

Effect of Methyl Tertiary-butyl on Blood Parameters and Liver Tissue in NMRI Albino Female Mice

Kobra Zare¹,
Nasim Naeimi²

¹ Ph.D, Department of Biology, Faculty of Science, Islamic Azad university of Tehran, Science and Research Branch, Tehran, Iran

² Lecturer, Department of Biology, Faculty of Science, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran

(Received July 16, 2016; Accepted November 7, 2016)

Abstract

Background and purpose: Methyl tertiary-butyl (MTBE) is an organic volatile compound that is used to improve gasoline as the replacement of tetraethyl lead. This compound can be absorbed into the blood in different ways and leave toxic effects. This study aimed to investigate the effects of MTBE on blood parameters and liver tissue in NMRI albino female mice.

Materials and methods: This study was conducted in 45 mature NMRI albino mice, which were placed into three groups, including two experimental groups (groups A and B) and a control group. Group A received 0.4 cc of MTBE (0.06 cc of MTBE and 0.04 cc of distilled water) at graded dose of 1600 mg/kg body weight once a day. Group B received the same compound along with 0.1 cc of physiological serum. After weighing and anesthetizing the mice, their blood samples were collected. Then, the liver and blood parameters were measured by MOTIC software as well as macroscopic and microscopic observations, using slides.

Results: The number of red blood cells, hematocrit, and plasma density elevated in group A, but hemoglobin level showed no increase, which indicate the toxic effects of this substance. In group A, hyperemia and liver inflammation were considerably associated with the increase in the diameter of lobular and interlobular central veins as well as sinusoids. The mean ratio of nucleus to cell size decreased; on the other hand, compared to mononuclear cells, the number of binuclear hepatocytes raised. There were statistically significant differences between the two experimental groups and between the control group and group A in most cases ($P < 0.05$).

Conclusion: According to our findings, the variations in blood parameters and liver tissue were due to the toxic effects of MTBE. As indicated, the use of physiological serum in group B reduced these changes. Hence, alternative compounds with lower risk should be used to improve gasoline.

Keywords: liver, blood parameters, mice, Methyl tertiary-butyl

بررسی اثرات متیل ترشیو بوتیل اتر (MTBE)، بر برخی پارامترهای خون و کبد

کبری زارع^۱
نسیم نعیمی^۲

چکیده

سابقه و هدف: متیل ترشیو بوتیل اتر (MTBE) ترکیب آلی فراری است که به جای تترا تیل سرب، جهت بهبود سوخت بنزین استفاده می‌شود. این ماده به روش‌های مختلف، جذب خون شده و آثار سمی بر جای می‌گذارد. در این پژوهش، سعی شد تا اثرات تزریقی آن بر فاکتورهای خونی و بافت کبد مورد مطالعه قرار گیرد.

مواد و روش‌ها: ۴۵ موش ماده بالغ نژاد Albino NMRI در سه گروه شاهد، گروه تیمار A، هر روز یک نوبت به میزان ۰/۴ cc MTBE (۰/۰۶ cc MTBE + ۰/۰۴ cc آب مقطر) با عیار ۱۶۰۰ mg/kg وزن موش، گروه تیمار B با شرایط مشابه (۰/۱ cc) سرم فیزیولوژی نیز دریافت کردند) قرار گرفتند. پس از وزن‌کشی، بیهوشی و خون‌گیری، پارامترهای مورد نظر بافت کبد و خون، با نرم‌افزار موتیک اندازه‌گیری شد و مطالعات ماکروسکوپی و میکروسکوپی به وسیله لام‌های تهیه‌شده، صورت گرفت.

یافته‌ها: افزایش میانگین تعداد گلبول‌های قرمز، هماتوکریت و چگالی پلاسما، بدون بالا رفتن هموگلوبین در گروه، نشان از اثرات سمی این ماده داشت. در گروه A، پرخونی و التهاب پارانشیم کبدی با افزایش میانگین قطر ورید مرکز لوبولی، بین لوبولی و سینوزوئیدها قابل‌اهمیت بود. میانگین اندازه هسته به سلول کاهش و تعداد سلول‌های دو هسته‌ای نسبت به تک‌هسته‌ای هیپاتوسیت‌ها افزایش یافت، در اکثر موارد تفاوت گروه A و B و شاهد با A معنی‌دار بود ($P < 0/05$).

استنتاج: معنی‌داری رابطه‌ها نشان داد که تغییرات پارامترهای خونی و بافت کبد ناشی از اثرات سمی MTBE بوده و همراهی سرم فیزیولوژی در گروه آزمایشی B، این تغییرات را کاهش داد؛ بنابراین، باید از ترکیبات جایگزین و کم‌خطری برای بهبود سوخت بنزین استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: بافت کبد، پارامترهای خونی، موش، MTBE

مقدمه

سمی بوده و در هوا آزاد می‌شود (۱). این ترکیب در جانوران سرطان‌زا می‌باشد؛ به طوری که در رت‌ها و مایس‌ها، تومورهای خطرناک، هیجان‌ات و سایر ناهنجاری‌های رفتاری را ایجاد می‌کند (۲). با توجه به این عوارض، همواره وجود ماده‌ای برای افزودن به بنزین

مشکلات ناشی از ترکیبات سرب موجود در بنزین، همواره موجب نگرانی طرفداران محیط زیست بوده است. از واکنش دی برمید اتیلن موجود در بنزین با اکسید سرب که در هنگام سوختن بنزین حاصل می‌شود، برمید سرب به وجود می‌آید که ترکیبی فرار و

Email: naeimi@science.usb.ac.ir

مؤلف مسئول: نسیم نعیمی - زاهدان: دانشگاه سیستان و بلوچستان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

۱. دکتری فیزیولوژی جانوری، دانشگاه علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

۲. مربی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۴/۲۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۵/۱۸ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۸/۱۷

سانتی گراد، ۵ mg/l است (۹). استفاده از MTBE در محیط، مسئله‌ای مهم می‌باشد؛ زیرا، شکایات زیادی در ارتباط با اثرات سوزش این ماده بر چشم‌ها و شش‌ها در برخی نواحی مانند آلاسکا که از MTBE به‌عنوان یک ترکیب در بنزین استفاده می‌کنند، گزارش شده است (۱۰). همچنین، این ماده می‌تواند بعد از تنفس در انسان‌ها و رت‌ها و نیز به‌صورت گوارشی یا تماس پوستی جذب بدن شود (۱۱). در حالت گازی یا مایع، انتظار می‌رود که MTBE به‌صورت خوراکی، درون‌صفافی، درون‌وریدی و یا تنفسی جذب شود (۱۲). دفع ماده MTBE و متابولیت‌های آن در رت‌ها از طریق شش‌ها (هوای بازدمی) و کلیه‌ها (ادرار) می‌باشد (۱۳). بعد از انجام تزریق درون‌صفافی MTBE-C14 رادیواکتیو به میزان بیشتر دفع شد که این دفع از طریق هوای بازدمی به میزان ۶۰ درصد، از راه‌های ادراری ۳۴ درصد، در مدفوع فقط ۲ درصد بود و ۴ درصد دیگر آن در بافت‌ها باقی ماند (۱۴). خون نوعی بافت پیوندی سست با عناصر سلولی گلبول‌های قرمز، گلبول‌های سفید و پلاکت‌ها است. هموگلوبین، ۹۵ درصد از پروتئین داخل سلولی گلبول قرمز را تشکیل می‌دهد (۱۵) و وظیفه آن تبادل گازهای تنفسی است (۱۶). اکی‌نوسیت، حالتی از چین خوردگی غشاء گلبول‌های قرمز است که بیش‌تر در اثر افزایش اسمولالیت خون و یا کاهش آدنوزین تری فسفات هنگام کم‌خونی‌های همولیتیک و در کارسینوم معده گزارش شده است (۱۵). گاهی گلبول‌های قرمز در اثر افزایش فیبرینوژن و گلبولین‌های پلاسما در حالت‌های التهابی و عفونت‌ها، به‌صورت رشته‌های طولیل به‌دنبال یکدیگر قرار می‌گیرند که به آن پدیده رولو (Rolu) گویند (۱۷).

حجم کلی خون در یک موش با وزن حدود ۲۲، ۵/۵ تا ۸ درصد وزن بدن و یا به‌طور متوسط 3 cm^3 می‌باشد. نسبت وزن خون به وزن بدن تقریباً ۱ به ۱۲ است. مدت‌زمان لازم برای سیلان خون در حدود ۵۰

جهت بالا بردن عدد اکتان و افزایش ظرفیت اکسیژن آن و نیز کاهش اثرات سمی تترا اتیل سرب احساس می‌گردد؛ بنابراین، از سال ۱۹۷۹، ترکیبی موسوم به متیل ترشیو بوتیل اتر (MTBE) به بنزین اضافه شد (۳). MTBE، ترکیبی شیمیایی با فرمول $\text{CH}_3\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ می‌باشد که مایعی فرار، قابل اشتعال و کم‌رنج بوده و قابلیت حل آن در آب، بسیار زیاد است و بویی شبیه به بوی دی‌اتیل اتر دارد. علاوه بر این، MTBE در شیمی آلی به‌عنوان یک حلال ارزان به کار می‌رود؛ اما نقطه جوش آن بسیار بالا می‌باشد (۴). MTBE، به‌وسیله واکنش شیمیایی متانول و ایزو بوتیلن ایجاد می‌شود. این ماده، محصولی از پالایشگاه نفت است و از ترکیب متانول و TBA (ترشیو بوتیل الکل) نیز ساخته می‌شود (۵). همچنین، این ماده چربی‌دوست بوده و ماهیت لیپیدی غشا سلولی، جذب آن را تسهیل می‌کند، به‌لحاظ شیمیایی، پایدار بوده و در دمای معمول، پلیمریزه یا تجزیه نمی‌شود و علاوه بر آب، در الکل و اترهای دیگر حل شده و بدون نیاز به مخلوط‌کننده‌های فیزیکی معلق می‌ماند (۶). علاوه بر این، MTBE ۱۱ درصد از حجم بنزین را تشکیل داده و موجب کارایی بهتر سوخت موتور می‌شود. این ماده، به‌وسیله نشت از تانکرهای ذخیره‌ای در پمپ بنزین‌ها و ورود به آب‌های زیرزمینی و خاک، نشت از وسایل نقلیه و خطوط لوله، ریزش به‌صورت تصادفی، آزاد شدن از انبارها و پالایشگاه‌ها و نیز از راه تبخیر وارد محیط می‌شود (۷).

MTBE، در غلظت ۵-۱۵ ug/lit، طعم آب را نامطبوع می‌کند؛ بنابراین، غلظت مشخصی از این ماده در آب آشامیدنی، بلافاصله قابل تشخیص می‌باشد و بدین صورت می‌توان تا حدی جلوی زیان‌های ناشی از مصرف آن را گرفت (این ماده بسیار بیش‌تر و سریع‌تر از سایر ترکیبات بنزین در آب نفوذ می‌کند) (۸). علاوه بر این، حلالیت آن در آب در دمای ۲۵ درجه

دسترسی آزاد به آب و غذای مخصوص موش در اتاق حیوان‌ها به مدت یک هفته پیش از آغاز آزمایش‌ها نگهداری شدند (۲۱). حیوان‌ها به صورت تصادفی به گروه‌های زیر تقسیم شدند:

۱- گروه شاهد ماده

گروه تیمار A

به موش‌های این گروه در مدت ۲۵ روز، هر روز یک نوبت به میزان ۰/۴ cc MTBE (۰/۰۶ cc MTBE + ۰/۰۴ cc آب مقطر) با عیار ۱۶۰۰ mg/kg وزن موش به صورت گاوآژ خورانده شد.

۲- گروه تیمار B

این گروه به مدت ۲۵ روز، هر روز یک بار مقدار ۰/۴ cc MTBE (۰/۰۶ cc MTBE + ۰/۰۴ cc آب مقطر) با عیار ۱۶۰۰ mg/kg وزن موش به همراه ۰/۱ cc سرم فیزیولوژی دریافت کردند.

سرم فیزیولوژی حاوی الکترولیت‌های سدیم، پتاسیم، کلسیم و کلرید جهت تیمار موش‌ها به روش خوراکی استفاده شد (۲۲).

سرم فیزیولوژی یک ترکیبی با الکترولیت‌های مشخص است که به صورت خوراکی استفاده شد (۲۲).

MTBE و سرم فیزیولوژی با سرنگ انسولین و نیدل گاوآژ شماره ۲۰ (خریداری شده از شرکت رازی راد، کشور ایران) و به روش گاوآژ وارد معده موش‌ها شد. گروه شاهد ماده، تحت اثر هیچ ماده‌ای قرار نگرفت. در طول مدت تیمار، وزن موش‌ها هر روز اندازه‌گیری گردید و برای بالارفتن دقت، گاوآژها در ساعت مشخصی از روز صورت گرفت.

خون‌گیری، رقیق کردن و شمارش گلبول‌ها

در پایان هر دوره آزمایشی (۲۵ روزه) (۲۳)، پس از بیهوش کردن موش‌ها با اتر و تشریح جانور، به وسیله

ثانیه تا یک دقیقه می‌باشد و انعقاد خون نیز طی ۱/۵ تا ۳ دقیقه صورت می‌گیرد (۱۸). در مورد فیزیولوژی بافت کبد می‌توان گفت که کبد بزرگ‌ترین غده بدن است. مواد غذایی جذب شده دستگاه گوارش در کبد پردازش و جهت استفاده قسمت‌های دیگر بدن، ذخیره می‌شود و خون آن (۸۰-۷۰ درصد) از ورید پورت و بقیه از شریان کبدی تأمین می‌شود (۱۶). سلول‌های اپی تلیال کبدی (هپاتوسیت‌ها)، صفحات پیوندشده و منشعب از یکدیگر و سه بعدی به نام لوبول‌های کلاسیک کبد را می‌سازند که مقاطع آن دارای وریدچه مرکزی لوبولی، هپاتوسیت، سینوزوئیدهای کبدی و ورید بین لوبولی می‌باشد (۱۹). هپاتوسیت‌ها دارای یک یا دو عدد هسته روشن و بزرگ هستند. انشعابات دور لوبی و بین لوبولی مکرراً تقسیم شده و سینوزوئیدها نیز در مرکز لوبول به یکدیگر رسیده و تشکیل ورید مرکز لوبولی را می‌دهند (۱۷). سینوزوئیدها، موئینه‌های مخصوص پیچ و خم‌داری به وسعت ۹ تا ۱۲ μm هستند که در جهت شعاعی بین لوبول‌ها قرار می‌گیرند (۲۰). با توجه به این‌که، تاکنون تحقیقات و مطالعات کافی درباره تأثیرات MTBE، بر روی خون و بافت کبد موش انجام نشده و منابع و سوابق کافی از کاربرد و اثرات این ماده بر روی ارگان‌های مشاهده نشده است، در تحقیق حاضر، اثر این ماده به صورت خوراکی بر روی موش سفید ماده نژاد Albino NMRI مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این پژوهش بر روی ۴۵ موش سفید ماده نژاد Albino NMRI (ساخت شرکت انستیتو پاستور، کشور ایران) انجام شد. موش‌های ماده بالغ در سن ۸-۱۰ هفته‌ای با میانگین وزنی ۲۸ g بودند. هر پنج موش در یک قفس و در شرایط کنترل‌شده از نظر دما و نور با

هموگلوبین موجود در خون مورد آزمایش دارد (۲۴). سپس این محلول با محلول استاندارد سالی مقایسه شد.

اندازه‌گیری چگالی سرم

چگالی سرم به وسیله دستگاهی به نام رفاکتومتر سنجیده شد که اساس کار آن بر مبنای شکست نور هنگام برخورد با جامدات است. در این روش، ابتدا دستگاه رفاکتومتر با ۱۰ μl آب مقطر صفر شد و پس از تمیز نمودن جایگاه نمونه، ۱۰ μl پلاسما تازه به وسیله سمپلر روی صفحه شیشه‌ای رفاکتومتر قرار داده شد و ۱۰ μl آب مقطر نیز به آن اضافه گردید. در نهایت، پس از قراردادن ورقه لاک‌بی بر روی صفحه شیشه‌ای، عدد لبه تاریک در ستون سمت راست خوانده شد. چون اعداد این ستون از عدد ۱/۰۰۰ (چگالی آب) تا عدد ۱/۰۴۰ برحسب گرم بر سانتی‌متر مکعب درجه‌بندی شده و معمولاً چگالی پلاسما در گروه‌های بیمار از ۱/۰۴۰ بیشتر است؛ در نتیجه جهت رقیق نمودن نمونه به آن ۱۰ μl آب اضافه و عدد به دست آمده در عدد ۲ ضرب شد (۲۱).

مطالعات بافتی

روش‌های مختلفی برای تهیه‌ی مقاطع بافتی وجود دارد؛ ولی متداول‌ترین و آسان‌ترین روش، پاساژ به وسیله پارافین جامد است که شامل برداشت کبند و شماره‌گذاری، فیکساسیون، آبگیری، شفاف‌سازی، آغشته‌سازی، غالب‌گیری، برش‌گیری، رنگ‌آمیزی، پارافین‌گیری، آب‌دهی، تمیز کردن لام‌ها و چسباندن می‌باشد. بعد از خشک شدن لام‌ها، برچسبی که نشان‌دهنده شماره و یا نام برش بود، در گوشه چپ لام زده شد (۲۵، ۲۶). در پایان، نمونه‌های تهیه‌شده مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفتند تا تغییرات ساختاری آن‌ها مشخص شوند و از نمونه‌ها توسط میکروسکوپ و لوپ که به دوربین دیجیتال مجهز بود، عکس تهیه شد و با

سرنگ ۲ میلی‌لیتری که به ماده ضد انعقاد EDTA آغشته شده بود، از دهلیز راست قلب موش، خون‌گیری به عمل آمد. سپس، یک قطره خون رقیق شده در ملانژور قرمز، بر روی لام نوبار ریخته شد و با کمک میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰× تعداد گلبول‌های قرمز مورد شمارش قرار گرفت.

اندازه‌گیری درصد حجمی گلبول‌های قرمز با روش میکروهماتوکریت

حجم کل عناصر سلولی خون موجود در حجم خاصی از خون پس از سانتریفوژ کردن به صورت درصدی محاسبه شد. به این صورت که لوله موینه مخصوص هماتوکریت تا سه چهارم طول آن از خون پر و انتهای آن با خمیر مخصوص مسدود شد. سپس، به وسیله دستگاه سانتریفوژ با سرعت ۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. در نهایت، حجم کلی گلبول‌های قرمز و سفید نسبت به پلاسما خون با استفاده از صفحه مدرج (۰ تا ۱۰۰) محاسبه گردید (۲۲).

اندازه‌گیری هموگلوبین با روش سالی

برای اندازه‌گیری هموگلوبین به روش سالی، با استفاده از پیت سالی، ۲۰ μl از خون حاوی EDTA برداشته و به یک لوله همومتر که تا درجه ۲ اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال داشت، منتقل گردید. سپس به آن آب مقطر اضافه و هم زده شد تا رنگ محلول در لوله وسط با رنگ لوله‌های کناری تقریباً مشابه شود. در نهایت، درجه سطح محلول خوانده و مقدار هموگلوبین برحسب گرم در دسی لیتر محلول خون تعیین شد. محلول اسید کلریدریک، سبب همولیز گلبول‌های قرمز و آزاد شدن هموگلوبین می‌شود. هموگلوبین با اسید کلریدریک، تولید اسید هماتین قهوه‌ای رنگ نمود که شدت رنگ آن بستگی به غلظت

هماتوکریت افزایش یافته در سطح $p < 0.05$ بین گروه‌های تیمار A و B و همچنین گروه شاهد و A معنی دار بود. میانگین هموگلوبین در موش‌های تیمار A و B، به ترتیب ۱۵ و ۱۴ g/dl و در گروه شاهد ۱۴/۵ بود. این افزایش در گروه‌ها معنی دار نبود ($p > 0.05$).

مقدار چگالی پلاسما خون موش‌های تیمار A و B، به ترتیب از ۱/۰۴۰ g/ml شاهد به ۱/۰۴۵ و ۱/۰۴۲ افزایش معنی داری یافت که این تفاوت، در سطح $p < 0.05$ بین گروه تیمار A و B و شاهد و تیمار A معنی دار بود؛ بنابراین، به طور خلاصه می‌توان نتایج این تغییرات را به صورت میانگین \pm انحراف معیار، تعداد گلبول‌های قرمز (mil/mm^3)، درصد هماتوکریت، گرم در دسی لیتر هموگلوبین و گرم در سانتی متر مکعب چگالی پلاسما در گروه‌های تیمار A، B و شاهد در غالب یک نمودار نشان داد ($p < 0.05$) اختلاف معنی دار در نظر گرفته شد. (نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱: مقایسه میانگین و انحراف معیار پارامترهای خونی در گروه‌های شاهد، تیمار A و B در موش‌های سفید ماده نژاد Albino NMRI
* اختلاف معنی دار در گروه‌های A و B ** اختلاف معنی دار در گروه‌های شاهد و A ($p < 0.05$)

تغییرات پارامترهای کبد

پارامترهای بافت کبد به صورت میانگین \pm انحراف معیار، در جدول شماره ۱ در گروه‌های مختلف مشخص شده است. با توجه به جدول شماره ۱ و اندازه‌گیری مقاطع بافتی، افزایش پارامترهای ذکر شده موش‌های

استفاده از نرم‌افزار مویک بخش‌های مورد نظر براساس واحد میکرومتر اندازه‌گیری گردید.

آنالیز آماری داده‌های حاصل از فاکتورهای خونی و بافت کبد، برای گروه‌های شاهد، تحت استرس MTBE و گروه MTBE + سرم فیزیولوژیک با کمک تجزیه واریانس یک‌طرفه صورت گرفت. هم‌چنین، جهت بررسی تفاوت‌های درون‌گروهی و مقایسه میانگین‌ها از آنالیز Post hoc از نوع آزمون توکای استفاده شد. نتایج به صورت Mean + SEM ارائه گردید و $p < 0.05$ اختلاف معنی دار در نظر گرفته شد. رسم نمودارها نیز، به کمک برنامه آماری Excel صورت گرفت.

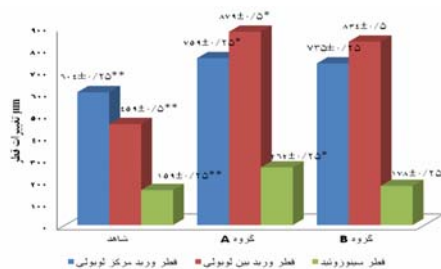
یافته‌ها

تغییرات پارامترهای خونی

میانگین تعداد گلبول‌های قرمز در گروه‌های تحت استرس MTBE (تیمار A) و تحت استرس MTBE + سرم فیزیولوژیک (تیمار B) به ترتیب ۱۲/۳۰۰ و ۹/۶۰۰ mil/mm^3 بود؛ در صورتی که در موش‌های شاهد ۹ mil/mm^3 شمارش شد. این تفاوت با روش آنالیز واریانس یک‌طرفه در سطح $p < 0.05$ برای گروه تیمار A و B معنی دار بود. هم‌چنین، در مقایسه گسترش‌های خونی گروه‌های تیمار و شاهد، ناهنجاری‌های مورفولوژیکی شامل رولو، پوی کیلوسیتوزیس (Poikilocytosis) و آنیزوسیتوزیس (Anisicytosis) در خون موش‌های تیمار شده مشاهده گردید.

میانگین هماتوکریت در گروه‌های تیمار A و B به ترتیب ۵۰ و ۴۵ درصد بود؛ در صورتی که در موش‌های شاهد، ۴۳ درصد مشاهده گردید. هم‌چنین، هماتوکریت افزایش یافت که این تفاوت، در سطح $p < 0.05$ بین گروه تیمار A و B هم‌چنین بین دو گروه شاهد گروه A معنی دار بود.

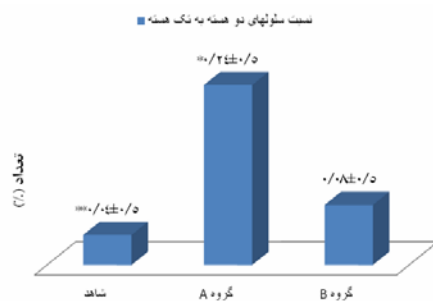
تحت استرس موش ماده $178 \mu\text{m}$ (گروه B) و $262 \mu\text{m}$ (گروه A) بود که در مقایسه با گروه‌های شاهد (گروه A) افزایش بسیار زیادی داشت. این تغییرات در مورد هر سه پارامتر اندازه‌گیری شده در سطح $P < 0/05$ معنی‌دار بود که در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است.



نمودار شماره ۲: مقایسه میانگین تغییرات قطر سیاهرگ مرکز لوبولی، بین لوبولی و سینوزوئید بافت کبد در گروه‌های شاهد، B و A در موش‌های ماده نژاد Albino NMRI. *اختلاف معنی‌دار در گروه A و B و **اختلاف معنی‌دار در گروه شاهد و A ($P < 0/05$)

تعداد سلول‌های دو هسته‌ای به کل سلول‌ها

در ارتباط با تعداد سلول‌های دو هسته‌ای نسبت به کل سلول‌های کبد، ملاحظه شد که نسبت تعداد سلول‌های دو هسته‌ای در کل سلول‌های کبدی افزایش نسبی داشت؛ به طوری که در نمونه‌های شاهد، این نسبت ۰/۰۴ درصد بود و موش‌های تیمار ماده به ۲۴ درصد و ۰/۰۸ درصد رسید. این تغییرات در سطح $P < 0/05$ معنی‌دار بود. این افزایش در نمودار شماره ۳ نشان داده شده است.

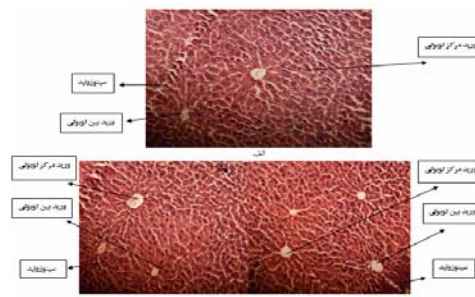


تحت استرس در موش‌های ماده نسبت به گروه شاهد معنی‌دار بود ($P < 0/05$).

جدول شماره ۱: مقادیر پارامترهای بافت کبد، در موش‌های شاهد و آزمایشی ماده نژاد Albino NMRI

| پارامتر | نمونه | |
|---|-------------|-------------|
| | تیمار B | تیمار A |
| قطر ورید مرکزی لوبولی (μm) | 604 ± 125 | 759 ± 125 |
| قطر ورید بین لوبولی (μm) | 735 ± 125 | 834 ± 125 |
| قطر سینوزوئید (μm) | 178 ± 125 | 262 ± 125 |
| نسبت سطح هسته به سلول (μm^2) | 0.04 ± 0.01 | 0.24 ± 0.05 |
| نسبت دو هسته به کل سلول | 0.08 ± 0.01 | 0.24 ± 0.05 |

مطالعات میکروسکوپی و عکس‌های گرفته‌شده از مقاطع طولی کبد و تغییرات پارامترهای ذکر شده در گروه شاهد و تیمار ماده در گروه‌های A و B در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است.



تصویر شماره ۱: تغییرات قطر ورید مرکز لوبولی، سینوزوئید و قطر ورید بین لوبولی در کبد (الف) گروه شاهد (ب) تیمار ماده گروه A (ج) تیمار ماده گروه B ($\times 100$)

تغییرات قطر سیاهرگ مرکز لوبولی، بین لوبولی و سینوزوئید بافت کبد

میانگین قطر سیاهرگ مرکز لوبولی در نمونه شاهد، $604 \mu\text{m}$ بود و در نمونه‌های تیمار ه به $759 \mu\text{m}$ (گروه A) و $735 \mu\text{m}$ (گروه B) رسید. افزایش قطر سیاهرگ بین لوبولی در گروه شاهد، به طور میانگین $459 \mu\text{m}$ بود و در نمونه‌های تیمار به $879 \mu\text{m}$ (گروه A) و $834 \mu\text{m}$ (گروه B) رسید. میانگین قطر سینوزوئیدها در گروه‌های

بود. این تغییرات در حالت مسمومیت و عفونت‌های خونی ایجاد می‌شود. در حالت کلی، وضع گلبول‌های قرمز تغییر آنچنانی نداشته است. فقط در مواردی، آنیزوسیتوزی، رولو و به‌ندرت هیپوکرومی (Hypochromic) نسبی ملاحظه شد. افزایش معنی دار ($p < 0/05$) در دو گروه (A و B)، شاید به فعالیت مراکز خون‌سازی مربوط باشد که در جریان استرس حاصل از تولوئن، اریتروسیتوز کاذب به وجود آمده و خون بخشی از مراکز خون‌ساز وارد خون محیطی شده اند، البته ترشح کورتیزول نیز می‌تواند باعث افزایش نسبی گلبول‌های قرمز شود (۲۷).

هماتوکریت به معنی نسبت حجم گلبول‌های قرمز به حجم خون است که در یک موش بالغ با وزن حدود ۲۲ g، ۵/۵ تا ۸ درصد وزن بدن و یا به‌طور متوسط 1 cm^3 می‌باشد. نسبت وزن خون به وزن بدن تقریباً ۱ به ۱۲ است (۲۸).

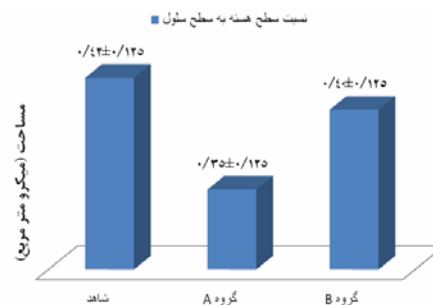
حجم کلی خون

در این تحقیق، در موش‌های تیمار شده، میانگین درصد حجمی گلبول‌های خونی نسبت به کل پلاسمای خون (هماتوکریت) افزایش قابل ملاحظه‌ای نشان داد؛ به طوری که از ۴۳ درصد در گروه شاهد به ترتیب به ۵۰ درصد و ۴۵ درصد در گروه‌های تیمار A و B رسید. این افزایش در مورد گروه تیمار A، ۱۶ درصد و در گروه تیمار B، ۴/۷ درصد و معنی دار بود ($p < 0/05$). این تغییرات می‌تواند ناشی از افزایش گلبول‌های قرمز و افزایش حجم آن‌ها باشد؛ زیرا زمانی که تعداد گلبول‌های قرمز و هموگلوبین افزایش پیدا کند هماتوکریت نیز بالا می‌رود. این نسبت با درصد بالای افزایش ۳۶ درصد میانگین گلبول‌های قرمز چندان متناسب نیست و می‌توان این موضوع را به افزایش چگالی پلاسمای، کوچک بودن برخی گلبول‌های قرمز و احتمالاً تخریب آن‌ها در

نمودار شماره ۳: مقایسه میانگین نسبت تعداد سلول‌های دوهسته‌ای به تک‌هسته‌ای در گروه‌های شاهد و تحت استرس خوراکی MTBE در موش ماده Albino NMRI
* اختلاف معنی دار در گروه‌های A و B
** اختلاف معنی دار در گروه‌های شاهد، A و B ($p < 0/05$)

مساحت سطح هسته به سیئوپلاسم

در ارتباط با رابطه سطح هسته به سیئوپلاسم بر حسب میکرومتر مربع، افزایش معنی داری دیده نشد. وسعت سطح هسته به سطح سلول در گروه شاهد، $42/0 \mu\text{m}^2$ بود؛ در صورتی که این مقدار در گروه‌های تیمار به $35/0 \mu\text{m}^2$ و $40/0 \mu\text{m}^2$ رسید ($P < 0/05$) (نمودار شماره ۴).



نمودار شماره ۴: مقایسه میانگین نسبت سطح هسته به سطح سلول در گروه‌های شاهد و تحت استرس خوراکی MTBE در موش ماده Albino NMRI

بحث

در این مطالعه، برخی پارامترهای خونی تغییرات افزایشی بسیاری را نشان داد. حضور کم و بیش گلبول‌های قرمز اکی‌نوسیت و گلبول‌های قرمز رولو در گسترش خونی قابل ملاحظه بود.

بررسی میانگین تعداد گلبول‌های قرمز گروه تیمار A ($12/3 \text{ million/mm}^3$) افزایشی در حدود ۳۶ درصد را نشان داد که این افزایش در گروه B کم‌تر و ۷ درصد بود. تنها در عده‌ای از سلول‌های خونی حالت‌های آکانتوسیتوزیس (Acanthocytosis) و رولو ایجاد شد که ناشی از تغییرات ویسکوزیته خون و افزایش چگالی

جریان ارزیابی هماتوکریت نسبت داد. مقدار هماتوکریت در نژادهای مختلف موش، حدود ۴۲ درصد گزارش شده است (۲۷). تغییر شکل گلبول‌های قرمز و افزایش حجم آن‌ها در افزایش هماتوکریت مؤثر است که این موضوع می‌تواند ناشی از اضافه شدن تعداد گلبول‌های قرمز و نیز کاهش آب خون باشد (۲۳)؛ بنابراین، در مطالعه حاضر با افزایش گلبول قرمز، به همان نسبت هماتوکریت افزایش یافت و این موضوع مطابق یافته‌های گذشته بود. غلظت و به عبارت دیگر ویسکوزیته خون در پلاسما، در مقابل هماتوکریت اهمیت دارد زیرا بین ویسکوزیته (غلظت خون) با هماتوکریت (درصد گویچه‌ها) رابطه مستقیمی وجود دارد، پس به دنبال کاهش آب بدن و افزایش سلول‌های خونی، پیدایش اجزاء بافتی در پلاسما خونی و مسمومیت ناشی از MTBE، چگالی پلاسما خونی نیز افزایش یافت.

در بررسی چگالی پلاسما با میانگین $1/040 \text{ gr/cm}^3$ در گروه شاهد، افزایشی در حدود ۱۲ درصد در موش‌های گروه A و B با میانگین $1/045 \text{ gr/cm}^3$ و $1/040 \text{ gr/cm}^3$ مشاهده شد. معنی‌داری گروه شاهد با گروه A و B می‌تواند ناشی از کاهش آب بدن، آزاد شدن اجزای بافتی و املاح حاصل از آن در خون باشد. افزایش چگالی خون به‌طور طبیعی می‌تواند در نقل و انتقال خون در اندام‌ها و تبادلات گازی مشکلاتی ایجاد نماید.

هموگلوبین موجود در گلبول‌های قرمز می‌تواند، حداکثر تا ۳۴ g به ازای ۱۰۰ ml سلول تغلیظ شود. میزان هموگلوبین خون موش $9/10-3/16 \text{ g/dl}$ می‌باشد. معمولاً افزایش تعداد گلبول‌های قرمز و هماتوکریت با افزایش هموگلوبین خون همراه است (۲۹). در این مطالعه نیز، میانگین هموگلوبین در گروه شاهد، A و B به ترتیب $14/5$ ، 15 و 14 gr/dl مشاهده شد. معمولاً افزایش تعداد گلبول‌های قرمز و هماتوکریت با افزایش

هموگلوبین خون در گلبول‌های قرمز نیز همراه است و معنی‌داری آن در گروه‌های شاهد با گروه A و گروه‌های A و B با هم مربوط به تغلیظ هموگلوبین و کاهش آب بدن می‌باشد (۱۵). برخلاف بالا رفتن تعداد گلبول‌های قرمز و هماتوکریت، میزان هموگلوبین افزایش معنی‌داری نداشت. این امر می‌تواند به اثرات تخریبی MTBE در مسائل خون‌سازی و یا تخریب هموگلوبین در گلبول‌های قرمز مربوط باشد که با وجود افزایش تعداد گلبول‌های قرمز جوان‌تر، هموگلوبین کافی در آن‌ها به وجود نیامده و در عده‌ای تخریب هموگلوبین صورت گرفته است. حضور گلبول‌های قرمز کم‌رنگ هیپوکرومی در گسترش خونی این مطلب را نشان می‌دهد و در این امر، سرم فیزیولوژی در گروه تیمار B، مؤثر نبود. سرم فیزیولوژی می‌تواند به‌عنوان ماده‌ای که اثرات سمی MTBE را در بدن تقلیل می‌دهد، مورد استفاده قرار گیرد (۲۲). در این مطالعه براساس نمودار شماره ۱، اثر افزایشنده MTBE بر روی تعداد گلبول‌های قرمز، هماتوکریت، هموگلوبین و چگالی سرم در گروه A، با حضور سرم فیزیولوژی به‌عنوان یک ماده ضدسمی، در گروه B کاهش نشان داد که معنی‌داری رابطه گروه‌های A و B و گروه شاهد با A در تمامی پارامترهای مورد آزمایش، دلیل روشنی برای اثرات ضدسمی سرم فیزیولوژی بود.

در بررسی ساختار کبدی در موش‌های تیمار A و B، نوعی التهاب کبدی ملاحظه می‌شود که در بخش‌هایی از خارج آن، غلاف پیوندی جدا شده و یا تخریب یافته است. توسعه رگ‌های خونی و انشعابات سینوزوئیدی قابل ملاحظه است و همان‌طور که انتظار می‌رود در تیمار B این تغییرات کاهش یافته است.

در تحقیقی که حافظی بر روی موش‌های spragus dawley با دوز 800 و 1600 mg/kg پس از ۴ هفته انجام داد، میزان هموگلوبین افزایش یافت (۳۰) که با

ناشی از افزایش قطر ورید پورت و انشعابات آن باشد. قطر سیاهرگ بین لوبولی که در گروه شاهد به طور میانگین $18/36 \mu\text{m}$ بود، در نمونه‌های تیمار افزایش ۸۳ و ۱۵ درصد پیدا کرد و در نتیجه خون سعی در تجمع در اطراف سلول‌های کبدی دارد که این امر می‌تواند به التهاب درون سلول‌های هیپاتوسیت منجر شود؛ به طوری که در منظره کلی از برش کبدی، انشعابات این ورید، لوبول‌ها را در بر گرفته و از فشردگی پارانشیم کاسته است.

در دیدگاه کلی، منظره انشعابات قطور مویرگ‌های دور هیپاتوسیت‌ها، سینوزوئیدهایی را به وجود آورده که در تیمارهای A قابل ملاحظه است و میانگین این افزایش در حدود ۶۱ درصد می‌باشد. در تیمار B، سرم فیزیولوژی از افزایش قطر سینوزوئیدها جلوگیری کرد و به حدود ۹ درصد رسید و افزایش قطر سینوزوئیدها ناشی از پرخونی، به التهاب کبدی منجر شد.

در بررسی میانگین وسعت هسته به سطح سلولی، اندازه هسته کاهش یافت. در مقاطع میکروسکوپی درون لوبول‌ها و اطراف ورید مرکزی لوبول، این ویژگی آشکار بود. میانگین این کاهش در گروه A در حدود ۲۰ درصد و در تیمار B از کاهش اندازه هسته جلوگیری شده و به حدود ۶ درصد رسید. کاهش سطح هسته، معرف کاهش حجم و ضعف اندامک‌های آن می‌باشد که می‌تواند نشانه‌ای از اختلالات کبدی باشد. هسته‌ها نیز در اثر مسمومیت، فعالیت متابولیکی قابل ملاحظه نمی‌توانند داشته باشند.

افزایش تعداد هسته‌ها در سلول‌های هیپاتوسیت نشان از تغییرات فعالیت و حساسیت سلول‌های کبدی داشت که معمولاً با تقسیمات هسته‌ای و ایجاد سلول‌های دو یا چند هسته‌ای ظاهر شد. این افزایش، در موش‌های تیمار A و B به ترتیب ۸ و ۶ درصد و در موش‌های شاهد، ۴ درصد بود که می‌تواند نشانه‌ای از

نتایج تحقیق حاضر همخوانی داشت. همچنین، در نتایج آزمایش دیگری در موش‌های صحرایی، پس از ۱۰۴ روز با دوز 1000 mg/kg سرطان خون ایجاد شد (۳۱).

اثرات MTBE بر بافت‌های کمی کار شده که در اکثر موارد وابسته به دوز می‌باشد. نتایج آزمایشات Gelenda نشان داد، MTBE بر میانگین تعداد نوزاد متولدشده و مدت زمان آبستنی اثر معنی‌دار نداشت، اما با دوز 2000 mg/kg وزن بدن در روز، دارای اثر معنی‌دار بر وزن مادر، نوزاد و تخمدان‌ها بود و از وزن تخمدان هنگامی که موش‌ها به مدت ۴ تا ۸ ماه در معرض MTBE قرار داشتند کاسته شد (۳۰). هم‌چنین از دست رفتن جنین‌ها بعد از لانه‌گزینی در رحم، کاهش قدرت حیاتی جنین‌ها، کاهش تعداد جنین‌ها، ناهنجاری‌های خارجی و احشایی در جنین، کاهش وزن نوزادان از جمله عوارض گزارش شده در مطالعات قبلی است (۳۲). در کبد، MTBE در اثر فرآیند متیلاسیون اکسیداتیو در میکروزوم‌های کبدی به TBA تبدیل می‌شود و سرعت این تبدیل در رت‌ها نسبت به انسان، دو برابر است (۳۳).

مطالعه کمی به‌طور مستقیم بر روی بافت کبد انجام شده و نتایج حاصل قابل مقایسه با مطالعات دیگری نیست. آزمایشات بافت کبد موش که حافظی با شرایط ۶ ساعت در روز و ۵ روز در هفته، ۱۸ ماه با دوز 3000 ppm و 8000 انجام دادند، افزایش در وزن کبد و هیپرتروفی هیپاتوسیت‌ها را در هر دو غلظت نشان داد که افزایش تقسیمات میتوزی در دوز 8000 ppm مشهود بود (۳۰).

در مطالعه حاضر، در نمونه‌های شاهد قطر سیاهرگ مرکز لوبولی $604 \mu\text{m}$ بود که در نمونه‌های گروه‌های آزمایشی B و A به ترتیب افزایشی $25/6$ و $215/6$ درصد ایجاد شد. این افزایش قطر می‌تواند

روش خوراکی در مدت زمان طولانی، سرطان و اثرات پره‌نئوپلاستیک (پیش از تومور) مشاهده گردید (۳۹). مصرف MTBE به میزان ۱/۴۲۸ mg/kg وزن بدن در هر روز به مدت ۱۴ روز موجب کاهش وزن‌های مطلق طحال و تیموس و وزن نسبی تیموس در رت‌های ماده شده؛ اما در جنس نر اثری نداشته است (۴۰،۴۸).

مشاهدات به عمل آمده نشان داده که MTBE در دوزهای بالا، در حیوانات، علاوه بر مرگ سلولی و آسیب بافتی، باعث تومورهای سرطانی می‌شود؛ بنابراین، به نظر می‌رسد که خطر سرطان‌زایی این ماده در انسان مطرح باشد (۴۱)، با توجه به پژوهش‌های انجام‌شده، این ماده به مولکول DNA آسیب وارد نمی‌کند؛ بنابراین، احتمال سرطان‌زایی آن در انسان بایستی از راه‌های متفاوت دیگری باشد (۴۲).

در حیوانات آزمایشگاهی که به صورت مختلف در معرض مقادیر بالای MTBE قرار گرفتند، موضوع سمیت و سرطان‌زایی این ماده اثبات گردیده است (۴۳). بدین معنی که، در یک سری آزمایشات، در اثر بلعیدن MTBE به مقدار ۱۰۰۰ mg به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن در روز، در طی یک دوره ۱۰۴ روزه، رت‌های ماده به سرطان خون مبتلا شدند و در رت‌های نر نیز در دوره فوق تومورهای بیضوی دیده شد (۴۴). طی تحقیقاتی، در یک دوره ۱۸ ماهه به دنبال استنشاق این ماده توسط رت‌های نر و ماده، خاصیت سرطانی در این حیوانات آزمایشگاهی مشاهده گردید. بر این اساس، IARC این ماده را در گروه با امکان سرطان‌زایی قرار داده است (۴۵).

با توجه به اثرات MTBE و نبود منابع و مقالات کافی درباره اثرات آن بر اجزای بافت‌های مختلف از جمله کبد، باید زمینه تحقیق درباره بررسی جزئیات بافتی و تغییرات ایجادشده در آن فراهم شود. اثرات

شروع فعالیت‌های متابولیکی و حتی تقسیمات میتوزی باشد. در این مورد نیز، سرم فیزیولوژی اثر کاهندگی بر MTBE داشت.

در سایر تحقیقات که بر روی سیستم عصبی انجام شده با توجه به مدت و میزان استفاده، MTBE در دوز بالا و در زمان کوتاه، با تأثیر بر سیستم عصبی جانوران موجب افزایش فعالیت، ناهماهنگی، تشنج و غش می‌شود. حجم زیاد این ماده، موجب صدمات کلیوی شده و رشد جنین را در حیوانات متوقف می‌کند. آتاکسی، تنفس سخت، سوزش ملایم چشم و پوست نیز از عوارض آن است (۳۴).

بر اساس آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان (IARC: International Agency for Research on Cancer) وابسته به سازمان بهداشت جهانی، هر چند MTBE به عنوان ماده سرطان‌زا قلمداد نمی‌شود؛ اما مشخص شده قرار گرفتن در معرض دوزهای بالای این ماده، خطری برای ایجاد سرطان است (۳۶،۳۵).

از مهم‌ترین و شایع‌ترین تأثیرات غیرسرطانی MTBE در انسان، می‌توان سردرد، سرگیجه، تهوع، آلرژی و مشکلات تنفسی را نام برد. در یک بررسی بر روی رت، به دنبال بلعیدن ۷۰ mg از این ماده به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن در روز اثراتی مشاهده نشد؛ ولی عوارض آن از ۱۰۰ mg به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن در روز، مشاهده گردید (۳۸،۳۷).

در مطالعات بر روی حیوانات، به نظر می‌رسد که قراردادن MTBE در معرض هوا در شرایط حاد، نیمه‌حاد، کوتاه‌مدت یا طولانی‌مدت بر سیستم‌های قلبی-عروقی، ماهیچه اسکلتی، پوستی، چشمی یا تولید مثلی بی‌اثر باشد؛ اما اثر آن به صورت خوراکی، حاد و نیمه‌حاد بر روی سیستم‌های تنفسی، معدی-روده‌ای، خونی، کبدی، کلیوی یا عصبی و تاحدودی مسمومیت‌های سیستمیک، خفیف مشاهده شده است. در مطالعات به

- ۴- رعایت نکات ایمنی هنگام کارکردن با این ماده در پمپ بنزین ها و پالایشگاه ها
- ۵- اطلاع رسانی عمومی درباره مضرات این ماده و ارائه راهکارهایی جهت کاهش عوارض ناشی از آن
- ۶- انجام تحقیقات دیگر بر روی سایر اندام ها و بررسی تغییرات آن ها.

سپاسگزاری

با تشکر از مسئولین آزمایشگاه دانشگاه رازی کرمانشاه که در انجام این تحقیق همراهی نمودند.

افزایشی و کاهش می MTBE ذکر شده در این تحقیق بر روی موش های ماده Albino NMRI را می توان با آزمایشات بیشتر به انسان نیز تعمیم داد و با توجه به کاربرد زیاد MTBE در سوخت وسایل نقلیه و اثرات مضر ترکیبات حاصل از آن، وجود این ماده در طولانی مدت، صدمات جبران ناپذیری بر سلامت انسان ها داشته که بهتر است در این زمینه اقدامات زیر انجام گردد:

۱- استفاده از ترکیباتی همراه با MTBE جهت کاهش اثرات مضر آن

۲- کمک به ایجاد طرحی سودمند برای مطالعات بیشتر سم شناسی MTBE

۳- شناخت اختلالات ناشی از خوردن یا استنشاق MTBE در ارتباط با تغییرات حاصله بر بافت ها و اندام های مختلف در موش

References

- Amberg A, Rosner E, Dekant W. Toxicokinetics of methyl tert-butyl ether and its metabolites in humans after oral exposure. *Toxicol Sci* 2001; 61(1):62-67.
- Yu XZ, Gu JD. Uptake, metabolism, and toxicity of methyl tert-butyl ether (MTBE) in weeping willows. *J Hazard Mater*. 2006; 137(3):1417-1423.
- Vainiotalo S, Kuusimäki L, Pekari K. Exposure to MTBE, tame and aromatic hydrocarbons during gasoline pump maintenance, repair and inspection. *J Occup Health* 2006 ; 48(5):347-357
- Lewis RJ. Methyl -tert-butyl ether (MTBE). In: *Hawley's condensed chemical dictionary*. 12th ed. New York, Van Nostrand Reinhold Co 1993; 760.
- Guillard Ch, Charton N ,Pichat P. Degradation mechanism of MTBE in atmospheric droplets. *Chemosphere*.2003; 53(5): 469-477.
- Deeb RA, Scow KM, Alvarez-Cohen L. Aerobic MTBE Biodegradation: An Examination of Past Studies, Current Challenges, and Future Research directions. *Biodegradation*.2000; 11(2-3):171-186
- Sgambato A, Iavicoli I, De Paola B, Bianchino G, Boninsegna A, Bergamaschi A, et al. Differential toxic effects of methyl tertiary butyl ether and tert-butanol on rat fibroblasts in vitro. *Toxicol Ind Health*. 2009; 25(2):141-151
- Prah J, Ashley D, Blount B, Case M, Leavens T, Pleil J, et al. Dermal, oral, and inhalation pharmacokinetics of methyl tertiary butyl ether (MTBE) in human volunteers. *Toxicol Sci*.2004 ;77(2):195-205
- De Peyster A, Rodriguez Y, Shuto R, Goldberg B, Gonzales F, Pu X, et al. Effect of oral methyl-t-butyl ether (MTBE) on the

- male mouse reproductive tract and oxidative stress in liver. *Reprod Toxicol*.2008; 26(3):246–253
10. Pouloupoulos S, Philippopoulos CJ. MTBE, methane, ethylene and regulated exhaust emission from vehicles with deactivated catalytic converters. *Atmosphoric Enviroment* 2004; 38(27): 4495 – 4500
 11. Werner I, Koger CS, Deanovic LA, Hinton DE. Toxicity of methyl-tert-butyl ether to freshwater organisms. *Environ Pollut* 2001;111(1):83-88.
 12. McKee RH, McKee RH, Vergnes JS, Galvin JB, Douglas JF, Kneiss JJ, Andrews LS. Assessment of the in vivo mutagenic potential of methyl tertiary butyl ether. *J Appl Toxicol*. 1997;17(S1): 31–36.
 13. Prah J , Ashley D, Blount B, Case M, Leavens T, Pleil J,etal. Dermal, oral, and inhalation pharmacokinetics of methyl tertiarybutyl ether (MTBE) in human volunteers. *Toxicol Sci*.2004; 77(2): 195–205.
 14. De Peyster A. MacLean KJ, Stephens BA, Ahern LD, Westover CM, Rozenshteyn D. Subchronic studies in Sprague-Dawley rats to investigate mechanisms of MTBE-induced Leydig cell cancer. *Toxicol Sci* 2003; 72(1): 31–42.
 15. Murray R K. Harper's Biochemistry. 25thed. New York, Appleton & Lange. 2000
 16. Junqueira L C, Carneiro J, Kelley R O. Basic Histology. New York. Appleton & Lange. 2002
 17. Martini F. Fundamental of Anatomy and Physiology. 5thed. London. Prentice-Hall. 2001.
 18. Hoffman R, Benz EJ, Shattil Jr. Hematology: Basic Principle and Practice. New York. Churchill Livingstone. 1991.
 19. Thibodeau G A, Patton K T. Anthony' s Text Book of Anatomy and Physiology. 17thed Missouri. Mosby. 2003.
 20. Ganong W F. Review of Medical Physiology. 15thed New York. Appleton and Lange. 1991.
 21. The National Institute for Occupational Safety and Health. Niosh Manual of analytical methods, 2th ed. Ohio. National Institute for Occupational Safety and Health. 1999.
 22. Marion N, Gleason D, Robert E, Harold C. Clinical Toxicology of Commercial Products- acute poisoning (home and farm). Baltimore. Williams and Wilkins Co. 1957.
 23. Suckow M A, Danneman P, Brayton C. The Laboratory Mouse. London. CRC Press. 2001
 24. Mjos K. Cyclic amines. In: Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology. Grayson M, Eckroth D. 3th ed. New York, John Wiley and Sons. 1997. pp: 295-308.
 25. Rojhan M S. Human Basic Histology. Teheran. Chehr Publisher. 2010.
 26. Bergman R A, Afifi A K. Saunders Text and Review Series of Histology. Philadelphia. Saunders Co. 1996.
 27. Swaen GMH, Amelvoort LV, Twisk JJ, Verstraeten E, Slootweg R, Coolins JJ, etal. Low level occupational benzene exposure and hematological parameters. *Chem Biol Interact*. 2010 ;184(1-2): 94–100.
 28. Xue-sheng W, Nan L, Wei-jun G, Shu-lan P, BAI Yu-ping, Guo-hui X, etal. Effect of Short-term Benzene Exposure on Peripheral Blood and Chromosomal Damage among Workers. *J Occup Env Med*. 2010;27(8): 464-467.
 29. Liu CS, Tsai JH, Kuo SW. Comparison of complete blood counts and urinary benzene metabolites after exposure to benzene. *Mid*

- Taiwan J Med.2000; 5: 235-242.
30. Hafezi M. Toxic effect of methyl tertiary-butyl ether on the lung tissue and blood cells and liver of mice. Conference Regional on Applied Studies in Fisheries and Environment. Kermanshah. University of Azad Kermanshah. 2011.
 31. Backer W S, Katoua HA. Assessment of the impact of methyl tertiary-butyl (MTBE) contaminated drinking water on the blood hematology, Bulletin of pure and applied science. 2006; 25(2): 234-242.
 32. Dodd D, Willson G, Parkinson H, Bermudez E. Two-year drinking water carcinogenicity study of methyl tertiary-butyl ether (MTBE) in Wistar rats. J Appl Toxicol. 2013; 33(7): 593-606.
 33. Hong JY, Yang CS, Lee M, Wang YY, Huang WQ, Tan Y, et al. Role of cytochromes P450 in the metabolism of methyl tert-butyl ether in human livers. Arch Toxicol. 1997; 71(4): 266-269.
 34. Bern R M, Levy M N. Principles of Physiology. 3th ed. Philadelphia. Mosby, 2000.
 35. Pourahmad J, Eskandari MR, Alavian G, Shaki F. Lysosomal membrane leakiness and metabolic biomethylation play key roles in methyl tertiary butyl ether-induced toxicity and detoxification. Toxicol Environ Chem. 2012 ; 94(2): 281-293.
 36. de Peyster A, Mihaich E, Kim DH, Elyea WA, Nemeč MJ, Hirakawa BP. Responses of the steroidogenic pathway from exposure to methyl- tert-butyl ether and tertbutanol. Toxicology. 2014 ; 319: 23-37.
 37. Li D, Yuan C, Gong Y, Huang Y, Han X. The effects of methyl tert-butyl ether (MTBE) on the male rat reproductive system. Food Chem Toxicol. 2008; 46(7): 2402-2408.
 38. Grant KA, Samson HH. Ethanol and tertiary butanol induced microcephaly in the neonatal rat: Comparison of brain growth parameters. Neurobehav Toxicol Teratol. 1982 ; 4(3): 315-321.
 39. Li D, Yin D, Han X. Methyl tert-butyl ether (MTBE)-induced cytotoxicity and oxidative stress in isolated rat spermatogenic cells. J Appl Toxicol. 2007; 27(1): 10-17.
 40. Benson J, Tibbetts B, Barr E. The uptake, Distribution, Metabolism, and Excretion of Methyl Tertiary - Butyl Ether Inhaled Alone and in Combination with Gasoline Vapor. J Toxicol Environ Health A. 2003 ; 66(11): 1029 - 1052.
 41. Li D, Yuan C, Gong Y, Huang Y, Han X. The effects of methyl tert-butylether (MTBE) on the male rat reproductive system. Food Chem Toxicol. 2008 ; 46(7): 2402-2408.
 42. Sørensen M, Skov H, Autrup H, Hertel O, Loft S. Urban benzene exposure and oxidative DNA damage: influence of genetic polymorphisms in metabolism genes. Sci Total Environ. 2003; 309(1-3): 69-80.
 43. Li D, Liu Q, Gong Y, Huang Y, Han X. Cytotoxicity and oxidative stress study in cultured rat Sertoli cells with methyl tert-butyl ether (MTBE) exposure. Reprod Toxicol. 2009 ; 27(2): 170-176.
 44. Nihlen A, Lof A, Johanson G. Experimental exposure to methyl tertiary-butyl ether I. Toxicokinetics in humans. Toxicol Appl Pharmacol. 1998; 148(2): 274-280.
 45. WHO, IARC. Formaldehyde. In: International Agency for Research on

Cancer monographs on the evaluation of
carcinogenic risks to humans: wood dust and

formaldehyde. Lyon, IARC, WHO. 1995; P:
217-362.