

Original Paper

Effect of Aspartam on histomorphometric alterations, kidney function and expression of Bcl2, Bax, Caspase 3, P53 Genes in Mice

Narges Zadsar, Ph.D Candidate in Comparative Anatomy and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

ORCID 0000-0002-6905-634X

*Hassan Morovvati (Ph.D), Corresponding Author, Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. E-mail: hmorovvati@ut.ac.ir

ORCID 0000-0003-0275-1636

Zahra Tootian (Ph.D), Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

ORCID 0000-0002-1260-080X

Mohammadtaghi Sheybani (Ph.D), Associate Professor, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

ORCID 0000-0002-8874-3516

Mohammad Taheri (B.Sc), Expert of Dr. Rastegar Laboratories, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

ORCID 0000-0002-9510-5125

Hojat Anbara, Ph.D in Comparative Histology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

ORCID 0000-0002-3472-9460

Abstract

Background and Objective: Aspartame is a kind of artificial and non-sugar sweetener that is used as a sugar substitute in some foods and beverages. This study was done to determine effect of Aspartam on histomorphometric alterations, kidney function and expression of Bcl2, Bax, Caspase 3, P53 Genes in Mice.

Methods: In this experimental study, 36 adult male NMRI mice were allocated into four groups including control group and three experimental groups. The mice in the control group received 0.3 ml of distilled water by oral gavage for 90 days and the experimental groups received 40, 80 and 160 mg/kg aspartame, respectively orally and daily. One day after treatment, blood and kidney tissue samples were taken to evaluate biochemical, histomorphometric alterations and gene expression.

Results: Renal capsule diameter, glomerulus diameter and height of the epithelial layer of distal and proximal tubules were significantly reduced in treated groups compared to control group with increasing dosage of aspartame ($P<0.05$). However, the size of the urinary space and the diameter of the lumen of distal and proximal tubules were significantly increased in treated groups in compared to control group ($P<0.05$). The level of blood nitrogen urea (BUN) and creatinine significantly increased treated groups in compared to the control group with increasing dosage of aspartame ($P<0.05$). Also, with increasing dosage of aspartame, Bcl2 gene expression significantly reduced in treated groups in compared to the control group ($P<0.05$) however expression of Bax, Caspase 3 and p53 genes were significantly increased in treated groups compared to the control group ($P<0.05$).

Conclusion: Aspartame can cause changes in biochemical, histomorphometric indices, expression of Bcl2, Bax, Caspase 3 and P53 genes in mice kidney.

Keywords: Aspartame, Kidney, Bcl2 Gene, Bax, Caspase 3, P53 Gene, Mice

Received 10 Feb 2020

Revised 11 Aug 2020

Accepted 12 Aug 2020

Cite this article as: Zadsar N, Morovvati H, Tootian Z, Sheybani M, Taheri M, Anbara H. [Effect of Aspartam on histomorphometric alterations, kidney function and expression of Bcl2, Bax, Caspase 3, P53 Genes in Mice]. J Gorgan Univ Med Sci. 2021 Spring; 23(1): 22-30. [Article in Persian]

اثر آسپارتام بر تغییرات هیستومورفومتریک، عملکرد کلیه و بیان ژن‌های *Bcl2*، *Bax*، *Caspase 3* و *P53* در موش سوری

ORCID 0000-0002-6905-634X

ORCID 0000-0003-0275-1636

ORCID 0000-0002-1260-080X

ORCID 0000-0002-8874-3516

ORCID 0000-0002-9510-5125

ORCID 0000-0002-3472-9460

نرگس زادسور، دانشجوی دکتری تخصصی آناتومی و جنین شناسی مقایسه‌ای، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

* دکتر حسن مروتی، استاد، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران.

دکتر زهرا طوطیان، استاد، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران.

دکتر محمدتقی شیبانی، دانشیار، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

محمد طاهری، کارشناس آزمایشگاه‌های دکتر رستگار، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

دکتر حجت عنبرآ، دکتری تخصصی بافت شناسی مقایسه‌ای، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: آسپارتام نوعی شیرین کننده مصنوعی و غیرقندی است که به عنوان جایگزین قند در برخی از غذاها و نوشابه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. این مطالعه به منظور تعیین اثر آسپارتام بر تغییرات هیستومورفومتریک، عملکرد کلیه و بیان ژن‌های *Bcl2*، *Bax*، *Caspase 3* و *P53* در موش سوری انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی تعداد ۳۶ سر موش نر بالغ نژاد *NMRI* در ۴ گروه ۹ تایی، یک گروه کنترل و سه گروه آزمایشی قرار گرفتند. موش‌ها در گروه کنترل به مدت ۹۰ روز ۰/۳ میلی‌لیتر آب مقطر به روش گاوژ و به صورت خوراکی دریافت نمودند و گروه‌های تجربی به ترتیب ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن آسپارتام را به روش گاوژ و خوراکی دریافت کردند. یک روز پس از دوره بیمار، نمونه‌های خون و هیستولوژی برای ارزیابی پارامترهای بیوشیمیایی، هیستومورفومتري و بیان ژن اخذ گردید. یافته‌ها: قطر جسمک کلیوی، قطر کلافه مویرگی و ارتفاع لایه اپیتلیوم لوله‌های پیچیده دور و نزدیک با افزایش دوز مصرفی آسپارتام در مقایسه با گروه کنترل به صورت چشمگیری کاهش داشت ($P < 0/05$)؛ اما اندازه فضای ادراری و قطر دهانه داخلی لوله‌های پیچیده دور و نزدیک در مقایسه با گروه کنترل به صورت معنی‌دار افزایش یافت ($P < 0/05$). با افزایش دوز مصرفی آسپارتام، میزان نیتروژن اوره و کراتینین خون در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0/05$). با افزایش دوز مصرفی آسپارتام میزان بیان ژن *Bcl2* در مقایسه با گروه کنترل به صورت چشمگیری کاهش یافت ($P < 0/05$). در حالی که میزان بیان ژن‌های *Bax*، *Caspase 3* و *P53* در مقایسه با گروه کنترل به صورت معنی‌دار افزایش یافتند ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: آسپارتام می‌تواند سبب تغییرات بیوشیمیایی، تغییرات هیستومورفومتریک کلیه و بیان ژن‌های *Bcl2*، *Bax*، *Caspase 3* و *P53* در موش سوری گردد.

کلید واژه‌ها: آسپارتام، کلیه، *Bcl2*، *Bax*، *Caspase 3*، ژن *P53*، موش سوری

* نویسنده مسؤل: دکتر حسن مروتی، پست الکترونیکی hmorovvati@ut.ac.ir

نشانی: تهران، خیابان آزادی، دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه، بخش بافت شناسی، تلفن ۰۲۱-۶۱۱۱۷۱۷، شماره ۶۶۹۲۹۵۳۲

وصول مقاله: ۱۳۹۸/۱۱/۲۱، اصلاح نهایی: ۱۳۹۹/۰۵/۲۱، پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۵/۲۲

مقدمه

مصرف و تحت شرایط اسیدی یا قلیایی هیدرولیز و به مولکول‌های تشکیل دهنده آن یعنی متانول، اسید آسپارتیک و فنیل آلانین تجزیه می‌گردد (۲). این شیرین کننده مصنوعی حدود ۲۰۰ برابر شیرین‌تر از ساکارز (قند طبیعی) است (۱). طبق آمار و اطلاعات سازمان غذا و دارو آمریکا (FDA) میزان دوز روزانه قابل قبول استفاده از این ترکیب در ایالات متحده آمریکا 50 mg/kg/BW و در اروپا 40 mg/kg/BW است. اثرات سوء آسپارتام بر روی اندام‌های حیاتی بدن همانند کلیه و کبد را می‌توان به متابولیت‌های حاصل از متابولیسم این ماده از جمله متانول و فرم آلدهید و همچنین به ایجاد

آسپارتام شیرین کننده‌ای مصنوعی و غیرقندی است که به عنوان جایگزین قند در برخی از غذاها و نوشابه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ترکیب در سال ۱۹۶۵ به طور کاملاً اتفاقی توسط جیمز شلاتر که یک داروساز بود؛ کشف شد (۱). در بررسی‌های سال ۱۹۸۳ فرضیه سرطان‌زایی آن در موش‌های آزمایشگاهی رد و استفاده از آن در انواع نوشیدنی‌ها و محصولات پخته شده تصویب شد. آسپارتام یک متیل استر دی‌پیتید از اسید آمینه‌های طبیعی ال آسپارتیک اسید، ال فنیل آلانین و متانول است. آسپارتام پس از

می‌شوند. کاسپاز ۳ به عنوان آخرین فاکتور در فرایند آپوپتوز به شمار می‌رود. این ژن در حقیقت مسرول 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. متعاقب بروز استرس‌های مولکولی و یا آسیب در غشای میتوکنندری، پروتئین‌های Bax اولیگومر می‌شوند که به نوبه خود باعث ایجاد حفراتی در غشاء میتوکنندری می‌شود که در پی این فرایند با آزاد شدن سیتوکروم C به درون سیتوزول، روند آپوپتوز آغاز می‌شود. در مورد پروتئین p53 می‌توان بیان نمود که از میان عملکردهای فراوان این پروتئین، مهار رشد غیرطبیعی سلول‌ها و آغاز مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌ها (آپوپتوز) در درجه اول اهمیت است (۱۶).

Qu و همکاران در سال ۲۰۱۹ اثرات همزمان چند شیرین کننده از جمله آسپارتام را بر روی رده سلول‌های سرطانی هپاتیک انسانی بررسی و دریافته‌اند که آسپارتام از طریق افزایش گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) سبب آغاز فرآیند آپوپتوز می‌شود (۱۷).

بیشتر شیرین کننده‌های مصنوعی توانسته‌اند با افزایش رادیکال‌های آزاد موجب تغییراتی در قسمت‌هایی از دستگاه‌های بدن شوند. آسپارتام نیز می‌تواند موجب تغییراتی در عملکرد این ساختارها شود. همچنین دفع فرم آلدئید که ماده حاصل از متابولیسم آسپارتام است؛ از طریق کلیه‌ها صورت می‌گیرد (۱۸)؛ احتمالاً مواد حاصل از هیدرولیز این ماده و به ویژه متانول که در کبد به فرم آلدئید اکسیده شده در کلیه تجمع می‌یابد. از این رو جهت بررسی تغییرات ایجاد شده در کلیه حین دفع متابولیت‌ها این عضو انتخاب گردید. این مطالعه به منظور تعیین اثر آسپارتام بر تغییرات هیستومورفومتریک، عملکرد کلیه و بیان ژن‌های Bax، Bcl2، Caspase 3 و P53 در موش سوری انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی روی ۳۶ سر موش نر بالغ نژاد NMRI در محدوده وزنی ۳۵-۲۵ گرم در دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران طی سال‌های ۹۸-۱۳۹۷ انجام شد.

پروتکل کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید و مطالعه مورد تایید (کد اخلاق ۳۰۰۲۹/۶/۱۴) دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران قرار گرفت.

موش‌های نر توسط فیکساتیو بوئن نشان‌دار شده و به ۴ گروه ۹ تایی به شرح زیر تقسیم شدند.

گروه کنترل: دریافت کننده ۰/۳ میلی‌لیتر آب مقطر خوراکی روزانه به روش گاواژ طی مدت ۹۰ روز (۱۸ و ۱۹).

گروه تجربی اول (آسپارتام ۱): دریافت کننده آسپارتام خوراکی به میزان ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بر وزن بدن روزانه به روش گاواژ

تغییرات عملکردی و ساختاری میکروپ‌های روده‌ای نسبت داد (۳-۵). Edmundson و Manion اعلام کردند که آسپارتام باعث تسکین درد، القاء اثرات خفیف ضدسرطانی در انسان و کاهش تب در حیوانات می‌گردد (۶). اثرات ضدتب و ضد درد آسپارتام به عنوان یک عامل بالقوه درمانی نیز گزارش شده است (۷). آسپارتام در دوزهای ۴ و ۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت تزریقی باعث فعالیت ضد التهابی معنی‌داری در موش می‌شود (۷). در یک مطالعه که خواص ضد التهابی آسپارتام به تنهایی و همچنین ترکیب با داروهای مختلف ضد التهابی مورد بررسی قرار گرفت؛ مشخص شد که آسپارتام در دوزهای ۴، ۸ و ۱۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن واکنش قابل توجهی در موش صحرایی در برابر خیز پنجه پا نشان داده است (۸).

مطالعات بیشتر در این زمینه نشان داد که آسپارتام ممکن است، انتقال دهنده‌های عصبی و گیرنده‌های مغز را تحت تاثیر قرار دهد و این اثرات ممکن است با مصرف طولانی مدت آسپارتام شدیدتر شود (۹). در همین زمینه نتایج Kim و همکاران بر روی ماهی زبرا (zebrafish) نشان داد که مصرف آسپارتام باعث التهاب شدید سلول‌های کبدی در ماهی زبرا می‌گردد. همچنین این محققین اعلام کردند که آسپارتام باعث نقص شدید نورون‌های حرکتی و عضلات خصوصاً در زمان بالا بودن جیره حاوی کلسترول می‌گردد (۱۰). در پژوهش انجام شده توسط Hozayen و همکاران با تجویز ۱۰۰۰ mg/kg آسپارتام به مدت ۱۸۰ روز اسکروتیک شدن عروق خونی قشر کلیه و تورم سلول‌های پوششی دیواره توبول‌ها مشاهده شد؛ اما در گروه دریافت کننده همان دوز آسپارتام همراه با ۱۲۵ mg/kg عصاره آبی رزماری ضایعه‌ای در بافت کلیه رخ نداد که ناشی از اثرات آنتی اکسیدانی رزماری در برابر سمیت آسپارتام بود (۱۱).

آپوپتوز یک فرآیند سلولی محافظت کننده است که نقش مهمی در توسعه و هومئوستاز بافت طبیعی و نیز عوامل پیدایش بیماری‌ها بازی می‌کند. این پدیده در شرایط طبیعی باعث می‌شود که سلول‌های پیر، آسیب دیده، اضافی و مضر حذف شوند و برای تکامل و ترمیم بافت ضروری است. هرگونه اختلال در روند آپوپتوز، کاهش یا افزایش نامتعرف مرگ سلولی و در نهایت بیماری را موجب می‌شود (۱۵-۱۲). مسیرهای درگیر در تحریک فرآیند 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 می‌گردد. در صورت کاهش بیان پروتئین Bcl-2 در غشای میتوکنندری‌ها، تولید و سنتز سیتوکروم‌ها افزایش می‌یابد که به ایجاد تغییر در نفوذپذیری و فعالیت غشای میتوکنندری‌ها انجامیده و سیتوکروم‌های C درون سیتوپلاسم آزاد

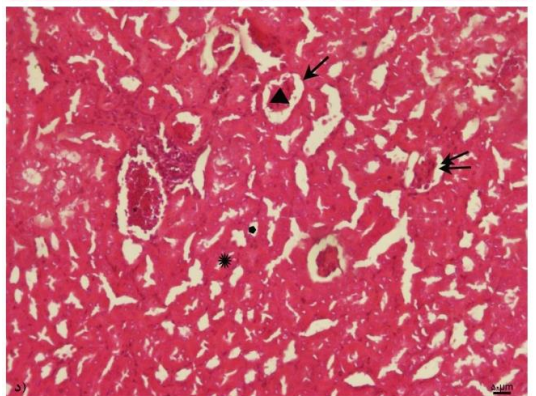
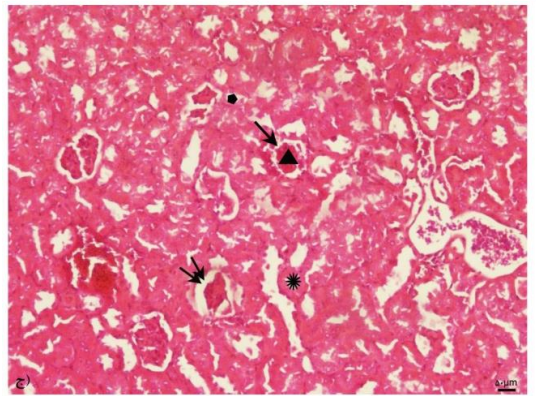
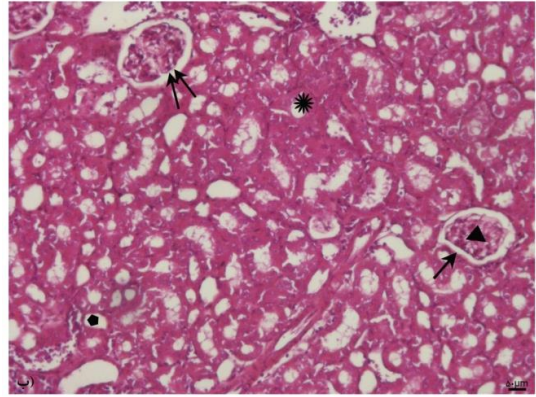
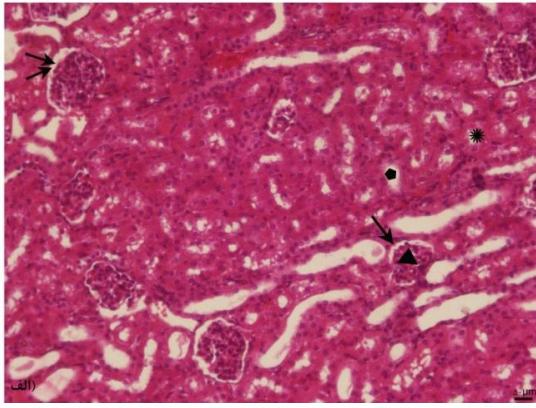
طی مدت ۹۰ روز (۲۰۱۹). گروه تجربی دوم (آسپاراتام ۲): دریافت کننده اسپاراتام خوراکی به میزان ۸۰ میلی گرم بر کیلوگرم بر وزن بدن روزانه به روش گاواژ طی مدت ۹۰ روز (۲۰۱۹). گروه تجربی سوم (آسپاراتام ۳): دریافت کننده اسپاراتام خوراکی به میزان ۱۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم بر وزن بدن روزانه به روش گاواژ طی مدت ۹۰ روز (۲۰۱۹). یک روز پس از پایان دوره تیمار، موش‌ها آسان کشتی شدند و مستقیماً از قلب آنها خونگیری به عمل آمد و در لوله‌های آزمایش فاقد ماده ضدانعقاد جمع‌آوری گردید. پس از باز کردن محوطه شکمی موش‌ها، کلیه‌ها خارج شدند. برای بررسی پارامترهای هیستولوژیک، کلیه را در فرمالین قرار داده و پس از ثبوت و آنگیری نمونه‌ها با اتانول صعودی ۷۰، ۹۰، ۹۵ و ۱۰۰ درصد به مدت یک ساعت و شفاف سازی با محلول گزیلول، قالب‌های پارافینی تهیه شدند و مقاطع بافتی ۵-۶ میکرونی با میکروتوم تهیه گردید. برش‌ها، پس از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین مورد مطالعه قرار گرفتند (۲۱). خون به دست آمده هر نمونه با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید تا سرم از لخته جدا شود و با استفاده از سمپلر سرم جمع‌آوری شد. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. به منظور آنالیز فاکتورهای BUN و کراتینین از کیت‌های سنجش بیوشیمیایی تجاری پارس آزمون و به کمک دستگاه اتوآنالایزر B.T3000 ساخت کشور آلمان به روش اسپکتروفتومتری استفاده شد.

برای بررسی بیان ژن‌های آپوپتوتیک از ۵ سر موش در هر گروه استفاده شد. ابتدا مقداری از بافت کلیه به وسیله تیغ بیستوری جدا و خرد شد و سپس توسط محلول RNX-Plus شرکت سیناژن استخراج RNA انجام شد. همچنین از کیت استخراج RNA RevertAid First Strand cDNA Synthesis شرکت فرمتاز برای سنتز cDNA استفاده شد. ابتدا مقدار مشخصی از RNA مربوط به هر ژن را با ۱ میکرولیتر dT Oligo و ۱ میکرولیتر پرایمر

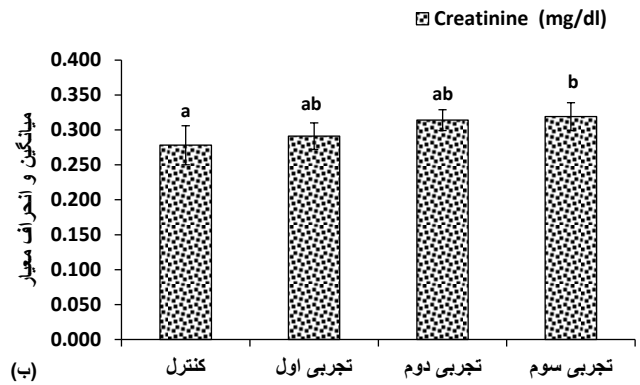
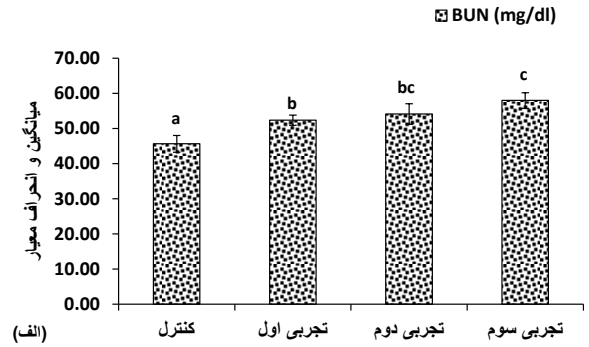
Random Hexamer ترکیب کرده و به حجم ۱۲ میکرولیتر رساندیم و پس از سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید و محلولی شامل ۴ میکرولیتر 5x Reaction Buffer، ۱ میکرولیتر RNase Inhibitor، ۲ میکرولیتر Reverse M-Mulv، ۱ میکرولیتر 10Mm dNTP Mix، ۱ میکرولیتر ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۲۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در آخر یک گرمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه به محلول وارد شد. برای انجام Real time pcr، از ژن‌های Bax، Bcl2، Caspase 3 و P53 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 R، ۵ میکرولیتر cDNA و ۱/۷ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز بود. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه از شرکت سیناژن تهیه شدند. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول یک ارائه شده است.

جدول ۱: توالی و تعداد پرایمر ژن‌های *Bax*، *bcl2*، *Caspase 3*، *P53* و ژن کنترل داخلی *GAPDH* (۲۴-۲۲)

ژن	توالی	اندازه (bp)
<i>Bcl-2</i>	FWD: CTGGTGGACAACATCGCTCTG REV: GGTCTGCTGACCTCACTTGTG	۲۲۶ جفت باز
<i>Bax</i>	FWD: TGCAGAGGATGATTGCTGAC REV: GATCAGCTCGGGCACTTTAG	۱۷۶ جفت باز
<i>Caspase-3</i>	FWD: AGTTGGACCCACCTTGTGAG REV: AGTCTGCAGCTCCTCCACAT	۲۹۸ جفت باز
<i>P53</i>	FWD: ACATAGTGTGGTGGTCCCT REV: ACCTCAAAGCTGTTCCGTCC	۱۵۲ جفت باز
<i>GAPDH</i>	FWD: GAACATCATCCCTGCATCCA REV: CCAGTGAGCTTCCCGTCA	۶۸ جفت باز



شکل ۱: بافت کلیه گروه کنترل (الف)؛ گروه تجربی اول (ب) دوز ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن اسپارتام؛ گروه تجربی دوم (ج) دوز ۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن اسپارتام؛ گروه تجربی سوم (د) دوز ۱۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن اسپارتام. علامت * نشان دهنده جسمک کلیوی شامل گلومرول (علامت ▲) و فضای ادراری (علامت ▲) است. علامت * نشان دهنده لوله های پیچیده نزدیک و علامت * نشان دهنده لوله های پیچیده دور است. درشت نمایی ۱۰۰×، رنگ آمیزی هماتوکسیلین - اتوزین



نمودار ۱: مقایسه نیتروژن اوره خون (BUN) (الف) و کراتینین (ب) بین گروه کنترل و گروه‌های تجربی اول، دوم و سوم به ترتیب دریافت کننده دوزهای ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن اسپارتام. حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) بین گروه‌ها است.

پارامترهای بیان ژن: بررسی نتایج حاصل از Real Time PCR

نشان داد که میزان بیان ژن Bcl2 در همه گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل دارای کاهش معنی دار بودند ($P < 0.05$). این در حالی بود که بین گروه‌های تجربی با هم هیچگونه اختلاف معنی داری مشاهده نگردید (نمودار ۲). نتایج حاصل از بررسی ژن Bax افزایش معنی داری در میزان بیان این ژن بین گروه‌های تجربی با گروه کنترل نشان داد ($P < 0.05$) و در رابطه با این فاکتور گروه تجربی سوم با گروه‌های تجربی اول و دوم نیز دارای اختلاف معنی دار بود ($P < 0.05$). در صورتی که هیچگونه اختلاف معنی دار و چشمگیری در میزان بیان این ژن در گروه تجربی دوم نسبت به گروه تجربی اول مشاهده نگردید (نمودار ۲). در مورد ژن Caspase 3 این اختلاف معنی دار تنها بین گروه‌های تجربی دوم و سوم در مقایسه با گروه‌های کنترل و تجربی اول مشاهده گردید ($P < 0.05$). به طوری که گروه تجربی اول با گروه کنترل و گروه‌های تجربی دوم و سوم با هم اختلاف معنی داری نداشتند (نمودار ۲). بررسی میزان بیان ژن p53 نشان داد که گروه‌های تجربی دوم و سوم در مقایسه با گروه کنترل و گروه تجربی اول دارای افزایش معنی دار بودند ($P < 0.05$) و در مورد میزان بیان این ژن گروه تجربی اول در

و نزدیک و متعاقب آن افزایش قطر دهانه داخلی این لوله‌ها باشد. Sayed Saleh بر روی موش‌های صحرایی نر دریافت‌کننده آسپاراتام مطالعه‌ای انجام داد و مشاهده کرد که افزایش معنی‌داری در میزان نیتروژن اوره خون (BUN)، کراتینین و پتاسیم سرم خون این موش‌ها وجود دارد (۲۸) که نتایج حاصل از این بررسی با مطالعه حاضر هم‌راستا است. از سوی دیگر در مطالعه طوطیان و همکاران که بر روی اندازه غشای پایه لوله‌های ادراری انجام شد؛ مشخص گردید که ضخامت غشای پایه لوله‌های ادراری موش‌های دریافت‌کننده آسپاراتام نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است (۲۹) و از آنجایی که کاهش ضخامت این لایه، می‌تواند در عمل تراوش که از عوامل مهم در تشکیل ادرار است؛ نقش موثری داشته باشد؛ پس می‌توان اینگونه بیان نمود که نقص در عمل تراوش متعاقب استفاده از آسپاراتام سبب افزایش میزان کراتینین و نیتروژن اوره خون می‌گردد که این خود می‌تواند دلیلی بر اثبات نتایج از حاصل مطالعه حاضر باشد.

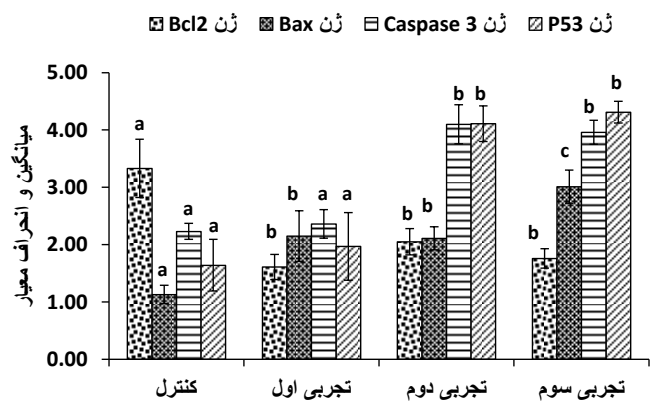
نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که با افزایش میزان دوز مصرفی آسپاراتام بیان ژن‌های Bax، Caspase III و p53 به صورت معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل افزایش می‌یابد. این در حالی است که میزان بیان ژن‌های Bcl2 در مقایسه با گروه کنترل به صورت معنی‌دار کاهش یافت. همانگونه که در مطالعه Ashok و Sheeladevi بر روی اثرات آسپاراتام بر بیان ژن‌های Bax، Caspase 3 و Bcl2 در سلول‌های مغزی انجام شد؛ مصرف آسپاراتام سبب افزایش بیان ژن‌های Bax و Caspase 3 و کاهش بیان Bcl2 شده است (۲۴).

از آنجایی که به نظر می‌رسد میتوکندری نقش مهمی در تنظیم آپوپتوز سلول بازی می‌کند؛ پس ورود ژن‌هایی همانند Bax به داخل میتوکندری باعث ایجاد منافذی در غشای این اندامک می‌شود که در نتیجه آن پروتئین‌هایی از جمله سیتوکروم C آزاد شده و وارد سیتوزول می‌شود و باعث شروع پیام‌رسانی آپوپتوتیک و در نتیجه فعال شدن کاسپاز ۳ می‌شود و در نهایت از این طریق آپوپتوز و مرگ سلولی رخ می‌دهد (۳۰).

Bcl2 ژنی است که با افزایش بیان از طریق مهار فعالیت‌های پیش‌آپوپتوزی و به‌وسیله جلوگیری از جابجایی عوامل آپوپتوزی سلول به داخل میتوکندری عمل می‌کند (۳۰). این یافته با نتایج حاصل از مطالعه Ziaaldini و همکاران هم‌راستا است که در آن بیان گردید Bcl2 از طریق به حداقل رساندن نفوذپذیری میتوکندری سلول‌ها توسط ژن Bax باعث جلوگیری از آپوپتوز سلولی می‌شود (۳۱).

پروتئین P53 توسط ژن سرکوبگر تومور P53 واقع بر روی کروموزوم شماره ۱۷ رمزگذاری می‌شود که این پروتئین به طور

مقایسه با گروه کنترل و نیز گروه تجربی دوم در مقایسه با گروه تجربی سوم اختلاف چشمگیر و معنی‌داری نداشتند (نمودار ۲).



نمودار ۲: مقایسه بیان ژن‌های Bcl2، Bax، Caspase 3 و P53 نسبت به ژن کنترل داخلی GAPDH بین گروه کنترل و گروه‌های تجربی اول، دوم و سوم به ترتیب دریافت‌کننده دوزهای ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن آسپاراتام. حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) بین گروه‌ها است.

بحث

بسیاری از مطالعات تجربی نشان می‌دهد که مصرف آسپاراتام باعث افزایش آسیب‌های کلیوی و در نتیجه کاهش عملکرد کلیه می‌شود. نتایج هیستومورفومتریک این پژوهش در مورد قطر جسمک کلیوی و کلافه مویرگی نشان داد که در گروه‌های تجربی میزان این فاکتورها نسبت به گروه کنترل با افزایش میزان دوز کاهش معنی‌داری یافته است. در مطالعاتی نشان داده شده که اثرات سمی مواد حاصل از متابولیسم آسپاراتام همانند فرم آلدئید و متانول بر روی کلیه به صورت تجمع ماده توکسیک توانسته است موجب ایجاد مرگ سلولی در لوله‌های کلیوی شود. براساس مطالعات مختلف فرم آلدئید و متانول اصلی‌ترین متابولیت‌های حاصل از هیدرولیز آسپاراتام در بدن هستند و از آنجایی که متانول حاصله خود در کبد به فرم آلدئید اکسیده شده و از طرفی فرم آلدئید از طریق کلیه دفع می‌گردد؛ پس احتمال می‌رود که تجمع این ماده در کلیه بر ساختار هیستومورفومتریک این ارگان اثرگذار باشد (۲۵).

عدم فعالیت تعدادی از آنزیم‌های دفاعی بدن که دارای قدرت آنتی‌اکسیدانی در کلیه هستند؛ سبب تخریب غشای پایه سلول‌های بافت کلیوی می‌شوند (۲۶). از طرفی دیگر آسپاراتام از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو موجب کاهش فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز در بافت کلیه شده (۲۷) که این امر تخریب غشاهای سلولی بافت کلیه را تشدید نموده و باعث آسیب به غشای پایه نیز می‌گردد که این موضوع می‌تواند دلیلی قانع‌کننده برای اثبات نتایج حاصل از مطالعه حاضر در راستای کاهش ارتفاع اپتلیوم لوله‌های پیچیده دور

می‌شود.

از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به عدم انجام مطالعات پاتولوژی و استریولوژیکی بافت کلیه متعاقب استفاده از اسپارتام اشاره نمود. بر این اساس انجام تکنیک استریولوژی بافت کلیه و مقایسه داده‌های آن با داده‌های هیستومورفومتري حاصل از مقاله حاضر پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که میزان بیان ژن‌های Bax، Caspase 3 و P53 با عملکرد کلیوی ارتباط عکس و بین میزان بیان ژن Bcl2، ارتفاع لایه اپیتلیوم لوله‌های پیچیده با عملکرد کلیه رابطه مستقیم وجود دارد. لذا بین تمامی فاکتورها و اتفاقاتی که سبب تشدید آپوپتوز و مرگ سلولی می‌شوند؛ با عملکرد کلیوی رابطه عکس وجود دارد که با افزایش میزان آپوپتوز، عملکرد کلیوی کاهش می‌یابد.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه پایان‌نامه (شماره ۹۰۵) خانم نرگس زادسر برای اخذ درجه دکتری تخصصی در رشته آناتومی و جنین‌شناسی مقایسه‌ای از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران بود.

References

- Magnason 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. DOI: 10.1080/10408440701516184
- Ager DJ, Pantaleone DP, Henderson SA, Katritzky AR, Prakash I, Walters DE. Commercial, synthetic Non-nutritive sweeteners. *The German Chemical Society*. 1998 Aug; 37(13-14): 1802-17. DOI: 10.1002/(SICI)1521-3773(19980803)37:13/14<1802::AID-ANIE1802>3.0.CO;2-9
- Nseir W, Nassar F, Assy N. Soft drinks consumption and nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2010 Jun; 16(21): 2579-88. DOI: 10.3748/wjg.v16.i21.2579
- Suez J, Korem T, Zeevi D, Zilberman-Schapira G, Thaiss CA, Maza O, et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*. 2014 Oct; 514(7521): 181-86. DOI: 10.1038/nature13793
- 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. DOI: 10.1023/a:1014419229301
- Edmundson AB, Manion CV. Treatment of osteoarthritis with aspartame. *Clin Pharmacol Ther*. 1998 May; 63(5): 580-93. DOI: 10.1016/S0009-9236(98)90109-6
- Pradhan S, Shah UH, Mathur AG, Sharma S. Aspartame: Sweetener with anti-inflammatory potential? *J Pharmacol Pharmacother*. 2010 Jul; 1(2): 113-14. DOI: 10.4103/0976-500X.72357
- Sharma S, Jain NK, Kulkarni SK. Possible analgesic and anti-inflammatory interactions of aspartame with opioids and NSAIDs. *Indian J Exp Biol*. 2005 Jun; 43(6): 498-502.
- Christian B, McConnaghey K, Betchea E, Brantley S, Coffey A, Hammond L, et al. Chronic aspartame affects T-maze performance, brain cholinergic receptors and Na⁺,K⁺-ATPase in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2004 May; 78(1): 121-27. DOI: 10.1016/j.pbb.2004.02.017
- Kim JY, Seo J, Cho KH. Aspartame-fed zebrafish exhibit acute deaths with swimming defects and saccharin-fed zebrafish have elevation of cholesteryl ester transfer protein activity in hypercholesterolemia. *Food Chem Toxicol*. 2011 Nov; 49(11): 2899-905. DOI: 10.1016/j.fct.2011.08.001
- Hozayen WG, Soliman HAE, Desouky EM. Potential protective effects of rosemary extract, against aspartame toxicity in male rats. *J Inter Acad Res Multidisc*. 2014; 2(6): 111-25.
- Quadrilatero J, Bombardier E, Norris SM, Talanian JL, Palmer MS, Logan HM, et al. Prolonged moderate-intensity aerobic exercise does not alter apoptotic signaling and DNA fragmentation in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010 Mar; 298(3): E534-47. DOI: 10.1152/ajpendo.00678.2009
- Siu PM. Muscle apoptotic response to denervation, disuse, and aging. *Med Sci Sports Exerc*. 2009 Oct; 41(10): 1876-86. DOI: 10.1249/MSS.0b013e3181a6470b
- McMillan EM, Graham DA, Rush JWE, Quadrilatero J. Decreased DNA fragmentation and apoptotic signaling in soleus muscle of hypertensive rats following 6 weeks of treadmill training. *J Appl Physiol* (1985). 2012 Oct; 113(7): 1048-57. DOI: 10.1152/jappphysiol.00290.2012
- Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of Apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)*. 2012 May; 4(5): 330-49. DOI: 10.18632/aging.100459
- Westphal D, Dewson G, Czabotar PE, Kluck RM. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim Biophys*

- Acta. 2011 Apr; 1813(4): 521-31. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2010.12.019
17. Qu D, Jiang M, Huang D, Zhang H, Feng L, Chen Y, et al. Synergistic Effects of The Enhancements to Mitochondrial ROS, p53 Activation and Apoptosis Generated by Aspartame and Potassium Sorbate in HepG2 Cells. *Molecules*. 2019 Jan; 24(3): 457. DOI: 10.3390/molecules24030457
 18. Doss C, Olson KR. Antiseptics and disinfectants. In: Dart RC. *Medical Toxicology*. 3rd ed New York: Lippincott Williams & Wilkins. Chap 22. 2004; pp: 1246-99.
 19. Onaolapo AY, Onaolapo OJ, Nwoha PU. Aspartame and the hippocampus: Revealing a bi-directional, dose/time-dependent behavioural and morphological shift in mice. *Neurobiol Learn Mem*. 2017 Mar; 139: 76-88. DOI: 10.1016/j.nlm.2016.12.021
 20. Onaolapo AY, Abdusalam SZ, Onaolapo OJ. Silymarin attenuates aspartame-induced variation in mouse behaviour, cerebrocortical morphology and oxidative stress markers. *Pathophysiology*. 2017 Jun; 24(2): 51-62. DOI: 10.1016/j.pathophys.2017.01.002
 21. Anbara H, Shahrooz R, Malekinejad H, Saadati S. [Protective Effects of Royal Jelly and Vitamin C against Experimental Hemolytic Anemia on Sex Hormones and Histochemical Testicle Tissue Histochemistry of Adult Mice]. *J Shahid Sadoughi Uni Med Sci*. 2016; 23(12): 1140-54. [Article in Persian]
 22. 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 Aug; 75(2): 683-93. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2000.0750683.x
 23. 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 Apr; 89(1-2): 133-46. DOI: 10.1016/s0169-328x(01)00058-4
 24. Ashok I, Sheeladevi R. Biochemical responses and mitochondrial mediated activation of apoptosis on long-term effect of aspartame in rat brain. *Redox Biol*. 2014 Apr; 2: 820-31. DOI: 10.1016/j.redox.2014.04.011
 25. Trocho C, Pardo R, Rafecas I, Virgili J, Remesar X, Fernandez López JA, et al. Formaldehyde derived from dietary aspartame binds to tissue components in vivo. *Life Sci*. 1998; 63(5): 337-49. DOI: 10.1016/s0024-3205(98)00282-3
 26. Cheeseman KH. Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Mol Aspects Med*. 1993; 14(3): 191-97. DOI: 10.1016/0098-2997(93)90005-x
 27. Iman MM. Effect of aspartame on some oxidative stress parameters in liver and kidney of rats. *Afr J Pharm Pharmacol*. 2011 Jun; 5(6): 678-82.
 28. Sayed Saleh AA. Synergistic effect of N-acetyl cysteine and folic acid against aspartame- induced nephrotoxicity in rats. *Int J of Adv Res*. 2014 May; 2(5): 363-73.
 29. Tootian Z, Limouei H, Sheibani MT, Fazelipour S, SalarAmoli J. [Morphometrical and histometrical changes of kidney in immature mice exposed to aspartame]. 2013; 68(2): 159-65. DOI: 10.22059/jvr.2013.31963 [Article in Persian]
 30. Koçtürk S, Kayatekin BM, Resmi H, Açıköz O, Kaynak V, Ozer V. The apoptotic response to strenuous exercise of the gastrocnemius and solues muscle fibers in rats. *Eur J Appl Physiol*. 2008 Mar; 102(5): 515-24. DOI: 10.1007/s00421-007-0612-7
 31. Ziaaldini MM, Koltai E, Csenge Z, Goto S, Boldogh I, Taylor AW, et al. Exercise training increases anabolic and attenuates catabolic and apoptotic processes in aged skeletal muscle of male rats. *Exp Gerontol*. 2015 Jul; 67: 9-14. DOI: 10.1016/j.exger.2015.04.008
 32. Dahabreh IJ, Schmid CH, Lau J, Varvarigou V, Murray S, Trikalinos TA. Genotype misclassification in genetic association studies of the rs1042522 TP53 (Arg72Pro) polymorphism: a systematic review of studies of breast, lung, colorectal, ovarian, and endometrial cancer. *Am J Epidemiol*. 2013 Jun; 177(12): 1317-25. DOI: 10.1093/aje/kws394
 33. Xue X, Yu JL, Sun DQ, Kong F, Qu XJ, Zou W, et al. Curcumin induces apoptosis in SGC-7901 gastric adenocarcinoma cells via regulation of mitochondrial signaling pathways. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15(9): 3987-92. DOI: 10.7314/apjcp.2014.15.9.3987
 34. Alsuhaibani ES. In vivo cytogenetic studies on aspartame. *Comp Funct Genomics*. 2010; 2010: 605921. DOI: 10.1155/2010/605921
 35. Köhler C, Orrenius S, Zhivotovsky B. Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *J Immunol Methods*. 2002 Jul; 265(1-2): 97-110. DOI: 10.1016/s0022-1759(02)00073-x