

تاثیر هیستوپاتولوژیک بخار فرمالدهید بر کلیه موش صحرایی

سید امیر حسین فاضلی (M.ST.)*

رامین آذر هوش (M.D.)**

علی داوریان (M.ST.)⁺

محمدجعفر گلعلی پور (Ph.D.)***

حنیف هاشم نژاد (M.ST.)*

چکیده

سابقه و هدف: فرمالدهید ماده‌ای شیمیایی است که مصرف گسترده‌ای در تثبیت بافت‌ها و نیز اجساد دارد. فرمالدهید در هنگام تشریح جسد تبخیر و در فضای سالن تشریح منتشر می‌گردد. مشاهدات نشان داده است که این گاز می‌تواند سبب بروز علائم بالینی نظیر سوزش چشم، گلو و بینی، ریزش اشک و خارش به دلیل تحریکات مخاطی گردد. این مطالعه به منظور تعیین تغییرات آسیب شناسی بافت کلیه موش‌های صحرایی (Rat) که به مدت ۱۸ هفته در معرض بخار فرمالدهید قرار گرفتند، طراحی شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه بر روی ۲۸ سر موش صحرایی نر از نژاد Albino Wistar با سن ۸-۶ هفته انجام شد. این حیوانات به طور تصادفی (براساس زمان مواجهه) و به طور کاملاً مساوی به سه گروه آزمایشی شامل گروه E1 (۴ روز در هفته روزی ۴ ساعت)، گروه E2 (۴ روز در هفته روزی ۲ ساعت) و گروه E3 (۲ روز در هفته روزی ۲ ساعت) و یک گروه شاهد C (بدون مواجهه) تقسیم شدند. موش‌های گروه‌های مورد به مدت ۱۸ هفته در معرض ۱ تا ۱/۹ ppm بخار فرمالدهید قرار گرفتند. در پایان ۱۸ هفته، تمام موش‌های گروه‌های مورد و شاهد تحت بی‌هوشی کشته شدند. از نمونه‌های بافت کلیه پس از تثبیت و قالب‌گیری، مقاطع بافتی به ضخامت ۵µm تهیه گردید. تمام مقاطع با اتوزین و هماتوکسیلین (H&E) رنگ‌آمیزی و با ذره بین نوری بررسی شدند.

یافته‌ها: تمام لام‌های گروه‌های E3, E2, E1 تغییرات زیر به طور مشترک دیده شد: در گلوبول‌ها فقط مختصری احتقان دیده شد که اختصاصی نمی‌باشد. در توبول‌های گروه‌های E1, E2 و E3، تغییرات انحطاطی (Degenerative) به صورت احتقان کانونی و انحطاط حفره‌ای سلول‌های لوله‌ای مشاهده شد. در بافت بینابینی تغییرات حاکی از فیروز و ارتشاح سلول‌های التهابی دیده نشد. در عروق کلیوی احتقان خفیف غیر اختصاصی مشاهده گردید. همچنین در رنگ‌پذیری هستک و سیتوپلاسم هیچگونه ناهنجاری دیده نشد. در گروه شاهد هیچگونه تغییرات آسیب‌شناسی بافتی مشاهده نگردید.

استنتاج: مواجهه با غلظت ۱ تا ۱/۹ ppm از بخار فرمالدهید موجب تغییرات خفیف و غیر اختصاصی به شکل احتقان گلوبولی و عروقی و نیز انحطاط حفره‌ای خفیف در سلول‌های لوله‌ای و نیز خونریزی پارانشیمال (انترستیسیل) می‌شود.

واژه‌های کلیدی: فرمالدهید، تغییرات هیستوپاتولوژیک، کلیه، موش صحرایی

* دانشجوی سال پنجم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان

✉ موله مسئول: گرگان- کیلومتر ۲ جاده گرگان به ساری، دانشکده پزشکی گرگان (بنیاد فلسفی)، گروه علوم تشریحی
Email: alidavarian@gmail.com

** متخصص پاتولوژی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی گیلان

*** متخصص علوم تشریحی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی گیلان

تاریخ تصویب: ۸۵/۶/۲۹

تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۵/۳/۲۰

تاریخ دریافت: ۸۴/۱۱/۱۵

مقدمه

فرمالدهید (CH_2O) با وزن ملکولی $30/03$ و بوی تند یک واکنش دهنده بی‌رنگ و قابل اشتعال است که در دما و فشار معمولی اتاق به سرعت پلیمریزه می‌شود. فرمالدهید در آب، اتانل و دی‌اتیل‌اتر قابل حل است و به شکل پلیمریزه (پارافرمالدهید) مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱).

فرمالدهید در هوا، به سرعت توسط نور خورشید اکسید شده و تولید دی‌اکسید کربن (CO_2) می‌نماید. نیمه عمر این ماده در غیاب دی‌اکسید نیتروژن (N_2O) در جو، تقریباً ۵۰ دقیقه در طی روز می‌باشد که در حضور N_2O ، این مدت به ۳۵ دقیقه کاهش می‌یابد (۱). گرچه منابع متفاوتی از فرمالدهید وجود دارد، اصلی‌ترین منبع تماس که بر انسان مؤثر می‌باشد، محیط‌های بسته (indoor) است. منابع تماسی دیگر شامل انتشار مستقیم به خصوص در فرایند تولید و استفاده از فرمالدهید می‌باشد (۱).

قابلیت‌هایی چون عمل کردن به عنوان یک ذره الکتروفیل و واکنش با ملکول‌های بزرگ و ایجاد پیوندهای متقاطع (Cross-Links) غیرقابل برگشت (۲)، فرمالدهید را به عنوان تثبیت کننده بافت‌ها در مطالعات بافتی و آسیب‌شناسی و در تثبیت اجساد مرسوم ساخته است.

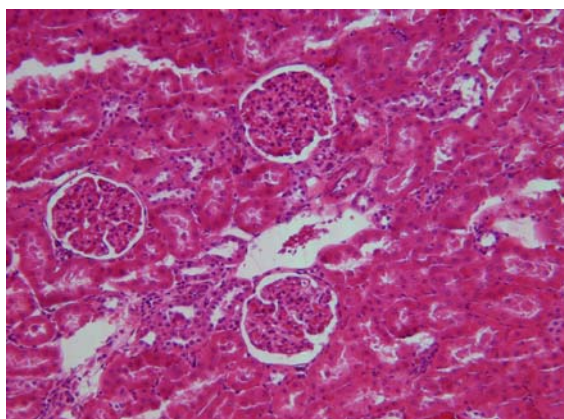
مواجهه حاد با بخار فرمالدهید به طور عمده سبب سوزش مخاط چشم و دستگاه تنفسی فوقانی در انسان می‌شود (۳). این در حالی است که مواجهه با این بخار برای یک دوره طولانی منجر به ایجاد تغییرات بافت شناسی و حتی تومور بینی در جوندگان شده است (۴، ۵). فرمالدهید همچنین سبب اختلال در عملکرد ریوی (۶)، تحریک و ایجاد واکنش‌های آسماتیک در افراد حساس می‌شود (۷، ۸).

در طی تشریح جسد، اساتید بخش تشریح و دانشجویان رشته پزشکی در معرض بخار فرمالدهید موجود در فضای سالن تشریح (ناشی از تبخیر ماده تثبیت کننده اجساد) قرار می‌گیرند. از این رو این مطالعه به منظور بررسی تغییرات آسیب شناسی ناشی از مواجهه با بخار فرمالدهید در بافت کلیه و نیز تعیین ارتباط این تغییرات با مدت مواجهه، بر روی موش‌های صحرایی انجام شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه بر روی ۲۸ سر موش صحرایی ۶-۸ هفته‌ای از نژاد Albino Wistar، تهیه شده از انستیتو پاستور ایران، انجام گرفت. موش‌ها، به طور تصادفی و به تعداد مساوی، براساس تفاوت در میزان ساعات مواجهه با بخار فرمالدهید، در سه گروه مورد آزمایش به صورت: مورد ۱ یا E1 (۴ روز مواجهه در هفته، روزی ۴ ساعت)، مورد ۲ یا E2 (۴ روز مواجهه در هفته، روزی ۲ ساعت) و مورد ۳ یا E3 (۲ روز مواجهه در هفته، روزی ۲ ساعت) و یک گروه شاهد (بدون مواجهه) تقسیم شدند. وزن هر یک از گروه‌ها با ترازوی دیجیتال سنجیده شد و میانگین‌های ۲۵۲ گرم برای گروه E1، ۲۰۹ گرم برای گروه E2، ۲۲۲ گرم برای گروه E3 و ۱۹۵ گرم برای گروه شاهد به دست آمد. میانگین غلظت بخار فرمالدهید موجود در سالن تشریح (محل مواجهه گروه‌های مورد با بخار)، پس از برداشتن پوشش اجساد به وسیله لوله جست و جوگر (Detector tube) و پمپ کشنده (Drager) مدل ۳۱ ساخت کشور آلمان در ابتدا، میانه و انتهای مطالعه مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. غلظت بخار بین ۱ تا $1/9$ ppm بود. دمای سالن ۲۰ تا ۲۶ درجه سانتی‌گراد و فشار هوای داخل سالن نیز ۷۶۳-۷۶۰ (atm) بود.

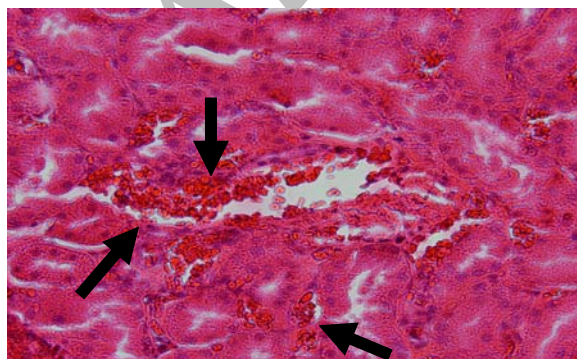
در گلومرول‌ها فقط کمی احتقان دیده شد که اختصاصی نمی‌باشد. در لوله‌های گروه‌های E3, E2, E1 تغییرات ایجاد شده شامل: احتقان کانونی و انحطاط حفره‌ای سلول‌های لوله‌ای بود. در بافت بینابینی تغییرات حاکی از فیروز وارثناح سلول‌های التهابی دیده نشد، ولی خونریزی پارانشیمی دیده شد که به شکل خونریزی بینابینی (Interstitial) بود. در عروق کلیوی احتقان خفیف غیراختصاصی مشاهده گردید. همچنین در رنگ‌پذیری هستک و سیتوپلاسم هیچ‌گونه یافته غیرطبیعی دیده نشد. در گروه شاهد هیچ‌گونه تغییرات آسیب شناسی بافتی مشاهده نگردید. (تصاویر ۱ تا ۵)



(C)

400X

H&E



E1

400X

H&E

تمامی گروه‌ها در ساعات غیر مواجهه، در اتاق مخصوص نگهداری حیوانات آزمایشگاهی، به دور از محل مواجهه که در آن، غلظت بخار فرمالدهید صفر ppm و حرارت ۲۰-۲۲ درجه سانتیگراد بود، تحت شرایط نور کافی و تهویه مناسب نگهداری می‌شدند. رژیم غذایی تمامی گروه‌ها یکسان بود که در دو نوبت صبح و عصر در اختیار آنها قرار می‌گرفت. کلیه گروه‌ها، آب مورد نیاز خود را به صورت ۲۴ ساعته آزادانه در اختیار داشتند.

قفس‌های گروه‌های مورد، به مدت ۱۸ هفته و بر اساس زمان‌بندی یاد شده، هر بار، بر روی میزی در ارتفاعی هم سطح میز حامل اجساد و به فاصله ۱۵ سانتی‌متری از آنها قرار داده می‌شد. در هنگام هر نوبت مواجهه‌ی گروه‌های مورد، گروه شاهد در اتاق مخصوص نگهداری حیوانات آزمایشگاهی قرار داشت.

پس از اتمام مدت مواجهه، هریک از موش‌های گروه‌های شاهد و مورد با کلروفورم بی‌هوش شدند و پس از نخاعی کردن به طریق در رفتگی گردن (Cervical Dislocation)، جدار شکم باز شد و پس از خارج کردن کلیه سمت چپ، نمونه‌هایی به ابعاد ۴ × ۴ میلی‌متر جدا گردید و به مدت ۴۸ ساعت به منظور ثابت شدن در محلول بافر فرمالدهید قرار داده شد. پس از عبور بافتی و قالب‌گیری پارافینی، ۱۰ برش از هر نمونه با ضخامت ۵ میکرومتر تهیه گردید. برش‌ها پس از رنگ‌آمیزی با روش H&E توسط ذره بین نوری Olympus در درشت‌نمایی‌های ۱۰۰×، ۲۰۰× و ۴۰۰× مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها

در تمام لام‌های گروه‌های E3, E2, E1 تغییرات غیر اختصاصی زیر به طور مشترک دیده شد:

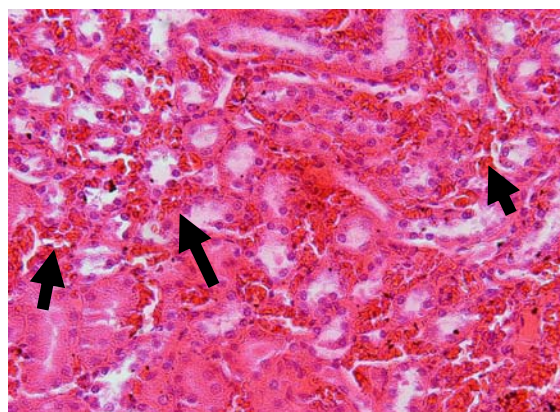
بحث

در این مطالعه، باتوجه به این که مقدار بخار فرمالدهید در حد میزان بخار موجود در سالن تشریح و مدت مواجهه نیز بر اساس زمان مواجهه استفاده کنندگان از این سالن (اساتید و دانشجویان) طراحی و طی مدت ۱۸ هفته اجرا شده است، تغییرات آسیب شناسی بافتی اختصاصی در ساختار بافت کلیه موش‌های گروه‌های مورد مشاهده نگردید. هرچند که این نتایج با نتایج به دست آمده در مطالعات دیگران که حاکی از عدم تغییرات بافت کلیه در اثر مواجهه با بخار فرمالدهید با میزان و مدت مواجهه‌ای مشابه با مطالعه ماست، همخوانی دارد، لکن مطالعات دیگری که بر روی مواجهه خوراکی با فرمالدهید انجام شده، حاکی از تغییرات شدید آسیب-شناسی در بافت کلیه گروه‌های مورد آزمایش بوده است.

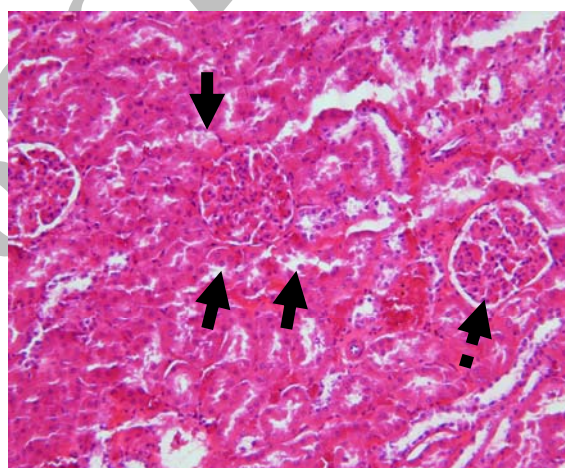
در مطالعه‌ای که توسط انجمن بهداشت صنعتی آمریکا (AIHA) در سال ۱۹۸۳ انجام گرفت، موش‌ها به صورت ۶ ساعت در روز، ۵ روز در هفته و به مدت ۴ هفته در معرض ۳ ppm بخار فرمالدهید قرار گرفتند که در این مدت هیچ اثری در کلیه‌ها دیده نشد (۵).

در مطالعه "دوبرویل" و همکاران در سال ۱۹۷۶ بر روی موش صحرایی، مواجهه آنها با بخار فرمالدهید با غلظت ۱/۶ ppm به صورت ۲۲ ساعت در روز برای مدت ۹۰ روز هیچ اثری در کلیه ایجاد نکرد (۹).

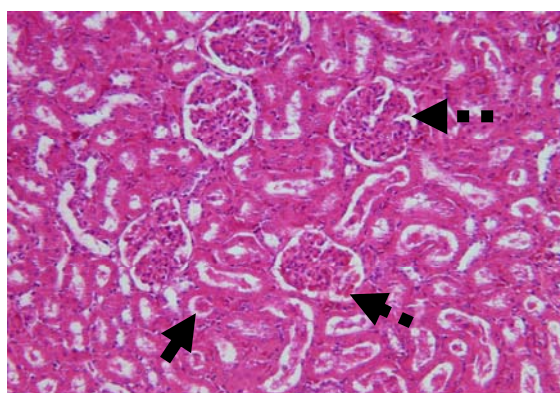
"راش" و همکاران نیز در سال ۱۹۸۳ با در معرض قرار دادن موش‌ها با بخار فرمالدهید با غلظت ۱ ppm به صورت ۲۲ ساعت در روز، ۷ روز در هفته و به مدت ۲۶ هفته، هیچ اثر آسیب‌شناسی در کلیه مشاهده نکردند (۱۰). ویلمر^۳ و همکاران در سال ۱۹۸۶ با مطالعه بر روی موش‌ها که به صورت ۸ ساعت در روز، ۵ روز در هفته



E1 :
400X H&E



E2 :
400X H&E



E3 :
400X H&E

1. Dubreuil
2. Rusch
3. Wilmer

و به مدت ۴ هفته در معرض ppm ۲۰ و ۱۰ بخار فرمالدهید قرار گرفته بودند، که این مقدار بسیار فراتر از مقدار مورد مطالعه ما بود، هیچ اثری در بافت کلیه مشاهده نکردند (۱۱).

وترسن و همکاران در سال ۱۹۸۷ با مواجهه موش‌ها با غلظت‌های ppm ۱۰، ۱ و ۲۰ به صورت ۶ ساعت در روز، ۵ روز در هفته به مدت ۱۳ هفته، تنها در گروه‌های ppm ۱۰ و ۲۰ آسیب مشاهده کردند (۱۲).

ویلمر و همکاران نیز در سال ۱۹۸۹ با طراحی یک مطالعه ۱۳ هفته‌ای بر روی موش‌های نر، آنها را بصورت ۸ ساعت در روز، ۵ روز در هفته در مواجهه با غلظت‌های ppm ۱۰ و ۲ بخار فرمالدهید قرار دادند که تغییرات مشاهده شده فقط در سیستم تنفسی موش‌ها بوده است. از سویی آنها با طراحی مطالعه‌ای ۱۳ هفته‌ای دیگر که موش‌ها به طور متناوب (به فواصل ۳۰ دقیقه مواجهه، ۳۰ دقیقه استراحت) به مدت ۴ ساعت در روز در مواجهه با ppm ۴ و ۲ بخار فرمالدهید قرار می‌گرفتند و مقایسه نتایج این مطالعه با مطالعه قبلی شان به این نتیجه رسیدند که عامل اصلی تعیین‌کننده شدت اثرات مسمومیت سلولی فرمالدهید، غلظت بخار فرمالدهید می‌باشد و مقدار تجمعی (مقدار $\times$ مدت زمان مواجهه) نقش کمتری را در این زمینه ایفا می‌کند (۱۳).

همان‌طور که قبلاً نیز ذکر شد، نتایج حاصل از مطالعات دیگری که بر روی مواجهه خوراکی با فرمالدهید انجام شده، حاکی از تغییرات آسیب‌شناسی اختصاصی در بافت کلیه گروه‌های مورد آزمایش بوده است. شدت این تغییرات بافتی در اثر مواجهه با این ماده، همان‌طوری که قبلاً نیز ذکر شده، وابسته به مقدار و مدت مواجهه می‌باشد (۱۴، ۱۵). با بررسی کینتیک فرمالدهید در بدن انسان و توجه به متابولیسم سریع آن

در کم‌تر از ۱/۵ دقیقه در داخل سرم (۱۶)، می‌توان چنین فرض کرد که احتمالاً اثرات مسمومیت سلولی فرمالدهید ناشی از متابولیت عمده آن یعنی اسید فرمیک می‌باشد. دفع اسید فرمیک از دو راه عمده‌ی متابولیزه شدن در کبد و دیگری ترشح در ادرار صورت می‌گیرد. از آنجا که متابولیسم اسید فرمیک در کبد از درجه‌ی اول و اشباع پذیر است، مواجهه با مقدار معینی از فرمالدهید و در نتیجه اسید فرمیک می‌تواند آنزیم‌های مذکور را اشباع نماید. بنابراین مواجهه با مقادیر بالاتر فرمالدهید باعث افزایش غلظت اسید فرمیک در سلول‌های کبدی و به تبع آن در پلاسما خواهد شد.

افزایش غلظت پلاسمایی اسید فرمیک باعث ایجاد اسیدوز متابولیک اولیه و در نهایت ایجاد اسیدوز سیستمیک خواهد شد که نتیجه آن ترشح کلیوی اسید فرمیک خواهد بود (۱۶). از سوی دیگر خود اسید فرمیک، سیتوکروم اکسیداز و چرخه‌ی تنفسی سلول را مهار کرده و با افزایش تنفس بی‌هوازی، موجب تولید اسید لاکتیک خواهد شد که این وضعیت نیز سبب کاهش ترشح اسید فرمیک به درون توبول‌های کلیوی می‌گردد (۱۷) و افزایش غلظت داخل سلول‌های کلیوی و سرمی آن را در پی خواهد داشت. بنابراین مواجهه با فرمالدهید در غلظت‌های بالا، سبب افزایش غلظت اسید فرمیک و در نتیجه ایجاد اثرات مسمومیت سلولی بر بافت کلیه خواهد شد.

با توجه به یافته‌های این مطالعه و مقایسه آن با نتایج سایر مطالعات، می‌توان چنین برداشت کرد که مواجهه با بخار فرمالدهید در غلظت و مدت مشابه مطالعه ما احتمالاً نمی‌تواند اثرات آسیب‌شناسی بافتی اختصاصی که قابل مشاهده با ذره بین نوری باشد در بافت کلیه موش صحرائی ایجاد کند. از سوی دیگر تغییرات غیر

1. Woutersen
2. Rusch
3. Wilmer

محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی گلستان به خاطر تصویب و حمایت مالی طرح، آقای مهندس مولودی، خانم شیرین ایرانی و کارکنان بخش آسیب شناسی بیمارستان دزیانی گران به خاطر همکاری صمیمانه اعلام می‌نمایند. همچنین از جناب آقای پرفسور بلداجی و سرکار خانم عذرا شیرین بیک مهاجر به خاطر راهنمایی‌های ارزنده سپاس ویژه اعلام می‌گردد.

اختصاصی ایجاد شده، در تمام گروه‌های مورد مواجهه تقریباً مشابه بوده است؛ بنابراین می‌توان گفت که احتمالاً شدت اثرات ایجاد شده ارتباط مستقیمی با مدت زمان مواجهه ندارد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله مراتب تشکر خود را از معاون

فهرست منابع

1. World Health Organization, Geneva. Formaldehyde, *Environ. Helth Crit.* 1998; 89: 218.
2. International Agency for research on cancer, Lyon. Wood dust and formaldehyde. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. *IARC.* 1995; 62: 217-362.
3. <http://www.epa.gov/ttn/uatw/hlthef/formaldehyde.html>.
4. Monticello TM, Swenberg JA, Gross EA, Leininger JR, Kimbell JS, Seilkop S, et al. Correlation of regional and nonlinear formaldehyde induced nasal cancer with proliferating populations of cells. *Cancer Res.* 1996; 56 (5): 1012-1022.
5. AIHA, Industrial hygiene news report, Chicago, Illinois, *Ame. Ind. Hygiene Assoc.* 1983.
6. Berstein RS, Staynedr LT, Elliott LJ, Kimbrough R. Inhalation exposure to formaldehyde: An overview of its toxicology, epidemiology, monitoring and control. *Am. Ind. Hyg. Assoc J.* 1984; 45: 778-785.
7. Burge PS, Harries MG, Lam WK, O'Brien IM, Patchett PA. Occupational asthma due to formaldehyde. *Thorax.* 1985; 40(4): 255-260.
8. Gorski P, Krokowiak A. Formaldehyde induced bronchial asthma-Does it really exist? *Polish. J. Occup. M.* 1991; 4(4): 317-320.
9. Dubreuil A, Bouley G, Godin J, Boudene C.J. Inhalation en continu de faibles doses de formaldehyde. Etude expérimentale chez le rat. *Eur. Toxicol.* 1976; 9: 245-250.
10. Rusch GM, Clary JJ, Rinehart WE, & Bolte HF. A 26-week inhalation toxicity study with formaldehyde in the monkey, rat, and hamster. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1983; 68: 329-343.

11. Wilmer JW, Woutersen RA, Appelman LM, Falke HE, Feron VJ. Subacute (4-week) inhalation toxicity study of formaldehyde in male rats: 8-hour intermittent versus 8-h continuous exposures. *J. Appl. Toxicol.* 1987; 7(1): 15-6.
12. Woutersen RA, Appelman LM, Wilmer JW, Falke HE, Feron VJ. Subchronic (13-week) inhalation toxicity study of formaldehyde in rats. *J Appl Toxicol.* 1987; 7(1): 43-9.
13. Wilmer JW, Woutersen RA, Appleman LM, Leeman WR, Feron VJ. Subchronic (13-week) inhalation toxicity study of formaldehyde in male rats: 8-hour continuous versus 8-hour intermittent exposures. *Toxicol Lett.* 1989; 47(3): 287-93.
14. Johannsen F.R, Levinskas G.J, Tegeris A.S. Effects offormaldehyde in the rat and dog following oral exposure. *Toxicol. Lett.* 1986; 30: 1-6.
15. Til H.P, Woutersen R.A, Feron V.J, Hollanders V.H.M, Falke H.E. Two-year drinking-water study of formaldehyde in rats. Food Chem. *Toxicol.* 1989; 27(2): 77-87.
16. Richard C, Dart, *Medical toxicology*, Third Edition, Lippincot Williams & Wilkins, USA. 2004; P: 1246, 1299.
17. Davarian A, Fazeli SA, Azarhoush R, Golalipour MJ. Histopathologic changes of rat tracheal mucosa following formaldehyde exposure. *Int. J. Morphol.* 2005; 23(4): 369-372.