

اثرات تجویز خوراکی تولوئن بر بافت طحال و پارامترهای خونی

Albino NMRI در موش سفید نر نژاد

نسیم نعیمی^۱، حمیدرضا عادلی^{۲*}، کبری زارع^۳^۱ عضو هیات علمی، گروه زیست شناسی، دانشکده ی علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران^۲ دانشجوی دکتری زیست شناسی تکوینی، دانشگاه علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران^۳ دکتری تخصصی، فیزیولوژی جانوری، دانشگاه علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران^۴ نویسنده مسئول: دانشگاه علوم و تحقیقات تهران، دانشکده ی علوم پایه، ایران

پست الکترونیک: adelihamidreza@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: تولوئن (Toluene) (C7H8) از تصفیه نفت خام به دست می آید و ترکیبی آروماتیک است که به عنوان ماده خام، مکمل و یا حلال مورد استفاده قرار می گیرد. با توجه به کاربرد زیاد در صنعت و سمی بودن آن، هدف مطالعه ی حاضر، بررسی اثر تولوئن بر بافت خون و ریه موش نر بالغ نژاد Albino NMRI بود.

مواد و روش کار: ۳۰ سر موش نر بالغ نژاد Albino NMRI در ۳ گروه، شم، گروه تیمار A که به مدت ۲۵ روز هر روز یک نوبت ۱/ سی سی تولوئن + سرم فیزیولوژیک (۰/۳۵٪ تولوئن + ۰/۶۵٪ سرم فیزیولوژیک) با عیار غلظت ۱۷۰۰ mg/kg وزن موش و گروه تیمار B با شرایط مشابه که عیار غلظت ۱۰۰۰ mg/kg تولوئن را دریافت کردند، مورد مطالعه قرار گرفتند. پس از وزن کشی، بیهوشی و خون-گیری، پارامترهای مورد نظر بافت طحال و خون، با نرم افزار موتیک اندازه گیری و مطالعات ماکروسکوپی و میکروسکوپی از طریق لامهای تهیه شده، انجام شد.

یافته ها: در گروه A افزایش میانگین تعداد گلبولهای قرمز ۴/۷٪، هماتوکریت ۱۸/۷٪، چگالی پلاسما ۱۲٪ و هموگلوبین ۷/۴٪، همچنین کاهش ضخامت دیواره کپسول طحال و فیبری شدن آن ۱۰/۱٪، افزایش ضخامت دیواره و قطر داخلی شریانچه مرکزی ۳۲٪ و ۳۵/۶٪، کاهش وزن طحال ۷٪ و وزن موش ها ۱۰٪ نسبت به گروه شم، معنی دار بود. ویژگیهای ذکر شده در گروه B (به جز پارامترهای خونی که بیشتر از گروه A بود) تغییرات کمتری را نشان داد اما در مقایسه با گروه شم و A معنی دار بود (۰/۰۵ < P).

نتیجه گیری: معنی داری رابطه ها نشان داد که تولوئن با تحریک مراکز خونساز، باعث افزایش پارامترهای خونی، به هم ریختگی پاراتشیمی و التهاب طحال شده که کاهش وزن بدن و طحال موش ها را به همراه داشت و در عیار بالاتر اثرات آسیب رسان بیشتری را نشان داد (غیر از پارامترهای خونی در گروه B).

واژه های کلیدی: تولوئن، پارامترهای خون، بافت طحال، موش سفید نر نژاد Albino NMRI

مقدمه

هیدرو کربن های آروماتیک یکی ترکیبات مهم نفت خام هستند که به دلیل وجود ۴ ترکیب اصلی در آنها یعنی تولوئن، بنزن، اتیلن بنزن و زایلن BTEX نامیده می شوند و خاصیت سمی و سرطانزایی آنها همیشه موجب نگرانی و بررسی این ترکیبات شده است [۱،۲]

تولوئن به عنوان ماده خام در تولید چسب ها، ضد زنگ، لاک، تینر، روغن جلا، عطر، الکل، رنگ، رنگهای لاستیک، رزین، چسب هواپیما، دباغی چرم، براق کننده کفش، روغن مو و پوست، عطر، ضد یخ، پاک کننده ها و آفت کش ها مورد استفاده قرار می گیرد [۳،۴]. در طبیعت دو منبع بزرگ مواد آلی، نفت و زغال سنگ است که ترکیبات آروماتیک از آنها بدست می آیند [۵]. تولوئن با فرمول شیمیایی C_7H_8 از گروه هیدروکربن های آروماتیک می باشد و به نام های متیل بنزن، فنیل متان، تولوئن متاسید و متیل بنزول نیز معروف است [۶]. این ماده به محیط زیست نیز آسیب می رساند، طبق گزارشی که گرین وایر در سال ۱۹۹۵ ارائه کرد، سه ماده شیمیایی سمی که به طور گسترده توسط صنایع شیمیایی وارد محیط می شوند تولوئن، متانول و آمونیاک هستند [۷]. تولوئن به همراه بنزن و گزیلن از افزودنیهای بنزین است و ۱۵/۴٪ آن را تشکیل می دهد که در ساختن کک از زغال سنگ به دست می آید [۸]. نش، دفن و انهدام محصولات حاوی بنزین و تخلیه فاضلابهای صنعتی در آبهای زیر زمینی و خاک، فعالیتهای صنعتی شامل پروسه، تولید، مصرف و دفع مواد زاید که در آنها تولوئن به عنوان ماده خام، مکمل و یا حلال مورد استفاده قرار می گیرد، محیط های تجاری، اداری و خانگی که این ماده در آنها کاربرد دارد، همچنین منابع متحرک، سوخت خودروها و جایگاه های سوخت گیری عامل انتشار تولوئن هستند [۹] انسان ممکن است از روشهای متعددی مانند بوکشیدن چسب به طور عمدی یا تصادفی خصوصا در کودکان، آب آشامیدنی، تنفس بخارات مواد شیمیایی در مراکز صنعتی و کارگاهها و یا استفاده از مایعات، و دود بنزین و فراورده های آرایشی در معرض تولوئن و عوارض آن قرار گیرد. همچنین کسانی که با بنزین و سایر فراورده های نفتی سر و کار دارند و یا در داخل خانه ها با وسایل آرایشی مانند جلا دهنده های

ناخن، رنگها، تینر، لکه پاکن ها و غیره کار می کنند، در معرض تولوئن قرار گیرند [۱۰]. از لحاظ سم شناسی، خواص تولوئن شبیه به بنزن بوده اما خاصیت تحریکی تولوئن بر روی پوست و غشاء موکوسی شدید تر از بنزن است. بطور کلی، تولوئن به عنوان یک عامل بازدارنده سیستم اعصاب مرکزی (CNS)، در غلظت های بالا دارای خاصیت نارکوتیک و بیهوش کنندگی است [۱۱،۱۲]

تولوئن در غلظت های متفاوت باعث اثرات متنوعی بر روی انسان دارد، مثلا افرادی که در معرض 200mg/kg تولوئن قرار گرفتند، دچار تحریک چشم و ریزش اشک شدند و در افرادی که در معرض مقدار 600mg/kg تولوئن بودند، تهوع خستگی و ضعف، همچنین خواب آلودگی و عدم تعادل گزارش شد [۱۳]. تولوئن حتی به مقدار کم 60mg/kg بعد از ۳۰ دقیقه باعث مرگ خواهد شد و علت آنرا بعد از کالبد شکافی ورم کبد، پرخونی، خونریزی و نکروز توبولی دانسته اند [۱۴،۱۵]

علاوه بر اثرات ذکر شده هارلمن^۱ و کوپر^۲ نشان دادند که تغییرات در برخی پارامترهای طحال از جمله طنبیهای طحالی، پالپ قرمز، اندازه و تراکم سلولهای خونی و سایر تغییرات هیستوپاتولوژی نشانه تغییر در عملکرد بافتی آن تحت تاثیر عوامل استرسی مختلف است [۱۶،۱۷]. به دلیل اهمیتی بافت طحال مطالعات زیادی بر روی آن انجام شده، منجنانا^۳ در بررسی اثرات آمفتامین در موش به ارتباط مستقیم کاهش وزن طحال و عملکرد سلولهای آن اشاره کرد [۱۸].

طحال دومین اندام لنفاوی بدن بوده که وزن آن، در بزرگسالان ۷۵ تا ۱۵۰ گرم است و در هر دقیقه، حدودا ۳۰۰ میلی لیتر خون از آن عبور می کند، بنابراین یک بافت کاملا پر خون محسوب می شود که ارتباط تنگاتنگی با گلبولهای قرمز خون دارد [۱۹]. این اندام در مراحل جنینی محل خونسازی بوده و حتی پس از اینکه این وظیفه را بافت مغز استخوان انجام می دهد در مواقع ضروری خونسازی با بزرگ شدن طحال به آن برمی گردد. ذخیره گلبولهای قرمز خون در پالپ قرمز و تخریب روزانه

1-Harleman

2- kuper

3 -Manjanatha

۳- هفته ای یک بار قفس‌ها نظافت و در صورت لزوم از مواد پاک کننده و ضدعفونی کننده (مایع ظرف شویی و الکل اتیل یک ۷۰٪) استفاده شد. هر روز غذای مانده جمع آوری و مجدداً غذای تازه در دسترس قرار گرفت.

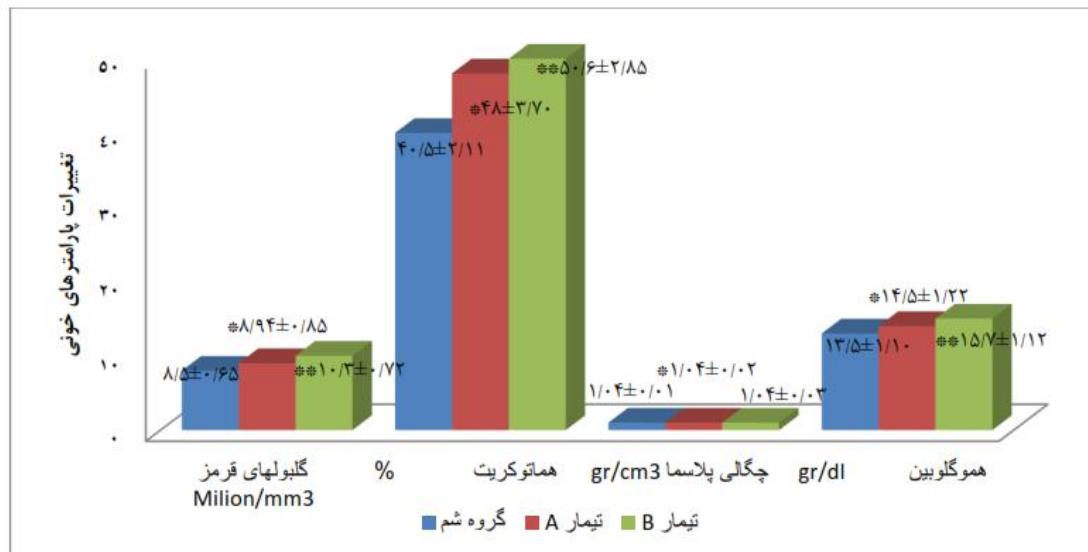
حجم کل عناصر سلولی خون موجود در حجم خاصی از خون را پس از سانتریفوژ کردن به صورت درصدی محاسبه کردیم. به این صورت که لوله موئینه مخصوص هماتوکریت را تا سه چهارم طول آن از خون پر کرده و انتهای لوله موئینه را با خمیر مخصوص مسدود کردیم و آن را به وسیله دستگاه سانتریفوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ نمودیم، سپس حجم کلی گلبول‌های قرمز و سفید را نسبت به پلاسمای خون با استفاده از صفحه مدرج (۰ تا ۱۰۰) محاسبه کردیم.

برای اندازه‌گیری هموگلوبین به روش سالی [۲۴]، با استفاده از پیپت سالی، ۲۰ میکرولیتر از خون حاوی EDTA را برداشته و آن را به یک لوله همومتر که تا درجه ۲ آن اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال داشت، انتقال دادیم و آن قدر به آن آب مقطر اضافه نموده و هم زدیم تا رنگ محلول در لوله وسط با رنگ لوله‌های کناری تقریباً یکی شد. سپس درجه سطح محلول را خوانده و مقدار هموگلوبین را بر حسب گرم در دسی لیتر محلول خون تعیین کردیم. محلول اسید کلریدریک گلبول‌های قرمز را همولیز کرده و موجب آزاد شدن هموگلوبین می‌شود. هموگلوبین با اسیدکلریدریک، تولید اسید هماتین قهوه‌ای رنگ کرد که شدت رنگ آن بستگی به غلظت هموگلوبین موجود در خون مورد آزمایش دارد [۲۶، ۲۷]. سپس این محلول با محلول استاندارد سالی مقایسه کردیم. 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 را با ۱۰ میکرولیتر آب مقطر صفر کرده، سپس جایگاه نمونه را تمیز و ۱۰ میکرولیتر پلاسمای تازه را به وسیله سمپلر روی صفحه شیشه‌ای رفاکتومتر ریختیم، ۱۰ میکرولیتر آب مقطر نیز به آن اضافه کردیم، سپس ورقه لاک‌ی را بر روی آن قرار داده و عدد لبه تاریک در ستون سمت راست را خواندیم. چون اعداد این ستون از ۱/۰۰۰ که چگالی آب است تا عدد ۱/۰۴۰ بر حسب گرم بر سانتی متر مکعب درجه بندی شده است و معمولاً چگالی پلاسما در گروه‌های تیمار از ۱/۰۴۰ بیشتر است، جهت رقیق نمودن نمونه به آن ۱۰ میکرولیتر آب اضافه کرده و عدد بدست آمده را در ۲

ضرب کردیم. روشهای مختلفی برای تهیه ی مقاطع بافتی وجود دارد، ولی متداول ترین و آسان ترین روش، پاساژ به وسیله ی پارافین جامد است که شامل برداشت طحال و شماره گذاری، فیکساسیون، آبگیری، شفاف سازی، آغشته سازی، غالب گیری، برش گیری، رنگ آمیزی، پارافین گیری، آب دهی، تمیز کردن لامها و چسباندن بود. بعد از خشک شدن لامها، برچسبی که نشان دهنده ی شماره و یا نام برش بود در گوشه ی چپ لام زدیم [۲۰] در پایان نمونه های تهیه شده مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفتند تا تغییرات ساختاری آنها مشخص شوند و از نمونه ها توسط میکروسکوپ و لوپ که به دوربین دیجیتال مجهز بود، عکس تهیه و با استفاده از نرم افزار موتیک بخشهای مورد نظر بر اساس واحد میکرومتر اندازه گیری شد. برای آنالیز آماری داده های حاصل از فاکتورهای خونی و بافت طحال، تجزیه واریانس یک طرفه برای گروه‌های شاهد، سرم فیزیولوژیک (شم)، تحت استرس مورفولین و گروه (مورفولین + سرم فیزیولوژیک) و جهت بررسی تفاوت‌های درون گروهی 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 معنی‌دار در نظر گرفته شد. رسم نمودارها به کمک برنامه آماری اکسل انجام شد. در آنالیز داده های آماری حاصل از اندازه گیری قطر بخش های مختلف طحال و تغییرات پارامترهای خونی از تجزیه واریانس یک طرفه و برای گروه‌های شم و تیمار (تحت استرس تولون) جهت بررسی تفاوت‌های درون گروهی و مقایسه میانگین‌ها از آنالیز از نوع آزمون Tukey استفاده شد. نتایج به صورت Mean + SEM ارائه، ($P < 0.05$) اختلاف معنی‌دار و با * مشخص شد. برای رسم نمودارها از برنامه آماری Excel استفاده و اندازه گیری ابعاد سلولها به وسیله نرم افزار Motic انجام شد.

یافته ها

نتایج این مطالعه نشان داد که افزایش در تعداد گلبولهای قرمز (میلیون در میلی متر مکعب)، درصد هماتوکریت، گرم در سانتی متر مکعب چگالی پلاسما و گرم در دسی لیتر هموگلوبین و پس از اثر تولون ایجاد شد که این افزایش بین، گروه شم با گروه تیمار A, B معنی دار بود و



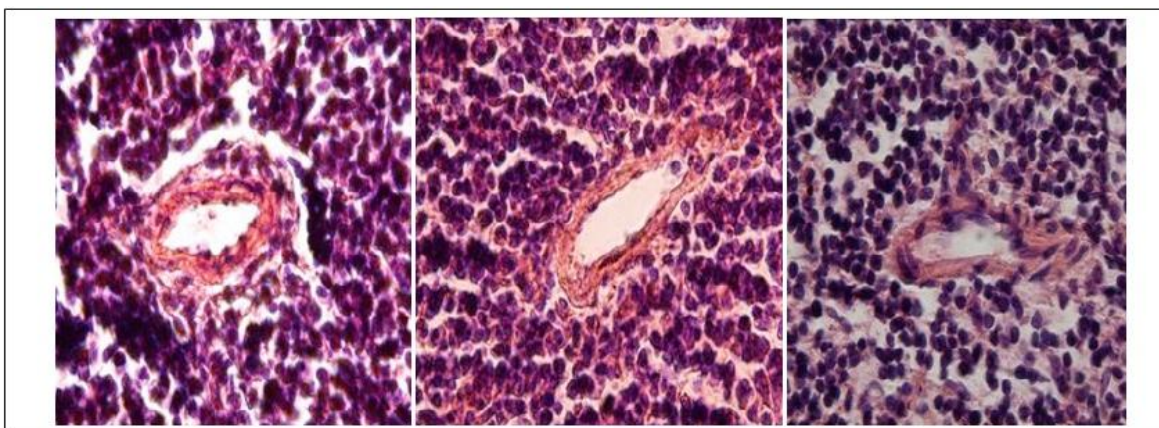
نمودار ۱: مقایسه میانگین پارامترهای خونی گروه های شم، تیمار A و B در موشهای سفید نر Albino NMRI
 علامت (*) نشان دهنده اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) بین گروههای تیمار A, B با گروه شم
 علامت (**) نشان دهنده اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) بین گروههای تیمار (A, B)

جدول ۱: میانگین $\pm$ انحراف از معیار، پارامترهای اندازه گیری شده در بافت طحال در واحد میکرومتر (μm) در گروه های شم، تیمار A و B موشهای سفید نر نژاد Albino NMRI

تعداد	تولون B گروه تیمار ۱۷۰۰ mg/kg	تولون A گروه تیمار ۱۷۰۰ mg/kg	گروه شم	نمونه
۳۵	۱۲۵/۵ ± ۳/۰۲۷	۱۱۵/۵ ± ۳/۰۲۷	۱۲۸/۵ ± ۳/۰۲۷	ضخامت کپسول طحالی (μm)
۴۵	۸۴/۲ ± ۲/۲۵**	۹۹/۱ ± ۲/۶۰ *	۷۵/۵ ± ۳/۰۲۷	ضخامت دیواره ای شریانچه مرکزی (μm)
۳۵	۱۴۲/۳ ± ۲/۷۵**	۱۷۵/۵ ± ۳/۰۲*	۱۲۹/۵ ± ۳/۰۲	قطر داخلی شریانچه مرکزی (μm)

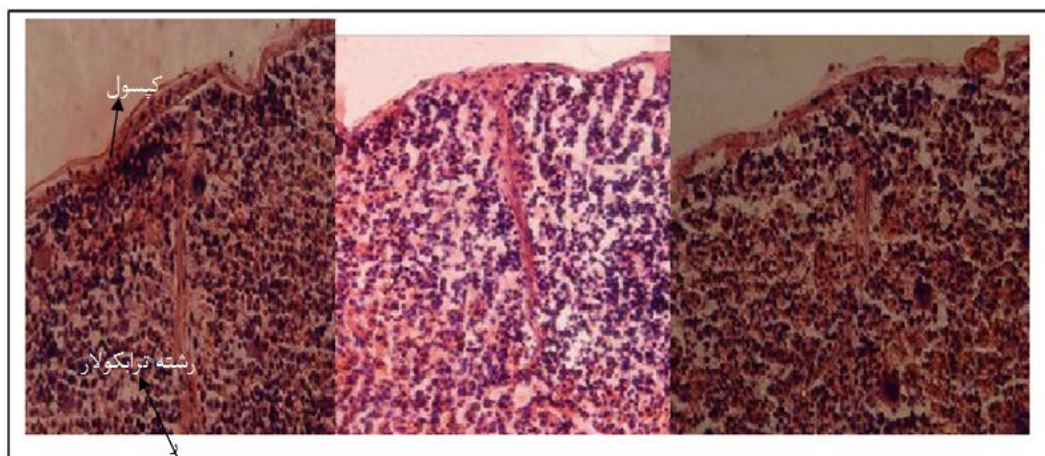
* اختلاف معنی دار در سطح ($P < 0.05$) بین گروه A با گروه شم

** اختلاف معنی دار در سطح ($P < 0.05$) بین گروه A و B



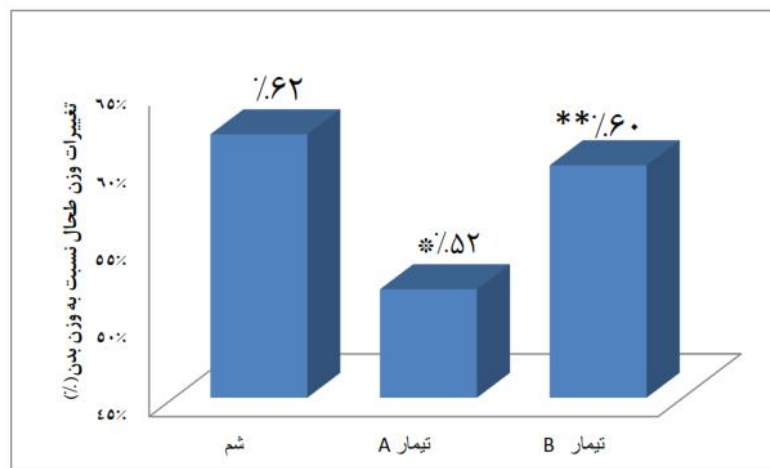
الف ب ج**

شکل ۱: برش طولی با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین و افزایش قطر شریانچه مرکزی پالپ سفید طحال در گروه های (ب) تیمار A، (ج) تیمار B در مقایسه با گروه شم (الف) ($\times 1000$)
 *اختلاف معنی دار در سطح ($P < 0.05$) بین گروه A با گروه شم
 **اختلاف معنی دار در سطح ($P < 0.05$) بین گروه B بین گروه A و B

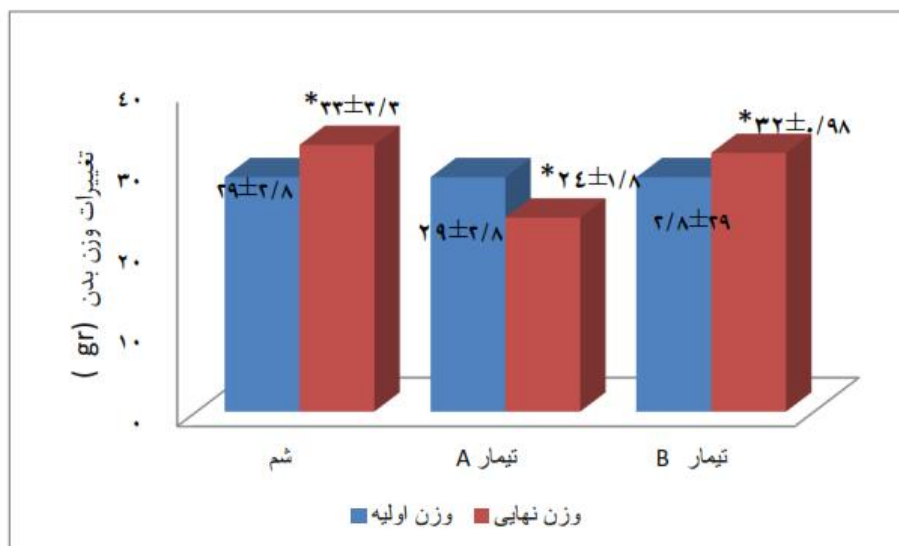


الف ب ج**

شکل ۲: کاهش ضخامت و فیبروز بافت کپسول و تریکولار بافت طحال که در گروه تیمار A (شکل ب) نسبت به گروه شم (شکل الف) و تیمار B (شکل ج) معنی دار بود ($P < 0.05$)
 *اختلاف معنی دار در سطح ($P < 0.05$) بین گروه A با گروه شم



نمودار ۲: کاهش معنی دار وزن طحال نسبت به وزن بدن موش بین دو گروه تیمار A و شم و ارتباط معنی دار دو گروه تیمار A, B در موشهای سفید نژاد Albino NMRI
 علامت (*) نشان دهنده اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) بین گروههای تیمار A با گروه شم
 علامت (**) نشان دهنده اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) بین گروههای تیمار (A, B)



نمودار ۳: افزایش وزن بدن (وزن ثانویه) در گروههای شم و تیمار B و کاهش آن در گروه تیمار A نسبت به وزن اولیه در موشهای سفید نژاد Albino NMRI
 علامت (*) نشان دهنده اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) بین وزن اولیه و ثانویه در گروههای شم، تیمار A, B

بحث

تولون ترکیبی است که در صورت تماس در جانوران، علائمی مانند تحریک چشم، دستگاه عصبی، تحریکات پوستی، عدم تعادل، لرزش و غیره ایجاد می‌کند. در موش های صحرایی تماس کوتاه مدت با تولون به میزان 1250 mg/kg هماهنگی سیستم عصبی را کاهش می‌دهد، گربه ها نیز به دنبال قرار گرفتن در معرض تولون به میزان 7800 mg/kg به مدت ۸۰ دقیقه دچار لرزش بدن شده و نهایتاً احساس ضعف، خستگی و خواب آلودگی در آنها ظاهر شد [۲۸]

در این تحقیق تولون اثرات مختلفی بر فاکتورهای خونی و بافت طحال داشت. بررسی میانگین تعداد گلبول های قرمز گروه تیمار A ($8/94 \text{ million/mm}^3$) افزایشی در حدود $4/7\%$ نشان داد که این افزایش در گروه B آشکارتر بود. در شکل گلبول های قرمز تغییرات عمده ای صورت نگرفت، تنها در عده ای از سلول های خونی حالت آکانتو سیتوزیس و حالت رولو ایجاد شد و ناشی از تغییرات ویسکوزیته خون، افزایش چگالی بود که در حالت مسمومیت و عفونت های خونی ایجاد می‌شود.

افزایش معنی دار ($P < 0/05$) در این دو گروه (A, B) شاید به فعالیت مراکز خونسازی مربوط باشد که در جریان استرس حاصل از تولون، ایتروسیتوز کاذب به وجود آمده و خون بخشی از مراکز خون ساز وارد خون محیطی شده است. البته ترشح کورتیزول نیز می‌تواند باعث افزایش نسبی گلبول های قرمز شود [۲۹]

هماتوکریت به معنی نسبت حجم گلبول های قرمز به حجم خون که در یک موش بالغ حدود ۲۲ گرم، $5/5$ الی 8 ٪ وزن بدن و یا به طور متوسط ۲ سانتی متر مکعب است. نسبت وزن خون به وزن بدن نیز تقریباً ۱ به ۱۲ است [۳۰]

در این تحقیق، میانگین درصد حجمی گلبول های خونی نسبت به کل پلاسمای خون (هماتوکریت) افزایش قابل ملاحظه ای در موش های تیمار نشان داد که از $40/5\%$ در گروه شم به ترتیب به $50/6\%$ و 48% در گروه های تیمار A و B رسید. این افزایش در مورد گروه تیمار A $18/7\%$ و در گروه تیمار B 25% و معنی دار بود ($P < 0/05$) و این تغییرات می‌تواند ناشی از افزایش گلبولهای قرمز و

اثرات افزایشنده تولون در تمامی پارامترها در گروه تیمار B بیشتر بود. (در مورد تعداد گلبولهای قرمز و هموگلوبین بین گروههای تیمار A, B, نیز ارتباط معنی دار وجود داشت) $P < 0/05$ که نمودار ۱ تغییرات این پارامترها را به صورت مقایسه ای در ۳ گروه آزمایشی نشان می‌دهد.

مطالعات میکروسکوپی و اندازه گیری ها نشان داد که میانگین $\pm$ انحراف معیار، ضخامت دیواره شریانچه مرکزی و قطر داخلی شریانچه مرکزی در گروه تیمار A و تیمار B نسبت به گروه شم افزایش معنی دار نشان داد (این اثر افزایشنده در بین گروه های تیمار A و B نیز معنی دار بود) ضخامت کپسول طحال در گروه تیمار A کاهش معنی داری را در نسبت به گروه شم داشت (بین گروه شم و B ارتباط معنی دار نبود) ($P < 0/05$) و جدول ۱ میانگین این تغییرات را در ۳ گروه آزمایشی نشان می‌دهد. مطالعات بافت شناسی و میکروسکوپی، افزایش ضخامت دیواره شریانچه مرکزی و قطر داخلی شریانچه مرکزی پالپ سفید را در شکل ۱ نشان می‌دهد که در گروه شم نسبت به تیمار A و تیمار B این رابطه معنی دار بود ($P < 0/05$) همچنین شکل ۲ کاهش ضخامت کپسول، جداسدن از بافت طحال، فیبروز بافت کپسول و تراکولار را در بافت طحال نشان می‌دهد که در گروه تیمار A نسبت به گروه شاهد و تیمار B این رابطه معنی دار بود ($P < 0/05$) میانگین و انحراف معیار وزن طحال ($0/56 \pm 0/27$) نسبت به وزن بدن در گروه شم $0/62$ در گروه تیمار A ($0/45 \pm 0/11$) و در گروه تیمار B $0/60$ ($0/49 \pm 0/12$) بود به این ترتیب وزن طحال نسبت به وزن بدن در گروه تیمار A کاهش معنی داری نسبت به گروه شم داشت (گروه تیمار A و B نسبت به یکدیگر رابطه معنی داری را نشان دادند) نمودار ۲ تغییرات وزن طحال را نسبت وزن بدن نشان می‌دهد ($P < 0/05$)

تغییرات وزن بدن: میانگین و انحراف معیار وزن موش های شم از $29 \pm 2/8$ گرم، ۴ گرم افزایش ($33 \pm 3/3$)، در گروه تیمار A ۵ گرم کاهش ($24 \pm 1/8$) و در گروه تیمار B $3/5$ گرم افزایش یافت ($32 \pm 0/98$) که تمامی این تغییرات در هر گروه، نسبت به وزن اولیه (زمان قبل از اثر تولون) معنی دار بود. نمودار ۳ تغییرات وزن بدن را نشان می‌دهد ($P < 0/05$).

داری افزایش اما میزان هماتوکریت کاهش پیدا کرد (ب) توجه به اینکه میانگین غلظت تولوئن در پمپ بنزینها ۳۷٪ است [۳۶]

کاهش هماتوکریت در مطالعه ملیکا و همکارانش در تزریق درون صفاقی تولوئن در موش ها به میزان ۳ میلی گرم بر وزن بدن به مدت ۱۱ روز نیز گزارش شد [۳۷]. البته در مطالعه زمانی پور و همکارانش مانند نتایج تحقیق ما افزایش هماتوکریت را در غلظت ۳/۹۹ پی پی ام بنزن گزارش شد که آن را به فعالیت فیزیکی افراد و از دست دادن آب بدن مرتبط دانسته اند و با توجه به نتایج مطالعه ما نیز این موضوع قابل تامل و نیاز به بررسی بیشتر دارد [۳۸] در غلظت های بسیار پایین تر تولوئن نیز تغییرات خونی گزارش شده است به طوری که کیو افزایش مقدار هموگلوبین را در غلظت ۵ پی پی ام بنزن گزارش کرد [۳۹] بنابراین دامنه تغییرات پارامترهای خونی را می توان به عنوان یک شاخص هماتوتوکسیکی برای تولوئن در نظر گرفت.

تولوئن بر بسیاری از اندامها اثر گذار بوده، از جمله کبد، کلیه ولی ما گزارش کامل و جامعی از بافت طحال مشاهده نکردیم. در یک بررسی موشهای صحرایی را برای ۵ هفته و هر هفته ۱۲ ساعت در معرض ۱۲۰۰ ppm تولوئن قرار دادند که آسیب های شنوایی برگشت ناپذیری در آنها مشاهده گردید. در این بین موش های مسن صدمات شنوایی عمیق تری نسبت به موش های جوان نشان دادند و در موش های صحرایی مصرف روزانه ۶۲۰ mg/kg تولوئن نیز صدمات شنوایی ایجاد شد [۴۰]. در این مطالعه طی دوره ۲۵ روزه تیمار موش های گروههای A و B، ملاحظه شد که به علت اثرات سمی تولوئن در بافت خون و طحال، کاهش تغذیه و در نتیجه کاهش جذب مواد غذایی، موش های گروه A کاهش وزن پیدا کردند. در مطالعه ای که در سال ۱۹۹۹ انجام شد تحت تاثیر عوامل استرس محیطی وزن موشهای رت کاهش نیافت [۴۱]. البته در مطالعه Le Gros تزریق ریتالین به موشها به طور معنی داری باعث کاهش وزن موش ها شد. در بیشتر نتایج افزودن تیمارهای مختلف باعث کاهش وزن موشها می شود زیرا این مواد به عنوان یک عامل استرسی مانع از وزن گیری نرمال می شوند [۴۲].

افزایش حجم آنها باشد زیرا زمانی که تعداد گلبول های قرمز و هموگلوبین افزایش پیدا کند هماتوکریت نیز بالا می رود. مقدار هماتوکریت در نژاد های مختلف موش در حدود ۴۲٪ گزارش شده است [۲۹]. تغییر شکل گلبول های قرمز و افزایش حجم آنها می تواند در افزایش هماتوکریت موثر باشد که این موضوع می تواند ناشی از اضافه شدن تعداد گلبول های قرمز و نیز کاهش آب خون باشد [۲۴]. بنابراین در این تحقیق با افزایش گلبول قرمز به همان نسبت هماتوکریت نیز افزایش یافت و این موضوع مطابق با یافته های گذشته بود.

در بررسی چگالی پلاسما با میانگین $1/040 \text{ gr/cm}^3$ در گروه شم، افزایشی در حدود ۱۲٪ در موش های گروه A و B با میانگین $1/045 \text{ gr/cm}^3$ مشاهده شد و معنی داری گروه شم با گروه A و B می تواند ناشی از کاهش آب بدن و آزاد شدن اجزای بافتی و املاح حاصله از آن در خون باشد. افزایش چگالی خون به طور طبیعی می تواند در نقل و انتقال خون در اندام ها و تبادلات گازی مشکلاتی ایجاد نماید.

هموگلوبین موجود در گلبولهای قرمز می تواند حداکثر تا ۳۴ گرم به ازای صد میلی لیتر سلول تغلیظ شود و میزان هموگلوبین خون موش $16/3 - 10/9 \text{ g/dl}$ است [۳۱] معمولا افزایش تعداد گلبول های قرمز و هماتوکریت با افزایش هموگلوبین خون همراه است. در این تحقیق نیز میانگین هموگلوبین در گروه شم A و B به ترتیب $13/5 \text{ g/dl}$ ، $14/5$ و $15/07$ بود که این افزایش در موش های گروه تیمار A در حدود ۷/۴٪ و در گروه تیمار B $11/1$ ٪ بود و تغلیظ هموگلوبین و کاهش آب بدن در این افزایش موثر است [۲۹].

البته در برخی منابع ذکر شده که تولوئن، سمیت خونی ایجاد نمی کند و یا شواهدی مبنی بر صدمات و مشکلات قطعی و دائمی خون گزارش نشده است [۳۲،۳۳] اما منابع دیگری به اثرات سمی خونی تولوئن بر خون اشاره کرده اند [۳۴،۳۵] در آزمایشی که نقاب و همکارانش در مورد اثرات هماتوتوکسیک مواجهه شغلی با بنزین انجام دادند، نتایج نشان داد که در کارگران پمپ بنزین های شیراز بعنوان افرادی که در مواجهه با بنزین و اثرات تولوئن ناشی از آن هستند، تعداد گلبولهای قرمز به طور معنی

انقباضات رگهای خونی به صورت سینوزوئید در پالپ قرمز در نمونه های تیمار گروه A قابل ملاحظه بود که نسبت به موارد شم گسترده تر و گشادتر شده بود ولی عملا از نظر سنجش تنها اندازه گیری ضخامت دیواره شریانچه مرکزی مقدور بود که براساس شکل ۱، همراه با افزایش قطر داخلی شریانچه مرکزی درون پالپ سفید که در گروه A $35/6\%$ و در گروه B 10% بود، ضخامت دیواره شریانچه مرکزی آن نیز ضخیم شده بود به طوری که در تیمار گروه A افزایش 32% و در گروه B 12% بوجود آمد. این افزایش قطر می تواند نشانه ای از توزیع نامتعادل شریانچه در پالپ سفید و قرمز باشد. در مورد تغییرات سه پارامتر ذکر شده بافت طحال، اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) در گروه A, B نسبت به گروه شم بر اساس میانگین های ذکر شده در جدول ۱ نشان دهنده اثر سمی و مخرب تولون است.

با بررسی وزن طحال قبل و بعد از تیمار، کاهش در وزن طحال های گروه های تیمار A و B مشاهده شد که این امر می تواند نشانه ای از تحلیل یا تخریب نسبی ساختار طحالی باشد. بر اساس نمودار ۲ به دلیل کاهش وزن بدن در گروه تیمار A، نسبت وزن طحال به وزن بدن در حدود 10% و در گروه تیمار B 2% کاهش یافت.

کاهش وزن طحال سبب کوچک شدن نسبی طحال شده و به نظر می آید طحال با انقباض، خون را به سمت اندام های حساس تر مثل کبد و ریه فرستاده که در مقابل اثرات سمی تولون واکنش نشان دهند.

تغییرات وزن طحال که به صورت کاهش به علت اثرات توکسیکی تولون بوده به طوری که سیلوا^۲ و همکارانش در سال ۲۰۰۳ کاهش وزن طحال را به دلیل مصرف برخی مواد نشان داد که می تواند در اثر تغییر در تراکم سلولها و آسیب بر بافت طحال بوده است و مصرف ریتالین باعث کاهش در ابعاد طحال و فولیکولهای طحالی شد [۴۷].

نتیجه گیری

تولون (متابولیت های حاصل از آن) ماده ای است که در زندگی روزمره ناخواسته با آن سروکار داریم و با توجه به نتایج به دست آمده، این ماده با افزایش تعداد گلبولهای

میانگین افزایش وزن در گروه شم در حدود 18% و در موشهای تیمار گروه B 15% نسبت به وزن اولیه بود، اما میانگین وزن موشهای تیمار تولون در گروه A 10% کاهش یافت. بنابراین به نظر می رسد که اثرات سوء تغذیه و ناهنجاریهای سیستم عصبی باعث شده است که رشد موش های تیمار تحت شعاع اثرات سوء تولون قرار بگیرد، مسلما اثرات این کاهش وزن متوجه اندام های مختلف نیز شده است. تغییرات وزن در ترکیبات مشابه دیگر نیز گزارش شده است به طوریکه استعمال مورفولین به صورت خوراکی باعث کاهش 0.7g/Kg وزن بدن و هیپرپلازی اپیتلیوم معده می شود [۴۳].

مطالعه نقاب و استیسی^۱ نشان داد که تولون باعث افزایش آنزیمهای کبدی می شود و افزایش غلظت کراتین و کاهش بیلی روبین در غلظت 203 پی پی ام گزارش شد و آنها از تولون به عنوان یک ماده سمی اثر گذار بر بافت کلیه گزارش کردند [۴۴].

همچنین کارگرانی که به مدت ۱۶ سال به دلیل موقعیت های شغلی، در معرض تولون 50 پی پی ام قرار گرفتند تغییرات عملکردی بافت کلیه در آنها قابل ذکر بود [۴۵]. در این بررسی، بافت طحال در تیمار گروه A به هم ریختگی نسبی در پارانشیم پالپ سفید و قرمز را نشان داد که التهاب حاصله ناشی از افزایش قطر رگهای خونی و توسعه شبکه مویرگی بود. بر اساس شکل ۲ ضخامت کپسول طحال در تیمارهای گروه A کاهش نسبی در حدود $10/1\%$ نشان داد و دنباله کپسول طحال که به صورت ترابکولا در ساختار درونی طحال نفوذ می کند، ساختار فیبری پیدا کرد، در اغلب نقاط دیواره کپسول، از طحال جدا شده و فاصله گرفته بود که این کاهش در گروه کمتر و B $2/3\%$ بود.

در مطالعه فاضلی پور و همکارانش که موشهای NMRI رتالین را با دوزهای 2mg/kg و 10 وزن بدن به مدت 40 روز و به صورت گاواژ دریافت کردند، ضخامت کپسول طحال تغییرات معنی داری را در گروه کنترل و تیمار نشان نداد اما تعداد پلاسماسل ها و مگاکاریوسیت ها کاهش یافت [۴۶].

قرمز، هماتوکریت، چگالی سرم، هموگلوبین خون باعث برهم خوردن تعادل این فاکتورهای خون شده و با به هم ریختگی بافت پارانشیمی، التهاب و کاهش وزن طحال و وزن بدن در موش های سفید نر اختلالات زیادی ایجاد کرده است که اگر این عوارض به انسان تعمیم داده شود برای سلامت بسیار مضر بوده و عامل تحریکی برای ایجاد بیماریها و مشکلات دیگر است.

بنابراین باید صنایع و بخش های استفاده کننده از تولوئن و مشتقاتش از طرق مراکز مرتبط با سلامت و واحدهای نظاره گر بهداشتی نسبت به استفاده مجاز این ماده اطلاع رسانی کرده و در پی یافتن ماده ای جایگزین و بی ضرر که کاهنده عوارض تولوئن باشند و تحقیقات بیشتری درباره اثر این ماده بر سایر بافتها انجام شود.

تشکر و قدردانی

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

References

1. Chapelle FH, Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated ground water :The perspectives of history and hydrology, Ground Water 1999; 37(1):32
2. Zilli M, Del Borghi A, Converti A, Toluene removal vapor in a laboratory scale bio filter, Appl Microbiol Biotechnol 2000;54(2):54
3. Nazary M, SHimeily S, The eighteenth Congress of Biology and Pharmacology 2007 ,mashhad university of medical science 2007;26-30 August
4. Barbara J, Finlayson P, James NP, Tropospheric Air Pollution: Ozone, Airborne Toxics, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Particles, Science 1997; 276: 1045 – 1051
5. Perigo JF and Prado C, Evolution of Occupational Exposure to Environmental Levels of Aromatic Hydrocarbons in Service Stations, British Occupational Hygiene 2005; 49(3): 233-240.
6. Little johns JV, DaugulisAJ, Kinetics and interactions of BTEX compounds during degradation by a bacterial consortium, Process Biochemistry 2008; 43: 1068-1076.
7. Arafa MA, Biodegradation of some aromatic hydrocarbons (BTEXs) by a bacterial consortium isolated from polluted site in Saudi Arabia, Pakistan Journal of Biological Science 2003; 6 (17):1482-1486.
8. Adami G ,Larese F, Venier M, “et al”, Penetration of benzene, toluene and xylenes contained in gasoline’s through human abdominal skin in vitro, Toxicology in Vitro 2006; 20(8):1321-1330
9. Lee YL, Pai MC, Chen JH, “et al” ,Central neurological abnormalities and multiple chemical sensitivity caused by chronic toluene exposure, Occupational Medicine 2003;53:479–82
10. Pour Rajab R, Mosenn Harzandi A, Distribution of Benzen, Toluene, Xylene in pollutant sources International conference in environmental crisis and its solutions, kish island-iran 2013;113-14 [Persian]
11. (ATSDR), Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Toxicological Profile for Toluene. U.S. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA. 2000
12. Revilla A S, Pestana CR, Pardo-Andreu GL, et al. Potential toxicity of toluene and xylene evoked by mitochondrial uncoupling, Toxicology in Vitro 2007; 21(5): 782-788
13. Wiaderna D, Tomas T, Effects of repeated exposure to toluene or amphetamine on locomotor activity in rats, International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health 2000;13:317–24.
14. Kum S, Sandikci M, Eren U, Metin N, Effects of formaldehyde and xylene inhalation on fatty liver and kidney in adult and developing rats ,J Anim Vet. Adv 2010; 9 (2): 396-401
15. Wang D H, Horike T, Mizuuchi H, Ishii K, Zhen L X, Taketa K, liver function tests of workers exposed to toluene and tolu-ene/dimethyl form amide at low concentrations, Journal of occupational health 1996; 38: 113-117
16. Harleman J.H. (2000), Approaches to the identification and recording of findings in the lymphoreticular organs indicative for immunotoxicity in regulatory type toxicity studies, Toxicology, 142:213-21
17. Kuper C.F., Harleman J.H., Richter-Reichelm H.B., Vos, J.G. (2000), Histopathologic approaches to detect changes indicative of immunotoxicity, Toxicol Pathol, 28: 454-466
18. Manjanatha M.G., Shelton S.D., Dobrovolsky V.N., Shaddock J.G., McGarrity L.G., Doerge D.R., Twaddle N.W., Lin C.J., Chen J.J., Mattison D.R., (2008) mPharmacokinetics, dose-range, and mutagenicity studies of methylphenidate hydrochloride in B6C3F1 mice. Environ Mol Mutagen. 49: 85-93.
19. Junqueira LC , Carneiro J, Kelley RO. Basic Histology. Appleton and Lange, New York 2002;8:112-137.
20. Harper H A, Murray R K, Granner DK, Maye PA, Rodwell V W, Harper’s Biochemistry 2000;44-60.
21. Bancroft J K, Gamble M, Theory and Practice of histological Techniques, 5th Ed. Churchill Living Stone, London 2002;4, 152-155.
22. Rojhan MS, Human Basic Histology, Published by Chehr ,University of Tehran, 2010, Teheran.

23. Niosh L, Manual of analytical methods, 2nd ed. Cincinnati, Ohio, National Institute for Occupational Safety and Health 1999;1:150-9.
24. Suckow M A, Danneman P, Brayton C, The Laboratory Mouse. CRC., London 2001;45-52
25. Sander J , Burkle G Induction of malignant tumours in rats by simultaneous feeding of nitrite and secondary amines 1969; 73: 54-66
26. Lupp A, Wange J, Oelschlager H, Fleck C, Pharmacological and toxicological testing of the enantiomers of two chiral fom ocaine alkyl morpholine derivatives in comparison to their in vitro interactions on drug metabolism in rats, *Arzneimittel for schung* 2006 ;56(1):1-11
27. Mlekusch W , Truppe W, The effect of hunger on free fatty acids and cortico strone plasma levels in rats, *Experience*1975; 15:1135-7.
28. Shih HT, Yu CL, Wu MT, Subclinical abnormalities in workers with continuous low level toluene exposure, *Toxicol Ind Health* 2011;27(8): 691-9
29. Swaen GMH, Amelsvoort LV, Twisk JJ, Verstraeten E, Slootweg R, Coolins JJ, Burns CJ, Low level occupational benzene exposure and hematological parameters *Chemico-Biological Interactions* 2010;184 : 94-100
30. Xue-sheng W, Nan L, Wei-jun G, Shu-lan P,BAI Yu-ping, Guo-hui X, Ying L, Effect of Short-term Benzene Exposure on Peripheral Blood and Chromosomal Damage among Workers, *Journal of Environmental & Occupational Medicine*, 2010-08
31. 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.
32. Tsai SP, Fox EE, Ransdell JD, Wendt JK, Waddell LC, Donnelly RP, Hematology surveillance study of petrochemical workers exposed to benzene, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2004; 4 (1): 67-73.
33. World health organization, Environmental health criteria 52, Toluene, 1985.
34. Bogadi-sare A, Zavalic M, Turk R, Utility of a routine medical surveillance program with benzene exposed workers , *AM J in Med* 2003; 445: 463-473
35. NIOSH Manual of Analytical Methods (NMAM), 4 ed. Hydrocarbons, Aromatic: Method 1501. 2003; 3 : 4-7
36. Neghab M, Hosseinzadeh K, Hassanzadeah J, Assessment of Hematotoxic effects of occupational exposure to unleaded petrol ,*Iran Occupational Health* 2013;9(4):1-12[Persian]
37. Milica KF, Tatjana B, Marijana P, Effects of intera peritoneal application of toluene dissolved in propylene glycol on erythropoiesis in wistar rats, *Acta veterinaria (bogard)*, 2004; 54;5-6 : 357-367.
38. Zamanipur SH, Mortazavi Y, Kaviani S, Occupational exposure to benzene and its associated hematologic side effects, *The scientific journal of zanzan university of medical sciences* 2003 ;39: 13-20[Persian]
39. Qu Q, Shore R, Li G, Jin X, Chen LC, Cohen B, Hematological changes among Chinese workers with a broad range of benzene exposure, *American Journal Of Industrial medicine* 2002; 42: 275-285.
40. Gospe SM, Zhou SS, Prenatal exposure to toluene results in abnormal neurogenesis and migration in rat somato sensory cortex ,*Pediatric Research* 2000;47:362-8.
41. Sabaghziarani F, Borhan,Raja F ,Esmaeili MH, The effects felectro magnetc fiedon fertility and mouse gonads inpreimtions tage , *Iranian journal of endocrinology and metablism(IjEM)* 2009;10:6 (42):647-652
42. Le Gros G , Ben-Sasson S Z , Seder R , Finkelman F D , Paul W E, Generation of interleukin 4(IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 andIL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells, *J Immunol* 2008; 181: 2943-2951.
43. Traut-Johnstone T, Kriel F,Hewer R,Bradley D,Williams G ,(43Azaniumylpropyl)morpholin-4-ium chloride hydrogen oxalate: an unusual example of a dication with different counter-anions, *Acta Crystallogr Struct Chem* 2014;6(12):1121-4.
44. Neghab M, Stacey N H, Toluene in- duced elevation of serum bile acids: Relationship to bile acid transport , *journal of toxicology and environmental health* 1997; 52: 249-268.
45. Chen Z, Liu S J, Cai S X, Exposure of workers to a mixture of toluene and xylenes effects, *occup environ med* 1994; 51:47-49

- 46.Fazelipour S , Tootian Z , Saatian M , Shahrabi M R , Kiaei S B.Alterations to morphometry, histomorphometry and histochemistry of spleen following chronic methylphenidate intake in animal model ,Journal of Veterinary Research 2013 ; 68(4):333-339[Persian]
- 47.Silva T C , Gorniak S L , Oloris S C S , Raspantini P C , Haraguchi M , Dagli M L Z, Effects of Senna occidentalis on chick bursa of fabricius, Avian Pathol 2003; 32: 633 - 637.

Study of Toluene Effect on Blood Parameters and Spleen Tissue in NMRI Albino Male Mice

Naeimi N¹, Adeli HR² *, Zare K³

¹MS.c, Department of Biology, Faculty of Science, University of sistan and Baluchestan , Zahedan ,Iran

²MS.c, Department of Biology, Faculty of Science, Branch of science and research of Tehran Azad University, Tehran, Iran

³Ph D,Department of Biology , Faculty of Science, Branch of sience and research of Tehran Azad university, Tehran, Iran

***Correspondencing Author:** Department of Biology science, Branch of science and research of Tehran Azad university, Tehran, Iran

Email: adelihamidreza@yahoo.com

Abstract

Background & Objectives: Toluene (C₇H₈) is obtained from crude oil and aromatic compounds refining which is mainly used as a raw material, supplement or solvent. According to its application in industry and toxic effects, its impact has been studied on blood and spleen tissues of NMRI Albino Male Mice in the present study

Material and Methods: Thirty mature Albino NMRI mice have been categorized in three groups of Shem, Group-A, which have been injected with the 0.1 cc Toluene solution (35% Toluene and 65% physiologic solution) with the purity of 1700 mg/kg for 25 days. Group-B with the similar mice and the same situation received the purity of 1000 mg/kg. After weighting, anesthesia, and taking blood samples, relative parameters of blood and spleen tissues were considered, measured, and studied in the scope of micro and macro.

Result: In the Group-A increased number of red blood cells (%4.7), hematocrit (%18.7), plasma density (%12), and hemoglobin (%7.4) as well as reduce thickness of spleen capsule wall and becoming more fibrous (%10/1), increased thickness of central arteriole wall (%32)and the inner diameter of the central arteriole of white pulp(%35.6), reduced spleen weight (%7), and body weight (%10) were observed in comparison with the Sham group that were significant. Characteristics mentioned in group B (except for the blood parameters which were more than group A) showed less change but there were significant in comparison with the sham and A groups (p<0.05).

Conclusion: The significance of this relationship showed that Toluene causes the elevated blood parameters, parenchyma adhesion by stimulation of hematopoietic centers leading to the inflammation which brings decreased spleen and body weight. These impacts are related to the dosage of the Toluene in which the higher purity has shown much more damage (except blood parameters in group B).

Key words: Toluene, Blood Parameters, Spleen ,Albino NMRI Male White Mice

Received: 27 Dec 2016

Revised: 15 Feb 2016

Accepted: 3 May 2016