Downloaded from journal.skums.ac.ir at 7:35 +0430 on Sunday September 3rd 2017

بررسی اثرات بنزوات سدیم بر روی تخمدان ها و هورمون های آن و گنادوتروپین ها در موش سوری ماده بالغ

دکتر داوود سهرابی*[1]، دکتر مهدی رهنما**، مژگان شمس الدین***، فرزانه فاخری†

*استادیار گروه بافت شناسی و جنین شناسی – دانشگاه علوم پزشکی زنجان، **استادیار گروه زیست شناسی - دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، ***کارشناس بافت شناسی -دانشگاه علوم پزشکی زنجان، †کارشناس زیست شناسی - دانشگاه علوم پزشکی زنجان.

تاریخ دریافت:۸۵/۱۲/۱۷ تاریخ تایید: ۸۶/۵/۱۸

چکیده:

زمینه و هدف: بنزوات سدیم (C6H5COONa) به عنوان یک داروی ضد عفونی کننده بر علیه باکتریها و میکروارگانیسم ها در انواع مواد غذایی و دارویی بهداشتی مصرف می شود. هدف از این مطالعه تعیین اثرات بنزوات سدیم بر روی تخمدان ها و هورمون های آن و گنادوتروپین ها در موش سوری (balb/c) ماده بالغ است.

روش بررسی: در یک مطالعه تجربی ۱۸ سر مـوش سوری (balb/c) ماده بالغ در سه گروه ٦ تایی قرار گرفتند. به گروه یک (کنترل) آب آشامیدنی طبیعی و به گروه دوم روزانه ۲۸۰ میلی گرم در کیلوگرم و به گروه سوم روزانه ٥٦۰ میلی گرم در کیلوگرم بنزوات سدیم محلول در آب آشامیدنی به مدت ٦۰ روز داده شد. بعد از تهیه سرم های خونی سنجش هورمون های گنادوتروپین (LH)، هیپوفیز (FSH) و استرادیول و پروژسترون به روش رادیوایمنواسی (RIA) انجام گرفت. به کمک میکروسکوپ نوری و الکترونی ساختار و فرا ساختار تخمدانی در موش ها مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل آماری برای مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون t انجام شد.

یافته ها: میانگین وزن تخمدان ها در موشهای گروه کنترل و گروه دوم پس از ٦۰ روز به ترتیب ۰/۹۸±۷/۷۵ و ۰/۸٤±۷/۲۱ میلی گرم بود (P>۰/۰٥). اما میانگین وزن تخمدان ها در گروه سوم (۰/۷۲±٦/٤۱ میلی گرم) نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری را نشان داد (P<۰/۰٥). وزن بدن موشها در گروه دوم (۲/۳۱±۳٥/٦ گرم) و سوم (۳/٦۱±۳٤/۲ گرم) نسبت به گروه کنترل (٤/۷٥±۳۹/٥ گرم) کاهش معنی داری داشت (P<۰/۰٥). در گروه های دوم و سوم کاهش معنی‌داری در مقدار هورمون های پروژسترون نسبت به گروه کنترل وجود داشت (P<۰/۰۰۱). در صورتی که کاهش هورمون های LH و FSH فقط در گروه سوم نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود (P<۰/۰۰۱). تفاوت هورمون استرادیول در گروه های دوم و سوم نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نبود. در نمونه‌های میکروسکوپ الکترونی کاهش ضخامت زونا پلوسیدا در گروه سوم دیده شد.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج این مطالعه و مطالعات دیگران می توان گفت اسید بنزویک و بنزوات سدیم به عنوان یکی از عوامل شیمیایی محیطی می تواند موجب کاهش روند فولیکولوژنز شود و فرآیند تخمک گذاری را مختل نماید. لذا پیشنهاد می گردد در صورت نیاز از مواد جایگزین استفاده شود.

واژه های کلیدی: بنزوات سدیم، تخمدان، فولیکولوژنز، گونادوتروپین.

مقدمه:

اسید بنزوییک (C6H5COONa) و املاح آن که از کربوکسیلیک اسیـــدهای آروماتیک می باشند. خاصیـــت ضد عفونی کنندگی داشته و در کنسروسازی و تهیه مرباجات و رب گوجـــه فرنگی به مقـدار فراوان مصرف می شوند. اسید بنزوییک و بنزوات سدیم به عنوان مواد دارویی در بیماران مبتلا به چرخه آنزیمی

نویسنده مسئول: زنجان -شهرک کارمندان- دانشکده پزشکی- گروه بافت شناسی - تلفن: ۰۲٤۱-٤۲٤۰۳۰۱، E-mail: sohrabidavood@yahoo.com

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 7:35 +0430 on Sunday September 3rd 2017

اوره آز نیز مصرف می شود (۱). گفته می شود بسیاری از هیدروکربن‌های آروماتیک غیر فعال، فوق‌العاده کارسینوژن هستند. هیدروکربن های آروماتیک توسط ارگانیسم های زنده متابولیزه شده و ترکیبات فعالی را می‌سازند همچنین با DNA وارد واکنش شده و می توانند ساختمان ژنتیکی سلول را تغییر داده و موجب تولید مثل های غیر قابل کنترل شوند. با توجه به اهمیت سلول های اجدادی تخمک که تقسیمات میتوز و میوز را پشت سر می‌گذارند و اینکه DNA سلولی در آنها فعال است موادی مانند بنزوات سدیم می‌توانند بر تقسیم سلولی در آنها اثرات سویی بگذارد (۲). در اثر بنزوات سدیم تغییرات هیپرپلاستیک و دژنراتیو در سلولهای کبدی و کلیوی و حتی بیضه دیده می‌شود ولی تغییرات پاتولوژیک در سلولهای مغزی وجود ندارد (۴،۳). با انجام مطالعاتی بر روی حیوانات آزمایشگاهی و بر روی اندام های قلب، طحال، کلیه، کبد و مغز نشان داده شد بنزوات سدیم آثار سویی مانند گرانولاسیون شدید پوست و حتی آسیب های جدی در سلول های مغزی دارد. کاهش وزن بدن، تغییراتی در یون های پلاسما و حتی در مواردی مرگ وجود دارد (۵). در مطالعات انجام شده کاهش وزن جنین (۶)، افزایش وزن کبد و بروز ضایعاتی در CNS (۷)، افزایش مرگ ومیر جنین ها (۸)، بروز ناهنجاری های مادرزادی در ستون مهره ها و سلول های شبکیه چشم (۹)، افزایش اسپرم های ناهنجار (۱۰) و بروز نواقص جنینی در ناحیه کرانیوفاسیال (به ویژه میکروسفالی) و ناهنجازی های روده ای در جنین قورباغه (۱۱) از عوارض مصرف بنزوات سدیم در جنین موش گزارش گردیده است. با توجه به مطالعات اندک در مورد اثرات اسید بنزوییک و بنزوات سدیم بر روی غدد تناسلی بویژه تخمدان ها و باروری آنها و نظر به اینکه بنزوات سدیم در مواد غذایی و دارویی در ایران استفاده می شود. این مطالعه با هدف تعیین اثرات بنزوات سدیم بر روی تخمدان و هورمون های آنها و گنادوتروپین های هیپوفیز در موش ماده بالغ انجام گرفت.

روش بررسی:

در یک مطالعه تجربی ۱۸ سر موش سوری از نژاد balb/c که در اتاق حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی زنجان تکثیر یافته بودند در سه گروه قرار گرفتند. دمای اتاق حیوانات تقریباً بین ۲۰-۲۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبتی معادل ۵۰-۷۵ درصد برای آنها فراهم بود. نور گر چه از طریق پنجره ای تامین می شد اما یک لامپ فلئورسنت نیز به مدت ۱۲ ساعت روشن و ۱۲ ساعت خاموش می شد. قفس های فلزی استاندارد همراه با خاک اره که بطور مرتب تعویض می شد. موش های ماده بالغ با سنین ۱۲-۱۰ هفته با وزن ۲۸-۲۵ گرم جهت شروع آزمایش ها انتخاب شدند. در مرحله اول موش ها در سه گروه ۶ تایی به صورت تصادفی قرار گرفتند. یک گروه به عنوان کنترل (گروه یک) و دو گروه بعنوان گروه های تجربی (گروه ۲ و گروه ۳) در نظر گرفته شد. به گروه کنترل آب آشامیدنی طبیعی و به گروه ۲ روزانه مقدار ۲۸۰ میلیگرم در کیلوگرم و به گروه ۳ روزانه مقدار ۵۶۰ میلیگرم برکیلوگرم پودر بنزوات سدیم (محصول شرکت دارویی سبحان) به صورت محلول در آب آشامیدنی داده شد. چون اکثر محققین اثر بنزوات سدیم بر روی موش صحرایی RAT و تقریباً با دو برابر دوزه های ما تجربه کرده بودند ما به علت استفاده از موش سوری نژاد balb/c تقریباً نصف دوزه های محققین قبلی را در این تجربه مورد استفاده قرار دادیم (۱۰،۷). این تجربه به مدت ۶۰ روز (دو ماه) ادامه پیدا کرد. بعد از ۶۰ روز با رعایت کلیه مسایل بویژه اینکه موشها در سیکل دی استروس باشند (با تهیه لام گسترش مهبلی) توسط اتر (مرک آلمان) بیهوش شدند. از

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 7:35 +0430 on Sunday September 3rd 2017

بطن چپ خونگیری شد. نمونه های خون جمع آوری و با اولترا سانتریفوژ سرم آنها جدا گردید و تا سنجش هورمونی در فریزر ۲۰ درجه سانتیگراد زیر صفر نگهداری شد. در مراحل بعد سنجش هورمون هایFSH و LH و استرادیول و پروژسترون در آزمایشگاه پزشکی هسته ای با کیت های شرکت Raidim,Italy به روش رادیو ایمونوآسی (RIA) انجام شد. بلافاصله تخمدان ها از بدن خارج گردید و بعد از معاینات تشریحی در محلول فرمالین ده درصد قرار گرفت و نمونه هایی از تخمدان ها به ابعاد بسیار کوچک در گلوتارالدئید ۱۰ درصد قرار گرفت. سپس تخمدان ها برای انجام مطالعات بافت شناسی توسط میکروسکوپ نوری آماده سازی شد. رنگ آمیزی به روش H-E انجام گرفت. تعدادی از تخمدان های تجربی و شاهد نیز برای انجام مطالعات میکروسکوپی الکترونی به مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران منتقل شدند. سپس داده ها توسط نرم افزار SPSS و با استفاده از آزمون t تجزیه و تحلیل شد.

یافته ها:

حیوانـات مورد آزمایش گروه های تجـربی و گروه کنترل بعد از ۶۰ روز دریافت بنـزوات سدیـم در آب آشامیدنی قبل از بیهوشی و کشته شدن با دقـت توزیـن شدند که کاهش وزن بدن موشها در گروه ۲ (۲/۳۱±۳۵/۶ گرم) و گروه ۳ (۳/۶۱±۳۴/۲ گرم) نسبت به گروه کنترل (۴/۷۵±۳۹/۵ گرم) تفـاوت معنـی داری داشت (P<۰/۰۵).

میانگین وزن تخمـدان ها پس از ۶۰ روز در موش های کنترل ۰/۹۸mg±۷/۷۵، موش های گروه ۲ mg ۰/۸۴±۷/۲۱ و در گروه ۳ ۰/۷۲mg±۶/۴۱ بود که گروه ۳ نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری را نشان می داد (P<۰/۰۵).

کاهش هورمون FSH و LH فقط در گروه ۳ نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود (P<۰/۰۰۱). اما تفاوت هورمون استرادیول در گروه های تجربی نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نبود. در صورتی که کاهش هورمون پروژسترون در گروه های تجربی نسبت به گروه کنترل معنی دار است (P<۰/۰۰۱) (جدول شماره ۱).

در بررسی مقاطع میکروسکوپی نوری و الکترونی در گروه ۲ برخی مقاطع روند کاهش بلوغ فولیکول ها را نشان می‌داد. در گروه ۳ فولیکول های آترتیک نسبت به گروه کنترل بسیار زیادتر بودند و سلول های آماسی فراوان در مقاطع تخمدان های این گروه وجود داشت. اجسام زرد در تخمدان های گروه های تجربی بسیار کم بود و یا اصلاً

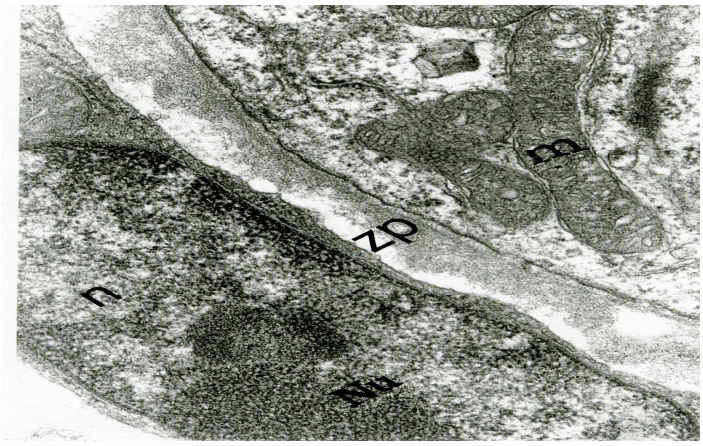
جدول شماره ۱: مقادیر هورمون های پلاسما در موش های گروه کنترل و تجربی بعد از دریافت دو ماه بنزوات سدیم

گروه های آزمایشی	FSH (mIU/ml)	LH (mIU/ml)	استرادیول (Pg/ml)	پروژسترون (Pg/ml)
کنترل (گروه ۱)	۰/۵۳۵±۰/۰۶۱	۰/۱۷۸±۰/۰۳۹	٤/۷۱±۰/۷٦	۳۹/۱۵±۱/۰۹
گروه ۲	۰/۵٦۱±۰/۰٦۹	۰/۱٦۳±۰/۰۳۵	۵/۷۷±۰/۹۲	*۳۵/۲٦±۱/۸۵
گروه ۳	*۰/۳٤۲±۰/۰۵۱	*۰/۰۹۱±۰/۰۱۸	۵/۲٦±۰/۹٤	*۳٦/۱۷±٤/۷۹

*P<۰/۰۰۱نسبت به گروه کنترل -داده ها به صورت "انحراف معیار±میانگین" می باشد. -گروه کنترل: دریافت آب آشامیدنی. گروه ۲: دریافت ۲۸۰ mg/kg/day بنزوات سدیم محلول در آب آشامیدنی. -گروه ۳: دریافت ۵٦۰ mg/kg/day بنزوات سدیم محلول در آب آشامیدنی. LH :luteinizing hormone FSH: follicle stimulating hormone

Pg: pico gram mIU: milli-international unit

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 7:35 +0430 on Sunday September 3rd 2017



تصویر شماره ۱: **میکروگراف تهیه شده با میکروسکوپ الکترونی انتقالی از تخمدان موش های در یافت کننده mg/kg ۵۶۰ بنزوات سدیم به مدت ۶۰ روز.**

(بزرگنمایی ۲۰۰۰۰ برابر). (ZP) مرز بین سلول های فولیکولی و اووسیت. لایه شفاف نازکتر شده، هسته متراکم تر و هتروکرماتین (n) است و شکاف هایی در هستک (nu) بوجود آمده است. میتوکندری ها (m) تغییراتی را نشان نمی دهند.

دیده نمی‌شد. نتایج میکروسکوپ الکترونی تغییراتی از قبیل بهم ریختگی لانه های تخمکی و متراکم شدن و فشردگی هسته سلول های فولیکولی را در هر دو گروه تجربی نشان داد. در گروه ۳ لایه شفاف در مقایسه با گروه کنترل بسیار نازکتر است و جسم زرد نیز بسیار کمتر در مقاطع دیده نمی شود (تصویر شماره ۱).

بحث:

در مورد اثرات اسید بنزوییک و املاح آن از جمله بنزوات سدیم بر بافت های بدن بویژه غدد تناسلی اطلاعات کمی در دست می باشد. مطالعات Stenberg و همکاران بر روی موش های صحرایی نشان می‌دهد مصرف طولانی مدت بنزوات سدیم همراه آب مصرفی به میزان ۱۸۰۰ میلیگرم بر کیلوگرم موجب کاهش وزن موش ها و کاهش وزن بعضی اندام ها شده است (۱۲). مطالعات Yang و Schaich در سال ۱۹۹۶ نشان می دهد که بنزوات سدیم موجب تغییرات هیستوپاتولوژیک و بی نظمی در سیستم عصبی می‌شود. این پژوهشگران می گویند بنزوات سدیم به علت ایجاد رادیکال های آزاد می تواند تغییراتی در DNA سلولی ایجاد کند (۱۳). شاید بتوان گفت در این پژوهش نیز همین فرضیه صادق است چون رادیکال های آزاد می توانند بر روی سنتز هورمون ها نیز موثر باشند و هم می توانند تقسیم سلولی را مختل کنند. اما به نظر می رسد اثر مهاری بنزوات سدیم ناشی از تغییرات ایجاد شده در اجزای فولیکولی نظیر اووسیت ها و سلول های گرانولوزا می‌باشد. این فرضیه محتمل است که این ماده شیمیایی اثرات تخریبی مستقیم بر بافت تخمدان داشته و یا اثرات خود را به صورت غیر مستقیم از طریق گنادوتروپین ها معطوف نموده است. این اثرات توسط نمونه های میکروسکوپ الکترونی نیز تایید می شود که در برخی نمونه ها فرا ساختار تخمدان متراکم شدن هسته سلولی را نشان می‌دهد. در حالت کلی می-توان گفت بسیاری از تغییرات ممکن است برگشت پذیر باشند. نازک شدن زونا پلوسیدا می تواند از جنبه های مختلفی مانند از بین رفتن رسپتورها با کاهش فعالیت اووسیت اثرات نامطوبی در باروری

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 7:35 +0430 on Sunday September 3rd 2017

تخمک داشته باشد. متراکم شدن هسته و پیدایش گرانول های متراکم در سیتوپلاسم شاید نشانه ای بر پیدایش سلول های آپوپتوزی در لایه‌های تخمک باشد. حتی در مقاطع بافت شناسی تخمدان نیز حضور تعداد انبوه سلول های آماسی می تواند این فرضیه را تایید کند و معمولاً رادیکال‌های آزاد می‌توانند این شرایط را ایجاد کنند که سبنزوات سدیم این خصوصیت را داراست. اما برای اثبات این موارد باز هم احتیاج به مطالعات بعدی است. حتی می توان این فرضیه را نیز مطرح کرد که ممکن است بنـــزوات سدیم بر روی آنزیم های مسئول استروئیدوژنز اثرات تخریبی داشته باشد. با توجه به اینکه در این مطالعه کاهشی در مورد هورمون استرادیول در گروه های تجربی وجود ندارد نمی‌توان روی این اثر خیلی صحه گذاشت از طرف دیگر چون هورمون پروژسترون در گروه های تجربی کاهش یافته است و منبع اصلی پروژسترون جسم زرد می‌باشد و نمونه های بافتی عدم تشکیل جسم زرد را نشان می‌دهد می‌توان گفت بنزوات سدیم بر روی آنزیم های سنتز پروژسترون بیشتر موثر بوده است. مطالعات دیگر در سالهای اخیر اثرات سمی بنزوات سدیم بر بافت های دیگر از جمله استخوان ها نشان داده است (۱۴). در مطالعه دیگری نیز گزارش شده است بر خلاف یافته های قبلی بنزوات سدیم بر تعداد محدودی از بافت های بدن از جمله سیستم عصبی اثرات سویی دارد و بافت های دیگر اثرات سمی ندارد (۱۵). اما باز هم مطالعه دیگر اثرات تخریبی آن را بر بافت پوست نشان داد (۱۶) و بالاخره در یک مطالعه دیگر نشان داده شده است که بنزوات سدیم موجب ادم در ریه می‌شود (۱۷). پس می‌توان گفت هنوز به مطالعات بیشتر در این مورد نیاز است.

نتیجه گیری:

با توجه به نتایجی که از این مطالعه به دست آمد و مطالعات دیگران، می توان گفت اسید بنزویک و بنزوات سدیم به عنوان یکی از عوامل شیمیایی محیطی می توانند موجب کاهش روند فولیکولوژنز شوند و فرآیند اووژنز و تخمک گذاری را مختل نمایند. پیشنهاد می شود در مواد غذایی و دارویی از آن استفاده نشـود و در صورت نیاز از مواد جایگزین استفاده گردد.

تشکر و قدردانی:

نویسندگان مقاله از حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان و از تمامی کسانی که ما را در این طرح یاری نمودند صمیمانه قدردانی می نمایند.

منابع:

1. Maki T, Suzuki Y. Benzoic acid and derivatives. In: Maki T, Suzuki Y. Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry. Vol 3. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft Mbh; 1985. p: 555-68.

2. Villanueva MB, Jonai H, Kanno S, Takeuchi Y. Dietary sources and background levels of hippuric acid in urine: comparison of Philippine and Japanese levels. Ind Health. 1994; 32(4): 239-46.

3. Toyoda M, Ito Y, Ishiki K, Orishi K, Kato T. Estimation of daily intake of many kind of food additives according to the market basket studies in Japan. JJS Nutrition. 1983; 36: 489-97.

4. Toth B. Lack of tumorigenicity of sodium benzoate in mice. Fundam Appl Toxicol. 1984 Jun; 4(3 Pt 1): 494-6.

5. Urano K, Kato Z. Evaluation of biodegradation ranks of priority organic compounds. J Hazardous Materials. 1986; 13: 147-59.

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 7:35 +0430 on Sunday September 3rd 2017

٦. شهلا طاهری، دکترداود سهرابی. بررسی اثرات تراتوژنیک بنزوات سدیم بر روی جنین موش صحرایی. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی زنجان. ۱۳۸۱، ۳۹(۲): ٤-۱.

7. Fujitani T. Short-term effect of sodium benzoate in F344 rats and B6C3F1 mice. Toxicol Lett. 1993 Aug; 69(2): 171-9.

8. Kimmel CA, Wilson JG, Schumacher HJ. Studies on metabolism and identification of the causative agent in aspirin teratogenesis in rats. Teratology. 1971 Feb; 4(1): 15-24.

9. Daston GP, Baines D, Elmore E, Fitzgerald MP, Sharma S. Evaluation of chick embryo neural retinal cell culture as a screen for developmental toxicants. Fundam Appl Toxicol. 1995 Jul; 26(2): 203-10.

10. Ishiguro S, Mayomoto A, Obi T, Nishio A. Teratological studies on benzyl acetate in pregnant rats. Kadnau (bulltine of faculty of agriculture, Kagoshina university). 1990; 43: 25-31.

11. Nair B. Final report on the safety assessment of benzyl alcohol, benzoic acid, and sodium benzoate. Int J Toxicol. 2001; 20(Suppl 3): 23-50.

12. Stenberg A, Ingater A. Toxicological evaluation of some combination of food preservatives. Food Cosment Toxico. 1970; 8(4): 369-80.

13. Yang MH, Schaich KM. Factors affecting DNA damage caused by lipid hydroperoxides and aldehydes. Free Radic Biol Med. 1996; 20(2): 225-36.

14. Jutten P, Schumann W, Hartl A, Dahse HM, Grafe U. Thiosemicarbazones of formyl benzoic acids as novel potent inhibitors of estrone sulfates. J Med Chem. 2007; 50(15): 3661-6.

15. Andersen A. Final report on the safety assessment of benzaldehyde. Int J Toxicol. 2006; 25 (Suppl 1): 11-27.

16. Lu YP, Lou YR, Xie JG, Peng QY, Zhou S, Lin Y, Shih WJ, Conney AH. Caffeine and caffeine sodium benzoate have a sunscreen effect, enhance UVB-induced apoptosis, and inhibit UVB-induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice. Carcinogenesis. 2007; 28(1): 199-206.

17. Nettis E, Colanardi MC, Ferrannini A Sodium benzoate-induced repeated episodes of acute urticaria/angio-oedema: randomized controlled trial. Br J Dermatol. 2004 Oct; 151(4): 898-902.