

Research Paper:

The Effect of Long-term Exposure to Aspartame on Histomorphometric, Histochemical and Expression of P53, Bcl-2 and Caspase-3 Genes in the Ovaries of Mice

Mohsan Hosseini¹ , *Hassan Morovvati¹ , Hojat Anbara¹ 

1. Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.



Citation Hosseini M, Morovvati H, Anbara H. The Effect of Long-term Exposure to Aspartame on Histomorphometric, Histochemical and Expression of P53, Bcl-2 and Caspase-3 Genes in the Ovaries of Mice. Qom University of Medical Sciences Journal. 2021; 15(6):414-425. <https://doi.org/10.32598/qums.15.6.2350.1>

 <https://doi.org/10.32598/qums.15.6.2350.1>



Received: 15 May 2021

Accepted: 31 Aug 2021

Available Online: 01 Sep 2021

Keywords:Aspartame, Ovary,
Genes, p53, Genes,
bcl-2, Caspase-3**ABSTRACT**

Background and Objectives Aspartame is a non-nutritive and artificial sweetener which is widely used in diet and low calorie products and also in a variety of foods, drugs and hygiene products. The present study has been conducted in order to evaluation of the effects of aspartame on ovaries in female mice.

Methods In this experimental study, 36 adult female mice were randomly divided into four groups of nine each. For three groups aspartame was administered orally with the doses of 40, 80 and 160 mg/kg.BW respectively, and one group as the control group received normal saline for 91 days by gavage. Also a control group was considered. 24 hours after the last treatment, ovarian tissue and blood samples were collected and used for biochemical, histomorphological, histomorphometric, histochemical and gene expression studies. The obtained data were analyzed using One-Way Analysis of Variance (ANOVA) and Tukey's test at the significance level of $P < 0.05$.

Results In ovarian histomorphometric studies, aspartame at a dose of 160 mg/kg significantly reduced growing follicles and significantly increased atresia follicles. Also in biochemical studies caused a significant decrease in TAC and a significant increase in MDA compared to control group. In connection with the studied genes, aspartame at a dose of 160 mg/kg caused a significant decrease in the expression of Bcl-2 gene and also a significant increase in the expression of P53 and Caspase-3 genes compared to the control group.

Conclusion It seems that high dose aspartame can cause adverse effects on histomorphology, histomorphometry and expression of P53, Bcl-2 and Caspase-3 genes in rat ovaries

*** Corresponding Author:**

Hassan Morovvati, PhD.

Address: Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

Tel: +98 (916) 6182384

E-Mail: hmorovvati@ut.ac.ir

مقاله پژوهشی:

تأثیر مصرف طولانی مدت آسپارتام بر هیستومورفومتري، هیستوشیمی و بیان ژن های Bcl-2، P53 و Caspase-3 در تخمدان موش های سفید کوچک آزمایشگاهی

محسن حسینی^۱، حسن مروتی^۱، حجت عنبر^۱

۱. گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: آسپارتام یک شیرین کننده مصنوعی و غیرمغذی است که به طور گسترده‌ای در محصولات رژیمی، کم کالری و همچنین در انواع غذاها، داروها و محصولات بهداشتی استفاده می‌شود. این مطالعه به منظور ارزیابی اثرات آسپارتام بر تخمدان موش ماده انجام پذیرفت. **روش بررسی:** در این مطالعه تجربی، ۳۶ سر موش سفید کوچک آزمایشگاهی ماده بالغ به صورت تصادفی به چهار گروه ۹ سری تقسیم شدند. سه گروه از گروه‌های فوق به ترتیب آسپارتام را به میزان ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن و یک گروه نیز به عنوان گروه کنترل سرم فیزیولوژی را به صورت خوراکی از طریق گاوژ به مدت ۹۱ روز دریافت کردند. ۲۴ ساعت پس از آخرین تیمار، نمونه‌های خونی و بافتی تخمدان جمع‌آوری و جهت بررسی‌های بیوشیمیایی، هیستومورفولوژی، هیستومورفومتري، هیستوشیمی و بیان ژن استفاده شد. داده‌ها با روش آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست توکی و در سطح معنی‌داری $P < 0.05$ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: در بررسی‌های هیستومورفومتري تخمدان، آسپارتام به میزان ۱۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم موجب کاهش معنی‌دار میانگین فولیکول‌های در حال رشد و افزایش معنی‌دار میانگین فولیکول‌های آتروزی شده و همچنین در مطالعات بیوشیمیایی موجب کاهش معنی‌دار ظرفیت آنتی اکسیدانت تام سرم و افزایش معنی‌دار مالون‌دی‌آلدئید نسبت به گروه کنترل شد. در ارتباط با میزان بیان ژن‌های بررسی شده، آسپارتام به میزان ۱۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم موجب کاهش معنی‌داری در بیان ژن Bcl-2 و نیز افزایش معنی‌داری در بیان ژن‌های P53 و Caspase-3 در مقایسه با گروه کنترل شد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد آسپارتام در دوز بالا می‌تواند موجب اثرات منفی بر هیستومورفولوژی، هیستومورفومتري و بیان ژن‌های P53، Bcl-2 و Caspase-3 در تخمدان موش شود.

تاریخ دریافت: ۲۶ اردیبهشت ۱۴۰۰

تاریخ پذیرش: ۰۹ شهریور ۱۴۰۰

تاریخ انتشار: ۱۰ شهریور ۱۴۰۰

کلیدواژه‌ها:

آسپارتام، تخمدان، ژن P53، ژن Bcl-2، کاسپاس-۳

مقدمه

آن حدود ۲۰۰ برابر بیشتر از ساکارز است [۲]. آسپارتام در داخل دستگاه معده‌ای روده‌ای توسط استرازاها و پپتیدازها به تقریباً ۵۰ درصد فنیل آلانین، ۴۰ درصد اسیدآسپارتیک و ۱۰ درصد متانول هیدرولیز می‌شود [۲، ۴].

متانول و متابولیت‌های حاصل از آن یعنی فرم‌آلدئید و اسیدفرمیک که نتیجه متابولیسم اصلی متانول هستند با وارد شدن به گردش سیاهرگی باب و سپس اکسیده شدن متانول در کبد، موجب سمیت در اکثر سلول‌ها و بافت‌های بدن می‌شوند [۵]. متابولیسم متانول به فرم‌آلدئید و اسیدفرمیک، به

آسپارتام از جمله افزودنی‌های مواد غذایی و از گروه شیرین کننده‌ها بوده و پودری بی‌بو، شدیداً شیرین، سفیدرنگ و بلورین است که در ترکیب غذاهای رژیمی کم کالری و بدون قند به فراوانی وجود دارد [۱، ۲]. آسپارتام در میان افراد مبتلا به دیابت و اضافه وزن طرفداران بسیاری دارد، از این رو معروف‌ترین و پرمصرف‌ترین شیرین کننده مصنوعی لقب گرفته است [۱، ۲]. آسپارتام دی‌پپتیدی حاصل از ترکیب دو اسید آمینه اسیدآسپارتیک و فنیل آلانین است که در مقادیر یکسان با ساکاروز (قند طبیعی)، میزان کالری مشابهی (۴ کیلوکالری بر گرم) را تولید می‌کند، ولی شدت شیرین کنندگی

نویسنده مسئول:

دکتر حسن مروتی

نشانی: تهران، دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه.

تلفن: ۶۱۸۲۳۸۴ (۹۱۶) ۹۸+

رایانامه: hmorovati@ut.ac.ir

موجب تغییراتی در دستگاه‌های مختلف بدن شوند و با توجه به گزارش‌های اخیر که اثبات نموده‌اند آپاراتام موجب آسیب‌های بافتی و ایجاد فرایند آپوپتوز در دستگاه تولیدمثلی نر شده است [۱۰، ۹، ۱]، احتمالاً آپاراتام می‌تواند در دستگاه تولیدمثلی ماده نیز تغییراتی در ساختار بافتی و عملکردی و نیز بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوز ایجاد کند. بنابراین هدف از این مطالعه، بررسی اثرات آپاراتام بر پارامترهای بیوشیمیایی، هیستومورفولوژی، هیستومورفومتري، هیستوشیمی و همچنین بیان ژن‌های P53، Bcl-2 و Caspase-3 در تخمدان موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی ماده تیمار شده طی یک دوره ۹۱ روزه بود که تا به حال مورد بررسی قرار نگرفته‌اند.

روش بررسی

حیوانات آزمایشگاهی

برای انجام این پژوهش که به صورت یک کارآزمایی تجربی تصادفی شده شاهددار طرح‌ریزی شده بود، ۳۶ سر موش سفید کوچک آزمایشگاهی ماده بالغ از نژاد NMRI با وزن ۲۵-۳۰ گرم از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد. حیوانات در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی 50 ± 10 درصد در قفس‌های پلی‌اتیلنی مخصوص نگهداری موش با دسترسی آزاد به آب آشامیدنی نگهداری شدند. تمامی حیوانات به صورت برابر از پلیت‌های مخصوص موش تغذیه می‌کردند. کلیه ضوابط و شرایط نگهداری و انجام آزمایش‌ها روی حیوانات در این مطالعه طبق دستورالعمل‌های مصوب کمیته اخلاق دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران با کد اخلاق ۳۰۰۲۹/۶/۲۱ صورت پذیرفت. قبل از شروع دوره تیمار، به منظور سازگاری با شرایط جدید محیط، حیوانات به مدت دو هفته نگهداری شدند و بعد از نشان‌دار کردن، موش‌های ماده به طور تصادفی به چهار گروه ۹ تایی تقسیم شدند و به مدت ۹۱ روز متوالی آپاراتام (A5139-0، 5G, Sigma-Aldrich, Cas No: 22839-47-0) را به صورت خوراکی از طریق گاوژ دریافت کردند.

گروه‌بندی حیوانات

۳۶ سر موش سفید کوچک آزمایشگاهی ماده به صورت تصادفی به چهار گروه ۹ تایی به ترتیب زیر تقسیم شدند. البته قبل از گروه‌بندی موش‌ها، در ابتدای دوره، برای حصول اطمینان از سالم بودن سیکل جنسی، اسمیر واژینال به مدت چهار روز تهیه و با میکروسکوپ بررسی شد و سپس در صورت سالم بودن موش‌ها توانستند به صورت تصادفی در گروه‌ها قرار بگیرند. در ادامه، موش‌های ماده پس از تعیین وزن اولیه، با محلول ثبوت بوئن نشان‌دار شده و گروه‌بندی انجام شد.

سلول‌های کبدی آسیب وارد کرده و با افزایش سطح $NADH^1$ و تشکیل آنیون سوپراکسید و پراکسید هیدروژن همراه است که ممکن است در پراکسیداسیون لیپیدی مؤثر باشد [۶]. قرار گرفتن در معرض متانول به عنوان یک محصول جانبی آپاراتام، باعث آسیب به غشای میتوکندریایی شده و منجر به بیش‌تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و ایجاد استرس اکسیداتیو، القای شکستگی در DNA، غیرفعال شدن پروتئین‌ها و آپوپتوز می‌شود [۷، ۲]. به تازگی، بسیاری از مطالعات تجربی تأیید کرده‌اند که آپاراتام موجب افزایش خطر ابتلا به لنفوم، لوسمی، آسیب دستگاه تناسلی و ادراری، آسیب دستگاه عصبی مرکزی و ایجاد فرایند آپوپتوز می‌شود [۱۰-۸].

آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، فرایند فیزیولوژیکی است که نقشی کلیدی در حفظ همئوستاز بافت‌های بالغ و نیز تنظیم تکامل سیستم ایمنی در جریان رشد و تومورزایی ایفا می‌کند. آپوپتوز نوعی مرگ سلولی است که در آن سلول‌های میزبان، به دنبال فعالیت برنامه‌ریزی شده و به صورت آشناری از وقایع، از بین می‌روند. این فعالیت توسط مجموعه‌ای از ژن‌ها کنترل می‌شود [۱۱]. این پدیده در شرایط طبیعی باعث می‌شود سلول‌های پیر، آسیب‌دیده، اضافی و مضر حذف شوند که برای تکامل و ترمیم بافت ضروری است. هرگونه اختلال در روند آپوپتوز، کاهش یا افزایش نامتعرف مرگ سلولی و درنهایت بیماری را موجب می‌شود [۱۱، ۱۲]. مسیرهای درگیر در تحریک فرایند آپوپتوز را به دو دسته مسیر درونی (میتوکندریایی) و مسیر بیرونی (رسپتورهای مرگ) تقسیم می‌کنند. در شرایط آسیب DNA و اختلالات فاکتورهای رشد، مسیر داخلی (مسیر تحت کنترل پروتئین Bcl2) فعال می‌شود. در صورت کاهش بیان پروتئین Bcl2 در غشای میتوکندری‌ها، تولید و سنتز سیتوکروم‌ها افزایش می‌یابد که به ایجاد تغییر در نفوذپذیری و فعالیت غشای میتوکندری‌ها انجامیده و سیتوکروم‌های C درون سیتوپلاسم آزاد می‌شوند. Caspase-3 به عنوان آخرین فاکتور در فرایند آپوپتوز به شمار می‌رود. این ژن در حقیقت مسئول تخریب پروتئین‌ها در سلول‌های در حال آپوپتوز، شکست DNA در سلول‌ها و حتی فشردگی کروماتین در سلول‌هاست که در ادامه منجر به مرگ سلول خواهد شد. پروتئین P53 یا به عبارتی پروتئین مهارکننده توموری به عنوان محافظ یکپارچگی ژنومی در سلول‌های ژرمینال شناخته می‌شود. از میان عملکردهای فراوان پروتئین P53، مهار رشد غیرطبیعی سلول‌ها و آپوپتوز در درجه اول اهمیت قرار دارد [۱۳]. بررسی‌ها در گذشته ثابت کرده‌اند که آپاراتام از طریق افزایش گونه‌های اکسیژن فعال سبب آغاز فرایند آپوپتوز می‌شود [۱۰، ۶].

از آنجایی که شیرین‌کننده‌های مصنوعی همانند آپاراتام، ساخارین و سیکلامات توانسته‌اند با افزایش رادیکال‌های آزاد

1. 1,4-Dihydronicotinamide adenine dinucleotide

اندازه‌گیری تستوسترون به روش الایزا و ایمونواسی، بر اساس اتصال رقابتی تستوسترون نمونه با تستوسترون کونژوگه طراحی و اجرا شد. نمونه‌های سرمی جهت تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانت تام سرم (TAC)، با استفاده از روش توانایی پلاسما در احیای یون‌های فریک به فرو (FRAP) که براساس توان احیاءکنندگی آهن سه‌ظرفیتی است، مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند [۹]. جهت تعیین پراکسیداسیون چربی‌ها (MDA)، سطح تولید مالون‌دی‌آلدئید (MDA) به عنوان شاخص ارزیابی این فرایند بر اساس واکنش با اسیدتیوباریتوریک (TBA) ارزیابی شد [۹].

بررسی‌های هیستومورفولوژی، هیستومورفومتري و هیستوشیمی

پس از پایان دوره تیمار، اقدام به نمونه‌برداری از موش‌ها شد که بدین منظور بعد از آسان‌کشی موش‌ها و بازکردن محوطه شکمی، تخمدان سمت چپ برای برش‌های پارافینی به مدت ۷۲-۴۸ ساعت در داخل محلول ثبوتی بوئن قرار داده شد و تخمدان سمت راست برای بررسی‌های بیوشیمیایی و هیستوشیمی در داخل ازت مایع قرار گرفت. به منظور تهیه برش‌های پارافینی سریالی، تخمدان‌ها پس از تثبیت، به ترتیب وارد مراحل آبگیری، شفاف‌سازی، آغشتگی با پارافین، قالب‌گیری، برش بافت به صورت سریالی با ضخامت ۵-۷ میکرومتر و ثابت‌کردن مقاطع بافتی روی لام شده و سپس مراحل رنگ‌آمیزی انجام شد. برای مطالعات هیستولوژی شامل هیستومورفولوژی و هیستومورفومتري، رنگ‌آمیزی معمولی هماتوکسیلین اتوزین مورد استفاده قرار گرفت. در همین راستا جهت مطالعات هیستوشیمی نیز از رنگ‌آمیزی‌های تری‌کروم ماسون و پرپودیک اسید شیف (PAS) استفاده شد. مطالعات هیستومورفولوژی شامل بررسی پیوستگی ساختار بافتی از نظر ظاهری، پراکندگی، وسعت، ادم، ازهم‌پاشیدگی و حالات غیرنرمال بود. مطالعات هیستومورفومتري نیز بر اساس انواع فولیکول‌های در حال رشد و آترزی شده صورت گرفت. بدین منظور فولیکول‌ها به دسته‌های آغازین (بدوی)، اولیه، ثانویه، ثالث، گراف، آترزی شده و جسم زرد تقسیم‌بندی شدند. رنگ‌آمیزی با پرپودیک اسید شیف جهت مشخص کردن مواد کربوهیدرات در سیتوپلاسم سلول‌ها استفاده شد و رنگ‌آمیزی تری‌کروم ماسون جهت تعیین تراکم رشته‌های همبندی و کلاژن و در راستای آن میزان فیبروزی شدن بافت تخمدان مورد مطالعه قرار گرفت [۱۵].

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بی‌درنگ یا کمی (Real-Time PCR)

برای بررسی بیان ژن‌های آپوپتوتیک، ابتدا مقداری از بافت تخمدان به وسیله تیغ جراحی جدا و خرد شد و سپس توسط محلول RNX-Plus شرکت سیناژن، استخراج RNA انجام گرفت. همچنین از کیت RevertAid First Strand cDNA Synthe- sis شرکت فرمنتاز برای سنتز cDNA استفاده شد. ابتدا مقدار معینی از RNA ژن مربوطه با یک میکرولیتر Oligo dT و یک

گروه اول) کنترل: حیوانات این گروه به مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی به صورت خوراکی از طریق گاواژ روزانه دریافت کردند.

گروه دوم) آسپارتام ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم یا دوز پایین آسپارتام: این گروه آسپارتام را به میزان ۴۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت خوراکی از طریق گاواژ روزانه دریافت کردند.

گروه سوم) آسپارتام ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم یا دوز متوسط آسپارتام: این گروه آسپارتام را به میزان ۸۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت خوراکی از طریق گاواژ روزانه دریافت کردند.

گروه چهارم) آسپارتام ۱۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم یا دوز بالای آسپارتام: این گروه آسپارتام را به میزان ۱۶۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت خوراکی از طریق گاواژ روزانه دریافت کردند.

سرم فیزیولوژی و آسپارتام در همه گروه‌ها به روش خوراکی از طریق گاواژ و به مدت ۹۱ روز و هر ۲۴ ساعت تجویز شد. میزان و دوزهای انتخاب‌شده برای آسپارتام بر اساس مطالعات و پژوهش‌های جدیدی که به تازگی چاپ شده بودند، برگزیده شد [۱۰، ۱۴].

نمونه‌برداری

یک روز پس از پایان دوره تیمار ۹۱ روزه، موش‌ها دوباره توسط ترازوی دقیق آزمایشگاهی در حد میلی‌گرم توزین شده و کلیه حیوانات موجود در چهار گروه ذکر شده با مخلوط کتامین و زایلازین بیهوش شدند. سپس نمونه‌های خون با وارد کردن سرنگ‌های استریل از خلف زائده مانوبریوم جناغ و از قسمت بطن راست قلب موش‌ها جمع‌آوری و آسان‌کشی شد. نمونه‌های خونی در یخ نگهداری شده با میانگین ۰/۵ میلی‌لیتری از هر موش، در لوله‌های اپندورف ۲ میلی‌لیتری ریخته شده و پس از لخته شدن خون، جهت استحصال سرم، نمونه‌ها با سانتریفیوژ یخچال‌دار در ۳۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. نمونه‌های سرم جدا شده به لوله‌های اپندورف یک میلی‌لیتری منتقل و تا زمان انجام آزمایش‌های هورمونی و سرمی در دمای ۷۰- درجه نگهداری شدند [۹]. در مورد تخمدان‌ها نیز تخمدان راست برای کارهای هیستوشیمی و اکسیدانی و تخمدان چپ برای مطالعات هیستومورفولوژی و هیستومورفومتري به کار گرفته شد. برای مشخص کردن تغییرات وزن بدن، اختلاف میانگین وزن نهایی از میانگین وزن ابتدایی به دست آمد.

ارزیابی‌های بیوشیمیایی هورمونی

اندازه‌گیری سطح هورمون تستوسترون با استفاده از کیت

جدول ۱. توالی و تعداد پرایمر ژن های P53, Bcl-2 و Caspase-3 و ژن کنترل داخلی GAPDH

اسامی ژن ها	توالی	اندازه (جفت باز)
P53	FWD: ACATAGTGTGGTGGTGCCT REV: ACCTCAAAGCTGTTCCGTCC	۱۵۲
Caspase-3	FWD: AGTTGGACCCACCTTGTGAG REV: AGTCTGCAGTCTCTCCACAT	۲۹۸
Bcl-2	FWD: CTGGTGGACAACATCGCTCTG REV: GGTCTGCTGACCTCACTTGTG	۲۲۶
GAPDH	FWD: GAACATCATCCCTGCATCCA REV: CCAGTGAGCTTCCCGTTCA	۶۸

مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

با توجه به کمی و پیوسته بودن داده ها، تعداد گروه های مستقل مورد ارزیابی و نیز متعاقب اطمینان از نرمال بودن توزیع داده ها توسط آزمون کولموگروف اسمیرنوف، ارزیابی آماری داده های این مطالعه با استفاده از بسته نرم افزاری SPSS نسخه ۱۹ (SPSS Inc, version 19.00, California, USA) انجام پذیرفت و تمامی نتایج بر اساس میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شدند. جهت مقایسه بین گروه ها آنالیز واریانس یک طرفه و به دنبال آن تست های مقایسه ای چندگانه توکی مورد استفاده قرار گرفت. مقدار $P < 0.05$ برای تعیین سطح معنی داری بین گروه ها در نظر گرفته شد [۱۴].

یافته ها

ارزیابی تغییرات وزن بدن

بررسی میانگین تغییرات وزن بدن در گروه های مختلف آزمایشی نشان داد در هر سه گروه دریافت کننده آسپارتام نسبت به گروه کنترل تغییرات وزنی معنی داری ($P < 0.05$) نشد (جدول شماره ۲).

بررسی های بیوشیمیایی

ارزیابی حاصل از سنجش هورمون تستوسترون

بررسی میزان هورمون تستوسترون در گروه های مختلف نشان داد در گروه های دریافت کننده آسپارتام تغییرات معنی داری ($P < 0.05$) در سطح هورمون تستوسترون در مقایسه با گروه کنترل رخ نداده است (جدول شماره ۲).

سنجش میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی تام سرم (TAC)

سنجش میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی تام سرم در گروه های مختلف نشان داد سطح TAC در گروه دریافت کننده آسپارتام به میزان ۱۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن نسبت به گروه کنترل دارای کاهش معنی داری ($P < 0.05$) بوده است (جدول شماره ۲).

میکرولیتر پرایمر Random Hexamer ترکیب شده و به حجم ۱۲ میکرولیتر رسید و پس از سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد آنکوبه شد و محلولی شامل ۴ میکرولیتر 5x Reaction Buffer، یک میکرولیتر Ribolock RNase Inhibitor، ۲ میکرولیتر 10Mm dNTP Mix و یک میکرولیتر Reverse M-Mulv به آن اضافه شد و پس از سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و ۱۲۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد قرار گرفت. در انتها یک گرمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه به محلول وارد شد. برای انجام Real-time PCR از ژن های P53, Bcl-2 و Caspase-3 و ژن کنترل داخلی GAPDH استفاده شد. حجم نهایی PCR برای هر ژن ۱۵ میکرولیتر شامل ۷/۵ میکرولیتر SYBR Green Master Mix، ۰/۴ میکرولیتر پرایمر F، ۰/۴ میکرولیتر پرایمر R، ۵ میکرولیتر cDNA و ۱/۷ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز بود. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه از شرکت سیناژن تهیه شد که توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول شماره ۱ ارائه شده است [۱۶، ۱۷، ۱۸]. هر سه ژن بایستی همزمان در دستگاه تکثیر شود، از این جهت بایستی پرایمرها را طوری طراحی کرد که در یک شرایط دمایی و زمانی تکثیر شوند. دستورالعمل حرارتی برای انجام این Real-time PCR به شرح زیر بهینه شد:

دنا تورا سیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه، ۴۰ سیکل تکثیری شامل مرحله دنا تورا سیون در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۵ ثانیه، دمای اتصال برای پرایمرهای P53, Bcl-2, Caspase-3 به ترتیب ۶۸، ۶۸، ۵۸ و ۶۱ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه و در نهایت تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه انجام شد. برای پرایمر Bcl-2 ۳۷ سیکل و برای پرایمرهای P53, Caspase-3 و GAPDH به ترتیب ۳۵، ۴۰ و ۳۳ سیکل انجام شد. پس از اتمام واکنش تکثیر، برای هر واکنش PCR یک نمودار رسم و سپس بر این اساس CT تعیین شد. بیان نسبی ژن های P53, Bcl-2 و Caspase-3 در موش های گروه ها با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد.

جدول ۲. مقایسه میانگین تغییرات وزن بدن و آزمایشات بیوشیمیایی تستوسترون، ظرفیت آنتی اکسیدانی تام سرم و مالون دی آلدئید در گروه‌های مختلف آزمایشی

میانگین $\pm$ انحراف معیار				پارامترها
گروه کنترل	۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم	۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم	۱۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم	
۶/۴۹ $\pm$ ۱/۴ ^a	۵/۹۶ $\pm$ ۱/۸۴ ^a	۶/۰۴ $\pm$ ۱/۹۷ ^a	۵/۹۷ $\pm$ ۲/۰۹ ^a	تغییرات وزن بدن (گرم)
۰/۱۶ $\pm$ ۰/۰۲ ^a	۰/۱۵ $\pm$ ۰/۰۱ ^a	۰/۱۶ $\pm$ ۰/۰۱ ^a	۰/۱۸ $\pm$ ۰/۰۱ ^a	میزان تستوسترون (نانوگرم بر میلی لیتر)
۰/۸۷ $\pm$ ۰/۰۴ ^a	۰/۸۹ $\pm$ ۰/۰۶ ^a	۰/۸۲ $\pm$ ۰/۰۵ ^a	۰/۵۸ $\pm$ ۰/۰۳ ^b	میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی تام سرم (نانومول بر میلی گرم)
۱/۶۵ $\pm$ ۰/۲۹ ^a	۱/۶۶ $\pm$ ۰/۲۳ ^a	۱/۹۶ $\pm$ ۰/۲۹ ^a	۲/۹۷ $\pm$ ۰/۴۹ ^b	میزان مالون دی آلدئید (نانومول بر میلی گرم)

مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

حروف لاتین غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار در هر ستون است ($P < 0.05$).

سنجش میزان مالون دی آلدئید (MDA)

بررسی میزان پراکسیداسیون چربی‌ها در حیوانات نشان داد تجویز آسپارتام در گروه دریافت کننده آسپارتام به میزان ۱۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن باعث افزایش معنی داری در میزان MDA ($P < 0.05$) در مقایسه با گروه کنترل شده است (جدول شماره ۲).

بررسی‌های هیستومورفولوژی

مشاهدات هیستومورفولوژی توسط میکروسکوپ نوری از برش‌های سریالی بافت تخمدان نشان داد دریافت آسپارتام به میزان ۱۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن موجب ایجاد نشانه‌هایی از تخریب بافت تخمدان و ایجاد به هم ریختگی و از هم گسستگی سلول‌های تخمدانی نسبت به گروه‌های دیگر به خصوص گروه کنترل و گروه دریافت کننده آسپارتام به میزان ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن شده است. همچنین در گروه دریافت کننده آسپارتام به میزان ۱۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن، آسیب‌های هیستومورفولوژی و ظاهری تخمدان مانند دژنراسیون اووسیت، مهاجرت هسته اووسیت و واکنش شدن در فولیکول‌های ثانویه آترزی شده به صورت شدیدتری مشاهده شد. این در حالی است که آسیب‌های هیستومورفولوژی تخمدان در فولیکول‌های ثالث و گراف آترزی شده همانند ریزش سلول‌های گرانولوزا، احتقان عروقی و در نهایت پاره شدن دیواره فولیکولی نیز در گروه دریافت کننده آسپارتام به میزان ۱۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن نسبت به سایر گروه‌ها بیشتر بود (تصویر شماره ۱، رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزین).

بررسی‌های هیستوشیمیایی

با توجه به نتایج هیستوشیمی رنگ آمیزی تری کروم ماسون در تمامی گروه‌های دریافت کننده آسپارتام، مشخص شد که هیچ تفاوتی بین این گروه‌ها و گروه کنترل از نظر میزان رشته‌های کلاژن و در راستای آن فیبروزی شدن بافت تخمدان به ویژه در اووسیت‌ها و ضخامت تونیکا آلبوژینا (سپید پرده) وجود ندارد

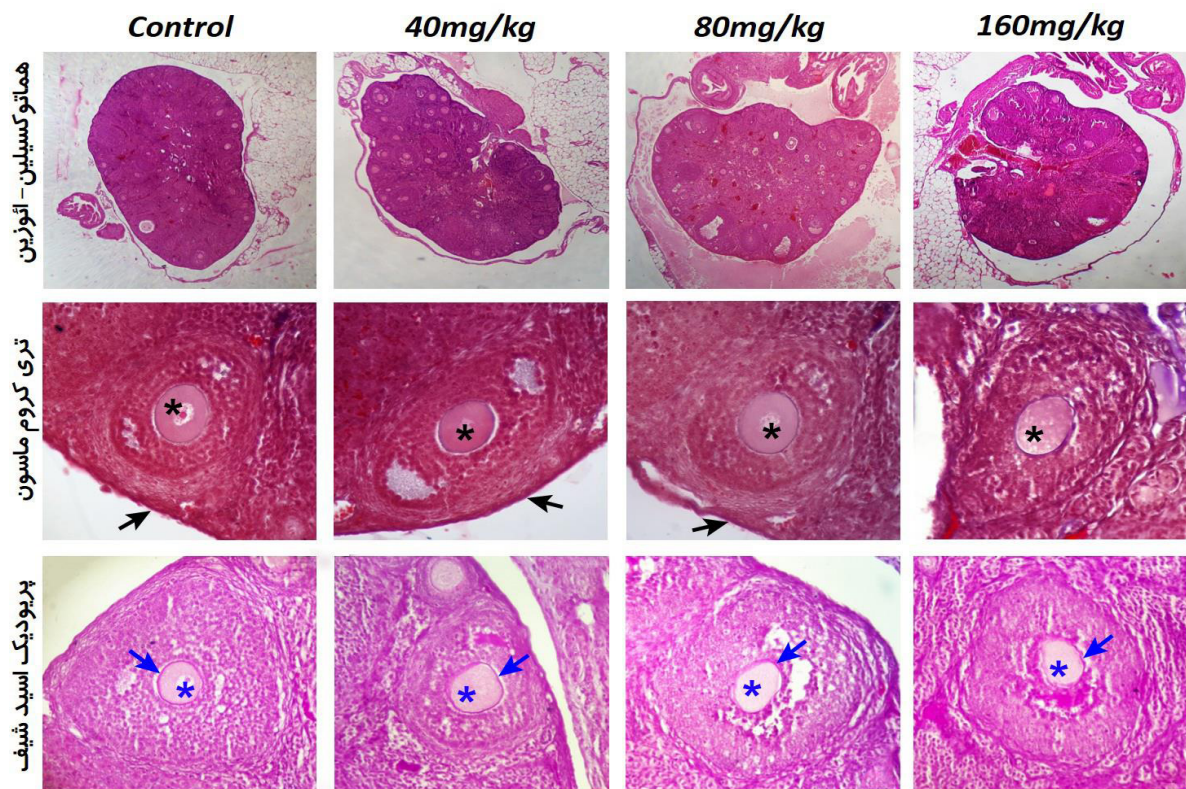
و مقاطع رنگ آمیزی شده با تری کروم ماسون تفاوت چندانی با یکدیگر نشان ندادند (تصویر شماره ۱، رنگ آمیزی تری کروم ماسون). بر اساس تحلیل هیستوشیمیایی نمونه‌های بافتی رنگ آمیزی شده توسط پریودیک اسید شیف، در گروه‌های دریافت کننده آسپارتام نیز تفاوتی در واکنش PAS و میزان مواد کربوهیدراته در داخل سیتوپلاسم سلول‌ها به خصوص در سلول اووسیت و ضخامت زونا پلوسیدا (منطقه شفاف) در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نشد (تصویر شماره ۱، رنگ آمیزی پریودیک اسید شیف).

بررسی‌های هیستومورفومتری

بررسی هیستومورفومتری بافت تخمدان بین گروه‌های آزمایشی دریافت کننده آسپارتام و کنترل نشان داد میانگین تعداد فولیکول‌های بدوی، اولیه، ثانویه، ثالث و گراف در گروه دریافت آسپارتام به میزان ۱۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن نسبت به گروه کنترل دارای کاهش معنی داری ($P < 0.05$) بوده است. همچنین این گروه از نظر میانگین تعداد جسم زرد نیز کاهش معنی داری ($P < 0.05$) نسبت به گروه کنترل از خود نشان داد. در همین راستا در گروه دریافت آسپارتام به میزان ۱۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن، پارامتر مربوط به میانگین تعداد فولیکول‌های آترزی شده ثانویه، ثالث و گراف دارای افزایش معنی داری ($P < 0.05$) از نظر میانگین فولیکول‌های آترزی نسبت به گروه کنترل بود (جدول شماره ۳).

ارزیابی سطح بیان ژن

به منظور ارزیابی سطح بیان ژن‌های Bcl-2، P53 و Cas-3 فرایند Real-time PCR برای این ژن‌ها انجام شد. این بررسی نشان داد دریافت طولانی مدت آسپارتام در گروه دریافت کننده آسپارتام به میزان ۱۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن موجب افزایش معنی داری ($P < 0.05$) در سطح بیان ژن P53 در مقایسه با گروه کنترل شده است (تصویر شماره ۲). سطح بیان ژن Caspase-3 تنها در گروه دریافت کننده آسپارتام به میزان



تصویر ۱. نمای کلی تخمدان در گروه‌های مختلف آزمایشی رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین آئوزین (بزرگنمایی $\times 40$)، گروه کنترل؛ که در آن حالت طبیعی بافت تخمدان همراه با فولیکول‌های مختلف در حال رشد دیده می‌شود. گروه دریافت‌کننده آسپاراتام به میزان ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن؛ فولیکول‌های سالم و آترتیک در مراحل مختلف دیده می‌شود. گروه دریافت‌کننده آسپاراتام به میزان ۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن؛ همانند گروه قبلی بوده با این تفاوت که فولیکول‌های سالم کمی کاهش پیدا کرده و فولیکول‌های آترزی شده نماد بیشتری دارند. گروه دریافت‌کننده آسپاراتام به میزان ۱۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن؛ به هم‌ریختگی بافت تخمدانی مشاهده شده و فولیکول‌های آترزی شده بیشتر شده و در مراحل مختلف دیده می‌شوند. فولیکول‌های سالم بیشتر در مرحله بدوی هستند.

رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون (بزرگنمایی $\times 400$)؛ برش عرضی از فولیکول‌های تخمدان در گروه‌های مختلف آزمایشی مربوط به رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون. گروه کنترل در بافت تخمدان و به خصوص در اووسیت (ستاره سیاه‌رنگ) و ضخامت تونیکا آلبوزینا (پیکان سیاه‌رنگ) دارای میزان طبیعی الیاف کلژن بوده و در این گروه عدم فیبروزی شدن بافت تخمدان مشاهده شد. در مقابل در تمامی گروه‌های دریافت‌کننده آسپاراتام در قیاس با گروه کنترل، در بافت تخمدان به‌ویژه در اووسیت (ستاره سیاه‌رنگ) و تونیکا آلبوزینا (پیکان سیاه‌رنگ) تغییری در میزان تراکم الیاف کلژن مشاهده نشد.

رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف (بزرگنمایی $\times 400$)؛ برش عرضی از فولیکول‌های تخمدان در گروه‌های مختلف آزمایشی مربوط به رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف. گروه کنترل در بافت تخمدان و به خصوص در اووسیت (ستاره آبی‌رنگ) و منطقه شفاف (پیکان آبی‌رنگ) شاهد میزان مواد کربوهیدرات طبیعی و واکنش PAS مثبت بود در تمامی گروه‌های دریافت‌کننده آسپاراتام نیز در بافت تخمدان به‌ویژه در سلول اووسیت (ستاره آبی‌رنگ) و منطقه شفاف (پیکان آبی‌رنگ) میزان کربوهیدرات طبیعی و واکنش PAS مثبت وجود داشت.

می‌تواند پیامد متابولیت‌های حاصل از هیدرولیز آسپاراتام طی فرایند گوارش و جذب این متابولیت‌ها در بدن باشد [۴، ۵]. سمیت ناشی از مصرف خوراکی آسپاراتام عمدتاً به متابولیت‌های حاصل از گوارش و جذب روده‌ای این ماده مرتبط است که طی متابولیسم آسپاراتام در داخل دستگاه معده‌ای روده‌ای توسط استرازها و پپتیدازها، این ماده به فنیل آلانین، اسیدآسپارتیک و متانول هیدرولیز می‌شود [۴، ۵]. متانول برای اکثر بافت‌های بدن مخرب بوده و نیز متابولیت‌های حاصل از آن یعنی فرمالدئید و اسیدفرمیک نیز موجب سمیت در بیشتر سلول‌ها و بافت‌های بدن می‌شوند [۵]. متانول از طریق سیاهرگ باب وارد کبد شده و توسط آنزیم الکل دهیدروژناز به فرمالدئید اکسید می‌شود که این ماده موجب سمیت در اکثر سلول‌ها و بافت‌های بدن می‌شود [۵].

۱۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن دارای افزایش معنی‌داری ($P < 0/05$) در مقایسه با گروه کنترل بود و گروه‌های دریافت‌کننده آسپاراتام به میزان ۴۰ و ۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن با گروه کنترل فاقد اختلاف معنی‌داری ($P < 0/05$) بودند (تصویر شماره ۲). از سوی دیگر در گروه‌های دریافت‌کننده آسپاراتام، سطح بیان ژن Bcl-2 تنها در گروه دریافت‌کننده آسپاراتام به میزان ۱۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری ($P < 0/05$) نشان داد (تصویر شماره ۲).

بحث

می‌توان چنین بیان کرد که نتایج به‌دست‌آمده در مورد تأثیرات مصرف آسپاراتام بر پارامترهای موجود در این مطالعه

جدول ۳. مقایسه تغییرات هیستومورفومتریک تخمدان در گروه‌های مختلف آزمایشی

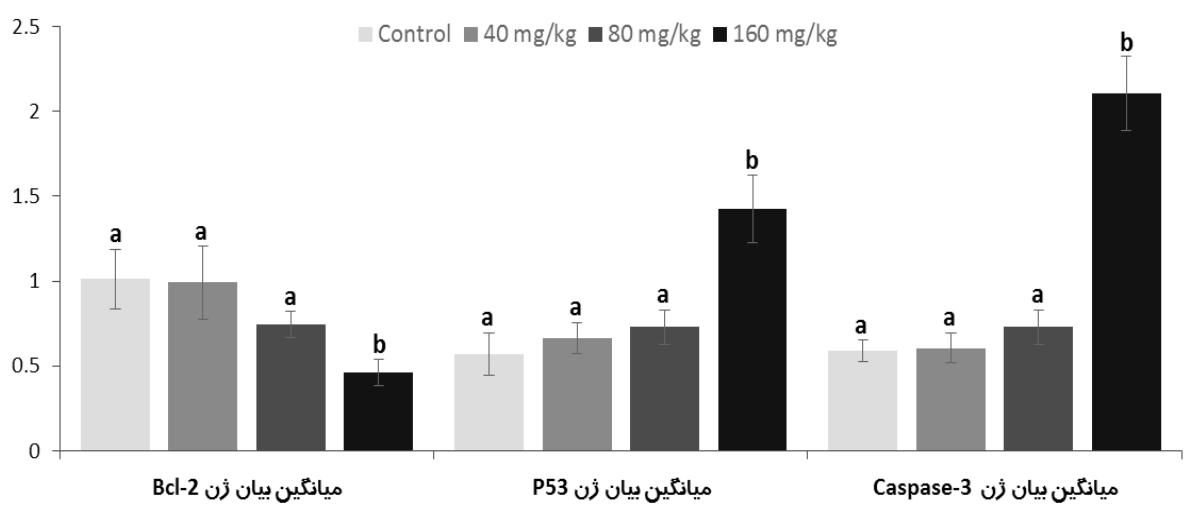
میانگین $\pm$ انحراف معیار				پارامترها
گروه کنترل	۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم	۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم	۱۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم	
۲۲۱/۰ $\pm$ ۷/۸۴ ^a	۲۲۳/۰ $\pm$ ۸/۸۰ ^a	۲۱۴/۶ $\pm$ ۹/۷۶ ^a	۱۷۰/۴ $\pm$ ۱۷ ^a	تعداد فولیکول‌های بدوی
۱۲۱/۰ $\pm$ ۴/۶۹ ^a	۱۱۸/۴ $\pm$ ۵/۶۸ ^a	۱۱۴/۲ $\pm$ ۴/۲۰ ^a	۸۳/۴ $\pm$ ۶/۵۰ ^b	تعداد فولیکول‌های اولیه
۲۲/۲ $\pm$ ۱/۳۰ ^a	۲۲/۶ $\pm$ ۱/۱۴ ^a	۲۰/۶ $\pm$ ۱/۱۴ ^a	۱۴/۸ $\pm$ ۱/۴۸ ^b	تعداد فولیکول‌های ثانویه
۵/۸ $\pm$ ۰/۴۴ ^a	۵/۸ $\pm$ ۰/۸۳ ^a	۵/۰ $\pm$ ۰/۷۰ ^a	۳/۲ $\pm$ ۰/۴۳ ^b	تعداد فولیکول‌های ثالث
۳/۴ $\pm$ ۰/۵۴ ^a	۳/۲ $\pm$ ۰/۸۳ ^a	۲/۸ $\pm$ ۰/۴۴ ^a	۱/۴ $\pm$ ۰/۵۴ ^b	تعداد فولیکول‌های گراف
۵/۲ $\pm$ ۰/۸۳ ^a	۵/۴ $\pm$ ۱/۱۴ ^a	۴/۸ $\pm$ ۰/۸۳ ^a	۱/۸ $\pm$ ۰/۸۳ ^b	تعداد جسم زرد
۳۶/۶ $\pm$ ۱/۳۴ ^a	۳۵/۸ $\pm$ ۱/۴۸ ^a	۳۸/۲ $\pm$ ۱/۳۰ ^a	۵۲/۲ $\pm$ ۲/۶۸ ^b	تعداد فولیکول‌های آنزیمی شده ثانویه، ثالث و گراف


 مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم
حروف لاتین غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در هر ستون است ($P < 0.05$).

[۱۸]. همچنین در بررسی دیگری مشخص شده است که مصرف خوراکی آسپارتام روزانه به میزان ۱۴ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در طی دوره ارگانوژنز موش صحرایی، باعث کاهش وزن بدن جنین و نیز کاهش وزن جفت می‌شود [۱۹]. در برخی دیگر از مطالعات بیان شده است که آسپارتام یک آنزیم روده‌ای بنام آلکالین فسفاتاز روده‌ای (IAP) را مهار می‌کند که این آنزیم می‌تواند از بروز چاقی، دیابت نوع ۲ و سندرم متابولیک جلوگیری کند. یافته‌های این آزمایشات نشان داد موش‌هایی که از آب حاوی آسپارتام استفاده می‌کردند در مقایسه با موش‌هایی که از آب بدون آسپارتام استفاده می‌کردند، دچار اضافه‌وزن بیشتری شدند [۲۰]. همچنین در تحقیق دیگری بیان شده

مقدار نسبتاً کمی آسپارتام قادر است به طور قابل توجهی باعث افزایش سطح متانول در خون شود که گفته می‌شود متابولیسم متانول به فرم آلدئید و اسیدفرمیک، با تشکیل آنیون سوپراکسید و پراکسید هیدروژن همراه است [۶]. آنیون سوپراکسید و پراکسید هیدروژن باعث آسیب به غشای میتوکندریایی شده و با بیش تولید گونه‌های فعال اکسیژن موجب ایجاد استرس اکسیداتیو و القای آپوپتوز می‌شود [۶، ۷].

مشخص شده است که مصرف آسپارتام به روش خوراکی بر کاهش وزن در انسان تأثیر دارد و این کاهش وزن به این دلیل است که آسپارتام باعث کاهش نوروپپتید ۷ مغزی می‌شود که نقش بسیار حیاتی در متابولیسم و سوخت و ساز بدن دارد



 مجله
دانشگاه علوم پزشکی قم

تصویر ۲. مقایسه میزان بیان ژن‌های Bcl-2، P53 و Caspase-3 در مقایسه با GAPDH در گروه‌های مختلف آزمایشی داده‌ها براساس میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده‌اند. حروف لاتین غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها در سطح $P < 0.05$ است.

۱۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن نسبت به گروه کنترل افزایش یافته بود، ولی این افزایش از نظر آماری معنی دار نبود.

مشاهدات هیستومورفولوژی توسط میکروسکوپ الکترونی و نوری در پژوهش‌های پیشین نشان می‌دهند که قرار گرفتن در معرض آسپارتام و متابولیت‌های حاصل از آن مانند فرم‌آلدئید موجب تغییر ساختار بافتی تخمدان از قبیل به هم‌ریختگی سلول‌های بینابینی بین فولیکول‌های در حال رشد، دژنراسیون اووسیت، ریزش و پیکنوز شدن هسته سلول‌های گرانولوزا می‌شود [۲۴، ۲۵]. همچنین در مطالعه دیگری بیان شده است که فرم‌آلدئید موجب احتقان عروقی و ادم بینابینی در تخمدان می‌شود که این نتایج با یافته‌های این مطالعه در موش‌های دریافت‌کننده آسپارتام به میزان ۱۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن کاملاً مطابقت دارد [۲۶]. مطالعات هیستومورفومتریک پیشین اثبات کرده‌اند که قرار گرفتن در معرض فرم‌آلدئید موجب کاهش اندازه و تعداد انواع فولیکول‌های در حال رشد (فولیکول‌های بدوی، اولیه، ثانویه، ثالث و گراف) و جسم زرد نسبت به گروه کنترل شده است، در حالی که تعداد فولیکول‌های آترزی شده نسبت به گروه کنترل به وضوح افزایش یافته بود که با نتایج گروه دریافت‌کننده آسپارتام به میزان ۱۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن در مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد [۲۵-۲۷].

در شرایطی که چرخه متابولیسمی دچار اختلال می‌شود متعاقباً متابولیسم سلولی نیز تغییر می‌کند. در این شرایط، سلول‌ها از دیگر منابع غذایی موجود در محیط برای سوخت و ساز استفاده می‌کنند. نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی پرئودیک اسید شیف در این مطالعه نشان داد در بافت تخمدان موش‌های دریافت‌کننده آسپارتام، واکنش پرئودیک اسید شیف (ذرات کربوهیدرات) در سلول‌های اووسیت و ضخامت منطقه شفاف تفاوتی با گروه کنترل نداشت. این نتایج حاکی از عدم اختلال در سوخت و ساز سلول‌های بافت تخمدان تحت تأثیر دریافت آسپارتام بود که با پژوهش‌های دیگری در این زمینه که در آن فرم‌آلدئید موجب افزایش واکنش پرئودیک اسید شیف در منطقه شفاف شده بود، همسو نیست [۲۷]. همچنین رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون در مطالعه حاضر نشان داد میزان رشته‌های کلاژن در اووسیت و ضخامت تونیکا آلبوزینا در گروه‌های دریافت‌کننده آسپارتام تغییر قابل مشاهده‌ای در مقایسه با گروه کنترل نشان نداد. این در حالی است که یافته‌های مطالعات قبلی نیز نشان می‌دهند مصرف آسپارتام موجب تغییر در میزان رشته‌های کلاژن در بافت‌های موش سفید کوچک آزمایشگاهی نشده است [۱۵].

استرس اکسیداتیو نقشی کلیدی در ایجاد و توسعه آپوپتوز بافتی ایفا می‌کند. بر اساس وضعیت سرکوب آنتی‌اکسیدانی در حیوانات مواجهه‌یافته با آسپارتام و در نظر گرفتن آپوپتوز حاصل از استرس اکسیداتیو می‌توان استنباط کرد که افزایش آپوپتوز در گروه مواجهه‌یافته با آسپارتام به میزان ۱۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم

است که آسپارتام مسیر تشخیص مصرف ماده غذایی را در مغز غیرفعال می‌کند که در این راستا با انجام ام‌آر‌آی‌های عملکردی مغز نشان داده شده که سرکوب اشتها به دلیل مصرف آسپارتام اتفاق نمی‌افتد و به همین دلیل به دنبال آن پیغام سیری به مغز ارسال نشده و در نتیجه فرد همچنان به خوردن غذا ادامه می‌دهد [۲۱]. در این مطالعه مشخص شد که آسپارتام موجب تغییرات وزن بدن در گروه‌های دریافت‌کننده آسپارتام نمی‌شود که با نتایج تحقیقات اشاره‌شده هم‌خوانی ندارد.

به منظور دستیابی به بینشی جهت درک بهتر تعادل بین اکسیدان / آنتی‌اکسیدان در محیط داخلی بدن، اندازه‌گیری میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام و مالون‌دی‌آلدئید می‌تواند بسیار کاربردی باشد [۱۵]. ارتباط بین آنزیم‌های دخیل در پاکسازی گونه‌های فعال اکسیژن با یکدیگر باعث حفاظت از بافت‌ها و سلول‌های بدن در برابر اثرات مخرب اکسیدان‌ها می‌شود. بنابراین حتی تغییرات بسیار اندک در میزان طبیعی آنزیم‌های ذکرشده می‌تواند منجر به تخریب مولکول‌های زیستی در برابر آسیب‌های اکسیداتیو و همچنین اختلال در سیستم‌های دفاعی بدن شود [۱۵]. طی این مطالعه آسپارتام ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام را در گروه دریافت‌کننده آسپارتام به میزان ۱۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن کاهش داده بود که این نتایج توسط گزارشات مختلف قبلی حمایت می‌شوند [۱۵، ۱۰، ۷]. در این مطالعه آسپارتام میزان مالون‌دی‌آلدئید را در گروه دریافت‌کننده آسپارتام به میزان ۱۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن افزایش داد. گزارشات پیشین افزایش سطح مالون‌دی‌آلدئید را در موش‌های دریافت‌کننده آسپارتام به میزان ۸۰ و ۱۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن نشان داده‌اند [۱۵، ۱۰] که با نتایج حاصل از گروه دریافت‌کننده آسپارتام به میزان ۱۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن در این مطالعه همسو بوده، ولی با سایر گروه‌های دریافت‌کننده آسپارتام همسو نیست.

افزایش مقادیر تستوسترون خون در بسیاری از بیماری‌های تخمدانی مانند سندرم تخمدان پلی‌سیستیک اتفاق می‌افتد. در ضمن افزایش تستوسترون باعث کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی و غیرآنزیمی می‌شود. مطالعه بالینی در زنان دچار سندرم تخمدان پلی‌سیستیک نشان داده که در زنان با تستوسترون بالا، استرس اکسیداتیو نیز افزایش یافته است [۲۲]. به نظر می‌رسد گنادوتروپین و استروژن، فاکتورهای بقا برای سلول‌های فولیکولی هستند. در حالی که تستوسترون آپوپتوز فولیکول‌ها را در موش افزایش می‌دهد. بر اساس شواهد موجود، فولیکول‌هایی که نسبت آندروژن به استروژن بالایی دارند، در مقایسه با فولیکول‌هایی که این نسبت در آن‌ها پایین‌تر است، به آپوپتوز حساس‌تر هستند. استروژن موجب رشد فولیکول‌ها می‌شود، ولی تستوسترون آترزی فولیکول‌ها را القا می‌کند [۲۳]. در این مطالعه، سطح هورمون تستوسترون در گروه دریافت‌کننده آسپارتام به میزان

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

کلیه ضوابط و شرایط نگهداری و انجام آزمایش‌ها روی حیوانات در این مطالعه طبق دستورالعمل‌های مصوب کمیته اخلاق دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران با کد اخلاق ۳۰۰۲۹/۶/۲۱ صورت پذیرفت.

حامی مالی

این تحقیق هیچ‌گونه کمک مالی از سازمان‌های تأمین مالی در بخش‌های عمومی، تجاری یا غیرانتفاعی دریافت نکرد.

مشارکت نویسندگان

تمامی نویسندگان در طراحی، اجرا و نگارش تمام بخش‌های پژوهش حاضر مشارکت یکسان داشته‌اند.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه تهران به سبب حمایت‌هایشان از این مطالعه اعلام دارند.

وزن بدن، ممکن است مربوط به تولید استرس اکسیداتیو به دنبال اکسیداسیون متانول باشد [۶، ۱۰]. در طول اکسیداسیون متانول رادیکال‌های آزاد تولید و منجر به آسیب به ساختار ماکرومولکول‌های سلول می‌شوند [۱۰]. در راستای یافته‌های ما در کاهش بیان ژنی Bcl-2 و افزایش بیان ژنی P53 و Cas-3 در تخمدان نشان داده شد این فاکتورها در روند آپوپتوز نقش دارند. P53 یکی از عوامل مهم در فرایند آپوپتوز بوده و به دنبال آسیب DNA باعث رونویسی پروتئین‌های پیش‌آپوپتوزی می‌شود [۱۰]. Bcl-2 یک میانجی ضدآپوپتوزی است که مانع آزاد شدن سیتوکروم c از میتوکندری‌ها به سیتوزول شده و فعالیت پروتئازهای کاسپاز را کنترل می‌کند [۱۰]. Caspase-3 اجرایی‌ترین آنزیم کلیدی است که تغییرات هیستومورفولوژیک سلولی را طی آپوپتوز تعدیل می‌نماید [۱۰]. بنابراین مصرف طولانی‌مدت آسپارتام منجر به ایجاد آپوپتوز توسط کاهش بیان میانجی ضدآپوپتوزی و افزایش بیان میانجی‌های آپوپتوزی شده است. همسو با مطالعه ما، محققین دیگری نیز کاهش بیان میانجی‌های ضدآپوپتوزی و افزایش بیان میانجی‌های آپوپتوزی را در اندام‌های مختلف حیوانات تجربی مورد آزمایش، متعاقب مصرف طولانی‌مدت آسپارتام گزارش کرده‌اند [۶، ۱۰، ۲۸-۳۰].

نتیجه‌گیری

با جمع‌بندی یافته‌های مطالعه حاضر چنین برمی‌آید که مصرف آسپارتام در دوز بالا طی یک دوره طولانی، به واسطه افزایش تولید رادیکال‌های آزاد، پیری‌ریزی تنش‌های اکسیداتیو و نیز تضعیف دستگاه دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن، موجبات اختلالات مربوط به پارامترهای هیستومورفولوژی، هیستومورفومتري، بیوشیمیایی و تغییرات هیستوشیمیایی را در موش‌های دریافت‌کننده آسپارتام به میزان ۱۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن فراهم می‌آورد که به نوبه خود قادر هستند عملکرد فیزیولوژیک سیستم تولیدمثل ماده را دچار اختلال نمایند. مضافاً اینکه دریافت آسپارتام به میزان ۱۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن قادر است به واسطه اعمال استرس اکسیداتیو موجب کاهش میزان بیان ژن‌های Bcl-2 و در عین حال افزایش میزان بیان ژن‌های P53 و Caspase-3 شود که از جمله ژن‌های دخیل در فرایند مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول بوده و سبب القای آپوپتوز می‌شوند. در حالی که نتایج گروه‌های دریافت‌کننده آسپارتام به میزان ۸۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن تفاوت قابل توجهی در مقایسه با نتایج گروه کنترل نداشت و آسیب‌های مشاهده‌شده در گروه مذکور دیگر را از خود نشان نداد. با این وجود، تأیید مضرات و توکسیک بودن آسپارتام در سایر بخش‌های دستگاه تولیدمثل ماده، نیازمند طرح‌ریزی مطالعات تجربی گسترده‌تر و نیز کارآزمایی‌های بالینی است.

References

- [1] Morovvati H, Khaksar Z, Sheibani M, Anbara H, Amini Kafiabad M, Moradi H R. [Effect of aspartame on histological and histo-metrical structure of prostate gland in adult mice (Persian)]. *Qom Univ Med Sci J*. 2019; 12(12):14-27. [DOI:10.29252/qums.12.12.14]
- [2] Morovvati H, Anbara H, Sheibani MT, Koohi MK, Hasanzadeh A. [The effect of long-term exposure to aspartame on histomorphometric and histochemical adrenal gland in adult NMRI mice (Persian)]. *Armaghane-Danesh*. 2019; 24(2):150-69. <http://armaghanj.yums.ac.ir/article-1-2430-en.html>
- [3] Magnuson BA, Burdock GA, Doull J, Kroes RM, Marsh GM, Pariza MW, et al. Aspartame: A safety evaluation based on current use levels, regulations, and toxicological and epidemiological studies. *Crit Rev Toxicol*. 2007; 37(8):629-727. [PMID]
- [4] Humphries P, Pretorius E, Naudé H. Direct and indirect cellular effects of aspartame on the brain. *Eur J Clin Nutr*. 2008; 62(4):451-62. [DOI:10.1038/sj.ejcn.1602866] [PMID]
- [5] Oyama Y, Sakai H, Arata T, Okano Y, Akaiki N, Sakai K, et al. Cytotoxic effects of methanol, formaldehyde, and formate on dissociated rat thymocytes: A possibility of aspartame toxicity. *Cell Biol Toxicol*. 2002; 18(1):43-50. [DOI:10.1023/A:1014419229301] [PMID]
- [6] Ashok I, Sheeladevi R. Biochemical responses and mitochondrial mediated activation of apoptosis on long-term effect of aspartame in rat brain. *Redox Biol*. 2014; 2:820-31. [PMID] [PMCID]
- [7] Ashok I, Sheeladevi R, Wankhar D. Long term effect of aspartame (Artificial sweetener) on membrane homeostatic imbalance and histopathology in the rat brain. *Free Radic Antioxid*. 2013; 3(2):42-9. [DOI:10.1016/j.fra.2013.09.003]
- [8] Okasha EF. Effect of long term-administration of aspartame on the ultrastructure of sciatic nerve. *J Microsc Ultrastruct*. 2016; 4(4):175-83. [DOI:10.1016/j.jmau.2016.02.001] [PMID] [PMCID]
- [9] Sheibani M T, Anbara H, Morovvati H, Razi M, SalarAmoli J. [Effect of long term-administration of aspartame on sperm quality, testosterone and oxidant parameters in mice (Persian)]. *J Ilam Univ*. 2019; 27(3):150-61. [DOI:10.29252/sjimu.27.3.150]
- [10] Anbara H, Sheibani MT, Razi M, Kian M. Insight into the mechanism of aspartame-induced toxicity in male reproductive system following long-term consumption in mice model. *Environ Toxicol*. 2021; 36(2):223-37. [DOI:10.1002/tox.23028] [PMID]
- [11] Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*. 2000; 21(3):485-95. [DOI:10.1093/carcin/21.3.485] [PMID]
- [12] Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. *Aging*. 2012; 4(5):330-49. [DOI:10.18632/aging.100459] [PMID] [PMCID]
- [13] Amaral JD, Xavier JM, Steer CJ, Rodrigues CM. The role of p53 in apoptosis. *Discov Med*. 2010; 9(45):145-52. [PMID]
- [14] Onaolapo AY, Abdusalam SZ, Onaolapo OJ. Silymarin attenuates aspartame-induced variation in mouse behaviour, cerebrocortical morphology and oxidative stress markers. *Pathophysiology*. 2017; 24(2):51-62. [PMID]
- [15] Anbara H, Sheibani MT, Razi M. Long-term effect of aspartame on male reproductive system: Evidence for testicular histomorphometrics, Hsp70-2 protein expression and biochemical status. *Int J Fertil Steril*. 2020; 14(2):91-101. [PMID]
- [16] Tamatani M, Mitsuda N, Matsuzaki H, Okado H, Miyake S, Vitek MP, et al. A pathway of neuronal apoptosis induced by hypoxia/reoxygenation: Roles of nuclear factor-kappaB and Bcl-2. *J Neurochem*. 2000; 75(2):683-93. [DOI:10.1046/j.1471-4159.2000.0750683.x] [PMID]
- [17] Harrison DC, Davis RP, Bond BC, Campbell CA, James MF, Parsons AA, et al. Caspase mRNA expression in a rat model of focal cerebral ischemia. *Brain Res Mol Brain Res*. 2001; 89(1-2):133-46. [PMID]
- [18] Beck B, Burlet A, Max JP, Stricker-Krongrad A. Effects of long-term ingestion of aspartame on hypothalamic neuropeptide Y, plasma leptin and body weight gain and composition. *Physiol Behav*. 2002; 75(1-2):41-7. [PMID]
- [19] Leme FAGdL, Azoubel R. Effects of aspartame on exocrine pancreas of rat fetuses. *Int J Morphol*. 2006; 24(4):679-84. [DOI:10.4067/S0717-95022006000500027]
- [20] Gul SS, Hamilton AR, Munoz AR, Phupitakphol T, Liu W, Hyoju SK, et al. Inhibition of the gut enzyme intestinal alkaline phosphatase may explain how aspartame promotes glucose intolerance and obesity in mice. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2017; 42(1):77-83. [DOI:10.1139/apnm-2016-0346] [PMID] [PMCID]
- [21] Yang Q. Gain weight by "going diet?" Artificial sweeteners and the neurobiology of sugar cravings: Neuroscience 2010. *Yale J Biol Med*. 2010; 83(2):101-8. [PMID]
- [22] Hilali N, Vural M, Camuzcuoglu H, Camuzcuoglu A, Aksoy N. Increased prolidase activity and oxidative stress in PCOS. *Clin Endocrinol*. 2013; 79(1):105-10. [DOI:10.1111/cen.12110] [PMID]
- [23] Mason HD, Willis DS, Beard RW, Winston RM, Margara R, Franks S. Estradiol production by granulosa cells of normal and polycystic ovaries: relationship to menstrual cycle history and concentrations of gonadotropins and sex steroids in follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994; 79(5):1355-60. [DOI:10.1210/jcem.79.5.7962330] [PMID]
- [24] Guo-qing P, Yan T, Ou J. [The effects of formaldehyde on ovarian histopathology structure, oocyte ultrastructure and apoptosis of female rats (Chinese)]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2010; 26(9):865-7. [PMID]
- [25] Treesh SA, Aburawi SM, Elghedamsi MT, Jaafari HA, Alzowam R, Shibani N, et al. Protective role of vitamin C on histopathological effect of formaldehyde on reproductive system in female albino mice (histological study). *Int J Adv Res*. 2019; 7(2):529-40. [DOI:10.21474/IJAR01/8516]
- [26] Wang HX, Wang XY, Zhou DX, Zheng LR, Zhang J, Huo YW, et al. Effects of low-dose, long-term formaldehyde exposure on the structure and functions of the ovary in rats. *Toxicol Ind Health*. 2013; 29(7):609-15. [DOI:10.1177/0748233711430983] [PMID]
- [27] Kareem LA, Banna HB, Naoom KM. Effects of Toluene and Formaldehyde on Oogenesis in Adult Female Mice. *Diyala J Med*. 2014; 6(1):33-40. <https://djm.uodiyala.edu.iq/index.php/djm/article/view/361>



- [28] Ashok I, wankhar D, wankhar W, Sheeladevi R. Neurobehavioral changes and activation of neurodegenerative apoptosis on long-term consumption of aspartame in the rat brain. *J Nutr Intermed Metab.* 2015; 2(3-4):76-85. [DOI:10.1016/j.jnim.2015.09.001]
- [29] Iyaswamy A, Wankhar D, Loganathan S, Shanmugam S, Rajan R, Rathinasamy S. Disruption of redox homeostasis in liver function and activation of apoptosis on consumption of aspartame in folate deficient rat model. *J Nutr Intermed Metab.* 2017; 8:41-50. [DOI:10.1016/j.jnim.2017.06.002]
- [30] Gombos K, Varjas T, Orsós Z, Polyák E, Peredi J, Varga Z, et al. The effect of aspartame administration on oncogene and suppressor gene expressions. *In vivo.* 2007; 21(1):89-92. <https://iv.iiarjournals.org/content/invivo/21/1/89.full.pdf>