

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

دکتر داوود سهرابی*، 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: ۱۵/۱۲/۱۷ تاریخ تایید: ۱۶/۵/۱۸

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 موش سوری (balb/c) ماده بالغ در سه گروه ۶ 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 ۵۶۰ میلی گرم در کیلوگرم بنزوات سدیم محلول در آب آشامیدنی به مدت ۶۰ 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 ۶۰ روز به ترتیب ۷/۷۵±۰/۹۸ و ۷/۲۱±۰/۸۴ میلی گرم بود (P>۰/۰۵). اما میانگین وزن تخمدان ها در گروه سوم (۶/۴۱±۰/۷۲ میلی گرم) نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری را نشان داد (P<۰/۰۵). وزن بدن موشها در گروه دوم (۳۵/۶±۲/۳۱ گرم) و سوم (۳۴/۲±۳/۶۱ گرم) نسبت به گروه کنترل (۳۹/۵±۴/۷۵ گرم) کاهش معنی داری داشت (P<۰/۰۵). در گروه های دوم و سوم کاهش معنی داری 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 معنی دار بود (P<۰/۰۰۱). تفاوت هورمون استرادیول در گروه های دوم و سوم نسبت به گروه کنترل معنی دار نبود. در نمونه های 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:

و تهیه مرباجات و رب گوجه فرنگی به مقدار فراوان مصرف می شوند. اسید بنزویک و بنزوات سدیم به عنوان مواد دارویی در بیماران مبتلا به چرخه آزریمی

اسید بنزویک (C6H5COONa) و املاح آن که از کربوکسیلیک اسیدهای آروماتیک می باشند. خاصیت ضد عفونی کنندگی داشته و در کنسروسازی

تعیین اثرات بنزوات سدیم بر روی تخمدان و هورمون‌های آنها و گنادوتروپین‌های 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 گرچه از طریق پنجره ای تامین می‌شد اما یک لامپ فلئورسنت نیز به مدت ۱۲ ساعت روشن و ۱۲ ساعت خاموش می‌شد. قفس‌های فلزی استاندارد همراه با خاک اره که بطور مرتب تعویض می‌شد. موش‌های ماده بالغ با سنین ۱۲-۱۰ هفته با وزن ۲۸-۲۵ گرم جهت شروع آزمایش‌ها انتخاب شدند. در مرحله اول موش‌ها در سه گروه ۶ تایی به صورت تصادفی قرار گرفتند. یک گروه به عنوان کنترل (گروه یک) و دو گروه بعنوان گروه‌های 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 بر کیلوگرم پودر بنزوات سدیم (محصول شرکت دارویی سبحان) به صورت محلول در آب آشامیدنی داده شد. چون اکثر محققین اثر بنزوات سدیم بر روی موش صحرائی RAT و تقریباً با دو برابر دوزهای ما تجربه کرده بودند ما به علت استفاده از موش سوری نژاد balb/c تقریباً نصف دوزهای محققین قبلی را در این تجربه مورد استفاده قرار دادیم (۷، ۱۰). 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 مهلبی) توسط اتر (مرکب آلمان) بیهوش شدند. از

اوره آز نیز مصرف می‌شود (۱). گفته می‌شود بسیاری از هیدروکربن‌های آروماتیک غیر فعال، فوق‌العاده کارسینوژن هستند. هیدروکربن‌های آروماتیک توسط ارگانسیم‌های زنده متابولیزه شده و ترکیبات فعالی را می‌سازند همچنین با DNA وارد واکنش شده و می‌توانند ساختمان ژنتیکی سلول را تغییر داده و موجب تولید مثل‌های غیر قابل کنترل شوند. با توجه به اهمیت سلول‌های 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 (۳، ۴). با انجام مطالعاتی بر روی حیوانات آزمایشگاهی و بر روی اندام‌های قلب، طحال، کلیه، کبد و مغز نشان داده شد بنزوات سدیم آثار سویی مانند گرانولاسیون شدید پوست و حتی آسیب‌های جدی در سلول‌های مغزی دارد. کاهش وزن بدن، تغییراتی در یون‌های پلاسما و حتی در مسواری مرگ وجود دارد (۵). در مطالعات انجام شده کاهش وزن جنین (۶)، افزایش وزن کبد و بروز ضایعاتی در CNS (۷)، افزایش مرگ و میر جنین‌ها (۸)، بروز ناهنجاری‌های مادرزادی در ستون مهره‌ها و سلول‌های شبکه چشم (۹)، افزایش اسپرم‌های ناهنجار (۱۰) و بروز نواقص جنینی در ناحیه کرایونوفاسیال (به ویژه میکروسفالی) و ناهنجاری‌های 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 بنزویک و بنزوات سدیم بر روی غدد تناسلی بویژه تخمدان‌ها و باروری آنها و نظر به اینکه بنزوات سدیم در مواد غذایی و دارویی در ایران استفاده می‌شود. این مطالعه با هدف

آب آشامیدنی قبل از بیهوشی و کشته شدن با دقت توزین شدند که کاهش وزن بدن موشها در گروه ۲ (۳۴/۲±۳/۶۱ گرم) نسبت به گروه کنترل (۳۵/۶±۲/۳۱ گرم) و گروه ۳ (۳۹/۵±۴/۷۵ گرم) تفاوت معنی داری داشت (P<۰/۰۵).

میانگین وزن تخمدان ها پس از ۶۰ روز در موش های کنترل ۷/۷۵±۰/۹۸mg، موش های گروه ۲ ۷/۲۱±۰/۸۴ mg و در گروه ۳ ۶/۴۱±۰/۷۲mg 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 معنی دار بود (P<۰/۰۰۱). اما تفاوت هورمون استرادیول در گروه های تجربی نسبت به گروه کنترل معنی دار 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 می داد. 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

بطن چپ خونگیری شد. نمونه های خون جمع آوری و با اولتراسانتریفوژ سرم آنها جدا گردید و تاسنجش هورمونی در فریزر ۲۰ درجه سانتیگراد زیر صفر نگهداری شد. در مراحل بعد سنجش هورمون های FSH و LH و استرادیول و پروژسترون در آزمایشگاه پزشکی هسته ای با کیت های شرکت Raidim, Italy به روش رادیو ایمنونوآسی (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 گلو تارالدئید 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:

حیوانات مورد آزمایش گروه های تجربی و گروه کنترل بعد از ۶۰ روز دریافت بنزوات سدیم در

جدول شماره ۱: مقادیر هورمون های پلازما 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	۴/۷۱±۰/۰۷۶	۳۹/۱۵±۱/۰۹
گروه ۲	۰/۵۶۱±۰/۰۶۹	۰/۱۶۳±۰/۰۳۵	۵/۷۷±۰/۰۹۲	*۳۵/۲۶±۱/۸۵
گروه ۳	*۰/۳۴۲±۰/۰۵۱	*۰/۰۹۱±۰/۰۱۸	۵/۲۶±۰/۰۹۴	*۳۶/۱۷±۴/۷۹

*P<۰/۰۰۱ نسبت 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 ۵۶۰ mg/kg/day بنزوات سدیم محلول در آب آشامیدنی.

FSH: follicle stimulating hormone LH: luteinizing hormone
Pg: pico gram mIU: milli-international unit



تصویر شماره ۱: میکروگراف تهیه شده با میکروسکوپ الکترونی انتقالی از تخمدان موش‌های در یافت کننده ۵۶۰ mg/kg بنزوات سدیم به مدت ۶۰ روز. (بزرگنمایی ۲۰۰۰۰ برابر). (ZP) مرز بین سلول‌های فولیکولی و اووسیت. لایه شفاف نازکتر شده، هسته متراکم تر و هتروکرماتین (n) است و شکاف‌هایی در هستک (nu) بوجود آمده است. میتوکندری‌ها (m) تغییراتی را نشان نمی‌دهند.

می‌گویند بنزوات سدیم به علت ایجاد رادیکال‌های آزاد می‌تواند تغییراتی در DNA سلولی ایجاد کند (۱۳). شاید بتوان گفت در این پژوهش نیز همین فرضیه صادق است چون رادیکال‌های آزاد می‌توانند بر روی سنتز هورمون‌ها نیز موثر باشند و هم می‌توانند تقسیم سلولی را مختل کنند. اما به نظر می‌رسد اثر مهاری بنزوات سدیم ناشی از تغییرات ایجاد شده در اجزای فولیکولی نظیر اووسیت‌ها و سلول‌های 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 گنادوتروپین‌ها معطوف نموده است. این اثرات توسط نمونه‌های میکروسکوپ الکترونی نیز تایید می‌شود که در برخی نمونه‌ها فرا ساختار تخمدان متراکم شدن هسته سلولی را نشان می‌دهد. در حالت کلی می‌توان گفت بسیاری از تغییرات ممکن است برگشت پذیر باشند. نازک شدن زونا پلوسیدا می‌تواند از جنبه‌های مختلفی مانند از بین رفتن رسته‌ها با کاهش فعالیت اووسیت اثرات نامطلوبی در باروری

دیده نمی‌شود. نتایج میکروسکوپ الکترونی تغییراتی از قبیل بهم ریختگی لانه‌های تخمکی و متراکم شدن و فشردگی هسته سلول‌های 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 نمی‌شود (تصویر شماره ۱).

بحث:

در مورد اثرات اسید بنزویک و املاح آن از جمله بنزوات سدیم بر بافت‌های بدن بویژه غدد تناسلی اطلاعات کمی در دست می‌باشد. مطالعات Stenberg و همکاران بر روی موش‌های صحرائی نشان می‌دهد مصرف طولانی مدت بنزوات سدیم همراه آب مصرفی به میزان ۱۸۰۰ میلیگرم بر کیلوگرم موجب کاهش وزن موش‌ها و کاهش وزن بعضی اندام‌ها شده است (۱۲). مطالعات Yang و Schaich در سال ۱۹۹۶ نشان می‌دهد که بنزوات سدیم موجب تغییرات هیستوپاتولوژیک و بی‌نظمی در سیستم عصبی می‌شود. این پژوهشگران

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 می شود (۱۷). پس می توان 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 فولیکولوزن شوند و فرآیند اووژنز و تخمک گذاری را مختل نمایند. پیشنهاد می شود در مواد غذایی و دارویی از آن استفاده نشود 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.

تخمک داشته باشد. متراکم شدن هسته و پیدایش گرانول های متراکم در سیتوپلاسم شاید نشانه ای بر پیدایش سلول های آپوپتوزی در لایه های تخمک باشد. حتی در مقاطع بافت شناسی تخمدان نیز حضور تعداد انبوه سلول های آماسی می تواند این فرضیه را تایید کند و معمولاً رادیکال های آزاد می توانند این شرایط را ایجاد کنند که سبب زوات 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 بنزوات سدیم بر روی آنزیم های مسئول استروئیدوزن اثرات تخریبی داشته باشد. با توجه به اینکه در این مطالعه کاهش در مورد هورمون استرادیول در گروه های تجربی وجود ندارد نمی توان 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 می باشد و نمونه های بافتی عدم تشکیل جسم زرد را نشان می دهد می توان 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

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.

6. شهلا طاهری، دکتر داوود سهرابی. بررسی اثرات تراتوژنیک بنزوات سدیم بر روی جنین موش صحرائی. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی زنجان. ۱۳۸۱، ۳۹(۲): ۴-۱.
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, Mayamoto 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 Cosmet Toxicol.* 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.