

اثرات هیستوپاتولوژیکی فرمالدهید بر مغزو ریه در مدل حیوانی موش - صحرائی

مداح، س. ۱، یوسفی، م. ۲*، نعیمی، س. ۲، غفاری خلیق، س. ۳

دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۱۸ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۲۷

خلاصه

فرمالدهید (FA) که نام علمی آن متانال است و با فرمول شیمیایی CH_2O شناخته می‌شود، یک گاز محلول در آب و بی‌رنگ می‌باشد. فرمالدهید در صنایع مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد و توانایی بالایی در تثبیت نمونه‌های تشریحی و بافتی بدن دارد. فرمالدهید به صورت مستقیم با اجزای بافت‌ها واکنش نشان می‌دهد و احتمالاً سایتوتوکسوسیتی آن به دلیل واکنش پذیری زیاد آن می‌باشد. در این مطالعه اثرات سمی فرمالدهید برای افرادی که به طور منظم با این ماده سروکار دارند مثل آناتومیست‌ها، دانشجویان پزشکی و کارگران صنایع مختلف، مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام این تحقیق ۲۴ قطعه موش بزرگ آزمایشگاهی نر بالغ از نژاد wistar به چهار گروه شش‌تایی تقسیم شدند. حیوانات به صورت آزادانه به آب و غذای کافی دسترسی داشتند. پس از طی دوره سازش پذیری، حیوانات به گروه‌های زیر تقسیم شدند: گروه کنترل: دریافت کننده نرمال سالین به صورت استنشاقی، گروه یک: دریافت کننده فرمالدئید ۱ ppm، گروه دوم: دریافت کننده فرمالدئید ۲ ppm، گروه سوم: دریافت کننده فرمالدئید ۳ ppm. زمان اکسپوزر از ۸:۳۰ صبح الی ۲:۳۰ عصر به مدت شش ساعت در روز به مدت هفت روز بود. پس از پایان اکسپوزر، مقاطع بافتی و رنگ آمیزی شده مغز و ریه و نمونه خون اخذ شده از قلب جهت اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی، مورد مطالعه قرار گرفتند. **نتایج:** در ناحیه DG هیپوکامپ مخ نکرور نورونی و تغییرات دژنراتیو نورون‌ها در دوزهای ۲ و ۳ ppm فرمالدهید روند افزایشی را نشان داده و تغییرات پاتولوژیکی چون نفوذ لکوسیتی، ضخامت دیواره آلوئولی و احتقان عروقی در بافت ریه نیز در دوزهای ۲ و ۳ ppm قابل توجه و معنی دار بود. نتایج حاصل از این مطالعه نشانگر وجود رابطه مستقیم بین افزایش دوز فرمالین دریافتی و آسیب‌های مغزی، ریوی و کبدی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: فرمالدهید، ریه، مغز، هیستوپاتولوژی، موش صحرائی.

۱. دانش آموخته دکترای عمومی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران
 ۲. گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران
 ۳. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران
- نویسنده مسئول: myousefi@semnan.ac.ir

همکاران در سال ۲۰۱۶ نشان دادند که مولکول mTOR ممکن است در آسیب سلول های تولید مثل مردان ناشی از قرار گرفتن در معرض فرمالین نقش داشته باشد (Fang و همکاران، 2016). شواهد علمی قوی وجود دارد که نشان داده بین بیماری های مغزی مثل آلزایمر و در معرض قرار گرفتن فرمالدهید ارتباط وجود دارد (Liu و همکاران، 2018). تغییرات مورفولوژیکی فاحشی مثل احتقان و خونریزی پتیشی در کبد موش هایی که در معرض فرمالدهید خوراکی قرار گرفتند دیده شده است (Afrin و همکاران، 2016).

تحقیقات اپیدمیولوژیک نشانگر این هستند که کارکنان صنایع، مومیایی کنندگان و متخصصین آناتومی در معرض ریسک بالایی از ابتلا به انواع سرطان ها در نواحی مختلف هستند مثل مغز و ریه (Coggon و همکاران، 2003)، پانکراس (Stone و همکاران، 2001).

دانشجویان دامپزشکی و متخصصین آناتومی بر حسب ضرورت زمان نسبتا طولانی در طول هفته در یک نیمسال تحصیلی در سالن تشریح و با نمونه های تثبیت شده با فرمالین کار می کنند و لذا در این زمان در معرض استنشاق گاز فرمالدهید هستند. در همین راستا این مطالعه تاثیر استنشاق فرمالدهید را بر روی بافت ریه، هیپوکمپ مغز و آنزیم های کبدی موش صحرایی بررسی نموده است.

مواد و روش کار

برای انجام این تحقیق ۲۴ قطعه موش صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار با وزن تقریبی ۱۸۰-۲۰۰ گرم و با سن حدود دو الی سه ماه از مرکز تحقیقات حیوانات آزمایشگاهی آموزشدهنده دامپزشکی شهسپرزاد تهیه و به آزمایشگاه تحقیقات رفتاری دانشکده دامپزشکی سمنان منتقل شد. جهت کار با حیوانات از کمیته ای ملی کار با حیوانات آزمایشگاهی کد اخلاقی E-98/10 دریافت شد. کلیه حیوانات در دمای 2 ± 22 درجه سانتیگراد و دوره تاریکی - روشنایی ۱۲ ساعته و در قفس های مخصوص به صورت گروه های شش تایی نگهداری شدند. حیوانات به صورت آزادانه به جز در هنگام مواجهه با فرمالدهید به آب و غذای کافی دسترسی داشتند. پس از طی دوره ی سازش پذیری، حیوانات به گروه های زیر تقسیم شدند:

گروه کنترل: دریافت کننده نرمال سالیین به صورت استنشاقی

گروه یک: دریافت کننده فرمالدهید به مقدار ۱ ppm

گروه دو: دریافت کننده فرمالدهید به مقدار ۲ ppm

گروه سه: دریافت کننده فرمالدهید به مقدار ۳ ppm

سلامت انسانی همواره به وسیله مواجهه با سموم واکنش- پذیر تهدید می شود. این سموم می توانند به بیومولکول های بسیار اساسی بدن مثل DNA و پروتئین ها آسیب بزنند. یکی از این مولکول ها، فرمالدهید است که ساده ترین و واکنش پذیرترین آلدئید می باشد. فرمالدهید در محیط زیست به وفور موجود است و همچنین بخشی از مواد غذایی را تشکیل می دهد. با این حال، حجم عظیمی از فرمالدهید بصورت اندوژن در نتیجه ی متابولیسم سلولی، ایجاد می شود. در حقیقت، بررسی های اخیر نشانگر این است که فرمالدهید اندوژن به میزان کافی جهت آسیب و تهدید سلامت ژنومی تولید می شود (Tulpule & Dringen 2013). فرمالدهید بطور اندکی در محل اصلی خود یافت می شود چون نیمه عمر کوتاهی در هوا دارد و در نور به فرم سمی آن تجزیه می شود (Gurel و همکاران 2005). فرمالدهید یک ماده مضر بالقوه است در حالیکه مکانیسم این که کدام یک از مواد دفعی آن اثرات سایتوتوکسیک دارد هنوز شناخته نشده است. فرمالدهید به صورت مستقیم با اجزای بافت ها واکنش نشان می دهد و احتمالا سایتوتوکسوسیتی آن به دلیل واکنش پذیری زیاد آن می باشد (Kimbell و همکاران، 2001).

فرمالدهید یک ماده شیمیایی است که به وفور در آزمایشگاه های آناتومی، بافت شناسی، آسیب شناسی و مومیایی کردن، به دلیل خاصیت آن در استرل کردن و حفظ و نگهداری بافتی استفاده می شود (Costa و همکاران، 2015). در صنایع آرایشی و بهداشتی، نه تنها به عنوان نگهدارنده، بلکه در مواد صاف کننده ی مو نیز وجود دارد (Peteffi و همکاران، 2016).

فرمالدهید اخیرا توسط سازمان بین المللی تحقیق درباره ی سرطان (IARC)، به عنوان یک ماده ی سرطان زا در انسان (Class 1) طبقه بندی شده است. برخی اثرات نامطلوب آن به دنبال مواجهه ی حاد با مقدار زیادی از فرمالدهید، می تواند شامل ضعف، سردرد، تهوع، استفراغ، پنومونی، دیس پنه، خس خس، سرفه، ادم حنجره و ادم ریوی، اسپاسم برونش ها، اسپاسم حنجره، دپرشن تنفسی، دپرشن سیستم اعصاب مرکزی، تشنج و کوما می باشد (Mehdi و همکاران، 2017).

فرمالدهید باعث ضررهای متعددی روی ارگان های مختلف تنفسی و استرس اکسیداتیو می شود (Tesfaye و همکاران، 2020). نه تنها سیستم تنفس بلکه سیستم های دیگر را نیز درگیر می کند. به عنوان مثال بیضه ها (Hegazy و همکاران، 2017)، مغز، کلیه و کبد از این موارد هستند (Zhao و همکاران، 2011). Fang و

محفظه‌ی مواجهه با فرمالدهید به ابعاد ۹۸×۵۱×۵۱ سانتی متر ساخته شد. به منظور کنترل بهتر شرایط محیطی، محفظه به خوبی با پلاستیک ضخیم پوشانده شد. در دوره‌ی مواجهه، فرمالدهید با توجه به ابعاد محفظه و دوز تعیین شده برای هر گروه در محفظه قرار داده شد. زمان مواجهه از ۸:۳۰ صبح الی ۲:۳۰ عصر به مدت شش ساعت در روز به مدت هفت روز متوالی بود. در طول مواجهه حیوانات اجازه دریافت غذا و آب نداشتند و در محفظه و تحت نظارت قرار می‌گرفتند. طبق برخی مطالعات این زمان مواجهه مشابه شرایط مختلف مواجهه‌ی شغلی انسان با این ماده بود (Nogueira و همکاران، 1997). برای اندازه‌گیری میزان فرمالدهید مایع مورد نیاز برای رسیدن به دوز استنشاقی مورد نظر برای هر گروه در دمای اتاق (۲۵ درجه) از فرمول زیر استفاده شد (۱۹).

$$\text{Mg/m}^3 = (\text{ppm}) \times (\text{molecular weight of the compound}) / (24.45)$$

بعد از مواجهه حیوانات با فرمالین و گذراندن دوره‌ی هفت روزه، حیوانات با ترکیب (کتامین/زایلازین) کتامین ۵۰ mg/kg و زایلازین ۵ mg/kg بیهوش شدند. سپس اخذ دو سی‌سی خون از قلب توسط سرنگ هپارینه انجام گرفت و جهت انجام مطالعات بیوشیمیایی خون به مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و سرم آن جداسازی شد. پس از مخلوط کردن محلولهای موجود در کیت، جهت سنجش فعالیت آنزیم‌های کبدی AST و ALT با استفاده از کیت آنزیمی CO بیوشیمی (شرکت پارس آزمون) توسط روش پیشنهادی فدراسیون بین‌المللی شیمی بالینی و طب آزمایشگاهی IFCC توسط دستگاه اسپکتوفتومتر با طول موج ۴۸۰ نانومتر انجام شد.

پس از آسان‌کشی، از مغز و ریه حیوانات جهت انجام بررسی‌های بافتی و پاتولوژیکی نمونه برداری لازم انجام شد. پس از انجام مراحل تثبیت، آنگیری، شفاف‌سازی و آغستگی با استفاده از دستگاه تیشو پروسوسور، بلوک‌های پارافینه با استفاده از دستگاه ذوب پارافین و قالب لوکهارت تهیه گردید. سپس برش‌هایی به اندازه ۵ میکرون با استفاده از میکروتوم روتاری تهیه و پس از انتقال به لام و خشک شدن در دمای ۶۵- تا ۷۰ درجه سانتیگراد در فور، توسط هماتوکسیلین-آنوزین رنگ شده و مورد بررسی قرار گرفتند.

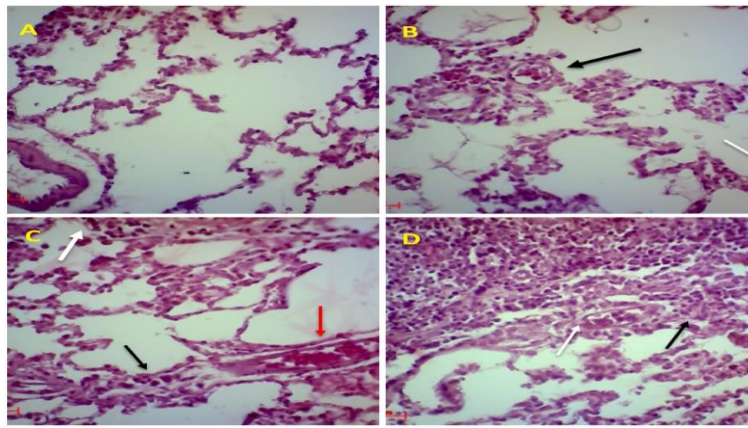
در بررسی میکروسکوپی، تعداد نوروهای نکروز شده و تعداد کل نوروهای ناحیه DG هیپوکامپ نخست با دوربین دیجیتال با بزرگنمایی ۴۰۰X عکسبرداری شد و سپس با نرم‌افزار Image J شمارش و میانگین درصد نوروهای نکروز شده نسبت به کل تعداد نوروها محاسبه گردید.

در بررسی میکروسکوپی ریه، چهار اسلاید رانوم از مناطق مختلف ریه با بزرگنمایی ۴۰۰X توسط دو پاتولوژیست دامپزشکی مورد بررسی قرار گرفت و از لحاظ خونریزی، نفوذ سلول‌های التهابی، احتقان عروقی و ضخامت دیواره آئولوی به صورت اسکورهای صفر تا چهار، مشاهده هیچ گونه تغییر پاتولوژیک درجه صفر، مشاهده تغییرات پاتولوژیک در یک اسلاید از چهار اسلاید درجه یک، مشاهده تغییرات پاتولوژیک در دو اسلاید از چهار اسلاید درجه دو، مشاهده تغییرات پاتولوژیک در سه اسلاید از چهار اسلاید درجه سه، مشاهده تغییرات پاتولوژیک در چهار اسلاید از چهار اسلاید درجه چهار، امتیازدهی و سپس میانگین امتیازها برای هر پارامتر ثبت شد.

نتایج

نمونه‌های ریه با میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی ۴۰۰ مورد مشاهده قرار گرفته و از نظر خونریزی، افزایش ضخامت آئولوی، نفوذ سلول‌های التهابی و احتقان عروقی و مویرگی بررسی شدند که نتایج به صورت نمودار نمایش داده شده است (تصاویر ۱، ۲، ۳، ۴).

همانطور که در شکل، نمودار ۱ و جدول ۱ دیده می‌شود، تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل و گروه مواجهه شده با یک ppm فرمالدهید دیده نمی‌شود. اما بین گروه‌های مواجهه شده با دو و سه ppm فرمالدهید تفاوت معنی‌داری از لحاظ بروز تغییرات پاتولوژیک دیده می‌شود.



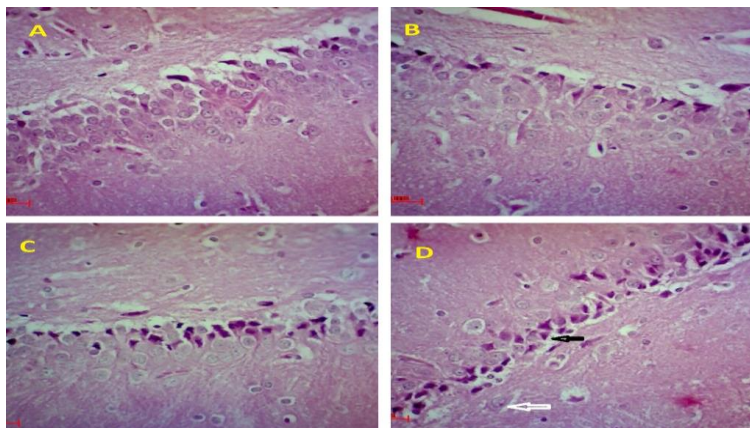
تصویر ۱: مقاطع عرضی ریه. A گروه کنترل، B گروه دوز 1 ppm، C گروه دوز 2 ppm، D گروه دوز 3 ppm. فلش قرمز نشان دهنده نفوذ لکوسیتی، فلش سیاه نشان دهنده افزایش ضخامت آلوتولی و فلش سفید نشان دهنده احتقان عروقی می باشد. با درشت‌نمایی ۴۰۰ و با رنگ آمیزی H&E (نگارنده).

گروه ها	Mean ± SE
کنترل	۱/۴۰ ± ۰/۲۴ ^c
ppm۱	۲/۳۳ ± ۰/۳۳ ^c
ppm۲	۴/۰۰ ± ۰/۴۱ ^b
ppm۳	۷/۵۰ ± ۰/۶۲ ^a
SEM	۰/۶۵

جدول ۱: تغییرات پاتولوژیک ناشی از فرمالدهید در ریه

نمونه‌های مغز توسط میکروسکوپ نوری و با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ از لحاظ نکروز نورونی در ناحیه DG هیپوکامپ بررسی (تصویر ۲) و نتایج به صورت درصد نکروز نورونی در نمودار ۲ و جدول ۲ نشان داده شدند.

در این بررسی، درصد نکروز نورونی بین گروه کنترل و گروه مواجه با یک ppm فرمالدهید تفاوت معنی‌داری نداشته‌است. اما بین گروه‌های مواجه با دو و سه ppm فرمالدهید تفاوت معنی‌داری از لحاظ درصد نکروز نورونی مشاهده شد. بنابراین بین افزایش دوز مواجهه فرمالدهید و نکروز نورونی، رابطه مستقیم وجود دارد.



تصویر ۲: مقطع عرضی از ناحیه DG هیپوکامپ. A گروه کنترل، B گروه دوز 1 ppm، C گروه دوز 2 ppm، D گروه دوز 3 ppm با درشت‌نمایی ۴۰۰ و با رنگ‌آمیزی H&E پیکان سیاه مشخصه نکروز نورونی و پیکان سفید مشخصه دژنراسانس نورونی میباشد (نگارنده).

گروه ها	Mean ± SE
کنترل	% ۲۵/۲۵ ± ۳/۹۰ ^b Total ۴۹/۰۰ ± ۶/۱۳ ^a
ppm۱	% ۲۵/۰۰ ± ۷/۸۲ ^b Total ۵۰/۵۰ ± ۵/۵۰ ^a
ppm۲	% ۴۰/۸۰ ± ۴/۱۹ ^a Total ۴۹/۶۰ ± ۳/۷۷ ^a
ppm۳	% ۴۵/۵۰ ± ۵/۶۳ ^a Total ۴۶/۰۰ ± ۱/۳۵ ^a
SEM	% ۳/۳۴ Total ۲/۰۷

جدول ۲: تغییرات پاتولوژیک ناشی از فرمالدهید در مغز.

با استفاده از کیت‌های شرکت پارس آزمون، دو آنزیم AST و ALT اندازه گیری شد. با توجه به نتایجی که در نمودارهای ۳ و ۴ و جدول ۳ آورده شده‌است، افزایش میزان آنزیم‌های کبدی با افزایش دوز فرمالدهید مواجهه رابطه مستقیم داشته که نشانگر آسیب کبدی در گروه‌های مواجهه با فرمالدهید می‌باشد.

گروه ها	AST (IU/L)	ALT (IU/L)
کنترل	۷۹/۲۰ ± ۱/۱۶ ^d	۳۸/۸۰ ± ۱/۱۶ ^d
ppm۱	۹۲/۸۰ ± ۱/۳۹ ^c	۴۹/۸۰ ± ۱/۸۵ ^c
ppm۲	۱۰۶/۸۰ ± ۲/۴۸ ^b	۶۰/۴۰ ± ۱/۳۳ ^b
ppm۳	۱۳۰/۲۰ ± ۳/۳۴ ^a	۶۶/۰۰ ± ۱/۹۵ ^a
SEM	۴/۴۵	۲/۵۰

جدول ۳: بررسی و مقایسه مقادیر آنزیم های کبدی در گروه های کنترل و درمان

اختلالات در سیستم عصبی شود (Malek و همکاران، 2003).

اثر مواجهه فرمالدهید بر ریه

فرمالدهید دارای اثرات مخرب بر بافت ریه می‌باشد. با توجه به جدول و نمودار ۱ که در نتایج آورده شد، شدت این اثرات با دوز فرمالدهید رابطه مستقیم داشته و با افزایش دوز فرمالدهید، افزایش شدت تغییرات پاتولوژیک مثل خونریزی، نفوذ سلول‌های التهابی، احتقان عروقی و افزایش ضخامت آلوئولی مشاهده شد.

مطالعه‌ای Saxena و همکاران در سال ۲۰۱۹، جهت بررسی تغییرات بافتی ناشی از فرمالدهید بر روی موش

بحث : فرمالدهید با فرمول شیمیایی (HCHO)، یک گاز اشتعال‌پذیر، بی‌رنگ و واکنش‌پذیر در دمای اتاق است. در سالن‌های تشریح، طی فرایند مومیایی کردن، حفظ و نگهداری بافتی، بخارات فرمالدهید به‌آسانی از طریق ریه جذب می‌شود و افرادی که در این سالن‌ها مشغول به کار هستند در معرض استنشاق فرمالدهید قرار می‌گیرند. سیستم تنفسی هدف اصلی فرمالدهید می‌باشد (۲۰). فرمالدهید به آسانی از سد خونی-مغزی عبور کرده و به همین دلیل در مایع CSF یافت می‌شود. از این رو، می‌تواند باعث برخی

صحرایی بالغ با دوزهای صفر (کنترل)، ۴٪، ۸٪ و ۴۰٪ فرمالدهید انجام و نتایج به دست آمده نشانگر این است که تغییرات پاتولوژیکی شامل افزایش ضخامت دیواره آلوئولی، کاهش فضای آلوئولی، از دست رفتن یکپارچگی دیواره آلوئولی، اتساع و احتقان مویرگی و عروقی، نفوذ سلول‌های التهابی و هایپرپلازی بافت لنفوییدی در تمام غلظت‌های چهار و هشت و ۴۰ درصد دیده شده است (Saxena و همکاران، ۲۰۱۹). در پژوهشی که با هدف بررسی نقش محافظتی (Bronco-T) در مقابل فرمالدهید در ریه موش صحرایی نر بالغ انجام شد، نتایج میکروسکوپی در موش‌هایی که با فرمالدهید ۴۰٪ مواجهه داشته اند، نشان دهنده تغییرات پاتولوژیک مثل هایپرپلازی اپیتلیال برونشیول‌ها، متاپلازی سلول‌های جامی، تهاجم لنفوسیتی، اتساع عروق ریوی و واسکولیت، ادم و نفوذ سلول‌های التهابی بوده است (Payani و همکاران، ۲۰۱۹). Murta و همکاران در سال ۲۰۱۶، هجوم سلول‌های التهابی به پارانشیم ریه را در موش‌های صحرایی که با دوزهای مختلف فرمالدهید مواجهه داشتند، ارزیابی و روند افزایشی در سیتوکین‌ها و کموکین‌ها که برای فعالیت و بقای سلول‌های التهابی ضروری هستند را، در بافت‌های آسیب‌دیده نشان دادند. همچنین، تعداد زیادی ماکروفاژ و لنفوسیت در ریه‌ها تشخیص داده شد که از آن به‌عنوان پاسخی علیه مواجهه با فرمالدهید یاد می‌شود (Murta و همکاران، ۲۰۱۶). در سال ۲۰۱۵ اثرات اکسیداتیو و التهابی بر ماهیچه‌های نای و دیافراگم در موش‌های صحرایی در مواجهه با غلظت‌های مختلف فرمالدهید ارزیابی و نشان داده شد که تنفس فرمالدهید ۱۰٪ باعث آسیب پروتئینی و چربی، کاهش دفاع آنتی‌اکسیدانی و همچنین فراخوانی سلول‌های التهابی می‌شود (Lima و همکاران، ۲۰۱۵). در سال ۲۰۱۷ نشان داده شد که فرمالدهید سبب آپوپتوز سلول‌های اپی‌تلیال نای شده و بیشترین میزان آپوپتوز سلول‌های پوششی نای در دور ۱۰ پی پی ام و در طول ۱۳ هفته مواجهه با فرمالدهید مشاهده شد (Sapmaz و همکاران، ۲۰۱۷).

اثر مواجهه فرمالدهید بر مغز

نتایج این مطالعه نشان داد که فرمالدهید دارای اثرات مخربی چون نکروز نورونی بر نورون‌های مغزی ناحیه DG هیپوکامپ دارد. همانطور که در نمودار ۲ دیده می‌شود، درصد نکروز نورونی در گروه موش‌های مواجهه شده با دوز فرمالدهید ۳ ppm بیش از سایر گروه‌ها می‌باشد که نشان‌دهنده‌ی رابطه مستقیم بین نکروز نورونی یا آسیب مغزی و دوز فرمالدهید است. با توجه به پژوهش Zararsiz و همکاران (۲۰۰۶)، افزایش آپوپتوز در کورتکس

prefrontal موش‌های صحرایی دریافت کننده فرمالدهید، ناشی از انتقال سیتوکروم C از غشا میتوکندری به درون سیتوپلاسم و افزایش فعالیت پروتئین Bax می‌باشد. نتایج نشان داد که مرگ سلولی که توسط فرمالدهید ایجاد شده است ناشی از افزایش فعالیت پروتئین Bax می‌باشد. نتایج این بررسی‌ها در تایید بررسی‌های پیشین می‌باشند که نشان دادند افزایش مرگ سلولی یا آپوپتوز ناشی از افزایش استرس اکسیداتیو و ROS می‌باشد که شاخص پراکسیداسیون را در مغز افزایش و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را کاهش می‌دهد (Zararsiz و همکاران، ۲۰۰۶). بنابراین می‌توان گفت مرگ نورونی در این بررسی ناشی از ایجاد استرس اکسیداتیوی است که توسط مواجهه با فرمالدهید ایجاد می‌شود.

Li و همکاران در سال ۲۰۲۰ با هدف بررسی تاثیر فرمالدهید گازی بر یادگیری و حافظه موش صحرایی، ۳۰ عدد موش را در سه گروه ۱۰ تایی تقسیم بندی کرده و به مدت ۲۱ روز با دوزهای ۰ (کنترل)، ۰/۵ و ۳ mg/m³ فرمالدهید گازی مواجهه دادند. طبق مشاهدات میکروسکوپی، تغییرات مشاهده شده در نمونه‌های مغز موش‌های گروه‌های درمان، شامل فاصله بین سلولی افزایش یافته، همچنین تورم و بدشکلی در سلول‌ها و کوتاه‌شدگی دندریت‌های راسی بوده است (Li و همکاران، ۲۰۲۰).

Aslan و همکاران در سال ۲۰۰۶ با مطالعه بر روی تعداد و حجم سلول‌های ناحیه DG هیپوکامپ در مغز موش‌های ۳۰ روزه مواجهه داشته با فرمالدهید، به بررسی اثرات مخرب فرمالدهید بر روی مغز پرداخت. در مطالعه‌ی آن‌ها دو گروه از موش‌های صحرایی با دوزهای شش و ۱۲ ppm فرمالدهید به مدت پنج روز در هفته و شش ساعت در روز، با فرمالدهید مواجهه داشتند. نتایج این بررسی نشانگر این بود که تعداد سلول‌های ناحیه DG در گروه با دوز پایین‌تر، بیشتر از تعداد سلول‌های DG در گروه با دوز بالاتر، بوده است. همچنین در این بررسی مشخص شد که هر دو گروه، افزایش حجم سلول‌های گرانولی را در ناحیه DG از خود نشان دادند (Aslan و همکاران، ۲۰۰۶).

مواجهه با مواد شیمیایی مانند تولوئن و فرمالدهید می‌تواند با فعال‌سازی محور HPA باعث افزایش سطح گلوکوکورتیکوئیدها شود. مواجهه‌ی درازمدت با شرایط استرس‌زا و گلوکوکورتیکوئیدها موجب کاهش گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئید در مغز و بخصوص در هیپوکامپ می‌شود. این موضوع باعث افزایش سطح کورتیکواسترون و در نتیجه

افزایش اضطراب و افسردگی می‌شود (Li و همکاران، 2012).

اثر مواجهه فرمالدهید بر کبد

در مطالعه‌ی حاضر، طی بررسی آنزیم‌های کبدی، همانطور که در نمودارهای ۳ و ۴ آورده شده، افزایش آنزیم‌های ALT و AST در گروه‌های درمان مشاهده شد. همچنین مشاهده شد که با افزایش دوز فرمالدهید، میزان آنزیم‌های کبدی نیز افزایش پیدا کرده‌اند.

Oluwafemi و همکاران در سال ۲۰۲۰ در مطالعه‌ی تاثیر فرمالدهید گازی ۴۰ درصد روی موش‌ها نشان دادند که سطح آنزیم‌های ALT، ALP، AST، کبدی به‌طور محسوسی افزایش یافته بود. همچنین بررسی میکروسکوپی و بافتی کبد رت‌های این گروه، نفوذ سلولی منتشر محیطی به همراه احتقان شدید ناشی از آسیب کبدی را نشان داده است. در شرایط طبیعی، تولید رادیکال‌های اکسیژن آزاد، ناشی از فرآیندهای متابولیکی داخل سلولی بوده و این رادیکال‌ها موجب آسیب اکسیداتیو سلولی با تأثیر بر لیپیدهای غشاء، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شوند. این اثرات مضر بالقوه، بوسیله دفاع آنتی اکسیدانی تنظیم می‌گردد. تصور می‌شود سمیت فرمالدهید بوسیله فعالیت آنزیم‌های ایجادکننده رادیکال آزاد و همچنین بوسیله ممانعت از سیستم‌های برطرف‌کننده رادیکال، واسطه‌گری می‌شود که در نهایت منجر به افزایش تولید ROS می‌گردد. فرمالدهید موجب اختلال در تعادل اکسیدان-آنتی اکسیدان در بافت‌های مختلف شده و موجب استرس اکسیداتیو همراه با آسیب بافتی می‌گردد (Oluwafemi و همکاران، 2020).

نتیجه گیری :

نتایج این مطالعه نشان داد که با افزایش دوز مواجهه با فرمالدهید، میزان آسیب وارده به ریه، کبد و همچنین مغز، بیشتر می‌شود. افزایش درصد نکروز و مرگ نورونی در ناحیه هیپوکمپ مشاهده شده در این مطالعه می‌تواند ناشی از ایجاد استرس اکسیداتیوی که حاصل مواجهه با فرمالدهید است، باشد.

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که مواجهه با فرمالدهید منجر به تخریب ساختاری و آسیب بافت کبدی و از بین رفتن یکپارچگی دیواره آلوئولی و آسیب‌های ریوی موش‌های صحرایی شده که می‌تواند ناشی از افزایش استرس اکسیداتیو بافتی باشد. افزایش استرس اکسیداتیو در بافت می‌تواند ناشی از واسطه‌های شیمیایی سلول‌های التهابی و نفوذ آن‌ها به بافت ریه و در کبد نیز افزایش شاخص‌های عملکرد کبد یعنی افزایش سطح آنزیم‌های کبدی را به دنبال داشته باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله لازم می‌دانند که از کمک‌ها و مشاوره ارائه شده توسط جناب آقای دکتر علی مهدوی و زحمات کارشناسان دانشکده دامپزشکی سمنان خانم رئیس‌بان و آقایان رستمی، تقی زاده و صابری نهایت تشکر را داشته باشند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی در این مقاله شناسایی نکردند.



The histopathological effects of formaldehyde on the lung and brain in the rat animal model

Maddah, S.¹, Yousefi, M.^{2*}, Naeimi, S.², Ghaffari khaligh, S.³

Received: 07.04.2021

Accepted: 19.10.2021

Abstract

Formaldehyde (FA), scientifically known as methanol and known by the chemical formula CH_2O , is a colorless, water-soluble gas whose pure form is a stimulant. Due to the high use of formaldehyde in various industries as well as its high ability to fix and maintain body tissues. Formaldehyde directly reacts with tissue components and its cytotoxicity is probably due to its high reactivity. In this study investigate the toxic effects of formaldehyde on people who deal with this substance regularly, such as anatomists, medical students, and workers in various industries. For this study, 24 adult male Wistar rats were divided into four groups of six. Animals had free access to adequate water and food. After the adaptation period, the animals were divided into the following groups: control group: normal saline recipient by inhalation, group one: 1ppm formaldehyde recipient, group 2: 2ppm formaldehyde recipient, group 3: 3ppm formaldehyde recipient. Exposure time was from 8:30 am to 2:30 pm for six hours a day for seven days. At the end of the exposure, lung, and brain tissue sections were taken, stained, and then studied. Blood samples were also taken from the heart to evaluate liver enzymes. The DG region of the cerebral hippocampus sections showed an increasing trend of neuronal necrosis and degenerative changes of neurons in groups 2 and 3 and pathological changes such as leukocyte infiltration, alveolar wall thickness, and vascular congestion in the lung tissue sections were also significant in groups 2 and 3.

The results of this study indicate a direct relationship between increasing the dose of formalin intake and brain, lung, and liver damage

Key words: Formaldehyde, Lung, Brain, Histopathology, Rat.

1. DVM Student, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran.

2. Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran.

2. Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran.

3. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran.

Corresponding Author: myousefi@semnan.ac.ir

Tulpule K, Dringen R. Formaldehyde in brain: an overlooked player in neurodegeneration? *J Neurochem.* 2013; 127(1), 7-21. doi: org/10.1111/jnc.12356 PMID: 23800365

Gurel A, Coskun O, Armutcu F, Kanter M, Ozen OA. Vitamin E against oxidative damage caused by formaldehyde in frontal cortex and hippocampus: biochemical and histological studies. *J Chem Neuroanat.* 2005; 29(3), 173-178. doi: org/10.1016/j.jchemneu.2005.01.001 PMID: 15820619

Kimbell JS, Overton JH, Subramaniam RP, Schlosser PM, Morgan KT, Conolly RB, Miller FJ. Dosimetry modeling of inhaled formaldehyde: binning nasal flux predictions for quantitative risk assessment. *Toxicol Sci.* 2001; 64(1), 111-121. doi: org/10.1093/toxsci/64.1.111 PMID: 11606807

Costa S, Carvalho S, Costa C, Coelho P, Silva S, Santos LS, ... & Teixeira, JP. Increased levels of chromosomal aberrations and DNA damage in a group of workers exposed to formaldehyde. *Mutagenesis.* 2015; 30(4), 463-473. doi: org/10.1093/mutage/gev002 PMID: 25711496

Peteffi GP, Antunes MV, Carrer C, Valandro ET, Santos S, Glaeser J, ... & Linden R. Environmental and biological monitoring of occupational formaldehyde exposure resulting from the use of products for hair straightening. *Environ Sci Pollut Res.* 2016; 23(1), 908-917. doi: org/10.1007/s11356-015-5343-4 PMID: 26351198

Mehdi AH, Saeed AK, Muhammad S, Hassan A, Salmo NAM, Abdulqadr N. Histopathologic Changes in Rat Organs upon Chronic Exposure to Formaldehyde Vapor. *Basrah J Vet Res.* 2014; 13(2).

Tesfaye S, Hamba N, Gerbi A, Neger Z. Oxidative Stress and Carcinogenic Effect of Formaldehyde Exposure: Systematic Review & Analysis. *Endocrinol. Metab. Syndr.* 2020; 9, 319. doi: 10.35248/2161-1017.20.9.319

Hegazy AA, Elsayed N E, Ahmad MM, Omar NM. Effect of formaldehyde on rat testis structure. *Acad Anat Int,* 2017; 3(2), 15-23. doi: 10.21276/aanat.2017.3.2.4

Zhao H, Cai Y, Yang Z, He D, Shen B. Acidosis leads to neurological disorders through overexciting cortical pyramidal neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 415(2), 224-228. doi: org/10.1016/j.bbrc.2011.08.008 PMID: 21856290

Fang J, Li DH, Yu XQ, Lv MQ, Bai LZ, Du LZ, Zhou DX. Formaldehyde exposure inhibits the expression of mammalian target of rapamycin in rat testis. *Toxicol Ind Health.* 2016 Nov; 32(11):1882-1890. doi: org/10.1177/0748233715592992 PMID: 26229097

Liu X, Zhang Y, Wu R, Ye M, Zhao Y, Kang J, Ma P, Li J, Yang X. Acute formaldehyde exposure induced early Alzheimer-like changes in mouse brain. *Toxicol Mech Methods*. 2018 Feb; 28(2):95-104. doi: org/10.1080/15376516.2017.1368053 PMID: 28812438

Afrin M, Amin T, Karim MR, Islam MR. Effects of formaldehyde intoxication on liver of Swiss albino mice. *IOSR J. Agric. Vet. Sci*, 2016; 9(9), 76-81. doi: 10.9790/2380-0909027681

Coggon D, Harris EC, Poole J, Palmer KT. Extended follow-up of a cohort of British chemical workers exposed to formaldehyde. *J Natl Cancer Inst*. 2003; 95(21), 1608-1615. doi: org/10.1093/jnci/djg046 PMID: 14600093

Stone, R. A., Youk, A. O., Marsh, G. M., Buchanich, J. M., McHenry, M. B., & Smith, T. J. Historical cohort study of US man-made vitreous fiber production workers: IV. Quantitative exposure-response analysis of the nested case-control study of respiratory system cancer. *J Occup Environ Med*. 2001; 779-792. doi: org/10.1097/00043764-200109000-00007 PMID: 11561361

Nogueira MI, Barbieri C, Vieira R, Marques ER, Moreno JEH. A practical device for histological fixative procedures that limits formaldehyde deleterious effects in laboratory environments. *J Neurosci Methods*. 1997; 72(1), 65-70. doi: org/10.1016/s0165-0270(96)00158-6 PMID: 9128170

ASSESSMENT, Exposure. Guidelines for exposure assessment. *Federal Register*, 1992, 57.104: 22888-938.

Saxena P, Sharma A, Gupta A, Chauhan K, Saini M, Singh G. Histological effects of formaldehyde inhalation on the alveolar architecture of lungs of Albino Rats. *J Anat Sci*. 2019; 27(2), 9-15.

Malek FA, Möritz KU, Fanghänel JA. Study on the effect of inhalative formaldehyde exposure on water labyrinth test performance in rats. *Ann Anat*. 2003; 185(3), 277-285. doi: org/10.1016/s0940-9602(03)80040-7 PMID: 12801093

Payani S, Mamatha C, Chandraprakash C, Bhaskar M. Protective role of (Bronco-T) against formaldehyde induced antioxidant, oxidative and histopathological changes in lung of male Wistar rats. *Toxicol Rep*. 2019; 6, 718-726. doi: org/10.1016/j.toxrep.2019.07.002 PMID: 31388499

Murta GL, Campos KKD, Bandeira ACB, Diniz MF, de Paula Costa G, Costa DC, ... & Bezerra FS. Oxidative effects on lung inflammatory response in rats exposed to different concentrations of formaldehyde. *Environ Pollut*. 2016; 211, 206-213. doi: org/10.1016/j.envpol.2015.12.054 PMID: 26774767

Lima L F, Murta G L, Bandeira ACB, Nardeli CR, Lima WG, Bezerra FS. Short-term exposure to formaldehyde promotes oxidative damage and inflammation in the trachea

and diaphragm muscle of adult rats. *Ann Anat.* 2015; 202, 45-51. doi: org/10.1016/j.aanat.2015.08.003 PMID: 26342159

Sapmaz E, Sapmaz HI, Vardi N, Tas U, Sarsilmaz M, Toplu Y, Arici A, Uysal M. Harmful effects of formaldehyde and possible protective effect of *Nigella sativa* on the trachea of rats. *Niger J Clin Pract.* 2017 May;20(5):523-529. doi: org/10.4103/1119-3077.183253 PMID: 28513508

Zararsiz I, Kus I, Akpolat N, Songur A, Ogeturk M, Sarsilmaz M. Protective effects of ω -3 essential fatty acids against formaldehyde-induced neuronal damage in prefrontal cortex of rats. *Cell Biochem Funct.* 2006; 24(3), 237-244. doi: org/10.1002/cbf.1204 PMID: 15648056

Li F, Gong S, Zhang H, Ding S. Learning and memory impairment of mice caused by gaseous formaldehyde. *Environ Res.* 2020; 184, 1-11, 109318. doi: org/10.1016/j.envres.2020.109318 PMID: 32151841

Aslan H, Songur A, Tunc AT, Ozen OA, Bas O, Yagmurca M, ... Kaplan S. Effects of formaldehyde exposure on granule cell number and volume of dentate gyrus: a histopathological and stereological study. *Brain Res.* 2006; 1122(1), 191-200. doi: org/10.1016/j.brainres.2006.09.005 PMID: 17011527

Li Y, Song Z, Ding Y, Xin Y, Wu T, Su T, ... & Lian Z. Effects of formaldehyde exposure on anxiety-like and depression-like behavior, cognition, central levels of glucocorticoid receptor and tyrosine hydroxylase in mice. *Chemosphere.* 2016; 144, 2004-2012. doi: org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.102 PMID: 26551198

Oluwafemi Adetuyi B, Olamide Okeowo T, Adefunke Adetuyi O, Abraham Adebisi O, Ogunlana OO, Janet Oretade O, ... & Batiha GES. *Ganoderma lucidum* from red mushroom attenuates formaldehyde-induced liver damage in experimental male rat model. *Biol.* 2020; 9(10), 313. doi: org/10.3390/biology9100313 PMID: 32992510