

تأثیر مواد پایدارکننده جایگزین شونده فرمالین بر نتیجه رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین

علی انیسیان^۱، مریم عیدی^۲

^۱استادیار پاتولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ابهر، ابهر، ایران.

^۲دانشیار فیزیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا، ورامین، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: امروزه فرمالین به عنوان یک فیکساتیو خوب و ارزان، ولی بسیار مضر برای سلامتی انسان مورد توجه قرار دارد. این ماده از جمله مواد شیمیایی است که به طور سنتی در آزمایشگاه‌های پاتولوژی و آناتومی به عنوان یک پایدارکننده استفاده می‌شود و افراد شاغل در این بخش‌ها نیز تحت تأثیر اثرات زیانبار آن قرار دارند. در این مطالعه تأثیر مواد پایدارکننده جایگزین شونده فرمالین بر نتیجه رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین بررسی گردید.

روش بررسی: در این مطالعه، از سه نوع ماده فیکساتیو که تاکنون به عنوان جایگزین شونده فرمالین معرفی شده‌اند، همراه با فرمالین ۱۰٪ بافر شده، استفاده گردید. این فیکساتیوها به ترتیب با حروف K, B و M نامگذاری و شناسایی شدند. سپس قطعات کبد خرگوش در ظروف حاوی هر کدام از این فیکساتیوها قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت، بافت‌ها فرآوری شده، و عمل قالب گیری با پارافین انجام گرفت. در ادامه، برش‌ها با روش رایج رنگ آمیزی H & E رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری بررسی شدند.

یافته‌ها: در مجموع، نتیجه حفظ و نگهداری ساختار بافتی و رنگ آمیزی بافت‌های فیکس شده با فیکساتیو M نسبت به دیگر فیکساتیوها مطلوب تر بود.

نتیجه گیری: در این مطالعه، دو نوع از سه نوع ماده فیکساتیو با داشتن بعضی محاسن و معایب نسبت به فرمالین باعث پایداری مطلوب بافت‌ها شده و نتیجه رنگ آمیزی قابل قبولی داشتند. در نتیجه می‌توان آنها را کاندیدای مناسبی برای جایگزینی فرمالین دانست.

کلید واژه‌ها: فرمالدئید؛ رنگ و برچسب زدن بافت‌ها؛ تثبیت کننده‌ها؛ آسیب شناسی.

نویسنده مسئول مکاتبات: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ابهر، ابهر، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی: anissian@abhariau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۹/۴/۶ تاریخ پذیرش: ۸۹/۶/۲۳

مقدمه

فرمالدئید اولین بار توسط دانشمند روسی به نام الکساندر باتلرف در ۱۸۵۹ کشف شد. فرمالدئید گازی با بوی تند است. این ترکیب ساده ترین عضو گروه آلدئیدها بوده و به آسانی از احتراق ناقص ترکیبات حاوی کربن ایجاد می‌شود. فرمالدئید در دمای اتاق به صورت گاز است، اما در آب به خوبی حل شده و به صورت محلول آبی ۳۷٪ به نام فرمالین عرضه می‌شود. امروزه این ماده به علت داشتن خواص شیمیایی موجود در آن، به عنوان یک فیکساتیو خوب و ارزان، ولی بسیار مضر برای سلامتی انسان مورد

توجه قرار دارد که بر این اساس مطالعات متعددی نیز بر روی خواص آن صورت گرفته است. طبق اطلاعات موجود در مؤسسه بین المللی تحقیقات سرطان، فرمالدئید جزء دسته موادی است که برای انسان سرطان زا می‌باشد (۱). فرمالدئید از جمله مواد شیمیایی است که به طور سنتی در آزمایشگاه‌های پاتولوژی و آناتومی به صورت یک پایدارکننده استفاده می‌شود. در مطالعات اپیدمیولوژیک متعددی در خصوص مواجهه شغلی با فرمالدئید، مشخص شده است که در افراد مورد مواجهه با این ماده، ریسک سرطان حلق و بینی بیشتر است (۲). آناتومیست‌ها و دانشجویان

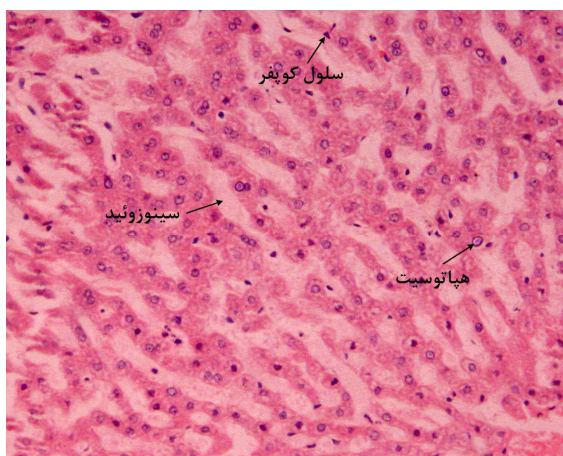
S-HT (S-Hydroxy Tryptamine) به‌طور مشخص در بخش پیشانی قشر مخ پس از استنشاق فرمالدئید مشاهده شده است (۱۵). مواجهه با فرمالدئید باعث تحریک مخاط دهان، مجاری فوقانی تنفسی و ناهنجاری‌های تنفسی می‌شود (۱۶)، ولی مکانیسم آن هنوز مشخص نشده است. از آنجا که ماست سل‌ها به‌طور گسترده در سرتاسر مجاری هوایی پخش می‌باشند، به‌نظر می‌رسد که فرمالدئید با تأثیر بر این سلول‌ها، باعث ایجاد ازدیاد حساسیت می‌شود (۱۷). امروزه فیکساتیوهای گوناگونی تولید شده‌اند که ادعا می‌شود دارای همان اثرات مثبت فرمالین در پایدارسازی بافت و فاقد اثرات منفی آن هستند. این مطالعه با هدف تعیین کیفیت پایدارسازی فیکساتیوهای جدید در مقایسه با فرمالین و امکان‌سنجی جایگزینی فرمالین با این مواد صورت گرفت.

روش بررسی

سه نوع ماده فیکساتیو که تاکنون به‌عنوان جایگزین شونده فرمالین معرفی شده‌اند، از شرکت‌های خارجی و داخلی تهیه و همراه با فرمالین ۱۰٪ بافر شده، فیکساتیوهای این مطالعه را تشکیل دادند. این فیکساتیوهای غیرفرمالینی، پایه الکلی داشته و به‌ترتیب با حروف B, K و M نامگذاری و شناسایی شدند. سپس نمونه‌برداری از بافت کبد خرگوش نژاد داج خریداری شده از انستیتو پاستور صورت گرفت. بافت‌ها در اندازه‌های ۱ در ۱ با قطر ۵cm تقسیم و در ظروف حاوی ۵۰cc از هر سه فیکساتیو نام برده، قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت، بر روی بافت‌ها عمل آبگیری، شفاف‌سازی و آکنده‌گی انجام شد. سپس قالب‌گیری با پارافین به عمل آمد. براساس جدول کوهن، ضریب اثر ۰/۵، توان آزمون (Beta - ۱) ۹۰٪ و $\alpha=0/05$ ، حداقل حجم نمونه (۲۸ مورد) انتخاب شد. تعداد ۳۰ برش از عمق ۲mm بافت کبد فیکس شده با هر کدام از فیکساتورهای بالا، با ضخامت ۵μm تهیه گردید. سپس نوع فیکساتیو هر برش بر روی لام مربوطه به وسیله قلم الماس نوشته شد، و برش‌ها با روش رایج رنگ‌آمیزی H & E رنگ‌آمیزی شدند. پس از انجام رنگ‌آمیزی و چسباندن لام، قبل از مطالعه تمام مشخصات نوشته شده بر روی اسلایدها با برچسبی پوشانده شد؛ تا مطالعه به‌صورت کور انجام پذیرد. اسلایدها براساس کیفیت حفظ ساختار کلی لبول‌های کبدی، کیفیت رنگ‌پذیری هپاتوسیت‌ها، شکل، آرایش و انسجام هپاتوسیت‌ها، کیفیت

پزشکی به میزان بیشتری از سایر گروه‌های شغلی در مواجهه با این ماده خطرناک قرار دارند؛ زیرا هنگام تشریح، در مواجهه با بخارات فرمالینی زیادی قرار می‌گیرند (۳). اثرات مضر فرمالین با افزایش دمای محیط افزایش یافته و استنشاق آن در دوران نوزادی باعث ایجاد بیماری‌های عصبی در بزرگسالی می‌شود (۴). مطالعه بر روی موش‌ها نشان داده است استفاده از غلظت‌های زیاد گاز فرمالدئید در مدت زمان طولانی باعث کارسینومای سلول‌های سنگفرشی بینی می‌گردد. اگرچه مطالعات اپیدمیولوژیک در خصوص مرگ و میر کارکنان پزشکی در مواجهه با فرمالدئید، کارسینوزن بودن آن را به‌طور کامل تأیید نکرده است (۵)، اما فرمالدئید به‌صورت کووالانسی با پروتئین‌ها ترکیب شده و کنژوگه‌های پروتئین فرمالدئید را تشکیل می‌دهد. این مسئله ممکن است منجر به تشکیل آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه فرمالدئید شود. سرم‌های به دست آمده از موش‌های آلوده با فرمالدئید نشان داده است که القای آنتی‌بادی‌ها نسبت به فرمالدئید، آلبومین در ۵۰٪ از حیوانات در ۳ ماهگی و ۶ ماهگی و تیتراژ آنتی‌بادی در ۶ ماهگی بالاتر بوده که در نتیجه پاسخ آنتی‌بادی و طول مدت زمان مواجهه نیز بیشتر بوده است (۶). فرمالدئید می‌تواند در افرادی که به‌صورت طولانی مدت در مواجهه با آن قرار دارند باعث آسم شود (۷). ولی مکانیسم مولکولی آن که علت اصلی می‌باشد، هنوز به‌خوبی شناخته نشده است (۸). در تحقیقات نشان داده شد در موش‌های مواجهه شده با ۱۵ppm فرمالدئید، تکثیر سلول‌های لنفو اپی‌تلیوم افزایش می‌یابد. همچنین در مطالعه‌ای که بر پلی‌مورفیسم ژنتیکی افراد در مواجهه با فرمالین به عمل آمد، هیچ اثر شاخصی بر نقاط پایانی ژنوتوکسیک یافت نشد (۹). در نتایج این مطالعه هایپرپلازی لنفو اپی‌تلیوم بافت لنفاوی دستگاه تنفس تنها تأثیر قابل تشخیص بخارات فرمالدئید بر روی بافت‌های لنفاوی منطقه تنفسی بود (۱۰). اگرچه عقیده بر این است که بخارات فرمالدئید باعث اختلال در مسیرهای ترمیمی DNA شده (۱۱) و بدین وسیله به‌صورت مؤثری باعث افزایش ریسک ایجاد سرطان می‌شود (۱۲). همچنین مشخص شده است تماس با فرمالدئید برای سیستم عصبی پستانداران سمی است (۱۳). طبق بررسی‌ها، موش‌های نر ارکی دکتومی شده پس از مواجهه با فرمالدئید نسبت به موش‌های شاهد، رفتارهای پرخاشگرانه بیشتری نشان می‌دهند (۱۴). در ضمن، افزایش دوپامین و کاهش

در مطالعه میکروسکوپی بافت‌های کبد فیکس شده فیکساتیو K مشاهده گردید که بافت‌های فیکس شده با این فیکساتیو گرچه دارای سازمان و معماری طبیعی بافت کبدی بودند و ساختار کلی لوب‌های کبدی در آنها قابل رؤیت بود، ولی شکل، آرایش و انسجام هپاتوسیت‌ها مانند آنچه که در نمونه‌های فیکس شده در فرمالین وجود داشت، به‌خوبی حفظ نشده بود و به‌صورت چروکیده و گاهی بدون اتصال به یکدیگر دیده می‌شد. هسته بعضی از هپاتوسیت‌ها نیز علایمی از شروع نکروز را نشان می‌داد و پیکنوز در تعدادی از آنها مشهود بود. کیفیت رنگ‌پذیری هپاتوسیت‌ها مطلوب و هسته‌ها به‌صورت بازوفیلیک، یوکروماتیک و سیتوپلاسم آنها به‌صورت ائوزینوفیلیک مشاهده شد. کنتراست بین هسته و سیتوپلاسم نسبتاً واضح و قابل رؤیت بود. با چروکیدگی هپاتوسیت‌ها، سینوزوئیدها متسع به‌نظر می‌رسیدند، ولی سلول‌های کوپفر در حاشیه آنها با هسته‌های هتروکروماتین و زاویه‌دار قابل شناسایی بودند. اجزای تشکیل دهنده قطعه باب از قبیل مجرای صفراوی، سرخرگچه و سیاهرگچه باب با رنگ‌پذیری مطلوب سلول‌های تشکیل دهنده آنها، کاملاً واضح و قابل تشخیص بود (شکل شماره ۲).



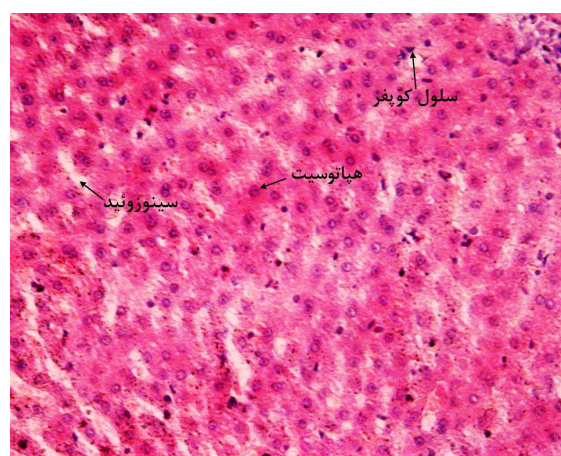
شکل شماره ۲: بافت کبدی فیکس شده با فیکساتیو K- هپاتوسیت‌ها چروکیده شده و سینوزوئیدها متسع به‌نظر می‌رسند.
(H & E Staining, 20x)

مطالعه میکروسکوپی بافت‌های کبد فیکس شده با فیکساتیو B نشان داد بافت‌های فیکس شده با این فیکساتیو از نظر کلی بسیار شبیه به بافت‌های فیکس شده با فرمالین می‌باشند. سازمان و معماری بافت، طبیعی بوده و ساختار کلی لوب‌های کبدی به‌طور

رنگ‌پذیری هسته، کروماتین، هستک، سیتوپلاسم و نیز کنتراست بین هسته و سیتوپلاسم و اجزای تشکیل دهنده قطعه باب بررسی شدند. امتیازدهی براساس متغیرهای فوق از "+" تا "++++" صورت گرفت. داده‌ها به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۳، روش کروسکال-والیس و تست تکمیلی من‌ویتنی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

در این بررسی مطالعه میکروسکوپی بافت‌های کبد فیکس شده فرمالین نشان داد بافت‌های فیکس شده با این فیکساتیو دارای سازمان و معماری طبیعی بافت کبدی بوده و ساختار کلی لوب‌های کبدی به‌طور طبیعی قابل رؤیت هستند؛ یعنی سیاهرگ مرکز لوبی در بخش میانی لوب و دستجات هپاتوسیت به‌صورت شعاعی در اطراف آن قرار داشتند. کیفیت رنگ‌پذیری هپاتوسیت‌ها نسبتاً مناسب بوده و هسته‌ها به‌صورت بازوفیلیک و یوکروماتیک مشاهده و سیتوپلاسم آنها به‌صورت ائوزینوفیلیک دیده شد. همچنین شکل، آرایش و انسجام هپاتوسیت‌ها؛ یعنی اندازه، شکل و ارتباط سلول‌ها با هم به‌صورت آنچه که در بافت‌شناسی طبیعی کبد آمده، حفظ شده بود. سینوزوئیدها در اندازه‌های طبیعی بوده و سلول‌های کوپفر در حاشیه آنها با هسته‌های هتروکروماتین قابل شناسایی و نیز اجزای تشکیل دهنده قطعه باب از قبیل مجرای صفراوی، سرخرگچه و سیاهرگچه باب با رنگ‌پذیری مناسب سلول‌های تشکیل دهنده آنها کاملاً واضح و قابل تشخیص بود. کیفیت رنگ‌پذیری هسته، کروماتین، هستک و کنتراست بین هسته و سیتوپلاسم نیز نسبتاً واضح و قابل رؤیت بود (شکل شماره ۱).



شکل شماره ۱: نمای هپاتوسیت‌ها در بافت فیکس شده با فرمالین
(H & E Staining, 20x)

کوپفر در حاشیه سینوزوئیدها با هسته‌های زاویه‌دار و هتروکروماتین، قابل رؤیت و تشخیص بودند. اجزای تشکیل دهنده قطعه باب نیز کاملاً واضح و مشخص مشاهده گردید (شکل شماره ۴).



شکل شماره ۴: کبد فیکس شده با فیکساتیو M- در تصویر قطعه باب و هپاتوسیت‌ها اطراف آن مشاهده می‌شوند.
(H & E Staining, 20x)

در مجموع، نتایج بافت‌های فیکس شده در ماده فیکساتیو M از نظر حفظ کیفیت ساختاری بافت، و فیکساتیو B از نظر کیفیت رنگ آمیزی با $p < 0.05$ ، بهتر از فرمالین و فیکساتیوهای دیگر بود.

بحث

گرچه فرمالین به عنوان یکی از هزاران ماده شیمیایی موجود و یک فیکساتیو خوب و ارزان، به علت خواص شیمیایی متنوع و پیچیده، در بخش‌های مختلف صنعت، شیمیایی، پزشکی، کشاورزی، خدماتی و اجتماعی کاربرد وسیع و روزافزونی دارد، ولی براساس نتایج مطالعات متعدد در خصوص اثرات آن، دارای زیان‌های جدی مانند سرطان‌زایی (۱، ۲)، اختلالات پوستی (۵)، تنفسی (۳، ۱۶) و اختلالات عصبی (۴) برای سلامتی افراد در مواجهه با آن، از قبیل آناتومیست‌ها و پاتولوژیست‌ها می‌باشد (۲). بنابراین تا جایی که بتوان باید از این ماده دوری جست، اما به علت کیفیت فیکس کنندگی قابل توجه، ارزان بودن، سهولت دسترسی و استفاده آسان نسبت به سایر فیکساتیوهای شناخته شده (۱۸)، افراد ترجیح می‌دهند تا از این ماده استفاده کنند. امروزه موادی به نام جایگزین شونده‌های فرمالین (۱۹) با پایه الکلی به بازار آمده است

طبیعی حفظ شده بود. کیفیت رنگ پذیری هپاتوسیت‌ها بسیار مطلوب بود؛ یعنی هسته‌ها به صورت بازوفیلیک و یوکروماتیک و سیتوپلاسم آنها به صورت ائوزینوفیلیک و شفاف مشاهده شد. هپاتوسیت‌ها کمی چروکیده شده، ولی در مجموع به طور پیوسته به هم قرار داشتند. کیفیت رنگ پذیری هسته، کروماتین و هستک و نیز کنتراست بین هسته و سیتوپلاسم واضح و قابل رؤیت بود. سینوزوئیدها به طور نسبی در اندازه‌های طبیعی قرار داشتند، ولی به علت چروکیدگی در هپاتوسیت‌ها، متسع به نظر می‌رسیدند. سلول‌های کوپفر در حاشیه سینوزوئیدها با هسته‌های زاویه‌دار و هتروکروماتین قابل رؤیت و نیز اجزای تشکیل دهنده قطعه باب نیز کاملاً واضح و مشخص مشاهده گردید (شکل شماره ۳).



شکل شماره ۳: کبد فیکس شده با فیکساتیو B- در تصویر قطعه باب و هپاتوسیت‌های نسبتاً چروکیده اطراف آن مشاهده می‌شوند.
(H & E Staining, 20x)

در مطالعه میکروسکوپی بافت‌های کبد فیکس شده با فیکساتیو M مشاهده گردید که بافت‌های فیکس شده با این فیکساتیو، از نظر سازمان و معماری بافت، طبیعی و ساختار کلی لوبول‌های کبدی نیز به طور طبیعی حفظ شده بود. کیفیت رنگ پذیری هپاتوسیت‌ها بسیار خوب بود؛ یعنی هسته‌ها به صورت بازوفیلیک، یوکروماتیک و سیتوپلاسم آنها به صورت ائوزینوفیلیک شفاف مشاهده شد. هپاتوسیت‌ها از نظر انسجام بافتی، کاملاً به هم پیوسته قرار داشتند و هیچ گونه جداشدگی در آنها دیده نمی‌شد. کیفیت رنگ پذیری هسته، کروماتین، هستک و نیز کنتراست بین هسته و سیتوپلاسم واضح و قابل رؤیت بود. سینوزوئیدها در اندازه‌های طبیعی بوده و چروکیدگی سلولی در هپاتوسیت‌ها دیده نشد. همچنین سلول‌های

چروکیدگی می کند. از نظر سهولت کاربرد و آماده سازی، هر سه فیکساتیو B، K و M آسانتر از فرمالین می باشند؛ زیرا آماده سازی فرمالین نیازمند مراحل تهیه رقت و بافر نمودن آن است. گرچه این مواد گرانتر از فرمالین هستند، ولی با توجه به سمی بودن کمتر احتمالی این مواد برای بدن و اثرات زیانبار فرمالین برای محیط زیست و مواجهه افراد شاغل با این ماده در حرفه های خاص (۱۶، ۱۲، ۸)، این میزان قابل توجه است. بنابراین توصیه می گردد در خصوص میزان اثرات منفی مواد جایگزین شونده فرمالین نیز تحقیقاتی صورت گیرد؛ تا در صورت داشتن ایمنی بیشتر برای بدن و سازگاری بیشتر با محیط زیست، استفاده از آنها گسترش بیشتری یابد.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد در مجموع، دو نوع از سه نوع ماده فیکساتیو با داشتن بعضی محاسن و معایب نسبت به فرمالین، می توانند باعث پایداری مطلوب بافت ها شده و رنگ آمیزی قابل قبولی ارائه دهند. در نتیجه می توان آنها را کاندیدای مناسبی برای جایگزینی فرمالین دانست.

که ادعا می شود دارای همان مزایا، ولی با اثرات زیانبار کمتر می باشند. در این مطالعه، به نظر می رسد که فیکس کردن بافت ها با مواد جایگزین شونده فرمالین در نتیجه رنگ آمیزی، نه تنها نتیجه منفی ندارد؛ بلکه دارای تأثیر نسبتاً بهتری نیز می باشد، به طوری که حتی در مورد فیکساتیو K که ضعیف ترین نتیجه را از نظر حفظ ساختار بافت دارد، در رنگ آمیزی بهتر از فرمالین عمل می کند. ضمن اینکه بهترین نتیجه رنگ آمیزی مربوط به فیکساتیو B، و بهترین وضعیت نگهداری بافت مربوط به فیکساتیو M بوده است. این نتیجه مشابه نتایج مطالعات قبلی در این خصوص است (۲۰). همچنین مؤید مطالعه سایر دانشمندان در خصوص رنگ آمیزی بافت بیضه موش پس از فیکساسیون با جایگزین شونده های فرمالین می باشد (۲۱). در مطالعه حاضر، از نظر کیفیت نگهداری ساختمان بافت پس از فیکساتیو M، نتیجه فرمالین بهتر از دو فیکساتیو دیگر بود، در حالی که پژوهشگرانی که از فیکساتیوهای دیگری استفاده کرده بودند، بهترین نتیجه را مربوط به فرمالین گزارش کردند (۲۲). بنابراین بیشتر مشکلات مربوط به فیکساتیوهای B و K در خصوص ایجاد چروکیدگی در هپاتوسیت ها بوده که به نظر می رسد بتوان با کاهش غلظت الکل در آنها این نقص را برطرف نمود. در این مورد، فیکساتیو K نیز بیشتر از فیکساتیو B ایجاد

References:

1. Chapot B, Secretan B, Robert A, Hainaut P. Exposure to Hazardous Substances in a Standard Molecular Biology Laboratory Environment: Evaluation of Exposures in IARC Laboratories. *Ann Occup Hyg* 2009 Jul; 53(5):485-90.
2. Costa S, Coelho P, Costa C, Silva S, Mayan O, Santos LS, Gaspar J, Teixeira JP. Genotoxic Damage in Pathology Anatomy Laboratory Workers Exposed to Formaldehyde. *Toxicology* 2008 Oct; 30;252(1-3):40-8.
3. Takayanagi M, Sakai M, Ishikawa Y, Murakami K, Kimura A, Kakuta S, Sato F. Formaldehyde Concentrations in the Breathing Zone of Medical Students During Gross Anatomy Laboratory in Toho University. *Kaibogaku Zasshi* 2007 Jun; 82(2):45-51. [Full Text in Japanese]
4. Nakano M, Omae K, Tanaka A, Hirata M, Michikawa T, Kikuchi Y, Yoshioka N, Nishiwaki Y, Chonan T. Causal Relationship Between Indium Compound Inhalation and Effects on the Lungs. *J Occup Health* 2009;51(6):513-21.
5. Saito A, Tanaka H, Usuda H, Shibata T, Higashi S, Yamashita H, Inagaki N, Nagai H. Characterization of Skin Inflammation Induced by Repeated Exposure of Toluene, Xylene, and Formaldehyde in Mice. *Environ Toxicol* 2011 Jun; 26(3):224-32.
6. Li H, Wang J, König R, Ansari GA, Khan MF. Formaldehyde-Protein Conjugate-Specific Antibodies in Rats Exposed to Formaldehyde. *J Toxicol Environ Health, Part A* 2007 Jul; 70(13):1071-5.
7. Werley MS, Lee KM, Lemus R. Evaluation of a Novel Inhalation Exposure System to Determine Acute Respiratory Responses to Tobacco and Polymer Pyrolysate Mixtures in Swiss-Webster Mice. *Inhal Toxicol* 2009 Jul; 21(8):719-29.
8. Zhang L, Freeman LE, Nakamura J, Hecht SS, Vandenberg JJ, Smith MT, Sonawane BR. Formaldehyde and Leukemia: Epidemiology, Potential Mechanisms, and Implications for Risk Assessment. *Environ Mol Mutagen* 2010 Apr; 51(3):181-91.

9. Jiang S, Yu L, Cheng J, Leng S, Dai Y, Zhang Y, Niu Y, Yan H, Qu W, Zhang C, Zhang K, Yang R, Zhou L, Zheng Y. Genomic Damages in Peripheral Blood Lymphocytes and Association with Polymorphisms of Three Glutathione S-Transferases in Workers Exposed to Formaldehyde. *Mutat Res* 2010 Jan; 695(1-2):9-15.
10. Kuper CF, Van Oostrum L, Ma-Hock L, Durrer S, Woutersen RA. Hyperplasia of the Lymphoepithelium of Nalt in Rats but not in Mice Upon 28-day Exposure to 15ppm Formaldehyde Vapor. *Exp Toxicol Pathol* 2011 Jan; 63(1-2):25-32.
11. Sul D. Evaluation of Toxicological Monitoring Markers Using Proteomic Analysis. *J Proteome Res* 2006 Oct; 5(10):2525-6.
12. Tiwari RR. Occupational Health Hazards in Sewage and Sanitary Workers. *Indian J Occup Environ Med* 2008 Dec; 12(3):112-5.
13. Songur A, Ozen OA, Sarsilmaz M. The Toxic Effects of Formaldehyde on the Nervous System. *Rev Environ Contam Toxicol* 2010;203:105-18.
14. Liu Y, Ye Z, Luo H, Sun M, Li M, Fan D, Chui D. Inhalative Formaldehyde Exposure Enhances Aggressive Behavior and Disturbs Monoamines in Frontal Cortex Synaptosome of Male Rats. *Neurosci Lett* 2009 Oct; 23;464(2):113-6.
15. Songur A, Sarsilmaz M, Ozen O, Sahin S, Koken R, Zararsiz I, Ilhan N. The Effects of Inhaled Formaldehyde on Oxidant and Antioxidant Systems of Rat Cerebellum During the Postnatal Development Process. *Toxicol Mech Methods* 2008 Jan; 18(7):569-74.
16. Khaliq F, Tripathi P. Acute Effects of Formalin on Pulmonary Functions in Gross Anatomy Laboratory. *Indian J Physiol Pharmacol* 2009 Jan-Mar; 53(1):93-6.
17. Lino-Dos-Santos-Franco A, Shia MK, Domingos HV, Breithaupt-Faloppa AC, Ligeiro de Oliveira AP, Oliveira-Filho RM, Vargaftig BB, Tavares-de-Lima W. Connective Tissue Mast Cells are the Target of Formaldehyde to Induce Tracheal Hyperresponsiveness in Rats: Putative Role of Leukotriene B(4) and Nitric Oxide. *Toxicol Lett* 2010 Oct;192(2):85-90.
18. Janczyk P, Weigner J, Luebke-Becker A, Kaessmeyer S, Plendl J. Nitrite Pickling Salt as an Alternative to Formaldehyde for Embalming in Veterinary Anatomy- A Study Based on Histo- and Microbiological Analyses. *Ann Anat* 2010 Feb; 193(1):71-5.
19. Buesa RJ. Histology Without Formalin? *Ann Diagn Pathol* 2008 Dec; 12(6):387-96.
20. Lassalle S, Hofman V, Marius I, Gavric-Tanga V, Brest P, Havet K, Butori C, Selva E, Santini J, Mograbi B, Hofman P. Assessment of Morphology, Antigenicity, and Nucleic Acid Integrity for Diagnostic Thyroid Pathology Using Formalin Substitute Fixatives. *Thyroid* 2009 Nov; 19(11):1239-48.
21. Howroyd P, Hoyle-Thacker R, Lyght O, Williams D, Kleymenova E. Morphology of the Fetal Rat Testis Preserved in Different Fixatives. *Toxicol Pathol* 2005;33(2):300-4.
22. Titford ME, Horenstein MG. Histomorphologic Assessment of Formalin Substitute Fixatives for Diagnostic Surgical Pathology. *Arch Pathol Lab Med* 2005 Apr; 129(4):502-6.