

## مقاله تحقیقی

مقایسه پایدارسازی فیکساتیو جانشین شونده فرمالین با فرمالین در جلوگیری از تغییرات پس از مرگ در بیضه موش

علی انیسیان

دانشگاه آزاد اسلامی واحد ابهر، گروه دامپزشکی، ابهر، ایران

\* مسئول مکاتبات: آدرس الکترونیکی: [anissian@abhariau.ac.ir](mailto:anissian@abhariau.ac.ir)

محل انجام تحقیق: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین - پیشوا

تاریخ دریافت: ۹۹/۶/۵

تاریخ پذیرش: ۹۹/۷/۸

### چکیده

فرمالین یکی از اصلی ترین مواد، برای فیکساسیون یا پایدار کردن بافت می باشد که اثرات زیان بار آن برای سلامتی شناخته شده است و ضروری است تا با یک ماده فیکساتیو دیگر جایگزین شود. هدف این مطالعه مقایسه توانایی پایدارسازی فیکساتیو جانشین شونده فرمالین با فرمالین، در جلوگیری از تغییرات پس از مرگ وابسته به زمان در بافت بیضه می باشد. برای این منظور، یک نوع ماده فیکساتیو که به عنوان جایگزین شونده فرمالین معرفی شده با فرمالین ۱۰ درصد بافر شده مقایسه شدند. نمونه برداری از بافت بیضه موش در زمان های صفر، ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت پس از مرگ انجام گرفت که پس از توزین نمونه در ظروف حاوی فیکساتیوهای مذکور قرار داده شدند و پس از ۴۸ ساعت مورد پاساژ، قالب گیری، برش گیری و رنگ آمیزی قرار گرفتند. وزن بیضه ها با گذشت زمان کاهش یافته و از نظر مورفولوژیک ساختمان آنها سازمان خود را از دست داد. با این حال، هر دو نوع فیکساتیو توانستند تا حدی از اتولیز بافت جلوگیری نمایند. در این مطالعه هر دو فیکساتیو با تفاوت بسیار کمی، تاثیر معنی داری بر حفظ ساختار بافت داشته اند. این مطالعه نشان داد مواد جایگزین فرمالین به آسانی می توانند بجای فرمالین مورد استفاده واقع شوند. اگرچه، فیکساتیوهای غیر فرمالینی گران تر از فرمالین هستند، ولی با در نظر گرفتن سمیت کمتر احتمالی این مواد برای بدن، این تفاوت قیمت قابل توجهی می باشد.

**واژه های کلیدی:** فرمالین، بیضه، فیکساتیو، اتولیز، بافت

### مقدمه

ماده فیکساتیو دیرتر به عمق بافت نفوذ کرده و سلول هایی که در آنجا قرار گرفته اند، بخصوص در بافت های با ضخامت بیشتر، دیرتر پایدار شده و در نتیجه تغییرات پس از مرگ در آنها مشهودتر باشد (۴). همین امر باعث می شود تا پس از عملیات آماده سازی، تهیه مقطع، رنگ آمیزی و مشاهده توسط میکروسکوپ، تغییراتی در ساختمان سلول ها مشاهده گردد که در مطالعه و تشخیص آسیب شناختی بیماری ها خلل وارد می نماید. برای حل این مشکل، پیشنهاد شده که

فرمالین یکی از اصلی ترین مواد، برای فیکساسیون یا پایدار کردن بافت می باشد (۱). پایدار کردن نمونه باعث می شود ساختار سلولی بافت، تا حد امکان از تغییرات پس از مرگ مصون مانده و شکل طبیعی خود را حفظ نماید (۲)، ولی همگی به علت داشتن مولکول های بزرگ، به کندی به داخل بافت نفوذ می نمایند (۳). این مسئله باعث می شود تا برای فیکساسیون بافت، وقت زیادی صرف شده و از طرفی،

۱۲، ۲۴، ۳۶، و ۴۸ پس از مرگ، در حرارت اتاق قرار داده شده بودند، انجام گرفت. نمونه‌ها دارای اندازه‌های ۱ در ۱ با قطر ۰/۵ سانتی‌متر بودند که پس از توزین و گذشت زمان‌های مختلف ذکر شده در ظروف حاوی ۵۰ سی سی از هر کدام از فیکساتیوهای مختلف ذکر شده در بالا، قرار داده شدند.

### فرآوری و آماده سازی بافت

نمونه‌ها ۴۸ ساعت پس از زمان قرار گرفتن در فیکساتیو، پاساژ بافتی یا آبیگری، شفاف‌سازی و آکندگی روی نمونه‌ها انجام شد. سپس، قالبگیری با پارافین انجام گرفت. برشگیری از بافت بیضه فیکس شده با هر کدام از فیکساتورهای بالا، با ضخامت‌های ۵ میکرون صورت پذیرفت. برش‌ها به وسیله رنگ‌های همتوکسیلین و ائوزین، رنگ‌آمیزی گردیدند. نمونه‌ها برای مشاهده سلول‌های زایای بریده شده، گونوسیت‌ها و هر نوع تغییر مورفولوژیک قابل توجه توسط میکروسکوپ نوری LX400 Labomed مورد ارزیابی قرار گرفتند. در هر نمونه لوله‌های اسپرم‌سازی که ساختمان کامل داشتند، از غشای پایه تا غشای پایه بعدی مورد ارزیابی و اندازه‌گیری قرار گرفتند.

### بررسی آماری

اندازه‌گیری توسط نرم افزار Axiovision LE Rel. 4.5 انجام گردید که در زیر شرح و توصیف مربوط به هر مرحله آمده است. داده‌ها به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۳، روش کروسکال-والیس و تست تکمیلی من‌ویتنی تجزیه و تحلیل شدند.

### نتایج

برش‌های بیضه موش در ساعت‌های صفر، ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ بعد از مرگ نشان‌دهنده تغییرات ساختمانی در ابعاد ماکروسکوپی و میکروسکوپی بودند. وزن بیضه‌ها در طی زمان کاهش یافته بود. در ساعت ۱۲ پس از مرگ، نسبت وزنی بیضه چپ و راست (که معمولاً بیضه چپ ۲/۵ درصد

ضخامت بافت، نباید بیشتر از ۵ میلی‌متر باشد که این حالت خود، محدودیت محسوب می‌گردد (۵)، زیرا ممکن است هنگام نمونه‌برداری در فیلد یا هنگام جراحی، به سبب ضرورت و یا فقدان لوازم کافی و یا ظروف متعدد، بافتی با قطر بیش از حد توصیه شده، برای مطالعه برداشته شود که در این صورت قسمت‌های عمقی بافت به خوبی فیکس نشده و سلول‌های آن دستخوش تغییرات پس از مرگ خواهند گردید. همچنین، اگر از زمان نمونه‌برداری تا زمان قرار دادن بافت در فیکساتیو، مدتی به طول بیانجامد و یا در مطالعات سم‌شناسی زمانی که نقطه پایان مطالعه، مرگ حیوان می‌باشد، معمولاً نمونه‌برداری با تاخیر همراه است و این تاخیر ممکن است از چند ساعت تا چند روز به طول بیانجامد. در اینجا باید متوجه بود که آیا عوارض ایجاد شده مربوط به اثرات سم یا دارو است و یا مربوط به تغییرات پس از مرگ است. برای این منظور در این مطالعه، بافت بیضه که یکی از بافت‌های حاوی سلول‌های حساس به تغییرات پس از مرگ می‌باشد، انتخاب گردید تا با مطالعه تغییرات پس از مرگ در آن در ساعت‌های مختلف، بتوان از آن به عنوان مارکر پاتولوژیک استفاده کرد و نیز بین این تغییرات با تغییرات پاتولوژیک در زمان زنده بودن که در مطالعات سم‌شناسی ایجاد می‌گردد، تفاوت قائل شد (۶). هدف از این مطالعه تعیین مقایسه توانایی پایداری فیکساتیو جانشین شونده فرمالین با فرمالین در جلوگیری از تغییرات پس از مرگ وابسته به زمان در بافت بیضه می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

#### مواد

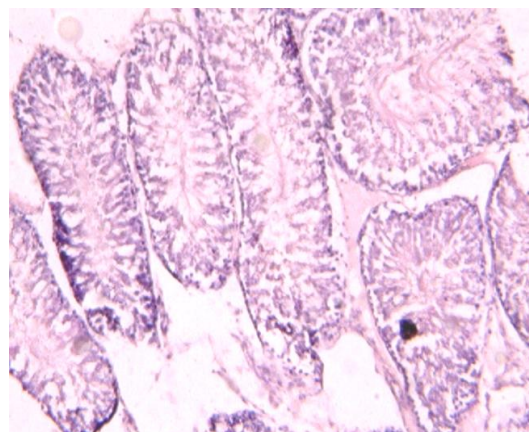
در مطالعه حاضر، مواد مصرفی به سه دسته فیکساتیوها، بافت بیضه و رنگ‌های بافتی تقسیم شدند. یک نوع ماده فیکساتیو که به عنوان جایگزین شونده فرمالین معرفی شده بود، به علاوه، فرمالین ۱۰ درصد بافر شده، فیکساتیوهای این مطالعه را تشکیل دادند (۷).

#### بافت

نمونه‌برداری از بافت بیضه موش‌های صحرایی نر بالغ خریداری شده از انستیتو پاستور، که پس از ساعت‌های صفر،



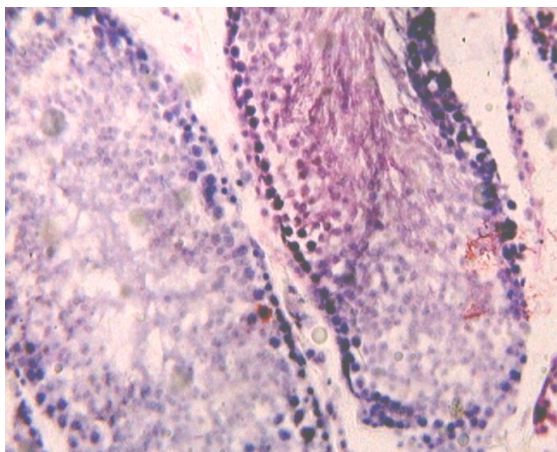
کلی در بزرگنمایی ۴۰ میکروسکوپ نوری و تغییرات اختصاصی سلول‌ها، در بزرگنمایی بیشتر مورد مشاهده قرار گرفتند. در این آزمایشات نشان داده شد که لوله‌های اسپرم‌ساز بلافاصله پس از مرگ، دارای جمعیت کاملی از سلول‌های زایای متصل به غشای پایه بودند. اگرچه تعدادی شکاف بین لوله‌های اسپرم‌ساز و بافت بینابینی ایجاد گردیده بود (تصاویر ۵ و ۶).



تصویر ۵- تصویر میکروسکوپ نوری از لوله‌های اسپرم‌ساز بلافاصله پس از مرگ در نمونه‌های فیکس شده توسط فیکساتیو غیرفرمالینی. جمعیت کاملی از سلول‌های زایای متصل به غشای پایه مشاهده می‌شوند. رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، بزرگنمایی ۱۰۰X.

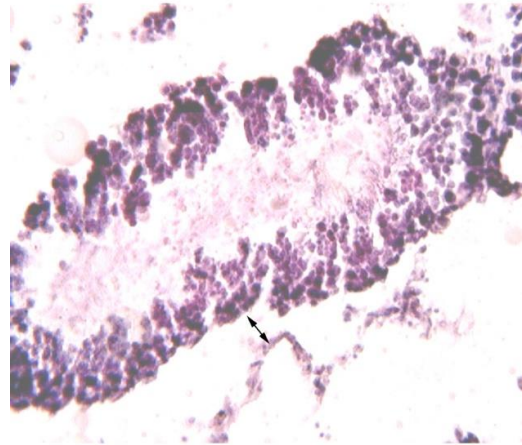
در حدود ۱۰ تا ۱۵ سلول سرتولی در این لوله‌ها در هر برش وجود داشت که دارای هسته‌های زاویه‌دار در نزدیکی قاعده خود بودند. هسته‌های اسپرماتوگونیاال متحدالشکل بوده و نزدیک به غشای پایه قرار داشتند. کروماتین اسپرماتوسیت‌ها متحدالشکل با نقاط متراکم مشاهده می‌شد. اجسام باقیمانده متراکم شده و در مراحل هفت و هشت قرار داشتند. در ساعت

۱۲ پس از مرگ اپی‌تلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز شروع به کنده شدن از غشای پایه نمودند. با این حال اتصالات سلول به سلول در آنها هنوز دست نخورده بودند. در این وضعیت، فیکساتیو غیرفرمالینی بهتر از فرمالین ساختمان بافت را حفظ نموده بود. هسته سلول‌های سرتولی دارای زاویه کمتر شده به سمت پهن شدن می‌رفتند. کروماتین آنها تا حدی متراکم شده و به صورت ندول‌هایی در زیر غشای هسته قرار گرفته بود. کروماتین اسپرماتوگونی‌ها تراکم بیشتری پیدا کرده و گاهی دچار حاشیه نشینی شده بودند. هسته اسپرماتیدها دارای کروماتین حاشیه‌ای و نوکلئوپلاسم شفاف و روشن بودند. اجسام باقیمانده بزرگتر شده و منتشر به نظر می‌رسیدند. هسته سلول‌های لیدیک کمتر همشکل بنظر می‌رسیدند و کروماتین آنها داخل هسته متراکم شده بود (تصاویر ۷ و ۸).

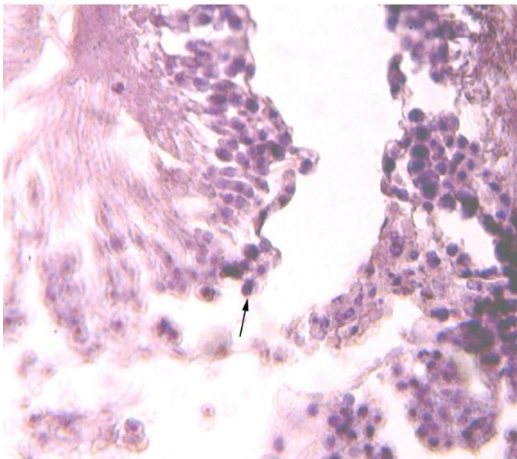


تصویر ۶- تصویر میکروسکوپ نوری از لوله‌های اسپرم‌ساز بلافاصله پس از مرگ در نمونه‌های فیکس شده توسط فرمالین. لوله‌ها دارای جمعیت کاملی از سلول‌های زایای متصل به غشای پایه می‌باشند، رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، بزرگنمایی ۲۰۰X.

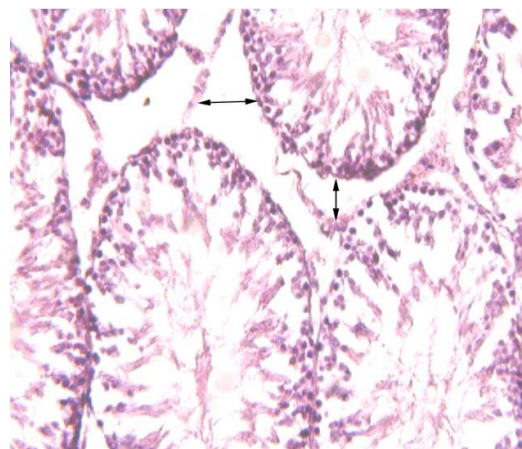
بیشتری داشته و از غشای پایه فاصله بیشتری گرفته بودند. هسته گرد اسپرماتیدها دارای کروماتین متراکم در طول غشای هسته و نوکلئوپلاسم روشن بودند. اجسام باقیمانده در این زمان قابل تشخیص نبوده، بصورت غباری-شکل مشاهده می شدند. هسته های سلول های لیدیگ پیکنوتیک، متراکم، کروی و کروماتین-های قطعه قطعه در آنها مشاهده شدند (تصاویر ۹ و ۱۰).



تصویر ۷- تصویر میکروسکوپ نوری از اپی تلیوم لوله های اسپرم ساز در نمونه هایی که توسط فرمالین فیکس شدند، سلول ها شروع به کنده شدن از غشای پایه نموده اند (فلش)، رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، بزرگنمایی ۱۰۰X.



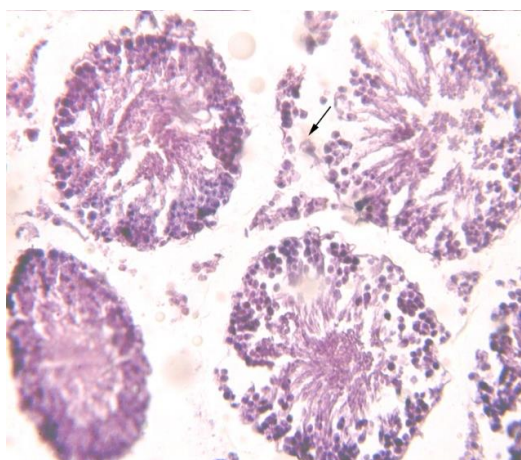
تصویر ۹- تصویر میکروسکوپ نوری از هسته سلول های لیدیگ پیکنوتیک، متراکم و کروی شده و کروماتین های آنها قطعه قطعه شده اند. نمونه توسط فیکساتیو فرمالینی فیکس شده است. اسپرماتوگونی ها دارای کروماتین کروی بیشتری بوده و از غشای پایه فاصله بیشتری گرفته اند. هسته گرد اسپرماتیدها دارای کروماتین متراکم در طول غشای هسته و نوکلئوپلاسم روشن هستند (فلش)، رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، بزرگنمایی ۴۰۰X.



تصویر ۸- تصویر میکروسکوپ نوری از اپی تلیوم لوله های اسپرم ساز که شروع به کنده شدن از غشای پایه نموده اند (فلش ها) در فیکساتیو غیرفرمالینی، رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، بزرگنمایی ۱۰۰X.

در ساعت ۳۶ در هر دو نوع فیکساتیو، اپتیلیوم توبول های اسپرم ساز، سالم و دست نخورده بودند، در حالی که تشخیص سلول های منفرد در بافت بینابینی به سختی مقدور بود. بعضی از سلول های سرتولی که هسته های قابل

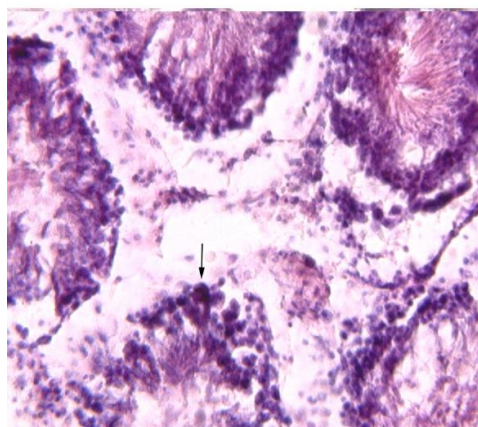
در ساعت ۲۴ پس از مرگ، تغییرات مشاهده شده شبیه ساعت ۱۲ بوده، ولی واضح تر شده است. اسپرماتوگونی ها کروماتین های کروی



تصویر ۱۱- تصویر میکروسکوپ نوری از افت قرار گرفته در فیکساتیو فرمالین، اپتیلیوم توبول‌های اسپرم‌ساز سالم و دست‌نخورده بوده، در حالی که تشخیص سلول‌های منفرد در بافت بینابینی به سختی مقدور است. بعضی از سلول‌های سرتولی که هسته‌های قابل تشخیص داشتند، از غشای پایه فاصله گرفته‌اند (فلش)، رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، بزرگنمایی  $100\times$ .

در ساعت ۴۸ پس از مرگ، سلول‌های موجود در فضای بینابینی قابل تشخیص نبوده و اپی-تلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز سالم و دست‌نخورده بودند. شواهدی از شکستگی اتصالات بین سلولی مشاهده می‌شدند. ولی مدرکی مبنی بر کنده شدن سلول‌های راسی اپی-تلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز و افتادن آنها به داخل لومن وجود نداشت. سلول‌های سرتولی محو شده و فقط تعدادی هسته قابل مشاهده بود. اسپرماتوگونی‌ها دارای کانون‌های پیکنوتیک شده بوده و هسته اسپرماتوسیت‌ها تکه تکه دیده می‌شدند (تصاویر ۱۲ و ۱۳).

تشخیص داشتند، از غشای پایه فاصله گرفته و به بالا آمده بوده و تمام زوایای خود را از دست داده بودند. سلول‌های اسپرماتوگونی به نظر کوچکتر و کنده شده از غشای پایه می‌رسیدند. سلول‌های لیدیک تقریباً همگی بی-نظم بوده و دچار تغییراتی شده بودند (تصویر ۱۱).

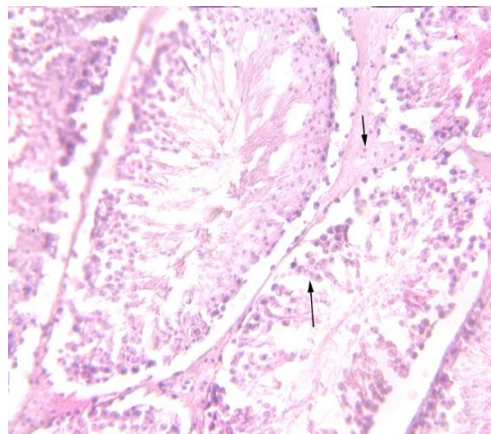


تصویر ۱۰- تصویر میکروسکوپ نوری از بافت قرار گرفته در فیکساتیو غیر فرمالینی، هسته سلول‌های لیدیک پیکنوتیک، متراکم و کروی شده و کروماتین‌های آنها قطعه‌قطعه شده‌اند. اسپرماتوگونی‌ها دارای کروماتین کروی کمتری بوده و سازمان خود را به میزان بیشتری نسبت به بافت‌های فرمالینی از دست داده‌اند. هسته گرد اسپرماتیدها دارای کروماتین متراکم بوده و ظاهراً به سمت پیکنوزه شدن پیش می‌روند (فلش)، رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، بزرگنمایی  $400\times$ .

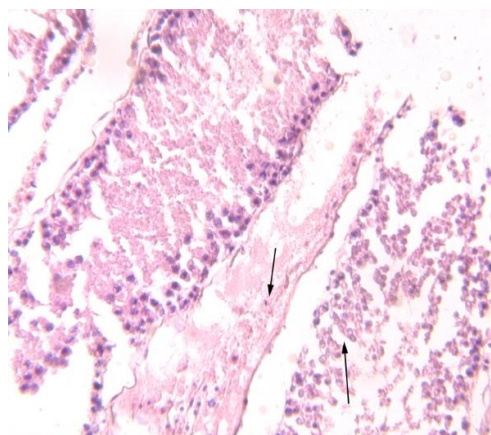
در مجموع، نتایج بافت‌های فیکس شده در ماده فیکساتیو غیرفرمالینی از نظر حفظ کیفیت ساختاری بافت و نیز از نظر کیفیت رنگ آمیزی با  $p < 0.05$  تفاوت چندانی با فرمالین نداشت.

#### بحث

در این مطالعه پایدار کردن بافت‌ها با مواد جایگزین شونده فرمالین، در کیفیت حفظ ساختار بافت بیضه پس از مرگ، دارای نتیجه نسبتاً برابر با فرمالین بود. این نتیجه مشابه نتایج مطالعات قبلی در این خصوص می باشد (۸). همینطور مؤید مطالعه سایر دانشمندان در خصوص رنگ آمیزی بافت بیضه موش پس از فیکساسیون با جایگزین شونده‌های فرمالین می باشد (۹). مواد سمی برای بیضه باعث تغییرات هیستوپاتولوژیکی گوناگونی در بافت بیضه پس از مواجهه با آن می شوند. بافت بیضه که به مدت ۱۲ تا ۴۸ ساعت پس از مرگ پایدار نشده اند، عوارض هیستوپاتولوژیکی واضحی را نشان دادند. تغییرات اتولیتیکی پس از مرگ تشخیص سلول‌های مختلف در یک بافت خاص را مشکل می سازد. همانطور که در مطالعات سایر دانشمندان در خصوص سلول‌های تیپ I تنه کاروتید گفته شده، تغییرات اتولیتیکی پس از مرگ باعث سخت شدن مطالعه هیستوپاتولوژیکی آنها گردیده است. پایداری بافت با تاخیر به وسیله مواد فیکساتیو مختلف بیضه‌ها به منظور مطالعات هیستوپاتولوژیکی نشان داد که به جز کاهش وزن، چند مارکر واضح برای مسمومیت بیضه‌ها وجود دارد. کاهش پیمشونده وزن بیضه در طول زمان پس از مرگ با کاهش قطر لوله‌های اسپرم‌ساز همبستگی داشته که با کاهش تشکیل مایع در لوله‌های اسپرم‌ساز مشخص می شود. از بین رفتن نسبتاً سریع سلول‌های سرتولی عامل کاهش مایع لوله‌های اسپرم‌ساز و کاهش قطر آنها محسوب می شود. در این میان، نوع ماده فیکساتیوی که بتواند نفوذپذیری بیشتری به داخل بافت و اثر



تصویر ۱۲- تصویر میکروسکوپ نوری از نمونه-های قرار گرفته در فیکساتیو فرمالین، سلول‌های موجود در فضای بینابینی قابل تشخیص نیستند، ولی اپی‌تلیوم لوله‌های اسپرم-ساز سالم و دست نخورده می باشند، رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، بزرگنمایی  $100\times$ .



تصویر ۱۳- تصویر میکروسکوپ نوری از نمونه-های قرار گرفته در فیکساتیو غیرفرمالینی، سلول‌های موجود در فضای بینابینی قابل تشخیص نبوده و اپی‌تلیوم لوله‌های اسپرم‌ساز در حال تخریب می باشند (فلش‌ها)، رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، بزرگنمایی  $100\times$ .

مواد برای بدن و اثرات زیان‌بار فرمالین برای محیط زیست و افراد شاغل در حرفه‌هایی که با این ماده در مواجهه هستند (۱۱،۱۲،۱۳)، این تفاوت قیمت، قابل توجه می‌باشد. اگرچه، از نظر مورفولوژیکی تغییرات ساختمانی ایجاد شده توسط این دسته از پایدارکننده‌ها با تغییراتی که توسط فرمالین ایجاد می‌شود، متفاوت هستند، ولی میزان آنها آنقدر نیست که در تشخیص پاتولوژی تداخل ایجاد نمایند. بنابراین توصیه می‌گردد در خصوص میزان اثرات زیان‌بار مواد جایگزین شونده فرمالین برای بدن نیز تحقیقاتی صورت پذیرد تا در صورت داشتن ایمنی بیشتر برای بدن و سازگاری بیشتر با محیط زیست، استفاده از آنها گسترش بیشتری یابد.

#### تقدیر و تشکر

بدین وسیله، از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا برای تأمین هزینه این پژوهش، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

پایدارسازی بیشتری داشته باشد، در این موارد موثرتر واقع می‌شود و کاربرد بیشتری دارد. در این مطالعه مشخص گردید که هر دو فیکساتیو با تفاوت بسیار کمی، تاثیر نسبی خوبی بر حفظ ساختار بافت داشته‌اند. از نظر کیفیت نگهداری ساختمان بافت، نتیجه فرمالین تا حدی بهتر از فیکساتیو غیرفرمالینی بود و این نتیجه با نتایج محققین دیگر که از فیکساتیوهای دیگری استفاده کرده بودند و بهترین نتیجه را مربوط به فرمالین گزارش کرده بودند مطابقت داشت (۱۰). بیشتر مشکلات مربوط به فیکساتیو غیرفرمالینی در خصوص ایجاد چروکیدگی در بافت بود که به نظر می‌رسد بتوان با کاهش غلظت الکل در آنها این نقیصه را برطرف نمود. از نظر سهولت آماده‌سازی، کاربرد و آماده‌سازی، فیکساتیو غیرفرمالینی، آسان‌تر از فرمالین بود. زیرا آماده‌سازی فرمالین نیازمند مراحل تهیه رقت و بافر نمودن آن می‌باشد.

مطالعه حاضر نشان داد که مواد جایگزین فرمالین به آسانی می‌توانند بجای فرمالین که ماده‌ای سرطان‌زا است، مورد استفاده واقع شوند. اگرچه، فیکساتیوهای غیرفرمالینی گران‌تر از فرمالین هستند، ولی با در نظر گرفتن سمیت کمتر احتمالی این

#### منابع مورد استفاده

- Vickerton, P., Jarvis, J., Jeffery, N., 2013. Concentration-dependent specimen shrinkage in iodine-enhanced microCT. *J Anat* 223(2):185-193.
- Peterson, T. S., Kent, M. L., Ferguson, J. A., Watral, V. G., Whipps, C. M., 2013. Comparison of fixatives and fixation time for PCR detection of *Mycobacterium* in zebrafish *Danio rerio*. *Dis Aquat Organ* 104(2):113-120.
- Dobó, E., Kása, P., Wenthold, R. J., Wolff, J. R., 1989. Pronase treatment increases the staining intensity of GABA-immunoreactive structures in the paravertebral sympathetic ganglia. *Histochemistry* 93(1):13-18.
- Buesa, R. J., Peshkov, M. V., 2012. How much formalin is enough to fix tissues? *Ann Diagn Pathol*. 16(3):202-9.
- Anissian, A., 2007. *Histotechniques*. Islamic Azad University, Abhar Branch. Pp.13-59 [in Persian].
- Bryant, B. H., Boekelheide, K., 2007. Time-dependent changes in post-mortem testis histopathology in the rat. *Toxicol Pathol* 35(5): 665-671.
- Zanini, C., Gerbaudo, E., Ercole, E., Vendramin, A., Forni, M., 2012. Evaluation of two commercial and three home-made fixatives for the substitution of formalin: a formaldehyde-free laboratory is possible. *Environ Health* 4(11):59.
- Takayanagi, M., Sakai, M., Ishikawa, Y., Murakami, K., Kimura, A., Kakuta, S., Sato, F., 2007. Formaldehyde concentrations in the breathing zone of medical students during gross anatomy laboratory in Toho University. *Kaibogaku Zasshi* 82(2):45-51 [Article in Japanese].
- Liu, K. S., Hao, J. H., Zeng, Y., Dai, F. C., Gu, P. Q., 2013. Neurotoxic effects and biomarkers of lead exposure: a review. *Chin Med Sci J*. 28(3):178-88. Review.



10. Lucchini, R., Zimmerman, N., 2009. Lifetime cumulative exposure as a threat for neurodegeneration: need for prevention strategies on a global scale. *Neurotoxicology* (6): 1144-1148.
11. Lillie, R. D., Fulmer, H. M., 1976. *Histopathologic technic and practical histochemistry*, 4th ed., New York: McGraw-Hill. Pp.135-169.
12. Shum, M. W., Hon, J. K. Y., 1969. A modified phosphotungstic acid hematoxylin stain for formalin fixed tissue. *Journal of Medical Laboratory Technology* 26: 38.
13. Songur, A., Ozen, O. A., Sarsilmaz, M., 2010. The toxic effects of formaldehyde on the nervous system. *Rev Environ Contam Toxicol* 203: 105-118.