

Zbl Arbeitsmed

<https://doi.org/10.1007/s40664-019-0337-6>

© Springer Medizin Verlag GmbH, ein Teil von
Springer Nature 2019



Igor Zavgorodnij¹ · Beatrice Thielmann² · Walerij Kapustnik³ ·
Ruslan Batschinskij⁴ · J. Batschinskaja⁵ · Irina Böckelmann²

¹ Lehrstuhl für Hygiene und Ökologie № 2, Charkower Nationale Medizinische Universität, Charkow, Ukraine

² Bereich Arbeitsmedizin, Medizinische Fakultät, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Magdeburg, Deutschland

³ Lehrstuhl für Innere- und Berufskrankheiten, Charkower Nationale Medizinische Universität, Charkow, Ukraine

⁴ Lehrstuhl für biologische Chemie, Charkower Nationale Medizinische Universität, Charkow, Ukraine

⁵ Lehrstuhl des Marketings und der Handelsunternehmer, Charkower Handels- und Wirtschaftsinstitut KNUHW, Charkow, Ukraine

Toxizität von Methyl-tert-butylether auf innere Organe von Versuchstieren unter Kältebedingungen

Hinführung zum Thema

Methyl-tert-butylether (MTBE) findet eine breite Anwendung in Produktionsstätten der Chemie- und Bauindustrie. Dabei könnte die gleichzeitige Einwirkung von toxischer Substanz und Kälte eine höhere Belastung bedeuten. Histologische Untersuchungen innerer Rattenorgane ergaben eine toxische Wirkung von MTBE, die durch Kälte deutlich verstärkt wurde. Dies ist arbeitstoxikologisch relevant, da eine Übertragbarkeit auf Menschen denkbar ist.

Der Mensch ist verschiedenen Umweltfaktoren ausgesetzt. Dazu gehören z. B. Xenobiotika. Diese chemischen Verbindungen sind dem Organismus oder dem betroffenen Ökosystem fremd und können auch in Kombination mit physischen Faktoren (z. B. Kälte, Hitze) wirken [1, 2]. Die multifaktorielle Wirkung verschiedener Einflussfaktoren physikalischer und/oder chemischer Herkunft auf den Organismus ist bedeutender als ein alleiniger Einfluss, weil die Kombinationsexposition addierende oder potenzierende Effekte hervorrufen kann. Die gleichzeitige Wirkung von chemischen

Verbindungen sowie Hitze oder Kälte auf den Organismus ist bis jetzt wenig erforscht. Besonders ungünstig wirken auf die menschliche Gesundheit die negativen Folgen chemischer und physikalischer Faktoren wie z. B. von Nitrobenzol und Methyl-tert-butylether unter Kältebedingungen, was in arbeitstoxikologischen Studien untersucht wurde [3–6]. Der physikalische Belastungsfaktor Kälte kommt nicht nur in der häuslichen Umwelt, sondern auch an verschiedenen Arbeitsplätzen vor. Die multifaktorielle Wirkung von chemischen Faktoren und Kälte ergibt sich somit wider Erwarten häufiger als andere Kombinationsexpositionen [7].

Hinsichtlich der Fragestellungen zu toxischen Wirkungen von Substanzen oder deren Metabolite auf Organsysteme besteht nach wie vor ein hohes arbeitstoxikologisches/-medizinisches Interesse. So erlauben die Ergebnisse experimenteller arbeitstoxikologischer Studien Rückschlüsse auf die Früherkennung arbeitsbedingter Gesundheitsstörungen und Erkrankungen im Einzelnen und auf die arbeitsmedizinische Praxis im Ganzen. Es besteht ein hoher Bedarf an Erkenntnissen aus zunächst tierexperimenteller Forschung. Dabei geht es um Fragen, wie der Körper unter bestimmten

klimatischen Bedingungen auf chemische Verbindungen reagiert und welche Besonderheiten daraus resultieren.

In der hier vorgelegten Studie werden die kombinierten Wirkungen des Methyl-tert-butylethers unter Kältebedingungen betrachtet.

Das Methyl-tert-butylether (MTBE) oder C₅H₁₂O ist ein vom Methanol abgeleiteter tertiärer Butylalkohol aus der Stoffgruppe der Etherverbindungen und gehört zu den flüchtigen Kohlenwasserstoffen. MTBE wird als Kraftstoffzusatz zur Reduzierung der toxischen Emissionen eingesetzt. Die ökologischen Anforderungen für die Verbrennungsgase der Automotoren führten zur Entwicklung umweltverträglicherer Benzine.

Da das MTBE für die Umwelt als gefährlich erkannt wurde, wird in einigen Ländern (USA, Kanada, Japan, Westeuropa) die Nutzung des Ethyl-tert-butylethers sowie des Ethanol und anderer alternativer Verbindungen untersucht. Dennoch produzieren osteuropäische Länder und der asiatisch-pazifische Raum mehr MTBE als zuvor. Da der Kraftstoffverbrauch zwischen 1995 bis 2016 im deutschen Güterstraßenverkehr um 21 % gestiegen war [8], wuchsen auch die Produktion und der Verbrauch von MTBE. Einerseits verringerten die

Die Autoren I. Zavgorodnij und B. Thielmann haben zu gleichen Teilen der Arbeit beigetragen.

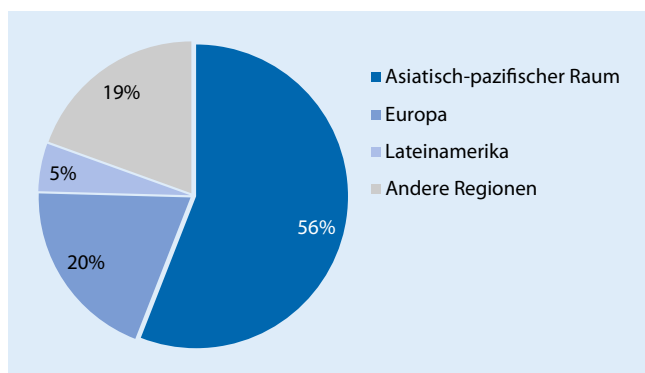


Abb. 1 ◀ Weltverbrauch des Methyl-tert-butylethers nach Regionen. (Mod. nach [10])

Industrieländer den Konsum des Methyl-tert-butylethers, aber andererseits bestand Nachfrage aufgrund erhöhten Benzinverbrauchs in der asiatisch-pazifischen Region, in Lateinamerika und im Nahen Osten. Somit war der Weltmarkt des MTBE in den letzten Jahren stabil.

Im Jahr 2004 bestanden in den USA und Kanada 48 Anlagen für die Produktion des Methyl-tert-butylethers. Außerdem werden in Europa 47, in den Ländern des Nahen und Mittleren Ostens 11, in Asien 45 und in Lateinamerika 23 Produktionsstätten betrieben. Die Nutzungskapazität lag damals bei 83,5%. In den USA nutzten 33 erdölverarbeitende Betriebe die eigene Produktion von MTBE, die die Hälfte der Nachfrage nach MTBE abdeckte. Dabei wurde hier 2001 die Spitzennachfrage nach Methyl-tert-butylether mit 13,3 Mio. Tonnen registriert. Vergleichend betrug der Konsum des MTBE in Europa 4,2 Mio. Tonnen. Seit 2006 ist in den USA die Verwendung des MTBE für die Produktion von Benzin verboten. 2009 wurden in den USA noch 2,36 Mio. Tonnen MTBE produziert und im ganzen Umfang nach Mexiko, Venezuela, Chile und in andere Staaten exportiert. Die Daten der statistischen Datenbank zeigen, dass 2009 beim europäischen Vergleich der Produktionskapazitäten von MTBE und Ethyl-tert-butylether (ETBE) Deutschland mit 1.386.000 Tonnen ganz vorne liegt, gefolgt von den Niederlanden mit 1.018.000 Tonnen und Frankreich mit 851.000 Tonnen [9]. Ähnliche Zahlen, bezogen nur auf MTBE, präsentierte die Studie der Akademie der Konjunktur der industriellen Märkte (Abb. 1). Zurzeit liegt die Produktionskapazität für MTBE

in Europa (einschließlich der Ukraine) bei fast 2,8 Mio. Tonnen [10].

Das MTBE wird auch in vielen Industriezweigen, insbesondere für die Synthese von Medikamenten sowie als Monomer für die Synthese von Polyethylen, Polypropylen oder Polyvinylchlorid, verwendet [11, 12].

Das bedeutet, dass MTBE zurzeit nicht nur aktiv auf die Verschmutzung der Atmosphäre, Abwässer und Böden Einfluss hat, was für die Gesundheit der Allgemeinbevölkerung relevant ist. MTBE kann auch als direkter Belastungsfaktor mit toxikologischer Relevanz am Arbeitsplatz angesehen werden. Es sind verschiedene Berufsgruppen wie bspw. Arbeiter von Ö Raffinerien und Tankstellen, Kraftfahrzeugführer oder Automechaniker sowie die Allgemeinbevölkerung davon betroffen [13–18].

Obwohl MTBE keine besonders auffälligen toxischen Wirkungen aufweist, ergaben jedoch einige tierexperimentelle Studien potenzielle kanzerogene Wirkungen von MTBE bei extrem hohen Expositionen [5]. Dieser Stoff wird nach europäischem Gefahrstoffrecht nur als „leichtentzündlich“ und als „reizt die Haut“ bezeichnet [19] und ist von der EU-Kommission als nichtgenotoxisches Kanzerogen eingestuft [20]. MTBE wurde aber von der Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) in der MAK- und BAT-Werte-Liste (Maximale Arbeitsplatzkonzentration und biologische Arbeitsstoff-Toleranzwerte) der Kategorie 3B der krebserzeugenden Arbeitsstoffe zugeordnet [21]. In Deutschland gilt eine Konzentration für diesen Arbeitsstoff in der Arbeitsluft von 180 mg/m³ (50 ppm)

als Grenzwert, bei deren Einhaltung keine Schädigungen zu erwarten sind [21]. Die LD₅₀ bei oraler Aufnahme liegt im Rahmen von Tierexperimenten bei Ratten bei 4000 mg/kg Körpergewicht [19], wobei diese je nach Region und Land variieren kann (z.B. Ukraine 5000 mg/kg; [22]). Eine kanzerogene Wirkung auf Leydig-Zellen nach oral verabreichtem MTBE konnte bei Ratten bei oraler Exposition > 250 mg/kg (NOEL, „No Observed Effect Level“) gefunden werden [23].

Das Ziel der vorliegenden tierexperimentellen Studie war eine vergleichende histologische Untersuchung der Wirkung von MTBE unter Kältebedingungen auf innere Organe (Leber, Niere, Lungen, Nebenniere, Milz und Schilddrüse).

Material und Methoden

Das subakute Laborexperiment erfolgte an geschlechtsreifen Rattenmännchen (Gewicht im Mittel 200 g) des Stammes WAG (Wistar Albino Glaxo) und dauerte 30 Tage lang. Die Tiere wurden vorher 14 Tage einer Quarantäne unterzogen. Die Haltung der Ratten folgte Standardvorbereitungsbedingungen mit freiem Zugang zu Trinkwasser. Die Versuchstiere teilte man auf 4 Gruppen mit je 6 Einzeltieren auf:

- Gruppe 4: Kontrollgruppe als Vergleichsgruppe zur Gruppe 3 sowie Behaglichkeit von 25 ± 2 °C,
- Gruppe 3: MTBE und Behaglichkeit von 25 ± 2 °C,
- Gruppe 2: Kontrollgruppe als Vergleichsgruppe zur Gruppe 1 sowie Kälte von 4 ± 2 °C,
- Gruppe 1: MTBE und Kälte von 4 ± 2 °C.

Die Kontrollgruppen 4 und 2 sind identisch mit den Kontrollgruppen 4 und 2 der Experimentenreihe mit Nitrobenzol (s. [3]), um die Anzahl der Tiere in Experimenten nicht unnötig zu erhöhen.

Die Tiere erhielten 30-mal eine Instillation von MTBE in den Magen in der Dosis von 500 mg/kg. Die Exposition der Tiere in zwei verschiedenen thermischen Regimes erfolgte 4 h lang 5-mal pro Woche. MTBE wurde mithilfe einer speziellen Sonde als Wasserlösung in den

Zbl Arbeitsmed <https://doi.org/10.1007/s40664-019-0337-6>
 © Springer Medizin Verlag GmbH, ein Teil von Springer Nature 2019

I. Zavgorodnij · B. Thielmann · W. Kapustnik · R. Batschinskij · J. Batschinskaja · I. Böckelmann

Toxizität von Methyl-tert-butylether auf innere Organe von Versuchstieren unter Kältebedingungen

Zusammenfassung

Hintergrund. Die Nutzung von Methyl-tert-butylether (MTBE) ist häufig. MTBE kann eine Verschmutzung der Umwelt bewirken und stellt an Arbeitsplätzen einen Belastungsfaktor mit potenziellem Gesundheitsrisiko dar. Durch die gleichzeitige kombinierte Exposition gegen einen chemischen und physikalischen Belastungsfaktor (MTBE und Kälte) kann sich die Wirkung von MTBE ändern. Kältearbeitsplätze kommen vor allem in Produktionsstätten z. B. der Chemie- oder Bauindustrie häufig vor. *Ziel der Arbeit* war die histologische Untersuchung der inneren Organe von Ratten sowohl unter thermischer Behaglichkeit als auch unter Kälte. **Material und Methoden.** Es wurden 4 Gruppen mit je 6 geschlechtsreifen Ratten-

männchen gebildet. Den beiden Testgruppen wurde 30-mal MTBE mit der Dosis 1/10 LD₅₀ (500 mg/kg des Tiergewichts) in den Magen appliziert. Die beiden Kontrollgruppen erhielten destilliertes Wasser. Anschließend wurden die Gruppen für 4 h Temperaturen der thermischen Behaglichkeit (25 ± 2 °C) oder Kälte (4 ± 2 °C) ausgesetzt. Am 30. Tag erfolgten Gewebeproben und histologische Untersuchungen. **Ergebnisse.** Die pathologischen Veränderungen waren unter Kälteexposition deutlich verstärkt. Insgesamt fanden sich in den Organen Entzündungsreaktionen (z. B. Glomerulonephritis), Emphyseme in der Lunge und Zytolysezeichen der Hepatozyten. Die Schilddrüse war hypothyreat. Eine reaktive

Hyperplasie war in der Milz nachweisbar. Die Grenzzonen der Nebennieren waren kaum abgrenzbar bei Abnahme der funktionellen Aktivität der Kerne endokriner Zellen. **Diskussion.** Unsere histologischen Untersuchungen ergaben ein ausgeprägtes toxisches Potenzial von MTBE, welches durch Kältebedingungen deutlich verstärkt wurde. Eine Übertragbarkeit auf den Menschen ist denkbar, da MTBE bei Menschen einen ähnlichen Abbauprozess hat wie bei Ratten. Daher sollte auf Schutzmaßnahmen am Arbeitsplatz besonders geachtet werden.

Schlüsselwörter

MTBE · Kälte · Kombinationswirkung · Tierexperiment · Toxizität

Toxicity of methyl tert-butyl ether on internal organs of experimental animals under cold conditions

Abstract

Background. The use of methyl tert-butyl ether (MTBE) is frequent. It can produce pollution of the environment and is a stress factor with potential health risks in workplaces. The simultaneous combined influence of a chemical and a physical stressor (MTBE and cold) can amplify the effects of MTBE. Workplaces with cold conditions are used in factories (e.g. chemical or construction industry). The aim of the work was the histological examination of the internal organs of rats under conditions of thermal comfort and in the cold. **Material and methods.** This toxicological study was carried out on 4 groups of 6 male rats. The 2 test groups were given 30 times

MTBE in the stomach at a dose of 1/10 LD₅₀ (500 mg/kg of animal weight). The two control groups received distilled water. The groups were exposed to thermal comfort temperatures (25 ± 2 °C) or cold (4 ± 2 °C) for 4 h. Tissue samples were taken and histological examinations were made on day 30. **Results.** The pathological changes were significantly increased under exposure to cold conditions. Inflammatory reactions (e.g. glomerulonephritis), pulmonary emphysema and cytolytic signs of hepatocytes were found in the organs. The thyroid gland was hypothyroid. Reactive hyperplasia was detectable in the spleen. The adrenal border zones were barely definable and indicated

a decreased functional activity of the nuclei of endocrine cells. **Discussion.** The histological studies showed a pronounced toxic potential of MTBE, which was significantly enhanced by cold conditions. Transferability to humans seems possible because MTBE in humans undergoes a similar degradation process as in rats. Therefore, special attention should be paid to protective measures at the workplace.

Keywords

MTBE · Cold · Combination effect · Animal experiment · Toxicity

Magen eingeführt. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Löslichkeit von MTBE in Wasser 42–54,3 g/l bei den im Experiment genutzten Temperaturen beträgt. Somit überschritt das injizierte Flüssigkeitsvolumen in den Magen von Ratten 2 ml nicht [24, 25]. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten bei gleichen Untersuchungsbedingungen eine äquivalente Menge von Aqua destillata.

Der Kältestress erfolgte unter den Bedingungen der 200-Liter-Verbrauchskammer mit zusätzlich ausgestatteten Zellen für eine isolierte freie Unterbrin-

gung der Tiere. Zur Abkühlung der Temperatur auf 4 ± 2 °C verfügte die Kammer über einen thermoelektrischen Kühler des „Luft-Luft“-Typs (Modell 180-24-AA, Fa. „Kriotherm“, Sankt Petersburg, Russland; [26]).

Die Untersuchungen wurden an der Nationalen Medizinischen Universität in Charkow 2012 beendet. Es lag ein positives Votum (Protokoll Nr. 9 vom 05.12.2011) der Kommission für Fragen der Ethik und Bioethik der Charkower Nationalen Medizinischen Universität vor. Ebenfalls wurden die nationalen

Standards der Pflege und Fütterung eingehalten. Diese Standards entsprachen den damals noch gültigen Grundsätzen des „Europäischen Übereinkommens zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere“ (Straßburg, 1986; [27]) und den Vorschriften des ersten Nationalen Kongresses für Bioethik [28]. Die experimentellen Untersuchungen wurden vormittags unter Berücksichtigung der zirkadianen Rhythmen ausgeführt [29].

Nach der Kontrolle der Versuchstiere am 30. Tag der Untersuchungsreihe

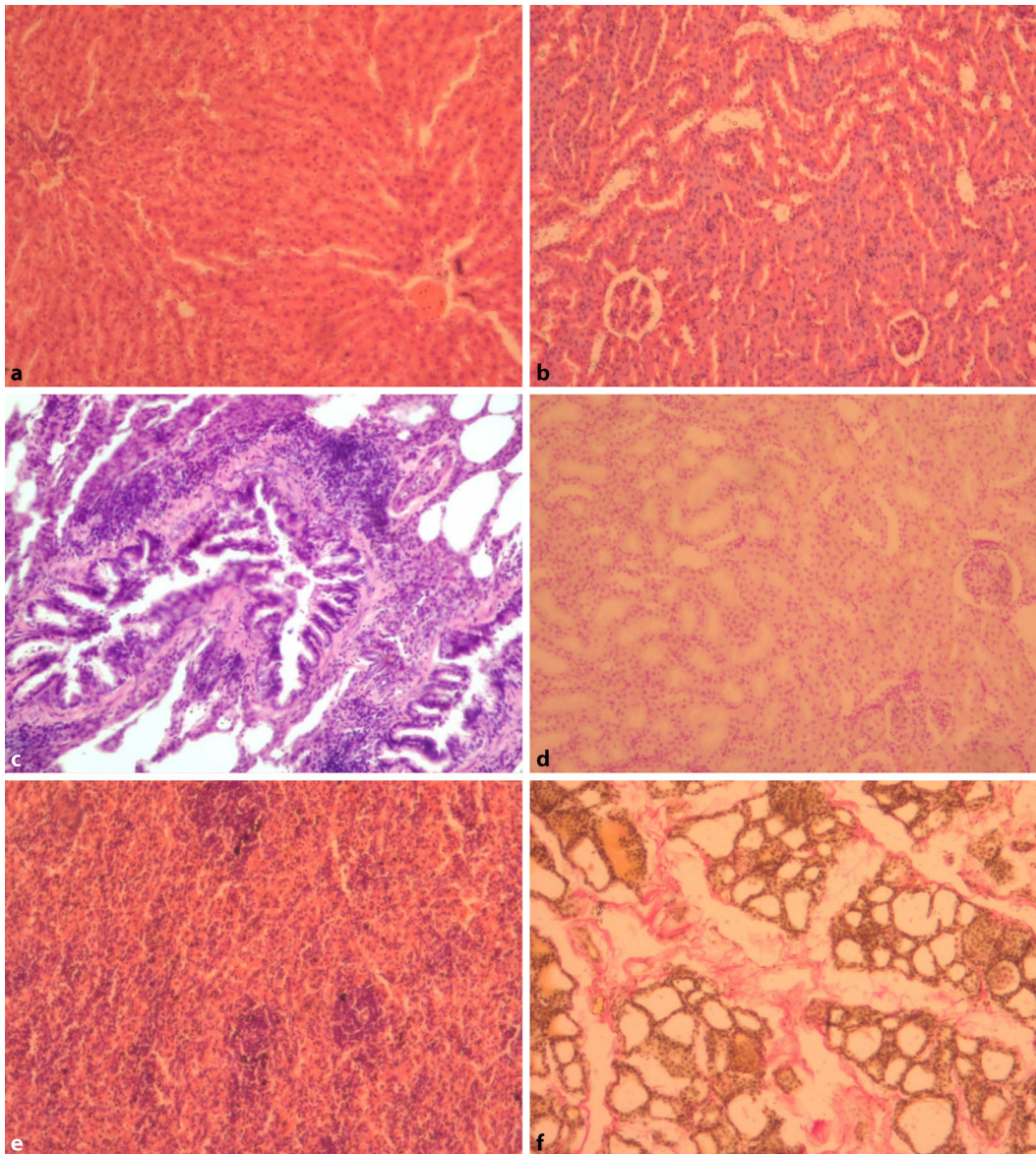


Abb. 2 ◀ Histologische Ergebnisse der Gruppe 4 (Kontrollgruppe unter thermischer Behaglichkeit [$t = 25 \pm 2^\circ\text{C}$]). Teile der Ergebnisse (a, b, d–f) der Kontrollgruppe sind in [3] publiziert. (Mit freundlicher Genehmigung des Springer Medizin Verlags). **a Leber:** Die lobuläre Struktur der Leber, blutgefüllte Zentralvenen und Lebersinusoid sind sichtbar. Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung. Vergr.: 1:200. **b Niere:** In der Nierenrinde sind die durch einen Querschnitt der proximalen Tubuli umgebenen Glomeruli von einheitlicher Größe. HE-Färbung. Vergr.: 1:200. **c Bronchien:** Abgerundete große Bronchien; mittlere und kleine Bronchien sind sternförmig mit einzelnen abgeschälten Epithelzellen. HE-Färbung. Vergr.: 1:200. **d Niere:** Milde violette Farbintensität des Nierenepithels. DNA-Nachweis nach Feulgen und Rossenbeck. Vergr.: 1:200. **e Milz:** In den dargestellten Milzfollikeln sind vorzugsweise T-Zonen erkennbar. HE-Färbung. Vergr.: 1:200. **f Schilddrüse:** Follikel sind dicht zueinander benachbart, wenig Bindegewebe. Elastica-Färbung nach van Gieson. Vergr.: 1:200

wurden bei diesen unter Narkose Gewebeproben von Leber, Milz, Nieren, Nebennieren, Lunge und Schilddrüse entnommen. Das zu untersuchende Material wurde in 10%-wässriger Lösung aus neutralem Formalin fixiert. Nach Abschluss der weiteren Arbeitsschritte mit Alkoholpräparation wurde das Material mit Paraffin verarbeitet und davon Serienschnitte ($4\text{--}5 \times 10^{-6}$ m dick) hergestellt. Die mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbten Präparate fanden Verwendung für eine allgemeine Gewebebewertung und für die histologische Untersuchung. Die Färbung mit der Pikrofuchsin-Lösung nach van Gieson in Kombination mit Weigerts Eisenhämatoxylin wurde

für die Darstellung und Differenzierung kollagenen Bindegewebes genutzt. Für den Nachweis von DNA und RNA sowie der Bewertung der funktionellen Aktivität von Strukturkomponenten der Organe kamen verschiedene histochemische Techniken zur Anwendung. DNA wurde nach Feulgen und Rossenbeck (Kontrolle mittels Hydrolyse mit HCl) aufgezeigt. RNA wurde nach Brachet-Färbung (Kontrolle mittels kristalliner Ribonuklease) dargestellt. Neutrale Mukopolysaccharide wurden mithilfe der PAS-Reaktion („Periodic Acid Schiff“ Reaktion; Kontrolle mittels Amylase) nachgewiesen. Die histologischen Techniken wurden nach den in den Leitlinien für

histologische und histochemische Technik festgelegten Vorschriften durchgeführt [30–33]. Die verwendeten Methoden entsprechen nach wie vor dem aktuellen Stand der Technik im Zeitraum der Untersuchungen. Die Mikropräparate wurden mit dem Mikroskop „Olympus“ BX-41 untersucht und dann durch Videomikroskopie fotografiert.

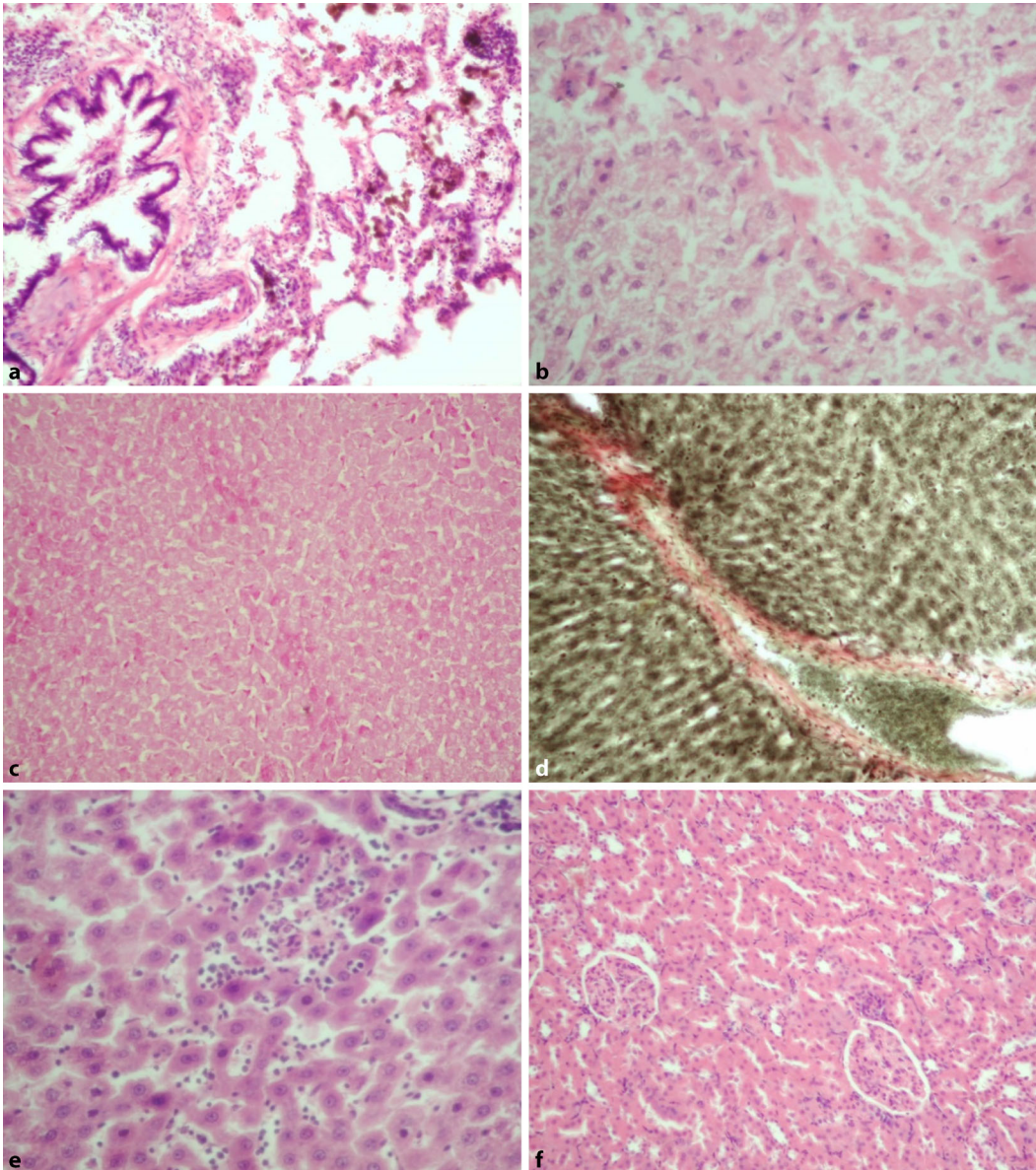


Abb. 3 ◀ Histologische Ergebnisse der Gruppe 3 (unter der subakuten Wirkung von Methyl-tert-butylether unter thermischer Behaglichkeit [$t = 25 \pm 2^\circ\text{C}$]). **a Lunge:** Verdickte alveolare Septen mit Lymphozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten als Entzündungsreaktion. Siderophagen im Lumen der Alveolen und in Alveolarsepten. Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung. Vergr.: 1:200. **b Leber:** Auflockerung der Leberbälkchen. Hydropische Veränderungen im Zytoplasma der Hepatozyten. HE-Färbung. Vergr.: 1:200. **c Leber:** Hepatozyten. Moderate Ablagerung von Glykogen. PAS-Reaktion („Periodic Acid Schiff“ Reaktion). Vergr.: 1:200. **d Leber:** Bindegewebe der Portalbahnen der Leber ist mäßig fuchsinophil. Elastica-Färbung nach van Gieson. Vergr.: 1:200. **e Leber:** Intraalobuläre entzündliche Infiltration. HE-Färbung. Vergr.: 1:400. **f Niere:** Fokale exsudativ-proliferative intrakapillare Glomerulonephritis. HE-Färbung. Vergr.: 1:200

Ergebnisse

Kontrollgruppe 4 (unter thermischer Behaglichkeit bei $25 \pm 2^\circ\text{C}$)

Die mikroskopischen Untersuchungen der Organe in dieser Kontrollgruppe ergaben eine unregelmäßige Blutstase, eine hohe Aktivität aller Funktionskomponenten, ein ausreichendes Maß an Stoffwechsel- und Syntheseprozessen und regenerative Vorgänge. Die histologische Darstellung der einzelnen Organe ist in der **Abb. 2** gegenübergestellt.

Versuchsgruppe 3 (MTBE unter thermischer Behaglichkeit bei $25 \pm 2^\circ\text{C}$)

Die histologischen Ergebnisse der einzelnen Organe der exponierten Gruppe 3 (MTBE unter thermischer Behaglichkeit) sind in der **Abb. 3** dargestellt.

Im Lungengewebe fanden sich entzündliche Veränderungen der Bronchien. Es zeigten sich rheologische Störungen aufgrund von Bronchospasmus, Dystelektasen und Blutgefäßhyperämie des Lungenparenchyms und des Interstitiums, Nachweis poröser Veränderungen der Gefäßwand durch Diapedeseblutung und Hämosiderose. Das lymphoide Ge-

webe der Bronchialschleimhaut bot eine hämosideroseartige Hyperplasie als Wirkung einer Antigenreaktion.

Die Leberuntersuchungen ergaben eine Auflockerung der Leberbalken. Das Zytoplasma der Hepatozyten war eosinophil, körnig und mit hyalinen Tröpfchen. Zudem fanden sich herdförmig hydropische Degenerationen und ein geringes Glykogendepot. Die Zellkerne waren hypertrophisch mit gut ausgeprägter Doppelmembran und scholliger Kernplasmastruktur. Daneben gab es Hepatozyten mit Karyo- und Zytolyse. Neben regelhaften Hepatozyten konnten polyploide Zellen im Sinne einer regenerativen Kapazität der Leber nachgewiesen werden.

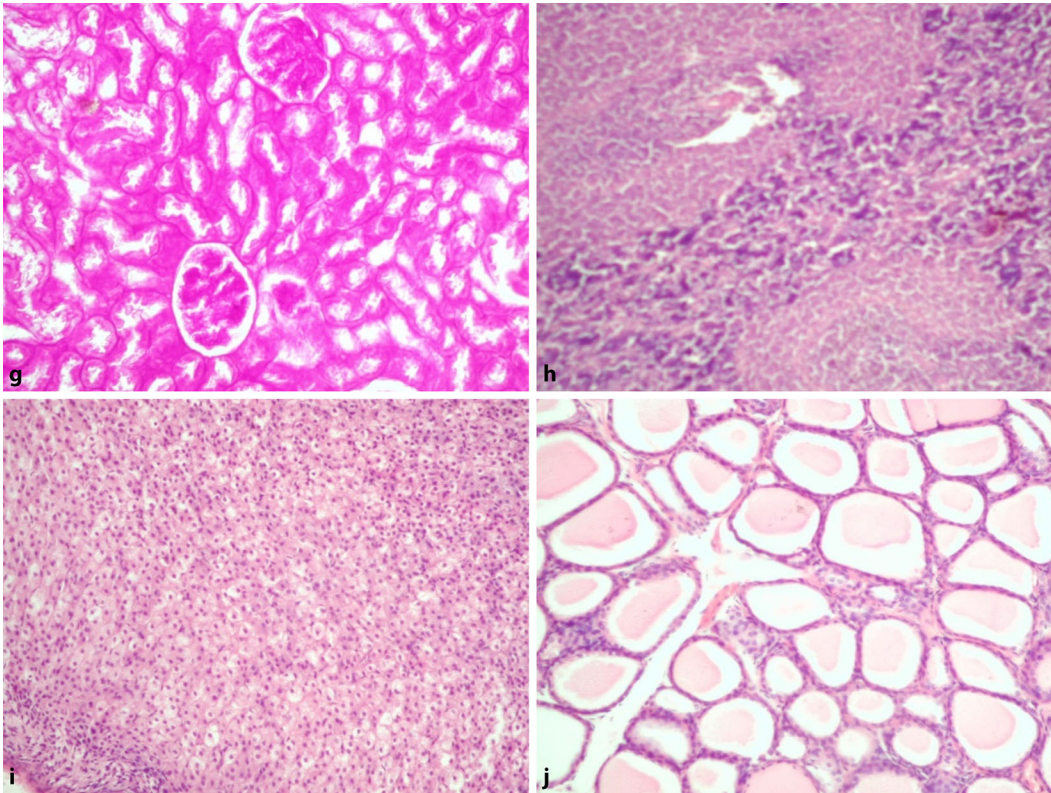


Abb. 3 (Fortsetzung) ◀
g Niere: Dünne und einheitlich gefärbte Basalmembranen der Tubuli. PAS-Reaktion. Vergr.: 1:200. **h Milz:** Große Lymphfollikel der Milz, in denen breite T- und B-Zonen gefunden werden. HE-Färbung. Vergr.: 1:200. **i Nebenniere:** Die glomeruläre Zone ist eng, das Zytoplasma der meisten Zellen ist vakuolisiert. HE-Färbung. Vergr.: 1:200. **j Schilddrüse:** Mittlere und große Follikel, das Follikel-epithel ist abgeplattet, das Kolloid wird durch homogene eosinophile Massen repräsentiert. HE-Färbung. Vergr.: 1:200

Die Zentralvenen und Sinusoide waren blutgefüllt und die Gefäßwände teilweise destrukturiert. Die Anzahl der Kupferzellen war im Vergleich zur Kontrollgruppe 4 vergrößert. Die Portalfelder reagierten bei van-Gieson-Färbung fuchsinophil. Es fanden sich eine lymphozytäre Infiltration sowie neutrophile Granulozyten.

In den Nieren waren die mäßig blutgefüllten Nierenglomeruli von einheitlicher Größe. In den Glomeruli konnte eine Proliferation von Mesangiozyten und eine schlecht exprimierte entzündliche Infiltration gezeigt werden als Zeichen einer fokalen exsudativ-proliferativen intrakapillären Glomerulonephritis. Das Lumen der proximalen Tubuli war rund oder oval, also nicht einheitlich. In einigen Tubuli waren homogene eosinophile Massen zu sehen. Das Zytoplasma des Tubulusepithels war eosinophil, geschwollen, mit runden Kernen mit klarer Struktur des Karyolems. Interstitielles und perivaskuläres Bindegewebe war nach Elastica-Färbung nach van Gieson leicht fuchsinophil mit einer geringen Anzahl von zellulären Elementen. Die Blutgefäße waren mäßig gefüllt mit Blut. Bei der PAS-

Reaktion waren die Basalmembranen der Tubuli deutlich einheitlich gefärbt.

Die Milzkapsel war mäßig fuchsinophil mit enthaltenen Trabekeln, Arterien und Venen. Die weiße Pulpa der Milz bildete große Lymphfollikel, in denen breite T- und insbesondere B-Zonen gefunden wurden als Hinweis einer reaktiven Hyperplasie. Die Zunahme der Zahl der embryonalen Zentren war ein Indikator der Entwicklung der Immunantwort nach dem humoralen Typ. In der roten Pulpa konnten Plasmozyten, viele Makrophagen und blutgefüllte Sinusoide, in deren Lumen Erythrozyten, neutrophile Granulozyten und Lymphozyten nachgewiesen werden.

In den Nebennieren waren die Grenz-zonen kaum unterscheidbar. Die glomeruläre Zone war eng. Hier überwogen kleine Zellen mit eosinophilem Zytoplasma und mit dunklen hyperchromatischen Kernen, die eine reduzierte Funktion anzeigten. Die Zona fascicularis war breit, das Zytoplasma der meisten Zellen war vakuolisiert. Die Zona reticularis war dagegen eng und durch anastomosierende Zellen mit eosinophilem Zytoplasma und hyperchromen

Kernen repräsentiert. Das Marklager wurde durch große ovale Zellen und blutgefüllte Kapillaren dargestellt.

Das Parenchym der Schilddrüse beinhaltete dicht beieinander liegende Follikel, die groß bis mittelgroß waren. Das Kolloid wurde durch homogene eosinophile PAS-positive Massen repräsentiert. Die Follikelwände wurden vom kubischen und abgeplatteten Follikel-epithel gebildet. Im Bindegewebe befanden sich Blutgefäße und Nervenäste. Diese Struktur der Schilddrüse entsprach eher einer hypothyreoten Funktion.

Kontrollgruppe 2 (unter Kälteexposition $4 \pm 2^\circ\text{C}$)

In der **Abb. 4** sind die histologischen Ergebnisse der einzelnen Organe der Kontrollgruppe 2 gegenübergestellt.

Die morphologischen Untersuchungen der inneren Organe der Versuchstiere unter Kälte ergaben eine ungleichmäßige Blutfüllung und -stase (diszirkulatorische Störung), Veränderungen im Leberparenchym (z. B. „Glykogenablagedepots“), Zytoplasmakörnigkeit von Leberzellen und Leber-epithel. Die polypliden

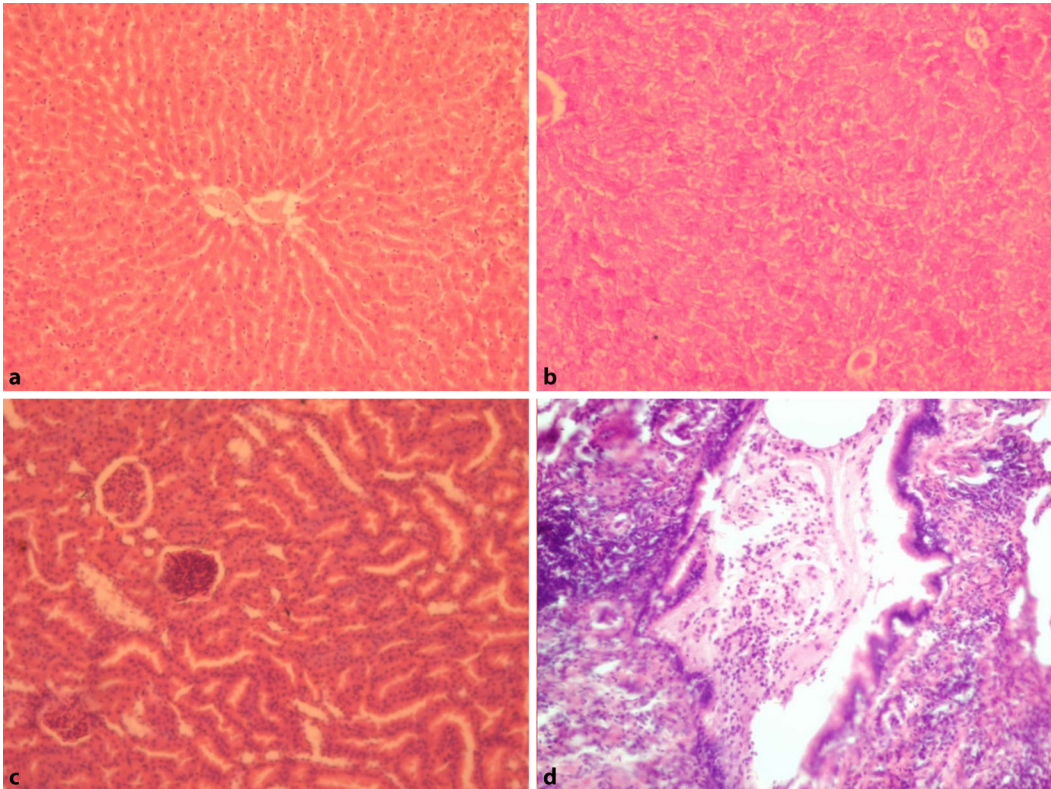


Abb. 4 ▲ Histologische Ergebnisse der Gruppe 2 (Kontrollgruppe unter Kälteexposition bei $4 \pm 2^\circ\text{C}$) Teile der Ergebnisse (a–h) der Kontrollgruppe sind in [3] publiziert. (Mit freundlicher Genehmigung des Springer Medizin Verlags). **a Leber:** Die lobuläre Struktur der Leber mit hepatischen Trabekeln, die durch Sinusoide voneinander getrennt sind. Blutgefüllte Zentralvenen. Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung. Vergr.: 1:200. **b Leber:** Rotviolette Glykogendepots im Zytoplasma der Hepatozyten. PAS-Reaktion („Periodic Acid Schiff“ Reaktion). Vergr.: 1:200. **c Niere:** Die Lumina der proximalen Tubuli sind verengt. Das Zytoplasma der epithelialen Tubuli ist ödematös, intensiv eosinophil und mit ausgeprägtem Kerncharakter. HE-Färbung. Vergr.: 1:200. **d Bronchien:** Im Lumen und auf der Oberfläche des Epithels ist Schleim mit einer Beimischung von abgeschuppten Epithelzellen und neutrophilen Granulozyten ein Hinweis für eine entzündliche Reaktion. HE-Färbung. Vergr.: 1:200

Leberzellen bestätigten das Vorhandensein eines regenerativen Potenzials im Organ. Unter den Kältestressbedingungen entwickelte sich in den Lungen eine Gefäßhyperämie mit Blutstase und Sludge-Phänomen sowie eine mukös-eitrige Endobronchitis. Die Vakuolen im Zytoplasma der Nebennieren boten eine Ausschöpfung der Ausgangsprodukte für die Synthese der Kortikosteroide. Die Nebennieren wiesen eine geringere Anzahl von Vakuolen im Zellzytoplasma auf. Die retikulären Schichten der Nebennieren ließen sich als eine teilweise Erschöpfung der Ausgangsprodukte für die Synthese von Kortikosteroiden deuten.

Gruppe 1 (MTBE unter Kälteexposition von $4 \pm 2^\circ\text{C}$)

Die kombinierte Wirkung von Methyl-tert-butylether und Kälte führte in verschiedenen Organen zur Potenzierung der pathogenen Wirkung (■ **Abb. 5**), wie z. B. in den Lungen zu den entzündlichen und destruktiven Veränderungen der Bronchien. Dort wurde eine eitrig-destruktive Pan- und Peribronchitis bzw. eine peribronchial-eitrige interstielle Pneumonie nachgewiesen. Auch das Lymphgewebe des Bronchialbaumes war durch erhebliche hyperplastische reaktive Zentren von Lymphfollikeln charakterisiert. Im Lungenparenchym wurden Atelektasen, Emphyseme und Bronchospasmen lokalisiert. Sämtliche Gefäße waren blutgefüllt mit einer Blutstase und Sludge in der Endstrombahn.

In Arteriolen und kleinen Arterien gab es fibrinoide Veränderungen.

Die kombinierte Wirkung von MTBE und Kälte führte zu einer stärkeren Destruktion der Lebertrabekel. Das Zytoplasma der Hepatozyten war ebenfalls körnig, mit hyalinen Tröpfchen und hydrophilen Umbauvorgängen. Die PAS-Reaktion ergab ein geringes, aber diffuses Glykogendepot. Vermehrt fanden sich apoptotisch veränderte Hepatozyten, v. a. mit Karyo- und Zytolyse. Die polyploiden Zellen waren einzeln als regeneratives Potenzial von Leberparenchym erkennbar. Die Zentralvenen und Lebersinuskapillare waren mit Blut gefüllt und enthielten proliferierte Kupferzellen. Ebenso war das Portalfeld mit einer ausgeprägten lymphozytären Infiltration und Beimischung neutrophiler Granulozyten zu beobachten. Das Bindegewebe der Leber war bei van-Gieson-Färbung fuchsi-

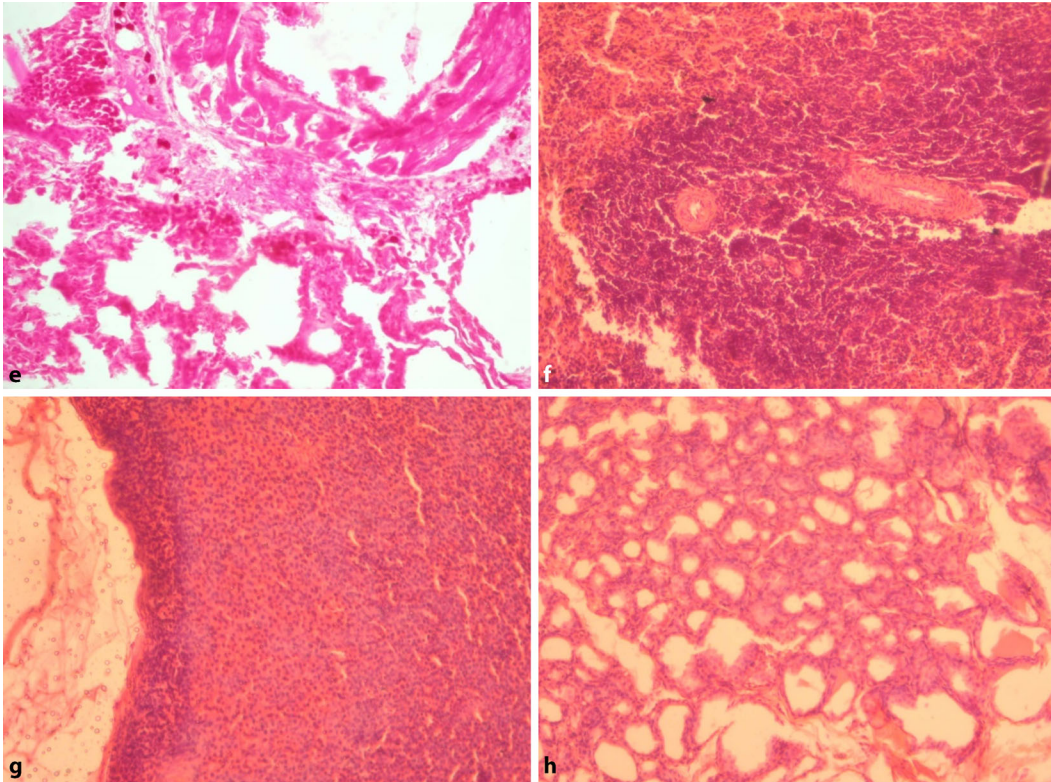


Abb. 4 (Fortsetzung) ◀
e Bronchien: Gruppen von Plasmazellen im Peribronchialgewebe. Brachet-Färbung. Vergr.: 1:200. **f Milz:** Große und mittlere Lymphfollikel der weißen Milzpulpa haben klar definierte breite T- und B-Zonen. HE-Färbung. Vergr.: 1:200. **g Nebenniere:** Zona reticularis, Zona glomerulosa und Zona fascicularis mit leicht vakuolisierendem Zytoplasma. HE-Färbung. Vergr.: 1:200. **h Schilddrüse:** Das Parenchym der Schilddrüsenfollikel hat mittelgroße Follikel. In den subkapsulären Abteilungen sind Gruppen großer Follikel erkennbar. Es gibt eine lobuläre Proliferation des Follikel epithels. HE-Färbung. Vergr.: 1:20

nophil. Nach Feulgen-und-Rossenbeck-Nachweis wurde eine schwach-violette Färbung von Hepatozytenkernen dargestellt mit Verringerung der mitotischen Zellaktivität.

In den Nieren fand sich eine deutlich ausgeprägte Gefäßfülle, vor allem im Nierenmarklager. In der mikrozirkulatorischen Endstrombahn fanden sich Blutstase, Sludge-Phänomen und eine intravaskuläre Hämolyse. Im Nierenglomerulus zeigte sich das Bild der mesangioproliferativen Glomerulonephritis. Die gewundenen Tubuli boten eine granuläre und hydropische Dystrophie des Epithels. Es war eine fokale Tubulonekrose nachweisbar. Das Lumen der Tubuli war ungleichmäßig, manchmal durch Epithelschwellung verengt. Es ließen sich Cluster von Proteinmassen und abgeschuppten Epithelzellen darstellen. Im interstitiellen Gewebe gab es eine kleine Anzahl von zellulären Elementen.

Die weiße Milzpulpa war hyperplasiert. In den Follikeln waren breite T- und B-Zonen ausgeprägt. Die rote Pulpa war mäßig blutgefüllt mit Plasmozyten und Makrophagen. Im Lumen der blutgefüllten Sinusoiden waren neutrophile Gra-

nulozyten und Lymphozyten nachweisbar.

Die Zona glomerulosa war verengt mit kleinen Zellen. Das Zytoplasma der meisten Zellen in dieser Zone war schwach vakuolisiert. Die Zona reticularis war ebenfalls verengt und durch Zellen mit eosinophilem Zytoplasma und hyperchromen Kernen gekennzeichnet. Das Marklager war breit mit einem entwickelten Netzwerk von Kapillaren. Bei dem DNA-Nachweis nach Feulgen-und-Rossenbeck-Färbung wurde eine leichte Verfärbung festgestellt, was auf eine Abnahme der funktionellen Aktivität der Kerne von endokrinen Zellen der Nebennieren hindeutet.

Die morphologische Untersuchung der Schilddrüse zeigte ähnliche morphologische Veränderungen wie unter thermischer Behaglichkeit. Es ließen sich mittelgroße bis große Schilddrüsenfollikel nachweisen. Daneben bot sich ein homogenes eosinophiles Kolloid. Die Follikelwände bestanden aus kubischen und abgeplatteten Follikel epithelien. Im Bindegewebe befanden sich Blutgefäße und Nervenäste. Diese Struktur der Schilddrüse entsprach eher einer hypothyreoten Funktion.

Diskussion

Betrachtet man die mikroskopischen Untersuchungen zunächst nur unter Kältebedingungen, bildeten die histologischen Veränderungen der inneren Organe einen Zustand funktionellen Stresses ab, der als Kältereaktion des Körpers gedeutet werden kann und eine reversible Zustandsänderung bietet. Die toxische Wirkung von MTBE sowohl bei Temperaturen der Behaglichkeit als auch unter Kälte verstärkte die pathologischen Veränderungen.

Unter dem Einfluss von MTBE unter thermischer Behaglichkeit traten in den Lungen entzündliche Veränderungen, Zerstörung der Blutgefäßwände und Hämosiderose auf, d. h. es gab eine Störung aller Komponenten der Lungen. In der Leber wurden dystrophische, fokale nekrotische und entzündliche Veränderungen identifiziert, die als Manifestation chronischer persistierender und zum Teil aktiver Hepatitis gewertet werden können. In diesem Fall blieb das regenerative Potenzial der Leber erhalten, da polypleide Hepatozyten nachweisbar waren. In den Nieren wurde eine toxische Glomerulonephritis festgestellt. In Milz

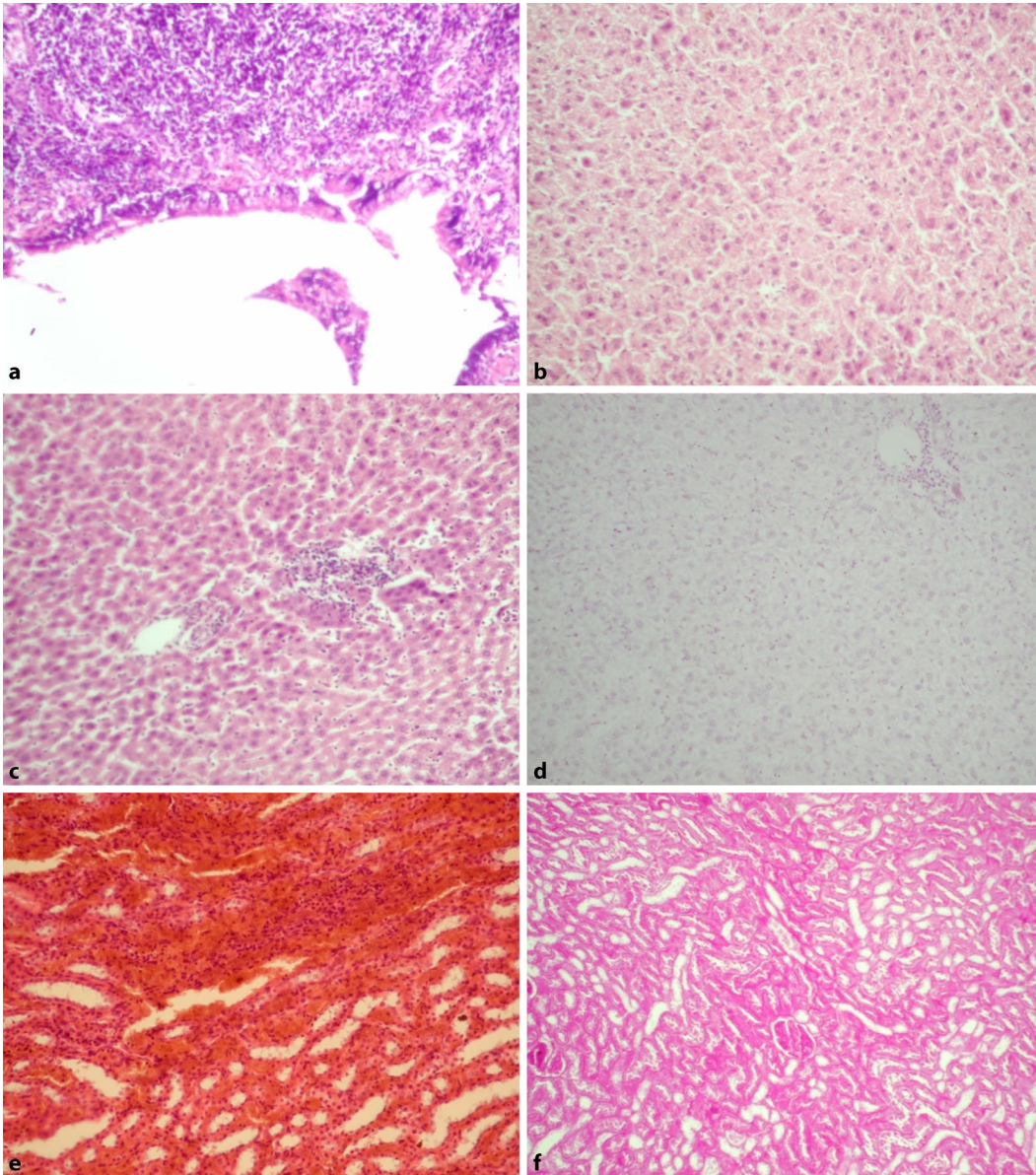


Abb. 5 ◀ Histologische Ergebnisse der Gruppe 1 (unter der subakuten Wirkung von Methyl-tert-butylether unter Kälte [$t = 4 \pm 2^\circ\text{C}$]). **a Bronchien:** Hyperplasie des lymphatischen Gewebes. Bildung von Lymphfollikeln mit reaktiven Zentren. Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung. Vergr.: 1:200. **b Leber:** Destruktion von Leberbälkchen. Zytoplasma mit Zeichen der Degeneration. HE-Färbung. Vergr.: 1:200. **c Leber:** Intralobuläre entzündliche Infiltration in den Hepatozyten. HE-Färbung. Vergr.: 1:200. **d Leber:** Schwache violette Färbung von Hepatozytenkernen. DNA-Nachweis nach Feulgen und Rossenbeck. Vergr.: 1:200. **e Niere:** Gefäßfülle des Nierenmarks. In der mikrozirkulatorischen Endstrombahn ist die Erscheinung der Blutstase, des Sludge-Phänomens und der intravaskulären Hämolyse sichtbar. HE-Färbung. Vergr.: 1:200. **f Niere:** Tubuli mit körniger und hydrophiler Epitheldystrophie und mit fokaler Tubulonekrose. PAS-Reaktion („Periodic Acid Schiff“ Reaktion). Vergr.: 1:200

und Lymphgewebe war eine mäßige Hyperplasie festzustellen, die eine Reaktion auf die Antigenwirkung ist. Histologische Veränderungen in der Nebenniere wiesen auf eine Hyperproduktion von Kortikosteroiden als Reaktion auf eine stressige Situation hin. Die Veränderungen der Schilddrüse entsprachen einer normalen oder leicht erniedrigten Funktion. Bei der kombinierten Wirkung von MTBE und Kälte wurde eine Potenzierung pathogener Effekte festgestellt. In der Lunge zeigte sich eine Zunahme von Entzündungen destruktiver Veränderungen in den Bronchien. Die Leber zeigte eine aktive Hepatitis vor dem Hintergrund einer erhöhten Apoptose und eines

verringerten regenerativen Potenzials. In den Nieren wurden mesangioproliferative Glomerulonephritis und fokale Tubulonekrose beobachtet. In der Milz gab es eine Hyperplasie der weißen Pulpa und eine verstärkte Makrophagen- und Plasmytenreaktion als Antwort auf die Antigenwirkung. Außerdem wies eine ausgeprägte Hyperplasie des Lymphgewebes in den Lungen auf eine signifikante Antigenlast hin. Die Veränderungen in der Nebenniere stellen eine Störung adaptiver Prozesse dar. Die Veränderungen in der Schilddrüse waren ähnlich wie unter thermischer Behaglichkeit.

Die Daten der histologischen Untersuchungen stimmen mit den von uns frü-

her vorgestellten Ergebnissen der experimentellen Untersuchung der Toxikodynamik von MTBE unter Kältestressbedingungen mit der Bewertung morphologischer und morphometrischer Studien von Rattenhoden überein, die die potenzierende Wirkung von Kältestress auf die Toxizität von MTBE anzeigten [5, 34].

Es wird aktuell diskutiert, ob eine 1:1-Übertragung dieser Ergebnisse auf den Menschen möglich ist [35]. Bei Menschen und Ratten lässt sich ein ähnlicher Metabolismus von MTBE nachweisen [36, 37]. MTBE wird im Körper zu Tertiärbutylalkohol (TBA) und Formaldehyd verstoffwechselt. Die im Blut nachweisbaren Metabolite wie 2-Methyl-1,2-

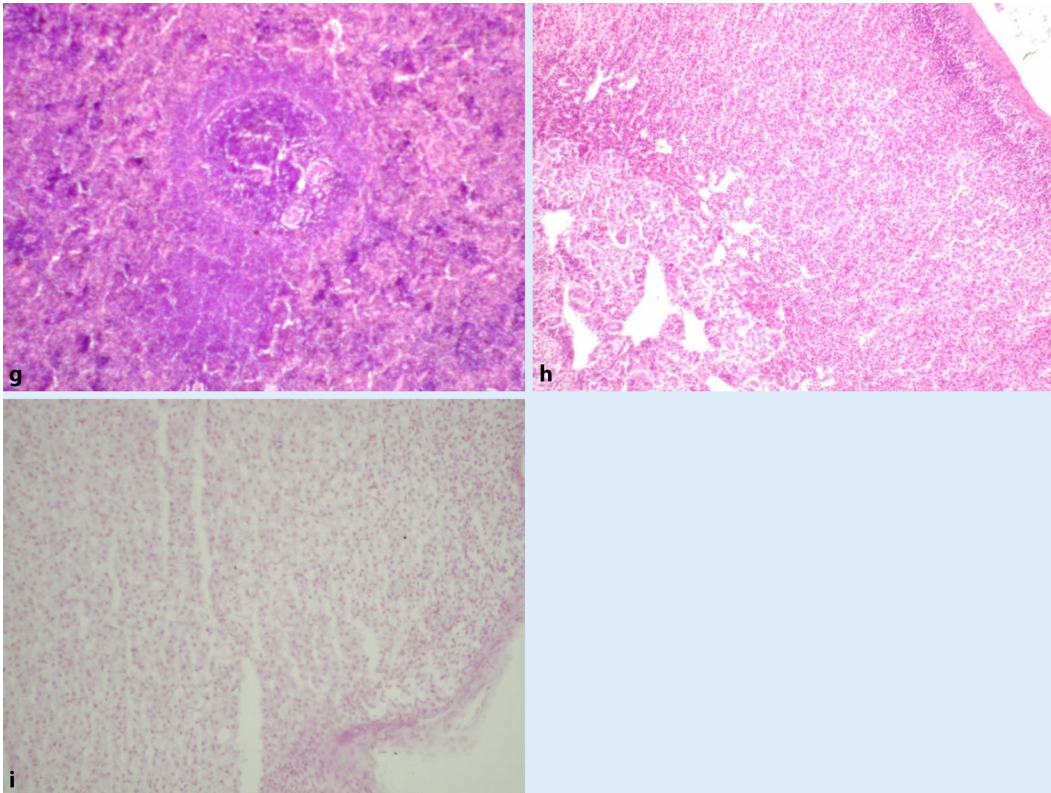


Abb. 5 (Fortsetzung) ◀
g Milz: Hyperplasie der weißen Pulpa. In den lymphoiden Fokallikeln breite T- und B-Zonen. HE-Färbung. Vergr.: 1:200. **h Nebenniere:** Die glomeruläre Zone ist schmal mit kleinen Zellen. Das Zytoplasma der Zellen der Zona arcuata bzw. glomerulosa ist schwach vakuolisiert. HE-Färbung. Vergr.: 1:100. **i Nebennieren:** Schwache Violett-färbung der Kerne endokriner Zellen in allen Schichten der Nebennieren. DNA-Nachweis nach Feulgen und Rosenbeck. Vergr.: 1:200

Propandiol und 2-Hydroxyisobuttersäure sind sowohl beim Menschen als auch bei Ratten identifizierbar, jedoch konnte TBA nur im Urin von Menschen bestimmt werden. Möglicherweise sind die dargestellten histologischen Veränderungen nicht nur allein durch MTBE bedingt, sondern auch Resultat dessen Metabolite wie TBA und Formaldehyd. Die Halbwertszeiten für MTBE liegen bei renaler Eliminierung bei ca. 1,2–1,5 h im Blut und ca. 0,3–3 h im Urin [37, 38]. Formaldehyd spielt wegen der noch rascheren Eliminierung hier eher keine bedeutende Rolle [23]. Die Halbwertszeiten für TBA liegen bei ca. 10 h im Blut und ca. 8,2 h im Urin [38] und sind deutlich länger als die von MTBE.

Obwohl die orale Aufnahme von MTBE am Arbeitsplatz selten vorkommt und am ehesten im Rahmen von Unfällen auftritt, ist diese dann von besonderer Bedeutung. Die oben aufgeführten histologischen Veränderungen zeigten ein eindeutiges toxisches Potenzial verschiedener Organe, die zu schwerwiegenden Erkrankungen führen können, z. B. eitrige Bronchitis. Da die histologischen Untersuchungen erst nach 30 Tagen erfolgten,

kann der Beginn dieser deutlichen histologischen Veränderungen nicht sicher bestimmt werden. Akute zentralnervöse Symptome konnten bei Ratten bereits bei geringen Dosierungen von 90 mg/kg und geringfügige hämatologische Veränderungen ab 300 mg/kg beobachtet werden [23].

Auf Schutzmaßnahmen am Arbeitsplatz sollte besonders geachtet werden. Maßnahmen bspw. zur Ersten Hilfe, zur Brandbekämpfung, bei unbeabsichtigter Freisetzung und zur Handhabung und Lagerung sollten bekannt und die Mitarbeiter aufgeklärt werden.

Fazit für die Praxis

- Ein ausgeprägtes zelltoxisches Potenzial von MTBE, welches durch Kältebedingungen deutlich verstärkt wurde, konnte nachgewiesen werden.
- Eine Übertragbarkeit auf den Menschen ist denkbar, da MTBE bei Menschen einen ähnlichen Abbauprozess hat wie bei Ratten. Jedoch sind hier weitere Forschungsstudien nötig.

Vermutlich spielen die Metabolite von MTBE eine größere Rolle.

- Auch im Rahmen anderer Studien sollten kombinierte Expositionen (z. B. Hitze) untersucht werden.

Korrespondenzadresse



Dr. med.
Beatrice Thielmann
 Bereich Arbeitsmedizin,
 Medizinische Fakultät, Otto-
 von-Guericke-Universität
 Magdeburg
 Leipziger Str. 44,
 39120 Magdeburg,
 Deutschland
 beatrice.thielmann@
 med.ovgu.de

Einhaltung ethischer Richtlinien

Interessenkonflikt. I. Zavgorodnij, B. Thielmann, W. Kapustnik, R. Batschinskij, J. Batschinskaja und I. Böckelmann geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Alle nationalen Richtlinien zur Haltung und zum Umgang mit Labortieren wurden eingehalten, und die notwendigen Zustimmungen der zuständigen Behörden liegen vor.

Literatur

- Zavgorodnij IW, Batschinskij RO, Pertsev DP (2013) Toxikologie der kombinierten Wirkung von chemischen Faktoren und niedriger Temperatur. *Sci J Minist Health Ukraine* 2(3):101–107 (Kongressband 5. National Bioethik Kiev, 23.–25. September 2013)
- Kundiev J, Trachtenberg IM, Tschernyuk Nagorna WI, Nagorna AM (2014) Arbeitsmedizin in der gegenwärtigen Phase. *Sci J Minist Health Ukraine* 1(5):47–55
- Zavgorodnij I, Thielmann B, Kapustnik W, Batschinskij R, Böckelmann I (2017) Wirkung von Nitrobenzol auf innere Organe unter Kältebedingungen. *Zbl Arbeitsmed* 67(6):314–320
- Zavgorodnij I, Thielmann B, Kapustnik W, Batschinskij R, Böckelmann I (2014) Toxizität von Nitrobenzol auf männliche Gonaden von Ratten unter Kältebedingungen. *Umweltmed Hyg Arbeitsmed* 19(3):301–310
- Zavgorodnij I, Kapustnik W, Batschinskij R, Thielmann B, Böckelmann I (2013) Toxische Wirkung von Methyltertiärbuthylether (MTBE) auf das männliche Reproduktionssystem unter Kältebedingungen. *Zbl Arbeitsmed* 63:80–90
- Zavgorodnij IB, Worontsov MP, Batschinskij RO (2006) On the united effects of chemical factors and cold stress (analytical literature review). *Ukrainskii Zhurnal S Probl Meditsini Pratsi* 3(7):65–70
- Tschatschschin WP, Dedenko II (1990) Work and human health in the north. *Murmansk*
- <https://www.umweltbundesamt.de/daten/verkehr/kraftstoffe>. Zugegriffen: 27. Jan. 2019
- <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/239903/umfrage/produktion-der-ether-zusaetze-mtbe-und-etbe-in-europa-nach-laendern-2009/>. Zugegriffen: 27. Jan. 2019
- Internationale Arbeitsgemeinschaft der Wasserwerke im Rheineinzugsgebiet Auswirkungen des Einsatzes von MTBE und ETBE auf Oberflächengewässer und Trinkwasserversorgung im Rheineinzugsgebiet. <https://www.iawr.org/publikationen/positionen/>. Zugegriffen: 29. Jan. 2019
- Yavorskii OP, Paustowskij JO (2008) Features of working environment and health of workers of methyl tertbutyl ether production and application at NPZ plants of Ukraine. *Dowlkilla Sdorowja* 3(46):60–63
- Biradar SA, Bhovi VK, Bodke YD, Bhavanishankar R (2009) A novel method for the synthesis of 6-bromo-2-(3,4-dichlorophenyl)imidazo[1,2-a]pyridine using microwave irradiation. *Molbank* 1:587
- Mohr SN, Fiedler N, Weisel C, Kelly-McNeil K (1994) Health effects of MTBE among new jersey garage workers. *Inhal Toxicol* 6(6):553–562
- Chang KH, Chen CH (2009) MTBE concentration profiles near MTBE manufacturing plant: modeling approach and modeling uncertainty. *Chemosphere* 75(10):1322–1328
- Kolb A, Puttmann W (2006b) Methyl tert-butyl ether (MTBE) in snow samples in Germany. *Atmos Environ* 40:76–86
- Kolb A, Puttmann W (2006a) Methyl tert-butyl ether (MTBE) in finished drinking water in Germany. *Environ Pollut* 140:294–303
- Phillips S, Palmer R, Brody A (2008) Epidemiology, toxicokinetics, and health effects of methyl tert-butyl ether (MTBE). *J Med Toxicol* 4(2):115–126
- Vandecasteele J-P (2008) *Petroleum microbiology*. Editions Technip, Paris
- Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung GESTIS-Stoffdatenbank. http://gestis.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_de/040480.xml?&=templates&fn=default.htm&S3.0. Zugegriffen: 27. Jan. 2019
- Richtlinie 2004/73/EG der Kommission vom 29. April 2004; Empfehlung der Europäischen Kommission vom 07.11.2001. <https://publications.europa.eu/de/publication-detail/-/publication/7bf52e98-781e-4c0a-aec9-3795a32f5984/language-de>. Zugegriffen: 16. Sept. 2018
- Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft (2018) MAK- und BAT-Werte-Liste. Mitteilung 54. Wiley, Weinheim
- Yavorovsky OP, Paustovsky YO, Anisimova IG, Zaprivoda LP (2015) Experimental study of methyl tertiary butyl ether effect on the embryogenesis in white rats. *Environment Health* 2:9–13
- Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft (2000) Methyl-tert-butylether. 30. Lieferung. Wiley, Weinheim
- Kajumov ZS, Nurullaev SP (2017) Entwicklung neuer sauerstoffhaltiger Kraftstoffzusammensetzungen mit hoher Oktanzahl. *Universum Tech Wissenschaften: Elektron Wissenschaftl* 7(40):1–5. <http://7universum.com/ru/tech/archive/item/4986>
- McConnell EL, Basit AW, Murdan S (2008) Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments. *JPP* 60:63–70
- Zavgorodnij IW, Myasoedow WW, Batschinskij RO, Iwanenko TO, Wekschin WO (2009) Patent № 39237 UA, MPK B01L 1/00, B01L 5/00. Charkiw National Medical University S. № u200812926; Sayawl. 06.11.2008; Opubl. 10.02.2009; Büll. № 3. Expositions-kammer. Satrawotschna Kamera
- European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (1986): Council of European. – Strasbourg. <https://www.aalac.org/about/ETS123.pdf>
- Kundiev J (2009) *Moderne Probleme der Bioethik*. Akadempriodika, Kiev
- Sapadnjuk IP (1983) Laboratory animals: breeding, content, use in experiment [Laboratornye zhivotnye: raswedenie, soderzhanie, ispolsovanie w eksperimente]. In: Sapadnjuk IP, Sapadnjuk WI, Sakharil EA (Hrsg) *Witscha schkola*, Kiev. Laboratory animals: breeding, content, use in experiment
- Lillie R (1960) Pathohistological technique and practical histochemistry [Patogistologitscheskaya tehnika i praktitscheskaya gistokhimiya]. Mir, Moscow
- Merkulov GA (1969) Course, pathohistological equipment [Kurs patologitscheskoi tehniki]. Meditsina, Moscow
- Sarkisov DS, Perov JL (1996) Microscopy technique: guide for doctors and laboratory technicians [Mikroskopicheskaya tehnika: rukowodstvo dlya vrachey i laborantov]. Meditsina, Moscow
- Pearse AGE (1968) *Histochemistry, theoretical and applied* Bd. 1. Churchill, London
- Batschinskij RO (2009) Untersuchung der Eigenschaften der Toxikodynamiken von Methylterbutylether unter Bedingungen der kombinierten Wirkung mit verringerter Lufttemperatur. *Westnik Taras Shevchenko Natl Univ Lugansk* 22(185):9–15
- Borghoff SJ, Parkinson H, Leavens TL (2010) Physiologically based pharmacokinetic rat model for methyl tertiary-butyl ether; comparison of selected dose metrics following various MTBE exposure scenarios used for toxicity and carcinogenicity evaluation. *Toxicology* 275(1–3):79–91
- Nihlén A, Wälinder R, Löf A, Johanson G (1998) Experimental exposure to methyl tertiary-butyl ether II. Acute effects in humans. *Toxicol Appl Pharmacol* 148(2):281–287
- Amberg A, Roesner E, Dekant W (1999) Biotransformation and kinetics of excretion of methyl-tert-butylether in rats and humans. *Toxicol Sci* 51:1–8
- Nihlén A, Wälinder R, Löf A, Johanson G (1998) Experimental exposure to methyl tertiary-butyl ether I. Acute effects in humans. *Toxicol Appl Pharmacol* 148(2):274–280