

## تأثیر مصرف طولانی مدت آسپارتام بر هیستومورفولوژی، هیستومورفومتري، هیستوشیمی و بیان ژن Caspase-3 در روده ی کوچک موش سفید کوچک آزمایشگاهی

سید احسان رحمانی<sup>۱</sup>، حسن مروتی<sup>۲</sup>، حجت عنبرآ<sup>۳</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** آسپارتام از خانواده شیرین کننده های مصنوعی می باشد که به طور فزاینده ای در محصولات رژیمی، کم کالری، انواع غذاها، داروها و محصولات بهداشتی استفاده می شود. مطالعه ی حاضر به منظور ارزیابی اثرات آسپارتام بر روده ی کوچک موش انجام پذیرفت.

**روش ها:** در این مطالعه ی تجربی، ۳۶ سر موش سفید کوچک آزمایشگاهی نر بالغ به صورت تصادفی به چهار گروه نه سری تقسیم شدند. سه گروه از گروه های فوق به ترتیب آسپارتام را به میزان ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت خوراکی از طریق گاوژ به مدت ۹۰ روز دریافت نموده و همچنین گروه شاهد نیز در نظر گرفته شد. ۲۴ ساعت پس از آخرین تیمار، نمونه های سرمی و بافتی جمع آوری و جهت بررسی های بیوشیمیایی، هیستومورفولوژی، هیستومورفومتري، هیستوشیمی و بیان ژن استفاده گردید.

**یافته ها:** در مطالعات هیستوشیمیایی، تغییر محسوس در رابطه با میزان ترکیبات کربوهیدراتی مابین گروه ها دیده نشد ولی میزان بافت فیروزی در گروه های دریافت کننده ی آسپارتام افزایش یافته بود. در بررسی های هیستومورفومتري روده کوچک، آسپارتام به میزان ۸۰ و ۱۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم موجب کاهش معنی داری در پارامترهای هیستومورفومتريک نسبت به گروه شاهد شده بود. دریافت آسپارتام به صورت وابسته به دوز موجب تغییرات معنی داری در پارامترهای اکسیدانی نسبت به گروه شاهد گردید. همچنین بیان ژن Caspase-3 در گروه دریافت کننده ی آسپارتام به میزان ۱۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم، افزایش معنی داری را در مقایسه با گروه شاهد نشان داد.

**نتیجه گیری:** به نظر می رسد آسپارتام به صورت وابسته به دوز می تواند موجب اثرات منفی بر هیستومورفولوژی، هیستومورفومتري، هیستوشیمی و پارامترهای اکسیدانی شده و بیان ژن Caspase-3 را در روده ی کوچک افزایش دهد.

**واژگان کلیدی:** آسپارتام؛ روده ی کوچک؛ بافت شناسی؛ کاسپاز ۳

**ارجاع:** رحمانی سید احسان، مروتی حسن، عنبرآ حجت. تأثیر مصرف طولانی مدت آسپارتام بر هیستومورفولوژی، هیستومورفومتري، هیستوشیمی و

بیان ژن Caspase-3 در روده ی کوچک موش سفید کوچک آزمایشگاهی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۲؛ ۴۱ (۷۳۸): ۸۹۵-۸۸۴

### مقدمه

فاقد قند به فراوانی یافت می شود (۱). این ماده در بین افراد مبتلا به دیابت و دارای اضافه وزن بسیار محبوب می باشد، از این رو مشهورترین و پرمصرف ترین شیرین کننده ی مصنوعی لقب گرفته است (۱). آسپارتام در واقع دی پپتیدی می باشد که از ترکیب دو اسید آمینه ی اسید آسپارتیک و فنیل آلانین حاصل شده و در مقادیر یکسان با ساکاروز میزان کالری مشابهی (۴ کیلوکالری بر گرم) را تولید می نماید ولی شدت شیرین کنندگی آن حدود ۲۰۰ برابر بیشتر از ساکارز است (۲). در اروپا میزان مصرف توصیه شده ی آسپارتام

مواد افزودنی موجود در خوراکی ها معمولاً به عنوان غذا مورد استفاده قرار نگرفته بلکه درون غذا و یا بر روی آن اضافه می شوند و در واقع افزودنی ها موادی هستند که به یک دلیل خاص از جمله برای افزایش زمان ماندگاری، طعم، رنگ، بهبود یا افزایش ویژگی های غذا، اضافه می شوند (۱). شیرین کننده های مصنوعی آسپارتام با نام علمی (ال آسپارتیل ال فنیل آلانین متیل استر) پودری بی بو، شدیداً شیرین، سفید رنگ و بلورین می باشد که در انواع مواد غذایی رژیمی کم کالری و

۱- دانشجوی دکترای تخصصی بافت شناسی مقایسه ای، گروه علوم پایه، دانشکده ی دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۲- استاد، بخش بافت شناسی و جنین شناسی، گروه علوم پایه، دانشکده ی دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۳- دکترای تخصصی بافت شناسی مقایسه ای، گروه علوم پایه، دانشکده ی دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

نویسنده ی مسؤو: حسن مروتی؛ استاد، بخش بافت شناسی و جنین شناسی، گروه علوم پایه، دانشکده ی دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

موجب تغییراتی در ساختار بافتی و عملکردی و نیز بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوز در روده‌ی کوچک در موش نیز گردد. لذا هدف از این مطالعه، بررسی اثرات آسپارتام بر روی پارامترهای هیستومورفولوژی، هیستومورفومتری، هیستوشیمیایی، بیوشیمیایی و همچنین بیان ژن Caspase-3 بر بافت روده‌ی کوچک در موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی به‌عنوان جایگزین انسانی تیمار شده طی یک دوره‌ی ۹۰ روزه که تا به حال مورد بررسی قرار نگرفته است، می‌باشد.

### روش‌ها

**حیوانات آزمایشگاهی:** برای انجام این پژوهش که به‌صورت یک کارآزمایی تجربی تصادفی شده شاهددار طرح‌ریزی شده بود، ۳۶ سر موش سفید کوچک آزمایشگاهی نر بالغ از نژاد NMRI با وزن ۲۵-۳۵ گرم از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. حیوانات در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با دمای  $25 \pm 2$  سانتی‌گراد و رطوبت نسبی  $50 \pm 10$  درصد در قفس‌های پلی‌اتیلنی مخصوص نگهداری موش با دسترسی آزاد به آب آشامیدنی نگهداری شدند. تمامی حیوانات به‌صورت برابر از پیلتهای مخصوص موش تغذیه شده و کلیه‌ی ضوابط و شرایط نگهداری و انجام آزمایش‌ها روی حیوانات در این مطالعه طبق دستورالعمل‌های مصوب کمیته‌ی اخلاق دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه تهران صورت پذیرفت. قبل از شروع دوره‌ی تیمار، به‌منظور سازگاری با شرایط جدید محیط، حیوانات به‌مدت دو هفته نگهداری شده و بعد از نشان‌دار کردن، موش‌های نر به‌طور تصادفی به ۴ گروه ۹تایی تقسیم شدند و به مدت ۹۰ روز متوالی آسپارتام (A5139-5G, Sigma-Aldrich, Cas No: 22839-47-0) را به‌صورت خوراکی از طریق گاواژ دریافت کردند.

**گروه‌بندی حیوانات:** ۳۶ سر موش سفید کوچک آزمایشگاهی نر بالغ به‌صورت تصادفی به چهار گروه ۹تایی به‌ترتیب زیر تقسیم شدند. در ادامه موش‌های نر پس از تعیین وزن اولیه، با محلول ثبوتی بوئن نشان‌دار شده و گروه‌بندی انجام گردید.

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

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

گروه سوم: دوز متوسط آسپارتام (Medium dose) یا آسپارتام ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم - این گروه آسپارتام را به میزان ۸۰ میلی‌گرم

۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و در آمریکا ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌باشد هر چند پژوهش‌های جدید بیان می‌کند که آسپارتام با آهستگی و پیوستگی راه خود را به محصولات روزانه، به ویژه در افراد مبتلا به دیابت یا دارای رژیم غذایی باز کرده است (۳). بعد از مصرف خوراکی آسپارتام، این ماده در داخل دستگاه گوارش (معه‌ای- روده‌ای) توسط استرازاها و پپتیدازها که مهم‌ترین آن‌ها کیموتریسین می‌باشد به اسید آمینه‌های سازنده‌ی خود فنیل‌آلانین، اسید آسپارتیک و الکل متانول هیدرولیز می‌گردد (۱). گفته شده است آسپارتام قبل از هیدرولیز، جذب سلول‌های مخاطی در روده‌ی کوچک شده و در این سلول‌ها متابولیزه می‌گردد (۱). برخی منابع دیگر نیز بیان داشته‌اند که آسپارتام توسط استرازاها پانکراسی در روده‌ی کوچک به دو بخش متانول و دی‌پپتید آسپارتیل-فنیل‌آلانین هیدرولیز می‌گردد و سپس دی‌پپتید حاصل و متانول جذب سلول‌های مخاطی روده‌ی کوچک می‌شوند (۴). در سلول‌های مخاطی، این دی‌پپتید توسط آنزیم آمینوپپتیداز که در داخل آنتروسیت‌ها قرار دارد به دو اسید آمینه‌ی سازنده خود هیدرولیز و سپس جذب می‌گردد (۴). قابل ذکر است که متانول ماده‌ای است که در داخل آنتروسیت‌ها متابولیزه نمی‌گردد و بلافاصله وارد گردش سیاهرگی باب شده و سپس در کبد به فرم آلدئید اکسیده می‌شود (۱). متانول و متابولیت‌های حاصل از آن یعنی فرم‌آلدئید و اسیدفرمیک با اکسیده شدن در کبد، موجب سمیت در اکثر سلول و بافت‌های بدن می‌شوند (۱). متابولیسم متانول به سلول‌های کبدی آسیب وارد کرده و با افزایش سطح NADH و تشکیل آنیون سوپراکسید و پراکسید هیدروژن همراه می‌باشد، که ممکن است در پراکسیداسیون لیپیدی مؤثر باشد (۵). افزایش متانول در بدن به عنوان یک محصول جانبی آسپارتام، باعث آسیب به غشای میتوکندریایی شده و منجر به بیش‌تولید گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species) ROS و ایجاد استرس اکسیداتیو، القای شکستگی در DNA، غیرفعال شدن پروتئین‌ها و آپوپتوز می‌گردد (۳، ۵). Caspase-3 به‌عنوان آخرین فاکتور در فرایند آپوپتوز به‌شمار رفته و در حقیقت مسئول تخریب پروتئین‌ها در سلول‌های در حال آپوپتوز، شکست DNA در سلول‌ها و حتی فشردگی کروماتین در سلول‌ها است که در ادامه منجر به مرگ سلول خواهد شد. بررسی‌ها در گذشته ثابت نموده‌اند که آسپارتام از طریق افزایش گونه‌های اکسیژن فعال سبب آغاز فرایند آپوپتوز می‌شود (۵، ۶). از آن‌جایی که شیرین‌کننده‌های مصنوعی همانند آسپارتام، ساخارین و سیکلامات توانسته‌اند با افزایش رادیکال‌های آزاد موجب تغییراتی در دستگاه‌های مختلف بدن شوند و همچنین گزارش‌های اخیر که اثبات نموده‌اند آسپارتام موجب آسیب‌های بافتی و ایجاد فرایند آپوپتوز در بافت‌های مختلف بدن شده است (۳، ۵، ۶)؛ احتمالاً آسپارتام بتواند

این منظور بعد از آسان‌کشی موش‌ها و باز کردن محوطه‌ی شکمی تحت شرایط استریل، قسمت‌های مختلف روده‌ی کوچک شامل دئودنوم، ژئوژنوم و ایلئوم جداسازی شد. قسمت‌های مختلف روده‌ی کوچک با سرم فیزیولوژی مورد شستشوی کامل قرار گرفته و به صورت مساوی (هر کدام از قسمت‌های مختلف روده‌ی کوچک ۱۰ قطعه بافتی) توزیع گردید، در ادامه قسمتی از نمونه‌های توزیع شده به منظور برش‌های پارافینی در داخل محلول ثبوتی فرمالین ۱۰ درصد بافری (۵ قطعه‌ی بافتی) قرار داده شد و قسمتی دیگر به منظور بررسی‌های بیوشیمیایی و بیان ژنی در داخل ازت مایع (۵ قطعه بافتی) قرار گرفت. بلوک پارافینی و برش بافت با ضخامت ۵-۷ میکرومتر تهیه گردید. برای مطالعات هیستولوژی شامل هیستومورفولوژی و هیستومورفومتری از رنگ‌آمیزی معمولی همانوکسیلین-انوزین استفاده شد. در همین راستا جهت مطالعات هیستوشیمیایی نیز از رنگ‌آمیزی‌های تری کروم ماسون و پریودیک اسید شیف (PAS (Periodic acid-Schiff) استفاده گردید. مطالعات هیستومورفولوژی شامل بررسی پیوستگی ساختار بافتی از نظر ظاهری، پراکندگی، از هم پاشیدگی و حالات غیرنرمال هیستوپاتولوژیکی بود (۸). مطالعات هیستومورفومتری نیز شامل میانگین طول پرزها، میانگین عرض پرزها، میانگین عمق کریپت‌ها، میانگین نسبت طول پرزها بر عمق کریپت‌ها، میانگین ضخامت لایه ماهیچه‌ای، میانگین پراکندگی سلول‌های جامی شکل در هر پرز، میانگین پراکندگی سلول‌های غیرجامی شکل در هر پرز و درصد سلول‌های جامی شکل در قسمت‌های مختلف روده‌ی کوچک شامل دئودنوم، ژئوژنوم و ایلئوم بوده و توسط میکروسکوپ نوری و دوربین دیجیتال و نرم افزار مربوط به این دوربین (Dino\_Lite Microscope, AnMo Dino\_Lite Electronics Corporation, Taiwan) انجام شد (۸). جهت انجام پارامترهای هیستومورفومتری برای هر موش ۵۰ و در مجموع ۴۵۰ عدد پرز و کریپ برای هر یک از قسمت‌های مختلف روده‌ی کوچک در هر گروه شمارش گردید. رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف (PAS) جهت تشخیص سلول‌های جامی شکل و مشخص نمودن مواد کربوهیدرات در سیتوپلاسم سلول‌ها استفاده شد (۲). همچنین رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون جهت تعیین تراکم رشته‌های همبندی و کلاژن و در راستای آن میزان بروز فیروز در بافت دئودنوم، ژئوژنوم و ایلئوم مورد مطالعه قرار گرفت (۲).

#### واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بی‌درنگ یا کمی (Real-Time PCR):

برای بررسی بیان ژن Caspase-3، ابتدا مقداری از بافت قسمت‌های مختلف روده‌ی کوچک شامل دئودنوم، ژئوژنوم و ایلئوم را به وسیله‌ی تیغ جراحی جدا و خرد شد و سپس توسط محلول RNX-Plus

به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت خوراکی از طریق گاوآژ روزانه دریافت کردند.

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

سرم فیزیولوژی و آسپارتام در همه‌ی گروه‌ها به روش خوراکی از طریق گاوآژ و به مدت ۹۰ روز و هر ۲۴ ساعت تجویز شد. میزان و دوزهای انتخاب شده برای آسپارتام بر اساس مطالعات و پژوهش‌های جدیدی که به تازگی چاپ گردیده بود، برگزیده شد (۳، ۶، ۷).

**نمونه‌برداری:** یک روز پس از پایان دوره‌ی تیمار ۹۰ روزه، موش‌ها دوباره توسط ترازوی دقیق آزمایشگاهی در حد میلی‌گرم توزین شده و کلیه‌ی 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 شدند. نمونه‌های سرمی جدا شده و به لوله‌های اپندورف ۱ میلی‌لیتری منتقل و تا زمان انجام آزمایش‌های سرمی در دمای ۷۰- نگهداری شدند (۲). در مورد روده‌ها، متعاقب آسان‌کشی حیوانات و تحت شرایط استریل، محوطه شکمی باز و نمونه‌های بافتی مربوط به قسمت‌های مختلف روده‌ی کوچک به دقت جداسازی و پس از شستشو با سرم فیزیولوژی برای کارهای هیستومورفولوژی، هیستومورفومتری و هیستوشیمیایی در نظر گرفته شد.

**ارزیابی‌های بیوشیمیایی:** نمونه‌ها جهت تعیین ظرفیت آنتی‌اکسیدانت تمام سرم (TAC)، با استفاده از روش FRAP (Ferric reducing ability of plasma) که بر اساس توان احیاء کنندگی آهن سه ظرفیتی می‌باشد، مورد اندازه‌گیری قرار گرفت (۶). فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD (Superoxide dismutase) از طریق کیت‌های بیوشیمیایی مورد سنجش قرار گرفت (۲). جهت تعیین پراکسیداسیون چربی‌ها، سطح تولید مالون دی‌آلدئید (MAD (Malondialdehyde) به عنوان شاخص ارزیابی این فرایند بر اساس واکنش با اسید تیوباربتوریک (Thiobarbituric acid) TBA مورد ارزیابی قرار گرفت (۶). همچنین آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز (GPx) که در بخش‌های سیتوپلاسمی و میتوکندری سلول یافت و در حفاظت از ارگانیزم‌ها در برابر آسیب‌های اکسیداتیو نقش مهمی دارند نیز از طریق کیت‌های بیوشیمیایی مورد سنجش قرار گرفت (۲).

#### بررسی‌های هیستومورفولوژی، هیستومورفومتری و هیستوشیمی:

پس از پایان دوره‌ی تیمار اقدام به نمونه‌برداری از موش‌ها شد که به

ارزیابی و نیز متعاقب اطمینان از نرمال بودن توزیع داده‌ها توسط آزمون Kolmogorov-Smirnov. ارزیابی آماری داده‌های این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۹ (SPSS Inc., Chicago, version 19, SPSS Inc., Chicago, ) انجام پذیرفت و تمامی نتایج بر اساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان گردید. جهت مقایسه‌ی بین گروه‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه و به دنبال آن تست‌های مقایسه‌ای چندگانه‌ی Tukey مورد استفاده قرار گرفت. مقدار  $P < 0/05$  برای تعیین سطح معنی‌داری مابین گروه‌ها در نظر گرفته شد.

کلیه‌ی ضوابط و شرایط نگهداری و انجام آزمایش‌ها روی حیوانات در این مطالعه طبق دستورالعمل‌های مصوب کمیته‌ی اخلاق دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه تهران با کد اخلاق IR.UT.VETMED.REC.1402.034 صورت پذیرفت.

### یافته‌ها

**بررسی تغییرات وزن بدن:** بررسی تغییرات وزن بدن در گروه‌های مختلف نشان داد که افزایش وزن حاصل از مصرف آسپاراتام در گروه دوز بالای آسپاراتام نسبت به گروه شاهد، معنی‌دار بوده است ( $P < 0/05$ ). این درحالی است که در در گروه‌های دوز پایین و متوسط آسپاراتام نسبت به گروه شاهد افزایش وزن معنی‌داری ( $P > 0/05$ ) مشاهده نشد (جدول ۲).

### بررسی‌های بیوشیمیایی

**سنجش میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام سرم TAC:** سنجش میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام سرم در گروه‌های مختلف نشان داد که سطح ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام سرم در گروه‌های دوز متوسط و بالای آسپاراتام نسبت به گروه شاهد، دارای کاهش معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) بود (جدول ۲).

**سنجش میزان مالون دی‌آلدئید MDA:** بررسی میزان پراکسیداسیون چربی‌ها در حیوانات نشان داد که تجویز آسپاراتام به صورت وابسته به دوز موجب افزایش معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) در تمامی گروه دریافت‌کننده‌ی آسپاراتام در مقایسه با گروه شاهد شده است (جدول ۲).

شرکت سینازن استخراج RNA انجام گرفت. همچنین از کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis شرکت فرمتاز برای سنتز cDNA استفاده شد. برای انجام Real-time PCR از ژن 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 سینازن تهیه گردید که توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ ارائه شده است (۵، ۶).

جدول ۱. توالی و تعداد پرایمر ژن Caspase-3 و ژن کنترل داخلی

اندازه (bp)	توالی	اسامی ژن‌ها
۲۹۸ جفت باز	FWD: AGTTGGACCCACCTTGTGAG REV: AGTCTGCAGCTCCTCCACAT	Caspase-3
۶۸ جفت باز	FWD: GAACATCATCCTGCATCCA REV: CCAGTGAGCTTCCCCTTCA	GAPDH

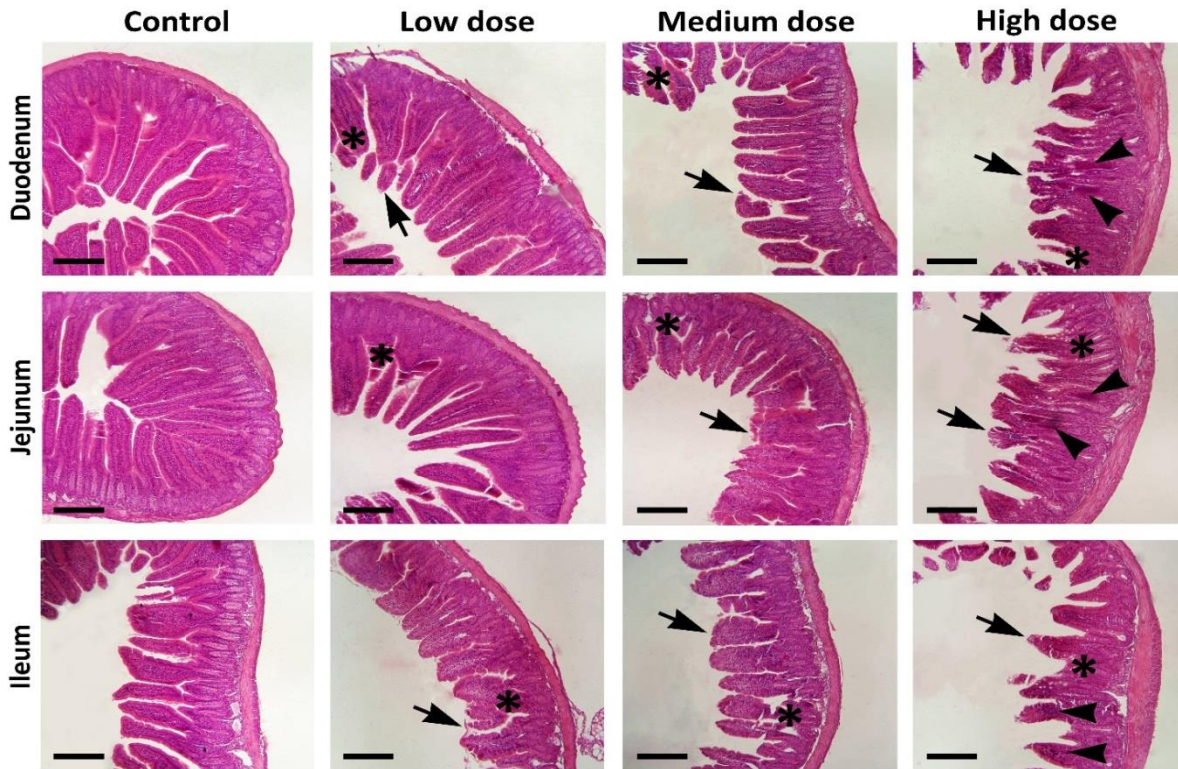
دستورالعمل حرارتی برای انجام این Real-time PCR به شرح زیر انجام شد. دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، ۴۰ سیکل تکثیر شامل مرحله دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۵ ثانیه، دمای اتصال برای پرایمرهای Caspase-3 و GAPDH به ترتیب ۵۸ و ۶۱ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، در نهایت تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه انجام شد. برای پرایمرهای Caspase-3 و GAPDH به ترتیب 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 Caspase-3 در موش‌های گروه‌های مختلف با استفاده از فرمول  $2^{-\Delta\Delta ct}$  محاسبه گردید.

با توجه به کمی و پیوسته بودن داده‌ها، تعداد گروه‌های مستقل مورد

جدول ۲. نتایج میانگین تغییرات وزن بدن و پارامترهای اکسیدانی سرم در گروه‌های مختلف آزمایشی

پارامترها	شاهد	دوز پایین	دوز متوسط	دوز بالا
تغییرات وزن بدن (گرم)	۴/۰ $\pm$ ۶۲/۶۷ <sup>a</sup>	۵/۱ $\pm$ ۲۴/۵۶ <sup>ab</sup>	۵/۲ $\pm$ ۵۸/۵۳ <sup>ab</sup>	۶/۱ $\pm$ ۹۷/۱۵ <sup>b</sup>
آنتی‌اکسیدانی تام سرم ( $\mu\text{mol/L}$ )	۱۷۹/۱۰ $\pm$ ۳۹/۲۱ <sup>a</sup>	۱۵۷/۹ $\pm$ ۷۱/۶۱ <sup>ab</sup>	۱۳۸/۱۳ $\pm$ ۵۸/۴۷ <sup>b</sup>	۱۰۶/۱۴ $\pm$ ۵۱/۴۹ <sup>c</sup>
مالون دی‌آلدئید ( $\mu\text{mol/L}$ )	۲/۰ $\pm$ ۴۶/۲۶ <sup>a</sup>	۳/۰۷ $\pm$ ۰/۲۷ <sup>b</sup>	۳/۰ $\pm$ ۶۸/۳۴ <sup>c</sup>	۵/۰ $\pm$ ۱۰/۳۷ <sup>d</sup>
سوپراکسید دیسموتاز (U/L)	۱/۰۵ $\pm$ ۰/۰۸ <sup>a</sup>	۰/۹۹ $\pm$ ۰/۰۶ <sup>a</sup>	۰/۰ $\pm$ ۷۹/۰۸ <sup>b</sup>	۰/۰ $\pm$ ۵۱/۰۹ <sup>c</sup>
گلوکاتایون پراکسیداز (U/mL)	۱/۰ $\pm$ ۶۰/۱۱ <sup>a</sup>	۱/۰ $\pm$ ۳۰/۱۵ <sup>b</sup>	۰/۰ $\pm$ ۹۷/۱۶ <sup>c</sup>	۰/۰ $\pm$ ۶۳/۱۰ <sup>d</sup>

$\mu\text{mol/L}$ : میکرومول بر لیتر. U/L: واحد بین‌المللی بر لیتر. mU/L: واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر. داده‌ها بر اساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شده‌اند. حروف لاتین غیر مشابه نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار در هر ستون می‌باشند ( $P < 0/05$ ).



شکل ۱. برش عرضی از قسمت‌های مختلف روده‌ی کوچک شامل بافت دئودنوم، ژئوژنوم و ایلئوم در گروه‌های مورد مطالعه مربوط به رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-انوزین.

در بافت دئودنوم، ژئوژنوم و ایلئوم موش‌هایی که آسپارتام دریافت کرده بودند، تخریب و کاهش بارزی در تعداد و ارتفاع پرزها (ستاره‌ها) و نیز تخریب بافتی مخاط و زیر مخاط این قسمت‌ها شامل تحلیل قسمت رأسی و آسیب سلول‌های اپی‌تلیوم سطح مخاط پرزهای روده‌ای (پیکان‌ها)، التهاب و ادم (سر پیکان‌ها) در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد (خط نشانه برابر ۲۰۰ میکرومتر).

شاهد گردید. به‌طوری که در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی آسپارتام قسمت رأسی پرزها دچار تحلیل شده و موجب تخریب سلول‌های اپی‌تلیوم سطح مخاط و کاهش جمعیت سلولی در این قسمت‌ها شده بود. همچنین در بررسی‌های هیستومورفولوژی نمونه‌های بافتی روده‌ی کوچک، علائم قابل توجهی از التهاب و ادم در قسمت‌ها و لایه‌های مختلف بافتی روده‌ی کوچک در موش‌های دریافت‌کننده‌ی آسپارتام مشاهده شد. این علائم شامل افزایش تراکم سلول‌های التهابی و احتقان عروقی بود. این شاخص‌ها نشان‌دهنده‌ی پاسخ التهابی در بافت دئودنوم، ژئوژنوم و ایلئوم روده‌ی کوچک در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی آسپارتام نسبت به گروه شاهد بود (شکل ۱، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-انوزین).

**بررسی‌های هیستومورفومتری:** بررسی هیستومورفومتری بافت روده‌ی کوچک بین گروه‌های آزمایشی دریافت‌کننده‌ی آسپارتام و شاهد نشان داد که میانگین طول و عرض پرزها در گروه‌های دوز متوسط و بالای آسپارتام در هر سه قسمت روده‌ی کوچک نسبت به گروه شاهد دارای کاهش معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) بود (شکل ۲، قسمت A و B). میانگین عمق کریپت‌ها تنها در قسمت دئودنوم

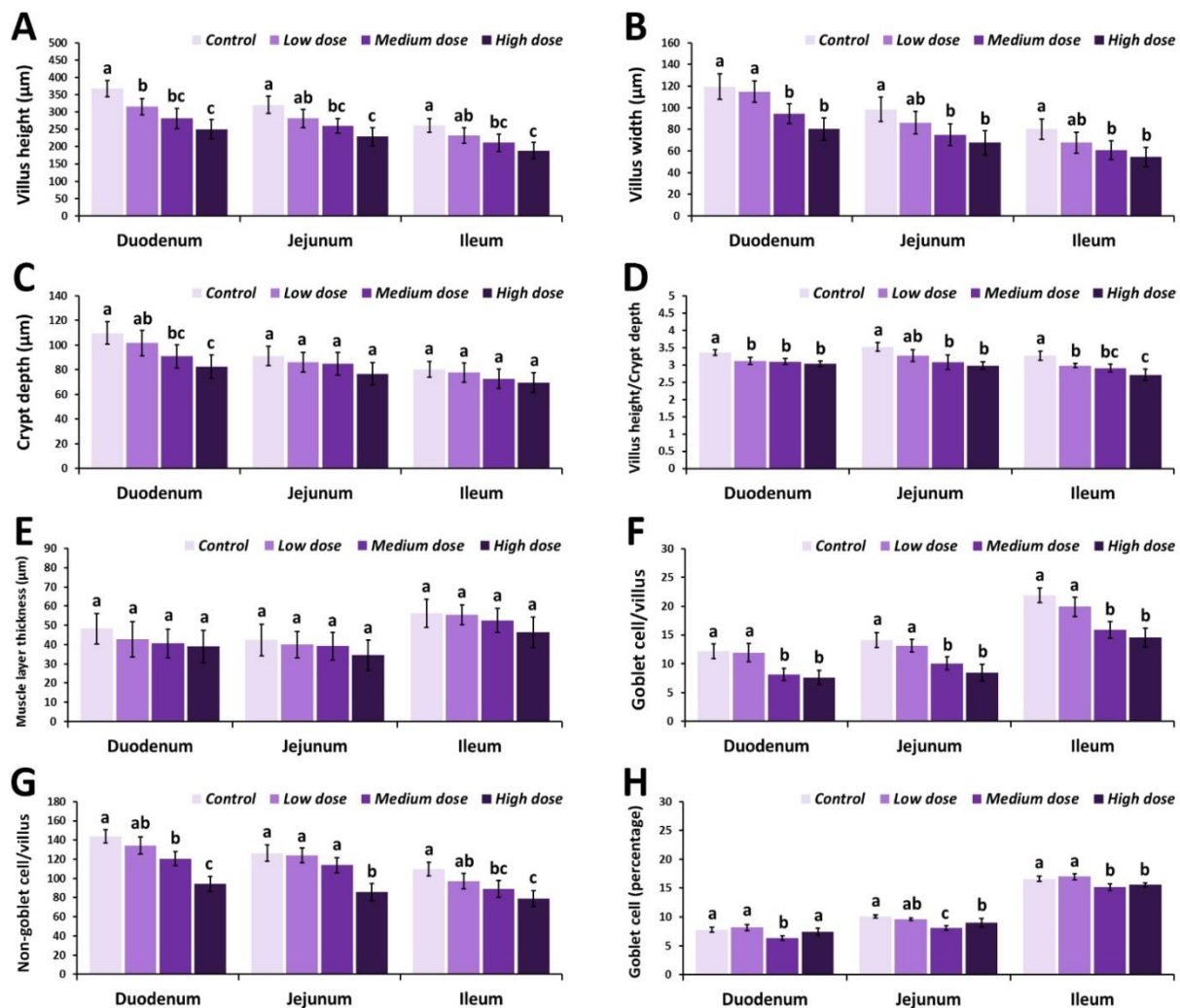
**سنجش میزان سوپراکسید دیسموتاز SOD:** سنجش میزان سوپراکسید دیسموتاز سرم در گروه‌های مختلف نشان داد که سطح این فاکتور اکسیدانی در گروه‌های دوز متوسط و بالای آسپارتام نسبت به گروه شاهد، دارای کاهش معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) بوده است (جدول ۲).

**سنجش میزان گلوتاتیون پراکسیداز GPx:** سنجش میزان گلوتاتیون پراکسیداز در سرم نشان داد که سطح گلوتاتیون پراکسیداز سرمی در تمام گروه‌های دریافت‌کننده‌ی آسپارتام به‌صورت وابسته به دوز نسبت به گروه شاهد دارای کاهش معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) بود (جدول ۲).

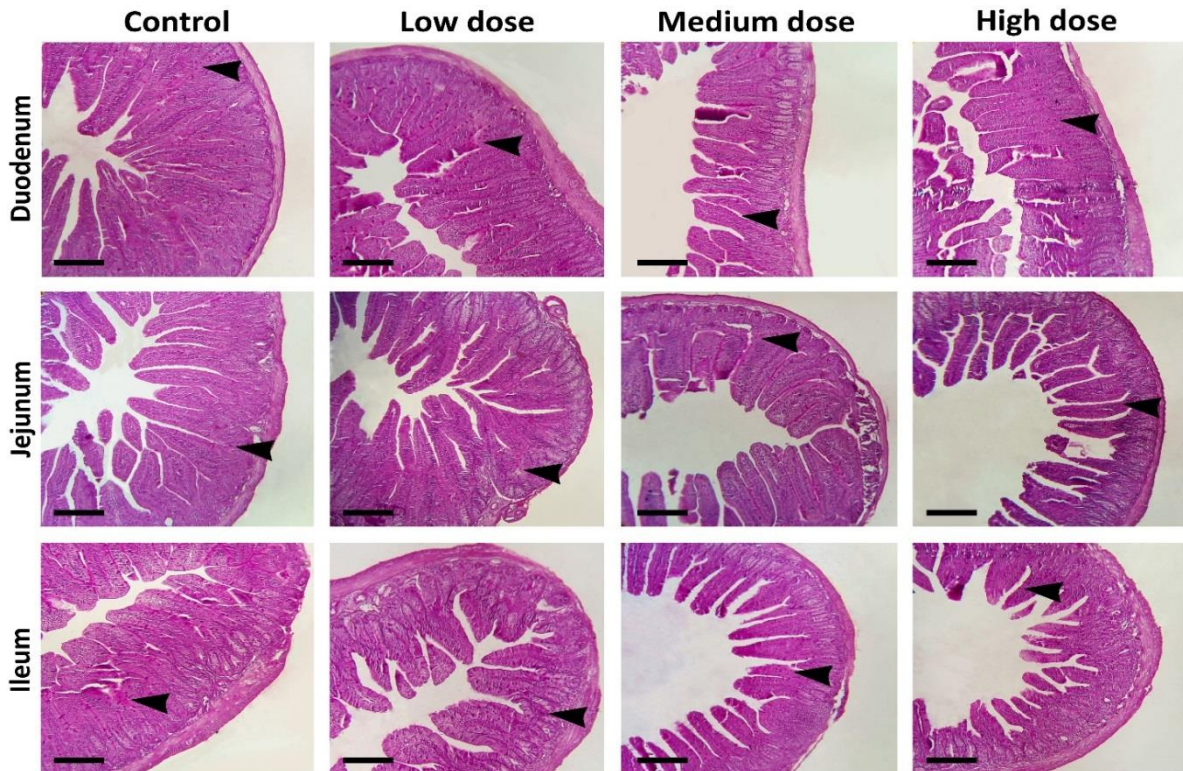
**بررسی‌های هیستومورفولوژی:** مشاهدات هیستومورفولوژی توسط میکروسکوپ نوری نشان داد که دریافت آسپارتام، موجب کاهش بارزی در تعداد، ارتفاع و عرض پرزهای قسمت‌های مختلف روده‌ی کوچک نسبت به گروه شاهد شده بود. آسپارتام به‌صورت وابسته به دوز موجب ایجاد نشانه‌هایی از تخریب بافت طبیعی از جمله بروز به هم‌ریختگی ساختار بافتی و از هم گسستگی سلول‌ها در مخاط و زیر مخاط دئودنوم، ژئوژنوم و ایلئوم نسبت به گروه

دارای کاهش معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) بودند (شکل ۲، قسمت F). در مقابل، میانگین پراکندگی سلول‌های غیرجامی شکل در هر پرز در قسمت دئودنوم در گروه‌های دوز متوسط و بالای آسپارتام، در قسمت ژئوژنوم در گروه دوز بالا و در قسمت ایلیوم در تمامی گروه‌های دریافت‌کننده‌ی آسپارتام نسبت به گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌دار ( $P < 0/05$ ) بودند (شکل ۲، قسمت G). در نهایت در پارامتر درصد سلول‌های جامی شکل، درصد این سلول‌ها در قسمت دئودنوم تنها در گروه‌های دوز متوسط آسپارتام و در قسمت‌های ژئوژنوم و ایلیوم در گروه‌های دوز متوسط و بالای آسپارتام نسبت به گروه شاهد دارای کاهش معنی‌دار ( $P < 0/05$ ) بودند (شکل ۲، قسمت H).

روده‌ی کوچک و در گروه‌های دوز متوسط و بالای آسپارتام نسبت به گروه شاهد دارای کاهش معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) بود (شکل ۲، قسمت C). میانگین نسبت طول پرزها بر عمق کریپت‌ها در تمام قسمت‌های روده‌ی کوچک در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی آسپارتام به‌صورت وابسته به دوز کاهش معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) را نسبت به گروه شاهد از خود نشان داد (شکل ۲، قسمت D). در مقابل میانگین ضخامت لایه‌ی ماهیچه‌ای در قسمت‌های مختلف روده‌ی کوچک در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی آسپارتام نسبت به گروه شاهد، فاقد اختلاف معنی‌دار ( $P > 0/05$ ) بود (شکل ۲، قسمت E). میانگین پراکندگی سلول‌های جامی شکل در هر پرز در گروه‌های دوز متوسط و دوز بالای آسپارتام در هر سه قسمت روده‌ی کوچک نسبت به گروه شاهد



شکل ۲. مقایسه‌ی میانگین پارامترهای هیستومورفومتریک در قسمت‌های مختلف روده‌ی کوچک شامل دئودنوم، ژئوژنوم و ایلیوم در گروه‌های مختلف آزمایشی. میانگین طول پرزها (A)، میانگین عرض پرزها (B)، میانگین عمق کریپت‌ها (C)، میانگین نسبت طول پرزها بر عمق کریپت‌ها (D)، میانگین ضخامت لایه‌ی ماهیچه‌ای (E)، میانگین پراکندگی سلول‌های جامی شکل در هر پرز (F)، میانگین پراکندگی سلول‌های غیرجامی شکل در هر پرز (G) و درصد سلول‌های جامی شکل (H). داده‌ها بر اساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شده‌اند. حروف لاتین غیرمشابه نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار مابین گروه‌ها در سطح  $P < 0/05$  می‌باشد.



شکل ۳. برش عرضی از قسمت‌های مختلف روده‌ی کوچک شامل بافت دنودنوم، ژئوژنوم و ایلئوم در گروه‌های مورد مطالعه مربوط به رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف. گروه شاهد و همچنین تمامی گروه‌های دریافت‌کننده‌ی آسپارتام شاهد مقادیر مواد کربوهیدرات طبیعی و واکنش پاس مثبت بودند. در تمامی گروه‌های مورد آزمایش، عدم اختلاف در میزان کربوهیدرات‌ها و دانه‌های پاس مثبت در بافت روده‌ی کوچک و سلول‌های جامی شکل (سر پیکان‌ها) مشهود بود و در مجموع مقاطع رنگ‌آمیزی شده با این رنگ تفاوت چندانی با یکدیگر نداشتند (خط نشانه برابر ۲۰۰ میکرومتر).

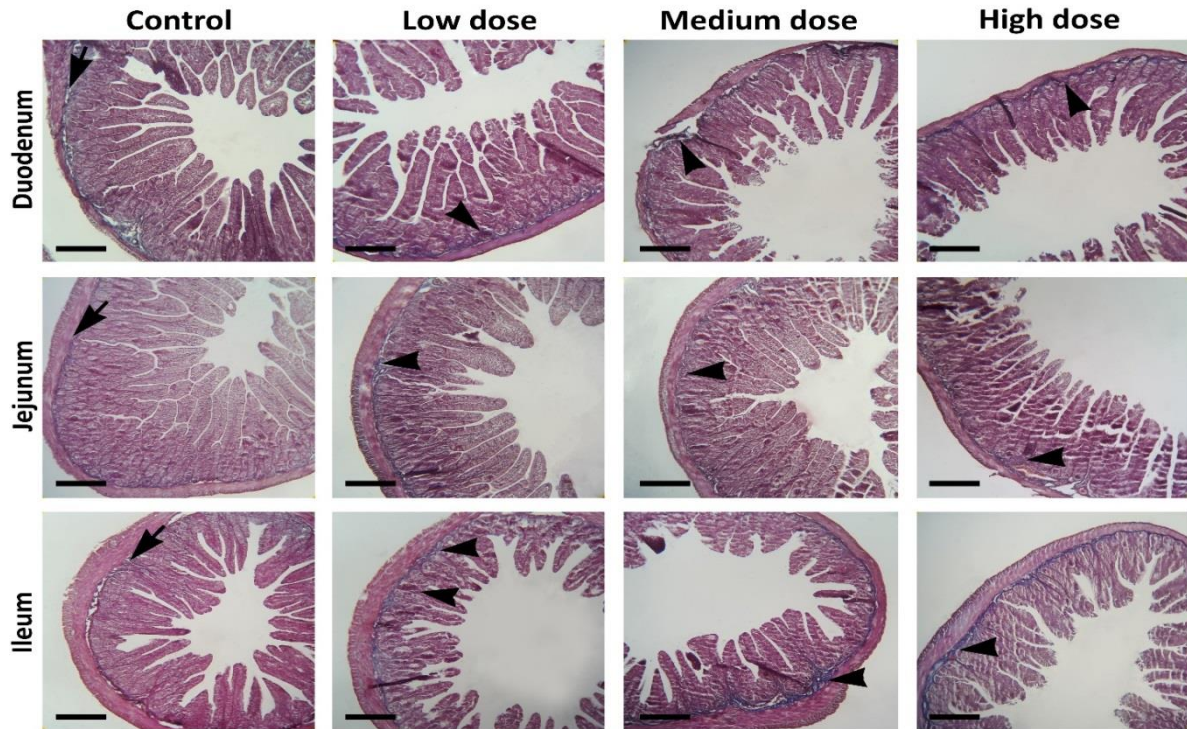
گروه‌های دوز متوسط و دوز بالای آسپارتام در مقایسه با گروه شاهد شده بود (شکل ۵).

### بحث

به نظر می‌رسد که نتایج بدست آمده در مورد تأثیرات مصرف آسپارتام بر روی پارامترهای مختلف در این مقاله می‌تواند به تبعیت از فرایندهای متابولیکی حاصل از هیدرولیز آسپارتام طی فرایند گوارش و جذب این متابولیت‌ها در بدن باشد (۵، ۹). آنچه که در اینجا مورد توجه قرار می‌گیرد، سمیتی است که از مصرف آسپارتام به عنوان یک ماده‌ی خوراکی ناشی می‌شود. این سمیت به‌طور اساسی با متابولیت‌های به دست آمده از فرایندهای گوارش و جذب روده‌ای مرتبط می‌باشد. در این متابولیسم، آسپارتام توسط استرازاها و پپتیدازها به فیل‌آلانین، اسید آسپارتیک و متانول در داخل دستگاه معده‌ای- روده‌ای هیدرولیز می‌گردد (۹). متانول از طریق سیاهرگ باب وارد کبد می‌شود و سپس توسط آنزیم الکل‌دهیدروژناز به فرم آلدئید اکسید می‌گردد. این فرایند، منجر به سمیت در اکثر سلول‌ها و بافت‌های بدن می‌شود (۵، ۹).

**بررسی‌های هیستوشیمیایی:** تحلیل هیستوشیمیایی نمونه‌های بافتی رنگ‌آمیزی شده توسط رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف در قسمت‌های مختلف روده‌ی کوچک نشان داد که در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی آسپارتام، تفاوت محسوسی در واکنش PAS و میزان مواد کربوهیدراته در داخل سیتوپلاسم سلول‌ها در مقایسه با گروه شاهد مشاهده نگردید (شکل ۳). با این حال نتایج هیستوشیمیایی رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون در دنودنوم، ژئوژنوم و ایلئوم نشان داد که در تمامی گروه‌های دریافت‌کننده‌ی آسپارتام، میزان رشته‌های کلاژن در مخاط و زیرمخاط و در راستای آن بروز فیروز در بافت این قسمت‌ها در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافته است (شکل ۴).

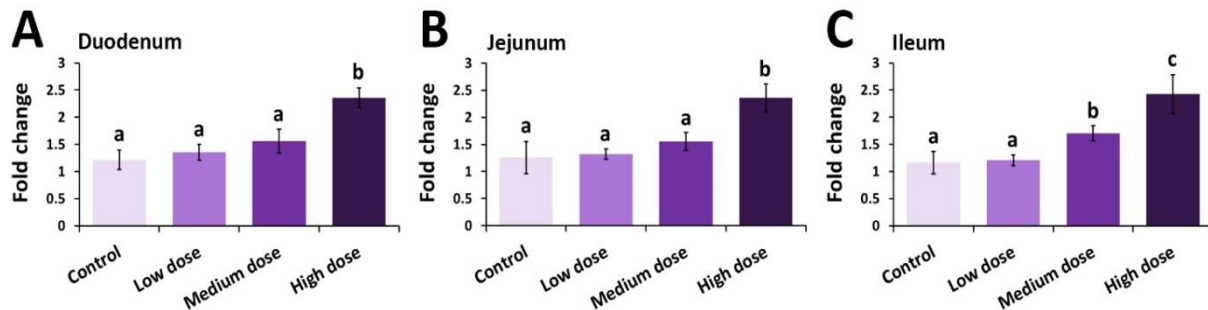
**ارزیابی سطح بیان ژن Caspase-3.** جهت ارزیابی سطح بیان ژن Caspase-3 در قسمت‌های مختلف روده‌ی کوچک فرایند Real-time PCR برای این ژن انجام گرفت. این بررسی نشان داد که دریافت طولانی مدت آسپارتام در گروه دوز بالای آن در دنودنوم و ژئوژنوم موجب افزایش معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) در سطح بیان این ژن در مقایسه با گروه شاهد گردیده است. همچنین سطح بیان ژن Caspase-3 در ایلئوم دارای افزایش معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) در



شکل ۴. برش عرضی از قسمت‌های مختلف روده‌ی کوچک شامل بافت دئودنوم، ژئوژنوم و ایلنوم در گروه‌های مورد مطالعه مربوط به رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون. گروه شاهد در بافت دئودنوم، ژئوژنوم و ایلنوم (پیکان‌ها) دارای میزان طبیعی الیاف کلاژن بوده و در این گروه عدم فیبروز بافت روده‌ی کوچک مشاهده گردید. در مقابل در تمامی گروه‌های دریافت‌کننده اسپارتام در قیاس با گروه شاهد، در بافت دئودنوم، ژئوژنوم و ایلنوم (سریک‌ها) افزایش محسوسی در میزان تراکم الیاف کلاژن مشاهده شد (خط نشانه برابر ۲۰۰ میکرومتر).

تأثیرات سمیت و اثرات زیان‌بار متابولیت‌های حاصل از اسپارتام و متانول می‌تواند در سطوح سلولی و بافتی ایجاد شده و به‌عنوان یک پاسخ به مصرف اسپارتام در بدن انسان در نظر گرفته شوند (۱۰). تحلیل نتایج مطالعات مختلف درباره‌ی تأثیر اسپارتام بر روی کاهش وزن در انسان نشان داده‌اند که اسپارتام ممکن است بر تناسب وزن بدن انسان تأثیر بگذارد، این تحلیل‌ها نشان می‌دهد که تأثیرات احتمالی اسپارتام در این زمینه به دلیل تأثیر آن بر کاهش نوروپپتید Y مغزی که نقش بسیار حیاتی در متابولیسم و سوخت و ساز بدن دارد، می‌باشد (۱۱).

آنچه به نظر می‌رسد این است که حتی مقدار کمی از اسپارتام می‌تواند به طور قابل توجهی منجر به افزایش سطح متانول در خون شود. این افزایش سطح متانول می‌تواند باعث متابولیسم متانول به فرم آلدئید و اسیدفرمیک شود، که همراه با تشکیل آنیون‌های سوپراکسید و پراکسید هیدروژن می‌باشد (۶). آنیون‌های سوپراکسید و پراکسید هیدروژن می‌توانند به آسیب غشای میتوکندریایی منجر شوند و با افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن، استرس اکسیداتیو ایجاد کرده و آپوپتوز را به وجود آورند (۳، ۶). در نتیجه، به نظر می‌رسد که



شکل ۵. مقایسه‌ی میزان بیان ژن Caspase-3 در مقایسه با GAPDH در قسمت‌های مختلف روده‌ی کوچک شامل دئودنوم، ژئوژنوم و ایلنوم در گروه‌های مورد مطالعه. سطح بیان ژن Caspase-3 در دئودنوم (A)، سطح بیان ژن Caspase-3 در ژئوژنوم (B)، سطح بیان ژن Caspase-3 در ایلنوم (C). داده‌ها بر اساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شده‌اند. حروف لاتین غیرمشابه نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار مابین گروه‌ها در سطح  $P < 0.05$  می‌باشد.



گروه‌های دریافت‌کننده‌ی آسپارتام کاملاً مطابقت داشت (۱۷).  
Chichger و Shil در سال ۲۰۲۱، بر اساس تحقیقات جدیدی که در دانشگاه انگلیا راسکین انگلیس انجام داده‌اند، بیان نموده‌اند که مصرف شیرین‌کننده‌ها از جمله آسپارتام می‌تواند روی لایه‌ی باکتری‌های معروف به میکروبیوتای روده که وظیفه‌ی پشتیبانی از روده را دارند، اثر مخرب داشته و موجب افزایش چسبندگی و حمله‌ی باکتری‌ها به سلول‌های روده در انسان شوند که منجر به آسیب به سلول‌های روده‌ای، عفونت و تخریب بافتی در این عضو می‌شود (۱۸).

مطالعات هیستومورفومتریک پیشین اثبات نموده‌اند که قرار گرفتن در معرض آسپارتام و سایر مواد اکسیدانی موجب تغییر در پارامترهای هیستومورفومتري در بافت‌های مختلف بدن در موش‌های کوچک آزمایشگاهی شده است (۵، ۱۹، ۲۰).

همچنین هوشمند عباسی و همکاران در سال ۲۰۱۶ گزارش کرده‌اند که مصرف آسپارتام در موش‌های نابالغ ماده، موجب تغییرات هیستومورفومتري در دوازدهه شامل کاهش در فراوانی پرزهای روده‌ای، کاهش در طول و عرض پرزها، کاهش عمق کریپت‌ها و کاهش ضخامت لایه‌ی ماهیچه‌ای شده است که متعاقب آن اختلال در تجزیه کامل مواد غذایی و همچنین اختلال در جذب مونومرها را به همراه دارد و بایستی از مصرف طولانی‌مدت آن تا حد امکان جلوگیری به عمل آورده شود، که با نتایج گروه‌های دریافت‌کننده‌ی آسپارتام در مطالعه‌ی حاضر به غیر از پارامتر ضخامت لایه‌ی ماهیچه‌ای هم‌خوانی داشت (۱۶).

در مواردی که چرخه‌ی متابولیسمی سلول‌ها دچار اختلال می‌شود، این اختلال بر متابولیسم آن‌ها نیز تأثیر گذاشته و موجب تغییر آن می‌شود. در چنین وضعیتی، سلول‌ها جهت تأمین انرژی و حفظ ساختار درونی خود از منابع غذایی مختلفی که در محیط موجود است، استفاده می‌کنند (۲۱). در مطالعه‌ی حاضر، نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی پرئودیک اسید شیف نشان می‌دهد که در دئودنوم، ژئوزنوم و ایلئوم موش‌های دریافت‌کننده‌ی آسپارتام، واکنش پرئودیک اسید شیف (که نشان‌دهنده‌ی ذرات کربوهیدرات است) در سلول‌های بافت روده‌ی کوچک و سلول‌های جامی شکل تفاوتی با گروه شاهد نداشت که با پژوهش‌های دیگری در این زمینه که در آن آسپارتام موجب افزایش واکنش پرئودیک اسید شیف در سلول‌ها نشده بود، همسو می‌باشد (۵).

همچنین، نتایج رنگ‌آمیزی تری‌کروم ماسون در این مطالعه نشان داد که مقدار رشته‌های کلاژن در دئودنوم، ژئوزنوم و ایلئوم گروه‌های دریافت‌کننده‌ی آسپارتام به طور قابل مشاهده‌ای تفاوت با گروه شاهد داشته و در تمامی گروه‌های دریافت‌کننده‌ی آسپارتام، نسبت به گروه شاهد، افزایش قابل توجهی در میزان تراکم الیاف کلاژن دیده شد. این

همچنین، مطالعات بر روی موش‌های صحرایی نیز نشان داد که مصرف آسپارتام در طی دوره‌ی ارگانوژنز ممکن است منجر به کاهش وزن جنین و همچنین وزن جفت شود (۱۲). در تحقیقات دیگری آمده است که آسپارتام می‌تواند فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز روده‌ای (IAP) را مهار نماید. این آنزیم می‌تواند از بروز چاقی، دیابت نوع ۲ و سندرم متابولیک جلوگیری کند. به عبارت دیگر، مطالعات نشان می‌دهد که مصرف آب حاوی آسپارتام نسبت به آب بدون آسپارتام، موجب افزایش وزن در موش‌ها می‌شود (۱۳). به‌علاوه، در تحقیقاتی دیگر نشان داده شده است که آسپارتام ممکن است مسیر تشخیص مصرف مواد غذایی را در مغز غیرفعال نماید (۱۴).

به نظر می‌رسد که وجود ارتباط و هم‌کاری میان آنزیم‌های مشغول در فرایند پاک‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن موجب حفاظت از سلول‌ها و بافت‌ها در برابر اثرات مخرب اکسیدان‌ها گردد. در نتیجه، حتی تغییرات ناچیزی در غلظت طبیعی این آنزیم‌ها ممکن است موجب ازمه پاشیدگی مولکول‌های زیستی در مقابل تهاجم‌های اکسیدانی شوند و همچنین اختلال در سیستم‌های دفاعی بدن را ایجاد نمایند (۲). در این مطالعه، آزمایش‌ها نشان داد که مصرف آسپارتام منجر به کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام، سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتیون پراکسیداز در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی آسپارتام می‌شود. این نتایج با تحقیقات قبلی همخوانی داشت (۲، ۳، ۱۵). در مقابل در این مطالعه آسپارتام میزان مالون‌دی‌آلدئید را در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی آسپارتام افزایش داده بود. گزارشات پیشین افزایش سطح مالون‌دی‌آلدئید را در موش‌های دریافت‌کننده‌ی آسپارتام نشان داده است (۲، ۳) که با نتایج حاصل در این مطالعه هم‌راستا می‌باشد.

مشاهدات هیستومورفولوژی توسط میکروسکوپ نوری در پژوهش‌های پیشین نشان می‌دهند که قرار گرفتن در معرض آسپارتام موجب تغییر ساختار بافتی از قبیل ادم، نکروز، به‌هم‌ریختگی نظم سلولی، دژنراسیون، پیکنوز هسته‌ی سلول‌ها و در نهایت آپوپتوز سلولی می‌گردد (۵، ۶). در همین راستا در مطالعه‌ی دیگری بیان شده که مصرف آسپارتام طی یک دوره‌ی درمانی شش هفته‌ای موجب تخریب سلول‌های اپی‌تلیوم سطح مخاط و به‌هم چسبندگی و تخریب بخش‌های وسیعی از پرزهای روده‌ای در موش‌های ماده‌ی نابالغ بآلبسی شده است. همچنین تحلیل رفتن بخش‌های رأسی برخی از پرزها نیز در این مطالعه مشخص شد (۱۶).

در تحقیق دیگری که توسط Chiedozie و همکاران در سال ۲۰۲۲ بر روی رت‌های نر نژاد ویستار انجام شد، مشخص گردید که مصرف آسپارتام باعث آتروفی سلول‌های اپی‌تلیوم مخاط، سلول‌های جامی شکل و غدد روده‌ای شده و موجب تخریب لامینا پروپریا و ماهیچه مخاطی در روده‌ی بزرگ می‌شود که این نتایج با یافته‌های این مطالعه در

## نتیجه‌گیری

با جمع‌بندی یافته‌های این مطالعه، مشخص می‌شود که آسپارتام در طول یک دوره‌ی زمانی طولانی منجر به اثرات مخربی در سیستم گوارشی می‌شود. افزایش تولید رادیکال‌های آزاد، ایجاد تنش‌های اکسیداتیو و ضعف سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن، منجر به اختلالات مختلف در پارامترهای هیستومورفولوژی، هیستومورفومتری، بیوشیمیایی و تغییرات هیستوشیمیایی در موش‌های دریافت‌کننده‌ی آسپارتام می‌شود. این اختلالات قادر به تخریب عملکرد فیزیولوژیک سیستم گوارشی، به ویژه اجزای مختلف روده‌ی کوچک، می‌باشند. علاوه بر این، مشاهدات نشان می‌دهند که دریافت آسپارتام ممکن است تحت تأثیر استرس اکسیداتیو باعث افزایش بیان ژن Caspase-3 شود. این ژن یکی از ژن‌های کلیدی در مراحل آپوپتوز سلولی است و توانایی القا کردن آپوپتوز را دارد. با این وجود، تصدیق آسیب‌ها و خطرات آسپارتام در سایر قسمت‌های دستگاه گوارشی نیازمند انجام مطالعات تجربی گسترده‌تر و همچنین انجام کارآزمایی‌های بالینی می‌باشد.

## تشکر و قدردانی

نگارندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه تهران به سبب حمایت‌های شان از این مطالعه اعلام دارند. این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکتری تخصصی (Ph.D) دانشگاه تهران می‌باشد که توسط شورای پژوهشی دانشگاه تهران مورد تأیید قرار گرفته است.

در حالی است که مطالعات قبلی نیز نشان دادند که مصرف آسپارتام موجب تغییر در میزان رشته‌های کلاژن در بافت‌های موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی می‌شود (۵، ۱۹). به این ترتیب، از نتایج مطالعه پیداست که مصرف آسپارتام ممکن است تأثیرات قابل توجهی را بر روی میزان رشته‌های کلاژن و به دنبال آن بروز فیبروز در قسمت‌های مختلف دستگاه گوارش ایجاد کند. این مشاهدات با نتایج مطالعات قبلی همخوانی داشت (۵، ۱۹).

استرس اکسیداتیو، نقش بسیار مهمی در ایجاد و پیشرفت آپوپتوز بافتی دارد. با توجه به وضعیت سرکوب آنتی‌اکسیدانی در حیوانات مواجه یافته با آسپارتام و در نظر گرفتن نقش آپوپتوز ناشی از استرس اکسیداتیو، می‌توان نتیجه گرفت که افزایش آپوپتوز در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی آسپارتام ممکن است به دلیل تولید استرس اکسیداتیو ناشی از اکسیداسیون متانول باشد (۱۵). حین فرایند اکسیداسیون متانول، رادیکال‌های آزاد تولید شده منجر به آسیب به ساختار ماکرومولکول‌های سلولی می‌شوند. نتایج تحقیقات ما نشان داد که بیان ژن Caspase-3 در مناطق مختلف روده‌ی کوچک افزایش یافته است. این ژن نقش کلیدی در آپوپتوز دارد و تغییرات هیستومورفولوژیک سلولی و بافتی در طی فرایند آپوپتوز را تنظیم می‌کند. این نتایج نشان داد که مصرف طولانی‌مدت آسپارتام، منجر به ایجاد آپوپتوز با افزایش بیان میانجی‌های آپوپتوز می‌شود. این تفسیر با تحقیقات دیگری که افزایش بیان میانجی‌های آپوپتوزی، به ویژه Caspase-3، در بافت‌های مختلف حیوانات آزمایشگاهی پس از مصرف طولانی‌مدت آسپارتام را گزارش کرده‌اند، همخوانی دارد (۳، ۵، ۶).

## References

1. Sheibani MT, Anbara H, Morovvati H, Razi M, SalarAmoli J. Effect of long term-administration of aspartame on sperm quality, testosterone and oxidant parameters in mice [in Persian]. J Ilam Univ Med Sci 2019; 27(3): 150-61.
2. 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.
3. 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.
4. Tobey NA, Heizer WD. Intestinal hydrolysis of aspartylphenylalanine--the metabolic product of aspartame. Gastroenterology 1986; 91(4): 931-7.
5. 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 [in Persian]. Qom Univ Med Sci J 2021; 15(6): 414-25.
6. Anbara H, Kian M, Darya GH, Sheibani MT. Long-term intake of aspartame-induced cardiovascular toxicity is reflected in altered histochemical parameters, evokes oxidative stress, and trigger P53-dependent apoptosis in a mouse model. Int J Exp Pathol 2022; 103(6): 252-62.
7. Onaolapo AY, Onaolapo OJ, Nwoha PU. Alterations in behaviour, cerebral cortical morphology and cerebral oxidative stress markers following aspartame ingestion. J Chem Neuroanat 2016; 78: 42-56.
8. Anbara H, Shalizer Jalali A, Shahrooz R, Razi M. Protective effect of royal jelly against phenylhydrazine-induced histological injuries of small intestine of mice: morphometric analyses [in Persian]. Qom Univ Med Sci J 2016; 9(11): 12-21.
9. Oyama Y, Sakai H, Arata T, Okano Y, Akaike 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.

10. Morovvati H, Koohi MK, Khaksar Z, Morshedi F, Anbara H, Parsaei F, et al. Histological and histometrical study of prostate following administration of sertraline in adult mice. *Iran South Med J* 2020; 23(3): 205-221.
11. Beck B, Burllet 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.
12. Leme FAGdL, Azoubel R. Effects of aspartame on exocrine pancreas of rat fetuses. *Int J Morphol* 2006; 24(4): 679-84.
13. Gul SS, Hamilton ARL, 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.
14. 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.
15. Ashok I, Sheeladevi R, Wankhar D. Long term effect of aspartame (Artificial sweetener) on membrane homeostatic imbalance and histopathology in the rat brain. *Free Radicals and Antioxidants* 2013; 3(Suppl): S42-S49.
16. Hooshmand Abbasi R, Tootian Z, Sheibani MT, Fazelpour S, Limouei H. Histological and histometrical study of duodenum in mice after ingestion of Aspartame [in Persian]. *Journal of Veterinary Research* 2016; 71(2): 205-10.
17. Chiedozie MC, Donatus EG, Amoo-Tella SY, Enang UAI. Moringa oleifera seed actions following aspartame consumption: a systematic evaluation of the large intestine. *Sch Int J Anat Physiol* 2022; 5(1): 15-24.
18. Shil A, Chichger H. Artificial sweeteners negatively regulate pathogenic characteristics of two model gut bacteria, *E. Coli* and *E. Faecalis*. *Int J Mol Sci* 2021; 22(10): 5228.
19. Morovvati H, Anbara H, Sheibani M, Koohi M, Hasanzadeh A. The effect of long-term exposure to aspartame on histomorphometric and histochemical adrenal gland in adult NMRI Mice [in Persian]. *Armaghan-e-Danesh* 2019; 24(2): 150-69.
20. Anbara H, Shahrooz R, Shalizar Jalali A, Razi M, Kalantari Hesari A. Protective effect of vitamin C against hemolytic anemia-induced changes in small intestine histoarchitecture of phenylhydrazine-treated mice [in Persian]. *J Shahrekord Uuniv Med Sci* 2015; 17(4): 70-9.
21. Anbara H, Shahrooz R, Mozafari AA, Malekinejad H, Morovvati H, Sheybani MT, et al. Protective Effects of Ethyl Pyruvate and Vitamin E Against Phenylhydrazine-Induced Nephrotoxicity in Mice [in Persian]. *Yafte* 2018; 20(1): 52-67.

## The Effect of Long-term Exposure to Aspartame on Histomorphology, Histomorphometry, Histochemistry and Expression of Caspase-3 Gene in the Small Intestine of Mice

Seyed Ehsan Rahmani<sup>1</sup>, Hassan Morovvati<sup>2</sup>, Hojat Anbara<sup>3</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Aspartame is a member of the artificial sweetener family, which is increasingly used in diet products, low-calorie foods, and various types of foods, medications, and hygiene products. The present study was conducted to evaluate the effects of aspartame on the small intestine of mice.

**Methods:** In this experimental study, 36 adult male mice were randomly divided into four groups of nine each. Three groups received aspartame orally via gavage at doses of 40, 80, and 160 mg/kg.BW, respectively, for 90 days. Additionally, a control group was included. 24 hours after the last treatment, serum, and tissue samples were collected for biochemical, histomorphological, histomorphometrical, histochemical, and gene expression analyses.

**Findings:** Significant changes in carbohydrate compositions were not observed in the histochemical studies between the groups, but the amount of fibrous tissue increased in the groups receiving aspartame. In histomorphometric evaluations of the small intestine, aspartame at doses of 80 and 160 mg/kg. BW caused a significant reduction in histomorphometrical parameters compared to the control group. Aspartame administration dose-dependently led to significant changes in oxidative parameters compared to the control group. Additionally, the expression of the Caspase-3 gene showed a significant increase in the group receiving aspartame at a dose of 160 mg/kg. BW compared to the control group.

**Conclusion:** It seems that aspartame can cause negative effects on histomorphology, histomorphometry, histochemistry, and oxidative parameters in a dose-dependent manner and increases the expression of the Caspase-3 gene in the small intestine.

**Keywords:** Aspartame; Small intestine; Histology; Caspase-3

**Citation:** Rahmani SE, Morovvati H, Anbara H. **The Effect of Long-term Exposure to Aspartame on Histomorphology, Histomorphometry, Histochemistry and Expression of Caspase-3 Gene in the Small Intestine of Mice.** J Isfahan Med Sch 2023; 41(737): 884-95.

1- PhD Candidate, Department of Comparative Histology and Embryology, School of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

2- Professor, Department of Comparative Histology and Embryology, School of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

3- PhD, Department of Comparative Histology and Embryology, School of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

**Corresponding Author:** Hassan Morovvati, Professor, Department of Comparative Histology & Embryology, School of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran; Email: hmorovvati@ut.ac.ir