

Subkronik Formaldehit İnhalasyonunun Sıçanlarda Bazı Böbrek Enzim Aktivitelerine Etkisi

H.Ramazan Yılmaz*, O.Aslan Özen**, Ahmet Songur***, Sadık Söğüt****, Hüseyin Özyurt****, Mustafa Sarsılmaz***

Özet:

Bu çalışmada, subkronik formaldehit inhalasyonunun, sıçan böbreğinde karbohidrat metabolizmasının önemli enzimleri olan Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD), 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD), Laktat dehidrogenaz (LDH), Malat dehidrogenaz (MDH) ve Heksokinaz (HK) enzim aktivitelerine etkisi araştırıldı. Bu amaçla, 24 adet yetişkin erkek Wistar-Albino sıçan kullanıldı. Bu sıçanların formaldehit inhale ettirilmeyen 8 tanesinden kontrol grubu oluşturuldu. Subkronik formaldehit inhalasyonunun toksik etkisinin araştırıldığı hayvanların 8 tanesine 10 ppm dozunda, diğer 8 tanesine de 20 ppm dozunda 13 hafta süreyle formaldehit inhale ettirildi. Böbrek dokusundaki enzimlerin aktiviteleri spektrofotometrik olarak tayin edildi. 10 ppm dozu inhale ettirilen sıçanlarda, böbrek 6PGD ($p<0.01$), LDH ($p<0.001$) ve MDH ($p<0.01$) enzim aktivitelerinde kontrole göre önemli bir artma gözlemlendi. 20 ppm dozu inhale ettirilen sıçanlarda, böbrek HK ve G6PD enzim aktivitelerinde önemli bir azalma bulundu ($p<0.05$). 6PGD ($p<0.05$), LDH ($p<0.01$) ve MDH ($p<0.05$) enzim aktivitelerinde ise, önemli bir artma gözlemlendi.

Sonuç olarak, erkek sıçanlara inhale ettirilen iki ayrı dozda formaldehitin, böbrek G6PD, 6PGD, LDH, MDH ve HK enzim aktivitelerini değiştirerek glukozun esas olarak girebileceği ana metabolik yolları etkilediği söylenebilir.

Anahtar kelimeler: Subkronik formaldehit inhalasyonu, heksokinaz, glukoz 6-fosfat dehidrogenaz, 6-fosfoglukonat dehidrogenaz, laktat dehidrogenaz, malat dehidrogenaz.

Formaldehit (HCHO), renksiz, normal sıcaklıkta hızla gaz haline dönüşebilen, yanabilen ve düşük molekül ağırlıklı kimyasal bir maddedir (1,2). Bu kimyasal, proteinleri sertleştirip çürümeleri önlediğinden biyolojik örneklerin saklanması ve mumyacılıkta, ayrıca böcekleri ve birçok mikroorganizmayı öldürdüğünden dezenfektan olarak kullanılmaktadır. Ayrıca tıpta, özellikle Anatomi laboratuvarlarında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Bu maddenin yaygın kullanımının yanında insan sağlığına önemli zararları da vardır. Özellikle, anatomistler, patoloğlar ve tahnitçiler formaldehite, işlerinden dolayı aşırı maruz kalmaktadırlar (3). Formaldehite maruz kalan anatomistler, patoloğlar ve cenaze işleriyle uğraşan kişiler üzerinde yapılan araştırmalarda, beyin kanseri, kan kanseri ve kolon kanserinden ölenlerin sayısında normal popülasyona göre bir artış olduğu gözlenmiştir (1). Formaldehitin, deri iltihabı, göz mukozasının tahriş olması, astım, akciğer ödemi, rinit ve farenjit gibi hastalıklara sebep olduğu bildirilmiştir (1,4). Ayrıca formaldehitin, in vitro olarak, DNA tek zincir kırıklarına sebep olduğu ve insan hücrelerinde olduğu gibi, Drosophila larvalarında, bakterilerde ve funguslarda mutajen (3) ve rodentlerde bir solunum karsinogeni olduğu bilinmektedir (3,5). Tavşan gözünün korneasına verilen formaldehitin, retina ve görme sinirine zarar verdiği bildirilmiştir (6).

Thrasher ve Kilburn, gebe fareleri, çiftleştirmeden önce, çiftleştirme esnasında ve gebelik süresince formaldehite maruz bıraktıklarında, embriyo ölümlerinin, kriptoorşitizm ve aberrant ossification venters gibi cenine ait anomalilerin arttığını, askorbik

Bu çalışma, II. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi 31 Ekim-4 Kasım 2001 Kuşadası'nda Poster olarak sunulmuştur.

Bu çalışma İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde yapılmıştır.

*İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Malatya

**Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi ABD, Zonguldak

***Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi ABD, Elazığ

****İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ABD, Malatya

Yazışma Adresi: Dr. H.Ramazan YILMAZ

Çöşnük Mah. M.Buyruk Cad.

Buluş Apt. C Blok A Kapısı

Kat 4 No 18

44330 MALATYA

asit konsantrasyonunun azaldığını, özellikle doğumdan sonraki dördüncü ayda endoplazmik retikulum, lizozomlar ve mitokondrilerin enzimlerinde anormalliklere, demir eksikliğiyle artan metabolik asidoza sebep olduğunu belirtmişlerdir (7). Yapılan bazı çalışmalarda, formaldehitin bazı enzimlerin aktivitelerini inhibe ettiği ve bazı enzimlerin aktivitelerini de arttırdığı belirtilmiştir (3,8).

Bu çalışmada; subkronik olarak formaldehite inhalasyon yoluyla maruz bırakılan erkek sıçanların böbreklerinde; karbohidrat metabolizmasının önemli enzimleri olan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD), 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD), laktat dehidrogenaz (LDH), malat dehidrogenaz (MDH) ve hekzokinaz (HK) enzim aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Formaldehit gazının oluşturulması:

Formaldehit gaz halinde satılmadığından ya formalin (%37-40'lık sulu çözelti) ya da polimer halde (paraformaldehit- $\text{HO}(\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$) piyasaya sürülür. Çalışmada kullanılan formaldehit gazı, paraformaldehitten (Merck KgaA 64271 Darmstadt, Germany) termal depolimerizasyon yoluyla elde edildi (9). Deneyin yapıldığı cam odacığın atmosferindeki formaldehit seviyesi, belli aralıklarla dijital bir formaldehit-metre kullanılarak ölçüldü (Environmental Sensors Co. Boca Raton FL 33431 USA).

Deney gruplarının oluşturulması: Her grupta 8 adet olmak üzere toplam 3 grup yetişkin erkek albino Wistar sıçanı (250 ± 5 gram) Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyotıp Araştırma Biriminden alındı. Gruplar, sıçanlar arasından randomize seçim yapılarak oluşturuldu. Sekiz adet sıçan kontrol grubu olarak ayrıldı ve diğer deneysel işlemler bitirilinceye kadar ayrı bir bölmede rutin beslenme diyeti ile beslendi. Diğer sıçanlardan oluşan deney grupları şu şekilde oluşturuldu: Subkronik grup:

Grup 1 (n=8): 13 hafta süreyle 10 ppm dozunda formaldehit inhalasyonuna maruz bırakıldı.

Grup 2 (n=8): 13 hafta süreyle 20 ppm dozunda formaldehit inhalasyonuna maruz bırakıldı.

Sıçanlara formaldehit inhalasyonunun sağlanması: Sıçanlar formaldehite horizontal olarak yerleştirilmiş cam odacıklarda maruz bırakıldı. Her bir odacıkta 4 sıçan bulunduruldu. Odacıklarda deney boyunca şu özellikler sabit tutuldu: Formaldehitin cam odacığa pompalanma hacmi: 10 litre/dakika, sıcaklık: 25 ± 2 °C, rölatif nem oranı: %45-55, günlük formaldehite maruz bırakılma siklusu: 12 saat/gündüz-gece.

Inhalasyon periyodunda sıçanlara yiyecek ve içecek verilmedi. Diğer zamanlarda Enstitü tarafından belirlenmiş stok diyet verildi. Sıçanlar günlük olarak kontrol edildi ve her hafta ağırlıkları ölçülerek kaydedildi.

Biyokimyasal analizler: 13'er haftalık formaldehit inhalasyonu periyodundan sonra sıçanlar eter anestezisi altında dekapitasyonla öldürüldü, otopsi yapıldı ve inspeksiyonla tesbit edilen patolojik değişiklikler kaydedildi. Böbrek dokusu çıkarıldıktan sonra soğuk (+4°C) 0.15 M'lık KCl ile yıkandı ve kurutma kağıdı ile kurutuldu. Böbrek dokusu tartıldıktan sonra büyük parçalara ayrıldı ve bir homojenizatör ile (Ultra Turrax Type T25-B, IKA Labortechnik, Germany) 0.15 M'lık KCl çözeltisi içinde 16000 rpm'de 3 dakika homojenize edildi. Homojenizasyon bir buz kabının içerisinde gerçekleştirildi. Homojenat 5000xg'de 1 saat (+4 °C'de) santrifüjlenerek süpernatant elde edildi. Analiz zamanına kadar (1 hafta) -40 °C'de bekletildi. G6PD, 6PGD, MDH, LDH ve HK enzimlerinin aktiviteleri süpernatanda spektrofotometrik olarak tayin edildi (10,11).

HK tayini: Hekzokinaz aktivitesi, glukoz'un HK'la glukoz – 6- fosfat'a çevrilmesi ve glukoz 6- fosfat'tın da G6PD enzimiyle glukonat 6- fosfat'a dönüşmesi esnasında oluşan NADPH'nin 25 °C de 340 nm de artan absorbanı kaydedildi ve dakikadaki absorban değişiminden hesaplandı (10).

LDH tayini: Aktivite, piruvat'ın laktat'a çevrilmesi sırasında oksitlenen NADH'nin 25 °C de 340 nm de azalan absorbanı kaydedildi ve dakikadaki absorban değişiminden hesaplandı (10).

G6PD tayini : G6PD aktivitesi, glukoz 6- fosfat'ın G6PD enzimiyle 6-fosfoglukanolakton'a dönüşmesi sırasında oluşan NADPH'nin 25 °C de 340 nm de artan absorbanı kaydedildi ve dakikadaki absorban değişiminden hesaplandı (10).

6PGD tayini : Aktivite, 6-fosfoglukonat'ın 6PGD'la D- riboluz 5-fosfat'a çevrilmesi sırasında oluşan NADPH'nin 30 °C de 340 nm de artan absorbanı kaydedildi ve dakikadaki absorban değişiminden hesaplandı (11).

MDH tayini: Aktivite, oksaloasetat'ın MDH'la malik asit'e dönüştürülmesi esnasında oksitlenen NADH'nin 25 °C de 340 nm de azalan absorbanı kaydedildi ve dakikadaki absorban değişiminden hesaplandı (10).

LDH ve MDH enzimlerinin aktivitelerinin tayini için karaciğer süpernatantları 30 kez tamponla seyreltilerek kullanıldı.

Tablo 1: 13 hafta süreyle inhalasyon yoluyla formaldehite maruz bırakılan sıçanların böbrek dokularında G6PD, 6PGD, MDH, LDH ve HK aktiviteleri. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma ($X \pm SD$) olarak verilmiştir.

Gruplar	Spesifik Aktivite mU/ mg protein					
	N	HK	G6PD	6PGD	LDH	MDH
Kontrol	8	4.6 $\pm$ 1.2	1.7 $\pm$ 0.5	3.5 $\pm$ 0.8	272 $\pm$ 87	2648 $\pm$ 551
Grup I (10 ppm)	8	3.9 $\pm$ 0.8	1.5 $\pm$ 0.6	5.1 $\pm$ 0.5**	613 $\pm$ 153***	3775 $\pm$ 528**
Grup II (20 ppm)	8	3.4 $\pm$ 0.4*	1.3 $\pm$ 0.5*	4.8 $\pm$ 0.9*	400 $\pm$ 83**	3613 $\pm$ 628*

* p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (kontrol grubu ile karşılaştırıldığında)

Protein tayini: Lowry metoduna (12) göre süpernatanda protein tayinleri yapıldı.

İstatistik analizi: SPSS® for Windows bilgisayar programı kullanıldı. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. Grupların ortalamaları arasındaki farkın anlamlılığı Mann Whitney U testi ile test edildi. P<0.05 ve daha altı anlamlı kabul edildi. İntra korelasyon analizleri Pearson two-tailed testi ile yapıldı.

Bulgular

Böbrek dokusu G6PD, 6PGD, MDH, LDH ve HK enzimlerinin aktiviteleri Tablo 1’de özetlenmiştir. Kontrol grubuna göre, subkronik olarak 10 ppm dozda formaldehit uygulanan grupta 6PGD (p<0.01), LDH (p<0.001) ve MDH (p<0.01) enzim aktivitelerinde önemli bir artış gözlemlendi. HK ve G6PD enzim aktivitelerinde istatistiksel olarak önemli olmayan bir azalma bulundu. Subkronik olarak 20 ppm dozda formaldehit uygulanan grupta HK ve 6PGD enzim aktivitelerinde istatistiksel olarak önemli bir azalma gözlemlendi (p<0.05). G6PD (p<0.05), LDH (p<0.01) ve MDH (p<0.05) enzim aktivitelerinde ise istatistiksel olarak önemli bir artış tespit edildi. Enzim aktiviteleri arasındaki korelasyon araştırıldığında, 10 ppm dozda, G6PD ile LDH (r = 0.897, p = 0.003) ve LDH ile MDH (r = 0.804, p = 0.016) arasında pozitif bir korelasyon bulundu. 20 ppm dozda, HK ile G6PD (r = -0.716, p = 0.046), HK ile LDH (r = -0.688, p = 0.059), arasında negatif bir korelasyon ve G6PD ile LDH (r = 0.917, p = 0.001), G6PD ile MDH (r = 0.877, p = 0.004) ve LDH ile MDH (r = 0.836, p = 0.001) arasında pozitif bir korelasyon gözlemlendi.

Tartışma

Formaldehit; gen mutasyonları, delesyon, kromozomal hatalar, tek zincir kırıkları, kardeş kromatit değiş tokuşu ve hücre değişimlerini kapsayan genotoksik (1,13,14), mutajenik,

teratojenik, embriyotoksik ve karsinojenik (15) bir kimyasaldır.

Çalışmamızda, 10 ppm formaldehite subkronik olarak maruz kalan sıçanların böbrek 6PGD (p<0.01), LDH (p<0.001) ve MDH (p<0.01) enzim aktivitelerinde, kontrol grubuna göre, istatistiksel olarak önemli bir artış gözlemlenmiştir. Ayrıca, 20 ppm dozda formaldehite maruz kalan sıçanlarda da 6PGD (p<0.05), LDH (p<0.01) ve MDH (p<0.05) enzim aktivitelerinde, kontrol grubuna göre önemli bir artış bulundu. LDH ve MDH enzim aktiviteleri arasında hem 10 ppm dozda hem de 20 ppm dozda istatistiksel olarak pozitif bir korelasyon gözlemlendi. 6-fosfoglukonat dehidrogenaz, pentoz fosfat yolunun anahtar enzimidir. NADP’dan NADPH oluşumunu sağlar. NADPH’lar, çeşitli biyosentez yollarında bir elektron donörü olarak, oksidatif hasara karşı hücreleri korumak için gerekli olan redükte glutatyonun sentezinde gereklidir (16).

Glutatyon, iç ve dış kaynaklı toksik kimyasallara karşı, hücre savunma sisteminde eşsiz bir rol oynar (17). Ayrıca protein ve DNA sentezinde, hücre membranının bütünlüğünün korunmasında ve enzim aktivitelerinin düzenlenmesinde görev almaktadır (17). Laktat dehidrogenaz, canlı organizmanın her hücresinde bulunan genel bir enzimdir (18). Diğer çoğu enzimler gibi LDH da idrarda bulunur ve özellikle böbrek ve mesane kanserinde günlük sentezlenmesinde artış olduğu rapor edilmiştir (19). Ayrıca 6PGD, MDH ve LDH enzimleri NADPH ve NADH üretmektedirler. Formaldehit verildiği süre zarfında değişik mekanizmalarla böbrekte reversibl veya irreversibl hasar oluşturmuş olabilir. Bu durumda hücrelerin redoks durumunun korunabilmesi ve hasarın minimumda tutularak özellikle membranlarda oluşan hasarın tamir edilmesi için NADPH ve NADH moleküllerine ihtiyaç vardır. 6-fosfoglukonat dehidrogenaz, MDH ve LDH enzim aktivitelerindeki artış, böbrekte meydana gelmiş

olan hasarların tamiri için gerekli olan bir yeni duruma adaptasyon süreci olabilir. Ku ve ark.(20), formaldehitin karaciğer hücrelerinde glutasyon seviyelerini azalttığını ve LDH enzim aktivitesini de arttırdığını iddia etmişlerdir. Farooqui ve ark.(21) formaldehiti subletal dozda (72 mg/kg) intraperitoneal olarak erkek farelere verdiklerinde, safra salgısında iki kata varan artış, glutasyon seviyesinde kontrole göre, karaciğerde %39, böbrekte %33, akciğerde %31 ve beyinde %22 oranında azalma olduğunu belirtmişlerdir. Yine Skrzydlewska ve ark.(16) araştırmalarında, vücuda alındığında karaciğerde önce formaldehite, daha sonra da formik asite metabolize edilen metanolün karaciğerdeki glutasyonu azalttığını belirtmişlerdir.

Çalışmamızda, subkronik olarak formaldehite maruz kalan erkek sıçanların böbrek HK ve G6PD enzim aktivitelerinde, kontrol grubuna göre hem 10 ppm dozda hem de 20 ppm dozda bir azalma bulduk. 20 ppm dozdaki azalma her iki enzim için de istatistiksel olarak önemli bulundu. Ayrıca 20 ppm dozda HK ile G6PD enzim aktiviteleri arasında önemli bir negatif korelasyon gözlemlendi.

Hekzokinaz ve G6PD enzim aktivitelerindeki inhibisyon, transkripsiyon, translasyon ve /veya substrat seviyesinde olabilir. Formaldehit, HK enziminin yapısında veya enzimin substratında bir değişiklik yapmış olabilir. Hekzokinaz enziminin substratı glukozdur. Hekzokinaz, ATP varlığında glukozu, glukoz-6-fosfat'a çevirir. Enzim aktivitesinde meydana gelen azalma, glukoz-6-fosfat miktarının azalmasına sebep olacaktır. Glukoz-6-fosfat G6PD enziminin substratıdır. Glukoz-6-fosfat miktarında meydana gelen azalma G6PD enziminin aktivitesinin azalmasına sebep olacaktır.

Cassee ve Feron (8), üç gün belirli aralıklarla formaldehite (3.6 ppm) maruz bıraktıkları ratların burun epitelindeki biyokimyasal ve histopatolojik değişimleri incelediklerinde, formaldehitin glutasyon S-transferaz, glutasyon peroksidaz, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitelerinde bir değişiklik gözlemediklerini belirtmişlerdir. Ancak, bu çalışmada hem uygulanan formaldehit miktarı az hem de uygulama zamanı kısadır. Buna rağmen, formaldehitin, riniti, dejenerasyonu, Frank nekrozunu, hiperplaziyi ve silialı ve siliasız nazal respiratör epitelin skuamöz metaplazisini indüklediğini belirtmişlerdir (8).

Sonuç olarak, subkronik olarak uygulanan formaldehit erkek sıçanlarda, HK ve G6PD enzim aktivitelerini azaltırken, 6PGD, MDH ve LDH enzim aktivitelerini arttırmıştır. Formaldehitin bu enzimler üzerine etkisini hangi mekanizmayla yaptığı açık değildir. Bu etkinin enzim

transkripsiyonu veya translasyonunu etkilemesinin yanısıra enzimlerin aktivitelerini indirekt bazı ara yollar üzerinden de değiştirebileceğini düşünmekteyiz. Enzim aktivitelerindeki azalma ve artma nedenlerinin daha iyi açıklanabilmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

The Toxic Effects Of Subchronic (13 WEEKS) Formaldehyde Inhalation on Some Enzymes In The Kidney Of Male Rats

Abstract:

In this study, the toxic effects of subchronic formaldehyde inhalation on the activities of hexokinase (HK), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGH), lactate dehydrogenase (LDH), and malate dehydrogenase (MDH) of the kidney of male rats were investigated. The aim of this study was to evaluate whether enzyme activities are changed in the kidney of rats exposed to subchronic formaldehyde inhalation (13-weeks). Twenty-four male Wistar albino rats were randomly divided into three separate groups. The first eight rats were used as control group. Rats were exposed to atmosphere containing 10 (n=8) and 20 ppm (n=8) formaldehyde for 13 weeks, respectively in group I and group II. Spectrophotometric method was used to determine the activities of the enzymes. The results showed a remarkable increase in 6PGD ($p<0.01$), LDH ($p<0.001$), and MDH ($p<0.01$) activities in the kidney tissues from rats exposed to 10 ppm formaldehyde for 13-weeks compared to controls. It was shown significantly that the HK and G6PD activities were reduced ($p<0.05$) and 6PGD ($p<0.01$) and MDH ($p<0.05$) activities were increased in the kidney tissues from rats exposed to 20 ppm formaldehyde for 13 weeks. As a result, it can be suggested that formaldehyde at two different doses inhaled by male rats may affect the main metabolic roots of glucose leading to the changes of the enzyme activities of kidney G6PD, 6PGD, LDH, MDH, and HK. Although underlying mechanism that affects enzyme activities is not clear, it seems more likely to change the activities by direct mechanism on enzyme activity rather than indirect mechanisms such as transcription and translation processes of the enzymes.

Key words: Subchronic formaldehyde inhalation, hexokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase.

Kaynaklar

1. Shaham J, Bomstein Y, Meltzer A, Kaufman Z, Palma E, Ribak J: DNA-protein crosslinks, a biomarker of exposure to formaldehyde *in vitro* and *in vivo* studies. *Carcinogenesis* 17: 121-125, 1996.

2. Kim CW, Song JS, Ahn YS, Park SH, Noh JH, Hong CS: Occupational asthma due to formaldehyde. *Yonsei Med J* 42 (4): 440-445, 2001.
3. Schlink K, Janßen K, Nitzsche S, Gebhard S, Hengstler JG, Klein S, Oesch F: Activity of O⁶-methylguanine DNA methyltransferase in mononuclear blood cells of formaldehyde-exposed medical students. *Arch Toxicol* 73: 15-21, 1999.
4. Ensafi AA, Abassi S: Sensitive reaction rate method for the determination of low levels of formaldehyde with photometric detection. *Fresenius J Anal Chem* 363:376-379, 1999.
5. Bernstein R, Stayner L, Elliott L, Kimbrough R, Fallk H, Blade L: Inhalation exposure to formaldehyde : An overview of its toxicology, epidemiology, Monitoring, and control. *Am Ind Hyg Assoc J* 45(11): 778-785, 1984.
6. Hayasaka Y, Hayasaka S, Nagaki Y: Ocular changes after intravitreal injection of methanol, formaldehyde, or formate in rabbits. *Pharmacol Toxicol* 89(2): 74-78, 2001.
7. Thrasher JD, Kilburn KH: Embryo toxicity and teratogenicity of formaldehyde. *Arch Environ Health* 56 (4): 300-311, 2001.
8. Cassee FR, Feron VJ: Biochemical and histopathological changes in nasal epithelium of rats after 3-day intermittent exposure to formaldehyde and ozone alone or in combination. *Toxicol Lett* 72: 257-68, 1994.
9. Chang JC, Steinhagen WH, Barrow CS: Effect of single or repeated formaldehyde exposure on minute volume of B6C3F1 mice and F-344 rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 61: 451-59, 1981.
10. Boehringer and Mannheim: Biochemica information handbook, Hexokinase (p.113-114), Glucose-6-phosphate dehydrogenase (p.99-100), lactate dehydrogenase (p.121-122), malate dehydrogenase (p.124-125), 1973.
11. Rudack D, Gozukara EM, Chisholm ME, Holten D: The effect of dietary carbohydrate and fat on the synthesis of rat liver 6-phosphogluconate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 252: 305-313, 1971.
12. Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-75, 1951.
13. Grafstrom RC, Albert J, Fornace JR, Autrup H, Lechner JF, Harris CC: Formaldehyde damage to DNA and inhibition of DNA repair in human bronchial cells. *Science* 220:216-218, 1983.
14. Casanova M, Heck HAD, Everitt JJ, Harrington WW, Popp JA: Formaldehyde concentrations in the blood of rhesus monkeys after inhalation exposure. *Food Chem Toxicol* 26: 715-716, 1988.
15. McLaughlin JK: Formaldehyde and cancer: A critical review. *Int Arch Occup Environ Health* 66: 295-301, 1994.
16. Ganczakowski M, Town M, Bowden DK, Vulliamy TJ, Kaneko A, Clegg JB, Weatherall DJ, Luzzatto L: Multiple glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient variants correlate with malaria endemicity in Vanuatu Archipelago (Southwestern Pacific). *Am J Hum Genet* 56: 294-301, 1995.
17. Skrzydlewska E, Farbiszewski R: Decreased antioxidant defense mechanisms in rat liver after methanol intoxication. *Free Radic Res* 27: 369-375, 1997.
18. Tóth L, Yuhász M, Varga T, Csikkel-Szolnoki A, Nemesók J: Some effect of CuSO₄ on carp. *J Environ Sci Health* 3: 627-635, 1996.
19. Schwartz MK, Bodansky O: Lactic dehydrogenase (Clinical aspect). In: *Methods in enzymology* (Ed. Wood WA). *Academic press inc, Orlando, Florida*, 1966, 9: pp: 294-302.
20. Ku RH, Billings RE: Relationships between formaldehyde metabolism and toxicity and glutathione concentrations in isolated rat hepatocytes. *Chem Biol Interact* 51(1): 25-36, 1984.
21. Farooqui MY, Upreti RK, Ahmed AE, Ensari GA: Influence of intraperitoneally administered formaldehyde on bile production and tissue glutathione levels in rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 53: 233-236, 1986.