

تأثیر هیستوپاتولوژیک بخار فرمالدهید بر کبد موش صحرایی

© علی داوریان*، سیدامیر حسین فاضلی*، محمدجعفر گلعلی پور*، رامین آذرهوش**، حانیه خراشادی زاده*، سمیه سدنی*

* گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گلستان

** گروه پاتولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گلستان

تاریخ وصول: شهریورماه ۸۴، تاریخ پذیرش: آذرماه ۸۴

چکیده

هدف: بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیک کبد موش صحرایی (RAT) پس از قرار گیری در معرض بخار فرمالدهید
مواد و روشها: این مطالعه که یک تحقیق تجربی است، روی ۲۸ سر رت از نژاد Albino wistar با سن ۷ هفته انجام شد. این حیوانات به طور تصادفی (بر اساس زمان مواجهه) و به طور کاملاً مساوی به سه گروه آزمایشی شامل: E1 (دو روز در هفته روزی دو ساعت)، گروه E2 (چهار روز در هفته روزی دو ساعت)، E3 (چهار روز در هفته روزی چهار ساعت) و یک گروه شاهد (بدون مواجهه) تقسیم شدند. رت‌های گروه‌های شاهد و آزمایشی پس از پایان ۱۸ هفته تحت بیهوشی کشته شدند. از نمونه‌های کبد پس از تثبیت و قالب گیری، مقاطع بافتی به ضخامت ۵ میکرو متر تهیه شد. مقاطع با روش H&E رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری بررسی شد.

یافته‌ها: در گروه E3 برخی از سلول‌ها ائوزینوفیلی سیتوپلاسم و نمای oncocyte پیدا کردند و در تعدادی نیز به صورت فوکال نمای ground glass (شیشه مات) ایجاد شد. اتساع سینوزوئیدها و شریان موجود در فضای پورت نیز دیده شد. در گروه E2 نیز دیلاتاسیون سینوزوئیدها و احتقان و در گروه E1، انفیلتراسیون سلولهای تک هسته ای در فضای پورت ورژنراسیون هپاتوسیتها در فضای پری پورتال دیده شد.

نتیجه گیری: اگرچه بخار فرمالدهید در غلظت و شرایط موجود در این مطالعه باعث ایجاد تغییرات هیستوپاتولوژیک در بافت کبد موشهای صحرایی می‌شود اما، احتمالاً شدت تغییرات هیستوپاتولوژیک ناشی از مواجهه با بخار فرمالدهید در این غلظت ارتباط معنا داری با زمان مواجهه ندارد.

کلیدواژه‌ها: فرمالدهید، کبد، تغییرات هیستوپاتولوژیک، زمان مواجهه، موش صحرایی (رت)

مقدمه

این گاز با وزن مولکولی $30.03 \frac{g}{mol}$ و نقطه جوش

قابلیتهایی چون عمل کردن به عنوان یک ذره الکتروفیل و

19.1° سانتی گراد و نقطه ذوب 92° سانتی گراد، دارای فشار

220 کیلوپاسکال در صفر درجه سانتی گراد است [۳].

فرمالدهید (HCHO) گازی است بی رنگ با بوی تند و تراکم

نسبی $1/0.4$ (هوا = ۱) که در 25° سانتی گراد بیشترین انحلال

را در آب دارا است [۱ و ۲].

© آدرس مکاتبه: گرگان، کیلومتر ۲ جاده گرگان به ساری، دانشکده پزشکی

گرگان (بنیاد فلسفی)، گروه علوم تشریح Email: alidavarian@gmail.com

طراحی و روی موشهای صحرایی (رت) انجام شد.

مواد و روشها

این مطالعه روی ۲۸ سر رت ۷ هفته ای از نژاد Albino wistar تهیه شده از انستیتو پاستور ایران انجام گرفت. رتها به طور تصادفی و به تعداد مساوی، بر اساس تفاوت در میزان ساعات مواجهه با بخار فرمالدهید در سه گروه مورد آزمایش به صورت: گروه E1 (دو روز در هفته روزی دو ساعت) گروه E2 (۴ روز در هفته روزی ۲ ساعت) گروه E3 (۴ روز در هفته روزی ۴ ساعت) و یک گروه شاهد (C) (بدون مواجهه) تقسیم شدند (اعداد داخل پرانتز نشانگر ساعات مواجهه است). وزن فرمالدهید هر یک از گروهها با ترازوی دیجیتال و به صورت میانگینهای ۲۵۲ گرم برای گروه E3، ۲۰۹ گرم برای گروه E2، ۲۲۲ گرم برای گروه E1 و ۱۹۵ گرم برای گروه شاهد بود. میانگین غلظت بخار فرمالدهید موجود در سالن تشریح (محل مواجهه گروههای مورد با بخار) پس از برداشتن پوشش اجساد به وسیله DETECTOR TUBE و پمپ DRAGER مدل ۳۱ ساخت کشور آلمان در ابتدا اواسط و انتهای مطالعه اندازه گیری شد.

غلظت بخار در حالت تهویه روشن ppm ۱/۱۵-۱ و در حال تهویه خاموش ppm ۱/۵ تا ۱/۹ بود. دمای سالن ۲۰ تا ۲۶ درجه سانتی گراد و فشار هوای داخل سالن نیز ۷۶۰-۷۶۳ بود.

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 تا ۲۲° سانتی گراد بود، تحت شرایط نور کافی و تهویه مناسب نگهداری می شدند. رژیم غذایی تمامی گروهها یکسان بود که در دو نوبت صبح و عصر در اختیار آنها قرار می گرفت. کلیه گروهها آب مورد نیاز خود را به صورت ۲۴ ساعته در اختیار داشتند.

قفسهای گروههای آزمایشی به مدت ۱۸ هفته و بر اساس زمان بندی یاد شده هر بار روی میزی در ارتفاعی هم سطح اجساد و به فاصله ۱۵ سانتی متری از آنها قرار داده می شد.

واکنش با مولکولهای بزرگ و ایجاد پیوندهای متقاطع (CROSS-LINKS) غیر قابل برگشت، فرمالدهید را به عنوان یک تثبیت کننده بافتها در مطالعات بافتی و آسیب شناسی و در تثبیت اجساد مرسوم ساخته است [۴].

منابع حاوی فرمالدهید شامل سیگار، مواد قابل احتراق، الیاف بافتنی، پوشاک و پلاستیک، رزین، مواد آرایشی و بهداشتی و مواد ضد عفونی کننده است [۵].

فرمالدهید این ماده نسبتاً ارزان در ساخت بسیاری از مواد مصرفی نظیر لوله های PVC، قرقه، زیپ، شانه، ظروف ملامین، پروتزیهای دندان، نئوپان استفاده می شود و به دلیل ثابت نبودن ساختمان مولکولی آن به آهستگی تبخیر و در هوا متصاعد می شود [۶].

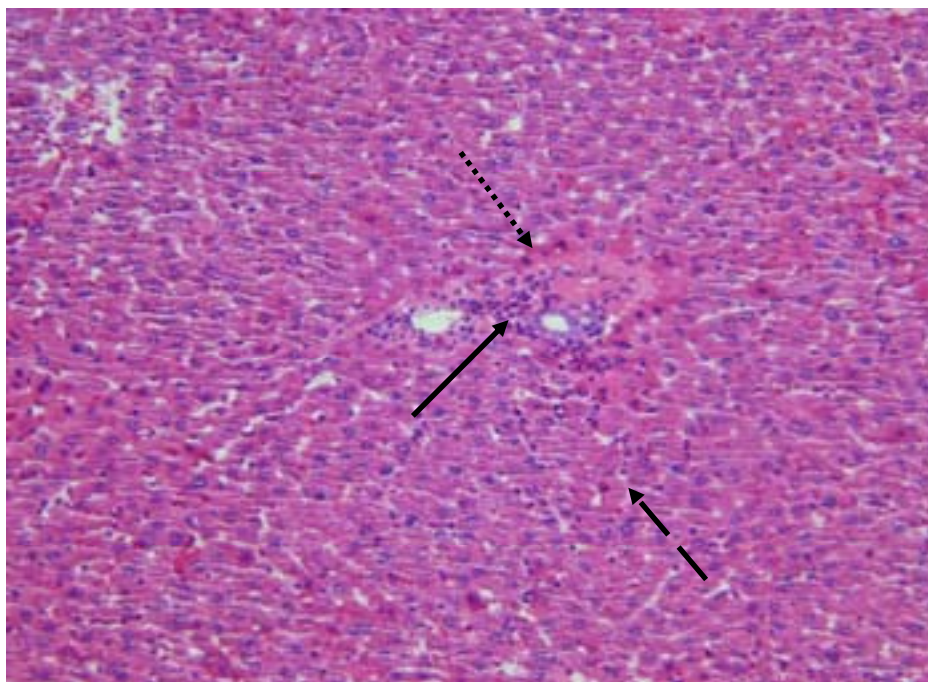
مواجهه حاد با بخار فرمالدهید به طور عمده سبب سوزش مخاط چشم و دستگاه تنفسی فوقانی در انسان می شود [۷]. این در حالی است که مواجهه با این بخار برای یک دوره طولانی تر به ایجاد تغییرات هیستوپاتولوژیک در مخاط تنفسی و نیز ایجاد تومور بینی در جوندگان منجر شده است [۸ و ۹]. فرمالدهید همچنین سبب اختلال در عملکرد ریوی [۱۰]، تحریک و ایجاد واکنشهای آسماتیک در افراد حساس می شود [۷ و ۱۱].

بخار فرمالدهید از راه پوست - دهان و تنفس جذب می شود و به سرعت توسط آنزیم فرمالدهید دهیدروژناز موجود در کبد و ایتروسیتهها متابولیزه شده و متابولیت آن یعنی اسید فورمیک، توسط جریان خون به اکثر جاهای بدن برده می شود [۱۲]. دفع ۸۲ درصد از آن از طریق CO₂ به هوا و ۱۳-۱۴ درصد بقیه به صورت اسید فورمیک از راه ادرار است [۱۳].

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 کاداور) قرار می گیرند. بنابراین به منظور بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیک احتمالی در بافت کبد ناشی از مواجهه با بخار فرمالدهید در سالن تشریح و نیز تعیین ارتباط این تغییرات با مدت مواجهه، مطالعه حاضر

یافته‌های هیستوپاتولوژیک در گروه E1 (کمترین مواجهه) شامل انفیلتراسیون خفیف سلولهای تک هسته‌ای در فضای پورت به همراه ارتشاحی از لنفوسیتها در ناحیه اینترا آسینار بود که به نفع هپاتیت لوبولار است. تعدادی از هپاتوسیتها خصوصا در ناحیه پری پورتال، شواهدی از رژنراسیون را نشان می‌دهند (شکل ۱).

هنگام هر نوبت مواجهه گروههای آزمایشی گروه شاهد در اتاق مخصوص نگهداری حیوانات آزمایشگاهی قرار داشت. پس از اتمام مدت مواجهه هر یک از رتهای گروههای شاهد و آزمایشی با کلرو فرم بیهوش شدند و پس از نخاعی کردن به طریق cervical dislocation جدار شکم باز و تمام بافت کبد بیرون آورده شد. سپس از هر کبد نمونه ای به ابعاد



شکل ۱ گروه آزمایشی ۱. رنگ آمیزی: H&E، بزرگنمایی: ۱۰۰×

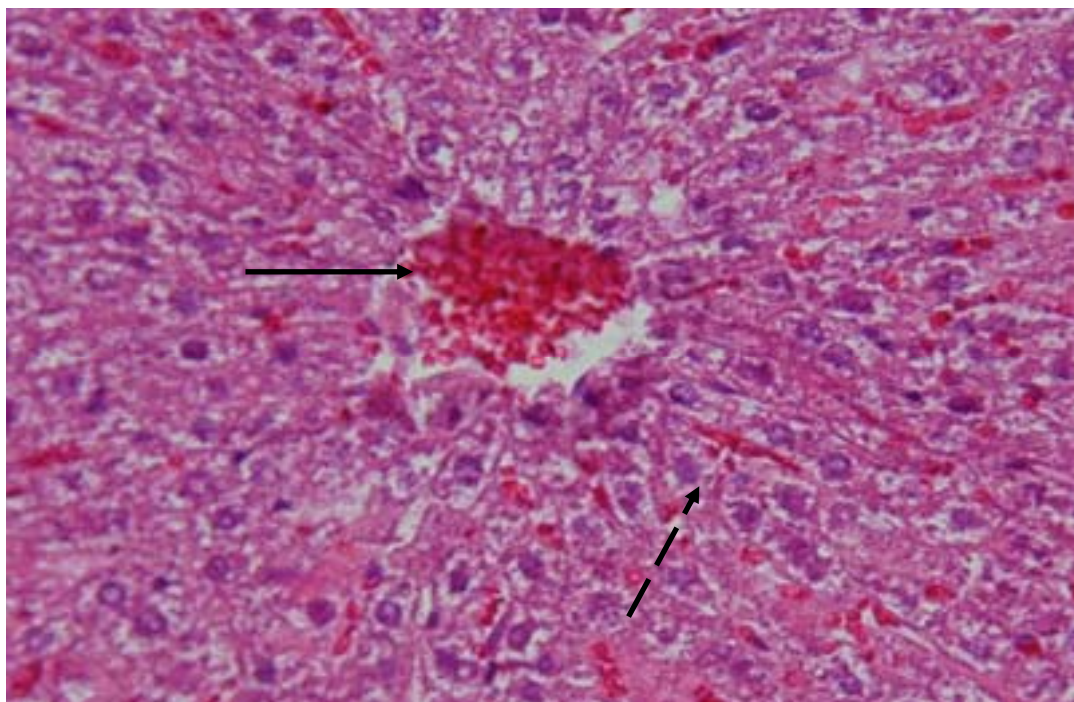
انفیلتراسیون خفیف سلولهای تک هسته‌ای در فضای پورت —————→
 به همراه ارتشاحی از لنفوسیتها در ناحیه اینترا آسینار —————→
 شواهدی از رژنراسیون در تعدادی از هپاتوسیتها→

در گروه E2 دیلاتاسیون و احتقان سینوزوئیدها و ورید مرکز لبولی دیده شد که این گشاد شدگی در برخی موارد شدید تر بوده و به ندرت اتساع شبه کیستیک را به خود گرفته بود (شکل ۲)

در گروه E3 تعدادی از سلولها به صورت focal نمای ground- glass (شیشه مات) پیدا کرده و سینوزوئیدها اتساع و احتقان مختصری داشتند (شکل ۳).

۲ در ۴ در ۴ میلی متر جدا شد و به مدت ۴۸ ساعت به منظور ثابت شدن در محلول بافر فرمالین قرار داده شد. پس از پاساژ بافتی و قالب گیری پارافینی، ۱۰ تا ۱۲ برش از هر نمونه با ضخامت ۵ میکرو متر تهیه شد. برشها پس از رنگ آمیزی با روش H&E توسط میکروسکوپ نوری Olympus در درشت نمایهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ بررسی شدند.

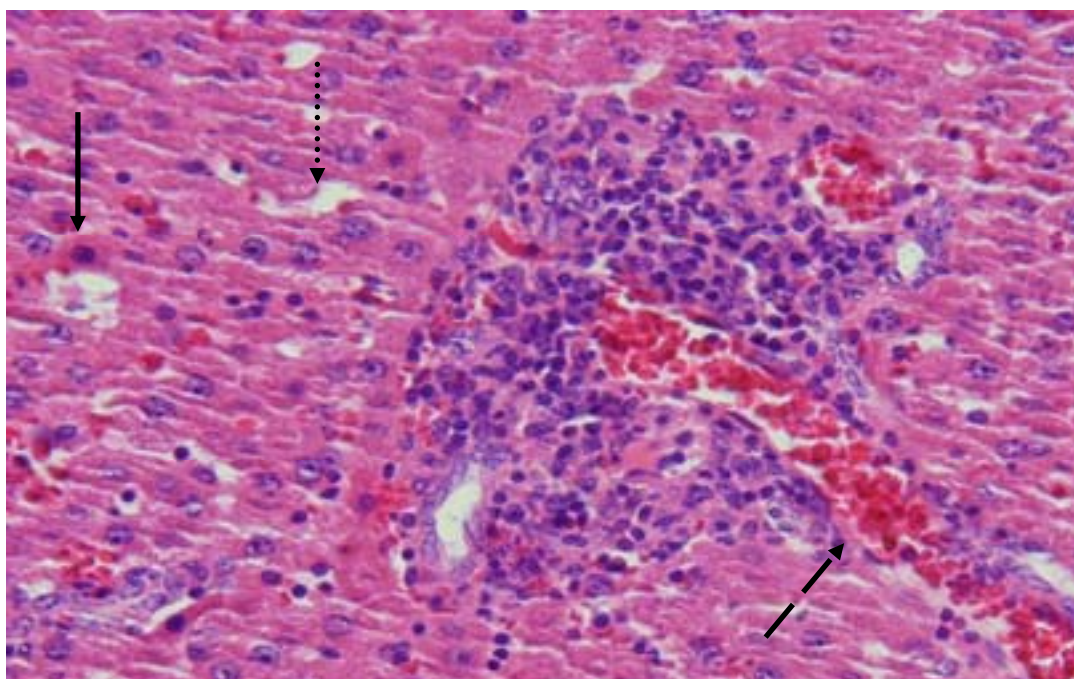
یافته‌ها



شکل ۲ گروه آزمایشی ۲. رنگ آمیزی H&E، بزرگنمایی ۴۰۰×

دیلاتاسیون و احتقان ورید مرکز لبولی →

دیلاتاسیون و احتقان سینوزوئیدها — — →



شکل ۳ گروه آزمایشی ۳. رنگ آمیزی H&E، بزرگنمایی ۴۰۰×

اتساع سینوزوئیدها →

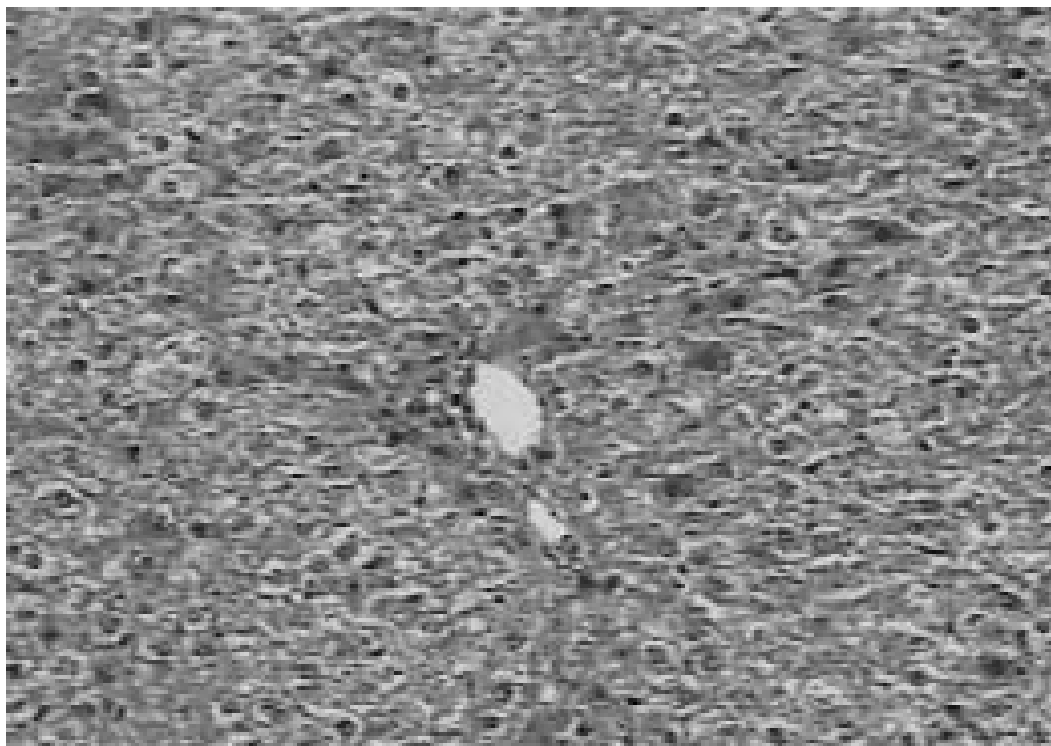
احتقان ورید مرکز لبولی — — →

نمای Ground glass — — →

[۱۰].

طبق مطالعات شیرلتینگ (Shirleyteng) و همکاران پس از خوراندن فرمالدهید به جوندگان، هپاتوتوکسیسیته و کاهش سطح آنزیمهای آنتی اکسیدان را مشاهده کردند. که این آثار رژنراسیون مشاهده شده در هپاتو سیتها که در مطالعه حاضر بدان اشاره شده را تصدیق می کند [۱۴].

برخی از سلولها سیتو پلاسمشان ائوزینو فیلک شده بود و نمای شبیه oncocyte پیدا کرده بودند. شواهدی از نکروز پارانشیم کبد در هیچ یک از گروههای آزمایش ملاحظه نشد. هیچ گونه تغییر هیستو پاتولوژیک در گروه شاهد مشاهده نشد (شکل ۴) لازم به ذکر است که یافته های یاد شده در هر گروه، در تمامی برشهای بافتی آن گروه دیده شد.



شکل ۴: ساختار لبول کبدی سالم در گروه شاهد - H&E x400

بحث

در بررسی انجام شده توسط باندمن (Bandman) و همکاران طی مواجهه موشها با فرمالدهید به میزان ۲۰۰ میلی گرم در متر مکعب طی ۱۲۲ روز متناوب، آثار التهابی در بافت کبدی دیده شد که می تواند موید مشاهده انفیلتراسیون سلولهای تک هسته ای در مطالعه ما باشد [۱۵].

مطالعه دیگری که توسط فرانک کاج میستار (Frank kuchemeistar) و همکاران انجام شد نشان داد که آلدیوها از جمله فرمالدهید منجر به القاء تومور در جوندگان می شود [۱۶]. همچنین DNA-Protein cross link در مورد تمام آلدیوها گزارش شده است. دلیل این یافته ها شاید بر اساس این واقعیت باشد که آلدیوها بسیار فعالند و می توانند به

این مطالعه نشان داد که مواجهه با بخار فرمالدهید منجر به اینفیلتراسیون سلولهای تک هسته ای در فضای پورت رژنراسیون هپاتوسیتها، دیلاتاسیون سینوزوئیدها و پر خونی (congestion) به همراه اتساع شریان فضای پورت می شود. همچنین نمای oncocyte در بعضی از سلولها مشاهده شد.

طبق مطالعه انجام شده توسط برستین (Berbstein) و همکاران، مواجهه با فرمالدهید منجر به ادم در کبد می شود. ادم مذکور می تواند به دنبال دیلاتاسیون سینوزوئیدها رخ داده باشد که این دیلاتاسیون در مطالعه حاضر نیز مشاهده شد

دفع اسید فرمیک از دو راه عمده ی متابولیزه شدن در کبد و دیگری ترشح در ادرار صورت می گیرد. اشباع پذیری آنزیمهای متابولیزه کننده اسید فرمیک در کبد، ایجاد اسیدوز متابولیک اولیه و سیستمیک و نیز اسیدوز لاکتیک در کلیه به دلیل مهار سیتوکروم اکسیداز [۲۲]، دو مکانیسم عمده ای است که می تواند باعث کاهش متابولیسم اسید فرمیک در کبد و نیز کاهش دفع آن از طریق کلیه شود. به این ترتیب غلظت اسید فرمیک در پلاسما به سطح سایتوتوکسیک آن خواهد رسید.

با مطالعه و بررسی نتایج هیستوپاتولوژیک مطالعه حاضر، می توان چنین برداشت کرد که اگرچه بخار فرمالدهید در غلظت و شرایط موجود در این مطالعه باعث ایجاد تغییرات هیستوپاتولوژیک در بافت کبد موشهای صحرایی می شود اما، احتمالاً شدت تغییرات هیستوپاتولوژیک ناشی از مواجهه با بخار فرمالدهید در این غلظت ارتباط معنی داری با زمان مواجهه ندارد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله مراتب تشکر خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی گلستان به خاطر تصویب و حمایت مالی طرح، آقای مهندس مولودی، خانم شیرین ایرانی و پرسنل بخش پاتولوژی بیمارستان دریایی گرگان به خاطر همکاری صمیمانه اعلام می نمایند. همچنین از جناب آقای پرفسور بلداجی و سرکار خانم شیرین بیک مهاجر به خاطر راهنماییهای ارزنده شان بینهایت سپاسگزاری می گردد.

ماکرومولکولها (Protein, mRNA) در سیتوپلاسم بسیاری از سلولها متصل شوند. این شواهد می تواند بیانگر پیدایش هپاتوسیتهایی با سیتوپلاسم گرانولر و اتوزینوفیلیک با هسته های گرد و مرکزی به نام oncocyte باشد که در مطالعه حاضر دیده شد.

همچنین در مطالعات کرنز (Kerns) و همکاران به اثر کارسینوژنیستی فرمالدهید اشاره شده است [۱۷].

در مطالعه انجام شده توسط روش (Rusch) و همکاران به صورت ۲۲ ساعت در روز، ۷ روز در هفته به مدت ۲۶ هفته تنفس فرمالدهید روی رت نژاد F344 با غلظت ۲/۵۹ ppm، کاهش وزن کبد دیده شد که با رزتراسیون سلول در مطالعه حاضر تطابق دارد [۱۸].

در مقابل این یافته ها، وترسن (Woutersen) و همکاران در مطالعه خود روی موشهایی که در مواجهه با ۲۰ ppm فرمالدهید به صورت ۶ ساعت در روز، ۵ روز در هفته به مدت ۱۳ هفته بودند هیچ ضایعه میکروسکوپی در بافت کبد مشاهده نکردند [۱۹].

همچنین در مطالعه آپلمان (Appleman) و همکاران هیچ تغییر هیستوپاتولوژیک کبدی در غلظت کمتر از ۱۰ ppm در مدت ۱۳ تا ۱۵ هفته دیده نشد [۲۰].

با بررسی کینتیک فرمالدهید در بدن انسان و توجه به متابولیسم سریع آن در کمتر از ۱/۵ دقیقه در داخل سرم [۲۲]، می توان چنین فرض کرد که احتمالاً آثار سایتوتوکسیک فرمالدهید ناشی از متابولیت عمده آن یعنی اسید فرمیک است.

References

1. Bardana EJJ, motanaro A. Formaldehyde and analysis of its respiratory cutaneous, and immunologic effects. Ann Allergy, 1991, 66(6): 447-58
2. kitchens JF, Castner RE, Edwards GS, Harward, W. Eand Macri BJ. Investigation of selected potential environmental ctaminants and acetaldehyde in Atlanta, Georgia. JAir Waste Manage Assoc 1993, 43: 469-74
3. Budavari S, O'Neil MJ, Smith A, Rahway NJ. The Merck index. 11th ed.: Merck & Co.Inc. 1989.
4. 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.
5. Sullivan JBJ, Krieger GR. Hazardous materials toxicology- clinical principles of environmental health. Baltimore, Williams and Wilkins 1992,

p974

۶. جاودان محمد، انتظاری زهرا. آثار سیتوتوکسیک بخار فرمالدهید روی مخاط بینی طی زمان ۳ و ۲۰ روز. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی قزوین. ۱۳۷۸. جلد ۲: صفحات ۲۳ تا ۱۷.
7. Kerfoot EJ, Mooney TE. Formaldehyde and paraformaldehyde study in funeral homes. Am Ind Hyg Assoc J 1975; 36:533-7.
۸. گلعلی‌پور محمدجعفر، آذرهوش رامین، فاضلی سیدامیرحسین، داوریان علی. تأثیر هیستوپاتولوژیک بخار فرمالدهید بر مخاط تنفسی نای موش صحرایی، مجله علمی- پژوهشی پزشکی قانونی، ۱۳۸۲؛ جلد ۹: صفحات ۱۸۵-۹
9. Monticello TM, Swenberg JA, Gross EA, Leininger JR, Kimbell JS, Seilkop S. Correlation of regional and nonlinear formaldehyde induced nasal cancer with proliferating populations of cells. Cancer Res 1996; 56 (5): 1012-22.
10. 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: 778-85.
11. Burge PS, Harries MG, Lam WK, O'Brien IM, Patchett PA. Occupational asthma due to formaldehyde. Thorax 1985; 40(4): 255-60.
12. Eric K. Noji, Gabor D.Kelen. Manual of Toxicologic Emergencies. Year Book Medical Publishers, Inc, USA, 1989, p:392-394

13. Richard C. Dart, Medical toxicology, Third Edition, Lippincot Williams & Wilkins, USA, 2004: 1246- 99
14. Teng SH, Beard K, Pourahmad J, Moridani M, Easson E, Poon R, Peter J. Brien O. The formaldehyde metabolic detoxification enzyme systems and molecular cytotoxic mechanism in isolated Rat Hepatocytes. Chem-Biol Interact, 2001, 130-132: 285-96.
15. Bandman A. Hazardous substances ,Galogen and Oxygen containing substances .Bandman A., Chimia 1994; 48: 124-128.
16. Kuchenmeister FP, Schmezer G. Engelhardt genotoxic bifunctional aldehydesproduces specific images in the comet assay. Mut Res-Gen. Tox. Environ. Mut 1998; 419 (1-3): 69-78.
17. Kerns WD, Davkov KL, Donofrio DJ, Gralla EJ, Swenberg JA. carcinogenicity of formaldehyde in rats and mice after long- term inhalation exposure. Cancer Res 1983; 43: 4382-92
18. 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: 329-43.
19. Woutersen RA, Appleman LM, Wilmer JW, Falke HE, Feron VJ. Sub chronic (13 week) inhalation toxicity study of formaldehyde in rats. J Appi Toxicol, Feb: 1987; 7(1): 43 -9
20. Appelman LM, Wilmer JW, Woutersen RA, Falke HE. Nasal tumors in rats after short-term exposure to a cytotoxic concentration of formaldehyde. Cancer Lett 1988; 39: 101-111.