

Subakut Ve Subkronik Formaldehit İnhalasyonundan Sonra Sıçanlarda Karaciğer Enzimatik Antioksidan Sistemin Değerlendirilmesi

Mustafa Sarsılmaz*, Oğuz Aslan Özen*, Hüseyin Özyurt**

Özet: Bu çalışmada formaldehit inhalasyonunun karaciğerin enzimatik antioksidan sistemine etkisi araştırılmıştır. 50 adet erişkin albino-Wistar cinsi erkek sıçanlar her birinde 10 sıçan olmak üzere 5 gruba bölündü. Bir grup kontrol (0 ppm), diğer dört grup subakut (4 hafta) ve subkronik (13 hafta) sürede haftada 5 gün, günde 8 saat, 10 ve 20 ppm formaldehit gazına maruz bırakıldı. Sıçanlar invivo olarak formaldehit üretimine sebep olan besinlerden uzak tutuldu. Bu işlemlerin sonunda sıçanlar eter anestezisi altında dekapitasyonla öldürüldü ve karaciğer dokusu çıkarılarak biyokimyasal analizlerde kullanıldı. Karaciğer dokusunda antioksidan enzimlerden total süperoksit dismutaz (t-SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri tayin edildi. Kontrol grubunun ortalama enzim aktiviteleri CAT için 48.22 ± 19.76 k/gr prot, t-SOD için 0.142 ± 0.026 ü/mg prot ve GSH-Px için 10.53 ± 1.15 Ü/gr prot. olarak bulundu. Enzim aktiviteleri formaldehit maruziyetinden fazla etkilenmedi. Bununla birlikte sadece subakut 20 ppm grubunda CAT aktivitesinde anlamlı bir azalma tespit edildi (%27.3) ($p < 0.016$).

Sonuç olarak, Formaldehit metabolizmasının en hızlı seyrettiği organ olan karaciğerde, subakut 10 ppm, subkronik 10 ve yine subkronik 20 ppm formaldehit gazına maruz kalmanın bu organın enzimatik antioksidan sistemine belirgin bir şekilde negatif veya pozitif etkisinin olmadığı sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Formaldehit toksikasyonu, karaciğer, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz.

Formaldehit ($H_2C=O$) endüstriyel kullanımı bakımından aldehit ailesinin en önemli üyesidir. İrrite edici ve zehirli bir gazdır. Proteinleri sertleştirip çürümelerini önlediği için biyolojik örneklerin saklanması, cesetlerin mumyalanmasında ve dezenfektan olarak kullanılmaktadır.

Son yıllarda formaldehitin tıbbi açıdan özellikle Anatomi laboratuvarlarında kullanımı nedeniyle rağbet edilen yönünün yanında, insanlara birçok yan etkilerinin olduğunu gösteren makaleler de yayınlanmıştır.

Sıçanlar uzun süreli 6-15 ppm dozunda formaldehite maruz bırakıldığında nazal tümöre yol açmaktadır (1,2,3). Yüksek konsantrasyonlarda formaldehit solunursa mukostaz ve siliostaza gelişir (4). Deneysel çalışmalarda oral yolla alınan formaldehitin genel metabolizmada birçok anormalliğe yol açtığı tespit edilmiştir: Hamile halde iken formaldehit alan sıçanların yavrularında doğum ağırlığının düşmesi (5), erkek Wistar sıçanlarda anormal sperm insidansının artması (6), *Drosophila Melanogaster*'de hemen bütün mutasyon tiplerine

rastlanması (7), midenin glandüler yapısında tümör-promoting aktivitenin olması (8). Bu bulguların formaldehit inhalasyonunu takiben de olup-olmadığına dair herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Hangi yolla alınırsa alınsın kana geçen formaldehitin veya vücutta endojen olarak üretilen formaldehitin katabolizması aynı şekilde olmaktadır. Formaldehit enzimatik olarak hızla formik asite çevrilerek uzaklaştırılmaktadır. Bu reaksiyonu katalizleyen birçok enzim olmakla birlikte bunların en önemlisi NAD-bağımlı formaldehit dehidrogenazdır (9). Bu enzimatik reaksiyonun ve bundan sonraki karbondioksit okside olma reaksiyonunun insan ve hayvanlardaki en yoğun gerçekleştiği doku karaciğerdir. Dolayısıyla dışarıdan yoğun bir şekilde vücuda giren formaldehitin karaciğer metabolizmasını etkilemesi kaçınılmaz gibi görünmektedir.

Bu çalışmanın amacı; subakut ve subkronik olarak formaldehite inhalasyon yoluyla maruz bırakılan sıçanlarda; formaldehit katabolizmasıyla, kullandığı kofaktör nedeniyle direkt ilişkisi bulunan antioksidan enzimlerden glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ile indirekt ilişkili olan diğer antioksidan enzimlerden total süperoksit dismutaz (t-SOD) ve katalaz (CAT) enzimlerinin aktivitesini ölçmek, eğer var ise

*Fırat Üniv. Tıp Fak. Anatomi Ana bilim Dalı, ELAZIĞ

** İnönü Üniv. Tıp Fak. Biyokimya ABD, MALATYA

Yazışma adresi:

Doç. Dr. Mustafa SARSILMAZ

Fırat Üniversitesi Anatomi ABD, ELAZIĞ

solunan formaldehit miktarı ve süresi ile enzim aktiviteleri arasındaki ilişkileri ortaya koymaktır.

Gereç ve Yöntem

Deney gruplarının oluşturulması: Her grupta on (10) adet olmak üzere toplam 5 grup yetişkin erkek albino Wistar sıçanı (250 ± 5 gram) Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Araştırma Ünitesi'nden alındı. Gruplar, sıçanlar arasından rasgele seçim yapılarak oluşturuldu. 1 haftalık alıştırmaya süresinden sonra, on adet sıçan kontrol grubu (0 ppm) olarak ayrıldı. Diğer sıçanlardan oluşan deney grupları şu şekilde oluşturuldu: A) Subakut grup: 4 hafta süreyle; grup 1 (n=10): 10 ppm, grup 2 (n=10): 20 ppm. B) Subkronik grup: 13 hafta süreyle; grup 3 (n=10): 10 ppm, grup 4 (n=10): 20 ppm dozunda formaldehite maruz bırakıldı.

Formaldehit gazının uygulanması: Formaldehit gazı, paraformaldehitten (Merck KgaA 64271 Darmstadt, Germany) termal depolimerizasyon yoluyla elde edildi (10). Sıçanlar formaldehite 100 lt. hacmindeki cam odacıklara alttan gidecek biçimde ve sıçanların tüm vücudunu etkileyecek şekilde verildi. Giriş ve çıkıştaki formaldehit seviyesi, düzenli aralıklarla OSHA (Occupational Safety and Health Administration) tavsiyeli formaldehit ölçen cihaz (Enviromental Sensors Co. Boca Raton FL 33431 USA- Catalog No: MVN-300) ile tespit edildi. Her bir odacıkta 10 sıçan bulunduruldu. Havanın akış hızı: 10 litre/dakika, sıcaklık: 25 ± 2 °C, nem oranı: %45-55, günlük ışık siklusu: 12 saat gündüz/gece şeklindeydi. Hem kontrol grubundaki hem de deney grubundaki sıçanlara inhalasyon periyodunda (8 saat) yiyecek ve içecek verilmedi. Diğer zamanlarda Enstitü tarafından belirlenmiş stok diyet ve çeşme suyu verildi. Sıçanların günlük muayenesi yapıldı.

Biyokimyasal analizler: 4 ve 13'er haftalık formaldehit inhalasyonu periyodundan sonra sıçanlar eter anestezisi altında dekapitasyonla öldürüldü, inspeksiyonla muayene edildi. Karaciğer dokusu çıkarıldıktan sonra buz gibi soğuk salin ile yıkandı. Analiz zamanına kadar (1 hafta) -80 °C'de bekletildi. Karaciğer dokusu tartıldıktan sonra büyük parçalara ayrıldı ve bir homojenizatör ile (Ultra Turrax Type T25-B, Janke and Kunkel GmbH and Co. KG, IKA Labortechnik, Germany) Tris-HCl tamponu (pH 7.4) 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.

CAT ve GSH-Px enzimleri süpernatantta ölçüldü. Süpernatant daha sonra 1/1 oranında etanol/kloroform karışımı (5/3, v/v) eklenerek vortekslenildi ve 5000xg'de (+4 °C'de) 1 saat santrifüjlendi. Üstteki etanol fazında t-SOD aktivitesi belirlendi. Protein tayini: Lowry metoduna göre yapıldı(11). Homojenat, süpernatant ve etanol ekstraktında protein tayinleri yapıldı. t-SOD tayini: Sun ve arkadaşlarının tariflediği(12) ve Durak ve arkadaşlarının modifiye ettiği metoda göre çalışıldı (13). Kısaca: reaksiyon ortamında ksantin/ksantin oksidaz sisteminin ürettiği süperoksit radikalleri normalde nitroblue tetrazoliumu (NBT) redükleyerek 560 nm'de en iyi tesbit edilebilen mavi-mor bir rengin oluşmasına neden olur. Karaciğer süpernatantında bulunan t-SOD, bu redüklenmeyi inhibe ederek renk oluşumunu engeller. NBT redüklenmesinin %50 inhibisyonuna neden olan enzim aktivitesine 1 ünite denildi. Sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi. CAT tayini: Aebi (14) metoduna göre yapıldı. Özet olarak; fosfat tamponu içerisinde (pH 7.4) hazırlanıp 240 nm'de yaklaşık 0.500 absorbans veren H₂O₂ çözeltisinin içine numune ilave edildiğinde, numunede bulunan CAT enzimi H₂O₂'yi parçalayarak moleküler oksijen ve su oluşturur. Bu arada absorbans azalması monitörden takip edilip eğimden aktivite hesabı yapıldı. Sonuçlar k (hız sabiti)/gram protein olarak ifade edildi. GSH-Px tayini: Paglia (15) ve arkadaşlarının metoduna göre yapıldı. Kısaca: karaciğer süpernatantında bulunan GSH-Px, reaksiyon ortamına ilave edilen redükte glutatyonu (GSH) okside glutatyon (GSSG) çevirir. Ortama ilave edilmiş olan glutatyon redüktaz enzimi okside glutatyonu yeniden GSH'a çevirirken molaritesini bildiğimiz NADPH okside olur. İnkübasyon periyodundan sonra (30 dak.) 340 nm'de absorbans azalması belirlenip eğimden aktivite hesaplandı. Sonuçlar U/gr protein olarak ifade edildi.

İstatistik analizi: "SPSS® for Windows" bilgisayar programı kullanıldı. 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

Karaciğer dokusu antioksidan enzim aktiviteleri Tablo I'de özetlenmiştir. Tabloya göre, enzimler içinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında farklılık gösteren tek enzim katalazdır. Subakut grupta 20 ppm dozda formaldehit uygulanan grupta CAT aktivitesi önemli oranda düşmüştür

($p < 0,02$). Subakut grupta 10 ppm formaldehit uygulanan grupta da kontrole göre önemli bir aktivite azalması göze çarpmaktadır ama bu istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$). GSH-Px enzimi açısından da subkronik grupta kontrole göre aktivite azalması tesbit edildi ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0,05$). Enzim sonuçları arasında korelasyon araştırıldığında, en yüksek korelasyon katsayısı subkronik 20 ppm grubunda t-SOD ve GSH-Px arasında bulundu. Burada iki enzim arasında negatif bir korelasyon vardı ($r = -0,585$, $p = 0,087$).

Tartışma

Anatomi laboratuvarlarında devamlı çalışanlar için formaldehit önemli bir tehdit oluşturmaktadır. Bir yıl süreyle günün belli saatlerinde laboratuvarında bulunan öğrencilerde sadece irritasyon bulguları tesbit edilmiş, ancak bunun çok ileri düzeyde bir yan etkiye sebep olduğu gösterilememiştir (1). Ancak bilim dalı olarak Anatomi ile uğraşan öğretim elemanlarında formaldehite bağlı daha ileri rahatsızlıklar görülebilmektedir. Literatür araştırmalarımızda rastladığımız deneysel çalışmalar genellikle hayvanlara oral yolla verilen formaldehitin toksik etkileri üzerinedir (6-8). Halbuki anatomi laboratuvarı çalışanları için önemli olan solunan formaldehitin etkisidir. Bundan dolayı biz deneyimizi planlarken literatürde az sayıda örneği bulunan, inhalasyon yoluyla verilen formaldehitin etkilerini konu edinen deneyi tercih ettik.

Karaciğer vücut metabolizmasında detoksifikasyon, ksenobiyotik metabolizması, aminoasit, protein, şekerler, vs. sentezi gibi merkezi bir role sahip olup, diğer dokulardan farklı olarak bazı ayrıcalıklara sahiptir. Mitokondrial, mikrozomal elektron transport sistemleri, prostaglandin sentezi, ksenobiyotik metabolizması gibi metabolik yollarda üretilen

serbest oksijen radikallerinin (SOR) detoksifikasyonu için iyi bir enzimatik ve non enzimatik antioksidan savunma sistemine sahiptir. Bu sayede SOR belli bir düzeyin altında tutularak hücrelere yapabileceği hasar minimum düzeyde tutulmaktadır.

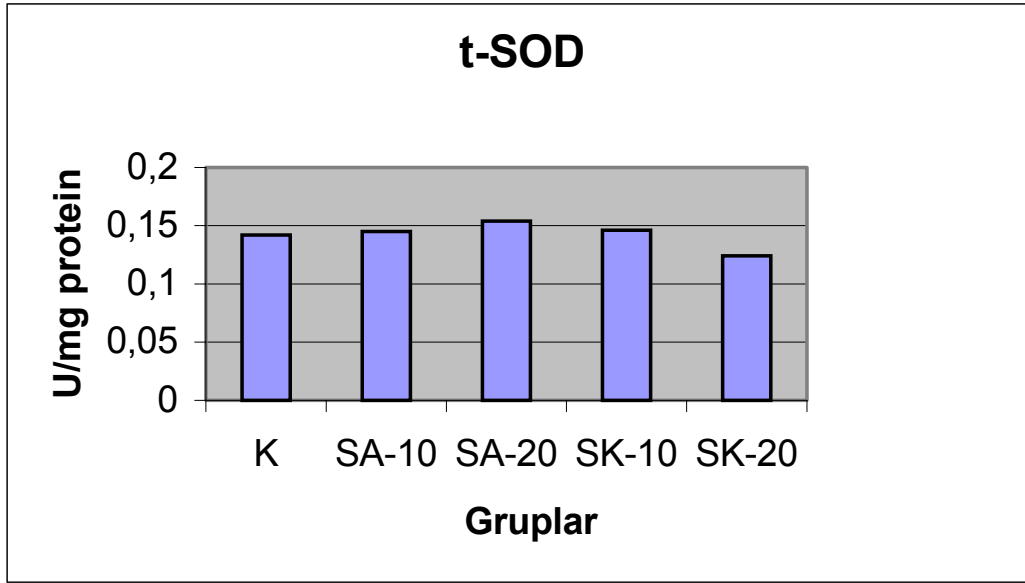
SOD enzimi süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) süpürücüsü olarak fonksiyon görmektedir. Süperoksiti hidrojen peroksit (H_2O_2) çevirir. H_2O_2 daha sonra CAT ve GSH-Px tarafından detoksifiye edilir (moleküler oksijen ve suya). Bu enzimlerden GSH-Px, kofaktör olarak GSH kullanılmaktadır. GSH karaciğerde bol miktarda sentez edilmektedir. GSH-Px enziminin dışında hücre membranından amino asitlerin transferi dahil olmak üzere daha birçok metabolik yol GSH kullanılmaktadır. Bu metabolik yollardan biri glutatyon bağımlı formaldehit dehidrogenaz'dır (GSH-FDH). Bu enzimin vücutta çok yaygın olarak bulunması, formaldehitin nükleik asitler, proteinler ve diğer hücre bileşenleri ile potansiyel olarak letal ve sitogenetik etkilerini önlemek için fonksiyon gördüğü konusunda bize fikir vermektedir (16). Skrzydlewska ve arkadaşları araştırmalarında (17), vücuda alındığında karaciğerde önce formaldehite, daha sonra da formik asite metabolize edilen metanolün karaciğerdeki GSH'ı azalttığını belirtmişlerdir. Bunun dışında hem enzimatik (Cu,Zn SOD), hem de enzimatik olmayan (askorbik asit) antioksidan sisteminde kontrol grubuna göre önemli değişiklikler tesbit etmişlerdir. Benzer değişiklikler (antioksidan sistem ve peroksidatif yıkım ürünlerinde değişiklikler) aynı araştırmacının enzimleri ağırlıklı olarak çalıştığı bir diğer çalışmada tesbit edilmiştir (18). Çalışmamızda inhalasyon yoluyla vücuda giren formaldehitin karaciğerdeki intoksikasyon sürecine bağlı muhtemel bir GSH deplesyonu sonucu GSH-Px aktivitesinde özellikle subkronik-10 ppm grubunda bir azalma göze

Tablo 1. Farklı doz ve sürelerde inhalasyon yoluyla formaldehite maruz bırakılan sıçanların karaciğer dokularında t-SOD, CAT ve GSH-Px aktiviteleri. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

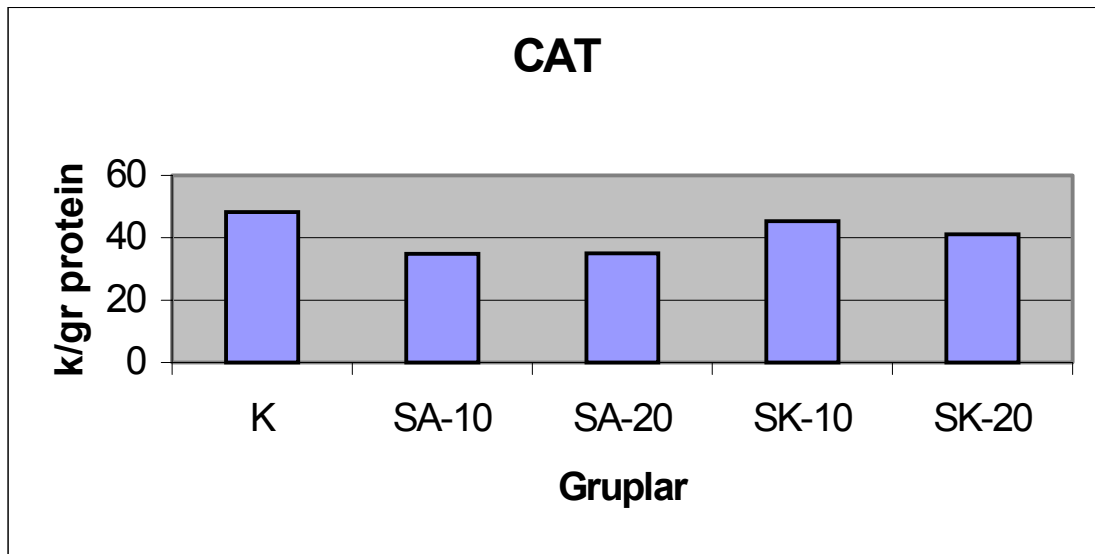
	t-SOD (U/mg protein)	CAT k/gr protein	GSH-Px (U/gr protein)
Kontrol ($n=10$)	0.142 $\pm$ 0.026	48.22 $\pm$ 19.76	9.41 $\pm$ 1.49
SA-10 ppm ($n=10$)	0.145 $\pm$ 0.050	34.87 $\pm$ 27.01	9.33 $\pm$ 1.61
SA-20 ppm ($n=10$)	0.154 $\pm$ 0.052	35.04 $\pm$ 6.68*	9.57 $\pm$ 1.72
SK-10 ppm ($n=10$)	0.146 $\pm$ 0.017	45.32 $\pm$ 17.92	8.36 $\pm$ 2.13
SK-20 ppm ($n=10$)	0.124 $\pm$ 0.030	41.15 $\pm$ 9.40	9.05 $\pm$ 2.12

SA: subakut, SK: subkronik, U: ünite, k: hız sabiti.

* $p < 0,02$ (kontrol grubu ile karşılaştırıldığında)



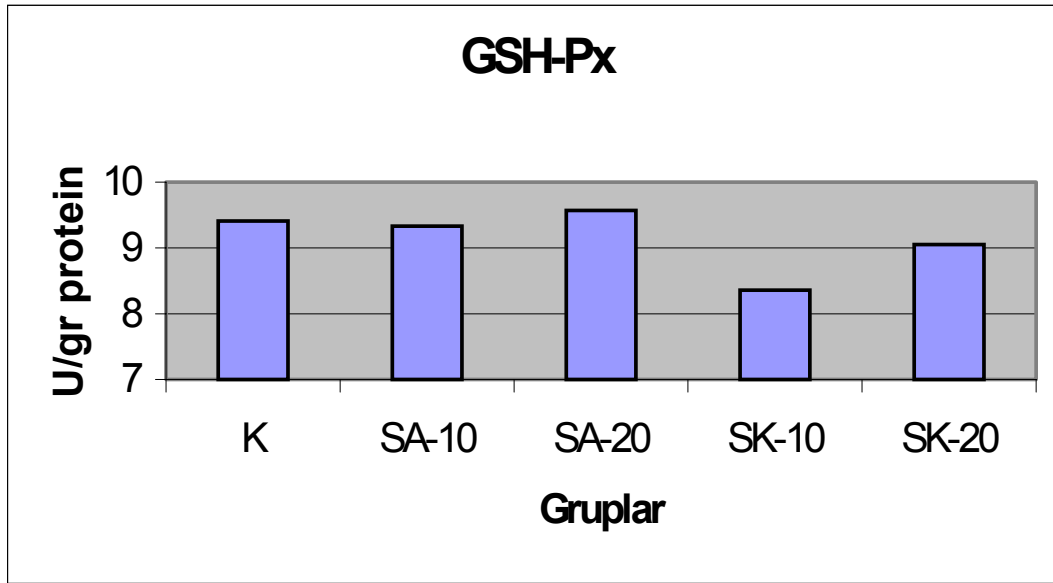
Grafik 1. Solunan formaldehitin karaciğer dokularındaki t-SOD aktiviteleri



Grafik 2. Solunan formaldehitin karaciğer dokularındaki CAT aktiviteleri

çarpılmaktadır (Grafik 3). Fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir. Anlamlı olmayan diğer bir azalma subkronik-20 ppm grubunda t-SOD seviyelerinde olmuştur (Grafik 1). Asıl değişiklik katalaz enziminde gözlenmektedir (Grafik 2). Özellikle subakut grubundaki azalmalar daha belirgindir. Bütün antioksidan enzimler gözönüne alındığında, formaldehit metabolizmasına bağlı olduğunu izlenimi veren direkt (GSH-Px) ve indirekt (t-SOD ve CAT) antioksidan enzim aktivite değişiklikleri meydana gelmiştir. Enzimlerin farklı şekillerde etkilenmesi, muhtemel bir kompensasyon mekanizmasını akla getirmektedir.

Ayrı bir çalışmada metanol verilen sıçanlarda karaciğerde belirgin değil ama eritrositlerde belirgin bir antioksidan enzim değişikliği saptanmış olup bu değişiklik, formaldehitin metabolizması esnasında meydana gelen GSH azalması ve ek olarak süperoksit üretimine bağlanmıştır(19). Cassee ve arkadaşları formaldehiti diğer bazı aldehitlerle birlikte sıçanlara inhale ettirdiklerinde, burun mukozası ve olfaktör mukozada GSH-FDH enziminin bunların detoksifikasyonunda major bir rolü olmadığı sonucuna varmışlardır(20). Bununla birlikte mukoza GSH-S-transferaz ve GSH-redüktaz enzim aktivitelerinde azalma, GSH-Px



Grafik 3. Solunan formaldehitin karaciğer dokularındaki GSH-Px aktiviteleri

aktivitesinde ise artma tesbit etmişlerdir. Bu durum bize formaldehitin, en azından solunum yolu epitelinin bu bileşiğe en yoğun maruz olan burun bölgesinde sülfidril (-SH) grubu taşıyan bileşikler (aminoasitler, küçük peptitler, vs) ile direkt veya indirekt olarak detoksifiye edildiği konusunda fikir vermektedir. Bu konuyla ilgili başka bir çalışmada ise formaldehit ile ozon ayrı ayrı belli oranlarda verildiğinde mukoza hücrelerinin GSH-S-transferaz, glukoz-6 fosfat dehidrogenaz, formaldehit dehidrogenaz ve GSH-redüktaz aktivitelerinde herhangi bir değişiklik tesbit edilememiş, ancak bu iki gaz birlikte verildiğinde bu enzimlerin aktivitesinde hafif bir azalma tesbit edilmiştir (21).

Sonuç olarak karaciğerin enzimatik antioksidan sisteminin formaldehit inhalasyonundan ve bunun metabolize edilmesinden çok fazla etkilenmediği, bu sisteme direkt ve indirekt etkilerinin ihmal edilebilir olduğu söylenebilir. Bu konunun daha iyi açıklığa kavuşturulabilmesi için enzimatik ve enzimatik olmayan sistemin total olarak değerlendirildiği daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca inhalasyon ve oral yolla alınan formaldehitin karaciğer antioksidan sistemine etkilerinin karşılaştırılmalı olarak çalışılması da eksik olarak gördüğümüz, çalışılması gereken diğer konulardır.

The Evaluation of the Enzymatic Antioxidan System of Liver after the Subacute and Subchronic Inhalation of Formaldehyde in Rats.

Abstract: In this study it was researched the effect of formaldehyde inhalation to the enzymatic antioxidant system of liver. 50 adult albino Wistar male rats were assigned to five groups of 10 each. A group was separated for Control (0 ppm). Other four groups of rats were exposed for subacute (4-week) and subchronic periods (13-week), (8 h/day; 5 days/week) to 10 and 20 ppm formaldehyde gas. The rats were kept out from diet caused production in vivo formaldehyde. At the end of the exposure period, the rats were killed by decapitation under the ether anaesthesia. Liver was removed and used in biochemical analysis. The activities of total superoxide dismutase (t-SOD), catalase (CAT) and glutathion peroxidase (GSH-Px), which are antioxidant enzymes, were determined in liver tissue. The average enzyme activities of the control group were found for CAT: 48.22 ± 19.76 k/gr prot, for t-SOD: 0.142 ± 0.026 ü/mg prot, for GSH-Px: 10.53 ± 1.15 Ü/gr prot. The enzyme activities were not too influenced of formaldehyde exposure. However, only the significant CAT activity decrease was determined in the subacute 20 ppm group ($p < 0.016$).

As a result, exposure in subacute to 10 ppm and subchronic to 10 or 20 ppm formaldehyde gas have not influenced as significantly negative or positive in liver in which the most intensive formaldehyde metabolism occurred.

Key Words: Formaldehyde toxicity, liver, superoxide dismutase, catalase, glutathion peroxidase

Kaynaklar

1. Özen OA, Sarsılmaz M: Solunan havadaki formaldehit toksisitesi ve alınması gereken önlemler. Fırat Tıp Dergisi Nisan, 2000 (Baskıda).
2. Feron VJ, Bruyntjes JP, Woutersen RA, Immel HR, Appelman LM: Nasal tumors in rats after short-term exposure to a cytotoxic concentration of formaldehyde. *Cancer Lett* 39: 101-111, 1988.
3. Kerns WD, Pavkov KL, Donofrio DJ, Gralla EJ, Swenberg JA: Carcinogenicity of formaldehyde in rats and mice after long-term inhalation exposure. *Cancer Res* 43: 4382-4395, 1982.
4. Morgan KT, Patterson DL, Gross EA: Formaldehyde and the nasal mucociliary apparatus. In: *Formaldehyde Toxicology, Epidemiology and Mechanisms*. Edited by Clary JJ, Gibson JE, Waritz RS. New York, Dekker, 1983, pp.193-210.
5. Soffritti M, Maltoni C, Maffei F, Biagi R: Formaldehyde: an experimental multipotential carcinogen. *Toxicol Ind Health* 5: 699-730, 1989.
6. Kalmykova TP: Cytogenetic effect of formalin on animal somatic and sex cells. *Veterinaria* 11: 67, 1979.
7. Auerbach C, Moutschen-Dahmen M, Moutschen J: Genetic and cytogenetical effect of formaldehyde and related compounds. *Mutat Res* 39: 317-361, 1977.
8. Furihata C, Yamkoshi A, Matsushima T: Inductions of ornithine decarboxylase and DNA synthesis in rat stomach mucosa by formaldehyde. *Jpn J Cancer Res* 79: 917-920, 1988.
9. Strittmatter P, Ball EG: Formaldehyde dehydrogenase a glutathione-dependent enzyme system. *J Biol Chem* 213: 461-465, 1955.
10. 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: 451-459, 1981.
11. Lowry O, Rosenbraugh N, Farr L, Rondall R: Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 183: 265-275, 1951.
12. Sun Y, Oberley LW, Li Y: A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*. 34:497-500, 1988.
13. Durak I, Yurtarslanı Z, Canbolat O, Akyol O: A methodological approach to superoxide dismutase (SOD) activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction. *Clin Chem Acta* 214:103-104, 1993.
14. Aebi H: Catalase, In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Edited by Bergmeyer HU. New York and London, Academic Press, 1974, pp. 673-677.
15. Paglia DE, Valentine WN: Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70: 158-170, 1967.
16. Barber RD, Donohue TJ: Pathways for transcriptional activation of a glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase gene. *J Mol Biol* 280: 775-784, 1998.
17. Skrzydlewska E, Farbiszewski R: Decreased antioxidant defense mechanisms in rat liver after methanol intoxication. *Free Radic Res* 27 : 369-375, 1997.
18. Skrzydlewska E: Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in rats after methanol intoxication. *Rocz Akad Med Białymst* 41: 397-404, 1996.
19. Skrzydlewska E, Farbiszewski R: Glutathione consumption and inactivation of glutathione-related enzymes in liver, erythrocytes and serum of rats after methanol intoxication. *Arch Toxicol* 71:741-745, 1997.
20. Cassee FR, Groten JP, Feron VJ: Changes in the nasal epithelium of rats exposed by inhalation to mixtures of formaldehyde, acetaldehyde, and acrolein. *Fundam Appl Toxicol* 29 : 208-218, 1996.
21. 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: 257-268, 1994.