



Baicaleinin Formaldehitle İndüklenen Akciğer Hasarında Oksidatif Stres ve Apoptotik Süreç Üzerine Etkileri

Effects of Baicalein on Oxidative Stress and Apoptotic Process in Formaldehyde-Induced Lung Damage

✉ Ebru TAŞTEKİN¹, ✉ Enis ULUÇAM², ✉ Elvan BAKAR³, ✉ Menekşe KARAHAN⁴, ✉ Emine MUT KEÇECİ²

¹Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

²Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

³Trakya Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

⁴Kırklareli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Kırklareli, Türkiye

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada, baicaleinin (BAI) formaldehitin (FA) neden olduğu akciğer hasarı üzerindeki etkisinin immünohistokimya ve gen ekspresyonu teknikleri ile incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada deney hayvanları biriminden temin edilen 24 adet erkek Wistar-Albino sıçan kullanıldı. Hayvanlar, basit randomizasyon yöntemi kullanılarak iki deney ve bir kontrol grubu olmak üzere üç gruba ayrıldı. Kontrol grubuna 14 gün boyunca intraperitoneal yolla serum fizyolojik, FA grubuna 14 gün boyunca intraperitoneal yolla 10 mg/kg dozda FA, FA+BAI grubuna intraperitoneal yolla 10 mg/kg dozda FA ve günlük 200 mg/kg BAI verildi. Deney sonunda toplanan akciğer doku örnekleri gen ekspresyonu ve immünohistokimya için analiz edildi.

Bulgular: FA grubunda yüksek derecede histopatolojik akciğer hasarı, immünokimyasal olarak düşük endotelial nitrik oksit sentaz (NOS) ve yüksek indüklenebilir NOS ekspresyonu vardı. FA+BAI grubu FA grubu ile benzer bulgulara sahipti ve patolojik bulgularda anlamlı iyileşme sağlamadı ($p<0,05$). Süperoksit dismutaz ve katalaz ekspresyon düzeyleri FA+BAI grubunda FA grubuna kıyasla anlamlı olarak artmıştı ($p<0,05$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, Sitokrom-c ekspresyonunun hem FA grubunda hem de FA+BAI grubunda arttığı tespit edildi ($p<0,05$).

Sonuç: Sonuç olarak, BAI tedavisinin FA kaynaklı akciğer dokusu hasarı üzerinde olumlu etkileri yoktur. FA, sıçan akciğerlerinde intrinsik mitokondriyal yol üzerinden apoptozu indükler ve BAI'nın ekspresyon düzeyinde apoptoz üzerinde olumlu bir etkisi yoktur. Ancak, çalışmamız BAI'nın ifade düzeyinde oksidatif stres parametreleri üzerinde iyileştirici bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Formaldehit, akciğer hasarı, baicalein, apoptosis, oksidatif stress

ABSTRACT

Aim: In this study, the effect of baicalein (BAI) on lung damage caused by formaldehyde (FA) is aimed to be examined via immunohistochemistry and gene expression techniques.

Materials and Methods: Within the scope of the study, 24 male Wistar-Albino rats were provided from experimental animal unit. Animals were divided into three groups as two experimental and a control group, using the simple randomization method. Control group received saline intraperitoneally for 14 days, the FA group received 10 mg/kg dose of FA intraperitoneally for 14 days and the FA+BAI group received 10 mg/kg dose of FA intraperitoneally and 200 mg/kg BAI daily for 14 days. At the end of the experimental process, lung tissue samples of rats were taken and analyzed in terms of gene expression and immunohistochemistry.

Results: FA group had high degree of histopathologic lung damage, immunochemically low endothelial nitric oxide synthase (NOS) and high inducible NOS expression. The FA+BAI group had similar findings with the FA group and did not display significant improvement on pathological findings ($p<0,05$). Superoxide dismutase and catalase expression levels were significantly increased in the FA+BAI group compared to the FA group ($p<0,05$). Compared with the control group, it was determined that Cytochrome-c expression increased in both FA group and FA+BAI group ($p<0,05$).

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Dr. Enis ULUÇAM, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

E-posta: eulucam@trakya.edu.tr **ORCID ID:** orcid.org/0000-0002-4686-7350

Geliş tarihi/Received: 07.05.2024 **Kabul tarihi/Accepted:** 13.08.2024



©Telif Hakkı 2024 Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi / Namık Kemal Tıp Dergisi, Galenos Yayınevi tarafından yayınlanmıştır.
©Copyright 2024 by Tekirdağ Namık Kemal University / Namık Kemal Medical Journal is published by Galenos Publishing House.
Creative Commons Atıf-GayriTicari-Türetilemez 4.0 (CC BY-NC-ND) Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

Conclusion: As a result, BAI treatment has no positive effects on FA-induced lung tissue damage. FA induces apoptosis in rat lungs via the intrinsic mitochondrial pathway and BAI has no positive effects on apoptosis at the expression level. However, our study reveals that BAI has an ameliorating effect on oxidative stress parameters at the expression level.

Keywords: Formaldehyde, lung damage, baicalein, apoptosis, oxidative stress

GİRİŞ

Formaldehit (FA), suda iyi çözünen, renksiz, saf haliyle tahriş edici ve keskin bir kokuya sahip bir aldehittir. FA, kadavraların fiksasyonu için anatomi laboratuvarları, dokuların fiksasyonu için histoloji ve patoloji laboratuvarları, tıp alanındaki dezenfeksiyon süreçleri ve gıda endüstrisinde koruyucu madde (E240) olarak ve çok sayıda ortamda yaygın olarak kullanılan bir kimyasal maddedir. Ancak, doğal özellikleri nedeniyle FA, tahriş edici ve zehirli bir kimyasal olarak sınıflandırılır. Herhangi bir ortamda oda sıcaklığında gaz halinde bulunabilir ve bu da önemli bir sağlık tehlikesi oluşturur¹.

FA'ya maruziyetten sonra, FA karaciğer ve eritrositlerde metanol ve formik aside metabolize olur. İdrar ve dışkı yoluyla veya solunum yoluyla karbondioksite oksitlenerek vücuttan atılır. Çok sayıda çalışma, FA'ya maruziyetin duyuusal tahriş, tükürük salgısı, dispne, baş ağrısı, uykusuzluk, konvülsiyonlar, davranış bozuklukları ve anormal sperm üretimi gibi çeşitli semptomlara neden olduğunu göstermiştir. Deney hayvanlarının FA'ya maruziyeti, FA'nın DNA, RNA ve proteinlere hızla metabolik olarak dahil olmasıyla sonuçlanır²⁻⁴. Deney hayvanı çalışmaları, FA muhtemelen bu makromoleküler etkileşimler nedeniyle çeşitli toksik etkilere neden olur. Uzun yıllardır yürütülen çalışmalarda, FA'nın farklı dokular ve potansiyel koruyucu ajanlar üzerindeki toksik etkisi araştırılmıştır. Özellikle solunum yolu ve akciğerler, inhalasyonla ilk etkilenen bölge olması nedeniyle hasar oluşan önemli dokulardır⁴⁻¹¹.

Literatürde çok sayıda çalışma, FA'nın hasar oluşturma mekanizmasında artmış oksidatif stres ve apoptozun rol oynadığını göstermiştir. Bu, akciğer epitel hücre canlılığında azalmaya ve apoptozun indüklenmesine neden olur. FA ile indüklenen apoptoz mekanizmasında Bax/Bcl-2 ekspresyon oranında değişiklik, mitokondriyal hasar, toksik metabolitlerin ortaya çıkması ve apoptoz mekanizmasının mitokondriyal yolunun aktivasyonu gibi farklı mekanizmalar bildirilmiştir. Bcl-2 ailesi proteinlerinin ekspresyonundaki değişikliklerin genellikle intrinsik yolla apoptozu indüklediği düşünülmektedir. Ayrıca, daha yüksek reaktif oksijen türleri seviyeleri hücre ölümü ve oksidatif stresin neden olduğu patolojik durumlarla ilişkilendirilmiştir; bu patolojik durumlarda aşırı ROS, DNA, lipitler, proteinler ve hücrel makromolekülleri okside ederek hasara neden olur¹⁰⁻¹⁴.

Apoptozis belirli genlerin aktivasyonunu, ekspresyonunu ve düzenlenmesini içerir¹⁵. Tümör baskılayıcı gen p53, Bcl-2 ailesi ve kaspaz ailesi apoptozisle ilişkili genler arasındadır. Apoptozis

mekanizması apoptotik sinyalin alınmasını, moleküller arasındaki etkileşimi ve kaspaz aktivasyonunu içerir ve bu da sürekli bir reaksiyon sürecine yol açar¹⁶. Dinamik bir süreç olan apoptozis, mitokondrilerden protein salarak kaspazları aktive eder¹⁷. Bu proteinlerden biri elektron taşıma zincirinin bir bileşeni olan sitokrom-c'dir (Sit-c)¹⁸. Sit-c mitokondrinin iç ve dış membranları arasında yer alır. Sit-c'nin dış membrandan sitozole salınması apoptozu tetikleyen en önemli olaydır¹⁹. Sitozola Sit-c'nin salınması kaspazı aktive eder. Apoptozda rol oynayan kaspazlar başlatıcı kaspaz ve efektör kaspaz olarak ayrılır²⁰. Sit-c tarafından aktive edilen kaspaz-9, kaspaz-3'ü indükler. Böylece hücre ölümüyle sonlanacak olan kaspaz kaskadı başlar. P53, hücre döngüsünü, DNA replikasyonunu ve kontrolsüz hücre bölünmesini kontrol eden bir tümör baskılayıcı proteindir. Sağlıklı hücrelerde p53 proteinleri kapatılır. Hücreler strese ve kontrolsüz bölünmeye maruz kaldığında aktive olur. Ancak bu protein hasar gördüğünde veya mutasyona uğradığında işlevlerini yerine getiremez. Bu da, kontrolsüz hücre bölünmesine ve tümör oluşumuna neden olur²¹.

Nitrik oksit (NO), nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından L-argininden sentezlenen bir sinyal molekülüdür ve üç izoformu vardır; endotelial NOS (eNOS), nöronal NOS ve indüklenebilir NOS (iNOS). eNOS tarafından sentezlenir ve hücrelerin normal işlevleri için gereklidir. Doku hasarı veya stres kaspazında, iNOS aracılığıyla ekstra NO üretilir. NO üretiminin artması nedeniyle, oldukça aktif olan peroksinitrit anyonu ve hidroksil gibi diğer serbest radikallerde artış meydana gelir. NO ayrıca antioksidanları tüketebilir ve oksidatif strese karşı organlar üzerindeki koruyucu etkilerini engelleyebilir²².

Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) gibi antioksidan enzimler ve indirgenmiş glutatyon (GSH) gibi enzimatik olmayan belirteçler, ROS türlerine karşı savunma sağlayarak fizyolojik süreçlerin sağlıklı işleyişine katkıda bulunur. SOD, glutatyon peroksidaz (Gpx) ve CAT, oksidatif stresin neden olduğu doku hasarının araştırılmasında en önemli antioksidan enzimlerdir ve aktivitelerindeki değişiklikler oksidatif stres belirteçleri olarak kabul edilir. FA, birçok molekülle reaksiyona girerek hücrelerde hem apoptozu hem de oksidatif stresi tetikler. SOD, Gpx ve CAT, oksidatif stresin neden olduğu doku hasarının araştırılmasında en önemli antioksidan enzimlerdir ve aktivitelerindeki değişiklikler FA ile yapılan çalışmalarda oksidan stres belirteçleri olarak kabul edilir²³⁻²⁷.

Baicalein (BAI), *Scutellaria baicalensis* bitkisinin köklerinden elde edilir. Çalışmalar, BAI'nin anti-bakteriyel, anti-virüs,

anti-alerjik, anti-oksidan ve anti- enflamatuvar özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. Son çalışmalarda, BAI'nın hücre çoğalması, metastaz, apoptoz ve otofaji gibi çeşitli biyolojik süreçler üzerindeki etkisine bağlı olarak kanser karşıtı aktivitelere sahip olduğu bulunmuştur²⁸⁻³⁰.

Amacımız bu verileri kullanarak konuyla ilgili bu iki soruya yanıt bulmaktır. Başlangıçta, FA neden olduğu hasar ile eNOS, iNOS üretimi, apoptotik süreçler ve akciğer dokularındaki antioksidan yanıtlar arasında bir bağlantı keşfedildi. Ayrıca, BAI'nin FA'nın neden olduğu akciğer hasarı üzerindeki etkisini araştırdık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Kimyasallar

BAI (BLDpharm BD6298, China), FA (Tekkim, Turkey).

Hayvanlar

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Ünitesi'nden toplam 24 adet 20-24 gr ağırlığında erkek Wistar albino sıçan temin edildi. Hayvanlar standart laboratuvar koşullarında (22±1 °C sıcaklık, %55 nem, 12 saat aydınlık/karanlık döngüsü) tutuldu ve standart yem ve musluk suyu ile beslendi. Hayvanlar deney ortamına adaptasyonlarının sağlanması için deney başlamadan 24 saat önce laboratuvar ortamına getirildi. Bu çalışma Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyle Yönelik Etik Kurulu'nun onayı ile yürütüldü (karar no: 2019.03.01, tarih: 29.03.2019).

Deneysel Tasarım

Çalışmada iki deney ve bir kontrol grubu olmak üzere üç grup planlandı. Her grup rastgele seçilen sekiz sıçandan oluşturuldu. Kontrol grubu: 14 gün boyunca günlük intraperitoneal tuzlu su verildi. FA grubu: 14 gün boyunca günlük intraperitoneal FA, 1/10 oranında tuzlu su ile seyreltilerek uygulandı. FA + BAI grubu: 14 gün boyunca günlük intraperitoneal FA, 1/10 oranında tuzlu su ile seyreltilerek uygulandı ve BAI, 200 mg/kg intraperitoneal dozda verildi. Literatürde deneysel FA toksisitesini belirlemek amacıyla yapılan subakut çalışmalar incelendiğinde, FA'nın intraperitoneal uygulanmasının tercih edildiği görüldü. Hem FA hem de BAI'nın dozları literatüre göre seçildi³⁰⁻³².

Deneysel sonunda tüm sıçanlar 10 mg/kg ksilazin hidroklorür (HCl) ve 50 mg/kg ketamin HCl anestezisi altında akciğer dokuları çıkarılarak ötenazi edildi. Dokuların yarısı patolojik inceleme için %10 formalin solüsyonuna batırıldı. Diğer kısımlar hızla dondurulduktan sonra mRNA izolasyonuna kadar -80 °C'de sıvı nitrojende saklandı.

Gen Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

Kantitatif ters transkriptaz (qRT)-PCR analizleri akciğer dokusundan ekstrakte edilen toplam RNA'dan üretilen tamamlayıcı DNA (cDNA) örnekleri üzerinde gerçekleştirildi. GSH, SOD, CAT, Sit-c, P53, Caspase-3, Caspase-9, iNOS ve eNOS genleri için özel olarak tasarlanmış primerler kullanıldı.

RNA İzolasyonu

Akciğer dokularından RNA izolasyonu, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific izolasyon kiti kullanılarak gerçekleştirildi. İzolasyon prosedürü, aşağıda açıklandığı gibi bu kitin yöntemine göre gerçekleştirildi. Daha iyi homojenizasyon için örnekler 1 mm çapında zirkonyum silikat boncukları yerleştirildi. Daha sonra sıvı nitrojende tutuldu ve bir doku parçalayıcıdan geçirildi. RNA'yı kolayca izole etmek için protein denatürasyon sürecini hızlandırmak amacıyla örnekler %1 merkaptotanol ve lizis tamponu eklendi. Suyu çıkarmak için hücre homojenizatlarına aynı hacimde %70 etanol eklendi. Boncukları uzaklaştırmak için 21380 G'de santrifüj edildi. Santrifüjden çıkan sıvıdan 700 µL kit içerisinde bulunan kolonlu tüplere alındı. Bu tüplerdeki örnekler 12000 g'de 15 saniye santrifüj edildi ve ardından tüplerin filtre kısımları toplama tüplerine aktarıldı. Örnekler 700 µL yıkama tamponu 1 eklendi ve 12000 g'de 15 saniye santrifüj edildi ve kolonlu tüplerin filtre kısımları yeni tüplere alındı. Üzerlerine 500 µL yıkama tamponu 2 eklendi ve 12000 g'de 15 saniye santrifüj edildi. Tekrar 500 µL yıkama tamponu 2 eklenip 2 dakika santrifüj edildikten sonra tüpler kapaklı tüplere alınarak tüplere 50 µL RNase içermeyen su kompozisyonu eklendi. 50 µL eklenmesinin sebebi çalışmalarda optimum hacmin bu şekilde belirlenmesiydi. Karışım 2 dakika inkübasyondan sonra 30 saniye boyunca 12000 g'de 2 dakika santrifüj edildi. Filtre parçaları atıldı ve alt parçalar ölçüm için alındı. Elde edilen RNA örneklerinden 2 µL alındı, Nanodrop cihazında pipetlendi ve saflık ve absorpsiyon değerleri 260-280 nm'de okunarak belirlendi. Ölçülen saflık değerleri 1,8-2,0 aralığında ölçüldü ve bu örneklerden c-DNA sentezi gerçekleştirildi.

Tamamlayıcı Deoksiribonükleik Asit (cDNA) Sentezi

cDNA sentezi, uygun protokol adımlarını izleyerek Yüksek Kapasiteli cDNA Ters Transkripsiyon sentez kiti (Katalog no: 4368814) kullanılarak izole edilen RNA'lardan gerçekleştirildi. Sentezlenen cDNA'lar -20 °C'de saklandı. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) koşulları adım 1: 25 °C, 09:53 dakika; adım 2: 37 °C, 120 dakika; adım 3: cDNA sentezi, 85 °C'de 5 dakika programlanarak gerçekleştirildi. cDNA sentez protokolü Tablo 1'de gösterilmiştir.

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) Ekspresyonu

Aktif GSH, SOD, CAT, P53, Sit-c, Kaspaz-3, Kaspaz-9, iNOS ve eNOS gen ekspresyon düzeyleri (qRT)-PCR yöntemi ile belirlendi. Gen ekspresyon çalışmalarında "RNA izolasyonu" bölümünde anlatıldığı gibi izole edilen RNA'dan elde edilen cDNA'lar kullanıldı. Çalışmamızda 384 kuyulu mikro plakaları okuyabilen Quant Studio 6 Flex qRT-PCR sistemi kullanıldı. Kullanılan qRT-PCR genleri ve dizileri Tablo 2'de listelenmiştir. Kalibrasyon ve düzeltme faktörü olarak gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz kullanıldı ve örnekler analiz edildi. Gen ekspresyon düzeyleri SYBR Green yöntemi kullanılarak belirlendi. qRT-PCR içerikleri; cDNA, SYBR Green ve ilgili genleri içerir. qRT-PCR reaksiyon karışımının içeriği 6 µL SYBR Green Master Mix, 2 µL cDNA ve 2 µL RNase içermeyen su ve 384 kuyulu bir plakanın her kuyusu için 0,5 µL primer forward, 0,5 µL reverse içerir. PCR programı: 50 °C'de 2 dakikalık 1 döngü ve 95 °C'de 10 dakikalık 1 döngü, ardından 40 döngü denatürasyon (15 saniye boyunca 95 °C) ve tavlama ve ekstansiyon (60 °C'de 1 dakika).

Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Doku örnekleri oda sıcaklığında 24 saat %10 formalin solüsyonunda fiksasyona tabi tutulduktan sonra parafin bloklara gömüldü ve artan oranda alkol serilerinden (60%, 70%, 80%, 90.99.9%) geçirildi. Şeffaflık için dokular 2 değişim

ksilen ve parafinizasyon adımlarına maruz bırakıldıktan sonra parafin bloklar hazırlandı. Bloklardan alınan 4 µ kesitlerin deparafinizasyon işleminden sonra, öncelikle genel doku histolojik incelemesi için birine hematoksilin-eozin (H&E) boyama uygulandı ve diğerlerine iNOS (Thermo Invitrogen PA3-030A) ve eNOS (Thermo Invitrogen MA5-15559) antikoları uygulandı. İmmünohistokimya boyama için Ventana BenchMark XT Ultra IHC/ISH sistemi platformu kullanıldı. Doku slaytları 37 °C'de bir gece ve 56 °C'de 2 saat inkübe edildi. Burada, slaytlara 60 °C'de 10 dakikalık ksilen serisi, %96, %80, %70 alkol serisi ve üç kez distile su serisi uygulandı. Antijen geri kazanımı için "Citrate buffer 10 X pH 8.0" (kod: 15-M820, Lot. 50930) kullanıldı (95-100 °C'de 20 dakika ve oda sıcaklığında/soğutmada 20 dakika). Fosfat tamponlu salin, %3 H₂O₂ ile endojen peroksit blokajından 10 dakika sonra uygulandı. Slaytlar iNOS ve eNOS antikolarıyla oda sıcaklığında 45 dakika inkübe edildi. Daha sonra standart immünoperoksidad boyama yöntemi adımları uygulandı. Kesitlerdeki boyamaları değerlendirirken patolog grup özelliklerini bilmeden tarafsız bir değerlendirme yaptı. Hazırlanan preparatlar Nikon Eclipse E600 model ışık mikroskopunda değerlendirildi. Kesitlerden Visia görüntüleme programında görüntüler alındı ve kaydedildi. Tüm H&E kesitleri mikroskobun rastgele seçilen 10 yüksek büyütme alanında (x400) değerlendirildi. Akciğer interstisyumunda enflamatuvar hücre infiltrasyonu ve köpüklü makrofaj birikimi, bronşiyol duvarında kalınlaşma, hemoraji ve epitel hücre dökülmesi gözlemlendi. Tüm sıçan kesitleri bu bulgulara göre önceden tanımlanmış yarı kantitatif bir skalada 0 ile 4 arasında puanlandı. Akciğer hasarı derecesi 0: normal doku; 1: minimal hasar (<%1-25 tutulum); 2: orta hasar (%25-75 tutulum); ve 3: ciddi nekroz (>%75 tutulum) olarak puanlandı³³. eNOS ve iNOS antikolarının değerlendirilmesi için, her bir Kaspaz'da pozitif boyanmış hücrelerin yayılımı ve yoğunluğu belirlendi. Boyanma derecesi 0 (%0-5), 1 (%6-24), 2 (%25-49), 3 (50-74%) ve 4 (≥%75) olarak derecelendirildi. Boyanma yoğunluğu 0 (negatif), 1 (hafif), 2 (orta) ve 3 (güçlü) olarak derecelendirildi. 0 ila 300 arasında değişen immünoreaktivite skoru, elde edilen iki derecenin çarpılmasıyla belirlendi³⁴.

Tablo 1. cDNA sentez protokolü

Madde	Hacim
Toplam RNA	10
10 X RT tampon	2 µL
25 X dNTP karışım (100 mM)	0,8 µL
10 X RT random primer	2 µL
MultiScribe ters transkriptaz	1 µL
Nükleazsız su	4,2 µL
Son hacim	20 µL
RNA: Ribonükleik asit, RT: Ters transkripsiyon, dNTP: Deoksiribonükleotid trifosfat	

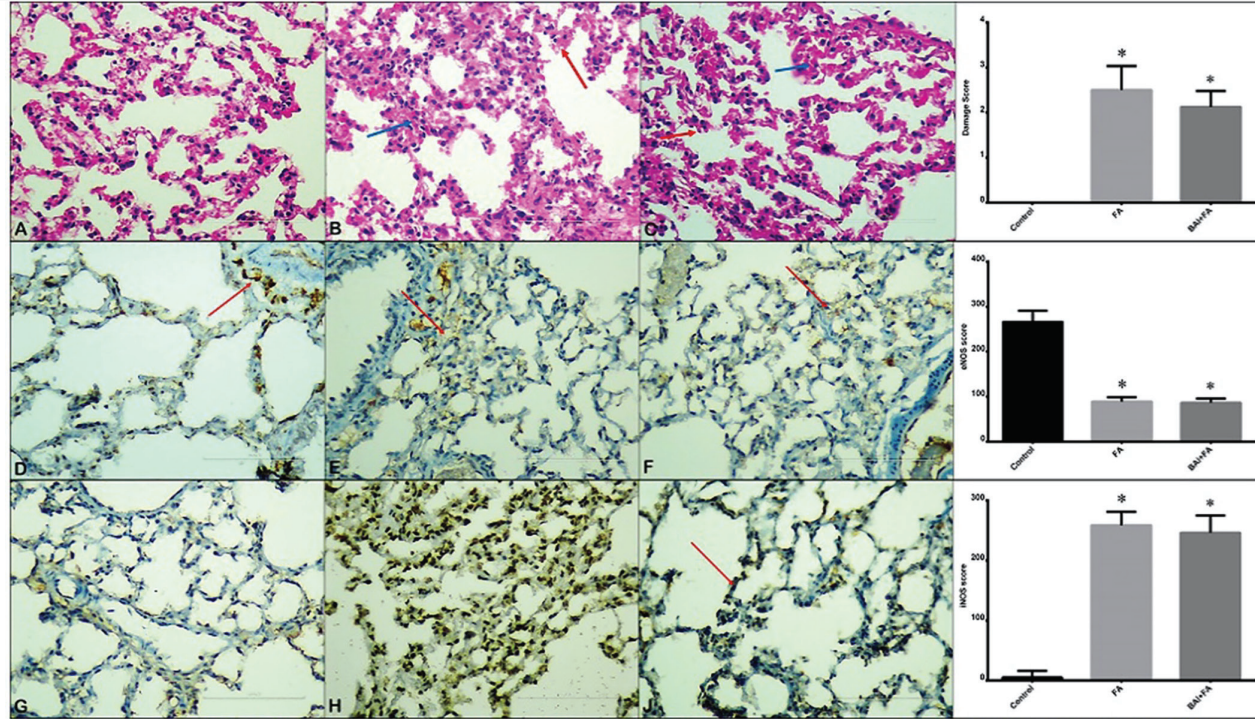
Tablo 2. qRT-PCR'de kullanılan genler ve dizilimi

Hedef gen	İleri primer dizilim (5'- 3')	Ters primer dizilim (5'- 3')
SOD	AGCTGCACCACAGCAAGCAC	TCCACCACCCTTAGGGCTCA
CAT	TCCGGGATCTTTTAACGCCATTG	TCGAGCACGGTAGGGACAGTTCAC
GSH	ACTTGGCACTCCTCTCCTGA	AGGCACTAGAACCTGCTGGA
Sit-c	AGTGGCTAGAGTGGTCATTCATTAC	TCATGATCTGAATCTGGGTATGAG
P53	CACAGTCGGATATGAGCATC	GTCGTCCAGATACTCAGCAT
Kaspaz-3	AGTTGGACCCACCTTGTGAG	AGTCTGCAGCTCCTCCACAT
Kaspaz-9	AGCCAGATGCTGTCCCATAC	CAGGAACCGCTCTCTTGTC
iNOS	GAGACAGGGAAGTCTGAAGCAC	CCAGCAGTAGTTGCTCCTCTTC
eNOS	ACCAGCACCTTTGGCAATGGAG	GAGACGCTGTTGAATCGGACCT
SOD: Süperoksit dismutaz, CAT: Katalaz, GSH: Glutasyon, Sit-c: Sitokrom-c, P53: Tümör proteini 53, iNOS: İndüklebilir nitrik oksit sentaz, eNOS: Endotelial nitrik oksit sentaz		

İstatiksel Analiz

Tanımlayıcı istatistiklerin tanımlanmasında ortalama ve standart sapma değerleri kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu tek örneklem Kolmogorov-Smirnov testi ile belirlendi. Değişkenlerin normal dağılıma uyması durumunda tek yönlü ANOVA testi uygulandı. Değişkenler arası çoklu

karşılaştırmalar için "Bonferoni post-hoc" testi yapıldı. Normal dağılım göstermeyen değişkenler arası çoklu karşılaştırmalar için Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Gruplar arası ikili karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. Tüm istatistiklerin anlamlılık sınırı $p<0,05$ olarak kabul edildi. İstatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 20.0 programı



Şekil 1. Akciğer dokusu ışık mikroskobu ve immünohistokimyasal bulgular. A) Kontrol; normal morfoloji (HEX200). B) FA; orta-ağır akciğer hasarı (mavi ok: interstitiyal hemoraji, kırmızı ok: kabuklaşmış epitel hücreler ve makrofajlar) (HEX200). C) FA+BAI; orta akciğer hasarı (mavi ok: interstitiyal hemoraji, kırmızı ok: kabuklaşmış epitel hücreler ve makrofajlar) (HEX200). D) eNOS kontrol: orta-şiddetli boyama (X200). E) eNOS FA; hafif boyama (X200). F) eNOS FA+BAI: hafif boyama (X200), G) iNOS kontrol: boyama yok (X200). H) iNOS FA: şiddetli boyama (X200). I) iNOS FA+BAI: orta boyama (X200). Akciğer dokusu histopatoloji bulguları *: Kontrol grubu karşılaştırması $p<0,05$

Tablo 3. Akciğer dokusu gen ekspresyon düzeyleri

Parametreler	Kontrol	FA	FA+BAI
SOD	3,22±0,60	3,10±0,85	7,77±0,85 ^γ
GSH	2,78±0,52	0,24±0,17 [*]	0,28±0,14 [*]
CAT	7,17±1,76	2,62±0,48 [*]	4,03±1,18 ^γ
P53	1,52±0,46	0,06±0,04 [*]	0,02±0,01 ^γ
Sit-c	1,73±0,56	9,65±1,94 [*]	22,80±4,88 ^γ
Kaspaz-3	2,69±1,05	0,50±0,23 [*]	0,43±0,23 [*]
Kaspaz-9	0,06±0,08	0,23±0,27 [*]	0,14±0,13
iNOS	5,55±0,42	7,12±1,69 [*]	26,13±4,59 ^γ
eNOS	413,78±51,96	73,30±3,71 [*]	37,93±3,35 ^γ

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. Tüm gruplar için n=8. *: Kontrol grubu karşılaştırması $p<0,05$; γ : FA ve Baicalein gruplarının karşılaştırması, $p<0,05$
FA: Formaldehit, BAI: Baicalein, SOD: Süperoksit dismutaz, CAT: Katalaz, GSH: Glutatyon; Sit-c: Sitokrom-c, P53: Tümör proteini 53, iNOS: İndüklebilir nitrik oksit sentaz, eNOS: Endotelial nitrik oksit sentaz

kullanıldı. Grafikler GraphPad Prism 6 Windows yazılımı kullanılarak oluşturuldu.

BULGULAR

Işık Mikroskobu Bulguları

Kontrol grubunda sıçanların akciğer dokularının morfolojisi normal morfolojiye benzerdi. FA grubunun mikroskopik bulguları oldukça dikkat çekiciydi, çünkü FA grubunun akciğerlerinde interstisyel hemoraji, enflamatuvar hücreler, makrofajlar ve ödem görüldü. Tüm sıçanlarda orta veya şiddetli epitel hücre dökülmesi, kalınlaşma ve kanama olan terminal bronşiyoller tespit edildi. FA+BAI grubunun histopatolojik bulguları FA grubuna göre daha az belirgin olmakla birlikte, bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p>0,05$) (Şekil 1).

İmmünohistokimyasal Bulgular

eNOS boyanması kontrol grubunda orta ila şiddetli, FA grubunda ise hafifti. Aksine, iNOS boyanması kontrol grubunda saptanmadı, ancak FA grubunda orta ila şiddetliydi. FA+BAI grubundaki boyanma özellikleri FA grubuyla benzerdi ($p<0,05$) (Şekil 1).

Çalışmamızda kontrol grubunda bulgular normal aralıkta seyrederken, FA grubunda histopatolojik akciğer hasarı derecesi daha yüksek, immünokimyasal olarak düşük eNOS ve yüksek iNOS ekspresyonu vardı. FA+BAI, eNOS ekspresyon seviyelerinde minimal artışa ek olarak akciğer hasarı ve iNOS ekspresyon seviyesinde minimal azalma sağladı. Ancak bu bulgular istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p<0,05$).

Gen Ekspresyon Düzeyleri

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında FA grubunda GSH ve CAT düzeylerinin daha düşük olduğu görülmektedir. SOD ve CAT ekspresyon düzeyleri FA+BAI grubunda FA grubuna göre anlamlı olarak artmıştı ($p<0,05$). P53 ekspresyon düzeyi FA grubunda kontrol grubuna göre daha düşük bulundu. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında Sit-c, iNOS ve eNOS ekspresyon düzeylerinin hem FA hem de FA+BAI gruplarında arttığı görüldü ($p<0,05$). Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz gen ekspresyon düzeyleri Tablo 3'te verilmiştir.

TARTIŞMA

FA, tıp bilimi ve endüstriyel sektörlerde yaygın olarak kullanılan renksiz, yanıcı bir gazdır ve ne yazık ki başlıca hava kirleticilerinden biridir. Patologlar, anatomistler ve teknisyenler gibi bazı mesleklerde FA'ya maruz kalma nedeniyle, normal popülasyona kıyasla lösemi, beyin tümörü, karaciğer, testis ve akciğer kanseri olgularında artış olduğu görülmektedir. FA, Uluslararası Araştırma Ajansı tarafından Grup 1 olarak

sınıflandırılmış, mukozal tahriş edici, ciddi solunum sistemi toksik ajanı ve kanserojen kimyasal olarak bilinmektedir^{35,36}. FA ayrıca sistemik enflamasyon kaynaklı depresif semptomlarla da ilişkilidir³⁷. Bu çalışmada, FA kaynaklı akciğer hasarı ile eNOS, iNOS ekspresyonu, antioksidan yanıt ve akciğer dokularındaki apoptotik süreç arasındaki bağlantıyı gözlemlemeyi amaçladık. Öte yandan, daha önce hiç çalışılmamış olan baicalienin FA hasarı üzerindeki etkilerini araştırmak istedik.

Ekzojen olarak alınan veya metabolik reaksiyonlarla oluşan FA, dokularda çeşitli toksik etkilere neden olur. FA maruziyeti çoğunlukla metanol metabolizması, demetilasyon, vücuttaki histon/DNA/RNA demetilasyon gibi ekzojen ve biyosentetik kaynaklar yoluyla inhalasyonla ortaya çıkar ve FA ara ürün olarak ortaya çıkar. FA ve metabolitlerinin toksik etkileri özellikle parankimal dokularda gözlemlenebilir. Önceki çalışmalarda, FA'nın biyomoleküler profil değişikliklerindeki rolü doğrulanmıştır ve sağlık çalışanlarında düşük mesleki maruziyetin ölçülebilir biyolojik sonuçlara da yol açabileceği vurgulanmıştır^{38,39}.

Bu çalışmanın amacı, karaciğerde metabolize edilen FA'nın toksik metabolitlerinin akciğer parankimi üzerindeki histopatolojik etkilerini ve apoptozis yolunu belirlemek ve gözlenen hasarın altında yatan nedenleri, yani enflamasyonu ve oksidatif stresi ortaya koymaktır. Daha önce diğer çalışmalarda belirlenen dozlarda FA'nın sıçanlara doğrudan (intrapertitoneal) uygulanmasıyla bir sıçan modeli oluşturulmuştur. Sonuçlar, doğrudan subakut FA maruziyetinin şiddetli enflamasyon, apoptozis ve artmış oksidatif stresi indükleyerek akciğer hasarına neden olduğunu göstermiştir. Bu hasar mekanizmaları histopatolojik bulgularla sonuçlanmıştır.

FA maruziyetine bağlı eNOS seviyesindeki azalma, hücrenin normal fonksiyonlarını kaybettiğini gösterir. iNOS'taki artış, doku hasarı gelişiminin bir işareti olarak görülebilir. GSH ve CAT seviyelerindeki azalma, oksidatif dengedeki bozulmanın doku hasarını kolaylaştırır ve hasarın iyileşmesini engelleyen bir faktör olduğunu da gösterir.

FA hücre ölümü veya apoptozis ile sitotoksositeye ve DNA ve kromozomal hasar yoluyla genotoksositeye neden olsa da, sınırlı veriler reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidatif stresin hasara katkıda bulunabileceğini öne sürmektedir. ROS'a aşırı maruz kalmanın DNA, lipitler ve proteinler gibi hücresel bileşenlere zarar vererek gelişimsel toksisiteye neden olduğu bilinmektedir⁴⁰. FA tarafından hem antioksidan enzimlerin indüksiyonu hem de baskılanması farklı dokularda gösterilmiştir. GPx, SOD, CAT ve GSH hücreleri oksidatif hasara karşı korurken, malondialdehit aktivite seviyelerinin oksidatif hasar seviyesini göstermek için kullanılabileceği bir oksidatif biyobelirteçtir⁴¹. Bazı çalışmalar FA'nın kemirgen testis dokusunda antioksidan savunma mekanizmasını indüklediğini ve etkilerini bozabileceğini göstermiştir⁴². Lim ve ark.⁹ FA'nın oksidatif stresin bir belirteci olan lipid peroksidasyon oluşumunda artışa neden olduğunu göstermiştir.

NO, doku hasarı veya strese yanıt olarak iNOS'un etkisiyle üretilir. Doku hasarının bir göstergesi olarak iNOS seviyesi artarken eNOS seviyesi azalır. NO üretimi serbest radikallerde artışa neden olur. NO'nun bir diğer etkisi de SOD, Gpx ve CAT gibi antioksidanları azaltmasıdır. Bunun sonucunda oksidatif stres nedeniyle doku hasarı meydana gelir. FA'nın neden olduğu doku hasarı, NO ve oksidatif stres mekanizmaları hakkında çok sayıda çalışma yapılmıştır. Öncelikle FA'nın oksidatif stres üzerindeki aktivatör etkisi değerlendirilmiştir. Bunları iNOS, eNOS, ROS, oksidatif stresin FA'nın etkilerini uyarma etkisi, doku hasarı derecesi ve farklı dokulardaki (beyin, karaciğer, böbrek, akciğer vb.) SOD, CAT, GPx seviyelerini gösteren çalışmalar izlemiştir⁴³. Mohammed ve ark.⁴⁴ FA'nın genotoksik ve hematotoksik hasarını değerlendirmişlerdir. Zararsız ve ark.³¹ çalışmalarını akciğer dokusu üzerinde planlamışlardır. Bu çalışmaların sonuçları FA, NO ve ROS ilişkisini destekleyen verilerimizle uyumludur⁴⁵.

Teng ve ark.⁴⁶ deneysel çalışmalarında düşük konsantrasyonlarda bile FA'nın izole sıçan hepatositlerinde oksidatif hasara neden olduğunu bildirmiştir. Benzer şekilde, Sarsılmaz ve ark.⁴⁷ sıçanlara inhalasyon yoluyla FA vererek karaciğer dokusunda CAT aktivitesinin azaldığını ve SOD aktivitesinin arttığını bulmuşlardır. Zararsız ve ark.³¹ akciğer dokusu üzerinde çalışmışlar ve FA'ya maruz kalan sıçanların akciğer dokusunda CAT enzim seviyelerinin azaldığını ve SOD enzim aktivitelerinin arttığını bulmuşlardır.

Literatürde, bir antioksidan olan BAI'nin ekspresyon düzeyinde FA toksisitesine karşı koruyucu etkilerini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak, BAI'nin farklı hücre hatları üzerindeki koruyucu etkilerini ekspresyon düzeyinde in vitro çalışmalarla değerlendiren çalışmalar bulunmaktadır^{9,43,45}.

Çalışmamızda qRT-PCR sonuçları, FA toksisitesi nedeniyle akciğer dokusunda oluşan hasar sonucu GSH ve CAT ekspresyonlarının azaldığını göstermiştir. Bu sonuç antioksidan savunmanın negatif etkilendiğini göstermektedir. SOD ve CAT ekspresyon seviyeleri FA+BAI grubunda FA grubuna göre anlamlı olarak artmıştır. Bu durum BAI'nin SOD ve CAT aracılığıyla antioksidan savunma sağlamada pozitif bir etki olarak değerlendirilmiştir.

İki ana yolak apoptoz aktivasyonuna yol açar. Birincisi, tümör nekroz faktörü ailesi üyeleri tarafından başlatılan ve prokaspaz-8 için aktive edici bir kompleks olan ekstrinsik (ölüm reseptörü aracılı) yolaktır ve ikincisi, prokaspaz-9 için aktive edici bir kompleks olan apoptozomlu intrinsik (mitokondri aracılı) yolaktır. İntrinsik yolak Bcl-2 ailesi proteinleri tarafından düzenlenir. Birkaç sinyal molekülü, hücre içi enflamatuvar mediatör sentezinin ve/veya apoptozun başlatılmasına yol açar. Çok sayıda çalışma, apoptozun FA kaynaklı akciğer hasarı sırasında hücre ölümünün mekanizmalarından biri olduğunu göstermiştir^{12,14,44}. Çalışmamızda, qRT-PCR ile intrinsik yolun

başlıca üyeleri olan Sit-c, CASPASE-3 ve CASPASE-9'u araştırdık. FA grubunda P53 ekspresyon düzeyinin kontrol grubuna göre azalması tümör baskılayıcı bir gen olan TP53 geninin oksidatif stres sonucu hasara uğraması ve bu nedenle P53 ekspresyon düzeyinin azalması şeklinde yorumlandı. P53 ekspresyon düzeyinin FA+BAI grubunda kontrol ve FA gruplarına göre anlamlı olarak düşük olduğu görüldü. Bu durum BAI'nin apoptotik süreç üzerinde etkisi olmadığı şeklinde yorumlandı. FA toksisitesine bağlı oksidatif stres sonucu apoptotik sürecin mitokondriyal yol üzerinden tetiklendiği düşünüldü. FA grubunda Sit-c ekspresyonunun kontrol grubuna göre artmış olması bunun bir göstergesi olabilir. Artmış hücrel stresin DNA hasarı ve lipid peroksidasyonuna bağlı membran hasarına yol açabileceği ve bunun sonucunda mitokondriden sitoplazmaya Sit-c salınımının artmış olabileceği düşünülmektedir. Apoptozomdaki apoptotik efektör veya "yönetici" proteinler (Sit-c, Apaf-1 ve prokaspaz) ve kaspaz kaskadı mitokondriye bağlı apoptotik süreçte rol oynar. FA'nın zararlı etkilerine karşı hücre ölümünü tetiklemek ve aktif kaspaz-9 oluşumunu tetiklemek için Sit-c ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir. Başlatıcı bir kaspaz olan aktif kaspaz-9, kaspaz-3 ve kaspaz-7 gibi efektör kaspazları ayırır ve aktive eder. Bu durum hücrel hasar ve DNA hasarının derecesini artırır. Hem FA hem de FA+BAI gruplarında kaspaz-3 ekspresyon seviyelerinde artış olmamıştır. Bu, hücredeki inaktif kaspaz-3 seviyesinin apoptozu tetiklemek için yeterli olduğunu düşündürmektedir. Ancak, FA+BAI grubunda Sit-c ekspresyon seviyesinin yüksek olduğu bulunmuştur. Bu, BAI'nin mitokondriyal hasar üzerinde terapötik bir etkisinin olmadığını düşündürmektedir.

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında FA grubunda iNOS ekspresyon düzeyinin arttığı gözlemlendi. Akciğer dokusuyla yapılan farklı bir çalışmada FA toksisitesine bağlı olarak iNOS ekspresyonunun arttığı belirtilmiştir. Bu sonuç bizim çalışmamızla uyumludur⁴⁴. Çalışmamızda da iNOS ekspresyon düzeyi diğer iki gruba karşılaştırıldığında FA+BAI grubunda yüksekti ($p < 0,05$). NO süperoksit radikaliyle reaksiyona girerek peroksinitrit oluşturur ve bu da DNA hasarına neden olur. FA+BAI grubunda iNOS ekspresyon düzeyindeki artış NO aracılığıyla antioksidan sistemin aktive olması şeklinde yorumlanabilir. İmmün boyama sonucunda FA grubunda iNOS immünreaktivitesinin anlamlı şekilde arttığı gözlemlendi. Bu, bu toksisiteye karşı hücrel hasara yanıtın NO yoluyla olabileceğini düşündürmektedir. Benzer şekilde, iNOS immünoreaktivitesi FA+BAI grubunda yüksek bulundu, ancak FA ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark yoktu. FA toksisitesi nedeniyle eNOS ekspresyon düzeyinin anlamlı şekilde azaldığı belirlendi. İmmünohistokimyasal boyama da bu sonucu desteklemektedir. eNOS immünoreaktivitesindeki azalmanın FA toksisitesi nedeniyle epitel doku hasarıyla ilişkili olabileceği düşünüldü. Kontrol ile karşılaştırıldığında hem FA

hem de FA+BAI gruplarında eNOS ekspresyon düzeyinde ve immünoreaktivite yoğunluğunda azalma gözlemlendi. Bu durum BAI'nin eNOS üzerinde etkili olmadığı şeklinde yorumlandı.

Yüksek konsantrasyonlarda FA maruziyetinde öksürük, nefes darlığı, 10-20 ppm seviyelerinde hırıltı, larinkste ödem ve spazm gibi pulmoner etkiler gözlemlenmiştir. Mikroskopik incelemede düşük doz FA'nın akut inhalasyonunun bile insan ve hayvanlarda üst solunum yollarında ve akciğer parankimasında enflamatuvar hücre değişikliklerine neden olduğu görülmektedir. 50-100 ppm dozlarında pulmoner enflamasyon, ödem ve pnömoni gelişmektedir³⁷⁻³⁸. Diğer önemli mikroskopik bulgular bronşiyollerde duvar kalınlığında artış, hemoraji ve epitel hücre dökülmesidir. Literatürde çok sayıda çalışma FA'nın indüklediği hasarı ve çeşitli maddelerin koruyucu etkisini göstermiştir^{11,32,43-48}. Çalışmamızda FA uygulaması olarak kolayca tanımlanan mikroskopik akciğer hasarı tespit edilmiştir.

S. baicalensis'ten elde edilen Wogonin ve BAI, apoptotik, enflamatuvar ve oksidatif etkiler açısından benzer farmakolojik özellikler sergiler. İn vivo ve in vitro çalışmalar, BAI'nin pankreas, karaciğer ve böbrek gibi organları enflamatuvar mediatörlerden ve bağışıklık sistemi hasarından koruduğunu göstermiştir^{49,50}.

Çalışmanın Kısıtlılıkları

Deneysel çalışmanın parametrelerinin biyokimyasal olarak incelenememiş olması ve doku örneklerinde Western blot analizinin yapılamamış olması çalışmanın sınırlılıklarıdır.

SONUÇ

Bu çalışmada, farklı dokularda antioksidan ve antienflamatuvar özellikleri kanıtlanmış olan BAI'nin, FA hasarına karşı akciğer dokusunda koruyucu bir ajan olarak deneysel çalışmalarla araştırılması amaçlanmıştır. Bie ve ark.²⁸, BAI'nin hepatosellüler karsinoma üzerindeki antikanser etkilerini araştırmış ve olumlu sonuçlar bulmuşlardır. Ayrıca, Sowndhararajan ve ark.²⁹, BAI'nin nöroprotektif etkilerini vurgulamışlardır. Ancak, BAI'nin FA kaynaklı akciğer hasarı üzerinde olumlu bir etkisi tespit edemedik. Sıçan akciğerlerinde, FA intrinsik mitokondriyal yol ile apoptozu indükler ve BAI'nin ifade düzeyinde apoptozis üzerinde olumlu bir etkisi yoktur. Öte yandan, çalışmamız BAI'nin ifade düzeyinde oksidatif stres parametreleri üzerinde iyileştirici bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

Etik

Etik Kurul Onayı: Bu çalışma Trakya Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulunun onayı ile yürütüldü (karar no: 2019.03.01, tarih: 29.03.2019).

Hasta Onayı: Hayvan deneyi.

Dipnot

Yazarlık Katkıları

Cerrahi ve Medikal Uygulama: E.U., M.K., E.M.K., Konsept: E.U., E.B., Dizayn: E.T., E.U., E.B., Veri Toplama veya İşleme: E.U., E.B., M.K., E.M.K., Analiz veya Yorumlama: E.T., E.U., E.B., Literatür Arama: M.K., E.M.K., Yazan: E.T., E.U., E.B.

Çıkar Çatışması: Bu makalenin yazarlarından biri Ebru TAŞTEKİN, Namık Kemal Tıp Dergisi, Editör Kurulu üyesidir. Ancak, makalenin editöryal kararının hiçbir aşamasında yer almamıştır. Bu makaleyi değerlendiren editörler farklı kurumlardandır. Diğer yazarlar herhangi bir çıkar çatışması beyan etmemiştir.

Finansal Destek: Çalışmanın finansal desteği Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (TUBAP-2020/30) tarafından sağlanmıştır.

KAYNAKLAR

- Suh HH, Bahadori T, Vallarino J, Spengler JD. Criteria air pollutants and toxic air pollutants. *Environ Health Perspect.* 2000;108:625-33.
- Condray R, Morrow LA, Steinhauer SR, Hodgson M, Kelley M. Mood and behavioral symptoms in individuals with chronic solvent exposure. *Psychiatry Res.* 2000;97:191-206.
- Kum C, Kiral F, Sekkin S, Seyrek K, Boyacioglu M. Effects of xylene and formaldehyde inhalations on oxidative stress in adult and developing rats livers. *Exp Anim.* 2007;56:35-42.
- Quievryn G, Zhitkovich A. Loss of DNA-protein crosslinks from formaldehyde-exposed cells occurs through spontaneous hydrolysis and an active repair process linked to proteasome function. *Carcinogenesis.* 2000;21:1573-80.
- Bakar E, Ulucam E, Cerkezayabekir A. Protective effects of proanthocyanidin and vitamin E against toxic effects of formaldehyde in kidney tissue. *Biotech Histochem.* 2015;90:69-78.
- Gulec M, Gurel A, Armutcu F. Vitamin E protects against oxidative damage caused by formaldehyde in the liver and plasma of rats. *Mol Cell Biochem.* 2006;290:61-7.
- Jakab MG, Klupp T, Besenyei K, Biró A, Major J, Tompa A. Formaldehyde-induced chromosomal aberrations and apoptosis in peripheral blood lymphocytes of personnel working in pathology departments. *Mutat Res.* 2010;698:11-7.
- Uluçam E, Bakar E. The effect of proanthocyanidin on formaldehyde-induced toxicity in rat testes. *Turk J Med Sci.* 2016;46:185-93.
- Lim SK, Kim JC, Moon CJ, Kim GY, Han HJ, Park SH. Formaldehyde induces apoptosis through decreased Prx 2 via p38 MAPK in lung epithelial cells. *Toxicology.* 2010;271:100-6.
- Rahman I, Biswas SK, Kode A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur J Pharmacol.* 2006;533:222-39.
- Sandikci M, Seyrek K, Aksit H, Kose H. Inhalation of formaldehyde and xylene induces apoptotic cell death in the lung tissue. *Toxicol Ind Health.* 2009;25:455-61.
- Chopra M, Reuben JS, Sharma AC. Acute lung injury:apoptosis and signaling mechanisms. *Exp Biol Med (Maywood).* 2009;234:361-71.
- Klekotka PA, Santoro SA, Wang H, Zutter MM. Specific residues within the alpha 2 integrin subunit cytoplasmic domain regulate migration and cell cycle progression via distinct MAPK pathways. *J Biol Chem.* 2001;276:32353.
- Levy M, Khan E, Careaga M, Goldkorn T. Neutral sphingomyelinase 2 is activated by cigarette smoke to augment ceramide-induced apoptosis in lung cell death. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2009;297:125-33.

15. Latif M, Faheem M. Study of oxidative stress and histo-biochemical biomarkers of diethyl phthalate induced toxicity in a cultureable fish, *labeo rohita*. Pak Vet J. 2019;40:202-8.
16. Antonio LS, Jeggle P, MacVinish LJ, Bartram JC, Miller H, Jarvis GE, et al. The effect of fluoride on the structure, function, and proteome of a renal epithelial cell monolayer. Environ Toxicol. 2017;32:1455-67.
17. Goldstein JC, Kluck RM, Green DR. A single cell analysis of apoptosis. Ordering the apoptotic phenotype. Ann N Y Acad Sci. 2000;926:132-41.
18. Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. Biochim Biophys Acta. 2006;1757:639-47.
19. Goldstein JC, Muñoz-Pinedo C, Ricci JE, Adams SR, Kelekar A, Schuler M, et al. Cytochrome c is released in a single step during apoptosis. Cell Death Differ. 2005;12:453-62.
20. Ouyang Z, Yang B, Yi J, Zhu S, Lu S, Liu Y, et al. Exposure to fluoride induces apoptosis in liver of ducks by regulating Cyt-C/Caspase 3/9 signaling pathway. Ecotoxicol Environ Saf. 2021;224:112662.
21. Kanapathipillai M. Treating p53 mutant aggregation-associated cancer. Cancers (Basel). 2018;10:154.
22. Chatterjee A, Black SM, Catravas JD. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiological regulation. Vascul Pharmacol. 2008;49:134-40.
23. Anbrazhagan S, Winkins SS. A biochemical study on variability of Superoxide dismutase, Catalase and Glutathione peroxidase in dry cleaners. Indian J Clin Biochem. 2008;23:198-9.
24. Chen Q, Xiao DS. Long-term aerobic exercise increases redox-active iron through nitric oxide in rat hippocampus. Nitric Oxide. 2014;361-10.
25. Eghbalzadeh K, Brixius K, Bloch W, Brinkmann C. Skeletal muscle nitric oxide (NO) synthases and NO-signaling in "diabetes"--what about the relevance of exercise training interventions? Nitric Oxide. 2014;37:28-40.
26. Miyauchi T, Maeda S, Iemitsu M, Kobayashi T, Kumagai Y, Yamaguchi I, et al. Exercise causes a tissue-specific change of NO production in the kidney and lung. J Appl Physiol. 2003;94:60-8.
27. Ramirez DC, Gimenez MS. Induction of redox changes, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 by chronic cadmium exposure in mouse peritoneal macrophages. Toxicol Lett. 2003;145:121-32.
28. Bie B, Sun J, Guo Y, Li J, Jiang W, Yang J, et al. Baicalein: a review of its anti-cancer effects and mechanisms in hepatocellular carcinoma. Biomed Pharmacother. 2017;93:1285-91.
29. Sowndhararajan K, Deepa P, Kim M, Park SJ, Kim S. Baicalein as a potent neuroprotective agent: A review. Biomed Pharmacother. 2017;95:1021-32.
30. Yalçınkaya Yavuz Ö, Aydoğdu N, Taştekin E, Süt N. The effects of baicalin on myoglobinuric acute renal failure in rats. Balkan Med J. 2018;35:68-76.
31. Zararsız İ, Kuş İ, Çolakoğlu N, Pekmez H, Yılmaz HR, Sarsılmaz M. Protective effects of melatonin hormone against exposure of formaldehyde-induced oxidative damage in lung of rats: light microscopic and biochemical study. Van Med J. 2004;11:105-12.
32. Türkoğlu AO, Sarsılmaz M, Çolakoğlu N, Zararsız İ, Kuloğlu T, Pekmez H, et al. Formaldehyde-induced damage in lungs and effects of caffeic acid phenethyl ester: a light microscopic study. Eur J Intern Med. 2008;5:152-6.
33. Sezer A, Guclu B, Kazanci B, Kadir M, Coban MK. Neuroprotective effects of agmatine in experimental peripheral nerve injury in rats: a prospective randomized and placebo-controlled trial. Turk Neurosurg. 2014;24:196-201.
34. Taştekin E, Palabiyik O, Ulucam E, Uzgur S, Karaca A, Vardar SA, et al. The effect of high protein diet and exercise on irisin, eNOS, and iNOS expressions in kidney. Ren Fail. 2016;38:1107-14.
35. Hauptmann M, Stewart PA, Lubin JH, Beane Freeman LE, Hornung RW, Herrick RF, et al. Mortality from lymphohematopoietic malignancies and brain cancer among embalmers exposed to formaldehyde. J Natl Cancer Inst. 2009;101:1696-708.
36. Mahboubi A, Koushik A, Siemiatycki J, Lavoue J, Rousseau MC. Assessment of the effect of occupational exposure to formaldehyde on the risk of lung cancer in two Canadian population-based case-control studies. Scand J Work Environ Health. 2013;39:401-10.
37. Guo J, Garshick E, Si F, Tang Z, Lian X, Wang Y, et al. Environmental toxicant exposure and depressive symptoms. JAMA Netw Open. 2024;7:e2420259.
38. Ghelli F, Bellisario V, Squillacioti G, Panizzolo M, Santovito A, Bono R. Formaldehyde in Hospitals Induces Oxidative Stress: The Role of GSTT1 and GSTM1 Polymorphisms. Toxics. 2021;9:178.
39. Ghelli F, Cocchi E, Buglisi M, Squillacioti G, Bellisario V, Bono R, Santovito A. The role of phase I, phase II, and DNA-repair gene polymorphisms in the damage induced by formaldehyde in pathologists. Sci Rep. 2021;11:10507.
40. Saito Y, Nishio K, Yoshida Y, Niki E. Cytotoxic effect of formaldehyde with free radicals via increment of cellular reactive oxygen species. Toxicology. 2005;210:235-45.
41. Zeng CE, Peng X, Qiao Y. Reproductive toxicity of formaldehyde to male mice. Chin J Hum Sex. 2003;12:1-4.
42. Ozen OA, Kus MA, Kus I, Alkoc OA, Songur A. Protective effects of melatonin against formaldehyde-induced oxidative damage and apoptosis in rat testes: an immunohistochemical and biochemical study. Syst Biol Reprod Med. 2008;54:169-76.
43. Arslan-Acaroz D, Bayşu-Sozibilir N. Ameliorative effect of boric acid against formaldehyde-induced oxidative stress in A549 cell lines. Environ Sci Pollut Res Int. 2020;27:4067-74.
44. Mohammed N, Ahmed SA, Hegazy NI, Kashishy K. Ameliorative effects of hesperidin and N-acetylcysteine against formaldehyde-induced-hemato- and genotoxicity. Toxicol Res (Camb). 2021;10:992-1002.
45. Squillacioti G, Bellisario V, Grosso A, Ghelli F, Piccioni P, Grignani E, et al. formaldehyde, oxidative stress, and FeNO in traffic police officers working in two cities of northern Italy. Int J Environ Res Public Health. 2020;17:1655.
46. Teng S, Beard K, Pourahmad J, Moridani M, Easson E, Poon R, et al. The formaldehyde metabolic detoxification enzyme systems and molecular cytotoxic mechanism in isolated rat hepatocytes. Chem Biol Interact. 2001;130-132:285-96.
47. Sarsılmaz M, Özen OA, Özyurt H. The Evaluation of the enzymatic antioxidant system of liver after the subacute and subchronic inhalation of formaldehyde in Rats. Van Med J. 2000;7:84-9.
48. Kriebel D, Myers D, Cheng M, Woskie S, Cocanour B. Short-term effects of formaldehyde on peak expiratory flow and irritant symptoms. Arch Environ Health. 2001;56:11-8.
49. Pan L, Cho KS, Yi I, To CH, Chen DF, Do CW. Baicalein, Baicalin, and Wogonin: protective effects against ischemia-induced neurodegeneration in the brain and Retina. Oxid Med Cell Longev. 2021;2021:8377362.
50. Ren M, Zhao Y, He Z, Lin J, Xu C, Liu F, et al. B Baicalein inhibits inflammatory response and promotes osteogenic activity in periodontal ligament cells challenged with lipopolysaccharides. BMC Complement Med Ther. 2021;21:43.