

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**FORMALDEHİT’İN GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Oncorhyncus mykiss*)’NDAN
İZOLE EDİLEN HEPATOSİTLER ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fatoş YILDIZ
Danışman: Prof. Dr. Burak KAPTANER

VAN – 2023

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**FORMALDEHİT'İN GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Oncorhyncus mykiss*)'NDAN
İZOLE EDİLEN HEPATOSİTLER ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fatoş YILDIZ

Bu çalışma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FYL-2022-9839 No'lu proje olarak desteklenmiştir.

VAN – 2023

KABUL VE ONAY SAYFASI

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Burak KAPTANER danışmanlığında, Fatoş YILDIZ tarafından sunulan “Formaldehit’in Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhyncus mykiss*)’ndan İzole Edilen Hepatositler Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği’nin ilgili hükümleri gereğince 22/05/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile başarılı bulunmuş ve yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Mucip GENİŞEL

İmza:

Üye: Prof. Dr. Burak KAPTANER

İmza:

Üye: Doç. Dr. Abdulahad DOĞAN

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun / / tarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

İmza

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Fatoş YILDIZ



ÖZET

FORMALDEHİT’İN GÖKKUŞAĞI ALABALIĞI (*Oncorhyncus mykiss*)’NDAN İZOLE EDİLEN HEPATOSİTLER ÜZERİNDEKİ SİTOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YILDIZ, Fatoş

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Burak KAPTANER

Haziran 2023, 68 sayfa

Formaldehit sentetik resinlerin ve kimyasalların üretiminde yaygın olarak kullanılan bir kimyasaldır. Bu kimyasal, su ürünleri yetiştiriciliğinde, balıkların dış parazitik enfeksiyonlarının kontrolü için de kullanılır. Bu çalışmada, formaldehitin gökkuşağı alabalığı (*Oncorhyncus mykiss*)’ndan izole edilen hepatositler üzerindeki olumsuz etkilerinin araştırılması amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda, primer olarak kültürü yapılan hepatositler formaldehitin, 0, 12.5, 25, 50, 100, 200 ve 400 μM konsantrasyonlarına 24 saat süre ile maruz bırakıldı. Formaldehit sitotoksitesi, kültür medyumuna salınan laktat dehidrogenazın ölçümüne dayalı olarak belirlendi. Daha sonra, formaldehitin hepatositlerde antioksidan savunma sistem indikatörleri üzerindeki etkisi araştırıldı. Elde edilen sonuçlara göre, formaldehitin sitotoksiste yüzdesinde küçük artışlara sebebiyet verdiği ve bu artışların 50 μM ve daha üst formaldehit konsantrasyonlarında, istatistiksel olarak anlamlı oldukları, belirlendi. Bundan başka, formaldehit maruziyeti sonrası hepatositlerde, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon-S-transferaz aktiviteleri ile redükte glutatyon içeriğinde anlamlı azalışların olduğu gözlemlendi. Glutatyon peroksidaz aktivitesinin ise formaldehitin 200 ve 400 μM konsantrasyonlarında anlamlı artışlar gösterdiği belirlendi. Formaldehitin 100, 200 ve 400 μM konsantrasyonlarının hepatositlerdeki malondialdehit düzeylerinde anlamlı artışlara neden olduğu bulundu. Sonuç olarak, çevresel bir kirletici olan formaldehitin, gökkuşağı alabalığı hepatositlerinde antioksidan savunma üzerinde sarsıcı etkiler oluşturarak oksidatif stresi tetiklediği ve hücreler üzerinde sitotoksik etkiler gösterdiği belirlendi. Bu zararlı etkileri göz önünde tutularak, bilinçsizce kullanımından sakınılmalıdır.

Anahtar kelimeler: Antioksidan savunma indikatörleri, Formaldehit, Gökkuşağı alabalığı, Lipid peroksidasyonu, *Oncorhyncus mykiss*, Sitotoksiste.



ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE CYTOTOXIC EFFECTS OF FORMALDEHYDE ON HEPATOCYTES ISOLATED FROM RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*)

YILDIZ, Fatoş

Master Thesis, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Burak KAPTANER

June 2023, 68 pages

Formaldehyde is a chemical that is extensively used in the production of resins and chemicals. It is also used to control external parasitic infections of fish in aquaculture. In the present study, it was aimed to investigate the negative impacts of formaldehyde on hepatocytes isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Toward this aim, primary cultured hepatocytes were exposed to formaldehyde at concentrations of 0, 12.5, 25, 50, 100, 200, and 400 μM for 24 h. The cytotoxicity of formaldehyde was determined by lactate dehydrogenase release into the culture medium. Then, the effects of the formaldehyde on the antioxidant system indicators in the hepatocytes were investigated. According to the obtained results, the formaldehyde caused small increases in the percentage of cytotoxicity, and the increases were statistically significant at a concentration of 50 μM and above. Moreover, significant decreases in the activities of superoxide dismutase, catalase, and glutathione-S-transferase and the reduced glutathione content were observed in the hepatocytes after exposure. Meanwhile, the glutathione peroxidase activity displayed significant increases with concentrations of 200 and 400 μM of formaldehyde. Formaldehyde at concentrations 100, 200, and 400 μM were caused significant increases in the malondialdehyde levels of the hepatocytes. As a conclusion, it was determined that environmental pollutant formaldehyde induced oxidative stress, depressing antioxidant defense, and demonstrated cytotoxic impacts on the cells. Considering those its harmful effects, its unconscious usage should be avoided.

Keywords: Antioxidant defense indicators, Cytotoxicity, Formaldehyde, Lipid peroxidation, *Oncorhynchus mykiss*, Rainbow trout..



TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren danışman hocam Prof. Dr. Burak KAPTANER'e, laboratuvar çalışmalarım boyunca yanımda olan arkadaşlarım Handan AYKUT, Evin TOKA ve Sevnur ÖZCAN'a, tez yazım sürecinde bana destek olan arkadaşlarım Emine DOĞAN ile Furkan YILMAZ'a ve hayatımın her evresinde yanımda olan çok değerli aileme teşekkürü borç bilirim.

Bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesi için verdiği maddi destekten dolayı, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (Proje kodu: FYL-2022-9839) teşekkür ederim. Çalışma sırasında gösterdikleri yardımlardan dolayı, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün akademik ve idari personeline ve Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu çalışanlarına ayrıca teşekkür ederim.

2023

Fatoş YILDIZ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ	5
2.1 Formaldehit ve Fizikokimyasal Özellikleri	5
2.2 Formaldehitin Kullanım Alanları.....	6
2.3 Formaldehitin İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri	7
2.4 Formaldehitin Metabolizması	9
2.5 Formaldehitin Toksik Etki Mekanizması.....	10
2.6 Formaldehitin Hücre Proliferasyonu ve Ölümü Üzerindeki Etkisi.....	12
2.7 Formaldehitin Su Ürünleri Yetiştiriciliğindeki Kullanımı.....	12
2.8 Formaldehitin Balıklar Üzerindeki Etkileri	14
2.9 Formaldehitin <i>İn Vitro</i> 'da Belirlenen Toksik Etkileri.....	19
2.10 Çalışmanın Amacı.....	29
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	31
3.1 Balık Temini	31
3.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar	31
3.3 Hepatosit İzolasyonu ve Kültürü	32
3.4 Hücre Kültürü Kimyasal Uygulama	34
3.5 Biyokimyasal Analizler	34
3.5.1 Laktat Dehidrogenaz Sitotoksikite Testi	34
3.5.2 Homojenizasyon İşlemi.....	36
3.5.3 Total Protein Tayini	36
3.5.4 Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Tayini	37
3.5.5 Katalaz Aktivitesi Tayini	39

3.5.6	Redükte Glutasyon Tayini	41
3.5.7	Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi Tayini	42
3.5.8	Glutasyon-S-Transferaz Aktivitesi Tayini	44
3.5.9	Malondialdehit İçeriği Tayini	45
3.5.10	İstatistiksel Analizler	47
4.	BULGULAR.....	49
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	55
	KAYNAKLAR.....	61
	ÖZ GEÇMİŞ.....	69



ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 2. 1 Formaldehitin fizikokimyasal özellikleri.....	6
Çizelge 3. 1 Çalışmada kullanılan cihazların listesi	31
Çizelge 3. 2 Çalışmada kullanılan kit ve kimyasalların listesi	32
Çizelge 3. 3 LDH sitotoksosite ölçüm kiti içeriği	35
Çizelge 3. 4 SOD kit içeriği ve solüsyonların başlangıç konsantrasyonları	38
Çizelge 3. 5 SOD aktivitesi ölçümünde küvete pipetlenen bileşenler ve miktarları.....	39
Çizelge 3. 6 CAT fosfat tamponu (pH:7.5)'nun hazırlanması için gerekli olan solüsyonlar.....	40
Çizelge 3. 7 CAT fosfat tamponunun hazırlanması için gerekli olan A ve B solüsyonlarının karıştırılma miktarları	40
Çizelge 3. 8 CAT aktivitesi ölçümünde küvete pipetlenen bileşenler ve miktarları ..	41
Çizelge 3. 9 GPx kit içeriği ve solüsyonların başlangıç konsantrasyonları	43
Çizelge 3. 10 GPx aktivitesi ölçümünde küvete pipetlenen bileşenler ve miktarları	43
Çizelge 3. 11 GST aktivitesi ölçümünde küvete pipetlenen bileşenlerin miktar ve konsantrasyonları.....	44
Çizelge 3. 12 MDA ölçümünde küvete pipetlenen bileşenler, miktarları ve ölçüm prosedürü	46

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2. 1 Formaldehitin kimyasal yapısı.....	5
Şekil 2. 2 İnsanda formaldehitin metabolizması.....	11
Şekil 2. 3 Formaldehitin muhtemel toksik etki mekanizmalarının şematik gösterimi....	20
Şekil 3. 1 LDH-sitotoksosite ölçüm kiti çalışma prensibi	35
Şekil 3. 2 Protein standart eğrisi	37
Şekil 3. 3 GSH standart eğrisi.....	42
Şekil 3. 4 1,1,3,3-tetraetoksipropan standartlarından türetilen standart eğri	46
Şekil 4. 1 Formaldehite 24 saat süre ile maruz bırakılan gökkuşağı alabalığı hepatositlerinde, “% sitotoksosite” değerleri	49
Şekil 4. 2 Formaldehite 24 saat süre ile maruz bırakılan gökkuşağı alabalığı hepatositlerinde, SOD aktivitesindeki değişimler	50
Şekil 4. 3 Formaldehite 24 saat süre ile maruz bırakılan gökkuşağı alabalığı hepatositlerinde, CAT aktivitesindeki değişimler	50
Şekil 4. 4 Formaldehite 24 saat süre ile maruz bırakılan gökkuşağı alabalığı hepatositlerinde, GPx aktivitesindeki değişimler	51
Şekil 4. 5 Formaldehite 24 saat süre ile maruz bırakılan gökkuşağı alabalığı hepatositlerinde, GSH düzeyindeki değişimler	52
Şekil 4. 6 Formaldehite 24 saat süre ile maruz bırakılan gökkuşağı alabalığı hepatositlerinde, GST aktivitesindeki değişimler.....	52
Şekil 4. 7 Formaldehite 24 saat süre ile maruz bırakılan gökkuşağı alabalığı hepatositlerinde, MDA düzeyindeki değişimler	53



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
ΔA	Absorbans değişimi
λ	Dalga boyu
α	Alfa
A	Absorbans
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
g	Santrifüj kuvveti
hPa	Hectopascal
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mmol	Milimol
mM	Milimolar
nm	Nanometre
nmol	Nanomol
$O_2^{\bullet -}$	Süperoksit radikali
$OH^{\bullet}$	Hidroksil radikali
P	İstatistiksel önem derecesi
pH	Bir çözeltinin asitlik-bazlık derecesini gösteren ölçü birim
ppm	Milyonda bir birim
rpm	Dakikadaki devir sayısı

Simgeler	Açıklama
-----------------	-----------------

sn	Saniye
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
v	Hacim

Kısaltmalar	Açıklama
--------------------	-----------------

ADH1	Alkol dehidrogenaz 1
ADH3	Alkol dehidrogenaz 3
ALDH2	Aldehit dehidrogenaz 2
ANOVA	Varyans analizi
BSA	Sığır serum albümin
CAS	Kimyasal Özetler Servisi
CAT	Katalaz
CDNB	1-kloro-2,4-dinitrobenzen
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DPÇB	DNA-protein çapraz bağlantıları
DTNB	5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
EGTA	Etilen glikol tetraasedik asit
FDH	Formaldehit dehidrogenaz
FGSH	S-formilglutatyon
GPx	Glutatyon peroksidaz
GR	Glutatyon redüktaz
GSH	Redükte glutatyon
GST	Glutatyon-S-transferaz
H₂O₂	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit

Kısaltmalar	Açıklama
HMGSH	Hidroksimetil glutatyon
INT	2-(-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolyum klorür
L-15	Leibovitz 15
LC50	Letal konsantrasyon 50
LDH	Laktat dehidrogenaz
MA	Molekül ağırlığı
MDA	Malondialdehit
MTHFD1	Metilen tetrahidrofolat dehidrogenaz 1
NaCl	Sodyum klorür
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotit
NADP+	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (okside)
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (redükte)
OD	Optik dansite
OECD	Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü
PBS	Fosfat tuz tamponu
ROS	Reaktif oksijen türü
SOD	Süperoksit dismutaz
SPSS	Sosyal Bilimler için İstatistik Programı
TBA	Tiyobarbitürik asit
TCA	Triklor asetik asit
THF	Tetrahidrofolat
WST	Suda çözünür tetrazolyum



1. GİRİŞ

Formaldehit, endüstriyel ürünlerin ve tüketici ürünlerinin üretiminde kullanılan, renksiz, uçucu, alevlenebilir ve yüksek derecede reaktif bir aldehittir. Zehirli bir gaz olan formaldehit, birçok iç ve dış ortamda belirlenmiştir. Formaldehitin iç ortamlardaki varlığı, mobilyalar, sunta, yalıtım malzemeleri, boyalar, cilalar gibi yapı malzemeleri ve tekstil ürünlerinden kaynaklanır. Formaldehitin dış çevredeki kaynakları ise motorlu araçlar, enerji santralleri, yakma fırınları ve rafinerilerdir (Leso vd., 2020). Troposferde, hidrokarbonların oksidasyonu sırasında, doğal olarak oluşan bu gaz, topraktaki bitkisel artıkların ayrışma süreçlerinin erken evrelerinde meydana gelen bileşiklerden biridir (DSÖ, 2001). Güçlü bir koruyucu ve tespit edici (fiksatif) olan formaldehit, araştırmacılar ve klinisyenler tarafından bitkisel ve hayvansal doku örneklerinin saklanması için genellikle %10 konsantrasyonda tercih edilerek kullanılır (Musial vd., 2016). Ameliyathanelerde ve yoğun bakımlarda dezenfektan olarak (Ülger, 2005), peynir gibi bazı gıdalarda ise bakteriyostatik ajan olarak kullanılır (DSÖ, 2001). Formaldehit, su ürünleri sektöründe, balık hastalıklarının önlenmesi için yaygın olarak tercih edilen bir dezenfektandır. Balıkların dış yüzeylerindeki (deri, yüzgeçler ve solungaçlar) parazitik enfeksiyonların ve balık yumurtalarındaki fungal (*Saprolegnia* spp.) infestasyonların kontrol edilmesinde, banyo şeklinde uygulanarak, kullanılır (Francis-Floyd, 1996). İnsanlar formaldehite, farklı tüketici ürünlerini kullanırken ve bazı ürünlerin üretimleri esnasında maruz kalabilirler. İnsanların formaldehite kısa süreli maruziyeti neticesinde, konsantrasyona bağlı rahatsızlık, hapşırmaya, öksürme, bulantı, nefes darlığı ile gözler, burun ve boğazda tahriş meydana gelebilir (DSÖ, 2001). Sigara dumanında da bulunan bu zehirli gazın, yapılan çalışmalar sonucunda, insanlar için kanserojen olduğu kabul edilmiştir (Norliana vd., 2009).

Atmosferik oksijen, temel halinde iki eşleşmemiş elektrona sahiptir, bu durum oksijenin paramagnetik özellik kazanmasını sağlar. Bu özellik ise oksijenin (aktive edilmediği müddetçe) organik moleküller ile kolaylıkla etkileşimini engeller. Oksijende meydana gelen kısmi redüksiyon, süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$), singlet oksijen (1O_2), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$) gibi reaktif oksijen türleri (ROS)'nin üretimi ile sonuçlanır. Akuatik canlılar da dahil olmak üzere aerobik organizmaların hepsi birçok metabolik süreç ile ilgili enerji üretimi için moleküler oksijen (O_2)'e ihtiyaç

duyarlar ve metabolik süreçleri sırasında, mitokondriyal elektron transport zincirleri (kompleks I (NADH dehidrogenaz)'de ve ubiquinon ile kompleks III arasında) aracılığıyla ROS üretirler. ROS üretimi peroksizom ile plazma membranında da gerçekleşebilir (Birnie-Gauvin vd., 2017; Hoseinifar vd., 2020). Hücrelerdeki diğer endojen ROS kaynakları; $O_2^{\bullet -}$ üreten triptofan deoksigenaz, ksantin oksidaz ve sitokrom p450 redüktaz ile H_2O_2 üreten guanil siklaz ve glukoz oksidaz gibi oksidazlardır (Valavanidis vd., 2006). Normal fizyolojik koşullarda ROS'ların, konakçının savunması (örneğin patojenik mikroorganizmalara karşı), hücre siklusunun düzenlenmesi ve hücre sinyal yolları ile ilişkili farklı fonksiyonlarda rolleri vardır. ROS'lar düşük ve orta konsantrasyonlarda hasara neden olmazlar ancak yüksek konsantrasyonlarda DNA, protein ve lipidler gibi hücresel komponentlere zarar verirler. Özellikle hücre zarının çift tabakalı lipid düzenlenmesinde bozulmalar, doymamış yağ asitlerinde lipid peroksidasyonunun indüklenmesi ve membran yapısı ile geçirgenliğindeki değişimin bir sonucu olarak meydana gelebilir. Bundan başka, malondialdehit (MDA) ve doymamış aldehytler gibi lipid peroksidasyon ürünleri, protein çapraz bağlantılarının oluşumunu uyaran birçok proteinin aktivitesini değiştirebilirler. ROS'lar lipidlere ek olarak, protein yapı ve fonksiyonunu değiştiren protein karbonil oluşumunu uyararak, proteinlerdeki aminoasitleri direkt olarak modifiye edebilirler. Yaptıkları bu modifikasyon, spesifik proteazların indirgemesi neticesinde, proteolizise hassasiyete ve peptid zincirinin parçalanmasına neden olabilir. ROS'lar DNA'da bazların indirgenmesine, tek ve çift iplikli DNA kırıklarını meydana getirerek ve pürin, pirimidin ve şeker bağlı modifikasyonları oluşturarak DNA'ya saldırabilirler. DNA'da meydana gelen bu değişimler, mikronükleus oluşumu, kromozomal ve nükleer anomaliler, mutasyonlar, delesyonlar, traslokasyonlar ve DNA protein çapraz bağlantıları gibi genotoksik etkilere yol açabilir (Hoseinifar vd., 2020). Aerobik organizmalar, evrimsel süreçler sırasında, ROS'ların oluşturduğu hücresel hasarı engellemek için, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bir organizmada ROS oluşumu ile antioksidan mekanizmalar tarafından meydana getirilen ROS'ların nötralizasyonu arasındaki dengesizlik durumu, oksidatif stres olarak tanımlanır. Bazı zenobiyotiklere, özellikle de toksik kirletici kimyasallara maruz kalma, endojen ve eksojen ROS üretiminde dengesizliğe sebep olur, bu da akabinde antioksidan savunmanın zayıflamasına yol açar. Neticede biyolojik sistemlerde, dokularda hasar oluşturan,

enflamasyon meydana getiren, dejeneratif hastalıklara neden olan ve yaşlanmayı hızlandıran oksidatif stres durumu ortaya çıkar (Valavanidis vd., 2006; Hoseinifar vd., 2020). Birçok balık türünde belirlenmiş olan enzimatik antioksidan savunma, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz ve glutatyon-S-transferaz (GST) gibi enzimler ile temsil edilir. Süperoksit anyon radikali hücrelerde ilk olarak üretilen ROS'tur. SOD, süperoksit anyon radikali ($O_2^{\bullet-}$)'ni daha az reaktif bir tür olan moleküler oksijene ve hidrojen peroksit'e metabolize eder. Bu enzimin, sitozolik (Cu^{2+} -SOD ve Zn^{2+} -SOD) ve mitokondriyal (Mn^{2+} -SOD) formları mevcuttur. Oluşan H_2O_2 , CAT ve GPx tarafından elimine edilir. Hem mitokondri hem de peroksisomlarda aktif olarak bulunan CAT, ROS oluşumu ve eliminasyonunun dengede tutulabilmesi için H_2O_2 'yi, su ve O_2 'ye dönüştürür. CAT'ın modülasyonu, hücre proliferasyonu, farklılaşması, göçü ve apoptozis gibi birçok süreç için önemlidir. H_2O_2 ve organik hidrojen peroksitler, sitozolik ve mitokondriyal GPx tarafından, redükte glutatyon (GSH) varlığında, nötralize edilirler. Bu enzim lipid peroksidasyonunun engellenmesinde ve hücre membran hasarlarının önlenmesinde önemli rol oynar. Glutatyon redüktaz (GR) aktivitesi, daha önce GPx tarafından oksidize edilen redükte GSH'ın, yenilenmesi için gereklidir. Bu bileşikler suda daha çözünür hale getirmek için GST, GSH'ın farklı substratlara konjugasyonunu katalizler. GST, en çözünür ve hücre kompartmanlarında en yaygın olarak bulunan antioksidandır. Zenobiyotiklerin detoksifikasyonunda rol oynayan GST, toksik etkilere yol açan ve yüksek derecede reaktif olan elektrofilik bileşiklerin, dokudaki nükleofilik bileşenlere bağlanmasından önce elimine edilmelerini gerçekleştirir (Van der Oost vd., 2003; Monteiro vd., 2006; Hoseinifar vd., 2020). Balıklarda bu enzimlere ek olarak, E, K, B ve C vitaminleri, aminoasitler, peptidler (GSH) gibi düşük molekül ağırlıklı enzimatik olmayan antioksidanlar mevcuttur (Van der Oost vd., 2003; Hoseinifar vd., 2020). Geçmişte yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar, önemli bir çevresel kirletici olan formaldehitin antioksidan dengeyi bozarak, oksidatif stresi uyardığını ortaya koymuştur (Gulec vd., 2006; Bernardini vd., 2022).

Balıklardan izole edilen ve primer kültürü yapılan hücreler, Toksikoloji ve Ekotoksikoloji alanlarında, zenobiyotiklerin zamana ve doza bağlı toksik etki mekanizmalarının aydınlatılmasında sıklıkla kullanılan, önemli araçlardır (Bols vd., 2005). Toksikoloji çalışmalarında deney organizması olarak kullanımı, Ekonomik

Kalkınma ve İşbirliği Örgütü (OECD) tarafından tavsiye edilen gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)’nın hepatositleri ise geçmişten bu yana birçok deneysel çalışmada, bir kimyasal veya farklı kimyasal karışımlarının olumsuz etkilerinin ortaya çıkartılması için tercih edilen hücrelerdir (OECD, 2019; Segner, 1998; Tollefsen vd., 2008).

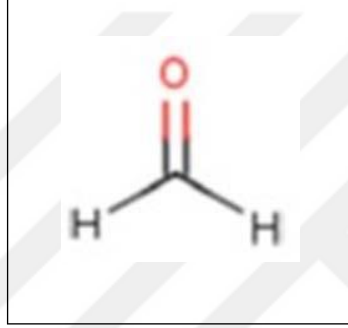
Formaldehitin *in vitro*’da balık hepatositleri üzerindeki toksik etkilerine ilişkin geçmişte yapılmış olan deneysel çalışmalara rastlanılamamıştır. Bu nedenle bu çalışmada, balık çiftliklerinde ektoparazitik enfeksiyonları kontrol etmek amacıyla yaygın olarak kullanılan bu kimyasalın, dünyada ve ülkemizde üretimi ve kültürü yaygın olarak yapılan gökkuşağı alabalığının hepatositleri üzerindeki negatif etkisinin, antioksidan sistem belirteçleri kullanılarak, araştırılması amaçlanmıştır.



2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

2.1 Formaldehit ve Fizikokimyasal Özellikleri

Kimyasallar içerisinde aldehit familyasında yer alan formaldehit, 1859 yılında keşfedilmiştir. Bu kimyasal, metanal, metaldehit, metilen oksit, oksimetilen, oksometan, formik aldehit ve fannofom olarak da bilinir. Moleküler formülü CH_2O 'dur. Kimyasal Özetler Servisi (CAS) Kayıt Numarası, 50-00-0'dır (Abdollahi ve Hosseini, 2014; Norliana vd., 2009). Formaldehitin kimyasal yapısı Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2. 1 Formaldehitin kimyasal yapısı (Norliana vd., 2009)

Formaldehit oda sıcaklığında keskin kokulu renksiz bir gazdır. Yüksek derecede reaktif olan formaldehit, kolaylıkla polimerizasyona uğrar. Formaldehit, yüksek derecede parlayıcı ve havada patlayıcı forma dönüşebilir. Formaldehit $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'nin üzerinde ayrışır. Su, alkoller ve diğer polar solventler içerisinde kolaylıkla çözünebilir. Tahmini buhar basıncı $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 5176 hPa 'dır. Formaldehitin $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'deki partiyon katsayısı (Log Pow)'nın 0.35 olduğu belirlenmiştir ki bu da formaldehitin düşük bir biyobirikim potansiyeline sahip olduğunu gösterir. Sıvı formaldehitin $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'deki yoğunluğu, 0.8153 g/cm^3 'tür. Kaynama ve erime noktası sırasıyla, $-19.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve $-92\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'dir. Formaldehitin Henry yasası sabiti ($3.4 \times 10^{-7}\text{ atm-cu m / mol}$) dikkate alındığında su yüzeylerinden buharlaşmaması beklenir ancak gaz olması nedeniyle kuru toprak yüzeylerinden volatilizasyonu çevresel koşullar altında gerçekleşir (Abdollahi ve Hosseini, 2014; Norliana vd., 2009). Formaldehitin fizikokimyasal özellikleri Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2. 1 Formaldehitin fizikokimyasal özellikleri (Norliana vd., 2009; DSÖ, 2001)

Özellik	Rapor edilen değer aralığı
Moleküler ağırlık (Dalton)	30.03
Erime noktası (°C)	-118 °C ile -92 °C aralığı
Kaynama noktası (°C, 101.3 kPa'da)	-21 °C ile -19 aralığı
Buhar basıncı (25 °C'de Pa)	516000
Sudaki çözünürlüğü (25 °C'de mg/L)	400000 – 550000
Henry yasası sabiti (25 °C'de Pa. m ³ mol /L)	$2.2 \times 10^{-2} - 3.4 \times 10^{-2}$
Log oktanol/su partisyon katsayısı (Log Kow)	-0.75 ile 0.35
Log organik karbon/su partisyon katsayısı (Log Koc)	0.70 ile 1.57
Konversiyon faktörü	1 ppm = 1.2 mg m ⁻³

Formaldehitin su içerisindeki ticari solüsyonları genel olarak formalin olarak isimlendirilir. Ticari formülasyonu genellikle, su ağırlığı başına düşen formaldehit gazı ağırlığının %37-40'dır. Formalinin paraformaldehite dönüşümünü (beyaz çökelti) önlemek için karanlıkta ve 4 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda saklanması gerekir. Formaldehitin sulu solüsyonlarında paraformaldehit oluşumunu önlemek için %10-15 metanol kullanılır, böylece stabilizasyonu sağlanır. Formalinin pH'sı ise 2.8 ile 4.0 arasında değişebilmektedir (Leal vd., 2018).

2.2 Formaldehitin Kullanım Alanları

Ticari formaldehitin çoğu metanolden üretilir. Formaldehit, farklı alanlarda, oldukça yaygın olarak kullanılır. Kimya endüstrisinde önemli bir solvent olarak kullanılır. Fenol ile formaldehitin yoğunlaşması ile sentezlenen fenolik polimerlerin üretimi için bir hammadDEDİR. Formaldehit ağırlıklı olarak resinlerin (üre-formaldehit resinleri, fenolik-formaldehit resinler, pentaeritritol vd) sentezinde kullanılır. Birçok alanda farklı amaçlar doğrultusunda, koruyucu ve dezenfektan olarak kullanılır. Ahşap fiksatiflerinde, kuru temizleme solüsyonlarında, solventlerde, brülör kullanımında, kimyasal üretiminde, petrol ürünlerinde, kağıt ve kağıt hamuru üretiminde, tekstil endüstrisinde, mobilya üretiminde kullanılan kontrplak yapıştırıcılarında, sentetik fiberlerde, boyalarda ve yalıtım köpükleri gibi ham materyallerde, halı malzemesi, döşeme kumaşları ve günlük

olarak kullanılan ev içi ürünlerde yer almakta ve kullanılmaktadır. Formaldehit hastanelerde dezenfektan olarak, araştırma/egitim laboratuvarlarında ise biyolojik örneklerin saklanabilmesi için bir koruyucu olarak kullanılır. Antimikrobiyal özelliğinden dolayı, kozmetiklerin, şampuanların, güneş losyonlarının, tıraş kremlerinin üretiminde kullanılabilir. Ziraat endüstrisinde bir dezenfektan gaz olarak kullanımının yanı sıra, jermisit, fungusit ve insektisit olarak kullanılır. Gıda endüstrisinde antibakteriyel ajan olarak ve gıdaların işlenmesinde koruyucu olarak kullanılır. Su ürünleri yetiştiriciliğinde, balıklarda dış parazit enfeksiyonlarının kontrolü için kullanılır. Deniz mahsullerinin bozulmasını engellemek ve raf ömrünün uzamasını sağlamak için de formaldehit kullanımı söz konusudur. Yaygın olarak kullanımından dolayı, milyonlarca insan formaldehite günlük olarak maruz kalabilmekte ve bu bileşik insanlar üzerinde olumsuz etkilere sebebiyet verebilmektedir (Norliana vd., 2009; Bernardini vd., 2022; Abdollahi ve Hosseini, 2014; Leal vd., 2018).

2.3 Formaldehitin İnsan Sağlığı Üzerindeki Etkileri

İnsanlar formaldehite farklı yollar ile maruz kalabilmektedir. Formaldehitin atmosfere salınımının ana kaynaklarını, özellikle otomobil egzoz gazı emisyonları ile otomobil emisyonlarındaki hidrokarbonların fotooksidasyonu gibi yanma süreçleri meydana getirir. Formaldehit emisyonlarına maruziyetin diğer yolları ise dezenfektan ve steril edici olarak kullanımı ile anatomi laboratuvarlarında ve morglarda tahnit sıvısı olarak kullanımından kaynaklanır. İnsanlarda formaldehite maruz kalımın bir başka önemli kaynağı da sigara dumanıdır. Formaldehite mesleki olarak maruz kalma temel olarak, üretim, işleme ve formaldehit içeren ürünlerin işlenmesi sırasında, soluma ve dermal yol ile meydana gelmektedir (Abdollahi ve Hosseini, 2014).

Formaldehitin akut inhalasyonu neticesinde meydana gelen predominant etkiler, ağız, burun ve üst solunum yolları müköz membranlarında, irritasyon ve yanmadır. Büyük miktarlardaki formaldehite akut olarak inhalasyon ile maruz kalma, halsizlik, mide bulantısı, kusma, akciğer iltihabı, baş ağrısı, solunum güçlüğü, öksürük, hırıltılı soluma, laringeal ve pulmonar ödem, laringeal spazm, bronko spazm, solunum bozukluğu, obstrüktif trakeobronşit, merkezi sinir sistemi depresyonu, konvulziyon ve komaya yol açabilir. Formaldehitin daha da ciddi miktarlarını soluma ile maruziyet sonucunda ise

pulmonar ödemine ortaya çıkması veya ölümcül olabilen solunum yetmezliğinin meydana gelmesi söz konusudur. Formaldehitin yutulması veya ağız yolu ile alınması (çoğunlukla intihar girişimleri neticesinde meydana gelir) neticesinde, ağız ile boğazda yanma ve irritasyon, gastrointestinal yolda yanma ve ülserasyon, göğüs veya karın ağrısı, bulantı, kusma, diyare, gastrointestinal hemoraji, metabolik asidoz, çok hızlı solunum, sarılık, proteinüri, hematüri ve böbrek yetmezliği gözlemlenebilir. Gaz halindeki formaldehite veya formaldehit içeren solüsyonlara sıçrama ile maruz kalma korozif etkiye neden olur ve ciltte yanma ile irritasyon meydana gelebilir, gözlerde ise görmede kalıcı değişikliklere ve körlüğe neden olan irrite edici etkiler gözlemlenebilir (Abdollahi ve Hosseini, 2014).

İnsanlarda yapılan deneysel çalışmalarda formaldehite kronik olarak inhalasyon yolu ile maruz kalma, üst solunum yolları, ağız, göz ve burun mukozalarında irritasyona neden olur ancak solunum yolunda hassaslaşmaya neden olmaz. Bununla birlikte, hassas kişilerde solunum yolundaki irritasyondan dolayı, astım belirtilerine yol açabilir. Formaldehit buharına mesleki olarak maruz kalma, akciğer fonksiyonunda, geçici ve geriye dönüşümlü düşüşlere neden olabilmektedir (Norliana vd., 2009; Abdollahi ve Hosseini, 2014).

Formaldehite mesleki olarak maruz bırakılan bireylerin bukkal ile nazal mukoza hücreleri ve periferik lenfositleri üzerinde bazı genetik etkiler gösterdiği gözlemlenmiştir ancak bazı çalışmalarda ise formaldehitin periferik lenfositler üzerinde genetik etkileri belirlenememiştir. Öte yandan formaldehite mesleki olarak maruz kalan kişilerde, mikronükleuslu bukkal ve nazal hücrelerin insidansında artışlar olduğu rapor edilmiştir. Formaldehit buharına maruz kalan kişilerden alınan periferik lenfositlerde ise, kromozomal aberasyonlar ve kardeş kromatid değişiklikleri gibi genetik etkiler belirlenmiştir. Bu nedenlerden dolayı, formaldehitin temas alanında, mutajenik potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir (Norliana vd., 2009). Formaldehitin insanlarda oluşturduğu genotoksik etkiye dair bazı deliller de mevcuttur. Örneğin, formaldehite mesleki olarak maruz kalan işçilerde, DNA-protein çapraz bağlantılarında artışlar olduğu ve kromozomal aberasyonlar ile kromozom parça kırıklarında anlamlı yükselmelerin meydana geldiği bildirilmiştir (Abdollahi ve Hosseini, 2014). Formaldehite maruz kalan işçilerin bronş hücrelerinde DNA global metilasyon değişiklikleri, akciğer hücrelerinde histon değişiklikleri ve burunda mikro RNA ekspresyonunun düzensizliği gibi olumsuzlukların meydana geldiği bildirilmiştir (Leso vd., 2020).

Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı, formaldehitin insanlardaki ve deney hayvanlarındaki karsinojen etkisine dair yeterli delillerin olduğunu bildirmiştir. Ajans, formaldehiti bir insan kanserojeni olarak sınıflandırarak (grup 1), bu kimyasalın insanlarda nazofaringeal kansere, sinonazal kansere ve lösemiye neden olduğuna dair yeterli delilin olduğunu rapor etmiştir (Norliana vd., 2009; Abdollahi ve Hosseini, 2014).

2.4 Formaldehitin Metabolizması

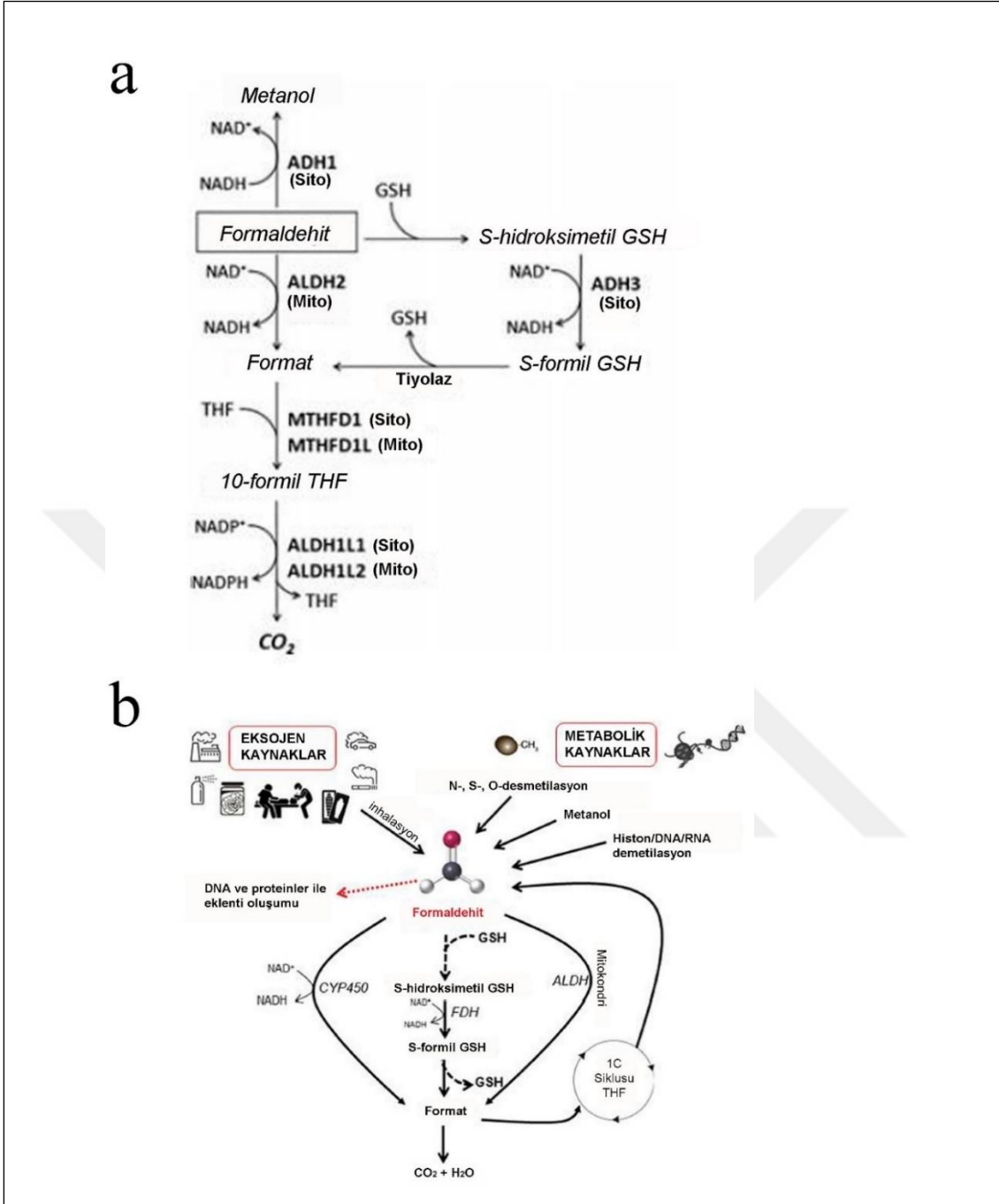
Çevresel bir kirlenici olarak, aynı anda birçok yerde bulunan ve eksojen olarak maruz kalınan formaldehit, insan vücudundaki enzimler ile katalizlenen reaksiyonlar tarafından endojen olarak da azımsanmayacak düzeylerde üretilir. Bununla birlikte, formaldehitin hücresel enzimler ile detoksifikasyonundan dolayı, formaldehit üretim ve bozulum süreçleri arasında kararlı bir denge sağlanmıştır ki bu da normal kan formaldehit konsantrasyonunun 0.1 M civarında olmasını sağlar (Tulpule vd., 2013). Formaldehitin insan vücudundaki biyosentetik kaynağına, bir ara ürün olarak meydana geldiği, metanol metabolizması örnek olarak verilebilir. Formaldehitin endojen kaynakları arasında, L-metionin, histamin ve metilalanin metabolizması yer alır ve bu metabolizma formaldehitin, pürinlerin ve diğer aminoasitlerin biyosentezi için anahtar bir aracı olmasını sağlar. Formaldehit bundan başka, DNA, RNA ve proteinlerin enzimatik oksidatif demetilasyonu ve aktifleşmiş nötrofil ve monositlerin miyeloperoksidasyon reaksiyonu sırasında da meydana gelir (Bernardini vd., 2022). Bütün hücrelerde esansiyel bir aracı olan ve zenobiyotikler ile aminoasitlerin metabolizması sırasında endojen bir aracı olarak oluşan formaldehit, hızlı bir şekilde metabolize edilir ve kanda ortalama 1.5 dk. yarılanma ömrüne sahiptir (Abdollahi ve Hosseini, 2014).

Formaldehit üretim süreçleri, metanol oksidasyonunu, metilamin deaminasyonunu ve histon demetilasyonunu kapsar. Bozulum süreçleri ise sitozolik alkol dehidrogenaz 1 (ADH1) aracılığı ile metanole indirgenmesini ve formata oksidasyonunu içerir. Formaldehitin oksidasyonu, sitozolik glutatyon (GSH) bağımlı alkol dehidrogenaz 3 (ADH3) (formaldehit dehidrogenaz = FDH) veya mitokondriyal aldehit dehidrogenaz 2 (ALDH2) ile katalizlenir. Formaldehit emildikten sonra hidroksimetil glutatyonu (HMGS) oluşturmak üzere glutatyon (GSH) ile spontan bir şekilde reaksiyona girer. ADH3, HMGS'ı S-formilglutatyon (FGSH)'a oksidize eder. FGSH, S-formilglutatyon

hidrolaz ile metabolize edilerek, format ve redükte GSH oluşturulur. ALDH2 formaldehit üzerinde direkt etki göstermesine karşın ADH3 için substrat, enzimatik bir reaksiyona bağımlı olmayan formaldehit-GSH birliğidir (Şekil 2.2) (Tulpule vd., 2013; Bernardini vd., 2022). Formaldehit türevi olan format, hem gama-amino bütirik asit reseptörleri hem de monokarboksilat taşıyıcı 1 ile hücrelerden dışarıya atılır. Format bundan başka, CO₂'yi oluşturmak üzere daha fazla oksidasyona uğrayabilir. Formatın oksidasyonu, tetrahidrofolat (THF) bağımlı, iki basamaklı bir süreçten oluşur. Format öncelikle, sitozolik metilen THF dehidrogenaz 1 (MTHFD1) veya mitokondriyal MTHFD1L tarafından katalizlenen ATP bağımlı enzimatik bir reaksiyonda, 10-formil THF'yi oluşturmak üzere THF ile reaksiyona girer. Daha sonra sitozolik ALDH1L1 ve bunun mitokondriyal izoformu ALDH1L2, 10-formil THF'yi CO₂'yi oluşturmak üzere oksidize eder (Şekil 2.2a). Katalaz da formatın oksidasyonuna, daha az bir ölçüde ve THF'ye bağımsız bir tarzda, katkı sağlayabilir (Tulpule vd., 2013). Formaldehit endoplazmik retikulumda, CYP2E1'i kapsayan sitokrom oksidaz CYP450 izoenzimleri tarafından da oksidize edilebilir (Şekil 2.2b) (Teng vd., 2001; Bernardini vd., 2022).

2.5 Formaldehitin Toksik Etki Mekanizması

Karbonil atomu formaldehitin elektrofilik bölgesidir. Bu bölge formaldehitin, hücre membranlarındaki, vücut sıvılarındaki ve dokularda yer alan DNA ile proteinlerin amino grupları gibi nükleofilik bölgeler ile kolaylıkla reaksiyona girmesini sağlar. Formaldehitin yüksek konsantrasyonları proteinlerin çökmesine sebep olur. Hücre içi seviyeleri alkol dehidrogenaz 3 (formaldehit dehidrogenaz) (ADH3) aktivitesini doyurduğu düzeye ulaştığında, formaldehit toksisitesi meydana gelebilir. Bu da metabolize edilmemiş sağlam moleküle, etkisini lokal olarak gösterme olanağı verir. Formaldehit çok düşük konsantrasyon aralığında bile çok güçlü bir çapraz bağ yapıcı ajandır. Bu ajanın reaksiyon mekanizması, formaldehitin başlangıçta, bir hidroksimetil ara ürünü oluşturmak üzere, hem aminoasit hem de DNA bazı üzerindeki primer amine eklenmesi ile gerçekleşir. Daha sonra hidroksimetil grubu, bir metilen köprüsü oluşturmak üzere ikinci bir primer amine kondanse olur (Abdollahi ve Hosseini, 2014).



Şekil 2. 2 İnsanda formaldehitin metabolizması (a: Tulpule vd., 2013; b: Bernardini vd., 2022), (Sito: sitoplazma; Mito: mitokondri; ADH1: alkol dehidrogenaz 1; ADH3: alkol dehidrogenaz 3 = FDH: formaldehit dehidrogenaz; ALDH2: aldehit dehidrogenaz 2; THF: tetrahidrofolat; MTHFD1: metilen THF dehidrogenaz 1)

2.6 Formaldehitin Hücre Proliferasyonu ve Ölümü Üzerindeki Etkisi

S-adenosil-L-metiyonin, N-hidroksimetil-L-arjinin, 1'-metil askorbijen, metanol, E-N-trimetil lizin ve metilamin gibi formaldehidojenik bileşikler, formaldehitin özel eksojen kaynaklarıdır. Endojen formaldehit, enzimatik metilasyon ve demetilasyon prosesleri sırasında, hidroksimetil gruplarından oluşabilmektedir. Çok yüksek derecede reaktif bir bileşik olan formaldehitin apoptozisin uyarımı, dolayısıyla da aterosklerozis ve nörodejeneratif süreçlerin patogenezi ile ilişkili olduğu düşünülür. Formaldehitin biyolojik etkisi, doza bağlıdır. Tümör hücreleri ve endotelial hücre kültürleri üzerinde yapılan *in vitro* çalışmalar, formaldehitin 10.0 M konsantrasyonunun nekrotik hücre ölümüne yol açtığını, 1.0 M konsantrasyonunun apoptozisi artırdığını ve mitotik aktiviteyi azalttığını, 0.5 ile 1.0 M aralığında ise hücre proliferasyonunu artırdığını ve apoptotik aktiviteyi azalttığını, göstermişlerdir. Formaldehidojenik bileşiklerden N-hidroksimetil-L-arjinin ve 1'-metil askorbijen ile formaldehit donörü resveratrolün, hücre proliferasyonunun potansiyel inhibitörleri oldukları düşünülmektedir. Bitkilerdeki endojen formaldehitin apoptozis ve hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde, görünür bir şekilde rolü mevcuttur. Formaldehitin genotoksik ve karsinojen etkileri DNA-protein çapraz bağlarını oluşturmaktan kaynaklanır. Dolayısıyla, apoptotik aktiviteyi azaltıcı etkiye sahip olan formaldehitin düşük dozları, çapraz bağa sahip olan hücrelerin artmasına neden olabilir (Szende ve Tyihák, 2010).

2.7 Formaldehitin Su Ürünleri Yetiştiriciliğindeki Kullanımı

Formaldehit, su ürünleri yetiştiriciliğinde en çok kullanılan kimyasal dezenfektanlardan birisidir. Profilaktik önlem ve terapötik amaçlar doğrultusunda kullanılabilir. Bir çok protozoon parazite (*Ichthyophthirius* spp., *Costia* spp., *Epistylis* spp., *Chilodonella* spp., *Scyphidia* spp., *Trichodina* spp.) ve monogenetik trematoda karşı son derece etkilidir (Leal vd., 2018) ancak bakteriyel ve fungal dış enfeksiyonların tedavisinde tercih edilmez. Bununla birlikte, formaldehitin yüksek konsantrasyonları, balık yumurtalarındaki mantarların kontrolü için kullanılır (Francis-Floyd, 1996).

Sıklıkla suya eklenilerek kullanılan formaldehitin tedavide uygulanan konsantrasyonu, balığı tehlikeye sokmayacak şekilde ve enfeksiyöz ajanı öldürmek için yeterli düzeyde olmalıdır. Bununla birlikte, enfeksiyöz ajanı öldürmek için gerekli olan konsantrasyon ile balık üzerinde negatif etkiye sebep olabilecek konsantrasyon arasındaki sınır, dar olabilir. Dolayısıyla uygulama dikkatli bir şekilde ve sadece gerçekten gerekli olduğunda yapılmalıdır. Uygun bir uygulama için, su akış hızı, tankın işlem hacmi, sıcaklık (en düşük seviyede olmalıdır) ve oksijen seviyeleri göz önünde tutulmalı ve daha önceden değerlendirme yapılmalıdır (Leal vd., 2018). Uygulamaya ilişkin olarak 2 tip sınıflandırma mevcuttur; kısa süreli banyo ve uzun süreli daldırma (banyo). Kısa süreli banyo uygulaması için en genel formaldehit dozajı, parazit ile enfekte olmuş balıkların tedavisinde, maksimum konsantrasyon düzeyine karşılık gelen ve 1 saate (genellikle 30 ile 60 dk. arasında değişir) kadar kullanılan, 250 mg/L'dir. Bununla birlikte, özel olarak dikkat edilmesi gereken bazı durumlar mevcuttur. Örneğin, tank ve kanallardaki salmon ve alabalıklar için 250 mg/L'lik konsantrasyon, su sıcaklığının sadece 10 °C'nin altındaki durumlar için uygundur. Su sıcaklığının 10 °C'nin üstündeki durumlarda ise formaldehitin en düşük konsantrasyonu (170 mg/L'ye kadar), daha uygundur. Su sıcaklığının 21 °C'nin üzerindeki koşullarda, formaldehit konsantrasyonu 150 mg/L'yi aşmamalıdır. Uzun süreli banyo uygulamalarında ise formaldehitin yaklaşık konsantrasyon aralığı, 12 saat için, 15 ile 25 mg/L arasındadır (Leal vd., 2018).

Uygulama sırasında formaldehit, balık tanklarının içerisindeki suyun oksijen düzeyini sarsar, su arıtma sistemindeki biyofiltrasyon prosesleri ile etkileşir ve çevreye karışır. Dolayısıyla formaldehit su kalitesini olumsuz olarak etkileyebilir. Formaldehitin inaktivasyonu için, atık formaldehit su ile dilüe edilmeli veya formaldehitin çevreye deşarjından önce konsantrasyonunu azaltmak amacıyla spesifik arıtma yöntemleri gerçekleştirilmelidir. Çevredeki formaldehit, oksidasyon, biyodegradasyon ve indirekt fotodegradasyon (direkt fotodegradasyon gerçekleşmez) gibi reaksiyonlar ile etkisizleştirilebilir. Formaldehitin, literatürde ileri sürülen akuakültür suyundan uzaklaştırma yöntemleri (havalandırma, biyodegradasyon, biyofiltrasyon, nötralizasyon gibi), tam anlamıyla etkili değildir ancak ileri oksidasyon arıtım yöntemlerinin iyi ve etkili alternatifler olabilecekleri ifade edilmiştir (Leal vd., 2018).

2.8 Formaldehitin Balıklar Üzerindeki Etkileri

Formaldehit/formalin uygulamalarının balıklar üzerindeki etkilerini ele alan çalışmalarda elde edilen sonuçlar tartışmalı olsa bile bir çok çalışmada negatif etkilerin meydana geldiği bildirilmiştir (Leal vd., 2018).

Formaldehitin 200 ppm konsantrasyonuna 2, 4 ve 6 saatlik süreler ile maruz bırakılan juvenil gökkuşağı alabalığı ve Coho salmonu (*Oncorhynchus kisutch*)’nda solungaç fonksiyonunda, asit-baz dengesinde ve hipofiz aktivitesindeki değişimler araştırılmıştır. Gökkuşağı alabalığında plazma, Cl^- , Ca^{2+} , total CO_2 ve interrenal vitamin C düzeylerinin devamlı bir şekilde ve uygulama süresi ile doğru orantılı olarak, düşüşler gösterdiği belirlenmiştir. Öte yandan Coho salmonunun bu metabolik parametrelerin, başlangıç seviyelerine yakın bir şekilde, devamlılıklarının sağlanabildiği gözlenmiştir. Coho salmonunda kan pH’sının ve alkali rezerv düzenlenmesinin de, özellikle uzun süreli uygulamalar sonrasında daha az etkilendiği bildirilmiştir. Oksijen tüketiminin her iki türde sarsıldığı ancak gökkuşağı alabalığında salmondakinden daha fazla düşüş gösterdiği belirlenmiştir. Her iki türde hemoliz belirlenmesine rağmen, bilirubineminin alabalıkta daha fazla meydana geldiği gözlenmiştir. Sonuç olarak, formaldehit uygulamalarının, gökkuşağı alabalığında daha fazla strese yol açtığı ifade edilmiştir (Wedemeyer, 1971).

Formalinin 200 ppm konsantrasyonuna 1 saat süre ile maruz bırakılan gökkuşağı alabalığında, hematokrit değerlerinin ve plazma glutamat oksaloasetik transaminaz aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. Formalinin 24 saat sonra tekrar uygulaması sonrasında ise kan glukoz düzeyinin anlamlı bir şekilde yükseldiği bildirilmiştir. Bir saatlik banyo uygulaması sonrasında karaciğerde, bazı hepatositlerde büzüşme ile sitoplazmik dejenerasyon gibi histopatolojik değişimler belirlenmiştir. İkinci kez yapılan formalin uygulaması (24 saat) sonrasında hepatositlerde vakuolizasyon, üçüncü kez yapılan uygulamadan sonra ise hepatositlerdeki normal sıralanmanın ortadan kalktığı ve sitoplazmik dejenerasyonun arttığı ifade edilmiştir (Williams ve Wooten, 1981).

Formalinin 25, 50 ve 75 mg/L konsantrasyonlarına 8 hafta boyunca sürekli olarak maruz bırakılan sazan balığı (*Cyprinus carpio*)’nda (0.8 g), karaciğer, solungaç, böbrek, dalak, bağırsak, kas ve deri dokularında histolojik değişimlerin meydana gelmediği gözlenmiştir. Bununla birlikte büyümede düşüş olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar sazan için formalinin 25-50 mg/L konsantrasyonlarının, 4 haftadan fazla ve sürekli olarak

maruz kalmadığı takdirde, güvenli olduğunu bildirmişlerdir. Öte yandan sazanda büyümenin, formalinin 75 mg/L konsantrasyonuna 2 haftadan daha fazla maruz kalınması durumunda, hafif olarak etkilendiği belirtilmiştir. Yapılan akut toksisite çalışmalarında ise formalinin 96 saatlik LC 50 konsantrasyonlarının, sazan balığı ve yılan kafalı balığın (*Channa striatus*) dokularında histolojik değişimler meydana getirmediği ancak gümüş barbusu (*Puntius gonionotus*)’nun formaline karşı (çalışılan türler arasında) en hassas tür olduğu ve 96 saatlik LC 50 konsantrasyonunun (83.0 mg/L) bu balığın solungaç sekonder lamellerinde hiperplaziye ve karaciğerinde ise yağlı dejenerasyona neden olduğu ifade edilmiştir (Chinabut vd., 1988).

Formalinin 25 µL/L konsantrasyonuna günlük 4 saat süre ile haftanın 4 ardışık günü ve 28 hafta boyunca maruz bırakılan kanal kedibalığı (*Ictalurus punctatus*)’nda solungaç morfometrisinde anlamlı farklılıkların meydana gelmediği gözlenmiştir. Formaline periyodik olarak maruz kalan balıklarda, kondisyon katsayısının 28 hafta sonrasında daha yüksek olduğu ve formaline atfedilebilecek ters etkilerin gerçekleşmediği bildirilmiştir (Bodensteiner vd., 1993).

Powell vd. (1996), formalinin 2 farklı konsantrasyonuna (167 ve 250 mg/L) her 2 haftada bir 12 hafta boyunca maruz bıraktıkları, iki farklı büyüklükteki (<16 cm ve >16cm) juvenil atlantik salmonu (*Salmo salar*)’nda, büyüme, hayatta kalma, plazma elektrolit düzeyi ve hematokrit gibi parametrelerde anlamlı değişimlerin meydana gelmediğini bildirmişlerdir.

Formaline haftada 2 kez (200 mg/L konsantrasyonda, statik banyo içerisinde 1 saat) maruz bırakılan juvenil gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)’nda büyüme oranında, iştahta, yem çevriminde ve kondisyon indeksinde, uygulamadan 6 ile 12 hafta sonra, anlamlı değişimlerin meydana gelmediği bildirilmiştir. Formalin uygulanan bireylerde, uygulanmayanlara kıyasla, daha iyi yüzgeç kondisyonu ve daha düşük korneal opasite insidansı belirlenmiştir. Dolayısıyla, haftada 2 kez tekrarlı 200 mg/L formalin uygulamasının, büyüme üzerinde herhangi bir negatif etki olmadan, hastalıktan koruma rejimi olarak gerçekleştirilebileceği ileri sürülmüştür (Speare ve Macnair, 1996).

Formalinin 167 ve 250 mg/L konsantrasyonlarına, 2 haftada bir 90 dk. süreyle, toplam 12 hafta maruz bırakılan juvenil atlantik salmonu (*Salmo salar*)’nda lamellar füzyon frekansında ve lamellar mukus hücresi sayılarında hafif ancak istatistiksel olarak anlamlı olmayan artışların meydana geldiği ve *Trichophyra piscium* indeksinde

uygulamadan 6 ile 12 hafta sonrasında anlamlı olmayan artışların meydana geldiği bildirilmiştir. Formalinin 200 mg/L konsantrasyonuna, 2 haftada bir 60 dk. süreyle, toplam 12 hafta maruz bırakılan juvenil gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)’nda ise solungaç lamellalarında bulunan mukus hücre sayısındaki artışa yönelik anlamlı etkilerin sınırlı olduğu bildirilmiştir. Her iki deneyde de lamellar epitel hücrelerinde, lamellar ödem ve nekroz belirlenmemiştir (Speare vd., 1997).

Jung vd. (2003), *Paralichthys olivaceus*’un eritrositlerini *in vitro*’da formaldehitin seri konsantrasyonlarına maruz (31.3 – 2000 ppm) bırakarak, hemoliz ve methemoglobin oluşumunu araştırmışlardır. Araştırmacılar ek olarak, formaline (0, 100, 212 ve 300 ppm) 3 saat süresince banyo yöntemi ile maruz bıraktıkları balıkta meydana gelen kısa süreli toksik etkileri, klinik testler kullanarak belirlemeye çalışmışlardır. *In vitro*’da uygulanan

formaldehit konsantrasyonlarının (31.3 – 2000 ppm) eritrositlerde hemolize neden olmadığı ancak 500 ppm ve üstündeki formaldehit konsantrasyonlarının, methemoglobin formasyonunu uyardığı gözlenmiştir. Formaline maruz bırakılan bütün balık gruplarında ise eritrosit sayısı, hemoglobin, hematokrit, ortalama küre hemoglobin konsantrasyonu ve ortalama immatür eritrosit yüzdesi değerlerinin yükseldiği bildirilmiştir. Formalinin serum alkalın fosfataz, aspartat aminotransferaz, laktat dehidrogenaz (LDH), potasyum,

klor, magnezyum ve inorganik fosfor düzeylerinde anlamlı artışlara neden olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte total protein düzeyinin anlamlı olarak azaldığı ifade edilmiştir. Öte yandan, lökosit sayısı, ortalama küre hacmi, ortalama küre hemoglobin,

albumin, glukoz, total kolesterol, yüksek dansiteli lipoprotein kolesterol, serbest kolesterol, alanin aminotransferaz, kalsiyum, kreatinin ve total bilirubin değerlerinde ise formalin maruziyeti sonrasında anlamlı değişimlerin meydana gelmediği rapor edilmiştir.

Buchmann vd. (2004), yumurta açıldıktan 2 ay sonra formaline maruz bırakılan gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yavrularında formaline sınırlı maruziyetin, (50 ppm, 1 saat) kuyruk yüzgeci epidermisinde, mukus hücrelerinin çoğalmasına sebep olduğunu gözlemlemişlerdir. Tam tersine, yüksek (200 – 300 ppm; 1 saat) veya uzun

süreli düşük (24 saat) konsantrasyonlarda formaline maruziyetin, mukus hücre yoğunluğunda azalmaya sebep olduğu belirlenmiştir. Formalinin epitel hücre membranlarında bleb (şişme)’lere, mukus salgısının arttığını işaret eden mukus hücre açıklıklarında genişlemeye ve yüzgecin farklı kısımlarında bölgesel farklılıklara sahip olan düzensiz hücre organizasyonuna sebep olduğu, ayrıca ifade edilmiştir.

Formalinin 150 ppm konsantrasyonuna 60 dakika süreyle maruz bırakılan çipura (*Sparus aurata*) ve levrek (*Dicentrarchus labrax*)’te, maruziyetten ve iyileşme periyodundan (24 ile 48 saat) sonra kandaki bazı stres indikatörlerinin değişimi araştırılmıştır. Plazma kortizol seviyesinin hem çipura hem de levrekte, formaline maruziyet sonrasında arttığı ancak levrekte plazma kortizol seviyesinin 48 saat içinde azaldığı bildirilmiştir. Plazma glukoz seviyesinin arttığı ve 48 saat boyunca yüksek kaldığı ifade edilmiştir. Plazma elektrolit değerlerinin, formalin uygulamasının ardından ve iyileşme periyodu sonrasında, balık türüne bağlı olarak, dalgalanmalar gösterdiği gözlenmiştir. Çipurada plazma P, Mg ve Cl değerlerinin formalin uygulamasından etkilenmediği, levrekte ise plazma Na ve Cl değerlerinin, formalin uygulamasının ardından, değişimler göstermediği bildirilmiştir. Hematokrit değerlerinin her iki balık türünde anlamlı olarak değişmediği gözlenmiştir. C-reaktif protein (CRP) seviyesinin çipurada formalin uygulamasından sonra azaldığı ve 48 saatlik iyileşme periyodu sonrasında yükselmediği bildirilmiştir. CRP düzeyinin levrekte ise, formalin uygulamasından sonra arttığı ve 48 saat içinde kontrol değerlerine döndüğü belirlenmiştir. Seruloplazmin seviyesinin her iki balık türünde de formalin maruziyetinden sonra azaldığı ve 48 saatlik iyileşme periyodunda normal değerlere dönmediği gözlenmiştir. Dolayısıyla, formalin uygulamasının hem çipura hem de levrek için potansiyel olarak stres kaynağı bir uygulama olduğu ifade edilmiştir (Yıldız ve Ergonul, 2010).

Formaldehitin 40 ve 120 ppm’lik konsantrasyonlarına 4 gün boyunca 30 dakika süreyle banyo yöntemi ile maruz bırakılan gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)’nda, son uygulamadan 24 saat sonra balıklardan alınan kan örneklerinde, hematokrit seviyesinin, eritrosit ve lökosit sayısının, hemoglobin düzeyinin ve eritrosit indeksinin azaldığı belirlenmiştir. Öte yandan, alınan doku örneklerinde (karaciğer, böbrek ve solungaç) MDA düzeyinin anlamlı bir şekilde yükseldiği, GPx ve GST aktivitelerinin arttığı ve redükte GSH düzeylerinin ise azaldığı bildirilmiştir (Yonar vd., 2014).

Gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)’nın formaldehite, 250 mg/L (1 saat) ve 500 mg/L (45 dk) konsantrasyonlarda maruziyeti sonrasında, solungaç lameli epitel ve pılar hücrelerinde dejenerasyon, lenfoid infiltrasyon, interlamellar nekroz, kas dokusu

dejenerasyonu, karaciğerde dilatasyon, damarlarda tıkanıklık, hepatositlerde dejenerasyon ve kan damarlarında hasar meydana geldiği bildirilmiştir (Bulut vd., 2015).

Formalinin gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) kalp dokusunda lipid peroksidasyon düzeyini ve oksidatif olarak modifiye protein (aldehit ve ketonik) seviyelerini artırdığı, belirlenmiştir. Ek olarak, kalp dokusunda LDH ve laktat düzeylerini yükselttiği, dolayısıyla oksidatif stresi tetiklediği gözlemlenmiştir (Tkachenko ve Grudniewska, 2016).

Formaline 0.17 ml/L konsantrasyonda ve 20 °C’de su banyosu şeklinde maruz bırakılan sazan (*Cyprinus carpio*)’da, banyodan hemen sonra, 24 saat sonra, 48 saat sonra ve 10 gün sonra, hematolojik ve biyokimyasal değerlerde değişimlerin meydana geldiği bildirilmiştir. Formalinin derideki münöz birimlerde çoğalmaya ve solungaç lamellalarında yapısal harabiyet ile münöz hücrelerde artışa neden olduğu gözlemlenmiştir (Chmelova vd., 2016).

İspir vd. (2017), gökkuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yavrularını (0.38 ± 0.07 g) formaline 50, 100 ve 200 ppm dozlarda 1 saat maruz bıraktıktan sonra balıkları 1 günlüğüne temiz ve formalinsiz suya aktarmışlardır. Araştırmacılar, tüm vücut homojenatlarında yaptıkları analizler sonucunda MDA düzeyinin yükseldiğini, CAT ile GPx aktivitelerinin ve GSH seviyesinin ise azaldığını gözlemlemişlerdir. İyileşme periyodu ardından ise, CAT aktivitesinin halen düşük olduğunu, GPx aktivitesi ile GSH düzeyinin ise kontrol değerlerine döndüğünü bildirmişlerdir. Dolayısıyla akut formalin inhalasyonunun tüm vücutta, oksidatif strese yol açabileceğini ve bazı sekonder toksik etkiler meydana getirebileceğini ifade etmişlerdir.

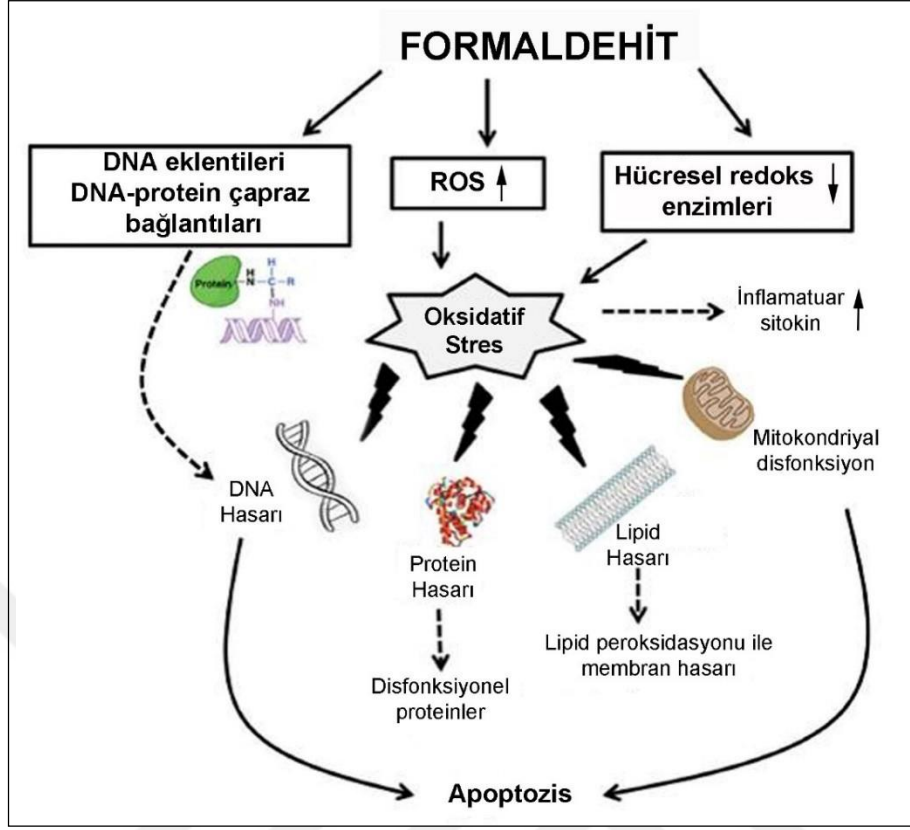
Formaldehitin 0, 20, 30, 40 mg/L konsantrasyonlarına, 15, 30 ve 60 günlük süreler ile maruz bırakılan sazan (*Cyprinus carpio*) balığında, solungaç primer lamellerinin yüzey epitel hücrelerinde çoğalma, solungaç sekonder lamellerinin epitel tabakasında ayrılma ve hepatositlerde vakuolizasyon gibi histopatolojik değişimlerin meydana geldiği, bildirilmiştir. Formaldehitin, bu olumsuz etkilerin yanı sıra, karaciğerde GST ve SOD aktivitelerini düşürdüğü, karaciğer ve solungaçlarda CAT aktivitesinde değişimlere yol açtığı gösterilmiştir. Sonuç olarak, formaldehitin kontrolsüz ve gereksiz kullanımından kaçınılmasının, oluşturabileceği olumsuz biyolojik etkileri azaltacağı, ifade edilmiştir (Kankaya ve Kaptaner, 2017).

Mersin balığı (*Huso huso* × *Acipenser ruthenus*) ve gökkuşığı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)’nda, formalinin akut toksisitesini araştıran ve kimyasal kalıntı analizlerini gerçekleştiren Hung vd. (2019), bu balık türlerinde 48 saatlik LC50 değerlerinin, sırasıyla 216 ppm ve 211 ppm olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada, 50 ppm konsantrasyonda formaline banyo yolu ile maruz bırakılmanın, solungaç lameli epitelinde ayrılmaya, hipertrofiye ve nekroza sebep olduğu ancak bu lezyonların maruziyetten 96 saat sonra iyileşme gösterdiği belirtilmiştir. 25 ppm banyo uygulaması sonrasında mersin balığının karaciğerinde kalıntı düzeylerinin 48. ve 96. saatlerde, kas dokusunda ise 1. saatte belirlenemediği bildirilmiştir. 50 ppm’lik uygulama sonrasında ise karaciğerde 96. saatte ve kasta 1. saate formalin kalıntısının belirlenemediği ifade edilmiştir. Gökkuşığı alabalığında, 25 ppm banyo uygulaması sonrasında, karaciğerde formalin kalıntı düzeylerinin 96. 168. ve 240. saatlerde belirlenemediği, kas dokusunda ise 8. saatten itibaren belirlenemediği gözlemlenmiştir. Çalışmada, 50 ppm’lik uygulama sonrasında ise karaciğerde 240. saatte ve kasta 24. saatten itibaren formalin kalıntısının belirlenemediği gösterilmiştir.

Formaldehite beş gün boyunca (150 ppm/30dk/gün) maruz bırakılan, sazan balığı (*Cyprinus carpio*)’nda, eritrosit miktarı, hemoglobin, hematokrit ve eritrosit indeks değerlerinde azalmaların olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, lenfosit, monosit, nötrofil hücre yüzdeleri ve lökosit miktarları ile serum glikoz ve kortizol seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı yükselmelerin olduğu tespit edilmiştir. Ek olarak kan hücre büyüklüklerinde, anlamlı artışlar gözlenmiştir (Şahan, 2020).

2.9 Formaldehitin *In Vitro*’da Belirlenen Toksik Etkileri

Farklı hücre hatlarının kültürü kullanılarak yapılan birçok deneysel toksikoloji çalışmasında, formaldehitin sitotoksik etkisi değerlendirilmiştir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda, formaldehit maruziyeti sonrasında, hücre canlılığında değişimlerin, oksidatif stresin ve apoptozisin meydana geldiği rapor edilmiştir (Şekil 2.3). Aşağıda formaldehitin toksik etki mekanizmasını ele alan bazı çalışmalara yer verilmiştir.



Şekil 2. 3 Formaldehitin muhtemel toksik etki mekanizmalarının şematik gösterimi (ROS: reaktif oksijen türleri) (Bernardini vd., 2022)

Formaldehitin, ratdan izole edilen hepatositlerde, reaktif oksijen türlerindeki artış ile birlikte, mitokondriyal membran potansiyelinde düşüşe ve mitokondriyal solunumda inhibisyona neden olduğu, bu etkilerin formaldehitin düşük konsantrasyonlarında (2 ve 4 mM) doza bağımlı bir şekilde meydana geldiği bildirilmiştir. Öte yandan, hücrelerdeki GSH içeriğinin doz artışı ile birlikte azaldığı, ifade edilmiştir. Yüksek formaldehit konsantrasyonlarında lipid peroksidasyon düzeyinin yükseldiği ve buna paralel olarak hücre ölümünün meydana geldiği gösterilmiştir. Hücrelerin, formaldehiti metabolize eden enzimlerin inhibitörlerine maruz bırakılması durumunda ise formaldehit sitotoksitesinin arttığı belirtilmiştir. Alkol dehidrogenaz ve aldehit dehidrogenaz inhibe edildiğinde, formaldehit sitotoksitesinde belirgin bir artış olduğu bildirilmiştir. GSH'ın azalması ile birlikte meydana gelen GSH bağımlı formaldehit dehidrogenaz inhibisyonunun, hepatositlerin formaldehite olan hassasiyetini artırdığı belirlenmiştir. Antioksidanların ve demir şelatörlerinin, formaldehit sitotoksitesine karşı koruyucu olduğu gözlenmiştir. Mitokondriyal permeabilite geçiş porunun açılmasını engellemek için ortama, siklosporin ve karnitin eklendiğinde ise sitotoksitesinin engellendiği

belirlenmiştir. Dolayısıyla formaldehitin toksik etkisini, mitokondri aracılığıyla, gerçekleştirdiği ifade edilmiştir (Teng vd., 2001).

Formaldehitin farklı dozları (0.1 – 10 mM)'na, 24, 48 ve 72 saatlik süreler ile maruz bırakılan, insan kolon karsinoma hücreleri (HT29) ile insan endotelial hücreleri (HUV-EC-C)'nde, 10 mM formaldehit konsantrasyonunun, hücrelere yüksek derecede hasar verdiği ve kültüre alınan hücreleri eradike ettiği gözlenmiştir. Formaldehitin 1 mM konsantrasyonunun, her iki hücre tipinde apoptozisi artırdığı ve mitozu azalttığı belirlenmiştir. Düşük doz (0.1 mM) formaldehitin ise hücre proliferasyonunu artırdığı ve apoptotik aktiviteyi azalttığı bildirilmiştir (Tyihák vd., 2001).

Lin vd. (2005), formaldehit, hidrojen peroksit ve formaldehit ile hidrojen peroksitin eşit molar konsantrasyonlarına maruz bırakılan rat aort endotelial hücrelerinde DNA-protein çapraz bağlantıları (DPÇB)'nin oluşumunu incelemişlerdir. Hücrelerin 0.05 ile 2 mM konsantrasyon aralığında, formaldehit, hidrojen peroksit ve formaldehit ile hidrojen peroksit'e 1.5 saat maruziyeti sonrasında, DPÇB oluşumunda, konsantrasyona bağımlı artışların gözlemlendiği bildirilmiştir. Hücrelerin 0.5 ile 4 saat arasındaki farklı zaman dilimlerinde, formaldehitin 0.05 ile 0.1 mM konsantrasyonlarına ve formaldehit ile hidrojen peroksitin 0.1 mM konsantrasyonuna maruz kalması sonucunda ise DPÇB oluşumunun zamana bağlı olarak arttığı belirlenmiştir. Formaldehitin 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 ve 2 mM konsantrasyonlarına 1.5 saat maruz bırakılan hücrelerde medyuma salınan LDH yüzdesinin, 2 mM formaldehit konsantrasyonunda, 0.05 – 2 mM arasındaki hidrojen peroksit konsantrasyonunda ve formaldehit ile hidrojen peroksitin bütün konsantrasyonlarında (0.01 – 2 mM) anlamlı artışlar gösterdiği bildirilmiştir. Hücrelerin farklı zaman aralıklarında (0.5 – 4 saat), formaldehitin 0.05 mM ve 0.1 mM konsantrasyonlarına maruziyet sonrasında ise medyuma salınan LDH düzeylerinde anlamlı değişimler tespit edilmemiştir ancak hidrojen peroksit ve formaldehit ile hidrojen peroksitin 0.05 ve 0.1 mM'lık konsantrasyonlarının farklı zaman dilimlerinde LDH salınımını artırdıkları gözlenmiştir. Dolayısıyla, formaldehit ve hidrojen peroksitin rat aort endotelial hücrelerine sinerjistik olarak hasar verebileceği ve formaldehitin düşük konsantrasyonlarının (0.0 – 0.1 mM) yaşlanma sırasında vücuttaki endotel hasarında payı olabileceği belirtilmiştir.

İnsan embriyonik böbrek hücre hattında (HEK293), formaldehitin farklı konsantrasyonlarının hücre proliferasyonu ve hücre siklusu üzerindeki etkisini araştıran

Qian vd. (2007), düşük doz (60 $\mu\text{mol/L}$) formaldehite 12 saat maruz bırakılan hücrelerde proliferasyonun uyarıldığını ancak yüksek formaldehit dozunda (240 $\mu\text{mol/L}$) hücre proliferasyonunun inhibe olduğunu (G1 fazındaki hücre yüzdesi artarken, S fazındaki hücre yüzdesinin azaldığı), belirlemişlerdir. Paralel olarak, yapılan morfolojik analizlerde hücre gelişiminin ve yoğunluğunun, formaldehitin 60 $\mu\text{mol/L}$ konsantrasyonunda, kontrol grubuna kıyasla, daha iyi ve yoğun olduğunu ancak formaldehitin 240 $\mu\text{mol/L}$ konsantrasyonunda hücrelerin gruplar halinde toplandığını ve dejenere olduklarını gözlemlemişlerdir.

İnsan vücudunda endojen olarak üretilen formaldehitin, nörodejenaratif hastalıklarda beyindeki seviyesi yükselmektedir. Formaldehitin nörotoksik etkisinin altında yatan moleküler mekanizmaları ve nöronların formaldehiti metabolize etme yeteneklerini belirlemek amacıyla serebral granüler nöronları formaldehite maruz bırakan araştırmacılar, formaldehit metabolizması ile ilgili farklı enzimlerin mRNA'larının, kültürde eksprese edildiklerini gözlemlemişlerdir. Elde edilen verilere göre, nöronların formaldehiti yaklaşık olarak 200 nmol/(saat $\times$ mg) civarında, sellular ve ekstrasellular format konsantrasyonlarındaki anlamlı artışlar ile birlikte metabolize ettikleri bildirilmiştir. Diğer taraftan, formaldehit uygulamasının nöronlarda glukoz tüketimini anlamlı olarak artırdığı, canlı nöronlarda laktat salınım oranını neredeyse iki misli yükselttiği ve nöronlardan dışarıya verilen antioksidan GSH miktarını güçlü bir şekilde uyardığı, ifade edilmiştir (Tulpule vd., 2013).

Formaldehitin düşük konsantrasyonlarına (10 $\mu\text{mol/L}$) maruz bırakılan HeLa hücrelerinde hücre gelişiminin uyarıldığı, yüksek konsantrasyonlarda (≥ 62.5 $\mu\text{mol/L}$) ise hücre gelişiminin inhibe olduğu belirlenmiştir. Hücrelerdeki, reaktif oksijen türü içeriğinin, maruziyet konsantrasyonunun artışı ile birlikte yükseldiği ve endojen formaldehit seviyesinin, yüksek formaldehit konsantrasyonlarında (125, 250, 500 ve 1000 $\mu\text{mol/L}$) arttığı ifade edilmiştir. Formaldehit dehidrogenaz ekspresyonunun ise 10 $\mu\text{mol/L}$ konsantrasyonda yükseldiği gözlenmiştir. Öte yandan, formaldehitin hücresel aktiviteyi etkilediği ve hücrelere giriş yaptığı ifade edilmiştir. Formaldehit maruziyetinin, hücrelerdeki endojen formaldehit içeriğini 24 saat içerisinde değiştirdiği ve formaldehit dehidrogenaz ekspresyonunu uyardığı belirlenmiştir. Formaldehit toksisitesinin, aldehit, hidroksil ve karboksil gruplarındaki karbon atomları tarafından meydana getirilmediği ifade edilmiştir. Sonuç olarak, formaldehitin hücre gelişimi ve endojen formaldehit

seviyesinin devamlılığının sağlanması için önemli bir sinyal molekülü olduğu ileri sürülmüştür (Ke vd., 2014).

Formaldehitin farklı konsantrasyonlarına (3200, 1600, 800, 400, 200, 100, 50 ve 0 μM) 1 saat süre ile maruz bırakılan insan doğal katil (NK) hücrelerinde, 400 μM 'dan yüksek olan konsantrasyonlarda, morfolojik değişimler (hücrelerde büzüşme ile hücre kolonilerinde bozulma) meydana geldiği gözlenmiştir. Hücre canlılığının 3200 ile 800 μM konsantrasyon aralığında, konsantrasyona bağımlı bir şekilde ve anlamlı olarak azaldığı ancak 800 μM 'dan daha düşük formaldehit konsantrasyonlarda, istatistiksel olarak anlamlı azalmaların meydana gelmediği bildirilmiştir. Formaldehit uygulamasının apoptotik/nekrotik hücreleri, 1600 ile 800 μM konsantrasyonlarda, anlamlı olarak artırdığı belirlenmiştir. NK hücrelerinden salgılanan perforin miktarında, formaldehit maruziyeti sonrasında, konsantrasyona bağımlı olarak anlamlı düşüşler gözlenirken, IFN- γ sekresyonunun formaldehitin sadece 3200 μM konsantrasyonunda anlamlı olarak azaldığı, granzim-B'nin ise anlamlı değişimler göstermediği belirlenmiştir. Dolayısıyla, insan NK hücrelerinin formaldehite duyarlı olduğu ve 800 μM 'lık formaldehit konsantrasyonunun, hücrelerin aktivitesini inhibe etmek için kritik bir konsantrasyon olabileceği ifade edilmiştir (Li vd., 2013).

Formaldehitin 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 ve 200 μM konsantrasyonlarına 12 saat süre ile maruz bırakılan, fare kemik iliği mezenşimal kök hücreleri (BM-MSC)'nde, hücre canlılığının 75 μM ve üzerindeki konsantrasyonlarda azaldığı belirlenmiştir. Formaldehitin DNA-protein çapraz bağlantılarının oluşumunu, 125 μM ve üzerindeki konsantrasyonlarda uyardığı gözlenmiştir. DNA iplik kırığının, yapılan proteinaz K modifiyeli komet ölçümünde, 75 ile 200 μM konsantrasyon aralığında doza bağımlı bir şekilde arttığı, standart alkali komet ölçümünde ise 125 μM üzerindeki dozlarda azaldığı gösterilmiştir. Kardeş kromatid değişiminin 125 μM üzerindeki dozlarda uyarıldığı, mikronükleus frekasının ise 125 μM üzerindeki dozlarda arttığı belirlenmiştir. DPÇB oluşumu ile canlılık oranı arasında negatif doğrusal bir korelasyon gözlenirken, DPÇB oluşumu ile kardeş kromatid değişimi ve mikronükleus frekansı arasında pozitif doğrusal ilişkiler tespit edilmiştir. Formaldehitin DNA hasarı yanıt genlerinin ekspresyonunda ise değişimlere yol açtığı, bildirilmiştir (She vd., 2013).

Shi vd. (2014), adenokarsinomik insan alveolar bazal epitel hücreleri (A549)'ni formaldehite maruz bırakmadan önce, bu hücreleri bir antioksidan olan selenyumun farklı

konsantrasyonları (1.25, 2.5, 5.0 ve 10.0 mg/L) ile 12 saat boyunca muamele etmişlerdir. Daha sonra, selenyum ile ön muameleye tabi tutulan A549 hücreleri ile hiç muamele edilmeyen hücreleri, formaldehitin 100 μ M konsantrasyonuna 4 saat süre ile maruz bırakıp, herhangi bir uygulamaya tabi tutulmayan kontrol hücreleri ile karşılaştırmışlardır. Elde ettikleri verilere göre, formaldehitin hücrelerde kontrol hücrelerine kıyasla, DPÇB oluşumunu uyardığını gözlemlemişlerdir. Formaldehit maruziyetinden sonra hücrelerde MDA içeriğinin anlamlı olarak yükseldiğini, SOD ve GPx aktivitelerinin ise azaldığını belirlemişlerdir. Ek olarak, nekroz faktör- κ B aktivasyonu ile aktivatör protein-I'in formaldehit etkisi ile uyarıldıkları gözlemlenmiştir. Sonuç olarak araştırmacılar, selenyum ön muamelesinin A549 hücrelerinde formaldehitin oluşturduğu negatif etkileri azalttığını ifade etmişlerdir.

Formaldehitin 0, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 ve 800 μ M konsantrasyonlarına 24 saat süre ile maruz bırakılan, insan beyin nöroblastoma (SK-N-SH), insan hepatosellular karaciğer karsinom (HepG2), insan akciğer karsinom (A549) ve insan retinal pigment epitel (ARPE-19) hücrelerinde, canlılığın dereceli olarak azaldığı belirlenmiştir. Hücre canlılığındaki anlamlı azalmaların, SK-N-SH ile ARPE-19 hücrelerinde, 200 μ M konsantrasyonda başladığı ve bu durumun konsantrasyon artışı ile birlikte devam ettiği gözlenmiştir. A549 hücrelerinde canlılıktaki anlamlı azalmanın ilk olarak, 400 μ M formaldehit konsantrasyonunda gözlemlendiği, HepG1 hücrelerinde ise 800 μ M formaldehit konsantrasyonunda meydana geldiği bildirilmiştir. Reaktif oksijen türü oluşumunun SK-N-SH hücrelerinde, formaldehite (200 μ M) maruziyetten 2 saat sonra başladığı belirlenmiştir. Formaldehitin 100 – 400 μ M konsantrasyonlarının, SK-N-SH hücrelerinde, ATP seviyesini anlamlı olarak düşürdüğü bildirilmiştir. Ek olarak mitokondriyal membran potansiyelinin, formaldehite (50 – 200 μ M) 24 saatlik maruziyet sonrasında, konsantrasyona bağlı olarak anlamlı azalmalar gösterdiği belirlenmiştir. Formaldehitin SK-N-SH hücrelerinde mitokondriyal solunum enzimlerinin (NADH dehidrogenaz, sitokrom c oksidaz ve akonitaz) inhibisyonuna sebebiyet verdiği ve konsantrasyona bağlı olarak parçalı çekirdekli hücre sayısını, apoptozu ve kaspaz 9 ile kaspaz3/7aktivitelerini artırdığı belirlenmiştir (Zerin vd., 2015).

Formaldehite (0, 50, 150, 250 ve 450 μ M) ve melatonine (0, 10, 50, 150 ve 250 μ M) 24 saat maruz bırakılan fare nöroblastoma (N2a) hücrelerinde canlılığın doza

bağımlı olarak azaldığı ve formaldehitin melatonini *in vitro*'da inaktive ettiği gözlenmiştir (Mei vd., 2016).

İnsan melanom hücreleri olan A375P ve SK-MEL-28 hücreleri, formaldehitin 0, 10, 25 ve 50 μ M konsantrasyonlarına sırasıyla 24 ve 72 saatlik süreler ile maruz bırakıldıktan sonra hücre proliferasyonundaki değişimler araştırılmıştır. Formaldehitin 10 ile 25 μ M konsantrasyonlarının hem A375P hem de SK-MEL-28 hücrelerinde proliferasyonu, anlamlı bir şekilde artırdığı gözlenmiştir. Formaldehitin 50 μ M konsantrasyonunun ise A375P hücre proliferasyonunu anlamlı olarak azalttığı fakat SK-MEL-28 hücre proliferasyonunda anlamlı bir değişime sebep olmadığı belirlenmiştir (Rizzi vd., 2014).

Rizzi vd. (2016), normal insan keratinositleri (HaCaT)'ni formaldehitin 10 ile 50 μ M konsantrasyon aralığına 2 gün maruz bırakmışlardır. Maruziyet sonrasında, formaldehitin 50 μ M konsantrasyonunun, asidik pH (5.5)'da hücre proliferasyonunu azalttığı belirlenmiştir. Bazik pH (8.0)'da ise formaldehitin hem 25 hem de 50 μ M konsantrasyonlarının canlılığı anlamlı olarak azalttığı gözlenmiştir. Formaldehite aynı konsantrasyon aralığında 3 gün süre ile maruz bırakılan insan melanoma hücreleri (SK-MEL-28)'nde ise, 10 μ M formaldehit konsantrasyonunun hem asidik (5.5) hem de bazik (8.0) pH'da hücre proliferasyonunu artırdığı ancak diğer konsantrasyonların (25 ve 50 μ M) hem asidik hem de bazik pH'da hücre proliferasyonunu etkilemediği bildirilmiştir.

Formaldehite (0, 50, 100 ve 200 μ M) 48 saat maruz bırakılan fare hipokampal nöronal hücrelerinde (HT22), hücre canlılığının 100 ile 200 konsantrasyonlarda sırasıyla, %40 ve %85 oranında azaldığı belirlenmiştir. Apoptozisin ise 100 μ M konsantrasyonda yaklaşık %12 oranında yükseldiği bildirilmiştir. Dolayısıyla, formaldehitin bu hücreler üzerinde nörotoksik etkiler gösterdiği ifade edilmiştir. Öte yandan, formaldehitin HT22 hücrelerinde, senesens ilişkili β -galaktosidaz, p16^{INK4a} ile p21^{CIP1} ekspresyonlarını artırdığı ve hücre gelişimini baskıladığı belirlenmiştir (Zhan vd., 2016).

Bai vd. (2017), formaldehitin hepatosellüler karsinom hücreleri (HepG2)'nde trigliserit metabolizması üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Formaldehitin 0.004 mmol/L ile 12.5 mmol/L konsantrasyon aralığına 24 ile 48 saatlik süreler boyunca maruz bırakılan hücrelerde, canlılığın doza bağımlı olarak azalmalar gösterdiği belirlenmiştir. Hücrelerdeki ekstrasellüler trigliserit seviyelerinin, 24 saatlik maruziyetin 0.004 mmol/L ile 0.1 mmol/L konsantrasyon aralığında, anlamlı artışlar gösterdiği gözlenmiştir. Sterol

düzenleyici element bağlanma proteini-1c, asetil-CoA karboksilaz, yağ asiti sentaz, mikrozomal trigliserit transfer proteini ve sn-1,2-diaçilgliserolaçıl düzeylerinin, formaldehit uygulamasından 24 saat sonra anlamlı yükselişler gösterdiği belirlenmiştir. İntrasellular trigliserit düzeyinin formaldehit uygulamasından 48 saat sonra ise azaldığı bildirilmiştir. Fosfo-AMP-aktifli protein kinaz α 'nın, bütün test edilen gruplarda, anlamlı artışlar gösterdiği, AMP aktifli protein kinazın ise 48 saatlik uygulamanın 0.1 mM konsantrasyonunda anlamlı olarak arttığı belirlenmiştir. Elde edilen veriler, kısa süreli formaldehit uygulamasının, hepatosellular trigliserit sentezini ve çok düşük dansiteli lipoprotein sekresyonunu uyararak trigliserit metabolizmasını dengelediği ancak uzun süreli formaldehit uygulamasının hepatositlerdeki trigliserit metabolizmasını bozduğu, bildirilmiştir.

İnsan bronşiyal epitel hücreleri (BEAS-2B) ile insan nazal hücreleri (RPMI2650) formaldehite bırakıldıklarında (0 – 500 μ M; 6 saat) hücre canlılığının doza bağımlı olarak azaldığı gözlenmiştir. Formaldehitin histon proteinleri ile eklentiler oluşturduğu ve spesifik olarak sitozolik H3 ile H4 histonların kovalent modifikasyonlarını inhibe ettiği belirlenmiştir. Bunun da BEAS-2B hücrelerinde kromatinlerin bir araya gelmesinde aberasyonlara neden olduğu ifade edilmiştir. Defektli kromatin montajının (asemblesinin), kanser ile ilişkili birkaç genin ekspresyonunda değişimler meydana getirdiği bildirilmiştir. Kromatin montajındaki inhibisyonunun ise formaldehit ile uyarılan karsinogeneze önemli rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (Chen vd., 2017a).

Formadehitin 60, 120 ve 240 μ M konsantrasyonlarına 24 saat süre ile maruz bırakılan rat faekromositoma türevi hücre (PC12) hattında, aldehit dehidrogenaz-2 ekspresyonu ile aktivitesinin yükseldiği belirlenmiştir. Apoptoziste, intrasellular reaktif oksijen türü düzeyinde ve 4-hidroksi-2-trans-nonanal ile MDA seviyelerinde de artışların olduğu gözlenmiştir. Hücrelerin, formaldehit uygulaması yapılmadan önce bir aldehit dehidrogenaz-2 inhibitörü olan daidzin (10 μ M) ile 30 dk muamele edilmesinin, formaldehitin hücrelerde oluşturduğu sitotoksisteyi ve oksidatif stresi antagonize ettiği belirlenmiştir. Daidzinin formaldehitin uyardığı apoptozisi ise azalttığı gözlenmiştir.

Diğer taraftan, formaldehit nörotoksitesini engelleyici özelliği olan hidrojen sülfid (H_2S)'in, formaldehitin aldehit dehidrogenaz-2 ekspresyonu ile aktivitesi üzerindeki artırıcı etkisini tersine çevirdiği bildirilmiştir (Chen vd., 2017b).

Formaldehite maruz bırakılan (20 ppm; 4 saat) insan deri keratinositlerinde canlılığın azaldığı ve apoptozisin arttığı belirlenmiştir. Beş farklı uçucu organik bileşiğin (hekzan, toluen, asetaldehit, formaldehit ve aseton) karışımına maruziyetin (her biri 20 ppm; 4 saat) ise hücrelerde DNA hasarı neticesinde meydana gelen apoptozisin tetikleyicisi olan serbest radikal üretimini, mitokondri potansiyel çöküşünü, lipid peroksidasyonunu ve proteazom inaktivasyonunu uyardığı bildirilmiştir (Dezest vd., 2017).

Formaldehitin 100 ile 900 μ M konsantrasyon aralığına, 24 saat süre ile maruz bırakılan fare nöroblastoma (N2a) hücrelerinde canlılığın doza bağlı olarak azaldığı belirlenmiştir. Ek olarak, formaldehitin hücrelerde apoptozu ve Tau proteininin hiperfosforilasyonunu artırdığı gösterilmiştir. Antioksidan bir polifenol olan resveratrolün ise formaldehitin hücrelerde oluşturduğu negatif etkileri azalttığı bildirilmiştir (He vd., 2017).

Formaldehite maruz bırakılan (0.01 ve 10 μ M; 9 gün) insan plasenta karyokarsinom (JEG-3) hücrelerinde proliferasyonun, doza bağlı olarak arttığı gözlenmiştir. Maruziyet sonrasında, hücrelerdeki siklin D1 ile siklin E1 protein ekspresyonu artarken, p21 ile p27 seviyelerinin azaldığı belirlenmiştir. Formaldehitin hücre göçünü artırdığı ve bir epitelyal belirteç olan E-kaderin ekspresyonunu azalttığı, öte yandan mezenşimal hücre belirteci olan N-kaderin ekspresyonunu ise artırdığı bildirilmiştir. Formaldehit maruziyetinden sonra hücrelerde, epitelyal mezenşimal transisyon ilişkili transkripsiyonel faktörlerinin regülasyonunda artışların olduğu belirlenmiştir. Formaldehitin, ROS üretimini ve bir antioksidan belirteç olan Nrf-2 ekspresyonunu artırdığı ancak endoplazmik retikulum stres-apoptozis ilişkili genin (p-eIF2) ekspresyonunu azalttığı gözlenmiştir. Sonuç olarak, formaldehitin JEG-3 hücrelerinin gelişimini ve göçünü uyardığı, bunu da endoplazmik retikulum stresini inhibe ederek ve Nrf-2 aktivitesini artırarak gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Lee vd., 2017).

Formaldehite maruz bırakılan (0, 5, 25 ve 50 μ M; 24 ile 48 saat) fare kardiyak ventriküler miyositleri (HL-1)'nde canlılığın doza bağlı olarak azaldığı belirlenmiştir. Formaldehitin hücrelerde apoptozisi uyardığı ve apoptozis ile ilişkili genlerin (Livin ve kaspaz-3) ekspresyonunu artırdığı gözlenmiştir. Hücrelerde, formaldehite maruziyet sonrasında, SOD aktivitesinin ve GSH seviyesinin düştüğü, MDA içeriğinin ise yükseldiği tespit edilmiştir. Dolayısıyla formaldehitin HL-1 hücrelerinde oksidatif stresi

tetiklediği bildirilmiştir. Diğer taraftan vitamin E'nin ortama eklenmesi ile birlikte formaldehitin oluşturduğu negatif etkilerin azaldığı rapor edilmiştir (Wu vd., 2017).

Formaldehite maruz bırakılan (0, 0.5, 1, 2mM; 4 ile 24 saat) insan orta kulak epitel hücreleri (HMEEC)'nde, canlılığının doza ve zamana bağlı düşüşler gösterdiği gözlenmiştir. Formaldehit maruziyetinden sonra hücrelerde enflamatuvar genlerin (tümör nekroz alfa ile musin) ekspresyonlarının uyarıldığı belirlenmiştir. Apoptozis yolakının ise mitokondriyal membran potansiyeli ve sitokrom oksidaz aktivitesindeki azalmalar ve kaspaz -9 ile kaspaz 3/7 aktivitelerindeki artışlar sonucunda, aktive olduğu bildirilmiştir (Kim vd., 2018).

İnsan konjunktivita türevi epitelial hücreleri formaldehite 100 ile 1200 µg/m³ konsantrasyonlarda, 15 ve 30 dk'lık süreler boyunca maruz bırakılmış, daha sonra 1 ile 24 saatlik iyileşme periyotlarının ardından hücrelerde canlılık, sitotoksikite ve enflamatuvar yanıtlardaki değişimler araştırılmıştır. Formaldehitin hücre canlılığında zamana bağlı olarak anlamlı azalmalar ve sitotoksik etkiler meydana getirdiği bildirilmiştir. Diğer taraftan formaldehitin hücrelerde, immun hücre koordinasyonu ve aktivasyonu ile ilişkili olan interlökin (IL)-6, makrofaj göç inhibitör faktörü ve kemokin ligand 8/IL-8 gibi sitokinlerin gen ekspresyonlarında artışlara sebep olduğu bildirilmiştir (Vitoux vd., 2018).

Formaldehitin, 50, 100, 200 µmol/L konsantrasyonlarına 12, 24 ve 48 saatlik süreler ile maruz bırakılan fare (BALB/c) kemik iliği hücrelerinde, canlılığın doza ve zamana bağlı olarak, anlamlı azalmalar gösterdiği belirlenmiştir. Yirmidört saatlik maruziyet sonrasında hücre canlılığındaki azalmalara ek olarak, peroksiredoksin II gen ekspresyonlarının azaldığı ancak ROS seviyelerinin yükseldiği bildirilmiştir. Peroksiredoksin II gen ekspresyonu inhibe edildiğinde, formaldehit ile uyarılan olayların arttığı gösterilmiştir. Peroksiredoksin II geninin ekspresyonunu inhibe etmek için küçük bir engelleyici RNA (siRNA) kullanıldığında, hücre büyümesi ile gelişimindeki inhibisyonun arttığı ve formaldehit tarafından uyarılan apoptozisin indüklendiği belirlenmiştir. Sonuç olarak, antioksidan savunma, apoptozis ve hücre proliferasyonu ile ilişkili olan peroksiredoksin II geninin, formaldehit ile uyarılan kemik iliği toksisitesi ile ilişkili olduğu ve bu genin inhibisyonunun formaldehitin oluşturduğu toksik süreci hızlandırdığı bildirilmiştir (Yu vd., 2019).

2.10 Çalışmanın Amacı

Bu tez çalışmasında, çevrede farklı kompartmanlarda varlığı tespit edilmiş olan ve endüstriyel alanlar ile su ürünleri sektöründe farklı amaçlar doğrultusunda kullanılan formaldehitin, gökkuşağı alabalığından izole edilen ve kültürü yapılan hepatositler üzerindeki toksik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç için çalışma kapsamında;

1. Formaldehitin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi, kültür medyumuna salınan LDH'ın ölçümü ile araştırıldı.
2. Formaldehitin hücrelerdeki antioksidan savunma sistemi üzerindeki etkisinin öğrenilmesi, SOD, CAT, GPx, GST aktivitelerinin ve redükte GSH düzeyinin ölçümleri ile gerçekleştirildi.
3. Formaldehitin hücrelerde oksidatif stres üzerine olan etkisi ise bir lipid peroksidasyon ürünü olan MDA ölçümü ile belirlendi.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Balık Temini

Çalışmada toplam 4 adet juvenil gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhycus mykiss*) (çatal boy: 19.5 – 25.5 cm; total ağırlık: 90 – 203 g) kullanıldı. Balıklar yerel bir alabalık üretim çiftliğinden (Şifa Alabalık Üretim Çiftliği, Gürpınar, Van) temin edildi. Bu tez çalışması Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (VAN YUHADYEK) tarafından onaylanmıştır (Karar no: 2023/05-39, protokol no: E-353485). Çalışma sırasında VAN YUHADYEK Yönergesi'nde yer alan etik ilkelere riayet edilmiştir.

3.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan cihazlar ve kimyasallar sırasıyla, Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2'de sunulmuştur.

Çizelge 3. 1 Çalışmada kullanılan cihazların listesi

Cihaz	Marka	Model
Buzdolabı	Beko	BK 9330 NF
Derin dondurucu	Beko	BK 7971 DF
Hassas terazi	Sartorius	ED 224S
İnkübatör	BINDER	KB 115
İnvert mikroskop	Leica	DMI 6100 B
Manyetik karıştırıcı	Heidolph	MR 3001
Mikroplaka okuyucu	Thermo Scientific	Multiskan GO 51119300
Mikroskop	Leica	DM500
pH metre	Sartorius	PB-11
Soğutmalı Mikrosantrifüj	Thermo Fisher Scientific	Micro CL 17R 75002455
Spektrofotometre	Shimadzu	UV-VIS 1201
Spektrofotometre	Shimadzu	UV-VIS 1800
Steril laminar akış kabini	ESCO	AC2-4E1
Sterilizatör	Sanyo	MOV-212S
Su banyosu	-	-
Ultrasonik homojenizatör	Jencons	LU7 8UA
Vorteks	Heidolph	Reax Top QO4

Çizelge 3. 2 Çalışmada kullanılan kit ve kimyasalların listesi

Kimyasal/Sarf	Marka	Katalog numarası
Formaldehit	Sigma-Aldrich	F8775
Antibiyotik- antimikotik solüsyon	Sigma	A5955
2-Fenoksietanol	Fluka	77699
CaCl ₂ .2H ₂ O	Merck	1.02382
CDNB (1-kloro-2,4-dinitrobenzen)	Fluka	24440
DTNB (5,5'-ditiyobis-2nitrobenzoik asit)	Sigma	D8130
EGTA (Etilen glikol tetraasedik asit)	Fluka	O3777
Etanol (% 99.9)	Merck	1.00983
Fosfat tuz tamponu (PBS)	Sigma	P4417
Laktat dehidrogenaz sitotoksisite ölçüm kiti	Abcam	ab65393
Glutasyon peroksidaz kiti	Randox-Ransel	RS505
Süperoksit dismutaz kiti	Randox-Ransod	SD125
GSH (Redükte Glutasyon)	Sigma-Aldrich	G4251
H ₂ O ₂	Merck	1.08597
KCl	Merck	1.04936
KH ₂ PO ₄	Merck	1.04873
Kollajenaz	Sigma-Aldrich	C5138
Leibovitz's 15 (L-15) Medyum	Gibco	11415-149
Kollajen-I kaplı hücre kültür plakası (24 kuyulu)	Stemcell Tech.	CellAdhere™ 100-0364
MgSO ₄ .7H ₂ O	Merck	1.05886
Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich	71640
NaCl	Merck	1.06404
NaH ₂ PO ₄	Fluka	71496
NaHCO ₃	Merck	1.06329
Sodyum sitrat tribazik dihidrat	Sigma	S4641
Tripan mavisi	Sigma	T8154

3.3 Hepatosit İzolasyonu ve Kültürü

Hepatosit izolasyonu, Mortensen vd. (2006)'den bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirildi. İzolasyon öncesinde, bütün cam malzemeler ve cerrahi aletler kuru hava

sterilizatöründe, steril edildi (120 °C’de ve 2 saat). Hücre izolasyonu sırasında gerekli olan medyum (L-15) ve solüsyonlar ise 0.22 µm por açıklığına sahip olan şırınga filtresinden (Isolab Pes, Almanya) geçirilerek steril edildi. Çalışmada kullanılan balıklar, 2-fenoksietanol kullanılarak (320 µL/L) anestezi edildi. Balıklar anestezi edildikten sonra, etil alkol ile spreylendi ve steril koşullarda karınları açılarak karaciğerleri dikkatli bir şekilde çıkartıldı. Çıkartılan karaciğerler, kalsiyum içermeyen solüsyon-I [NaCl (7.41 g/L), KCl (0.36 g/L), MgSO₄ (0.15 g/L), Na₂HPO₄ (1.6 g/L), NaH₂PO₄ (0.4 g/L), NaHCO₃ (0.31 g/L) ve EGTA (20 mg/L)] içerisine alındı ve bu solüsyon içerisinde, bistüri ve pens yardımı ile küçük parçalara ayrıldı. Dokudaki kanın iyice uzaklaşması için parçalar sivri uçlu pens yardımıyla iyice küçültüldü. Küçültülen parçalar oda sıcaklığında 10 dk. süre ile yıkandı aynı zamanda damar ve bağ dokusu gibi kaba doku kısımları ince uçlu pensler yardımı ile uzaklaştırıldı. Bu solüsyon içerisinde kanı uzaklaşana kadar bekletilen parçalar, bu kez solüsyon-I ile aynı içeriğe sahip olan ancak EGTA yerine CaCl₂ (0.11 g/L) ve kollajenaz (Type IV, 0.05 mg/mL) içeren solüsyon-II içerisine alındı. Karaciğer dokuları bu solüsyon içinde yaklaşık 15 dk. tritürasyon işlemine tabi tutuldu. Tritürasyon işlemi, önce kesik uçlu mavi pipet ucu ile daha sonra mavi ve sarı pipet uçları ile yapıldı. İyice ayrıışan doku parçaları, bu kez steril bir enjektörün iğnesinden, sonrasında da steril bir insülin enjektörünün iğnesinden geçirilerek dokuya ait hücrelerin iyice ayrışması sağlandı. Bu işlemler tamamlandıktan sonra, elde edilen süspansiyon, 90 g’de 5 dk. boyunca santrifüj edildi ve süpernatant pipetlenerek uzaklaştırıldı. Pellet üzerine, antibiyotik-antimikotik (v/v, % 1), NaHCO₃ (0.38 g/L) ve glutamin içeren serumsuz L-15 eklendi. Hücreler bu medyum ile tekrar süspanse edildikten sonra 90 g’de 5 dk. santrifüj edildi. Bu işlem bir önceki basamaktan kalan enzimin uzaklaşması için toplam üç kez tekrar edildi. En son yıkamadan sonra medyum ile tekrar süspanse edilen hücreler bu defa 90 g’de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant alındı ve çöken hücrelerin üzerine L-15 eklenerek tekrar süspanse olmaları sağlandı. Süspansiyon içindeki hücrelerin canlılığı, tripan mavisi eksklüzyon metodu ile Thoma lamı kullanılarak test edildi ve hücre canlılığının % 90’dan fazla olduğu belirlendi. Hücre süspansiyonunda mL’deki hücre sayısı da belirlendikten sonra hücreler, kollajen-I kaplı 24 kuyulu mikropakanın (CellAdhere™) her kuyusuna 5×10⁵/mL olacak şekilde ekildi. Kimyasal uygulamasından önce hücreler, kuyu tabanına iyice bağlanabilmeleri için, 12

°C’de 24 saatliğine O₂/CO₂’siz steril inkübatör içinde ve nemli hava atmosferde inkübasyona bırakıldı. Hücreler daha sonra invert mikroskop ile incelendi.

3.4 Hücre Kültürü Kimyasal Uygulama

Test kimyasalı olan formaldehit (CH₂O; MA: 30.03; %36.5 – 38, yoğunluk: 1.09 g/ml (25 °C’de), katalog no: F8775, Sigma-Aldrich) solüsyonu, L-15 içinde çözülerek stok solüsyonu (0.1 M) hazırlandı. Hücrelerin 24 saatlik inkübasyonunun tamamlanmasının ardından, Formaldehitin 0, 12.5, 25, 50, 100, 200 ve 400 µM konsantrasyonları hücrelere, 24 saat süre ile uygulandı. Çalışmada seçilen formaldehit konsantrasyonları ve uygulama süresi Zerin vd. (2015), He vd. (2017) ve Yu vd. (2019)’ne göre belirlendi. Her konsantrasyon için 4 tekrerrür yapıldı. Kontrol grubuna ait kuyudan alınan medyum ise sadece L-15 ile değiştirildi. Uygulama, O₂/CO₂’siz steril inkübatör içinde nemli hava atmosferinde ve 12 °C’de gerçekleştirildi.

3.5 Biyokimyasal Analizler

3.5.1 Laktat Dehidrogenaz Sitotoksosite Testi

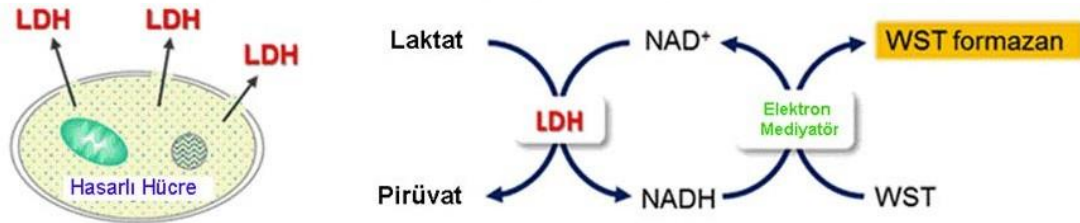
Bütün hücrelerde stabil bir enzim olarak bulunan LDH, plazma membranında hasar meydana gelmesi durumunda kültür medyumuna içine salınır. Bu nedenle medyum içinde LDH ölçümü, sitotoksosite çalışmalarında, bir indikatör olarak kullanılır. Formaldehitin hepatositlerde oluşturduğu hasarın belirlenmesi, yukarıda sözü edilen prensibe dayalı olarak dizayn edilmiş olan ticari bir kit kullanılarak ve bu kitin protokolüne uyularak, ölçüldü. Kitin çalışma prensibine göre, hasarlı hücrelerden kültür medyumuna salınan LDH, laktatı oksidize ederek NADH oluşturur ve oluşan NADH, WST (suda çözünür tetrazolyum) ile reaksiyon vererek sarı renk meydana getirir (Şekil 3.1). Oluşan sarı rengin yoğunluğu, lizise uğrayan hücre sayısı ile direkt olarak ilişkilidir (Abcam LDH-sitotoksosite ölçüm kiti kitapçığı, katalog no.: ab65393). Kit içeriği Çizelge 3.3’te belirtilmiştir.

Formaldehit uygulamaları tamamlandıktan sonra hücrelerin bulunduğu medyum nazıkçe pipetlenerek ependorf tüplere alındı. Tüpler, 600 × g’de 10 dk santrifüj edildi.

Elde edilen süpernatantlardan 10 µL alınarak, ELISA plaka (96 kuyulu) kuyularına yüklemeler yapıldı. Daha sonraki aşamalar, kit protokollerine uyularak gerçekleştirildi.

Çizelge 3. 3 LDH sitotoksosite ölçüm kiti içeriği

Kit içeriği
1. WST substrat karışımı
2. LDH ölçüm tamponu
3. Hücre lizis solüsyonu
4. Durdurma solüsyonu
5. LDH



Şekil 3. 1 LDH-sitotoksosite ölçüm kiti çalışma prensibi (Anonim, 2023)

Doksan altı kuyulu ELISA mikropalakasına, 4 farklı tipte örnek yüklendi. Mikropalakaya yüklenen örnekler, aşağıda belirtilmiştir:

1. Arka plan kontrol (AK) kuyusu: İçinde hücre bulunmayan sadece kültür medyumunun bulunduğu kuyu.
2. Düşük kontrol (DK) kuyusu: Kontrol grubuna ait hücrelerin bulunduğu kuyulardan alınan medyumunu içeren kuyu.
3. Yüksek kontrol (YK) kuyusu: İçerisine lizis solüsyonu eklenerek hücrelerin hasar verildiği kuyuya ait medyumunu içeren kuyu.
4. Test örneği (TÖ): Formaldehit uygulaması yapılan gruplardan alınan medyumunu içeren kuyular.

Tüm örnekler mikropalakaya yüklendikten sonra, daha önce kit prosedüründe belirtildiği şekilde hazırlanmış olan LDH reaksiyon karışımı (200 µl WST substrat karışımı + 10 mL LDH ölçüm tamponu), her kuyuya 100 µl miktarında eklendi. Sonrasında mikropalaka hafifçe çalkalanarak kuyular içerisindeki sıvının karışması sağlandı ve örnekler oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Son aşamada, örneklerin optik dansite (OD) değerleri 450 nm dalga boyunda, mikropalaka okuyucu kullanılarak,

belirlendi. Her konsantrasyon ve kontrol grubu için 4 ölçüm yapıldı. Ölçümler 2 tekerrürlü olarak gerçekleştirildi. Yüzde sitotoksosite değerleri, kit prosedüründe verilen formüle (eşitlik 3.1) göre hesaplandı. Sonuçlar “% sitotoksosite” olarak ifade edildi.

$$\text{Sitotoksosite (\%)} = \frac{(\text{TÖ absorbans değeri} - \text{DK absorbans değeri})}{(\text{YK absorbans değeri} - \text{DK absorbans değeri})} \times 100 \quad (3.1)$$

3.5.2 Homojenizasyon İşlemi

Hücrelere formaldehitin 24 saatlik uygulanmasının sona ermesinin ardından, yukarıda belirtildiği şekilde, medyum nazikçe pipetlenerek alındı. Kuyu tabanında bulunan hücreler, 1 mL soğuk PBS (pH: 7.4) ile süspanse edildi. Süspansiyon halindeki hücreler (5×10^5 hücre/mL), ultrasonik parçalayıcı kullanılarak, 60 sn süre ile 20 W’da lizise maruz bırakıldı. Oluşan homojenat, $15000 \times g$ ve 4°C ’de 20 dk boyunca, santrifüj edildikten sonra süpernatantlar alınarak, tüplere aktarıldı. Süpernatantlar, antioksidan savunma sistemi parametrelerinin analizi için -20°C ’de saklandı.

3.5.3 Total Protein Tayini

Antioksidan savunma sistemi belirteçlerinin mg protein cinsinden ifade edilebilmesi için, her örneğe ait süpernatantta, total protein tayini yapıldı. Total protein konsantrasyonu, Bradford, (1976) metoduna göre, BSA’nın standart olarak kullanılması ile belirlendi.

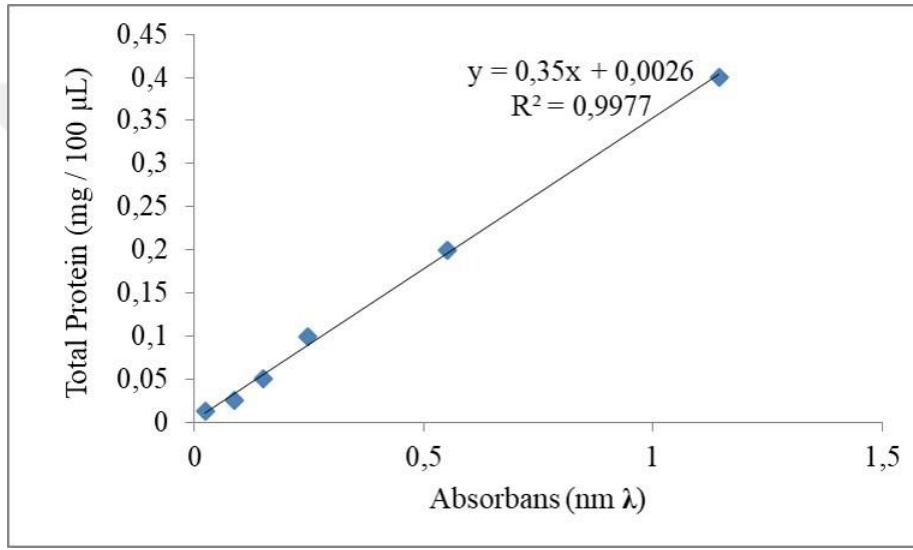
Prensip: Bradford metodu, proteine bağlanan Coomasie Blue G boya reaktifinin, 595 nm dalga boyundaki maksimum absorpsiyonunun, spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanır.

Ayırıcılar:

1. Konsantre Bradford solüsyonu (5×): 100 mg Coomasie Blue G, 50 mL absolü etanol ve 100 mL ortofosforik asit (%85) içerisinde çözülür. Solüsyon distile su ile 200 mL’ye tamamlanır ve filtre edilir.

2. Bradford solüsyonu (1×): Yukarıda hazırlanan solüsyonun, distile su ile 1:5 oranında sulandırılması ile hazırlanır.

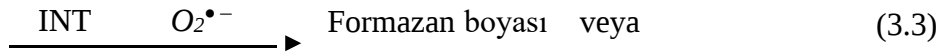
Yöntem: Standartlar hazırlanmadan önce 10 mg/mL stok BSA hazırlandı. Stoktan seri sulandırılmalar yapılarak 0.0125 ile 0.400 mg/100 µL aralığında toplam 6 adet standart oluşturuldu. Standartlar, kör ve örnekler Bradford solüsyonu ile muamele edildikten sonra, 20 dk boyunca karanlık ortamda inkübe edildi. Spektrofotometre köre karşı sıfırlandıktan sonra, örnek ve standartların absorbansı, 595 nm dalga boyunda ölçüldü. Standartlara karşılık gelen absorbans değerlerine dayalı olarak standart eğri oluşturuldu (Şekil 3.2). Örneklerdeki total protein konsantrasyonu eğriye ait fonksiyon kullanılarak belirlendi. Sonuçlar mg/mL protein olarak ifade edildi.



Şekil 3. 2 Protein standart eğrisi

3.5.4 Süperoksit Dismutaz Aktivitesi Tayini

Prensip: SOD, oksidatif enerji basamağında üretilen süperoksit anyon radikalının ($O_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dismutasyonunu katalizler. Ölçüm yönteminde, ksantin ve ksantin oksidaz kullanılarak oluşturulan süperoksit radikali, 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolyum klorür (INT) ile reaksiyona girer ve kırmızı formazan boya formu oluşur. SOD aktivitesi, bu reaksiyonun inhibisyon derecesinin, 505 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile belirlenir. Ölçümde bir ünite SOD, INT'nin indirgenmesinin %50'lik inhibisyonunu gerçekleştirir (eşitlik 3.2, 3.3 ve 3.4) (Suttle ve McMurray, 1983).



Yöntem: SOD aktivite ölçümü Ransod kit (Randox Lab., İngiltere) kullanılarak ve kit protokollerine uyularak gerçekleştirildi. Kit içeriği ve solüsyonların başlangıç konsantrasyonları Çizelge 3.4’te gösterilmiştir.

Çizelge 3. 4 SOD kit içeriği ve solüsyonların başlangıç konsantrasyonları

Kit İçeriği	İçerik bileşeni	Solüsyonların başlangıç konsantrasyonları
Substrat karışımı	Ksantin	0.05 mmol/L
	INT	0.025 mmol/L
Tampon	CAPS	40 mmol/L, pH 10.2
	EDTA	0.94 mmol/L
Ksantin oksidaz		80 U/L
Standart		4.6 U/mL

Kör (S1) olarak, 0.01 mol fosfat tamponu (pH: 7.0) kullanıldı. Kalibrasyon stok solüsyonu, 10 mL distile su içerisinde hazırlandı (4.6 U/mL). Standartlar (S2–S6), kitte belirtildiği şekilde, 0.01 mol fosfat tamponu ile kalibrasyon stok solüsyonundan seyreltilerek hazırlandı. Ölçüm yapılırken, süpernatant (25 µL) küvet içerisine pipetlendikten sonra üzerine 850 µL substrat karışımı eklendi. Küvet iyice çalkalandıktan sonra, bu karışımın üzerine 125 µL ksantin oksidaz ilave edildi (ölçüm sırasında küvet içine pipetlenen bileşenler Çizelge 3.5’te belirtilmiştir). Küvetteki karışımın başlangıç absorbansı (A_1), 505 nm’de 37 °C’de, 30 sn sonra ölçüldü ve kaydedildi. Ölçüme 3 dk boyunca devam edildi ve son absorbans değeri (A_2), 3. dk’nın sonunda kaydedildi. Kör ve standartların absorbans değerlerinin ölçümleri de yukarıda belirtildiği gibi gerçekleştirildi. Her konsantrasyon ve kontrol grubu için 4 ölçüm yapıldı.

Hesaplama: Standart ve örneklere ait dakika başına düşen absorbans değeri ($\Delta A = (A_2 - A_1)/3$) hesaplandıktan sonra bütün standartlar ve örnekler için % inhibisyon değerleri kitte verilen ve aşağıda belirtilen formüllerden (eşitlik 3.5 ve 3.6) yararlanılarak

hesaplandı (S1 için reaksiyon inhibisyonu gerçekleştirilmediği için % inhibisyon değeri 100'dür).

$$100 - \frac{(\Delta A_{s \text{ tan dart / dk}} \times 100)}{(\Delta A_{k\ddot{o}r / dk})} = \%Inhibisyon \quad (3.5)$$

$$100 - \frac{(\Delta A_{\ddot{o}rnek / dk} \times 100)}{(\Delta A_{k\ddot{o}r / dk})} = \%Inhibisyon \quad (3.6)$$

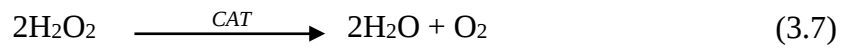
Standartların U/mL olarak bilinen konsantrasyonlarına karşılık gelen % inhibisyon değerleri kullanılarak bir standart eğri oluşturuldu. Örneklerdeki SOD aktivitesi, bu eğriden elde edilen denklem kullanılarak, "U/mL" olarak belirlendi. Elde edilen sonuçlar daha sonra her örnekte belirlenen total protein miktarına oranlanarak, spesifik aktivite hesaplandı. Sonuçlar "U/mg protein" olarak ifade edildi.

Çizelge 3. 5 SOD aktivitesi ölçümünde küvete pipetlenen bileşenler ve miktarları

Küvete pipetlenen bileşenler	S1 (μL)	S2-S6 (μL)	Örnek (μL)
Örnek	25	-----	-----
Standart	-----	25	-----
Örnek sulandırıcı	-----	-----	25
Substrat karışımı	850	850	850
Ksantin oksidaz	125	125	125

3.5.5 Katalaz Aktivitesi Tayini

Prensip: CAT, H₂O₂'nin suya ve oksijene ayrışmasını katalizler (eşitlik 3.7).



H₂O₂, ışığı 240 nm dalga boyunda absorbe eder. H₂O₂'in CAT tarafından dekompoze olma oranı, spektrofotometrik olarak 240 nm dalga boyunda, tespit edilir.

Yöntem: Süpernatantlarda CAT aktivitesinin ölçümü, H_2O_2 'nin tüketilme esasına dayalı olan ve Aebi (1974), tarafından geliştirilen yöntemle göre gerçekleştirildi. Ölçümler 240 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak yapıldı.

Kullanılan solüsyonların hazırlanışı:

a. CAT fosfat tamponunun hazırlanışı: Çizelge 3.6.'da belirtilmiş olan A (KH_2PO_4) ve B (Na_2HPO_4) solüsyonları, 50 mM konsantrasyon için verilen miktarlarda tartılarak hazırlanır. Hazırlanan A ve B solüsyonları daha sonra Çizelge 3.7'de belirtilen miktarlarda karıştırılır. Bu şekilde CAT fosfat tamponunun hazırlanmış olur (pH: 7.5).

Çizelge 3. 6 CAT fosfat tamponu (pH:7.5)'nin hazırlanması için gerekli olan solüsyonlar

Kimyasal	Molekül Ağırlığı	50 mM için	Son Hacim (distile su)	Solüsyon Adı
KH_2PO_4	136.09 g/mol	6.805 g	1000 mL	A
Na_2HPO_4 (susuz)	141.96 g/mol	7.098 g	1000 mL	B

Çizelge 3. 7 CAT fosfat tamponunun hazırlanması için gerekli olan A ve B solüsyonlarının karıştırılma miktarları

50 mM Fosfat tamponu (1 L) (pH 7.5)	A Solüsyonu (mL)	B Solüsyonu (mL)
	160	840

b. H_2O_2 solüsyonu: Absorbansı 0.500 nm'ye ayarlanmış olan H_2O_2 'li fosfat tamponudur. Yaklaşık 300 mL fosfat tamponu (pH 7.5, 50 mM) koyu renkli bir cam şişeye aktarılır. Spektrofotometre 240 nm'de fosfat tamponuna göre sıfırlandıktan sonra renkli şişedeki tampona 10-20 μ L miktarında H_2O_2 ilave edilir ve absorbans 0.500 nm oluncaya kadar bu işleme devam edilir. H_2O_2 ilavesi yapılırken şişe ara ara karıştırılır.

Deneyin yapılışı: Örnek ve tampon kuvartz küvet içerisine Çizelge 3.8'de belirtilen miktarlarda bırakıldıktan sonra küvetin ağzı bekletilmeden kapatılır ve küvet hızlıca alt-üst edilerek absorbansı okunur. Absorbans azalması, her 15 sn'de bir defa olmak üzere 5 dakika süre ile kaydedilir (aktivite hızlı ilerliyorsa 10 sn'de bir kayıt yapılır ve lineer azalma tespit edilirse okuma sonlandırılabilir). Hesaplamada 1 dakikalık lineer absorbans azalmasının en yüksek (A_1) ve en düşük (A_2) değerleri esas alınır.

Çizelge 3. 8 CAT aktivitesi ölçümünde küvete pipetlenen bileşenler ve miktarları

Tampon	Kör (mL)	Örnek (mL)
Fosfat Tamponu	2.99	-
H ₂ O ₂ solüsyonu	0.01	-
H ₂ O ₂ 'li fosfat tamponu	-	2.99
Süpernatant	-	0.01

Hesaplama: $\Delta A = \epsilon \times c \times L$, [(A: absorbans/dk, ϵ : ekstinksiyon katsayısı, c: konsantrasyon, L: ışık yolu (1 cm)]

H₂O₂'nin 240 nm'deki milimolar ekstinksiyon katsayısı: 0.0436 mM⁻¹cm⁻¹
(0.0436 mM = 0.0436 mmol/L = 0.0000436 mmol/mL = 0.436 μ mol/mL = 43.6 nmol/mL)

Her konsantrasyon ve kontrol grubu için 4 ölçüm yapıldı. Süpernatantta “nmol/dk/mL” olarak hesaplanan sonuçlar, daha sonra her örnekte belirlenen total protein miktarına oranlanarak, CAT'ın spesifik aktivitesi hesaplandı (eşitlik 3.8). Sonuçlar, “tüketilen H₂O₂ (nmol)/dk/gr protein” olarak ifade edildi.

$$\text{CAT aktivitesi (nmol/dk/mL)} = \frac{\Delta A}{43.6} \times \text{Küvet içi sulandırma} \left(\frac{V_t}{V_o} \right) \times \text{SO} \quad (3.8)$$

ΔA : Absorbansın 240 nm dalga boyunda dk başına değişimi

V_t : Toplam hacim

V_o : Örnek hacmi

SO: Süpernatant sulandırma oranı

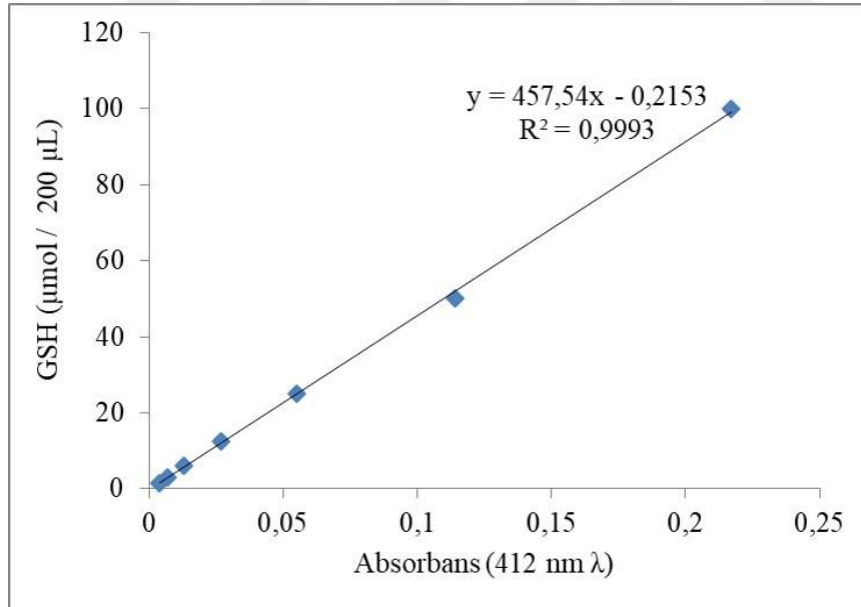
3.5.6 Redükte Glutatyon Tayini

Prensip: Redükte GSH içeriği tayininde süpernatanttaki sülfidril gruplarının, fosfat tamponu kullanılarak, 5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) ile reaksiyonu sonucu oluşan sarı rengin absorbansı, 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür (Beutler, 1984).

Ayıracılar:

1. Fosfat tamponu: 0.3 M NaH_2PO_4 distile su ile hazırlandı (pH: 6.8).
2. DTNB (Ellman Ayıracı): 40 mg DTNB'nin, % 1'lik 100 mL sodyum sitrat çözeltisi içerisinde çözünmesi ile hazırlandı.

Yöntem: Tüplerin içerisine 200 μL süpernatantlardan alındıktan sonra üzerine 1 mL fosfat tamponu eklendi. Vortekslenen tüpler, sıcak su banyosunda 60 $^\circ\text{C}$ 'de 10 dakika bekletildi. Tüpler oda sıcaklığına getirildikten sonra her tüpe 200 μL DTNB ayıracı eklenerek Shimadzu UV/VIS-1800 marka spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda, köre karşı okuma yapıldı. Standartlar için 100 μM GSH stok çözeltisi fosfat tamponu içerisinde taze olarak hazırlandı. Daha sonra stok çözeltisi seyreltilerek 200 μL 'de 100 μM ile 1.563 μM konsantrasyon aralığında 7 adet standart hazırlandı. GSH standartlarına karşılık gelen absorbans değerlerinden oluşturulan standart eğri (Şekil 3.3)'ye göre örneklerdeki GSH konsantrasyonu hesaplandı. Her konsantrasyon ve kontrol grubu için 4 ölçüm yapıldı. Sonuçlar " $\mu\text{mol GSH} / \text{mg protein}$ " olarak ifade edildi.

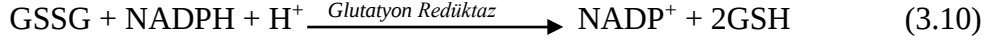
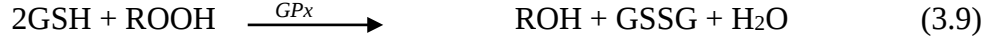


Şekil 3. 3 GSH standart eğrisi

3.5.7 Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi Tayini

Prensip: GPx, GSH'ın kümen hidroperoksit (ROOH) ile oksidasyonunu katalizler (eşitlik 3.9). Oluşan oksidize glutasyon (GSSG), glutasyon redüktaz varlığında NADPH

kullanılarak, NADP⁺'ye GSH'a dönüştürülür (eşitlik 3.10). Absorbanstaki düşüş 340 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür (Paglia ve Valentine, 1967).



Yöntem: Glutasyon peroksidaz aktivitesi, Ransel kit (Randox Lab., İngiltere) kullanılarak ve kit protokollerine uyularak gerçekleştirildi. Kit içeriği ve solüsyonların başlangıç konsantrasyonları Çizelge 3.9'da, ölçüm sırasında küvet içine pipetlenen bileşenler ise Çizelge 3.10'da gösterilmiştir. Küvet içerisine süpernatanttan 20 µL bırakıldı ve üzerine 1000 µL reajan eklendi. Daha sonra bu karışıma 40 µL kümen hidroperoksit eklendi. Küvet iyice çalkalandıktan sonra, örneğin ve körün başlangıç absorbansı, 340 nm dalga boyunda 37 °C'de, 1 dk sonra spektrofotometrik olarak ölçüldü. Absorbans okuması 1 ve 2 dk sonra tekrar edildi.

Çizelge 3. 9 GPx kit içeriği ve solüsyonların başlangıç konsantrasyonları

Kit İçeriği	İçerik bileşeni	Solüsyonların başlangıç konsantrasyonları
Reajan	GSH	4 mmol/L
	GR	≥ 0.05 U/L
	NADPH	0.34 mmol/L
Tampon	Fosfat Tamponu	0.05 mol/L, pH: 7.2
	EDTA	4.3 mmol/L
Kümen hidroperoksit		0.18 mmol/L

Çizelge 3. 10 GPx aktivitesi ölçümünde küvete pipetlenen bileşenler ve miktarları

Küvete pipetlenen bileşenler	Örnek (µL)	Kör (µL)
Örnek	20	-----
Distile su	-----	20
Reajan	1000	1000
Kümen hidroperoksit	40	40

Hesaplama: GPx konsantrasyonu, kitte önerilen formülden ($U/L = 8412 \times \Delta A_{340}/dk$) yararlanılarak hesaplandı. Her konsantrasyon ve kontrol grubu için 4 ölçüm yapıldı. Sonuçlar “U/ mg protein” olarak ifade edildi.

3.5.8 Glutasyon-S-Transferaz Aktivitesi Tayini

Prencip: GST, elektrofilik bileşiklerin detoksifikasyonunu, GSH’ın –SH grubu ile tepkime vermelerini katalizleyerek gerçekleştirir (eşitlik 3.11). Enzimin aktivite tayini, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB)’in GSH ile konjugasyonu sırasında meydana gelen absorbanstaki artışın, 340 nm dalga boyunda ve 25 °C’de spektrofotometrik olarak ölçümüne dayanır (Habig vd., 1974).



Yöntem: Çizelge 3.11’de çözeltiler sırasıyla belirtilen miktarlarda küvete eklendikten sonra, küvet iyice çalkalandı. Daha sonra absorbanstaki artış 340 nm’de, 3 dk boyunca her 30 sn’de bir kaydedildi.

Çizelge 3. 11 GST aktivitesi ölçümünde küvete pipetlenen bileşenlerin miktar ve konsantrasyonları

Küvete pipetlenen bileşen	Kör (mL)	Örnek (mL)	Son Konstrasyon (mM)
PBS (0.11 M)	2.7	2.7	100 mM
Distile su	0.1	-	-
CDNB (30 mM)	0.1	0.1	1 mM
GSH (30 mM)	0.1	0.1	1 mM
Süpernatant	-	0.1	-

Her örneğin absorbanstaki dk başına değişim (ΔA) belirlendikten sonra aşağıda verilen formüle göre, GST’nin molar ekstinksiyon katsayısı (9.6 mmol/L/cm) ve küvetteki sulandırma oranı hesaba katılarak, enzimin mL’deki aktivitesi belirlendi (eşitlik 3.12). Her konsantrasyon ve kontrol grubu için 4 ölçüm yapıldı. Sonuçlar, “nmol CDNB-glutasyon konjugatı/dk/mg protein” olarak ifade edildi.

Hesaplama:

$$\text{GST aktivitesi (mmol/dk/L)} = \frac{\Delta A}{9.6} \times \frac{V_t}{V_o} \times \text{SO} \quad (3.12)$$

ΔA : Absorbansın 340 nm’de, dk başına değışimi

V_t : Toplam hacim

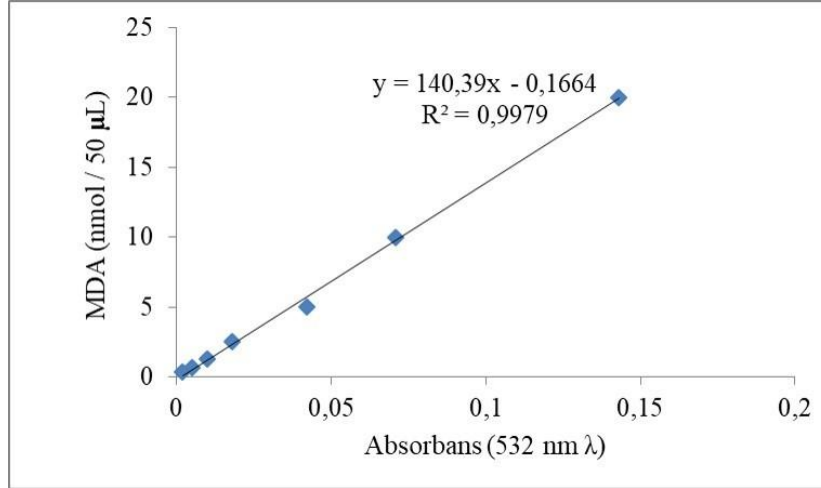
V_o : Örnek hacmi

SO: Süpernatant sulandırma oranı

3.5.9 Malondialdehit İçeriğı Tayini

Prensip: Yağ asitlerinin, serbest radikallerle reaksiyonu sonucu oluşan peroksidasyon ürünlerinden MDA, tiyobarbitürik asit (TBA) ile pembe renkli forma girmesi prensibine dayanır (Buege ve Aust, 1978).

Yöntem: MDA içeriğı, Buege ve Aust, (1978)’a göre spektrofotometrik olarak ölçüldü. Özet olarak; 0.05 mL 150 mM Tris-HCl tamponu (pH: 7.1), 0.05 mL süpernatant üzerine eklendi. Daha sonra bu karışma, 0.05 mL 1.5 mM askorbik asit ve 0.05 mL 1 mM FeSO₄ ilave edildi. Bu karışımın total hacmi, distile su ile 0.5 mL’ye tamamlandı. Bu bileşenlerin olduğu tüpler vortekslendikten sonra, 37 °C’de 15 dk boyunca inkübe edildi. Daha sonra tüplere 0.5 mL trikloroasedik asit (%10) ve 1 mL TBA (%0.375) eklendi. Tüpler vortekslendikten sonra kaynar suda 15 dk’lığına inkübasyona bırakıldı. Tüpler oda sıcaklığına getirildikten sonra, 3000 rpm’de 10 dk. santrifüj edildi. Son olarak, elde edilen süpernatantlar kullanılarak, 532 nm dalga boyunda, spektrofotometrik ölçümler gerçekleştirildi (Çizelge 3.12). Örneklerdeki MDA konsantrasyonu, eksternal 1,1,3,3-tetraetoksipropan standartlarından (50 µL’de 0.3125 nmol ile 20 nmol aralığında, toplam 7 adet) türetilen standart eğri kullanılarak hesaplandı (Şekil 3.4). Sonuçlar, “nmol/mg protein” olarak sunuldu.



Şekil 3. 4 1,1,3,3-tetraetoksipropan standartlarından türetilen standart eğri

Çizelge 3. 12 MDA ölçümünde küvete pipetlenen bileşenler, miktarları ve ölçüm prosedürü

Ayıraçlar	Numune (mL)	Standart (mL)	Kör (mL)
Numune	0.1	---	---
Kör	---	---	0.1
Standart	---	0.1	---
Tris-HCl tamponu (150 mM)	0.1	0.1	0.1
Askorbik asit çözeltisi (1.5 mM)	0.1	0.1	0.1
FeSO ₄ .7H ₂ O (1 mM)	0.1	0.1	0.1
Distile Su	0.6	0.6	0.6

-Tüplere yukarıda verilen bileşenler eklendikten sonra, tüpler karıştırılır ve tüpler 37 °C’de 15 dk inkübe edilir.

-İnkübasyon tamamlandıktan sonra tüplere aşağıdaki bileşenler eklenir ve vortekslenir. Tüpler vortekslendikten sonra kaynar su banyosunda (95 °C) 15 dk bekletilir.

TCA (%10)	1	1	1
TBA Çözeltisi (%0,375)	2	2	2

-Tüpler 3000 rpm’de 10 dk santrifüj edilir. Süpernatantlar alınarak, 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik okuma yapılır. Sonuçlar standart grafikten elde edilen denklem (Şekil 3.4) kullanılarak değerlendirilir.

3.5.10 İstatistiksel Analizler

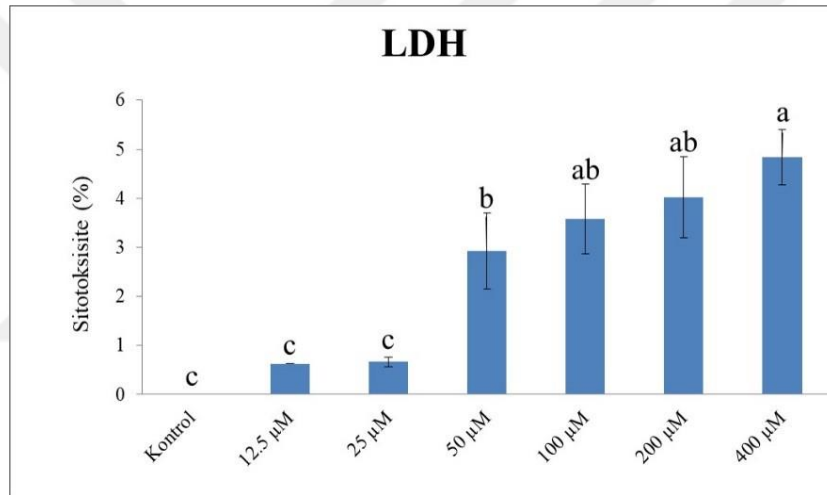
Çalışmadan elde edilen veriler, SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 20.0 istatistik paket programı (IBM SPSS Statistics)'nda, varyans analizi (ANOVA) ile analiz edildi. Gruplar arasındaki farklılıkların belirlenmesi için *post-hoc* Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Analizler sonucunda elde edilen veriler, “ortalama $\pm$ standart hata” olarak ifade edildi. İstatistiksel önem derecesi $P < 0.05$ seviyesinde kabul edildi.





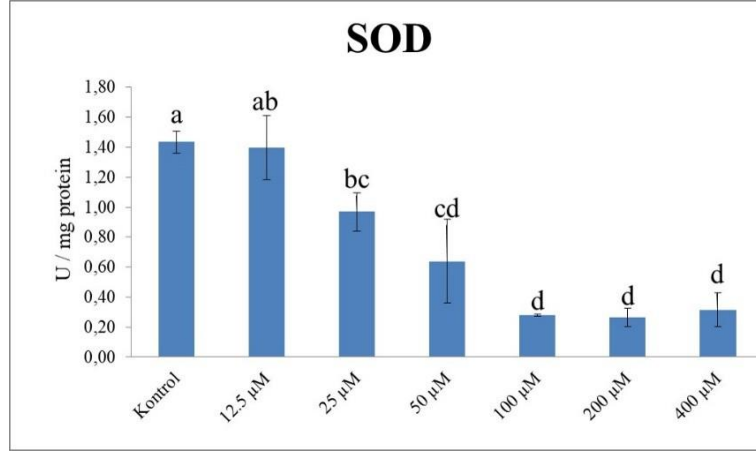
4. BULGULAR

Formaldehite 24 saat süre ile maruz bırakılan gökkuşuğu alabalığı hepatositlerinde sitotoksosite yüzdesi değerlerinin, formaldehitin 0, 12.5, 25, 50, 100, 200 ve 400 μM 'lık konsantrasyonlarında sırasıyla, %0, % 0.625 ± 0.003 , % 0.665 ± 0.1 , % 2.93 ± 0.777 , % 3.580 ± 0.711 , % 4.022 ± 0.822 ve % 4.835 ± 0.566 olduğu belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre formaldehite maruz kalma sonucu sitotoksosite yüzdesinde küçük de olsa artışlar meydana geldiği ve bu artışların formaldehitin 50 μM ve üstü konsantrasyonlarında, kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı oldukları gözlemlendi ($P < 0.05$) (Şekil 4.1).



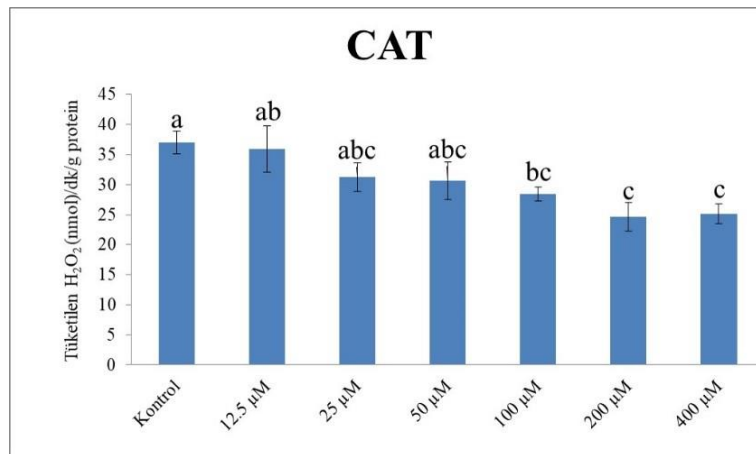
Şekil 4. 1 Formaldehite 24 saat süre ile maruz bırakılan gökkuşuğu alabalığı hepatositlerinde, “% sitotoksosite” değerleri. Sütunlar üzerindeki farklı harfler, Duncan *post hoc* çoklu karşılaştırma testine göre, gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı olan farklılıkları ifade etmektedir ($P < 0.05$)

Formaldehite 24 saat maruziyet sonrasında hepatosit SOD aktivitesi (U/mg protein)’nin kontrol grubunda 1.435 ± 0.074 , formaldehitin 12.5, 25, 50, 100, 200 ve 400 μM konsantrasyonlarının uygulandığı gruplarda ise sırasıyla, 1.397 ± 0.212 , 0.968 ± 0.125 , 0.640 ± 0.277 , 0.278 ± 0.007 , 0.263 ± 0.061 ve 0.316 ± 0.113 olduğu belirlendi. Bu sonuçlara göre SOD aktivitesinin, kontrol grubuna kıyasla, 25 μM ve üzerindeki konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gösterdiği tespit edildi ($P < 0.05$) (Şekil 4.2).



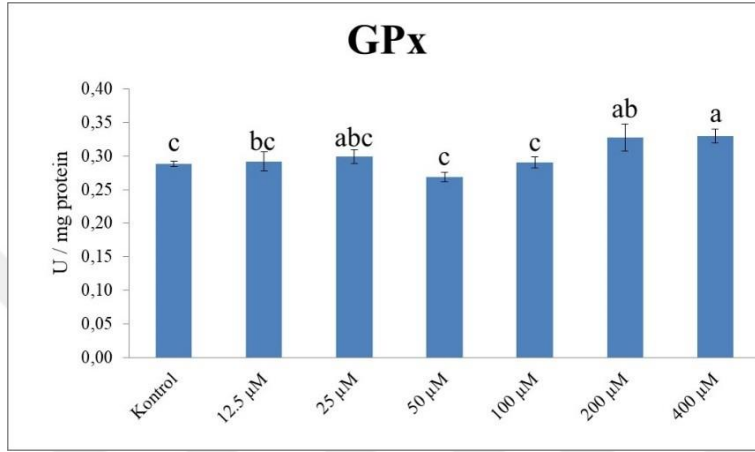
Şekil 4. 2 Formaldehite 24 saat süre ile maruz bırakılan gökkuşağı alabalığı hepatositlerinde, SOD aktivitesindeki değişimler. Sütunlar üzerindeki farklı harfler, Duncan çoklu karşılaştırma testine göre, gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı olan farklılıkları ifade etmektedir ($P < 0.05$)

CAT aktivitesi (tüketilen H_2O_2 (nmol) /dk/ g protein)'nin kontrol grubunda 37.064 ± 1.901 olduğu belirlendi. CAT aktivitesi, formaldehitin 12.5, 25, 50, 100, 200 ve 400 μM konsantrasyonlarının uygulandığı gruplarda ise sırasıyla, 35.958 ± 3.852 , 31.284 ± 2.374 , 30.642 ± 3.116 , 28.404 ± 1.139 , 24.641 ± 2.393 ve 25.143 ± 1.658 olarak ölçüldü. Buna göre CAT aktivitesinin bütün gruplarda azalmalar gösterdiği ve bu azalmaların formaldehitin 100 μM ve üzerindeki konsantrasyonlarında, kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı oldukları belirlendi ($P < 0.05$) (Şekil 4.3).



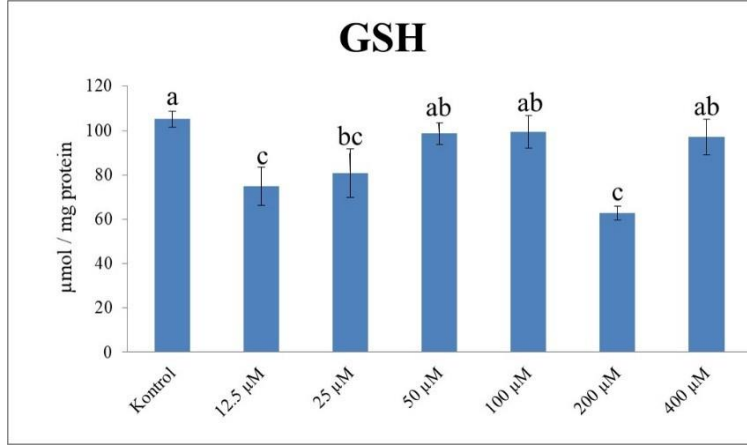
Şekil 4. 3 Formaldehite 24 saat süre ile maruz bırakılan gökkuşağı alabalığı hepatositlerinde, CAT aktivitesindeki değişimler. Sütunlar üzerindeki farklı harfler, Duncan çoklu karşılaştırma testine göre, gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı olan farklılıkları ifade etmektedir ($P < 0.05$)

GPx aktivitesi (U/mg protein)'nin kontrol grubunda 0.288 ± 0.004 , formaldehitin 12.5, 25, 50, 100, 200 ve 400 μM konsantrasyonlarının uygulandığı gruplarda ise sırasıyla, 0.292 ± 0.141 , 0.299 ± 0.010 , 0.269 ± 0.007 , 0.290 ± 0.008 , 0.327 ± 0.202 ve 0.329 ± 0.103 olduğu belirlendi. Buna göre GPx aktivitesinin, formaldehitin 200 ve 400 μM konsantrasyonlarında, kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı artışlar gösterdiği gözlemlendi ($P < 0.05$) (Şekil 4.4).



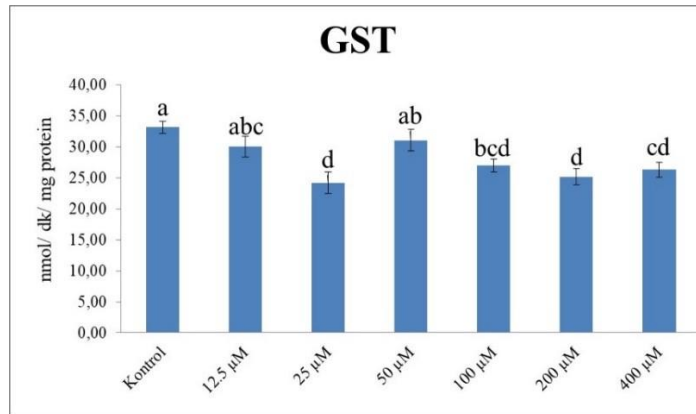
Şekil 4. 4 Formaldehite 24 saat süre ile maruz bırakılan gökkuşuğu alabalığı hepatositlerinde, GPx aktivitesindeki değişimler. Sütunlar üzerindeki farklı harfler, Duncan çoklu karşılaştırma testine göre, gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı olan farklılıkları ifade etmektedir ($P < 0.05$)

Redükte GSH içeriği ($\mu\text{mol} / \text{mg}$ protein) kontrol grubunda 105.098 ± 3.464 , formaldehitin 12.5, 25, 50, 100, 200 ve 400 μM konsantrasyonlarının uygulandığı gruplarda ise sırasıyla, 74.822 ± 8.566 , 80.677 ± 11.027 , 98.546 ± 5.036 , 99.310 ± 7.395 , 62.795 ± 3.142 ve 97.096 ± 8.043 olarak ölçüldü. Buna göre formaldehitin redükte GSH düzeyini, 12.5, 25 ve 200 μM 'lık konsantrasyonlarda, kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşürdüğü belirlendi ($P < 0.05$) (Şekil 4.5).



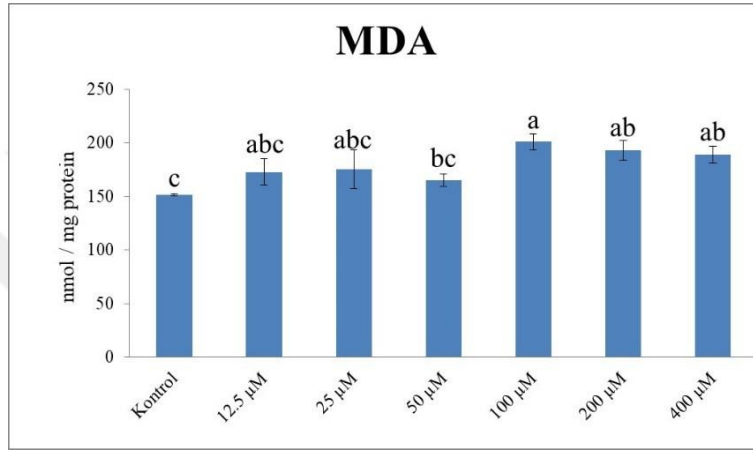
Şekil 4.5 Formaldehite 24 saat süre ile maruz bırakılan gökkuşaağı alabalığı hepatositlerinde, GSH düzeyindeki değişimler. Sütunlar üzerindeki farklı harfler, Duncan çoklu karşılaştırma testine göre, gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı olan farklılıkları ifade etmektedir ($P < 0.05$)

GST aktivitesi (nmol CDNB-glutasyon konjugatı/dk/mg protein) kontrol grubunda 33.194 ± 0.962 , formaldehitin 12.5, 25, 50, 100, 200 ve 400 μM konsantrasyonlarının uygulandığı gruplarda ise sırasıyla, 30.082 ± 1.705 , 24.215 ± 1.740 , 31.101 ± 1.781 , 26.996 ± 1.048 , 25.191 ± 1.316 ve 26.323 ± 1.187 olarak, ölçüldü. Buna göre formaldehitin GST aktivitesinde, 25, 100, 200 ve 400 μM 'lık konsantrasyonlarda, kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı azalmalara neden olduğu belirlendi ($P < 0.05$) (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 Formaldehite 24 saat süre ile maruz bırakılan gökkuşaağı alabalığı hepatositlerinde, GST aktivitesindeki değişimler. Sütunlar üzerindeki farklı harfler, Duncan çoklu karşılaştırma testine göre, gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı olan farklılıkları ifade etmektedir ($P < 0.05$)

MDA düzeyi (nmol /mg protein) kontrol grubunda 151.628 ± 1.201 olarak ölçüldü. Formaldehitin 12.5, 25, 50, 100, 200 ve 400 μM konsantrasyonlarının uygulandığı gruplarda ise sırasıyla, 172.971 ± 12.173 , 175.354 ± 17.927 , 165.178 ± 5.939 , 200.966 ± 7.352 , 193.035 ± 9.257 , ve 188.800 ± 7.794 olarak, belirlendi. Buna MDA düzeyinin, 100, 200 ve 400 μM formaldehit konsantrasyonlarında, kontrol grubuna kıyasla, istatistiksel olarak anlamlı artışlar gösterdiği belirlendi ($P < 0.05$) (Şekil 4.7).



Şekil 4. 7 Formaldehite 24 saat süre ile maruz bırakılan gökkuşuğu alabalığı hepatositlerinde, MDA düzeyindeki değişimler. Sütunlar üzerindeki farklı harfler, Duncan çoklu karşılaştırma testine göre, gruplar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı olan farklılıkları ifade etmektedir ($P < 0.05$)



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Formaldehit, tüketici ürünlerinin ve endüstriyel ürünlerin üretiminde yaygın olarak kullanılan bir kimyasaldır. Varlığı, günlük olarak kullanılan ev gereçlerinde ve yapı materyallerinde belirlenmiş olan bu kimyasala akut olarak maruz kalma, insanlarda üst solunum yolu rahatsızlıkları, alerji, nörotoksisite, nazofaringeal kanser ve lösemi gibi sağlık problemlerine yol açabilmektedir (Swenberg vd., 2013; He vd., 2017; Bernardini vd., 2022). Formaldehit, hücrelerde reaktif oksijen türlerinin oluşumunu artırarak, lipid, protein, karbohidrat ve nükleik asitler gibi makromoleküller üzerinde hasar oluşturma potansiyeline sahip olan reaktif bir aldehittir. Bu çevresel kirleticinin hücrelerde canlılığı azalttığı, apoptozisi uyardığı, oksidatif stresi tetiklediği ve DNA eklentileri ile DNA-protein çapraz bağlantılarını artırarak genotoksik etkiler meydana getirdiği, geçmişte yapılan çok sayıda *in vivo* ve *in vitro* çalışma ile ortaya konulmuştur (Bernardini vd., 2022). Balık çiftliklerinde ektoparazitik enfeksiyonların kontrolünün sağlanabilmesi için yaygın bir dezenfektan olarak kullanılan formaldehit, gökkuşağı alabalığı da dahil olmak üzere, balıklar üzerinde toksik etkiler meydana getirebilmektedir (Buchmann vd., 2004; Leal vd., 2018). Formaldehitin *in vitro*'daki toksik etki mekanizması, insan ve memelilere ait farklı hücre hatları kullanılarak yapılan çok sayıda çalışma ile aydınlatılmaya çalışılmıştır ancak su ürünleri sektöründe farklı amaçlar doğrultusunda kullanılan formaldehitin balık hücreleri üzerinde oluşturduğu toksik etkileri konu alan, *in vitro*'da yapılmış, herhangi bir çalışma ile karşılaşılmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada formaldehitin, gökkuşağı alabalığından izole edilen hepatositler üzerindeki negatif etkilerinin belirlenmesi ve literatürdeki bu eksikliğin giderilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda formaldehitin hepatositler üzerinde gösterdiği sitotoksik etki, hücrelerden kültür medyumuna salınan LDH'nin ölçümüne dayanılarak belirlendi. Buna göre; formaldehite 24 saatlik maruziyet sonrasında, hücrelerde belirlenen sitotoksisite yüzdesinin doz artışı ile birlikte küçük artışlar gösterdiği ve bu artışların 50, 100, 200 ve 400 μM 'lık formaldehit konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı oldukları gözlemlendi. Benzer olarak Lin vd. (2005), formaldehite 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 ve 2 mM konsantrasyonlarda 1.5 saat maruz bırakılan rat aort endotelial hücrelerinde medyuma salınan LDH yüzdesinin doz artışı ile birlikte arttığını ve 2 mM'lık formaldehit konsantrasyonunda meydana gelen artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu

bildirmişlerdir. Bu çalışma ile uyumlu olarak, farklı canlılık testleri [MTT (3-(4, 5-dimetiltiazol-2-yl)-2, 5-difenil tetrazolyum bromid) ölçümü, tripan mavisi ve CCK-8 (hücre sayım kiti) ölçümü gibi]'nin kullanıldığı birçok *in vitro* çalışmada, formaldehitin hücre canlılığını, doza ve zamana bağlı olarak, azalttığı bildirilmiştir (Bernardini vd., 2022). Örneğin, formaldehitin 2.0, 4.0 ve 10 mM konsantrasyonlarına 60, 120 ve 180 dk'lık süreler boyunca maruz bırakılan rat hepatositlerinde sitotoksikite yüzdesinin doza ve zamana bağımlı artışlar gösterdiği belirlenmiştir (Teng vd., 2001). Öte yandan, tümör hücreleri ve endotelial hücre kültürleri üzerinde yapılan *in vitro* çalışmalar, formaldehitin 10.0 M konsantrasyonunun nekrotik hücre ölümüne yol açtığını, 1.0 M konsantrasyonunun apoptozisi artırdığını ve mitotik aktiviteyi azalttığını, 0.5 ile 1.0 M aralığındaki konsantrasyonun ise hücre proliferasyonunu artırdığını ve apoptotik aktiviteyi azalttığını, göstermişlerdir. Dolayısıyla formaldehitin biyolojik etkisinin doza bağımlı olarak gerçekleştiği rapor edilmiştir (Szende ve Tyihák, 2010). Bu çalışmadaki formaldehit konsantrasyonu ve uygulama süresi ile benzer olarak, formaldehitin 0, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 ve 800 µM konsantrasyonlarına 24 saat süre ile maruz bırakılan, insan beyin nöroblastoma (SK-N-SH), insan hepatosellüler karaciğer karsinom (HepG2), insan akciğer karsinom (A549) ve insan retinal pigment epitel (ARPE-19) hücrelerinde, canlılığın dereceli olarak azaldığı belirlenmiştir. Yapılan çalışmada hücre canlılığındaki istatistiksel olarak anlamlı azalışların, SK-N-SH ile ARPE-19 hücrelerinde 200 µM, A549 hücrelerinde 400 µM, HepG1 hücrelerinde ise 800 µM formaldehit konsantrasyonlarında başladığı ifade edilmiştir (Zerin vd., 2015). Dolayısıyla formaldehitin hücreler üzerinde oluşturduğu sitotoksik etki, doza, uygulama süresine ve hücre tipine bağlı olarak değişebilmektedir. Geçmişte yapılan çalışmalara benzer olarak çalışmamızdan elde edilen sonuçlar, uygulanan formaldehit konsantrasyonlarının 24 saatlik süre içerisinde gökkuşağı alabalığı hepatositleri üzerinde sitotoksik etki potansiyeline sahip olduklarını göstermektedir.

Formaldehit toksik etkisini, serbest radikal üreten enzimleri aktive ederek, serbest radikalleri süpüren sistemleri inhibe ederek ve reaktif oksijen türlerinin oluşumunu artırarak meydana getirir (Söğüt vd., 2004; Saito vd., 2005; Gulec vd., 2006). Formaldehitin karaciğerde ve farklı dokularda antioksidan enzimleri ve detoksifiye edici sistemleri etkileyerek oksidatif hasara yol açtığı, birçok deneysel çalışmada, gösterilmiştir (Teng vd., 2001; Söğüt vd., 2004; Mei vd., 2016; Bakar vd., 2014). SOD,

süperoksit anyon radikallerinin eliminasyonunda ilk savunma hattını oluşturur ve süperoksit anyon radikali ($O_2^{\bullet-}$)'ni moleküler oksijene ve hidrojen peroksit'e metabolize eder. SOD fonksiyonunun gerçekleşmemesi durumunda, bu serbest radikal oldukça reaktif ve zararlı olan hidroksil radikallerinin meydana gelmesine neden olur (Halliwell ve Gutteridge 2015; Hoseinifar vd., 2020). Bu çalışmada, formaldehitin hepatosit SOD aktivitesinde belirgin düşüşlere neden olduğu tespit edildi. Çalışmamız ile uyumlu olarak, daha önce yapılmış olan çalışmalarda, formaldehitin ratların karaciğer (Gulec vd., 2006), böbrek (Zararsiz vd., 2006a; Zararsiz vd., 2007a; Bakar vd., 2014), akciğer (Lino-dos-Santos-Franco vd., 2011) ve prefrontal korteks (Zararsiz vd., 2006b; Zararsiz vd., 2007b) dokularında, SOD aktivitesini anlamlı olarak düşürdüğü bildirilmiştir. Formaldehite maruz bırakılan sazan balığı (*Cyprinus carpio*)'nın karaciğerinde de SOD aktivitesinin anlamlı düşüşler gösterdiği gözlemlenmiştir (Kankaya ve Kaptaner, 2017). Benzer olarak, formadehite maruz bırakılan A549 hücreleri (Shi vd., 2014) ile HL-1 hücrelerinde de (Wu vd., 2017) SOD aktivitesinde düşüşlerin meydana geldiği belirtilmiştir. SOD aktivitesi sonucunda meydana gelen ve bir hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$) öncüsü olan H_2O_2 , CAT tarafından indirgenerek H_2O 'ya ve O_2 'ye dönüştürülür. Formaldehit uygulamasının, hepatosit SOD aktivitesindeki azalmalara paralel olarak, CAT aktivitesinde de anlamlı düşüşlere yol açtığı gözlemlendi. Bu çalışmada elde edilen bulgular ile uyumlu olarak, SOD ile CAT aktivitesindeki eş zamanlı düşüşler, formaldehite maruz bırakılan ratların karaciğerinde de belirlenmiştir (Gulec vd., 2006). Antioksidan enzimlerin çoğu aşırı oksidan artışı veya oksidan olan kendi substratı tarafından inaktive edilebilir (Modesto ve Martinez, 2010). SOD ve CAT, oksidatif olarak reaktif olan moleküllere karşı hassas olan enzimlerdir. Örneğin SOD'un H_2O_2 tarafından, CAT'ın ise hidroksil ve süperoksit anyon radikalleri tarafından inaktif hale getirildiği belirlenmiştir (Pigeolet vd., 1990). SOD aktivitesindeki düşüşler, artan oksijen radikalleri veya bunların dönüşümü ile oluşan H_2O_2 'nin, enzimdeki sisteinin oksidasyonuna yol açması neticesinde, meydana gelmiş olabilir (Dimitrova vd., 1994; Abhijith vd., 2016). Diğer taraftan aşırı artan ROS'lar da böyle bir etkiyi ortaya çıkarmış olabilir (Abhijith vd., 2016). CAT aktivitesinin inhibisyonu ise toksik maddelerin, enzimin $-SH$ grubuna bağlanması ile ilişkilidir (Ruas vd., 2008). SOD ile fonksiyonel olarak bağlantılı olan CAT'ın aktivitesindeki düşüş, formaldehit maruziyeti neticesinde artan $O_2^{\bullet-}$ radikali veya H_2O_2 radikalinden kaynaklanabilir (Asagba vd., 2008; Ruas vd., 2008; Modesto ve Martinez, 2010; Abhijith

vd., 2016). Bu çalışmadaki bulgular ile paralel olarak, İspir vd. (2017), formaldehite banyo yöntemi ile maruz bırakılan gökkuşağı alabalığı yavrularının tüm vücut homojenatlarında, CAT aktivitesinin düştüğünü ve bu düşüşün iyileşme periyodu süresince tekrar geriye dönmediğini bildirmişlerdir. Uyumlu olarak CAT aktivitesindeki azalmalar, formaldehite maruz bırakılan ratların trakesinde ve diyafram kasında belirlenmiştir (Lima vd., 2015).

Balıklardaki başlıca peroksidaz, GSH'ı bir kofaktör olarak kullanan ve selenyuma bağımlı tetramerik bir sitozolik enzim olan, GPx'dir. Bu enzim, H_2O_2 'nin suya metabolize edilmesini katalizler ve membranların lipid peroksidasyon hasarından korunmasında, önemli rol oynar (Van der Oost vd., 2003). Bu çalışmada, hepatositlerin formaldehite (200 ve 400 μM) maruz bırakılması sonucunda, GPx aktivitesinde anlamlı artışlar meydana geldiği gözlemlendi. Benzer olarak, formaldehite maruz bırakılan ratların karaciğer (Zararsız vd., 2005), böbrek (Bakar vd., 2014) ve nazal epitel (Cassee vd., 1996) dokularında, GPx aktivitesinde artışlar meydana geldiği bildirilmiştir. GPx aktivitesindeki yükselmeler, formaldehite banyo yöntemi ile maruz bırakılan gökkuşağı alabalığının karaciğer, böbrek ve solungaç dokularında da belirlenmiştir (Yonar vd., 2014). Hepatosit GPx aktivitesindeki artışlar, H_2O_2 'nin üretimindeki artışa bağlı olarak, enzimin membran hasarını önleyici rolü neticesinde meydana gelmiş olabilir.

G-glutamin, sistein ve glisin içeren bir tripeptid olan GSH, hücrelerdeki başlıca tiyol bileşiğidir. Enzimatik olmayan bir antioksidan olan GSH, ROS'lara ve elektrofilik bileşiklere karşı gerçekleştirilen antioksidan savunma mekanizmasının temelini oluşturur. ROS'lar ile direkt veya indirekt olarak reaksiyona girebilen bu molekülün sülfidril grubu, serbest radikal süpürücü fonksiyonunu meydana getirdiği esnada, oksidize olmuş disülfid GSH (GSSG)'a dönüşür. Hücredeki diğer enzimler veya enzim sistemleri de (örneğin GPx ve peroksiredoksinler) çeşitli peroksitlerin ve hidroperoksitlerin indirgenmeleri için GSH'ı kullanırlar. GST'ler elektrofilik zenobiyotiklerin GSH ile konjugasyonunu katalizleyerek detoksifikasyonlarını gerçekleştirirler (Van der Oost vd., 2003; Ribas vd., 2014; Vašková vd., 2023). Bu çalışmada, formaldehit maruziyeti sonucunda bazı gruplarda hepatosit GSH düzeylerinde anlamlı azalmaların meydana geldiği belirlendi. Bu durum hücrelerde oksidatif stresin meydana geldiğini gösterir. Redükte GSH, formaldehit ve GSH'ı S-formil-GSH'a dönüştüren formaldehit dehidrogenaz için bir substrat fonksiyonu görür (Teng vd., 2001;

Wu vd., 2004) ayrıca redükte GSH'ın sülfidril grubu, formaldehit ile enzimatik olmayan reaksiyon gerçekleştirir (Wlodek, 1988; Teng vd., 2001). Dolayısıyla, formaldehit maruziyeti sonrasında hepatosit redükte GSH düzeyindeki azalmalar, bu nedenlerden dolayı meydana gelmiş olabilir (Huang vd., 2019). Diğer taraftan GSH'ı bir kofaktör olarak kullanan GPx'in aktivitesindeki artışlar da GSH düzeyindeki azalmaların sebebi olabilir. Bu çalışma ile uyumlu olarak, formaldehite maruz bırakılan ratların karaciğer, böbrek, akciğer ve beyin GSH düzeylerinde anlamlı azalmaların olduğu belirlenmiştir (Farooqui vd., 1986; Söğüt vd., 2004; Mei vd., 2016; Huang vd., 2019). İspir vd. (2017) ise formaldehite banyo yöntemi ile maruz bıraktıkları gökkuşığı alabalığı yavrularının tüm vücut homojenatlarında, GSH düzeyinin anlamlı olarak düştüğünü ve bu düşüşün iyileşme periyodu sonrasında, tekrar eski seviyesine dönmediğini bildirmişlerdir. Yapılan *in vitro* çalışmalarda da, formaldehitin rat hepaositlerinde (Teng vd., 2001), Jurkat hücrelerinde (Saito vd., 2005) ve fare kardiyak ventriküler miyositleri (HL-1)'nde (Wu vd., 2017) GSH seviyelerini dramatik olarak düşürdüğü belirlenmiştir.

Faz II metabolize edici enzim familyasının bir bölümünü oluşturan GST'ler, hücrelerin reaktif oksijen metabolitlerine karşı korunması da dahil olmak üzere, hücresel detoksifikasyon sisteminde anahtar fonksiyonlara sahiptirler ve zenobiyotikler ile karsinojenlerin biyotransformasyonunda rol oynarlar. GST'nin GSH'ı elektrofilik bileşiklere konjuge etmesi neticesinde, zararlı ilaçların ve çevresel kimyasalların detoksifikasyonu sağlanır. Bu nedenle GST'ler, toksikolojik olarak önemli enzimlerdir (Allocati vd., 2018; Dasari vd., 2018; Ghelli vd., 2021). Yapılan bir çalışmada, formaldehite maruz kalan ve GSTT1 ile GSTM1 polimorfizmi gösteren hastane çalışanlarında, ürün oksidatif stres düzeylerinde yükselmelerin olduğu tespit edilmiştir (Ghelli vd., 2021). Çalışmamızda formaldehitin GST aktivitesinde anlamlı azalışlar meydana getirdiği belirlendi. GST aktivitesinde gözlenen azalmalar, substratı olan GSH miktarındaki düşüşlere bağlı olarak meydana gelmiş olabilir (Goto vd., 1992; Nair vd., 2006). Bu çalışmaya benzer olarak Dey vd. (2016), formaldehit ile muamele edilen insan rekombinant GST aktivitesinin ve insan plazması ile eritrositlerindeki GST aktivitesinin anlamlı azalışlar gösterdiğini, bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar TH-1 monositler ile yaptıkları *in vitro* çalışmada da, formaldehitin GST aktivitesini GSH içeriğindeki düşüş ile birlikte azalttığını belirlemişlerdir.

Serbest radikaller ve ROS'ların doymamış yağ asitlerinde oluşturdukları oksidasyon sonucunda, glikolipid, fosfolipid ve kolesterol gibi hedef lipid tiplerinde, bir karbondan hidrojenin uzaklaştırılması ve yerine oksijenin eklenmesini kapsayan, bir dizi değişiklik meydana gelir. Oluşan lipid peroksil radikalleri ve hidroperoksiller, membran fonksiyonunda bozulmaya sebep olur ve hücrelerin apoptoza gitmesine yol açar (Yin vd., 2011). Lipid peroksidasyonunun major endojen son ürünü olan MDA, oldukça mutajeniktir ve hücrelerde serbest radikal atağından sonra meydana gelen lipid peroksidasyonunun faydalı bir indikatörüdür (Ayala vd., 2014). Gerek ratlarda gerekse balıklarda yapılan birçok *in vivo* çalışmada (Söğüt vd., 2004; Gulec vd., 2006; Zararsız vd., 2007a; Bakar vd., 2014; Yonar vd., 2014; İspir vd., 2017; Zhang vd., 2018; Huang vd., 2019) ve farklı hücre hatlarının kullanıldığı *in vitro* (Teng vd., 2001; Zhang vd., 2013; Shi vd., 2014; Chen vd., 2017b; Wu vd., 2017) çalışmalarda formaldehitin, ROS artışına sebep olarak, hücre ve dokulardaki MDA seviyesini yükselttiği, bildirilmiştir. Yukarıda refere edilen çalışmalar ile uyumlu olarak, bu çalışmada da formaldehitin gökkuşağı alabalığı hepatositlerinde MDA düzeyini yükselttiği belirlendi. Dolayısıyla, formaldehitin bu hücreler üzerinde oluşturduğu toksik etkiyi, oksidatif stresi uyararak meydana getirdiği söylenilebilir.

Sonuç olarak bu çalışmada, su ürünleri sektöründe ektoparazitik enfeksiyonların önlenmesi ile tedavisinde bir dezenfektan olarak kullanılan formaldehitin, dünyada ve ülkemizde kültürü yaygın olarak yapılan ve önemli bir besin kaynağı olan gökkuşağı alabalığı hepatositleri üzerinde, sitotoksik etkiler gösterdiği belirlendi. Formaldehitin hepatosit antioksidan enzim aktivitelerinde baskılanma (SOD, CAT, GST) ile uyarıma (GPx) yol açtığı ve bir antioksidan molekül olan GSH düzeyinde azalmalara sebep olduğu gözlemlendi. Dolayısıyla formaldehitin, antioksidan savunma mekanizmasında sarsıcı etkiler oluşturarak ve lipid peroksidasyonunu uyararak, hücrelerde oksidatif stres meydana getirdiği tespit edildi. Elde edilen bulgular göz önünde tutulduğunda, farklı çevresel kompartmanlarda varlığı tespit edilen bu kirleticinin toksik etkilerinden korunmak için oldukça bilinçli davranılması ve çevreye bulaşının önlenmesi için yeterli tedbirlerin alınması, insan ve çevre sağlığı açısından, oldukça elzemdir.

KAYNAKLAR

- Abdollahi, M., Hosseini, A. (2014). Encyclopedia of Toxicology (3. Ed.), **Formaldehyde** (pp. 653–656). Tehran University of Medical Sciences: Tehran, Iran.
- Abhijith, B. D., Ramesh, M., Poopal, R. K. (2016). Responses of metabolic and antioxidant enzymatic activities in gill, liver and plasma of Catla catla during methyl parathion exposure. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 77, 31-40. doi:10.1016/j.jobaz.2015.11.002
- Aebi, H. (1974). Methods of Enzymatic Analysis. Bergmeyer HU (Ed.), **Catalase** (2. ed., Vol. 2, pp. 673-684). Academic Press: Massachusetts, USA.
- Allocati, N., Masulli, M., Di Ilio, C., Federici, L. (2018). Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. *Oncogenesis*, 7(1), 8.
- Anonim. (2023). Sitotoksikite LDH Test Kiti-WST. Erişim tarihi: 9 Mayıs 2023 Erişim adresi: <https://www.dojindo.eu.com/store/p/851-Cytotoxicity-LDH-Assay-Kit-WST.aspx>.
- Asagba, S. O., Eriyamremu, G. E., Igberaese, M. E. (2008). Bioaccumulation of cadmium and its biochemical effect on selected tissues of the catfish (*Clarias gariepinus*). *Fish physiology and biochemistry*, 34, 61-69
- Ayala, A., Muñoz, M. F., Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 360438. doi:10.1155%2F2014%2F360438
- Bai, J., Wang, P., Liu, Y., Zhang, Y., Li, Y., He, Z., Hou, L., Liang, R. (2017). Formaldehyde alters triglyceride synthesis and very low-density lipoprotein secretion in a time-dependent manner. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 56, 15-20. doi:10.1016/j.etap.2017.08.023
- Bakar, E., Ulucam, E., Cerkezayabekir, A. (2014). Protective effects of proanthocyanidin and vitamin E against toxic effects of formaldehyde in kidney tissue. *Biotechnic & Histochemistry*, 90(1), 69-78. doi:10.3109/10520295.2014.954620
- Bernardini, L., Barbosa, E., Charao, M. F., Brucker, N. (2022). Formaldehyde toxicity reports from in vitro and in vivo studies: a review and updated data. *Drug and Chemical Toxicology*, 45(3), 972-984. doi:10.1080/01480545.2020.1795190
- Beutler, E. (1984). A Manual of Biochemical Methods. E. Beutler (Ed), **Red cell metabolism** (3. Ed., pp. 105–106). Grune & Startton: New York, ABD.
- Birnie-Gauvin, K., Costantini, D., Cooke, S. J., Willmore, W. G. (2017). A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: a review. *Fish and Fisheries*, 18(5), 928-942. doi: 10.1111/faf.12215
- Bodensteiner, L. R., Sheehan, R. J., Lewis, W. M., Wills, P. S., Herman, R. L. (1993). Effects of repetitive formalin treatments on channel catfish juveniles. *Journal of Aquatic Animal Health*, 5(1), 59-63.
- Bols, N. C., Dayeh, V. R., Lee, L. E. J., Schirmer, K. (2005). Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. Piscine cell lines in environmental toxicology. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, 6, 43-84.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. doi:1016/0003-2697(76)90527-3

- Buchmann, K., Bresciani, J., Jappe, C. (2004). Effects of formalin treatment on epithelial structure and mucous cell densities in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), skin. *Journal of Fish Diseases*, 27(2), 99-104. doi:10.1111/j.1365-2761.2003.00519.x
- Buege, J. A., Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. Academic press. In *Methods in Enzymology*, 52, 302-310. doi:10.1016/S0076-6879(78)52032-6
- Bulut, C., Kubilay, A., Bektaş, Z. H., Birden, B. (2015). Histopathological effects of formaldehyde (CH₂O) on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). *Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research*, 1(1), 43-48.
- Cassee, F. R., Groten, J. P., Feron, V. J. (1996). Changes in the nasal epithelium of rats exposed by inhalation to mixtures of formaldehyde, acetaldehyde, and acrolein. *Toxicological Sciences*, 29(2), 208-218. doi:10.1093/toxsci/29.2.208
- Chen, D., Fang, L., Mei, S., Li, H., Xu, X., Des Marais, T. L., Lu, K., Liu, S. X., Jin, C. (2017a). Regulation of chromatin assembly and cell transformation by formaldehyde exposure in human cells. *Environmental Health Perspectives*, 125(9), 097019. doi:10.1289/EHP1275modest
- Chen, Y., Zhou, C. F., Xiao, F., Huang, H. L., Zhang, P., Gu, H. F., Tang, X. Q. (2017b). Inhibition of ALDH 2 protects PC 12 cells against formaldehyde-induced cytotoxicity: involving the protection of hydrogen sulphide. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 44(5), 595-601. doi:10.1111/1440-1681.12741
- Chinabut, S., Limsuwan, C., Tonguthai, K., Pungkachonboon, T. (1988). Toxic and sublethal effect of formalin on freshwater fishes. *Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific (NACA)*, WP8873.
- Chmelova, L., Sehonova, P., Doubkova, V., Plhalova, L., Blahova, J., Tichy, F., Modra, H., Svobodova, Z. (2016). Effects of therapeutic formalin bath on selected indices in fish. *Neuroendocrinology Letters*, 37(1), 67-77.
- Dasari, S., Ganjayi, M. S., Meriga, B. (2018). Glutathione S-transferase is a good biomarker in acrylamide induced neurotoxicity and genotoxicity. *Interdisciplinary Toxicology*, 11(2), 115-121. doi: 10.2478/intox-2018-0007
- Dey, T., Dutta, P., Manna, P., Kalita, J., Boruah, H. P. D., Buragohain, A. K., Unni, B., Ozah, D., Goswami, M.K., Kotokey, R. K. (2016). Cigarette smoke compounds induce cellular redox imbalance, activate NF-κB, and increase TNF-α/CRP secretion: a possible pathway in the pathogenesis of COPD. *Toxicology Research*, 5(3), 895-904. doi: 10.1039/c5tx00477b
- Dezest, M., Le Behec, M., Chavatte, L., Desauziers, V., Chaput, B., Grolleau, J. L., Descargues, P., Nizard, C., Schnebert, S., Lacombe, S., Bulteau, A. L. (2017). Oxidative damage and impairment of protein quality control systems in keratinocytes exposed to a volatile organic compounds cocktail. *Scientific Reports*, 7(1), 1-14. doi:10.1038/s41598-017-11088-1
- Dimitrova, M. S., Tishinova, V., Velcheva, V. (1994). Combined effect of zinc and lead on the hepatic superoxide dismutase-catalase system in carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 108(1), 43-46.
- Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ). (2001). Air Quality Guidelines. WHO Regional Office for Europe (Ed.), **Chapter 5.8 Formaldehyde** (2. ed., pp. 1-25). WHO Regional Publications: Copenhagen, Denmark.
- Farooqui, M. Y., Upreti, R. K., Ahmed, A. E., Ansari, G. A. (1986). Influence of intraperitoneally administered formaldehyde on bile production and tissue

- glutathione levels in rats. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, 53(2), 233-236.
- Francis-Floyd, R. (1996). *Use of formalin to control fish parasites*. University of Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agriculture Sciences: Florida, USA.
- Ghelli, F., Bellisario, V., Squillacioti, G., Panizzolo, M., Santovito, A., Bono, R. (2021). Formaldehyde in Hospitals Induces Oxidative Stress: The Role of GSTT1 and GSTM1 Polymorphisms. *Toxics*, 9(8), 178. doi:10.3390/toxics9080178
- Goto, I., Agar, N. S., Maede, Y. (1992). The relationship between reduced glutathione level and glutathione S-transferase activity in sheep erythrocytes. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 40(2-3), 99-104.
- Gulec, M., Gurel, A., Armutcu, F. (2006). Vitamin E protects against oxidative damage caused by formaldehyde in the liver and plasma of rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 290, 61-67. doi:10.1007/s11010-006-9165-z
- Habig, W. H., Pabst, M. J., Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139. doi:10.1016/S0021-9258(19)42083-8
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine* (5. ed.). Oxford University Press: New York, USA.
- He, X., Li, Z., Rizak, J. D., Wu, S., Wang, Z., He, R., Su, M., Qin, D., Wang, J., Hu, X. (2017). Resveratrol attenuates formaldehyde induced hyperphosphorylation of tau protein and cytotoxicity in N2a cells. *Frontiers in Neuroscience*, 10, 598. doi:10.3389/fnins.2016.00598
- Hoseinifar, S. H., Yousefi, S., Van Doan, H., Ashouri, G., Gioacchini, G., Maradonna, F., Carnevali, O. (2020). Oxidative stress and antioxidant defense in fish: the implications of probiotic, prebiotic, and synbiotics. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 29(2), 198-217. doi:10.1080/23308249.2020.1795616
- Huang, J., Lu, Y., Zhang, B., Yang, S., Zhang, Q., Cui, H., Lu, X., Zhao, Y., Yang, X., Li, R. (2019). Antagonistic effect of epigallocatechin-3-gallate on neurotoxicity induced by formaldehyde. *Toxicology*, 412, 29-36. doi:10.1016/j.tox.2018.10.022
- Hung, Y.W., Lin, Y.H., Huang, H.Y., Wang, W.S., Chiu, C.F., Chiu, C.C., Chiu, H.W., Tsai, W.H., Hung, S.W. (2019). Acute Toxicity and Drug Residue Analysis of Formalin in Two Cold Water Fishes: Cultured Hybrid Bester Sturgeon (*Huso huso* × *Acipenser ruthenus*) and Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *United Journal of Biomedical Engineering and Science*, 1(1), 1-10.
- İspir, U., Kirici, M., Yonar, M. E., Yonar, S. M. (2017). Response of antioxidant system to formalin in the whole body of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Cellular and Molecular Biology*, 63(1), 13-16. doi:10.14715/cmb/2017.63.1.3
- Jung, S. H., Sim, D. S., Park, M. S., Jo, Q., Kim, Y. (2003). Effects of formalin on haematological and blood chemistry in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquaculture Research*, 34(14), 1269-1275. doi:10.1046/j.1365-2109.2003.00936.x
- Kankaya, E., Kaptaner, B. (2017). Formaldehitin Subletal Konsantrasyonlarının Sazan (*Cyprinus carpio* L., 1758) Balığı Üzerindeki Toksik Etkileri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 27(3), 406-415. doi:10.29133/yyutbd.319772
- Ke, Y. J., Qin, X. D., Zhang, Y. C., Li, H., Li, R., Yuan, J. L., Yang, X., Ding, S. M. (2014). In vitro study on cytotoxicity and intracellular formaldehyde concentration

- changes after exposure to formaldehyde and its derivatives. *Human & Experimental Toxicology*, 33(8), 822-830. doi:10.1177/0960327113510538
- Kim, S. H., Choi, J. W., Suh, M. W., Lee, J. H., Oh, S. H., Song, J. J., Park, M. K. (2018). Effect of formaldehyde on human middle ear epithelial cells. *BioMed Research International*. doi:10.1155/2018/6387983
- Leal, J. F., Neves, M. G. P., Santos, E. B., Esteves, V. I. (2018). Use of formalin in intensive aquaculture: properties, application and effects on fish and water quality. *Reviews in Aquaculture*, 10(2), 281-295. doi: 10.1111/raq.12160
- Lee, H. M., Kim, S. M., Choi, K. C. (2017). Treatment of human placental choriocarcinoma cells with formaldehyde and benzene induced growth and epithelial mesenchymal transition via induction of an antioxidant effect. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(8), 854. doi:10.3390/ijerph14080854
- Leso, V., Macrini, M. C., Russo, F., Iavicoli, I. (2020). Formaldehyde exposure and epigenetic effects: A systematic review. *Applied Sciences*, 10(7), 2319. doi:10.3390/app10072319
- Li, Q., Mei, Q., Huyan, T., Xie, L., Che, S., Yang, H., Zhang, M., Huang, Q. (2013). Effects of formaldehyde exposure on human NK cells in vitro. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36(3), 948-955. doi:10.1016/j.etap.2013.08.005
- Lima, L. F., Murta, G. L., Bandeira, A. C. B., Nardeli, C. R., Lima, W. G., Bezerra, F. S. (2015). Short-term exposure to formaldehyde promotes oxidative damage and inflammation in the trachea and diaphragm muscle of adult rats. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 202, 45-51. doi:10.1016/j.aanat.2015.08.003
- Lin, Z., Luo, W., Li, H., Zhang, Y. (2005). The effect of endogenous formaldehyde on the rat aorta endothelial cells. *Toxicology Letters*, 159(2), 134-143. doi:10.1016/j.toxlet.2005.05.003
- Lino-dos-Santos-Franco, A., Correa-Costa, M., dos Santos Durão, A. C. C., de Oliveira, A. P. L., Breithaupt-Faloppa, A. C., de Almeida Bertoni, J., Oliveira-Filho, R. M., Câmara, N.O.S., Marcourakis, T., Tavares-de-Lima, W. (2011). Formaldehyde induces lung inflammation by an oxidant and antioxidant enzymes mediated mechanism in the lung tissue. *Toxicology Letters*, 207(3), 278-285. doi:10.1016/j.toxlet.2011.09.026
- Mei, Y., Duan, C., Li, X., Zhao, Y., Cao, F., Shang, S., Ding, S., Yue, X., Gao, G., Yang, H., Shen, L., Feng, X., Jia, J., Tong, Z., Yang, X. (2016). Reduction of endogenous melatonin accelerates cognitive decline in mice in a simulated occupational formaldehyde exposure environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13(3), 258. doi:10.3390/ijerph13030258
- Modesto, K. A., Martinez, C. B. (2010). Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 78(3), 294-299. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.10.047
- Monteiro, D. A., De Almeida, J. A., Rantin, F. T., Kalinin, A. L. (2006). Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 143(2), 141-149. doi:10.1016/j.cbpc.2006.01.004
- Mortensen, A. S., Tølfen, C. C., Arukwe, A. (2006). Gene expression patterns in estrogen (nonylphenol) and aryl hydrocarbon receptor agonists (PCB-77) interaction using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) primary hepatocyte culture.

- Journal of Toxicology and Environmental Health*, 69(1-2), 1-19. doi:10.1080/15287390500257792
- Musial, A., Gryglewski, R. W., Kielczewski, S., Loukas, M., Wajda, J. (2016). Formalin use in anatomical and histological science in the 19th and 20th centuries. *Folia Medica Cracoviensia*, 56(3), 31–40.
- Nair, P., Kanwar, S. S., Sanyal, S. N. (2006). Effects of non steroidal anti-inflammatory drugs on the antioxidant defense system and the membrane functions in the rat intestine. *Nutricion Hospitalaria*, 21(6), 638-649.
- Norliana, S., Abdulamir, A. S., Abu Bakar, F., Salleh, A. B. (2009). The health risk of formaldehyde to human beings. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*, 4(3), 98-106.
- OECD, L. (2019). Test no. 203: fish, acute toxicity test. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*, Sect. 2. OECD Publishing, Paris. doi:10.1787/9789264069961-en
- Paglia, D. E., Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70(1), 158-169. doi:10.5555/uri:pii:0022214367900765
- Pigeolet, E., Corbisier, P., Houbion, A., Lambert, D., Michiels, C., Raes, M., Zachary, M.D., Remacle, J. (1990). Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mechanisms of Ageing and Development*, 51(3), 283-297. doi:10.1016/0047-6374(90)90078-T
- Powell, M. D., Speare, D. J., Fulton, A. E., Friars, G. W. (1996). Effects of intermittent formalin treatment of Atlantic salmon juveniles on growth, condition factor, plasma electrolytes, and hematocrit in freshwater and after transfer to seawater. *Journal of Aquatic Animal Health*, 8(1), 64-69.
- Qian, X., Hujun, H., Guangtao, Y., Xu, Y. (2007). Effect of Formaldehyde on Cellular Proliferation of HEK293 Cells. **1st International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, IEEE**, Wuhan, China.
- Ribas, V., García-Ruiz, C., Fernández-Checa, J. C. (2014). Glutathione and mitochondria. *Frontiers in Pharmacology*, 5, 151. doi:10.3389/fphar.2014.00151
- Rizzi, M., Cravello, B., Reno, F. (2014). Textile industry manufacturing by-products induce human melanoma cell proliferation via ERK 1/2 activation. *Cell Proliferation*, 47(6), 578-586. doi: 10.1111/cpr.12132
- Rizzi, M., Cravello, B., Tonello, S., Reno, F. (2016). Formaldehyde solutions in simulated sweat increase human melanoma but not normal human keratinocyte cells proliferation. *Toxicology in Vitro*, 37, 106-112. doi:10.1016/j.tiv.2016.09.009
- Ruas, C. B. G., dos Santos Carvalho, C., de Araújo, H. S. S., Espíndola, E. L. G., Fernandes, M. N. (2008). Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated river. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(1), 86-93. doi:10.1016/j.ecoenv.2007.08.018
- Saito, Y., Nishio, K., Yoshida, Y., Niki, E. (2005). Cytotoxic effect of formaldehyde with free radicals via increment of cellular reactive oxygen species. *Toxicology*, 210(2-3), 235-245. doi:10.1016/j.tox.2005.02.006
- Segner, H. (1998). Isolation and primary culture of teleost hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 120(1), 71-81.
- She, Y., Li, Y., Liu, Y., Asai, G., Sun, S., He, J., Pan, Z., Cui, Y. (2013). Formaldehyde induces toxic effects and regulates the expression of damage response genes in BM-MSCs. *Acta Biochim Biophys Sin*, 45(12), 1011-1020. doi:10.1093/abbs/gmt105

- Shi, Y. Q., Chen, X., Dai, J., Jiang, Z. F., Li, N., Zhang, B. Y., Zhang, Z. B. (2014). Selenium pretreatment attenuates formaldehyde-induced genotoxicity in A549 cell lines. *Toxicology and Industrial Health*, 30(10), 901-909. doi:10.1177/0748233712466129
- Sögüt, S., Songur, A., Özen, O. A., Özyurt, H., Sarsılmaz, M. (2004). Does the subacute (4-week) exposure to formaldehyde inhalation lead to oxidant/antioxidant imbalance in rat liver. *Eur J Gen Med*, 1(3), 26-32.
- Speare, D. J., Arsenault, G., MacNair, N., Powell, M. D. (1997). Branchial lesions associated with intermittent formalin bath treatment of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 20(1), 27-33. doi:10.1046/j.1365-2761.1997.d01-103.x
- Speare, D. J., Macnair, N. (1996). Effects of intermittent exposure to therapeutic levels of formalin on growth characteristics and body condition of juvenile rainbow trout. *Journal of Aquatic Animal Health*, 8(1), 58-63.
- Suttle, N. F., McMurray, C. H. (1983). Use of erythrocyte copper: zinc superoxide dismutase activity and hair or fleece copper concentrations in the diagnosis of hypocuprosis in ruminants. *Research in Veterinary Science*, 35(1), 47-52. doi:10.1016/S0034-5288(18)32201-X
- Swenberg, J. A., Moeller, B. C., Lu, K., Rager, J. E., Fry, R. C., Starr, T. B. (2013). Formaldehyde carcinogenicity research: 30 years and counting for mode of action, epidemiology, and cancer risk assessment. *Toxicologic Pathology*, 41(2), 181-189. doi: 10.1177/0192623312466459
- Szende, B., Tyihák, E. (2010). Effect of formaldehyde on cell proliferation and death. *Cell Biology International*, 34(12), 1273-1282. doi:10.1042/CBI20100532
- Şahan, A. (2020). The effects of formaldehyde, hydrogen peroxide and trichlorophen applications on some hematological stress indicators in mirror carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Aquatica Turcica*, 16(1), 71-81. doi:10.22392/actaquatr.594137
- Teng, S., Beard, K., Pourahmad, J., Moridani, M., Easson, E., Poon, R., O'Brien, P. J. (2001). The formaldehyde metabolic detoxification enzyme systems and molecular cytotoxic mechanism in isolated rat hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions*, 130, 285-296. doi:10.1016/S0009-2797(00)00272-6
- Tkachenko, H., Grudniewska, J. (2016). Evaluation of oxidative stress markers in the heart and liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* walbaum) exposed to the formalin. *Fish Physiology and Biochemistry*, 42, 1819-1832. doi:10.1007/s10695-016-0260-0
- Tollefsen, K. E., Blikstad, C., Eikvar, S., Finne, E. F., Gregersen, I. K. (2008). Cytotoxicity of alkylphenols and alkylated non-phenolics in a primary culture of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69(1), 64-73. doi:10.1016/j.ecoenv.2006.12.005
- Tulpule, K., Hohnholt, M. C., Dringen, R. (2013). Formaldehyde metabolism and formaldehyde-induced stimulation of lactate production and glutathione export in cultured neurons. *Journal of Neurochemistry*, 125(2), 260-272. doi:10.1111/jnc.12170
- Tyihak, E., Bocsi, J., Timar, F., Racz, G., Szende, B. (2001). Formaldehyde promotes and inhibits the proliferation of cultured tumour and endothelial cells. *Cell Proliferation*, 34(3), 135-141. doi:10.1046/j.1365-2184.2001.00206.x

- Ülger, F. (2005). Ameliyathane ve Yoğun Bakımda: Dezenfeksiyon, Sterilizasyon ve Enfeksiyonlardan Korunma Yöntemleri. **IV. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi**, Samsun, Türkiye.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64(2), 178-189. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.03.013
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2), 57-149.
- Vašková, J., Kočan, L., Vaško, L., Perjési, P. (2023). Glutathione-Related Enzymes and Proteins: A Review. *Molecules*, 28(3), 1447. doi:10.3390/molecules28031447
- Vitoux, M. A., Kessal, K., Baudouin, C., Laprévote, O., Melik Parsadaniantz, S., Achard, S., Brignole-Baudouin, F. (2018). Formaldehyde gas exposure increases inflammation in an in vitro model of dry eye. *Toxicological Sciences*, 165(1), 108-117. doi:10.1093/toxsci/kfy125
- Wedemeyer, G. (1971). The stress of formalin treatments in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 28(12), 1899-1904. doi:10.1139/f71-285
- Williams, H. A., Wootten, R. (1981). Some effects of therapeutic levels of formalin and copper sulphate on blood parameters in rainbow trout. *Aquaculture*, 24, 341-353.
- Wlodek, L. (1988). The reaction of sulfhydryl groups with carbonyl compounds. *Acta Biochimica Polonica*, 35(4), 307-317.
- Wu, D., Jiang, Z., Gong, B., Dou, Y., Song, M., Song, X., Tian, Y. (2017). Vitamin E reversed apoptosis of cardiomyocytes induced by exposure to high dose formaldehyde during mice pregnancy. *International Heart Journal*, 58(5), 769-777. doi: 10.1536/ihj.16-279
- Wu, G., Fang, Y. Z., Yang, S., Lupton, J. R., Turner, N. D. (2004). Glutathione metabolism and its implications for health. *The Journal of Nutrition*, 134(3), 489-492. doi:10.1093/jn/134.3.489
- Yıldız, H. Y., Ergonul, M. B. (2010). Is prophylactic formalin exposure a stress source for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*)? *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 57, 113-118.
- Yin H., Xu L., Porter N.A. (2011). Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical Reviews*, 111(10), 5944-5972. doi:0.1021/cr200084z
- Yonar, S. M., Sağlam, N., Yöntürk, Y., Aytemur, A., Koşar, A. (2014). Formaldehit Uygulanan Gökkuşluğu Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'nda Bazı Hematolojik ve Antioksidan Parametrelerin Araştırılması. *Journal of Fisheries Sciences. com*, 8(4), 317-323. doi: 10.3153/jfscom.201438
- Yu, G., Zhang, Y., Liu, S., Fan, L., Yang, Y., Huang, Y., Song, J. (2019). Small interfering RNA targeting of peroxiredoxinII gene enhances formaldehyde-induced toxicity in bone marrow cells isolated from BALB/c mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 181, 89-95. doi:10.1016/j.ecoenv.2019.05.086
- Zararsız, İ., Sarsılmaz, M., Sönmez, M. F., Evren, Köse, E., Yılmaz, H. R., Ozan, E. (2005). Kadavra tespitinde kullanılan formaldehitin sıçan karaciğerinde oluşturduğu hasar ve buna omega-3 yağ asitlerinin etkisi. *Fırat Tıp Dergisi*, 10(3), 103-107.

- Zararsiz, I., Kus, I., Akpolat, N., Songur, A., Ogeturk, M., & Sarsilmaz, M. (2006b). Protective effects of ω -3 essential fatty acids against formaldehyde-induced neuronal damage in prefrontal cortex of rats. *Cell Biochemistry and Function*, 24(3), 237-244. doi:org/10.1002/cbf.1204
- Zararsiz, I., Kuş, I., Ogeturk, M., Akpolat, N., Kose, E., Meydan, S., Sarsilmaz, M. (2007b). Melatonin prevents formaldehyde-induced neurotoxicity in prefrontal cortex of rats: an immunohistochemical and biochemical study. *Cell Biochemistry and Function*, 25(4), 413-418. doi:10.1027/cbf.1315
- Zararsiz, I., Sarsilmaz, M., Tas, U., Kus, I., Meydan, S., Ozan, E. (2007a). Protective effect of melatonin against formaldehyde-induced kidney damage in rats. *Toxicology and Industrial Health*, 23(10), 573-579. doi:0.1177/0748233708089022
- Zararsiz, I., Sonmez, M. F., Yilmaz, H. R., Tas, U., Kus, I., Kavakli, A., Sarsilmaz, M. (2006a). Effects of ω -3 essential fatty acids against formaldehyde-induced nephropathy in rats. *Toxicology and Industrial Health*, 22(5), 223-229. doi:10.1191/0748233706th260oa
- Zerin, T., Kim, J. S., Gil, H. W., Song, H. Y., Hong, S. Y. (2015). Effects of formaldehyde on mitochondrial dysfunction and apoptosis in SK-N-SH neuroblastoma cells. *Cell Biology and Toxicology*, 31, 261-272. doi:10.1007/s10565-015-9309-6
- Zhan, K., Ning, M., Wang, C., Tang, Y., Gu, H., Yan, C., Tang, X. (2016). Formaldehyde accelerates cellular senescence in HT22 cells: possible involvement of the leptin pathway. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 48(8), 771-773. doi:10.1093/abbs/gmw054
- Zhang, B. Y., Shi, Y. Q., Chen, X., Dai, J., Jiang, Z. F., Li, N., Zhang, Z. B. (2013). Protective effect of curcumin against formaldehyde-induced genotoxicity in A549 Cell Lines. *Journal of Applied Toxicology*, 33(12), 1468-1473. doi:10.1002/jat.2814
- Zhang, X., Zhao, Y., Song, J., Yang, X., Zhang, J., Zhang, Y., Li, R. (2018). Differential health effects of constant versus intermittent exposure to formaldehyde in mice: implications for building ventilation strategies. *Environmental Science & Technology*, 52(3), 1551-1560. doi:10.1021/acs.est.7b05015

ÖZ GEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Fatoş YILDIZ

Eğitim Bilgileri

Lisans

Üniversite : Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi

Fakülte : Fen Fakültesi

Bölüm : Biyoloji

Mezuniyet Yılı : 2020

Akademik Yayınlar

Kaptaner, B., Yılmaz, C., Aykut, H., Doğan, E., Fidan, C., Bostancı, M., Yıldız, F. (2021). Bisphenol S leads to cytotoxicity-induced antioxidant responses and oxidative stress in isolated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Molecular Biology Reports*, 48, 7657-7666.

Kaptaner, B., Doğan, A., Aykut, H., Yıldız, F., Dönmez, F., Doğan, E. (2022). Histochemical changes, cellular dynamics and antioxidant responses in the corpuscles of Stannius of the female Lake Van fish (*Alburnus tarichi* Güldenstädt, 1814)(Cyprinidae) during migration from highly alkaline and brackish water to freshwater. *Aquaculture Research*, 53(7), 2959-2969. doi:10.1111/are.15811



T. C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
ARAŞTIRMA KESİN SONUÇ ONAY BELGESİ



VAN YUZUNCUYILUNIVERSITY (TURKEY)
ANIMAL RESEARCHES LOCAL ETHIC COMMITTEE
RESEARCH FINAL REPORT APPROVAL CERTIFICATE

Araştırmancın Adı	Formaldehit'in gökkuşağı alabalığı (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)'ndan izole edilen hepatositler üzerindeki sitotoksik etkilerinin araştırılması
Title of the Research	Investigation of cytotoxic effects of formaldehyde on isolated hepatocytes from rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)
Araştırmacı(lar) Investigator(s)	Yürütücü / Chief investigator: Prof. Dr. Burak KAPTANER / Prof. Dr. Burak KAPTANER Yardımcı Araştırmacı(lar) / Co-investigator(s): Fatoş YILDIZ (Yüksek Lisans Öğrencisi) / (Msc Candidate)
Araştırmancın Başlama Tarihi / Research Starting Date:	03.01.2022
Araştırmancın Bitiş Tarihi / Research Completion Date:	03.03.2023
Proje Süresi / Total Time of Project:	18 Ay / 18 Months
Proje No / Project Number:	
Araştırmayı Destekleyen Kuruluş (varsa) / Funding institution(s) (if available):	Van Y. Y. Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi / Scientific Research Projects Coordination Unit of Van Yuzuncu Yil University
Destek Şekli ve Miktarı / Type and amount of funding:	Tez Projesi (Y. Lisans), - / Thesis Project (MSc), 39.989,19 TL

Karar:

Yukarıda bilgileri verilen araştırma projesinin kesin sonuç raporu Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 30/03/2023 tarih ve 2023/05-39 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Decision:

Final report of the research project detailed above was approved by Van Yuzuncu Yil University Animal Researches Local Ethic Committee in the session held on 30/03/2023 (decision number 2023/05-39)

	BASKAN/CHAIR Prof. Dr. Semiha DEDE	
ÜYE/Member Prof. Dr. N. Tuğba BİNGÖL ÜYE	ÜYE/Member Prof. Dr. Sıddık KESKİN ÜYE/Member	ÜYE/Member Prof. Dr. Nalan ÖZDAL ÜYE/Member
ÜYE/Member Prof. Dr. Atilla DURMUŞ ÜYE/Member	ÜYE/Member Prof. Dr. Yıldırım BAŞBUĞAN ÜYE/Member	ÜYE/Member Doç. Dr. Ferda KARAKUŞ ÜYE/Member
ÜYE/Member Doç. Dr. Cansel Yılmaz DEMİR ÜYE/Member	ÜYE/Member Doç. Dr. Abdurrahman DOĞAN ÜYE/Member	ÜYE/Member Dr. Öğr. Üyesi Dilek ALTINDAL ÜYE/Member
ÜYE/Member Doç. Dr. Şükran ONALAN	ÜYE/Member Vet. Hek. İsmail Hakkı BEHÇET	ÜYE/Member Zir. Müh. Kenan YILDIRIMOĞLU

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 26/05/2023

Tez Başlığı: Formaldehit'in Gökkuşığı Alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*)'ndan İzole Edilen Hepatositler Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışmamın, kapak sayfası, giriş, ana bölümler ve sonuç bölümlerinden oluşan toplam 48 (kırksekiz) sayfalık kısmına ilişkin, 26/05/2023 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre tezimin benzerlik oranı %6 (yüzde altı) dır.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

- Kabul ve onay sayfası hariç,
- Teşekkür hariç,
- İçindekiler hariç,
- Simge ve kısaltmalar hariç,
- Gereç ve yöntemler hariç,
- Kaynakça hariç,
- Alıntılar hariç,
- Tezden çıkan yayınlar hariç,
- 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words)

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Adı Soyadı: Fatoş YILDIZ

Öğrenci No: 20910001168

Anabilim Dalı: Biyoloji

Programı: Tezli Yüksek Lisans

Statüsü: (×) Yüksek lisans

() Doktora

26/05/2023

Fatoş YILDIZ

DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR

Prof. Dr. Burak KAPTANER

ENSTİTÜ ONAYI
UYGUNDUR