



اثرات سمی بخارات فرمالدئید بر بافت بیضه و پارامترهای اسپرم موش سوری بالغ

شهرام وثوقی^۱، علی خوانین^۲، مژده صالح نیا^۳، حسن اصلیان^۴، وحید اسماعیلی^۵

تاریخ پذیرش: ۹۱/۰۳/۲۳

تاریخ دریافت: ۹۱/۰۱/۲۸

تاریخ ویرایش: ۹۰/۰۸/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: فرمالدئید ($H_2C=O$) عضوی از خانواده آلدئیدها با ساده‌ترین مولکول آلتی است که به صورت گسترش در صنایع استفاده می‌شود. هدف این مطالعه تجربی بررسی اثرات زیان‌آور فرمالدئید بر بافت بیضه و کیفیت اسپرم موش‌های سوری نر بود.

روش بررسی: ۳۶ موش نر بالغ تراز MRI به صورت تصادفی به سه گروه مساوی (n=12) تقسیم شدند گروه F1 با غلظت پائین و گروه F2 با غلظت بالای بخارات فرمالدئید در اتاقک مواجهه تنفسی به ترتیب با غلظت‌های معادل با ۱۰ ppm و ۲۰ ppm به مدت ۱۰ روز، هر روز به مدت ۸ ساعت مواجهه داشتند، گروه کنترل در این مدت هوازی تازه دریافت می‌کرد. در پایان دوره مواجهه، نیمی از موش‌های هر گروه ۲۴ ساعت پس از مواجهه (برای بررسی اثرات بلند مدت) کشته شدند، بیضه موش‌ها برای آزمایشات بافت شناسی و بافت اپیدیدیم برای انجام آنالیز اسپرم برداشته شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از بررسی بلند مدت نشان داد که در هر دو گروه تجربی تعداد اسپرم‌های گرفته شده از اپیدیدیم و درصد اسپرم‌ها با تحرک پیشرونده به صورت معنادار کمتر از گروه کنترل ($p < 0.01$) و درصد اسپرم‌های غیرطبیعی بصورت معنی‌دار بیشتر از گروه کنترل بود ($p < 0.01$). مطالعه بافت شناسی بیضه ۳۵ روز پس از مواجهه نشان داد که فرمالدئید موجب آتروفی لوله‌های اسپرم ساز و ایجاد واکوئل دریافت اپیتیال می‌گردد.

نتیجه گیری: استنشاق فرمالدئید می‌تواند اثر تخریبی بر بافت بیضه داشته و کیفیت اسپرم را کاهش دهد.

کلید واژه‌ها: فرمالدئید، بیضه، پارامترهای اسپرم، تغییرات بافتی، موش.

هفت سال بیش از ۷۰٪ افزایش تولید جهانی داشته است [۲]

فرمالدئید به مقدار زیاد در ساخت رزین‌ها (فنل فرمالدئید – ملامین فرمالدئید – اوره فرمالدئید) مصرف می‌شود. در صنایع لاستیک این ماده به عنوان نگاهدارنده و پوشاننده لاستیک خام به کار می‌رود، در نساجی برای بهبود و ثبات رنگ روی پارچه استفاده می‌گردد. در صنایع چوب و تولید ورقه‌های MDF و همچنین در ساخت چسب چوب به مقدار زیاد استفاده می‌شود. این ماده در ساخت علف کش‌ها – باکتری کش‌ها و قارچ کش‌های کشاورزی نیز به کار می‌رود [۲].

فرمالدئید از راه پوست، گوارش و تنفس جذب بدن می‌شود و اثرات فیزیولوژیک سریع آن: تحریک اولیه پوست، چشم و مخاط تنفسی است [۳].

مقدمه

فرمالدئید ($H_2C=O$) یک عضو خانواده آلدئیدها با ساده‌ترین مولکول آلتی، گازی بی‌رنگ، قابل اشتعال، محرك با بوی تند است که دارای جرم مولکولی ۳۰/۰۳ بوده و به راحتی در دما و فشار معمول اتاق پلیمریزه می‌گردد. کاربرد وسیع فرمالدئید در صنایع مختلف (سازمان WHO تعداد ۳۶ صنعت مختلف را که در آنها کارگران با فرمالدئید تماس شغلی دارند معرفی نموده) در بسیاری از مشاغل مواجهه با آن را اجتناب ناپذیر کرده است [۱].

فرمالدئید از نظر اقتصادی نیز در جهان بسیار حائز اهمیت است، تولید این ماده در جهان در سال ۲۰۰۰ به میزان ۲۳/۲۱ میلیون تن بوده که در سال ۲۰۰۷ تولید آن به ۳۶ میلیون تن رسیده است، یعنی در طی

۱- دانشجوی دکتری پهداشت حرفه‌ای، گروه پهداشت حرفه‌ای، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۲- (نویسنده مستول) دانشیار، گروه پهداشت حرفه‌ای، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۳- استاد، گروه علوم تشریعی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۴- استادیار، گروه پهداشت حرفه‌ای، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۵- کارشناس ارشد، پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست شناسی و علوم پزشکی تولیدمثل، گروه جنین شناسی، تهران، ایران.

E در کاهش تخریب بافت بیضه رت‌های که با فرمالدئید استنشاقی مواجهه داشتند پرداختند و اثر حفاظتی ویتامین E تائید گردید [۱۱].

با توجه به اینکه طیف وسیعی از کارگران مرد در معرض این ماده قرار دارند و مطالعات محدودی در مورد اثر استنشاق این ماده بر پارامترهای اسپرم خصوصاً "تحرک اسپرم‌ها" صورت گرفته است، در این پژوهش به مطالعه ارتباط بین مواجهه تحت حاد شغلی با بخارات فرمالدئید و تغییر در پارامترهای اسپرم پرداختیم و تأثیر این ماده بر اسپرم‌های پیش‌رونده، اسپرم‌های غیر پیش‌رونده و اسپرم‌های بی‌تحرک مورد ارزیابی قرار گرفت.

لازم است این قسمت طوری بازنویسی شود که ضمن بیان اهمیت موضوع و نتایج برخی از مطالعات با هدف از انجام پژوهش خاتمه یابد. ضمناً "ضرورت انجام مطالعه با وجود برخی مطالعات مشابه نیز توضیح داده شود.

روش بررسی

در این تحقیق تعداد ۳۶ سر موش نر بالغ از نژاد NMRI خریداری شده از انسستیتو پاستور تهران با محدوده وزنی بین ۲۰-۳۵ گرم و با سن بین ۷-۸ هفتگی انتخاب شد (تکامل جنسی موش‌ها بین روزهای ۴۹-۲۸ بعد از تولد می‌باشد و سن باروری موش نر بالغ در ۶۰ روزگی یافته وزن ۲۰-۳۵ گرم می‌باشد) [۱۲]. موش‌ها یک هفته قبل از مواجهه به حیوان‌خانه دانشگاه تربیت مدرس منتقل شدند تا با محیط سازگاری پیدا کنند. در محیط حیوان‌خانه، موش‌ها در دمای محیطی $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ورطوبت ۵۰ تا ۴۰ درصد، تحت تأثیر شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار گرفتند و با غذای کافی مخصوص موش و آب کافی تغذیه شدند. موش‌ها در زمان مواجهه بالغ و سن آن‌ها بیشتر از ۵۶ روز بود.

موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی مطابق با دستورالعمل‌های دانشگاه تربیت مدرس در این پژوهش رعایت شد. در ابتدای کار همه موش‌ها وزن

سازمان OSHA حد تماس شغلی این ماده را برای مواجهه ۸ ساعته (TWA) 0.75 ppm و برای مواجهه کوتاه مدت (STEL) 2 ppm اعلام نموده است [۳-۴]. انجمن دولتی بهداشت صنعتی آمریکا حد تماس شغلی این ماده را 0.3 ppm (سقف) اعلام نموده است [۴].

اثرات حاد و مزمن فرمالدئید از جمله خاصیت تحریک کننده پوست، مخاط چشم و دستگاه تنفسی، سرطان‌زاوی در بینی و قسمت‌های فوقانی دستگاه تنفس در حیوانات آزمایشگاهی و همچنین تأثیر این ماده بر کاهش ظرفیت‌های تنفسی انسان در تماس طولانی مدت در تحقیقات متعددی که محققین مختلف و سازمان‌های علمی انجام داده‌اند تائید گردیده است [۵].

در تحقیقات گذشته بیشتر به بررسی تأثیر فرمالدئید بر سیستم تنفسی [۶] سیستم گوارشی [۷] سیستم قلبی عروقی [۷] و سیستم اعصاب [۸] پرداخته شده است و مطالعات محدودی روی اثر این ماده بر سیستم باروری جوندگان انجام گرفته است. تحقیقات قبلی نشان داده است که فرمالدئید تزریقی در رت‌ها موجب تخریب هسته سلول‌های لیدیگ و کاهش سطح سرمی تستوسترون می‌گردد [۹] همچنین در پژوهش دیگری متوجه تأثیر فرمالدئید تزریقی بر افزایش تعداد اسپرم‌های غیرطبیعی در موشهای نر مورد آزمایش، شدند [۹].

Zhou و همکاران به مطالعه تأثیر فرمالدئید بر فرآیند اسپرمatoژنز در رت‌های بالغ پرداختند و تغییرات مورفو‌لولژیکی اسپرم موشهایی که با غلظت‌های $10\text{ mg}/\text{m}^3$ و $0.5\text{ mg}/\text{m}^3$ فرمالدئید به مدت ۲ هفته (۱۲ ساعت در روز) مواجهه داشتند را گزارش کردند. نتایج این تحقیق نشان دهنده آتروفی توبول‌های لولهای اسپرم‌ساز و کاهش وزن بیضه‌ها و افزایش اسپرم‌های غیرطبیعی بود [۱۰].

در پژوهش دیگری که در مورد اثر فرمالدئید بر تعداد و درصد اسپرم‌های متحرک در اپیدیدیم بیضه رت‌ها صورت گرفت به بررسی تأثیر حفاظتی ویتامین



از اپیدیدیم و چربی اطراف جدا شده و اپیدیدیم در محیط کشت قرار گرفت و بیضه چپ پس از شستشو با نرمال سالین با ترازوی دقیق وزن و سیس در محلول فیکساتیو بوئن (Merck,Germany) قرار داده شد [۱۹] و مراحل آبگیری و شفافسازی به ترتیب با عبور از الكل با درجات صعودی و زایلین (Merck,Germany) انجام شد. سیس بافت‌ها با پارافین (Merck,Germany) قالب‌گیری و با استفاده از میکروتوم (Leica,Germany) به مقاطع با ضخامت $5\text{ }\mu\text{m}$ برش داده شد و رنگ‌آمیزی به روش هماتوکسیلین-ائوزین (Sigma, USA) انجام شد. سیس لامهای رنگ‌آمیزی شده با میکروسکوپ نوری بررسی شد [۲۰].

روش آنالیز اسپرم جهت بررسی کیفیت اسپرم:

در این تحقیق به منظور مطالعه کیفیت اسپرم، پارامترهای اسپرم شامل: تعداد اسپرم (غلظت) - درصد بقاء (اسپرم های زنده) - درصد اسپرم‌های متحرک پیش‌رونده و درصد اسپرم‌ها با مورفولوژی طبیعی مورد بررسی قرار گرفت. بررسی تحرک و غلظت اسپرم نمونه‌ها توسط دستگاه Sperm Class Analyzer Microptic (SCA) ساخت شرکت Microptic اسپانیا که برای آنالیز اسپرم موش تنظیم و کالیبره شده بود بر طبق دستورالعمل سازمان جهانی بهداشت انجام شد [۲۱]. پس از خروج بیضه و اپیدیدیم از کیسه بیضه قسمت دم اپیدیدیم را جهت گرفتن اسپرم بالغ متحرک با قیچی در شرایط استریل قطعه قطعه کرده و در یک تست تیوب حاوی ۱ میلی لیتر محلول محیط کشت Ham's F-10 (Nutrient Mixture-Ham-FBS (Foetal Serum ۱۰ + X1, GIBCO, UK) Bovine Serum, GIBCO, UK) تیوب را در انکوباتور (37°C) با $5\text{ CO}_2\%$ گذاشتیم، پس از گذشت ۳۰ دقیقه اسپرم‌های خارج شده از اپیدیدیم جهت آنالیز اسپرم مورد استفاده قرار گرفت [۱۹].

و شناسنامه دار شدن سیس بطور تصادفی آن‌ها را به دو گروه تجربی (F1(n=12), F2(n=12) و گروه کنترل (n=12) تقسیم گردید.

گروه‌های تجربی به مدت ۱۰ روز با فرمالدئید استنشاقی به ترتیب با غلظت 10 ppm و 20 ppm مواجهه داشتند و موش‌های گروه کنترل در دوره مواجهه هوای تازه استنشاق می‌کردند. جهت مواجهه موش‌ها با بخارات فرمالدئید محفظه‌ای به ابعاد $21\times75\times29\text{ cm}^3$ به شکل مکعب مستعطیل با حجم $30\times25\times29\text{ L}$ لیتر از جنس پلی‌گلاس بدون رنگ و شفاف که کاملاً با چسب آکواریوم سیل شده بود ساخته شد و ۲ سوراخ بر روی دیوارهای محفظه، جهت جریان ورودی و خروجی هوا به داخل محفظه و اندازه گیری غلظت در نظر گرفته شد. هوا این محفظه حداقل ۱۲ بار در ساعت تعویض می‌گردید [۱۳].

برای مواجهه ازروش ترمال دی پلیمریزاسیون پارا فرمالدئید استفاده شد [۱۴-۱۵]. غلظت فرمالدئید مورد نیاز از طریق حرارت دادن پارافرمالدئیدتا 60°C و انتقال توسط گاز حامل (هوا) به اتفاق مواجهه ایجاد گردید. غلظت فرمالدئید در داخل اتفاق مواجهه با تغییر دبی پمپ هوا واستفاده از میکروروولو و نیز کنترل توسط روتاتور به دامنه مطلوب و نسبتاً "پایدار رسید و غلظت فرمالدئید در هر ساعت ۴ بار توسط دستگاه فوچک (قرائیت مستقیم) با لامپ PID مخصوص ترکیبات آلی فرار و با انرژی $11/7\text{ eV}$ ($16-17$) اندازه گیری و پایش گردید ($C_1 = 19/79 \pm 1/56\text{ ppm}$ و $C_2 = 10/89 \pm 0/76\text{ ppm}$). کنترل دقت اندازه گیری های انجام شده براساس روش 3500 پیشنهادی سازمان NIOSH با حساسیت کمتر از $0/1\text{ ppm}$ انجام گرفت [۱۸].

پس از آخرین روز دوره مواجهه، موش‌ها در دو مقطع زمانی، روز یازدهم، روز سی و پنجم پس از پایان مواجهه، و روز سی و پنجم پس از پایان مواجهه به روش قطع مهره‌های گردنی کشته شدند ($n=6$ در هر گروه و در هر دوره) و با ایجاد برش بروی اسکروتوم، بیضه و اپی دیدیم برداشته شد و در مرحله بعد بیضه‌ها

گردید و درصد اسپرم‌های زنده و مرده مشخص شد. اسپرم‌های زنده رنگ نگرفته و در زیر میکروسکوپ بی‌رنگ دیده می‌شدند و اسپرم‌های مرده رنگ صورتی گرفته بودند. (برای هر نمونه ۲ بار شمارش انجام گرفت) [۲۳].

بررسی مروفولوژی اسپرم:

برای مطالعه مروفولوژی اسپرم در هر نمونه، طبق Van der Horst and Maree., [۲۴] ابتدا $10\text{ }\mu\text{L}$ از محیط کشت حاوی اسپرم را روی لام استاندارد Leja products B.V., عمق $20\text{ }\mu\text{m}$ ریخته (The Netherlands Nieuw_Vennep) و لام را روی صفحه گرم میکروسکوپ (37°C) قرار دادیم و پس از ۳ دقیقه، لام زیر میکروسکوپ فاز-کنتراست و توسط سیستم CASA مورد مطالعه قرار گرفت.

چندین فیلد مختلف مورد بررسی قرار گرفت تا تحرک و شمارش اسپرم‌ها (حداقل ۴۰۰ اسپرم) در هر نمونه سنجش گردد. غلظت (تعداد) اسپرم نمونه، در یک میلی لیتر حجم نمونه توسط دستگاه اعلام گردید. برای هر نمونه ۲ بار شمارش صورت گرفت [۲۳].

همچنین این دستگاه به طور هم زمان تحرک اسپرم‌ها را نیز بر اساس معیارهای پیشنهادی سازمان WHO تعیین کرده و به صورت زیر گزارش نمود [۲۱]:

- الف - درصد اسپرم‌های Progressive motile
- ب - درصد اسپرم‌های Non-Progressive motile
- ج - درصد اسپرم‌های Static Immotile

آنالیز آماری

داده‌های عددی به صورت میانگین \pm انحراف معیار ($M \pm SD$) بیان شد. به منظور مقایسه اختلاف میانگین وزن بیضه‌ها و همچنین مقایسه اختلاف میانگین پارامترهای مختلف اسپرم بین گروه کنترل و سایر گروه‌ها از آزمون t و ANOVA استفاده شد. Scheffe سپس گروه‌ها بصورت جفت با کمک تست با گروه کنترل و با یکدیگر مقایسه شدند. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۱/۵ انجام گرفت و $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

شمارش اسپرم و بررسی تحرک اسپرم‌ها:
بررسی تحرک و تعیین غلظت اسپرم نمونه‌ها با کمک کامپیوتر و سیستم- assisted sperm analyzer (computer- assisted sperm analyzer) شده توسط Krause انجام شد [۲۲].

مقدار $4\text{ }\mu\text{L}$ از محیط کشت حاوی اسپرم را توسط سمپلر برداشته و روی یک خانه لام استاندارد Leja products B.V., عمق $20\text{ }\mu\text{m}$ ریخته (The Netherlands Nieuw_Vennep) و لام را روی صفحه گرم میکروسکوپ (37°C) قرار دادیم و پس از ۳ دقیقه، لام زیر میکروسکوپ فاز-کنتراست و توسط سیستم CASA مورد مطالعه قرار گرفت.

چندین فیلد مختلف مورد بررسی قرار گرفت تا تحرک و شمارش اسپرم‌ها (حداقل ۴۰۰ اسپرم) در هر نمونه سنجش گردد. غلظت (تعداد) اسپرم نمونه، در یک میلی لیتر حجم نمونه توسط دستگاه اعلام گردید. برای هر نمونه ۲ بار شمارش صورت گرفت [۲۳].

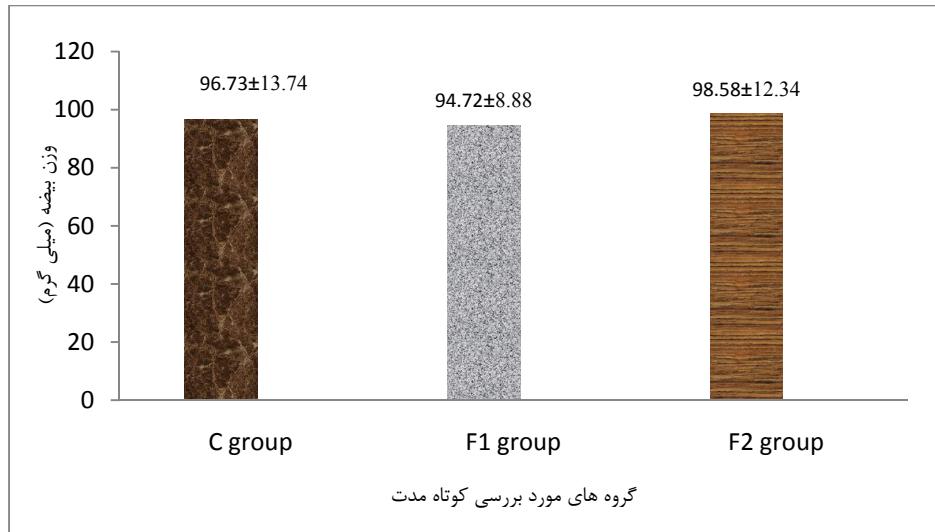
همچنین این دستگاه به طور هم زمان تحرک اسپرم‌ها را نیز بر اساس معیارهای پیشنهادی سازمان WHO تعیین کرده و به صورت زیر گزارش نمود [۲۱]:

- الف - درصد اسپرم‌های Progressive motile
- ب - درصد اسپرم‌های Non-Progressive motile
- ج - درصد اسپرم‌های Static Immotile

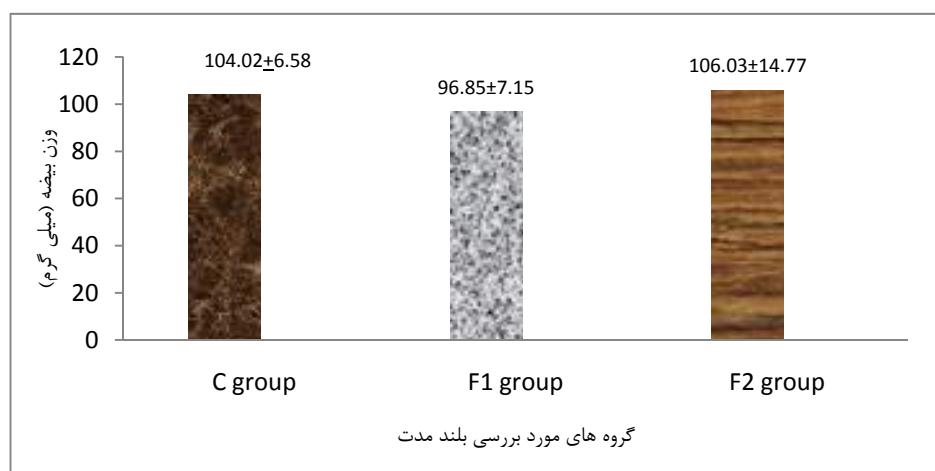
دو ماهنامه علمی کاربران دوره ۱۰، شماره ۱، فوریه و اردیبهشت ۱۳۹۲

بررسی قابلیت زنده ماندن اسپرم‌ها:

مطابق روش بررسی حیات اسپرم بیان شده توسط دستورالعمل سازمان جهانی بهداشت [۲۱]، مقدار $5\text{ }\mu\text{L}$ از محیط کشت حاوی اسپرم را روی لام سیتوژنیک قرار داده، سپس با $5\text{ }\mu\text{m}$ رنگ آئوزین Y (0.5% wt/vol; Merck Chemical Co., Germany) مخلوط شد و بلا فاصله با بزرگ‌نمائی (NikonTM Eclipse E-400 Zیر میکروسکوپ - X400 Japan) ۲۰۰ تعداد اسپرم شمرده و بررسی



نمودار ۱ : مقایسه میانگین وزن بیضه موش های گروه شاهد با گروه های تجربی ، ۲۴ ساعت پس از مواجهه .



نمودار ۲ : مقایسه میانگین وزن بیضه موش های گروه شاهد با گروه های تجربی، ۳۵ روز پس از مواجهه .

طبیعی در هردو گروه آزمون F1,F2 نسبت به گروه کنترل است (جدول ۱).

همچنین در بررسی کوتاه مدت درصد قابلیت زنده ماندن اسپرم ها در گروه F1 نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی داری نداشت لیکن درصد قابلیت زنده ماندن اسپرم ها در گروه F2 ($70/88 \pm 4/92$) نسبت به گروه کنترل ($82/17 \pm 3/49$) کاهش معنادار نشان داد ($p < 0.05$) (جدول ۱).

نتایج حاصل شده از بررسی بلند مدت پارامترهای اسپرم اپیدیدیم، یعنی ۳۵ روز پس از پایان مواجهه،

یافته ها

نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد که در اثر استنشاق فرمالدئید با غلظت ۱۰ ppm اختلاف معنی داری بین وزن بیضه موش های گروه شاهد و گروه های آزمون در بررسی کوتاه مدت (۲۴ ساعت بعد از مواجهه) و بلند مدت (۳۵ روز بعد از مواجهه) وجود ندارد (نمودار ۲ و ۱).

نتایج به دست آمده از بررسی اثرات کوتاه مدت نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار در تعداد، درصد اسپرم های متحرک پیش رونده و درصد مرغولوژی

جدول ۱: مقایسه میانگین پارامترهای اسپرم در گروه شاهد در بررسی کوتاه مدت (۲۴ ساعت پس از پایان مواجهه). اعداد به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد نشان داده شده‌اند.

p Value	گروه‌ها			متغیرها
	F2 تجربی	F1 تجربی	کنترل	
	Mean + SD	Mean + SD	Mean + SD	
^a ۰/۸۴۴	۳/۷۳ \pm ۰/۵۳	۳/۹۳ \pm ۱/۰۹	۴/۷۷ \pm ۰/۵۶	تعداد اسپرم \times (میلیون در میلی لیتر)
^b ۰/۶۸۸				
^c ۱/۰۰۰				
^a ۰/۹۳۳	۳۵/۲۲ \pm ۳/۶۳	۳۹/۷۲ \pm ۵/۷۲	۴۲/۸۷ \pm ۴/۰۵	اسپرم متحرك پيشرونده (درصد)
^b ۰/۲۱۴				
^c ۰/۷۵۶				
^a ۰/۹۶۹	۳۴/۴۲ \pm ۵/۵۶	۳۴/۳۷ \pm ۴/۹۴	۳۷/۶۲ \pm ۷/۰۹	اسپرم متحرك غير پيشرونده (درصد)
^b ۰/۹۷۱				
^c ۱/۰۰۰				
^a ۰/۳۷۹	۳۰/۳۵ \pm ۴/۳۲	۲۶/۰۸ \pm ۶/۱۲	۱۹/۵۲ \pm ۴/۰۵	اسپرم بي تحرك (درصد)
^b ۰/۰۲۶				
^c ۰/۷۹۸				
^a ۰/۲۸۹	۷۰/۸۸ \pm ۴/۹۲	۷۵/۳۳ \pm ۵/۸۹	۸۲/۱۷ \pm ۳/۴۹	زنده ماندن اسپرم (درصد)
^b ۰/۰۱۲				
^c ۰/۷۳۵				
^a ۰/۱۴۱	۷۵/۳۳ \pm ۳/۱۴	۷۵/۶۷ \pm ۳/۰۸	۸۱/۳۳ \pm ۲/۷۳	مرفوولوژي طبیعی (درصد)
^b ۰/۱۰۳				
^c ۱/۰۰۰				

a = اختلاف بین گروه تجربی F1 و گروه کنترل.. b = اختلاف بین گروه تجربی F2 و گروه کنترل.. c = اختلاف بین گروه F1 و گروه F2

گروههای تجربی F2,F1 به ترتیب ($61/33 \pm 5/85$) و ($54/67 \pm 5/96$) می‌باشد که در مقایسه با گروه کنترل ($35/22 \pm 3/63$) کاهش نشان داد و این کاهش از نظر آماری معنادار است ($p < 0/05$) و بیشترین کاهش مربوط به گروه F2 می‌باشد (جدول ۲). در مطالعه بلند مدت (۳۵ روز پس از پایان مواجهه) بررسی مرفوولوژی اسپرم ها نشان داد که بین درصد اسپرم ها با مرفوولوژی طبیعی در گروه های تجربی F1 ($71/67 \pm 2/73$) و F2 ($68/83 \pm 2/79$) و گروه کنترل ($82/17 \pm 2/23$) اختلاف آماری معناداری وجود دارد ($p < 0/05$). مطالعه ناشی از مقایسه برشهای بافتی به دست آمده در نمونه های مربوط به گروههای شاهد و آزمون نشان داد که در گروه شاهد، لوله های اسپرم ساز بطور منظم و مشخص به همراه بافت

نشان داد که درصد اسپرم های متحرك پیش رو نده اپیدیدیم در اسپرم موشهای گروههای آزمون F2,F1 به ترتیب ($24/17 \pm 3/81$) و ($26/65 \pm 1/61$) بوده که نسبت به گروه کنترل ($44/47 \pm 2/88$) کاهش معناداری داشته است ($p < 0/05$), لیکن تفاوت معنی داری در درصد اسپرم های پیش رو نده بین گروههای F1,F2 مشاهده نشد (جدول ۲).

میانگین تعداد اسپرم اپیدیدیم در گروههای تجربی F2,F1 به ترتیب میلیون در میلی لیتر ($2/58 \pm 0/44$) و ($2/87 \pm 0/51$) بود که نسبت به گروه کنترل میلیون در میلی لیتر ($0/65 \pm 0/08$) تفاوت معنی داری ($p < 0/05$) وجود دارد. با توجه به تست تکمیلی Scheffe، بیشترین اختلاف بین گروه کنترل و گروه F2 می باشد (جدول ۲). درصد اسپرم های رنگ نگرفته (زنده) در



جدول ۲: مقایسه میانگین پارامترهای اسپرم در گروه های تجربی F1, F2 با گروه شاهد در بررسی بلند مدت (۳۵ روز پس از پایان مواجهه) . اعداد به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد نشان داده شده‌اند.

p Value	تجربی F2	تجربی F1	کنترل	گروه ها
				متغیرها
^a ./...	Mean + Sd ۲/۵۸ \pm ۰/۴۴	Mean + Sd ۲/۸۶ \pm ۰/۵۱	Mean + Sd ۵/۰۸ \pm ۰/۶۵	تعداد اسپرم \times (میلیون در میلی لیتر)
^b ./...				
^c ./۹۶				
^a ./...	۲۴/۱۷ \pm ۳/۸۱	۲۶/۶۵ \pm ۱/۶۱	۴۴/۴۷ \pm ۲/۸۸	اسپرم
^b ./...				متحرک پیشرونده (درصد)
^c ./۹۰				
^a ./۵۶	۲۸/۵۷ \pm ۴/۵۶	۳۳/۰۸ \pm ۵/۶۱	۳۷/۹۳ \pm ۳/۱۲	اسپرم
^b ./۰۲				متحرک غیر پیشرونده (درصد)
^c ./۶۴				
^a ./...	۴۲/۲۸ \pm ۶/۶۸	۴۰/۲۷ \pm ۶/۳۸	۱۷/۵۸ \pm ۵/۳۴	اسپرم
^b ./...				بی تحرک (درصد)
^c ./۴۶				
^a ./...	۵۴/۶۶ \pm ۵/۹۶	۶۱/۳۳ \pm ۵/۵۸	۸۳/۳۳ \pm ۴/۶۳	زنده ماندن اسپرم (درصد)
^b ./...				
^c ./۴۱				
^a ./...	۶۸/۸۳ \pm ۲/۷۹	۷۱/۶۷ \pm ۲/۷۳	۸۲/۱۷ \pm ۲/۲۳	مرفوولوژی طبیعی (درصد)
^b ./...				
^c ./۵۹				

. a= اختلاف بین گروه تجربی F1 و گروه کنترل، b= اختلاف بین گروه تجربی F2 و گروه کنترل، c= اختلاف بین گروه F1 و گروه F2 .

بافت های زنده یک ماده سمی به حساب می آید [۴]. در این تحقیق بررسی اثرات در دو مقطع زمانی پس از اتمام مواجهه صورت گرفت، یک روز پس از پایان مواجهه و روز سی و پنجم بعد از پایان مواجهه n=۶ در هر گروه و در هر دوره) چراکه یک سیکل کامل بازسازی سلول های اپیتلیوم لوله اسپرم ساز در موش ۸/۶ روز است و طول دوره اسپرماتوژن موش ۳۵ روز می باشد، لذا تغییرات پارامترهای فیزیولوژیک اسپرم، پس از ۳۵ روز بهتر قابل مشاهده و بررسی است [۱۲,۲۴].

در این مطالعه نتایج حاصل از بررسی اثر فرمالدئید بر وزن بیضه نشان داد که اختلاف معنی داری بین گروه های آزمون و شاهد چه در بررسی کوتاه مدت و چه پس از گذشت ۳۵ روز از قطع تماس، وجود نداشت. تفاوت های غیر معنی دار ممکن است در اثر

بینایینی لوله های اسپرم ساز قرار داشته و سلوهای لیدیگ به صورت طبیعی با سیتوپلاسم صورتی و هسته درشت مشاهده گردیدند، این مشاهدات علائم بافت کاملاً "طبیعی بیضه موش را گواهی می کرد (تصویر ۱).

در گروه های تجربی F2,F1 دژنراسیون بعضی از لوله های اسپرم ساز و بهم ریختگی نظم و ترتیب سلولی در سلول های دودمان منوی مشاهده شد و افزایش فاصله بین لوله های اسپرم ساز در مقایسه با گروه شاهد دیده شد (تصاویر ۲ و ۳).

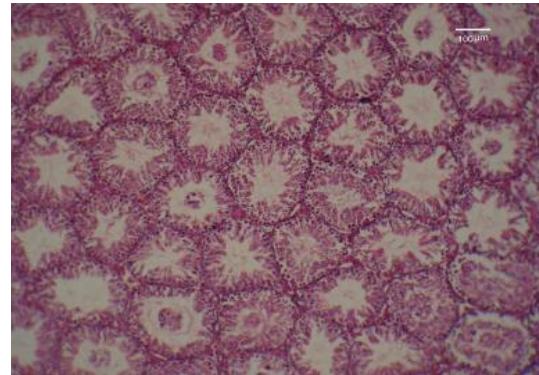
بحث و نتیجه گیری
امروزه اثبات شده که فرمالدئید، با اینکه در جنبه های مختلف زندگی انسان کاربردهای صنعتی و بهداشتی وسیعی پیدا کرده است لیکن در ارتباط با

خوراکی فرمالدئید در طولانی مدت در بلدرچین در دوز بالای 5 mg/kg و نیز کاهش وزن بیضه در اثر استنشاق فرمالدئید با غلظت 10 mg/m^3 در مدت دو هفته تماس را گزارش کرده‌اند [۲۶].

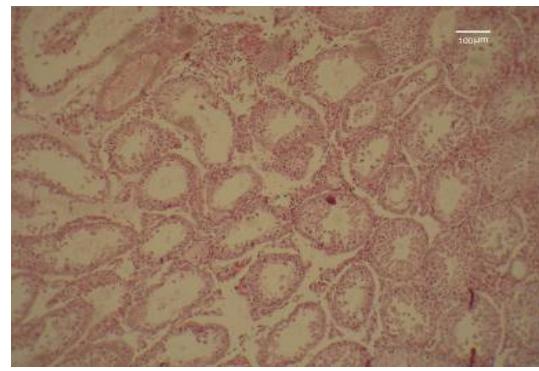
تأثیر بر تعداد و تحرک اسپرم‌ها:

در این مطالعه در بررسی اثرات بلند مدت (۳۵ روز بعد از پایان مواجهه) به این نتیجه رسیدیم که اختلاف معنی‌داری در درصد اسپرم‌های متحرک پیش‌روندۀ در دو گروه آزمون و شاهد وجود دارد و می‌توان گفت فرمالدئید در غلظت 20 ppm و 10 ppm موش نژاد NMRI می‌تواند میزان اسپرم‌های متحرک پیش‌روندۀ را کاهش دهد. این موضوع در مورد برخی از مواد شیمیائی دیگر مثل آکریل آمید [۲۷] و اتیلن گلیکول مونوآتیل اتر [۲۸] و متیل مرکوری [۲۹] توسط محققین گزارش شده است. مطالعه حاضر نشان داد که فرمالدئید موجب کاهش Mazilli درصد تحرک اسپرم‌ها می‌گردد. به نظر وهمکاران، اسپرم‌های غیر‌پیش‌روندۀ وابی تحرک وغیرطبیعی مانند WBC می‌توانند آنیون سوپر-اکسیداز تولید کنند [۳۰] که خود یک عامل اکسیداتیو است و موجب افزایش گونه‌های فعل اکسیژن گردیده و می‌تواند باعث کاهش کیفیت اسپرم‌ها گردد [۳۱].

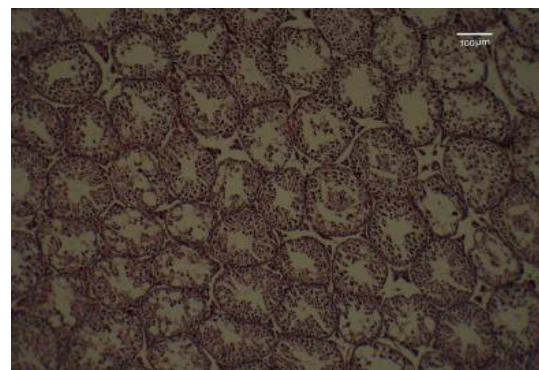
با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان گفت احتمالاً "فرمالدئید" مانع از بلوغ اسپرم شده و کاهش تحرک آن را موجب می‌شود، شاید این ماده بر بافت دیواره اپیدیدیم نیز اثر بگذارد چراکه ترشحات بافت دیواره اپیدیدیم موجب بلوغ اسپرم می‌گردد [۱۱]. در پژوهشی که M. Anzar و همکاران انجام دادند، اسپرم گاو را با فرمالدئید و بافر هیپراسموتیک در شرایط انجماد مستقیم قرار دادند و بی‌حرکتی کامل اسپرم‌ها و تغییرات حالت‌های آکروزوم را گزارش کرده و بیان کردند که حرکت اسپرم در باروری اهمیت بیشتری نسبت به تکامل آکروزوم دارد [۳۲].



تصویر ۱: بخشی از مقاطع بافت بیضه گروه کنترل C - در این تصویر چند لوله اسپرم ساز طبیعی با نظم خاص سلولی مشاهده می‌شود ($\times 100$).



تصویر ۲: بخشی از مقاطع بافت بیضه گروه مواجهه با فرمالدئید F1 - در این تصویر بی نظمی سلولی در رده سلولهای ژرمنیال در لوله‌های اسپرم ساز و افزایش فاصله بین لوله‌های اسپرم ساز دیده می‌شود ($\times 100$).



تصویر ۳: بخشی از مقاطع بافت بیضه گروه مواجهه با فرمالدئید F2 - در این تصویر واکوئل‌هایی در اپیتلیوم به چشم می‌خورد و دُنبراسیون چند لوله اسپرم‌ساز دیده می‌شود ($\times 100$).

تفاوت‌های فردی در موش باشد، در این رابطه بعضی از محققین کاهش وزن بیضه را در اثر مصرف



بافت بیضه گروههای تجربی آسیب به غشاء بطور واضح مشاهده شد لذا کاهش معنی دار درصد اسپرمها با مورفولوژی طبیعی در بررسی بلندمدت منطقی بوده و با نتایج تحقیقات قبلی تطابق دارد [۳۴، ۳۵].

تأثیر بر بافت بیضه:

در مطالعه مقاطع بافتی بیضه در این تحقیق در بررسی بلندمدت در گروههای تجربی، تعدادی از لوله‌های اسپرم‌ساز که در فرایند اسپرماتوزنر دخالت دارند دچار دژنرازیون شده و در بافت بینایی آنها تغییراتی، به صورت بی‌رنگ شدن سلول‌های لیدیگ و کاهش گرانول‌های ترشحی دیده شد.

در مطالعات قبلی که اثر فرمالدئید را روی لوله‌های اسپرم‌ساز رت و موش بررسی نموده تعییرات بافتی بیضه و آسیب به سلول‌های ژرمنیال گزارش شده است [۱۱-۱۰] که نتایج پژوهش‌های قبلی در مورد به هم خورده‌گی نظام سلولی در برخی از لوله‌های اسپرم‌ساز آتروفوی لوله‌های اسپرم‌ساز و دژنره شدن آنها با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد. (تصویر ۳ و ۲). مواجهه استنشاقی با فرمالدئید در غلاظت‌های ۲۰ ppm و ۱۰ موجب تعییرات پاتولوژیک بافت بیضه شده، کاهش قابل توجه درصد اسپرم‌ها با تحرک پیشرونده را سبب می‌گردد. فرمالدئید با تعییر در پارامترهای فیزیولوژیک اسپرم، کیفیت اسپرم را پائین می‌آورد و برای بافت بیضه یک ماده سمی محسوب می‌شود.

تقدیر و تشکر

نویسنده‌گان مقاله لازم می‌دانند مراتب قدردانی و تشکر خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس و معاونت محترم پژوهشی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس که شرایط لازم برای انجام این تحقیق را فراهم آورده‌ند اعلام نمایند.

کاهش تحرک اسپرم به عوامل متعددی نسبت داده می‌شود با این حال هنوز علت اصلی آن ناشناخته مانده است. از بین این عوامل می‌توان به دو عامل افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و از بین رفتن عصبدهی بافت بیضه اشاره کرد که عامل دوم در بروز اختلالات مورفولوژیک اسپرم بیشترین سهم را دارد [۳۳-۳۴]. بافت بیضه و اسپرم‌ها بسیار حساس به آسیب‌های ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن ROS می‌باشند. افزایش گونه‌های فعال اکسیژن آپوپتوزیس سلول‌های ژرمنیال بیضه را افزایش داده و موجب کاهش تحرک اسپرم‌ها می‌گردد [۱۱].

نتایج پژوهش‌های قبلی Zhou, D. X. نشان داد که استنشاق فرمالدئید با غلظت 10 mg/m^3 و به مدت دو هفته موجب افزایش گونه‌های فعال اکسیژن و کاهش سطح فعالیت‌های آنتی اکسیدان‌های آزیمی در بافت بیضه رت‌های مورد آزمایش گردیده موجب کاهش تحرک اسپرم‌ها و کاهش تعداد اسپرم‌های اپیدیدیم شد [۱۱]. در تحقیق حاضر نیز اختلاف معنی‌داری بین تعداد اسپرم اپیدیدیم در گروههای آزمون و شاهد دیده شد که نتایج تایید کننده گزارشات قبلی است.

تأثیر بر مورفولوژی اسپرم‌ها:

بر اساس نتایج به دست آمده از بررسی اثرات کوتاه مدت در هر دو گروه تجربی، درصد اسپرم‌ها با مورفولوژی طبیعی نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نشان نداد؛ اما در بررسی بلند مدت در گروه F1 و گروه F2، کاهش معنی‌دار درصد اسپرم‌ها با مورفولوژی طبیعی در موش‌ها مشاهده شد. در مطالعه‌ای که Odeigah PG. روی رت‌های آلبینو انجام داد، به رت‌ها به میزان 0.5 mg/kg تا 0.125 mg/kg وزن بدن فرمالدئید، داخل صفاقی تزریق نمود و اثر مرگ‌آور فرمالدئید بر روی اسپرم‌ها و تعییرات مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم‌ها را گزارش کرد [۳۵] در تعداد قابل توجهی از لامهای تهیه شده از مقاطع

comparison of the human to animal models. Environmental Health Perspectives. 1988;77:37.

13. Malek FA, Möritz KU, Fanghänel J. Effects of a single inhalative exposure to formaldehyde on the open field behavior of mice. International journal of hygiene and environmental health. 2004;207(2):8-151.

14. McClellan RO, Henderson RF. Concepts in inhalation toxicology: Informa HealthCare; 1995.

15. Songur A, Akpolat N, Kus I, Ozen OA, Zararsiz I, Sarsilmaz M. The effects of the inhaled formaldehyde during the early postnatal period in the hippocampus of rats: A morphological and immunohistochemical study. Neuroscience Research Communications. 2003;33(3):78-168.

16. Chou J. Hazardous gas monitors: a practical guide to selection, operation and applications: McGraw-Hill Professional; 2000.

17. Singla M, Walia M, Singh M, Mahapatra P, Pandey L, Jain S. Formaldehyde concentration measuring system: An optoelectronic device. 2004.

18. Paul Thomas C, Meunier F, Veasey C, McGill C. Effect of relative humidity on the determination of formaldehyde with the NIOSH 3500 method (chromotropic acid method). Analytical Communications-Royal Society Of Chemistry. 1988;6-35:103.

19. Anjamrooz SH, Movahedin M, Mowla SJ, Pour Bairanvand S. Assessment of morphological and functional changes in the mouse testis and epididymal sperms following busulfan treatment. Iranian Biomedical Journal. 2007;11(1):15-22.

20. Kiernan JA. Histological and histochemical methods: Med Council on Alcohol; 1990.

21. Organization WH. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen: World Health Organization; 2010.

22. Krause W. Computer-assisted semen analysis systems: comparison with routine evaluation and prognostic value in male fertility and assisted reproduction. Human Reproduction. 1995;10(suppl 1):60.

23. Verstegen J, Igner-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. Theriogenology. 2002;57(1):79-149.

24. Leblond C, Clermont Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. Annals of the New York Academy of Sciences. 1952;55(4):73-548.

25. Van der Horst G, Maree L. SpermBlue®: A new universal stain for human and animal sperm which is also amenable to automated sperm

منابع

- Krzyzanowski M, Cohen A. Update of WHO air quality guidelines. Air Quality, Atmosphere & Health. 2008;1(1):13-7.
- Tang X, Bai Y, Duong A, Smith MT, Li L, Zhang L. Formaldehyde in China: Production, consumption, exposure levels, and health effects. Environment international. 2009;35(8):24-121
- Cogliano VJ, Grosse Y, Baan RA, Straif K, Secretan MB, El Ghissassi F. Meeting report: summary of IARC monographs on formaldehyde, 2-butoxyethanol, and 1-tert-butoxy-2- propanol. Environmental Health Perspectives. 2005;113(9):1205.
- Naya M, Nakanishi J. Risk assessment of formaldehyde for the general population in Japan. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 2005;43(3): 48-232.
- Liteplo R, Meek M. Inhaled formaldehyde: exposure estimation, hazard characterization, and exposure-response analysis. Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews. 2003;6(1):85-114.
- Arican RY, Sahin Z, Ustunel I, Sarikcioglu L, Ozdem S, Oguz N. Effects of formaldehyde inhalation on the junctional proteins of nasal respiratory mucosa of rats. Experimental and Toxicologic Pathology. 2009;61(4):297-305.
- Gulec M, Gurel A, Armutcu F. Vitamin E protects against oxidative damage caused by formaldehyde in the liver and plasma of rats. Molecular and cellular biochemistry. 2006;290(1):-61.
- Turkoglu Ao, Sarsilmaz M, Kus I, Songur A, Ozyurt H, Akpolat N, et al. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents formaldehyde-induced neuronal damage in hippocampus of rats. www neuroanatomy org. 2007;71,6-66.
- Chowdhury AR, Gautam A, Patel K, Trivedi H. Steroidogenic inhibition in testicular tissue of formaldehyde exposed rats. Indian journal of physiology and pharmacology. 1992;36(3):162.
- Zhou DX, Qiu SD, Zhang J, Wang HX. Effect of Formaldehyde on Spermatogenesis and Testicular Morphology in Adult Rats. Journal of US-China Medical Science. 2006;3(3):58-60
- Zhou DX, Qiu SD, Zhang J, Tian H, Wang HX. The protective effect of vitamin E against oxidative damage caused by formaldehyde in the testes of adult rats. Asian journal of andrology. 2006;8(5):8-584.
- Working PK. Male reproductive toxicology:



morphology analysis. Biotechnic & Histochemistry. 2010;84(6): 299-308.

26. Khan A, Bachaya H, Khan M, Mahmood F. Pathological effects of formalin (37 % formaldehyde) feeding in female Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). Human & experimental toxicology. 2005;24(8):415.

27. Reproductive NRCSO, Toxicology D, Studies NRCBoE, Toxicology NRCCo. Evaluating chemical 2001.

28. Foster P, Creasy DM, Foster JR, Gray T. Testicular toxicity produced by ethylene glycol monomethyl and monoethyl ethers in the rat. Environmental Health Perspectives. 1984;57:207.

29. Silva DA, Teixeira CT, Scarano WR, Favareto APA, Fernandez CDB, Grotto D, et al. Effects of methylmercury on male reproductive functions in Wistar rats. Reproductive Toxicology. 2011.

30. Mazzilli F, Rossi T, Marchesini M, Ronconi C, Dondero F. Superoxide anion in human semen related to seminal parameters and clinical aspects. Fertility and sterility. 1994;62(4):862.

31. Kao SH, Chao HT, Chen HW, Hwang TIS, Liao TL, Wei YH. Increase of oxidative stress in human sperm with lower motility. Fertility and sterility. 2008;89(5):90-1183.

32. Anzar M, Graham E. Role of sperm motility and acrosome integrity in the filtration of bovine semen. Theriogenology. 1996;45(2):20-513.

33. Pasqualotto FF, Sharma RK, Nelson DR. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. Fertility and sterility. 2000;73(3): 64-459.

34. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility- a clinical perspective. Human reproduction update. 2008;14(3):243.

35. Odeigah P. Sperm head abnormalities and dominant lethal effects of formaldehyde in albino rats. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 1997;389(2-3):8-141.

Toxic Effects of Formaldehyde Vapors on Testicular tissue and Sperm Parameters in Adult Mice

S. Vosoughi¹, A. Khavanin², M. Salehnia³, H. Ailian⁴, V. Esmaeili⁵

Received: 2011/11/11

Revised: 2012/04/16

Accepted: 2012/06/12

Abstract

Background and aims: Formaldehyde ($\text{H}_2\text{C=O}$), is a member of aldehyde family with the simplest organic molecules, used in various industries. The aim of this experimental study was to investigate the detrimental effects of formaldehyde on testicular tissue and sperm quality in mice.

Methods: Thirty six mature male NMRI mice were randomly divided into three equal groups ($n=12$). Group F1 (low concentration) and group F2 (high concentration) were exposed to formaldehyde vapour corresponding to inhalation chamber concentration of 10 and 20 ppm respectively for 10 days (8 hours per day), while the third group received fresh air as the control group. Following exposure, half of the experimental animals in each group ($n=6$), were sacrificed after 24 h to detect short-term effects and the other animals ($n=6$) after 35 days to detect long term effects, the epididymal tissues were taken for sperm analysis as well as testes removed for histological examination.

Results: The results of long-term effects study showed that the epididymal sperm concentration and the percentage of progressive sperm motility significantly decreased ($p<0.01$), the abnormal sperm rate significantly increased ($p<0.01$) in both experimental groups compared to the control group. Testicular histology analysis, 35 days after exposure showed that formaldehyde induces alterations such as epithelial vacuolization and seminiferous tubles atrophy.

Conclusion: The inhaled formaldehyde can destroy testicular tissue and decrease sperm quality.

Keywords: formaldehyde - testis - histological changes - sperm parameters – mouse.

1. PhD Candidate, Department of Occupational Health, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. vosoughi@modares.ac.ir

2. (Corresponding author) Associated Professor, Department of Occupational Health, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. khavanin@modares.ac.ir

3. Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

4. Assistant Professor, Department of Occupational Health, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

5. MSc., Embryology Department, Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute, ACECR, Tehran, Iran.