

SUBAKUT DÖNEMDE SOLUNAN FORMALDEHİTİN SIÇANLARIN LEYDİĞ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ HİSTOPATOLOJİK ETKİLERİ

Mustafa SARSILMAZ, Oğuz Aslan ÖZEN, Nusret AKPOLAT, İltter KUŞ, Ahmet SONGUR

Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Elazığ / TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 21.01.2000

The Histopathologic Effects Of Inhaled Formaldehyde On Leydig Cells Of The Rats In Subacute Period.

SUMMARY

This study was planned to research effects of subacute formaldehyde exposure on Leydig cells in the rat, since literature on this subject is limited.

Adult male wistar rats were exposed for 4 weeks (8 h/day; 5 days/week) to 0 (control), 10 and 20 ppm formaldehyde vapour. Gradual diminution in body weight gain and Leydig cell population was observed in both test groups. Various types of nuclear damage in Leydig cells was quantitatively determined in the experimental groups. Subacute inhalation of formaldehyde vapour caused structural impairment of Leydig cells.

These adverse effects on the rat Leydig cells inhaled formaldehyde have shown that other body organs except respiratory system should be investigated by researchs in different times and concentrations.

Key words: Formaldehyde; inhalation; leydig; subacute.

ÖZET

Bu çalışma, bu konudaki bilgiler yeterli olmadığından, subakut sürede solunan formaldehitin sıçanların leydig hücreleri üzerine etkilerini araştırmak için planlanmıştır.

Erişkin Wistar cinsi erkek sıçanlar 4 hafta boyunca haftada 5 gün, günde 8 saat olmak üzere 0 (Kontrol), 10 ve 20 ppm formaldehit gazına maruz bırakıldı. Vücut ağırlığı artışlarında ve Leydig hücre sayısında her iki uygulama grubunda kademeli azalma gözlemlendi. Ayrıca deney gruplarındaki Leydig hücrelerinde değişik tipte çekirdek hasarları tespit edildi. Formaldehit gazının subakut solunumu Leydig hücrelerinin yapısal olarak bozulmasına sebep oldu.

Solunan formaldehitin sıçanların Leydig hücrelerine yaptığı bu olumsuz etkiler solunum sistemi dışındaki diğer organlarda da değişik zaman ve konsantrasyonlarda detaylı araştırma yapılmasının önemini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Formaldehit; solunum; leydig; subakut

GİRİŞ

Formaldehit renksiz bir gazdır, suda çok iyi çözünür. Saf formu iritan ve keskin kokuludur. Formaldehit günümüzde çok yaygın olarak kullanılan bir kimyasal maddedir. Örneğin; tıp anatomide kadavrafiksasyonu, histoloji ve patoloji laboratuvarlarında dokuların fiksasyonu ve dezenfeksiyon işlemleri formaldehit ile yapılmaktadır. Ayrıca boya, plastik, yapı malzemeleri, tekstil, kağıt ve kozmetik endüstrileri gibi değişik alanlarda kullanılmaktadır. Bu kadar yaygın bir şekilde kullanılan ve bulunduğu her ortamda sürekli gaz haline dönüşen formaldehitin hayvan deneylerinde üst ve alt solunum yollarına zararları, mutajen, kanserojen olduğu gösterilmiştir(1).

Bu nedenle resmi bazı kuruluşlar tarafından (Occupational Safety and Health Administration OSHA, National Institute for Occupational Safety and Health-NIOSH gibi) solunum havasında bulunması gereken formaldehit konsantrasyonunun üst sınırı belirlenmiştir(2,3,4).

Testisler üremenin olması için hayati organlardır. Endokrin ve ekzokrin bez olarak işlev gören testisin, endokrin görevi Leydig hücrelerinden testosteron salgılanması, ekzokrin görevi ise spermatogenesis'dir(5). Spermatogenezisin olması için testosteron hormonu şarttır. Bu da Leydig hücrelerinin kilit rolünü gösterir. Formaldehitin Leydig hücreleri üzerine olumsuz etkileri

intraperitoneal uygulamalarla gösterilirken, solunum yoluyla alınan formaldehitin Leydig hücreleri üzerindeki etkileri detaylı araştırılmamıştır(6,7). Halbuki formaldehitin sebze ve meyvelerin yapısında bulunması ve sindirim yoluyla alınması doğal olmasına karşın; havada bulunması çevre kirliliğidir ve solunum yolu ile alınması normal değildir(8). Bundan hareketle solunan formaldehitin leydig hücreleri üzerine olan etkilerinin araştırılması amacıyla bu çalışma planlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Çalışmamızda formaldehit gazı, Chang ve arkadaşlarının tanımladığı metoda göre paraformaldehitin (Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany) ısıtılarak depolimerize edilmesiyle elde edildi(9). Solunan havadaki formaldehit konsantrasyonu, düzenli aralıklarla OSHA (Occupational Safety and Health Administration) tavsiyeli formaldehit ölçen cihaz (Enviromental Sensors Co. Boca Raton FL 33431 USA- Catalog No: MVN-300) ile tespit edildi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyomedikal Araştırma Ünitesi'nden temin edilen, erişkin erkek albino Wistar cinsi 250 ± 5 gm ağırlığındaki sıçanlardan, her grupta 10 adet olmak üzere üç grup rasgele oluşturuldu. bir haftalık alıştırmaya süresinden sonra 0(kontrol), 10 ve 20 ppm konsantrasyonlarındaki formaldehit gazı, yatay yerleştirilmiş 100 lt. hacmindeki cam odalara alttan gidecek biçimde ve sıçanların tüm vücudunu etkileyecek şekilde 4 hafta boyunca haftada 5 gün ve günde sekiz saat olmak üzere kesintisiz verildi. Formaldehit uygulanırken cam odalardaki hava akışı 10 lt/dk, ısı 25 ± 2 °C, nem oranı %45-55 ve ışık döngüsü 12 saat aydınlık/karanlık şeklindeydi. Her üç gruba da formaldehit uygulaması esnasında su ve yem verilmedi. Uygulama sonrasında ise tüm gruplara yeme ve içme serbest bırakıldı. Sıçanların günlük fizik muayenesi yapıldı.

4 haftalık formaldehit uygulamasından sonra her gruptaki 10 sıçan eter anestezisi altında dekapitasyonla öldürüldü, organları çıkarıldı ve patolojik değişiklikler yönünden makroskopik olarak muayene edildi.

Ağırlık Ölçümleri: Vücut ağırlıkları deney sırasında her hafta kaydedildi. 29. günde hayvanlara otopsi yapıldı, komşu dokulardan temizlenen testisler tartıldı.

Histolojik Çalışma: Her gruptan alınan testisler Bouin solüsyonunda tespit edildi, dehidratasyon işleminden sonra parafin bloklara gömüldü. Mikrotomda 5µm kalınlığında kesitler alınarak, hematoxylene-eozin ile boyandı. X400 büyütmede leydig hücreleri saptandı ve her grupta 10 intersitisiyal alan tespit edilerek sayıldı.

Her üç gruba ait sıçanların Leydig hücrelerinde meydana gelen değişik tipteki çekirdek hasarları incelendi ve toplam hücre sayısındaki miktarı yüzde olarak kaydedildi.

Bulunan değerler "Minitab 10" bilgisayar istatistik programında "One-Way" varyans analizi kullanılarak değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmamız sonucu elde edilen bulgular üç alt başlıkta toplandı.

1- Klinik Bulgular: Klinik olarak ilk ortaya çıkan bulgular tüylerin dikleşmesi, sık göz kırpması, aşırı yalanma, burun temizliğinde artma, kesik nefes alma, sık aksırma şeklindeki iritasyon bulgularıydı. Formaldehit uygulamasından 10 gün sonra tüylerde sararma görüldü.

2- Vücut ve Testis Ağırlıkları: II. ve III. gruptaki sıçanların vücut ağırlığı artışlarında kontrol grubundaki sıçanlara göre belirgin bir azalma ($p < 0.001$) görüldü (tablo-1).

Her iki grubun testis ağırlıklarında ise kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma meydana gelmedi (tablo-2).

Tablo 1: Farklı konsantrasyonlarda solunan formaldehitin sıçan vücut ağırlık artışlarına yüzde olarak etkisi.

Uygulanan	Gruplar	N	Ağırlık artışları (%)	p
0 ppm(Kontrol)	I	10	17.74±3.37	
10 ppm	II	10	4.66±1.45	<0.001
20 ppm	III	10	2.63±0.76	<0.001

Değerler Ortalama± St.Sapma olarak gösterilmiştir.

Tablo 2: Farklı konsantrasyonlarda solunan formaldehitin sıçan testis ağırlıklarına etkisi.

Uygulanan	Gruplar	N	Testis Ağırlıkları*	p
0 ppm(Kontrol)	I	10	0.93±0.03	
10 ppm	II	10	0.92±0.06	>0.05
20 ppm	III	10	0.89±0.06	>0.05

*Testis ağırlıkları son günkü vücut ağırlığına düşen testis ağırlığının yüzde değeridir.

Değerler Ortalama± St.Sapma olarak gösterilmiştir.

Tablo 3: Farklı konsantrasyonlarda solunan formaldehitin Leydig hücre sayısına etkisi

Uygulanan	Gruplar	N	Leydig hücre sayısı	p
0 ppm(Kontrol)	I	100	47.27±7.8	
10 ppm	II	100	45.04±7.8	<0.05
20 ppm	III	100	44.36±7.5	<0.01

Leydig hücreleri her grup için 100 alanda sayıldı. Değerler Ortalama± St. Sapma olarak gösterilmiştir.

Tablo 4: Farklı konsantrasyonlardaki formaldehitin sıçan Leydig hücrelerinde değişik tipteki çekirdek hasarları.

Uygulanan	Gruplar	Normal	Piknotik	Karyorektik	Karyolitik
0 ppm(Kontrol)	I	98	2	—	—
10 ppm	II	92	2	4	2
20 ppm	III	76	9	10	5

Değerler her gruptaki toplam hücre sayısına düşen yüzdelerdir. Her grup için 100 alan incelenmiştir yapıda olduğu gözlenmektedir. st : Seminifer Tubul, → : Leydig hücresi. (H.E.X1000).

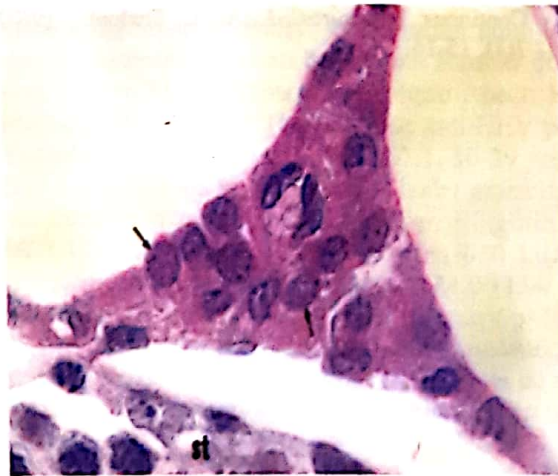
3- Histopatolojik Bulgular:

a) *Makroskobik Bulgular:* Otopsi yapılan hem kontrol hem de formaldehit uygulanan gruplardaki hayvanlarda anormal makroskobik bir bulguya rastlanmadı.

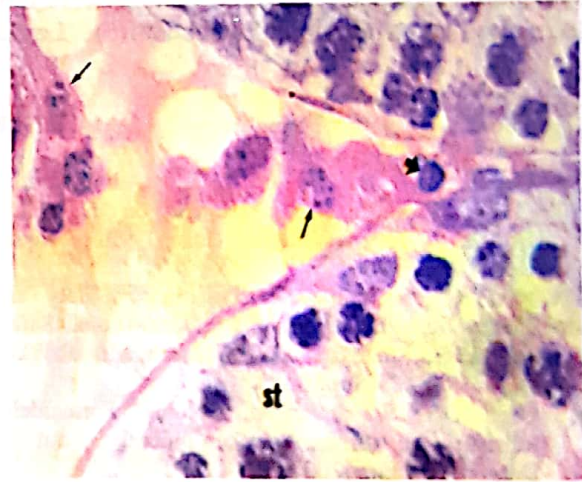
b) *Mikroskobik Bulgular:* Işık mikroskop altında X400 büyütmede her grup için seçilen 100 interstisyel alanda Leydig hücreleri incelendi. Buna göre kontrol grubundaki sıçanların Leydig hücre sayısı normal sınırlar içindeydi(Tablo-3). Çekirdek hasarı yönüyle sadece %2 oranında piknotik hücre belirlendi(tablo-4).

Bu da normal sınırlar içinde kabul edildi(şekil-1)(4).Formaldehit uygulanan II. ve III. grup sıçanların Leydig hücre sayısında; her iki grupta da anlamlı olmak üzere, II. grupta hafif ($p<0.05$),

III. grupta ise daha belirgin ($p<0.01$) azalma görüldü (tablo-3). Yine her iki grubun Leydig hücrelerinde değişik tipte çekirdek hasarları tespit edildi (şekil-2), (tablo-4). Çekirdek hasarlarındaki artma hücre sayısındaki azalmayla paralellik gösterdi.



Şekil 1. Kontrol grubuna ait sıçanların seminifer tubul ve etrafındaki Leydig hücrelerinin normal



Şekil 2. Deney gruplarına ait sıçanların Leydig hücrelerinde azalma ve dejeneratif değişiklikler gözlenmektedir. st : Seminifer Tubul, → : Karyorektik Leydig hücresi, ➤: Piknotik Leydig hücresi. (H.E.X1000).

TARTIŞMA

Literatür taramalarında solunum yoluyla alınan formaldehitin testisler üzerine olan etkisini gösteren detaylı çalışmalara rastlanmamıştır(7). Mevcut literatürler ise formaldehitin intraperitoneal yoldan verilmesine dayanan bazı çalışmalardır(6,10). Bu nedenle bulgularımızı intraperitoneal yoldan verilen formaldehitin testisler üzerindeki etkisini gösteren araştırmalar ile kıyasladık. Kıyaslamalarda ortaya çıkan bulgular, her iki yoldan (solunum yolu ve intraperitoneal yol) uygulanan formaldehitin testisler üzerinde birbirine yakın etkiler gösterdiği şeklinde ortaya çıkmıştır. Roy Chowdhury ve arkadaşları 30 gün boyunca üç grup halinde intraperitoneal uyguladıkları formaldehitin (5-10-15mg/kg), vücut ve

testis ağırlıkları üzerinde belirgin bir azalma ($p<0.01$) olduğunu göstermişlerdir(6). Roy Chowdhury'nin vücut ağırlığındaki azalma bulgusu bizim çalışmamızda daha belirgindir ($p<0.001$). Bunun sebebi Roy Chowdhury'nin çalışmasında daha genç ve düşük vücut ağırlıklı ($150\pm 5g$) sıçanlar kullanması olabilir. Testis ağırlığındaki azalma intraperitoneal uygulamada her üç grupta da belirgin ($p<0.05$, $p<0.01$) bizim çalışmamızdaki azalma belirgin değildir ($p>0.05$).

Vücut ve testis ağırlığında ortaya çıkan azalmalar, çeşitli yazarlarca, formaldehitin sitotoksik etkisine bağlanmakta ve Einknis'in de çalışmasında gösterdiği şekilde formaldehitin nükleik asit ve protein sentezini durdurma özelliğiyle açıklanmaktadır(11,12).

Leydig hücreleri testisin endokrin salgı fonksiyonunu üstlenerek testosteron üretimiyle ve böylece spermatogenezisi sağlamaktadır(5). Leydig

hücrelerinin yapısal olarak bozulması testosteron sentezini azaltacak ve spermatogenezisi yavaşlatacaktır. Roy Chowdhury'nin çalışmasında Leydig hücre sayısında artan dozla çoğalan belirgin bir azalma ($p<0.001$) ve aynı şekilde çekirdek hasarlarında artış göze çarpmaktadır. Çalışmamızda da Leydig hücre sayısının artan doza bağlı anlamlı olarak azalması ($p<0.05$, $p<0.01$) ve çekirdek hasarlarındaki artışın bunu desteklemesi intraperitoneal uygulama kadar şiddetli olmamakla beraber solunan formaldehitin Leydig hücrelerine olan zararlı etkilerini göstermektedir.

Solunan formaldehitin subakut sürede Leydig hücreleri üzerinde yaptığı olumsuz etkiler, konunun önemini göstermektedir (13). Havadaki formaldehitin solunum sistemi dışındaki diğer organlar üzerindeki etkileri, değişik zaman ve konsantrasyonlarda detaylı araştırıldığı takdirde, konu bir bütün halinde açıklığa kavuşacaktır.

KAYNAKLAR

1. Council Report: Formaldehyde, JAMA, 1989; 261:1183-1187.
2. Occupational Safety and Health Administration (1984). Preliminary Assessment on the Health Effects of Formaldehyde, Occup. Safety Health Rep. 14, 476-486.
3. National Institute for Occupational Safety and Health. Recommendations for Occupational Safety and Health Standards, MMWR Morb. Mortal Wkly. Rep. (1986),35(Suppl), 1S.
4. Özen OA, Sarsılmaz M, Solunan Formaldehit toksisitesi ve Alınması gereken önlemler. Fırat Tıp Dergisi, (Baskıda)2000:
5. Bortolüsi M., Zanehetta R., Belvedere P. and Colombo L. Sertoli and Leydig Cell Numbers and Gonadotropin Receptors in Rat Testis from Birth to Puberty. Cell Tissue Res. (1990). 260,185-191.
6. Roy Chowdhury A., Gautam A.K., Patel K.G., Trivedi H.S. Steroidogenic Inhibition in Testicular Tissue of Formaldehyde Exposed Rats.Indian J. Physiol. Pharmacol. (1992).36(3),162-68.
7. Vural G. Formaldehit Soluyan Sıçanlarda Görülen Histopatolojik Değişiklikler. Türk Patoloji Dergisi. (1993). 9-(1); 42-47.
8. Patrizia R., Corrado L.G. Oral Toxicity of Formaldehyde and Its Derivates. Critical Reviews In Toxicology. (1991), 21, 315-328.
9. Chang J.C., Steinhagen W.H., Barrow C.S. Effect of Single or Repeated Formaldehyde Exposure on Minute Volume of B6C3F1 Mice and F-344 Rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. (1981), 61(3),451-459.
10. Majumder P.K., Kumar V.L. Inhibitory Effects of Formaldehyde on the Reproductive System of Male Rats. Indian J. Physiol. Pharmacol. (1995),39, 80-82.
11. Ma T.H., Harris M.M. (1988). Review of the Genotoxicity of Formaldehyde. Mut. Res. 196, 37-59.
12. Feldman M. Ya Reactions of Nucleic Acids and Nuclearoproteins with Formaldehyde. Prog. Nucl. Acids Res. Mol. Biol. (1975). 13, (1), - 49.
13. Wilmer J.W.G.M., Woutersen R .A., Appelman L.M., Leeman W.R., Feron V.J. Subacute (4 week) Inhalation Toxicity Study of Formaldehyde in Male Rats: 8 Hours Intermittent Versus, 8 Hours Continuous Exposures. J. Appl. Toxicol. (1987). 7(1), 15-16.