

# تأثیر مصرف طولانی مدت آسپارتام بر شاخص‌های هیستومورفومتری و هیستوشیمی غده فوق کلیوی در موش نر بالغ نژاد NMRI

حسن مروتی<sup>\*</sup>، حجت عنبر، محمدتقی شیبانی، محمد کاظم کوهی، آلا حسن‌زاده

گروه علوم پایه دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۷/۱۱/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۱/۲۷

## چکیده

**زمینه و هدف:** آسپارتام یک شیرین کننده مصنوعی است که بالغ بر ۲۰۰ میلیون نفر در بیش از ۹۰ کشور جهان در فرآورده غذایی و دارویی مختلف به‌طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌دهند. گزارش‌های مورد بحث زیادی در سمیت آسپارتام بر روی بافت‌های مختلف بدن وجود دارد، لذا هدف از مطالعه تعیین و تأثیر مصرف طولانی مدت آسپارتام بر شاخص‌های هیستومورفومتری و هیستوشیمی غده فوق کلیوی در موش نر بالغ نژاد NMRI بود.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی تعداد ۳۶ سر موش سفید کوچک آزمایشگاهی نر بالغ از نژاد NMRI با وزن ۲۵-۲۰ گرم از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران تهیه گردید، موش‌ها به صورت تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند؛ سه گروه از گروه‌های فوق به ترتیب آسپارتام را به میزان ۴۰ (دوز پایین آسپارتام)، ۸۰ (دوز متوسط آسپارتام) و ۱۶۰ (دوز بالای آسپارتام) میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت خوراکی از طریق گاواژ به مدت ۹۰ روز دریافت نموده و همچنین گروه کنترل نیز در نظر گرفته شد. ۲۴ ساعت پس از آخرین تیمار تغییرات هیستولوژی و هیستومورفومتری به وسیله میکروسکوپ دیجیتال مورد ارزیابی قرار گرفتند. همچنین رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی پریود یک اسیدشیف، تریکروم ماسون و تولوئیدین بلو به ترتیب جهت مشخص کردن مواد کربوهیدرات، میزان فیبروزی شدن و تعداد ماست‌سل‌ها در بافت غده فوق کلیه انجام پذیرفت. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون واریانس یک‌طرفه و تست توکی تجزیه و تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** آسپارتام در گروه دوز بالا، موجب به هم ریختگی نظم سلولی در بین سلول‌های ناحیه گلومولوزا و رتیلولاریس شده بود. همچنین آسپارتام در ناحیه فاسیکولاتا در گروه‌های دوز متوسط و دوز بالا موجب به هم ریختگی سلولی و از هم پاشیدگی ستون‌های سلولی شده و کانون‌های التهابی و نکروزی نیز در ناحیه فاسیکولاتا قابل مشاهده بودند. در بخش مرکزی غده فوق کلیه در گروه‌های دوز متوسط و بالا نقاط نکروزی وجود داشتند. تغییرات هیستومتریک افزایش معنی‌داری را در اندازه سلول‌های اسفنجی، تعداد ماست‌سل‌ها و ضخامت لایه‌های فاسیکولاتا و رتیلولاریس نشان داد. همچنین موجب کاهش معنی‌داری در قطر بزرگ ناحیه مرکزی غده فوق کلیه در گروه‌های دوز متوسط و بالا شده بود. در پارامترهای ضخامت لایه گلومولوزا و کپسول غده فوق کلیه تغییرات معنی‌داری مشاهده نگردید. در بررسی‌های هیستوشیمی در رنگ‌آمیزی تری‌کروم ماسون مشخص گردید که آسپارتام باعث افزایش بافت فیبروزی در گروه دوز بالا گردیده بود. همچنین در رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف تغییر محسوسی در رابطه با میزان ترکیبات کربوهیدراتی در گروه‌ها وجود نداشت.

**نتیجه‌گیری:** یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان داد که آسپارتام به‌عنوان یک اکسیدان، در گروه‌های دوز متوسط و بالا با تولید گونه‌های فعال اکسیژن موجب اثرات منفی در پارامترهای هیستومورفومتری شده و آسیب بافتی در غده فوق کلیوی را سبب گردید. همچنین باعث افزایش تعداد ماست‌سل‌ها و فیبروزی شدن بافت غده فوق کلیه گردید.

**واژه‌های کلیدی:** آسپارتام، غده فوق کلیه، هیستومورفومتری، موش نژاد NMRI

\* نویسنده مسئول: حسن مروتی، تهران، دانشگاه تهران، گروه علوم پایه دامپزشکی

Email: hmorowati@ut.ac.ir



## مقدمه

مواد افزودنی که در خوراکی‌ها وجود دارند معمولاً به عنوان غذا مورد استفاده قرار نمی‌گیرند، بلکه درون غذا و یا بر روی آن مورد استفاده قرار می‌گیرند تا باعث بهبود کیفیت، ظاهر، طعم و بافت آن شده و یا در تسهیل مراحل غذا نقش ایفا نمایند (۱). مواد افزودنی شامل: مواد نگهدارنده، شیرین کننده‌ها، افزودنی‌های رنگی، طعم دهنده‌ها و غیره می‌باشد. بیش از ۳۰۰۰ افزودنی مورد تأیید برای استفاده در سراسر جهان وجود دارد و شیرین‌کننده‌های مصنوعی یکی از مواد افزودنی مهم غذایی هستند (۲).

آسپارتام یک شیرین کننده مصنوعی است که بالغ بر ۲۰۰ میلیون نفر در سراسر جهان در رژیم غذایی خود آن را مصرف کرده و همچنین در بیش از ۹۰ کشور جهان و افزون بر ۶۰۰۰ فرآورده غذایی و دارویی از جمله؛ نوشیدنی‌های کربن دار، نوشیدنی‌های کم کالری و بدون قند، حبوبات، آدامس‌ها، بستنی‌ها، ژلاتین بدون قند، آبنبات‌ها، مرباها، ژله‌ها، آبمیوه‌ها، کیک‌های بدون قند، نوشیدنی‌های رژیمی، نوشیدنی‌های آماده به صورت پودر، ژله‌ها و پودینگ‌ها، شکلات‌های بدون قند، کلوچه‌های بدون قند، نوشیدنی‌های سبزیجات، ماست و غیره مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳-۵).

آسپارتام پودری بی‌بو، شدیداً شیرین، سفیدرنگ و بلورین می‌باشد که در ترکیب غذاهای رژیمی کم‌کالری و بدون قند به وفور دیده می‌شود (۶). آسپارتام معروف‌ترین و پرمصرف‌ترین شیرین کننده

مصنوعی می‌باشد که در میان افراد مبتلا به دیابت و اضافه وزن طرفداران بسیاری داشته و از این رو تمایل یا نیاز به ساخت غذاها و نوشیدنی‌ها بدون اضافه کردن کالری اضافی، آسپارتام را محبوب می‌سازد (۷). آسپارتام، دی‌پپتیدی حاصل از ترکیب دو اسید آمینه اسیدآسپارتیک و فنیل‌آلانین، با فرمول شیمیایی L-آسپارتیل L-فنیل‌آلانین متیل‌استر می‌باشد که در مقادیر یکسان با ساکاروز، میزان کالری مشابهی (۴ کیلوکالری بر گرم) را تولید می‌کند، با این حال، شدت شیرین کنندگی آن ۱۶۰ تا ۱۸۰ برابر ساکارز می‌باشد (۸). میزان مصرف توصیه شده آسپارتام ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در اروپا و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در آمریکا می‌باشد هر چند مشاهدات اخیر نشان داده است که آسپارتام به آرامی راه خود را به محصولات روزانه، مخصوصاً برای افرادی دیابتی یا دارای رژیم غذایی باز کرده است. بنابراین، این طیف از افراد و به طور ضمنی و ناخودآگاه سایر افراد جامعه نیز از محصولات و مواد غذایی که حاوی آسپارتام هستند، استفاده می‌کنند و این چنین به راحتی از مرز میزان مصرف توصیه شده آسپارتام عبور می‌کنند (۹). بازار پرسود و رو به پیشرفت محصولات رژیمی و ترکیبات شیرین کننده به اندازه کافی مورد کاوش قرار نگرفته و در پژوهش‌هایی که بر روی مصرف خوراکی آسپارتام و در پی آن جذب روده‌ای و متابولیسم آسپارتام در پستانداران صورت گرفته، نشان داده شده است که این ماده در داخل دستگاه معده‌ای - روده‌ای به وسیله

استرازاها و پپتیدازها به تقریباً ۵۰ درصد فنیل آلانین، ۴۰ درصد اسید آسپارتیک و ۱۰ درصد متانول هیدرولیز می‌گردد (۹ و ۱۰).

گزارش شده است که نه تنها متانول که برای اکثر بافت‌های بدن مخرب می‌باشد بلکه متابولیت‌های حاصل از آن یعنی فرم‌آلدئید و اسیدفرمیک که نتیجه متابولیسم اصلی متانول با وارد شدن به گردش سیاهرگی باب و سپس اکسیده شدن متانول در کبد می‌باشند موجب سمیت در اکثر سلول و بافت‌های بدن می‌گردند (۱۱ و ۱۰). مقدار نسبتاً کمی آسپارتام به طور قابل توجهی می‌تواند باعث افزایش سطح متانول در خون شود. متابولیسم متانول به فرم‌آلدئید و اسیدفرمیک با تشکیل آنیون سوپراکسید و پراکسید هیدروژن همراه است (۱۲).

افزایش تولید رادیکال‌های آزاد یا کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها سبب عدم تعادل در وضعیت بازسازی سلول می‌شود که خود منجر به پراکسیداسیون لیپیدی غشای پلاسمایی، القای شکستگی در DNA و غیر فعال شدن پروتئین‌ها می‌شود (۱۳). قرار گرفتن در معرض متانول به‌عنوان یک محصول جانبی آسپارتام، باعث آسیب به غشای میتوکندریایی شده و منجر به بیش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و ایجاد استرس اکسیداتیو می‌گردد (۱۴).

یافته‌های قبلی ثابت کرده است که آسپارتام سبب ایجاد سمیت در سطوح مختلف می‌شود. به تازگی، بسیاری از پژوهش‌های تجربی تأیید کرده‌اند

که آسپارتام حتی بسیار کمتر از میزان مصرف توصیه شده روزانه یک ماده بالقوه سرطان‌زا می‌باشد و باعث افزایش خطر ابتلا به لنفوم، لوسمی، تومورهای دستگاه تناسلی و ادراری، تومورهای دستگاه عصبی مرکزی و آسیب به ساختار عصب سیاتیک می‌گردد (۱۵). علاوه بر این، پژوهش‌های گسترده‌ای ارتباط بین مصرف آسپارتام و خطر ابتلا به دیابت نوع ۲، زایمان زودرس، سمیت کلیوی، آسیب به قشر مغز و مخچه، سمیت کبدی و ایجاد تغییرات هیستوپاتولوژیک در غدد بزاقی پارتید را به اثبات رسانده است (۱۵). در پژوهش‌های قبلی در مورد نقش آسپارتام در آسیب‌های وارده بر فوق کلیه بیان شده است که آسپارتام میزان بیان ژن‌های کاسپاز ۸ و ۹ و سیتوکروم c را افزایش داده و از این طریق به طور عمده باعث افزایش آپپتوز از طریق مسیر میتوکندریایی درگیر در آپپتوز می‌شود (۱۲). همچنین بیان گردیده است که آسپارتام سبب افزایش بیان کاسپاز ۳ در بافت فوق کلیه با روش ایمنوهیستوشیمی شده است (۱۶)، ولی تاکنون در مورد تأثیرات آسپارتام بر روی تغییرات هیستولوژی و هیستومتری و هیستوشیمی مطالعه جامعی صورت نگرفته است، از این رو مطالعه حاضر انجام گرفت تا بررسی دقیق‌تری از نظر بافتی صورت گیرد. همچنین نظر به کاربرد وسیع و گسترده آسپارتام در صنایع مواد غذایی، این ماده شیمیایی ممکن است ساختارهای بدن را دستخوش تغییراتی کند. با توجه به پژوهش‌های انجام گرفته، گزارش‌های مختلف انسانی،

مخصوص نگهداری موش با دسترسی آزاد به آب آشامیدنی نگهداری شدند. تمامی حیوانات به صورت برابر از پیلتهای مخصوص موش تغذیه می‌کردند.

تمام مراحل پژوهش مطابق با اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوبه کمیته اخلاق دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران با مجوز کد اخلاق ۷۵۰۶۰۲۵/۶/۲۴ انجام گردید.

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 نر به طور تصادفی به ۴ گروه ۹ تایی به ترتیب زیر تقسیم شدند و به مدت ۹۰ روز متوالی آسپارتام (Sigma Aldrich, Cas No: 22839-47-0) را به صورت خوراکی از طریق گاوژ روزانه دریافت کردند. گروه اول یا کنترل؛ حیوانات این گروه به مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی از طریق گاوژ روزانه دریافت کردند، گروه دوم نیز آسپارتام ۴۰ یا دوز پایین آسپارتام؛ این گروه آسپارتام را به میزان ۴۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت خوراکی از طریق گاوژ روزانه دریافت کردند (۱۷ و ۱۸)، گروه سوم آسپارتام ۸۰ یا دوز متوسط آسپارتام که این گروه آسپارتام را به میزان ۸۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت خوراکی از طریق گاوژ روزانه دریافت نمودند و گروه چهارم آسپارتام ۱۶۰ یا دوز بالا که حیوانات این گروه آسپارتام را به میزان ۱۶۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت خوراکی از طریق گاوژ روزانه دریافت کردند.

اطلاعات محدودی درباره عوارض آسپارتام و مسایل ابهام برانگیزی (ضد و نقیضی) که در مورد سالم یا مضر بودن آسپارتام در بین محققین وجود دارد، بررسی‌های محدودی درباره عوارض سوء معدودی از شیرین‌کننده‌های مصنوعی بر روی غده فوق کلیه صورت گرفته است و همان‌گونه که اشاره شد مطالعات بسیار اندک انجام شده در مورد اثرات آسپارتام بر غده فوق کلیه از نوع مولکولی بوده و بررسی‌های جامع بر اثرات داروی آسپارتام بر روی شاخص‌های بافت‌شناسی غده فوق کلیه انجام نشده است. از این رو بررسی اثرات سوء شیرین‌کننده آسپارتام روی هیستولوژی، هیستومورفومتری و هیستوشیمی غده فوق کلیه ضروری به نظر می‌رسد، لذا هدف از این مطالعه، بررسی اثرات آسپارتام روی هیستولوژی، هیستوشیمی و هم‌چنین برخی پارامترهای هیستومورفومتری در موش‌های سوری تیمار شده طی یک دوره ۹۰ روزه که تا به حال مورد بررسی قرار نگرفته است، می‌باشد.

#### روش بررسی

در این مطالعه تجربی تعداد ۳۶ سر موش سفید کوچک آزمایشگاهی نر بالغ از نژاد NMRI با وزن ۲۵-۲۰ گرم از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. حیوانات در شرایط استاندارد ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با دمای  $25 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی  $50 \pm 10$  درصد در قفس‌های پلی‌اتیلنی

هیستومورفومتری نیز شامل؛ ضخامت کپسول غده فوق کلیه، ضخامت ناحیه گلومولوزا، ضخامت ناحیه فاسیکولاتا، ضخامت ناحیه رتیکولاریس، میانگین قطر سلول‌های اسفنجی لایه فاسیکولاتا و همچنین قطر بزرگ ناحیه مرکزی غده فوق کلیه بود که به وسیله میکروسکوپ دیجیتالی (Dino-Lite Digital Microscope, AnMo Dino-Lite Electronics Corporation, Taiwan) انجام شد (۱۹).

برش‌ها پس از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین با رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی پریودیک اسید شیف (PAS)<sup>(۱)</sup>، تولوئیدین بلو<sup>(۲)</sup> و تریکروم ماسون<sup>(۳)</sup> نیز مورد مطالعه قرار گرفت. رنگ‌آمیزی PAS جهت مشخص کردن مواد کربوهیدرات در سیتوپلاسم سلول‌ها استفاده گردید و همچنین رنگ‌آمیزی تری‌کروم ماسون جهت تعیین تراکم رشته‌های همبندی و کلاژن و در راستای آن میزان فیبروزی شدن بافت غده فوق کلیه انجام گردید (۲۰).

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست توکی تجزیه و تحلیل شدند.

#### یافته‌ها

نتایج بررسی‌های میکروسکوپی نشان داد کپسول غده فوق کلیه از نظر هیستولوژی و ظاهری در گروه‌های مختلف تغییر محسوس نداشت. ناحیه

یک روز پس از پایان دوره تیمار ۹۰ روزه، کلیه حیوانات موجود در چهار گروه زک‌شده با مخلوط کتامین (۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تحت بیهوشی قرار گرفته و در ادامه به وسیله گاز CO<sub>2</sub> آسان‌کشی شدند. سپس محوطه شکمی موش‌ها شکافته و غدد فوق کلیه از بدن خارج شدند. سپس جهت بررسی پارامترهای هیستولوژی و مورفومتری، غدد فوق کلیه در محلول ثبوتی بوئن (حجم‌های مساوی از ۰/۲ درصد پیکریک اسید در بافر فسفات و ۲ درصد فرمالدهید در بافر فسفات) قرار گرفتند. نمونه‌های بافتی فوق کلیه پس از ثبوت، همراه با مشخصات هر نمونه درون ظروف مخصوص گذاشته شده و طی مراحل پاساژ بافتی، با استفاده از پارافین مذاب قالب‌گیری شدند. به دنبال قالب‌گیری و تهیه قالب‌های پارافینی، با استفاده از دستگاه میکروتوم برش‌هایی به ضخامت ۶ میکرومتر از قالب‌های پارافینی تهیه شده و در نهایت رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین جهت رنگ‌آمیزی نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

مطالعات هیستولوژی شامل؛ شکل کپسول، گسیختگی سلولی در سلول‌های موجود در نواحی سه‌گانه منطقه قشری و مرکزی غده فوق کلیه، حالت بافت بخش قشری و مرکزی غده فوق کلیه از نظر ادم و پرخونی و پراکنندگی رشته‌های همبندی و کلاژن در نواحی قشری و مرکزی و مرز بین این دو ناحیه به وسیله رنگ‌آمیزی‌های هماتوکسیلین و ائوزین و تولوئیدین بلو مورد بررسی قرار گرفت. بررسی‌های

1-Periodic Acid Schiff  
2-Toluidine Blue  
3-Masson-Trichrom

پایین، دوز متوسط و دوز بالای آسپارتام موجب تغییرات معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) در ضخامت کپسول نسبت به گروه کنترل نشده بود (نمودار ۱).

ارزیابی میانگین ضخامت لایه گلومرولوزا غده فوق کلیوی نشان داد که دریافت آسپارتام در گروه‌های دوز پایین، دوز متوسط و دوز بالای آسپارتام موجب تغییرات معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) در ضخامت لایه گلومرولوزا نسبت به گروه کنترل نشده بود (نمودار ۲).

نتایج حاصل از بررسی میانگین ضخامت لایه فاسیکولاتا نشان داد که ضخامت لایه فاسیکولاتا در گروه‌های دوز متوسط و دوز بالای آسپارتام به صورت معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) نسبت به گروه کنترل افزایش پیدا کرده بود. همچنین میانگین ضخامت لایه فاسیکولاتا در گروه‌های دوز متوسط و دوز بالای آسپارتام دارای اختلاف معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) با گروه دوز پایین آسپارتام بود. گروه دوز پایین آسپارتام فاقد اختلاف معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) با گروه کنترل بود (نمودار ۳).

بررسی میزان ضخامت لایه رتیکولاریس در گروه‌های مختلف نشان داد که ضخامت این لایه در گروه دوز بالای آسپارتام با گروه کنترل دارای افزایش معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) بوده و گروه‌های دوز پایین و دوز متوسط آسپارتام نیز افزایش معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) در ضخامت لایه رتیکولاریس با گروه کنترل نداشتند. همچنین ضخامت لایه رتیکولاریس در گروه دوز بالای آسپارتام نسبت به گروه‌های دوز پایین و دوز متوسط آسپارتام افزایش معنی‌داری

گلومرولوزا خارجی‌ترین بخش قشری غده فوق کلیه می‌باشد که در زیر کپسول قرار گرفته و از دستجات سلولی که بیشتر به شکل حلقوی آرایش پیدا کرده‌اند، تشکیل شده است. در گروه دوز بالا به هم ریختگی نظم سلولی تا حدودی در بین سلول‌های این ناحیه دیده شد (تصویر ۱). ناحیه فاسیکولاتا در غده فوق کلیه موش در زیر ناحیه گلومرولوزا قرار گرفته است و بیشترین وسعت بخش ناحیه قشری را به خود اختصاص می‌دهد. در گروه کنترل و دوز پایین آرایش سلول در این بخش منظم بود، ولی در مورد گروه‌های دوز متوسط و بالا به هم ریختگی سلولی و از هم پاشیدگی ستون‌های سلولی این بخش به وضوح قابل مشاهده بوده و از هم گسستگی سلولی در این گروه‌ها مشهود بود. همچنین کانون‌های التهابی و نکروزی در این بخش از گروه‌های دوز متوسط و بالا مشاهده شد (تصویر ۱). از نظر هیستولوژی ناحیه رتیکولاریس که داخلی‌ترین ناحیه بخش قشری غده فوق کلیه می‌باشد، ضخامت این لایه از نظر ظاهری در گروه دوز بالا افزایش داشته و به هم ریختگی سلولی تا حدودی در این گروه قابل مشاهده بود (تصویر ۱). همچنین ضخامت بخش مرکزی غده فوق کلیه نیز از نظر ظاهری در گروه‌های دوز متوسط و بالا کاهش پیدا کرده بود و آسیب‌های بافتی التهابی و نقاط نکروزی به صورت محدود در این گروه‌ها دیده شده و نیز کانون‌های خون‌ریزی در بخش مرکزی گروه‌های نامبرده قابل مشاهده بود (تصویر ۱).

نتایج حاصل از ضخامت کپسول غده فوق کلیه نشان داد که دریافت آسپارتام در گروه‌های دوز

( $p < 0/05$ ) داشته و دارای اختلاف معنی‌دار با این گروه‌ها بود (نمودار ۴).

میانگین قطر بزرگ بخش مرکزی غده فوق کلیه نشان داد که میانگین قطر در گروه‌های دوز متوسط و دوز بالای آسپارتام به صورت معنی‌داری ( $p < 0/05$ ) نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا کرده بود. همچنین میانگین قطر بزرگ بخش مرکزی در گروه‌های دوز متوسط و دوز بالای آسپارتام دارای اختلاف معنی‌دار ( $p < 0/05$ ) با گروه دوز پایین آسپارتام بود. گروه دوز پایین آسپارتام فاقد اختلاف معنی‌دار ( $p < 0/05$ ) با گروه کنترل بود (نمودار ۵).

در میانگین اندازه سلول‌های اسفنجی ناحیه فاسیکولاتا در گروه‌های دوز متوسط آسپارتام و دوز بالای آسپارتام نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری ( $p < 0/05$ ) مشاهده گردید. همچنین گروه دوز پایین آسپارتام نیز نسبت به گروه کنترل فاقد افزایش معنی‌دار ( $p < 0/05$ ) در اندازه سلول‌های اسفنجی بود. در میان این گروه‌ها نیز گروه‌های دوز متوسط آسپارتام و دوز بالای آسپارتام دارای اختلاف معنی‌داری ( $p < 0/05$ ) با گروه دوز پایین آسپارتام بودند (نمودار ۶).

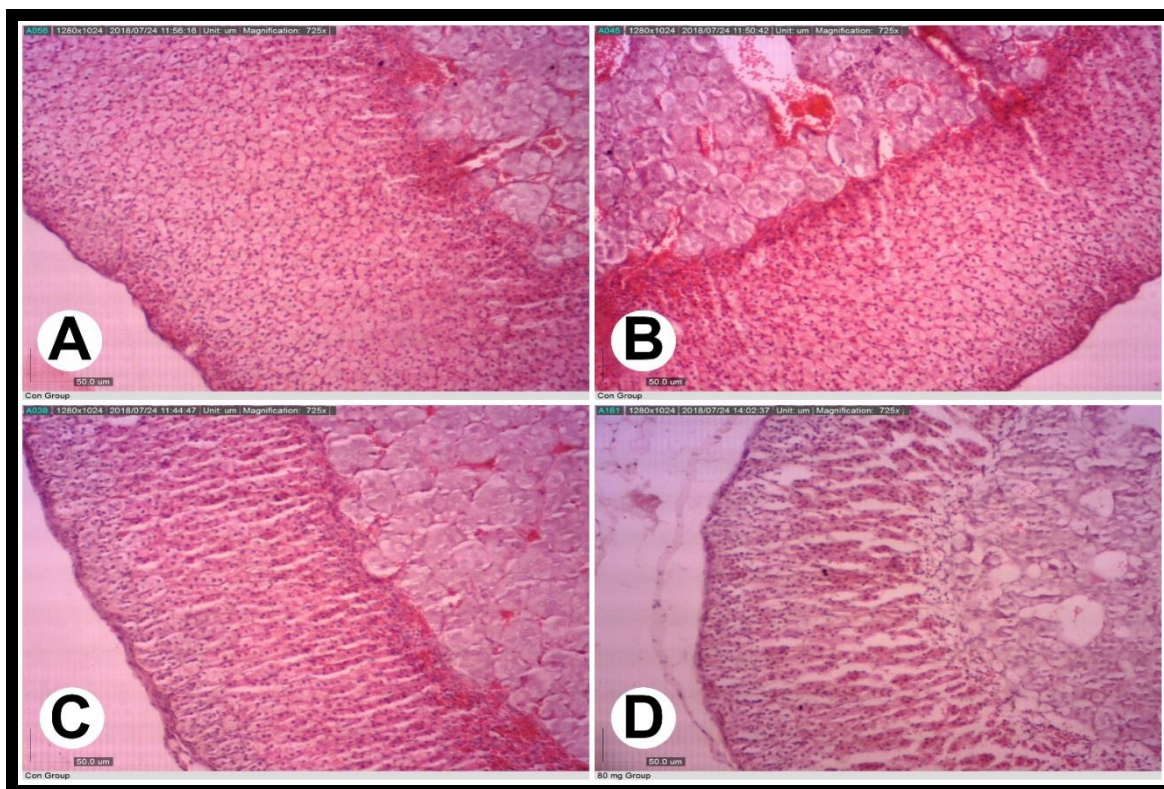
نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی تری‌کروم ماسون مطالعه رنگ‌آمیزی تری‌کروم ماسون نشان داد که در گروه‌های دوز متوسط آسپارتام و دوز بالای آسپارتام افزایش بافت فیبروزی در بافت فوق کلیه نسبت به گروه کنترل و دوز پایین آسپارتام وجود داشت. در گروه دوز بالا آسپارتام تراکم رشته‌های

کلاژن نسبت به گروه‌های دیگر بیشتر بوده و میزان بافت فیبروزی در این گروه بیشترین مقدار را دارا بود (تصویر ۲).

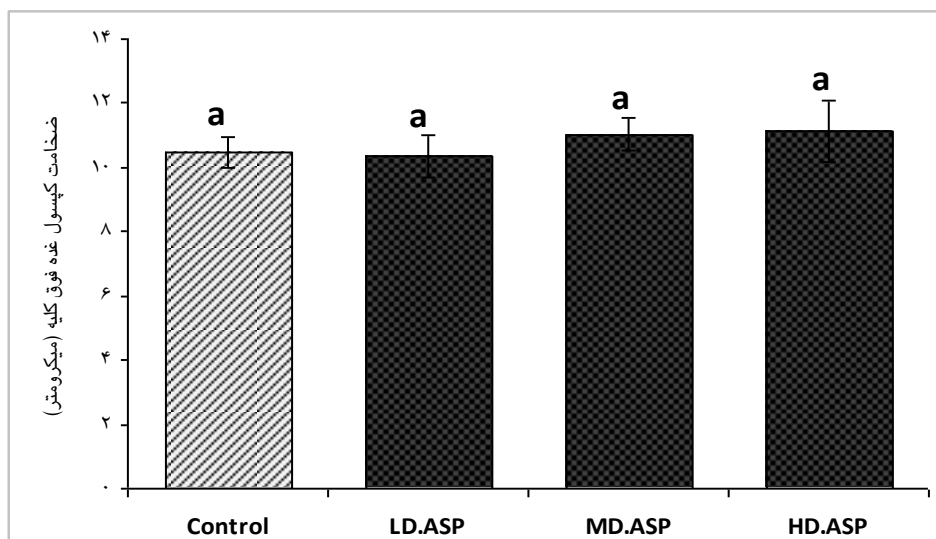
مطالعه رنگ‌آمیزی پاس نشان داد که در میزان مواد کربوهیدراته و وجود دانه‌های پاس مثبت در بین در گروه کنترل و سایر گروه‌های آزمایش تفاوت چندانی وجود نداشت و مقاطع رنگ‌آمیزی شده با این رنگ تفاوت چندانی با یکدیگر نشان ندادند (تصویر ۳).

در این مطالعه نشان داده شد که ماست‌سل‌ها با دانه‌های متاکروماتیک که رنگ آبی تولوئیدن‌بلو را به رنگ بنفش تیره و مایل به قرمز نشان می‌دهند پر بوده و روی هسته را نیز اغلب پوشش می‌دهد. این سلول‌ها بزرگتر از سایر سلول‌های پیرامونی مشاهده شدند و در بافت فوق کلیه موش‌ها فقط در کپسول این عضو وجود داشتند و اغلب در پیرامون عروق خونی مشاهده شدند. مطالعه ظاهری بافت‌شناسی نشان داد که تعداد این سلول‌ها در گروه دوز بالای آسپارتام بیشتر از سایر گروه‌ها بود (تصویر ۴). در همین راستا بررسی میانگین تعداد ماست‌سل‌ها در کپسول غده فوق کلیه نشان داد که میانگین تعداد این سلول‌ها در گروه دوز بالای آسپارتام افزایش معنی‌داری ( $p < 0/05$ ) نسبت به گروه کنترل و گروه‌های دوز پایین و متوسط آسپارتام داشته است. سایر گروه‌ها فاقد اختلاف معنی‌دار ( $p < 0/05$ ) با یکدیگر بودند (نمودار ۷).

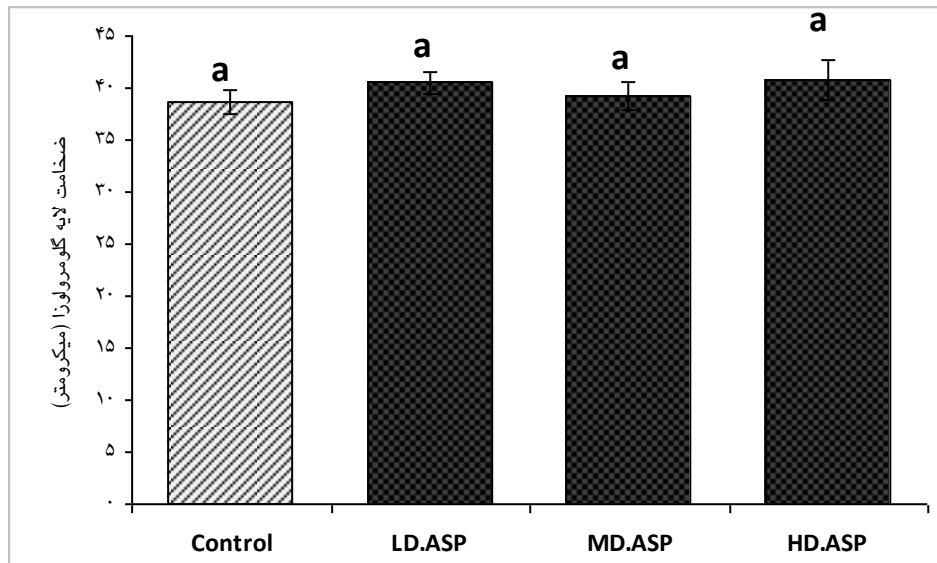




تصویر ۱: نمای میکروسکوپی از بافت فوق کلیه در گروه‌های مختلف آزمایشی مربوط به رنگ آمیزی هماتوکسیلین اتوزین (H&E).  
A: گروه کنترل، ساختار طبیعی بافت غده فوق کلیوی دیده می‌شود، B: گروه دوز پایین اسپارتام، C: گروه دوز متوسط اسپارتام و D: گروه دوز بالای اسپارتام به هم ریختگی نظم سلولی و از هم پاشیدگی ستون‌های سلولی در ناحیه فاسیکولاتای بخش قشری و کانون‌های التهابی و نکروزی در ناحیه فاسیکولاتای بخش قشری و نیز بخش مرکزی غده فوق کلیه در این گروه دیده می‌شود.



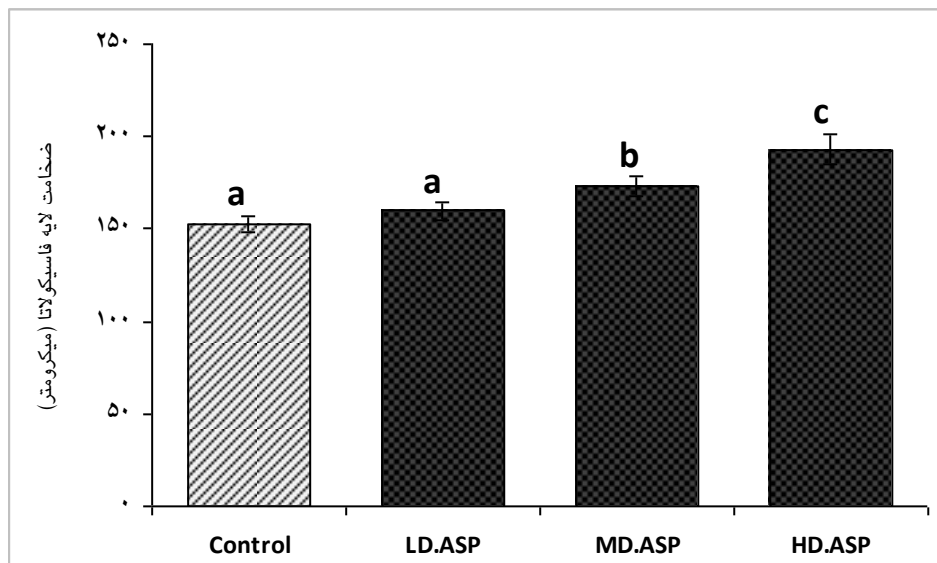
نمودار ۱: مقایسه میانگین ضخامت کپسول غده فوق کلیه در گروه‌های مختلف آزمایشی  
Control: کنترل، LD.ASP: دوز پایین اسپارتام، MD.ASP: دوز متوسط اسپارتام و HD.ASP: دوز بالا اسپارتام. داده‌ها بر اساس میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند.  
حروف لاتین غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در هر متغیر می‌باشند ( $p < 0.05$ ).



نمودار ۲: مقایسه میانگین ضخامت لایه گلومرولوزا در گروه‌های مختلف آزمایشی

Control: کنترل، LD.ASP: دوز پایین آسپارتام، MD.ASP: دوز متوسط آسپارتام و HD.ASP: دوز بالا آسپارتام. داده‌ها بر اساس میانگین  $\pm$  انحرافمعیار بیان شده اند.

حروف لاتین غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در هر متغیر می‌باشند ( $p < 0.05$ ).

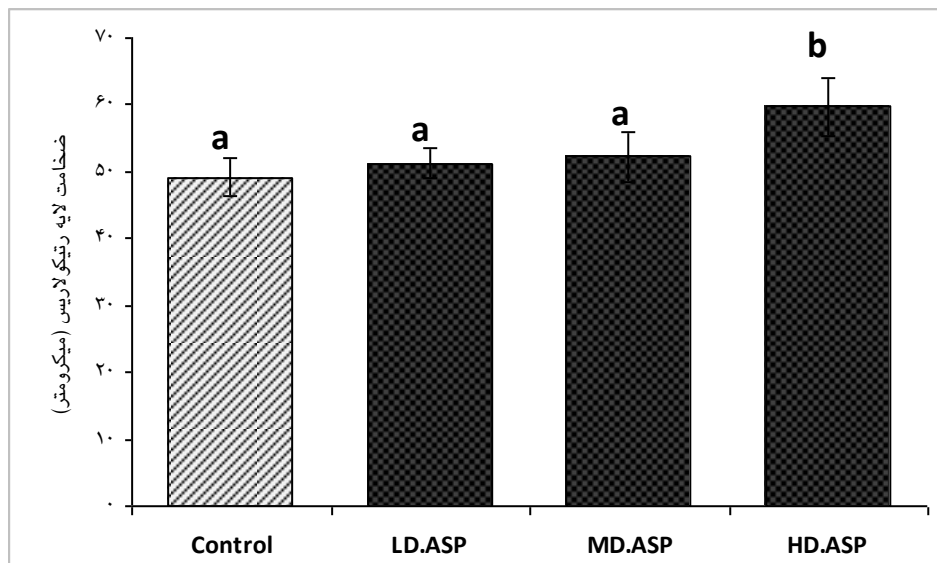


نمودار ۳: مقایسه میانگین ضخامت لایه فاسیکولاتا در گروه‌های مختلف آزمایشی

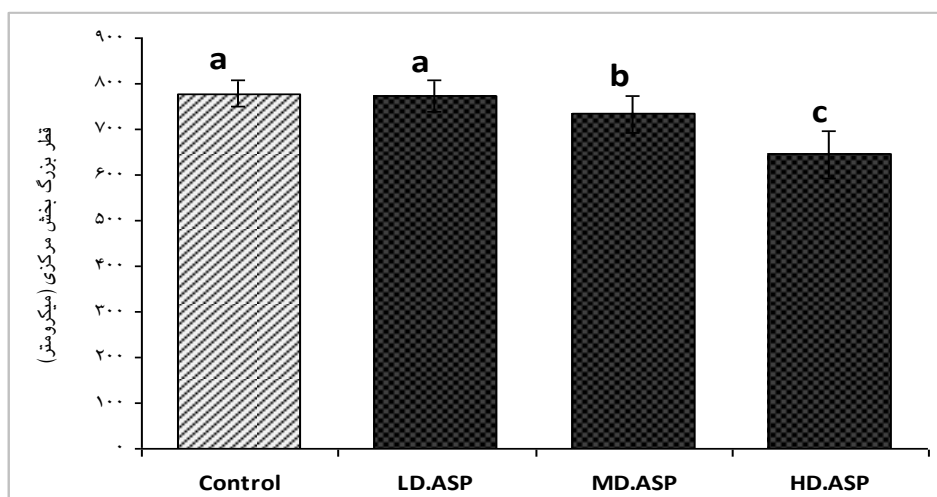
Control: کنترل، LD.ASP: دوز پایین آسپارتام، MD.ASP: دوز متوسط آسپارتام و HD.ASP: دوز بالا آسپارتام. داده‌ها بر اساس

میانگین  $\pm$  انحرافمعیار بیان شده اند.

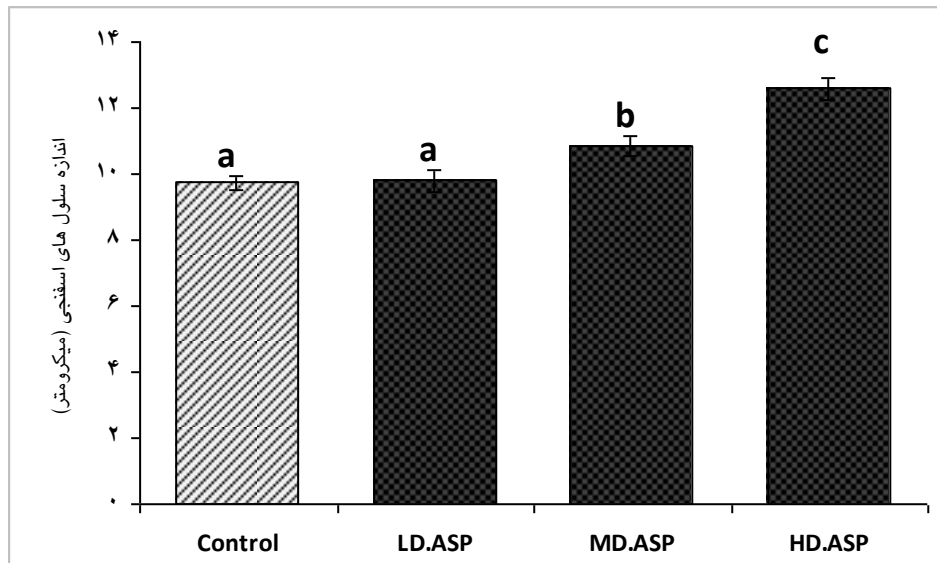
حروف لاتین غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در هر متغیر می‌باشند ( $p < 0.05$ ).



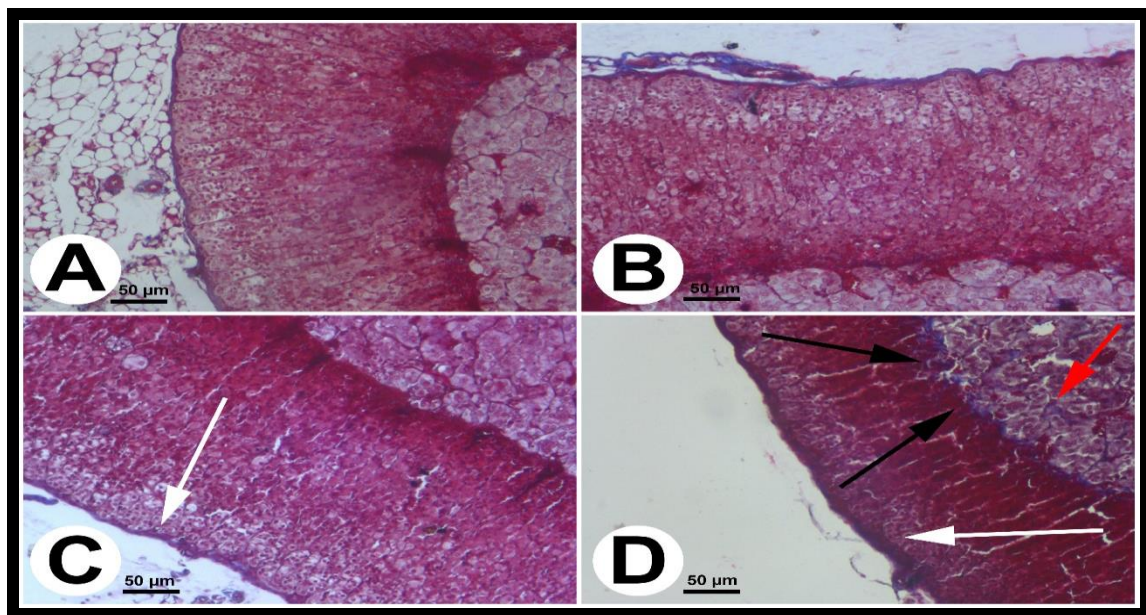
نمودار ۴: مقایسه میانگین ضخامت لایه رتیلولاریس در گروه‌های مختلف آزمایشی  
 Control: کنترل، LD.ASP: دوز پایین آسپارتام، MD.ASP: دوز متوسط آسپارتام و HD.ASP: دوز بالا آسپارتام. داده‌ها بر اساس میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند.  
 حروف لاتین غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در هر متغیر می‌باشند ( $p < 0.05$ ).



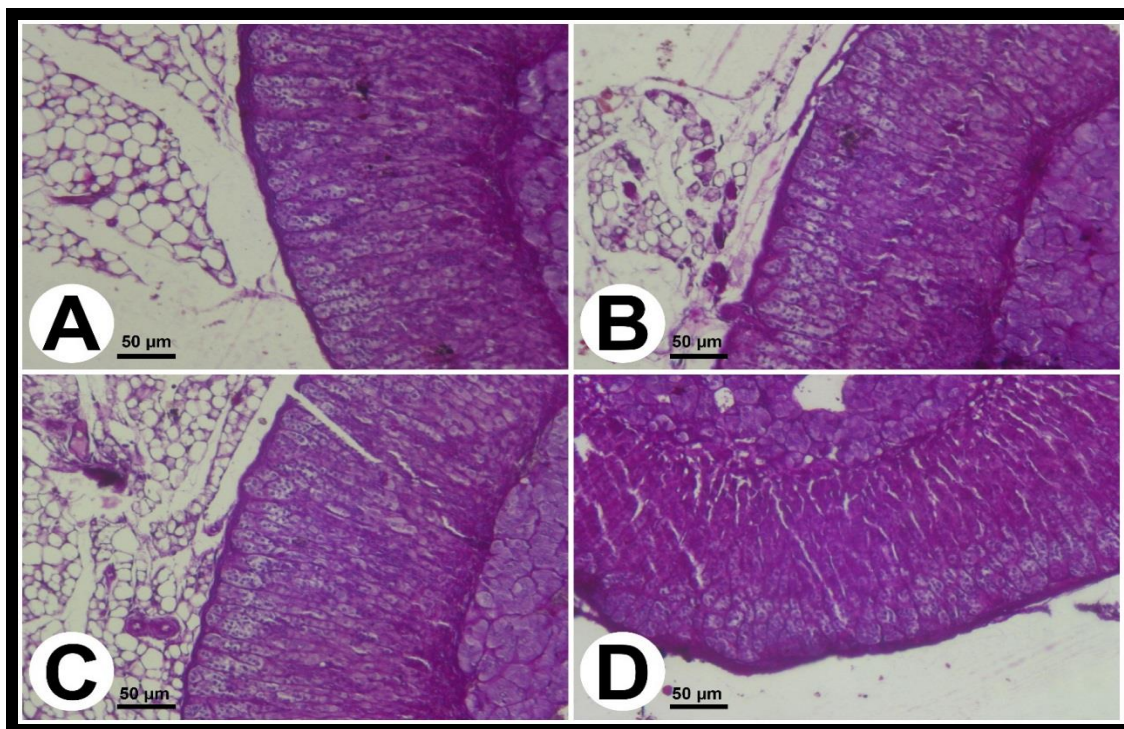
نمودار ۵: مقایسه میانگین قطر بزرگ بخش مرکزی غده فوق کلیه در گروه‌های مختلف آزمایشی  
 Control: کنترل، LD.ASP: دوز پایین آسپارتام، MD.ASP: دوز متوسط آسپارتام و HD.ASP: دوز بالا آسپارتام. داده‌ها بر اساس میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند.  
 حروف لاتین غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در هر متغیر می‌باشند ( $p < 0.05$ ).



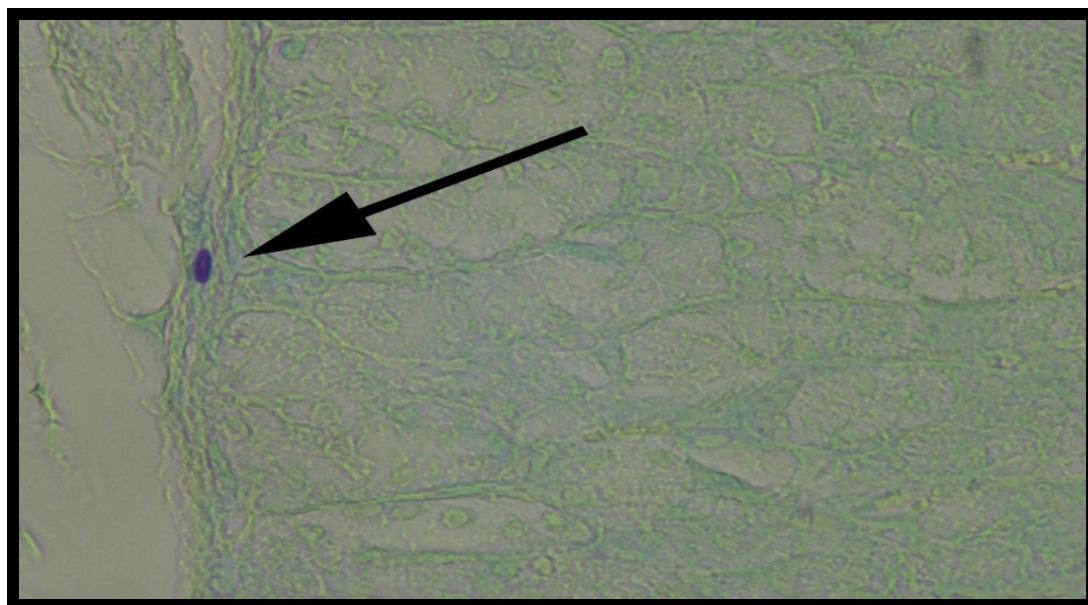
نمودار ۶: مقایسه میانگین اندازه سلول‌های اسفنجی ناحیه فاسیکولاتا در گروه‌های مختلف آزمایشی Control، کنترل، LD.ASP، دوز پایین آسپارتام، MD.ASP، دوز متوسط آسپارتام و HD.ASP، دوز بالا آسپارتام. داده‌ها بر اساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شده‌اند. حروف لاتین غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در هر متغیر می‌باشند ( $p < 0.05$ ).



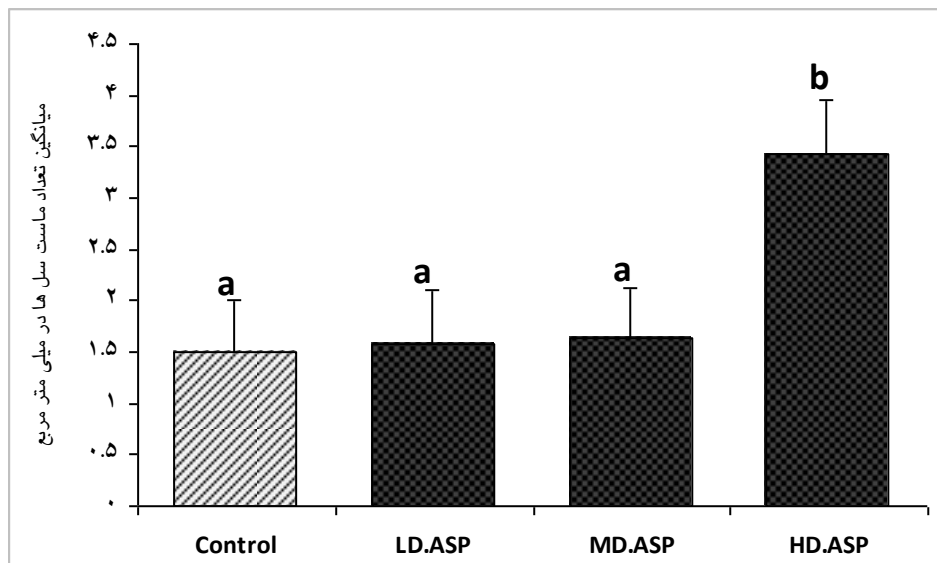
تصویر ۲: نمای میکروسکوپی از بافت فوق کلیه در گروه‌های مختلف آزمایشی مربوط به رنگ‌آمیزی تری‌کروم ماسون. A: گروه کنترل، رنگ آمیزی تری‌کروم ماسون با پراکندگی یکنواخت رشته‌های کلاژن همراه با ساختار طبیعی بافت فوق کلیه، B: گروه دوز پایین آسپارتام، پراکندگی یکنواخت رشته‌های کلاژن دیده می‌شود. تفاوت قابل توجهی در ساختار بافت فوق‌کلیوی با گروه کنترل دیده نمی‌شود، C: گروه دوز متوسط آسپارتام، میزان بافت فیبروزی در کیسول غده فوق کلیه نسبت به گروه کنترل و دوز پایین آسپارتام افزایش نشان می‌دهد (فلش سفید رنگ) و D: گروه دوز بالای آسپارتام، نشان‌دهنده آسیب‌های فوق‌کلیوی ناشی از دوز بالای آسپارتام که افزایش بافت فیبروزی مربوط به کیسول غده فوق کلیه (فلش سفید رنگ)، ناحیه بین بخش قشری و مرکزی غده فوق کلیه (فلش‌های سیاه رنگ) و بخش مرکزی غده فوق کلیه (فلش قرمز رنگ) در گروه مذکور نسبت به سایر گروه‌ها مشهود است.



تصویر ۳: نمای میکروسکوپی از بافت فوق کلیه در گروه‌های مختلف آزمایشی مربوط به رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف (PAS). A: گروه کنترل، B: گروه دوز پایین اسپارتام، C: گروه دوز متوسط اسپارتام و D: گروه دوز بالای اسپارتام، نشان دهنده عدم اختلاف در میزان مواد کربوهیدراته و دانه‌های پاس مثبت در بین گروه کنترل و سایر گروه‌های آزمایش که در مجموع مقاطع رنگ‌آمیزی شده با این رنگ تفاوت چندانی با یکدیگر نداشتند.



تصویر ۴: نمای میکروسکوپی یک ماست سل در بافت فوق کلیه در گروه دوز بالای اسپارتام به وسیله رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو (بزرگنمایی ۴۰۰ برابر). سیتوپلاسم ماست سل‌ها با دانه‌های متاکروماتیک که رنگ آبی تولوئیدین بلو را به رنگ بنفش تیره و مایل به قرمز نشان می‌دهند پر بوده و در بافت فوق کلیه موش‌ها فقط در کپسول این عضو وجود داشتند (فلش سیاه رنگ).



نمودار ۷: میانگین تعداد ماست سل ها در یک میلی متر مربع در گروه‌های مختلف آزمایشی  
 Control: کنترل، LD.ASP: دوز پایین آسپارتام، MD.ASP: دوز متوسط آسپارتام و HD.ASP: دوز بالا آسپارتام.  
 داده‌ها بر اساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شده‌اند.  
 حروف لاتین غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در هر متغیر می‌باشند ( $p < 0.05$ ).

## بحث

کلیه در دوزهای متوسط و بالای این دارو می‌گردد به صورتی که باعث افزایش معنی‌دار در ضخامت لایه فاسیکولاتا و رتیکولاریس و نیز افزایش تعداد ماست سل‌ها در کپسول غده فوق کلیه شده بود و همچنین آسپارتام سبب کاهش معنی‌دار در قطر بزرگ ناحیه مرکزی غده فوق کلیه شد. در راستای آزمایش‌های هیستوشیمیایی غده فوق کلیه تحت تأثیر مصرف آسپارتام این دارو باعث تغییرات هیستوشیمیایی در بافت غده فوق کلیه در گروه‌های دوز متوسط و بالای آسپارتام گردیده بود.

در طی دهه‌های اخیر، نگرانی جوامع بشری در مورد افزایش مسمومیت‌های انسانی که ریشه در مواد توکسیک دارند رو به افزایش می‌باشد که در همین راستا افزودنی‌های مواد غذایی و تغذیه عامل مهم و تأثیرگذار در ورود این مواد توکسیک به بدن و تأثیر

آسپارتام به طور گسترده در فرآورده‌های غذایی و دارویی به عنوان یک شیرین کننده با کالری کم وجود داشته و عمدتاً به وسیله افرادی که سعی در کاهش وزن دارند یا بیمارانی که مبتلا به دیابت هستند و نیز در میان ورزشکاران مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴). لذا هدف از این مطالعه تأثیر مصرف طولانی مدت آسپارتام بر شاخص‌های هیستومورفومتری و هیستوشیمی غده فوق کلیوی در موش نر بالغ نژاد NMRI بود.

مطالعه حاضر برای اولین بار اثرات توکسیک آسپارتام را روی ساختار بافتی غده فوق کلیه نشان داد. طبق نتایج این مطالعه اثبات گردید که آسپارتام به عنوان یک شیرین کننده سبب آسیب به ساختار بافتی و تغییر در پارامترهای هیستومورفومتریک غده فوق

متابولیسم متانول به فرمالدئید و اسیدفرمیک، با تشکیل آنیون سوپراکسید و پراکسید هیدروژن همراه است (۱۲). فنیل آلانین و اسید آسپارتیک متابولیت‌های دیگری از متابولیسم آسپارتام هستند که در مورد اثرات آنها اطلاعات چندانی در دسترس نیست هر چند گزارش‌ها بیان نموده‌اند که فنیل آلانین موجب تخریب و مختل کردن فرآیند تنظیم نوروترانسمیترها در سیستم عصبی مرکزی می‌شود (۹). بیشتر بررسی‌ها حاکی از آن است که بیشترین و مخرب‌ترین اثرات توکسیک آسپارتام احتمالاً مربوط و به متانول متعاقباً فرمالدئید حاصل از متابولیسم آن می‌باشد که بیان شده است که آسپارتام و متابولیت‌های آن به طور بالقوه طیف گسترده‌ای از فرآیندهای بدن از جمله متابولیسم اسیدهای آمینه، ساختار و متابولیسم پروتئین‌ها، یکپارچگی ساختاری اسیدهای نوکلئیک، عملکرد سیستم‌های عصبی و نورون‌ها و تعادلات اندوکرینی را مختل می‌نمایند (۹). به وضوح مشخص شده است که دریافت آسپارتام و به دنبال آن افزایش سطح متانول و ایجاد فرمالدئید و اسیدفرمیک، با تشکیل آنیون سوپراکسید و پراکسید هیدروژن باعث آسیب به غشای میتوکندریایی می‌شود، که منجر به بیش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) شده و ایجاد آسیب‌های اکسیداتیو در سلول‌های غده فوق کلیه را به دنبال دارد (۲۳ و ۲۲). بر این اساس، همان‌طور که در مطالعه حاضر نیز مشهود بود چنین به نظر می‌رسد که شکل‌گیری تنش اکسیداتیو متعاقب مصرف آسپارتام موجبات آسیب سلولی و نمایان شدن

آن بر روی بافت‌های مختلف می‌باشد (۱). می‌توان بیان نمود که نتایج فوق‌الذکر در مورد تأثیرات مصرف آسپارتام بر روی پارامترهای فوق‌الذکر می‌تواند پیامد متابولیت‌های حاصل از هیدرولیز آسپارتام طی فرآیند گوارش و جذب این متابولیت‌ها در بدن باشد (۱۰ و ۹). این پژوهش‌ها نشان داده‌اند که سمیت ناشی از مصرف خوراکی آسپارتام عمدتاً به متابولیت‌های حاصل از گوارش و جذب روده‌ای این ماده مرتبط می‌باشد که طی متابولیسم آسپارتام در داخل دستگاه معده‌ای- روده‌ای به وسیله استرازاها و پپتیدازها، این ماده تقریباً به فنیل آلانین، اسید آسپارتیک و متانول هیدرولیز می‌گردد (۱۰ و ۹). این‌گونه بیان شده است که نه تنها متانول که برای اکثر بافت‌های بدن مخرب می‌باشد بلکه دیگر متابولیت‌های حاصل از متانول یعنی فرمالدئید و اسیدفرمیک نیز موجب سمیت در اکثر سلول و بافت‌های بدن می‌گردند (۱۱ و ۱۰). متانول در داخل آنتروسیست‌ها متابولیزه نمی‌شود و خیلی سریع با ورود به گردش خون سیاهرگی باب وارد کبد شده و به وسیله آنزیم الکل دهیدروژناز به فرمالدئید اکسید می‌شود که این ماده موجب سمیت در اکثر سلول و بافت‌های بدن می‌گردند (۱۱ و ۱۰). پژوهش‌های اندکی به اثرات مخرب آسپارتام و فرمالدئید حاصل از آن را بر روی غده فوق کلیه پرداخته است (۲۱ و ۱۶). بررسی‌ها حاکی از آن است که مقدار نسبتاً کمی آسپارتام به طور قابل توجهی قادر است باعث افزایش سطح متانول در خون شود که گفته می‌شود

تغییرات ساختاری در سلول‌های غده فوق کلیه موش را سبب شده است.

بررسی‌ها نشان می‌دهند که مصرف آسپارتام می‌تواند وقوع آپوپتوز در سلول‌های غده فوق کلیه را، از طریق استرس اکسیداتیو تحریک کرده و از این طریق باعث آسیب‌های بافتی در غده فوق کلیه گردد (۱۳)، که در راستای نتایج این مطالعه می‌باشد که نشان می‌دهد مصرف آسپارتام در گروه‌های دوز متوسط و بالای آسپارتام باعث کاهش آرایش سلولی و آسیب‌های بافتی در غده فوق کلیه می‌گردد. همچنین اثبات گردیده است که آسپارتام می‌تواند باعث تغییر در بیان ژن در هیپوتالاموس و غده فوق کلیه در موش‌های مواجه یافته با آسپارتام گردد (۲۱) و نیز در مطالعه‌ای دیگر سایر پژوهشگران در مقایسه‌ای از جهات بافت‌شناسی و ایمونوهیستوشیمیایی بین میزان ایمنی آسپارتام و استویا در محور هیپوفیز آدرنال موش صحرائی بالغ متوجه شدند که استویا به عنوان یک شیرین کننده طبیعی نسبت به آسپارتام در محور هیپوفیز آدرنال ایمنی بیشتری داشته و آسپارتام باعث آپوپتوز سلول‌های لایه فاسیکولاتا غده فوق کلیه همراه با هیپرپلازی سلول‌های کورتیکوتروپیک می‌شود و در نهایت باعث آسیب‌های بافتی در غده فوق کلیه می‌گردد که با نتایج حاصل از گروه‌های دوز متوسط و بالای آسپارتام در این مطالعه همخوانی دارد (۱۶). شواهد حاکی از آن است که استرس اکسیداتیو ناشی از مواد اکسیدانی می‌تواند آسیب‌های بافتی غده فوق کلیه را از طریق مکانیسم‌های مختلفی

از قبیل پراکسیداسیون لیپیدی غشای پلاسمایی سلول‌ها و القای آپپتوز ایجاد نماید (۱۳) که با نتایج این مطالعه همسو می‌باشد.

مطالعات متعددی بررسی پارامترهای هیستومورفومتریکی در بافت غده فوق کلیه را شاخص مناسبی جهت ارزیابی میزان آسیب‌های این اندام بر می‌شمرند (۲۵ و ۲۴). به نظر می‌رسد که آسپارتام و سایر مواد اکسیدانی از طریق تنش‌های اکسیداتیو باعث تغییرات در پارامترهای هیستومورفومتریکی بافت غده فوق کلیه می‌شود (۲۶ و ۱۶). در مطالعه حاضر، دریافت آسپارتام باعث تغییر در پارامترهای هیستومورفومتریکی بافت غده فوق کلیه در گروه‌های دوز متوسط و بالای آسپارتام شده بود که در همین راستا و در تأیید یافته‌های مطالعه حاضر، بررسی‌های اخیر نیز نشان می‌دهند که تزریق مواد اکسیدانی در موش بزرگ آزمایشگاهی باعث افزایش در ضخامت لایه فاسیکولاتا، ضخامت لایه رتیکولاریس و افزایش اندازه سلول‌های اسفنجی ناحیه فاسیکولاتا می‌شود که با نتایج حاصل از گروه‌های دوز متوسط و بالای آسپارتام در مطالعه حاضر همسو می‌باشد، ولی با گروه دوز پایین همسو نمی‌باشد (۲۷ و ۲۶). همچنین برخلاف بررسی‌های پیشین که آسپارتام باعث تغییر در ضخامت لایه فاسیکولاتا نشده بود در این مطالعه آسپارتام باعث افزایش در ضخامت این لایه گردیده است (۱۲). در این مطالعه آسپارتام سبب تغییر در ضخامت لایه گلومرولوزا و ضخامت کپسول غده فوق کلیه در هر سه گروه‌های آزمایشی نشده بود که



می‌شوند، حمایت می‌شود (۳۱ و ۳۰). در سال‌های اخیر نتایج زیادی در ارتباط با مشارکت ماست‌سل‌ها در تکثیر فیبروبلاست‌ها و افزایش میزان کلاژن و فیبروزی شدن در بافت‌های مختلف به دست آمده است که افزایش تعداد ماست‌ها در روند ترمیم زخم‌ها و تشکیل پوست حاکی از ارتباط با فیبروبلاست‌ها و افزایش کلاژن دارد. همان‌طور که در تحقیق حاضر نیز افزایش میزان ماست‌سل‌ها باعث افزایش میزان کلاژن و فیبروزی شدن بافت غده فوق کلیه در گروه‌های دوز متوسط آسپارتام و دوز بالای آسپارتام شده است (۳۲ و ۳۳). نتایج رنگ‌آمیزی پاس این مطالعه نشان داد که میزان مواد کربوهیدراته و وجود دانه‌های پاس مثبت در بین در گروه کنترل و سایر گروه‌های آزمایشی تغییری نداشت که این نتایج حاکی از عدم اختلال در سوخت و ساز سلول‌های بافت غده فوق کلیه تحت تأثیر دریافت آسپارتام بود که هم‌سو با سایر پژوهش‌های دیگر در این زمینه می‌باشد (۳۱).

در مطالعه حاضر آسپارتام باعث تغییر در شاخص‌های هیستومورفومتری و هیستوشیمی غده فوق کلیوی شده بود، از این رو پیشنهاد می‌شود برای بررسی بهتر این تغییرات، از روش‌های استریولوژی و ایمنوهیستوشیمیایی استفاده گردد.

### نتیجه‌گیری

با جمع‌بندی یافته‌های مطالعه حاضر چنین بر می‌آید که آسپارتام به واسطه افزایش تولید

این نتایج با یافته‌های حاصل از این پژوهش‌های دیگر که نشان می‌دهد دریافت فرمالدئید و مواد اکسیدان سبب تغییر در این پارامترهای هیستومتریکی نمی‌شود، کاملاً مطابقت دارد (۲۸ و ۲۷). پژوهش‌های پیشین اثبات نموده‌اند که قرار گرفتن در معرض فرمالدئید باعث تغییر در ضخامت بخش مرکزی غده فوق کلیه نمی‌شود (۲۸)، ولی در مطالعه حاضر اثبات گردید که میانگین قطر بزرگ بخش مرکزی غده فوق کلیه نشان داد که میانگین قطر بخش مرکزی غده فوق کلیه در گروه‌های دوز متوسط و دوز بالای آسپارتام نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا کرده بود که این نتایج هم‌سو با نتایج پژوهش‌های دیگر می‌باشد که نشان می‌دهد مواد اکسیدانی دیگر سبب کاهش ضخامت این لایه در غده فوق کلیه موش بزرگ آزمایشگاهی می‌شود (۲۷). در این بررسی به وسیله رنگ‌آمیزی تولوئیدین بلو مشخص گردید که تعداد ماست‌سل‌ها در کپسول غده فوق کلیه در گروه دوز بالای آسپارتام افزایش یافته است که با نتایج پژوهش‌های دیگر که نشان می‌دهد تعداد این سلول‌ها در کپسول اندام‌های بدن در اثر مواد اکسیدانی افزایش می‌یابد مطابقت دارد (۲۹). همچنین مطالعه رنگ‌آمیزی تری‌کروم ماسون نشان داد که در گروه‌های دوز متوسط آسپارتام و دوز بالای آسپارتام افزایش بافت فیبروزی در بافت فوق کلیه وجود داشت که این نتایج به وسیله سایر پژوهش‌های قبلی که نشان می‌دهد مواد اکسیدانی باعث افزایش میزان رشته‌های کلاژن در بافت غده فوق کلیه موش بزرگ آزمایشگاهی

رادیکال‌های آزاد، پیری‌تنش‌های اکسیداتیو و نیز تضعیف دستگاه دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن، موجبات آسیب‌های بافتی در غده فوق کلیه و نیز اختلالات مربوط به پارامترهای هیستومورفومتریک و تغییرات هیستوشیمیایی غده فوق کلیه را در موش‌های گروه دوز متوسط و دوز بالا را فراهم آورد. در حالی که نتایج گروه دوز پایین آسپارتام تفاوت قابل توجهی با نتایج گروه کنترل نداشته و آسیب‌های مشاهده شده در دو گروه مذکور دیگر را از خود نشان نداد. وجود این، تأیید مضرات و توکسیک بودن آسپارتام در غده فوق کلیه موش نر، نیازمند طرح‌ریزی پژوهش‌های تجربی گسترده‌تر و نیز کارآزمایی‌های بالینی می‌باشد.

#### تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان نامه مقطع دکتری عمومی دامپزشکی دانشگاه تهران می‌باشد، که با حمایت این دانشگاه انجام شد، نگارندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه تهران، کیوان سهرابی‌فرد کارشناس بخش بافت‌شناسی و جنین‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران اعلام دارند.

## REFERENCES

1. Yuet-Wan Lok K, Chung WY, Benzie IF, Woo J. Colour additives in snack foods consumed by primary school children in Hong Kong. *Food Addit Contam Part B Surveill* 2010; 3(3): 148-55.
2. Whitehouse CR, BoullWata J, McCauley LA. The potential toxicity of artificial sweeteners. *AAOHN J* 2008; 56(6): 251-9.
3. Lean MEJ, Hankey CR. Aspartame and its effects on health: The sweetener has been demonised unfairly in sections of the press and several websites. *BMJ: British Medical Journal* 2004; 329: 755-6.
4. Abhilash M, Paul MV, Varghese MV, Nair RH. Effect of long term intake of aspartame on antioxidant defense status in liver. *Food Chem Toxicol* 2011; 49(6): 1203-7.
5. Leme LFAG, Azoubel R. Effects of aspartame on exocrine pancreas of rat fetuses. *Int J Morphol* 2006; 24(4): 679-84.
6. 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.
7. Abhilash M, Sauganth Paul MV, Varghese MV, Nair RH. Long-term consumption of aspartame and brain antioxidant defense status. *Drug Chem Toxicol* 2013; 36(2): 135-40.
8. Abdel-Salam OM, Salem NA, El-Shamarka ME, Hussein JS, Ahmed NA, El-Nagar ME. Studies on the effects of aspartame on memory and oxidative stress in brain of mice. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2012; 16(15): 2092-101.
9. Humphries P, Pretorius E, Naude H. Direct and indirect cellular effects of aspartame on the brain. *Eur J Clin Nutr* 2008; 62(2): 451-62.
10. Soffritti M, Belpoggi F, Padovani M, Lauriola M, Degli Esposti D, Minardi F. Life-time carcinogenicity bioassay of toluene given by stomach tube to Sprague-Dawley rats. *Eur J Oncol* 2004; 9(2): 91-102.
11. 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.
12. Ashok I, Sheeladevi R. Biochemical responses and mitochondrial mediated activation of apoptosis on long-term effect of aspartame in rat brain. *Redox Biology* 2014; 2: 820-31.
13. Horio Y, Sun Y, Liu C, Saito T, Kurasaki M. Aspartame-induced apoptosis in PC12 cells. *Environ Toxicol Pharmacol* 2014; 37(1): 158-65.
14. 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: 42-9.
15. Okasha EF. Effect of long term-administration of aspartame on the ultrastructure of sciatic nerve. *J Microsc Ultrastruct* 2016; 4(4): 175-83.
16. Abdelhaliem NG, Mohamed DS. Comparative Study on the Safety of Aspartame and Stevia on the Adrenal-Pituitary Axis of Adult Male Albino Rats: Histological and Immunohistochemical Study. *Egyptian Journal of Histology* 2017; 40(2): 216-25.
17. Ashok I, Poornima PS, Wankhar D, Ravindran R, Sheeladevi R. Oxidative stress evoked damages on rat sperm and attenuated antioxidant status on consumption of aspartame. *Int J Impot Res* 2017; 29(4): 164-70.
18. 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; 139: 76-88.
19. Anbara H, Shalizar Jalali A, Shahrooz R, Razi M. Protective effect of royal jelly following phenylhydrazine-induced hepatotoxicity in mice. *Armaghane Danesh* 2015; 20(7): 611-22.
20. 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 Univ Med Sci* 2016; 23(12): 1140-54.
21. Collison KS, Inglis A, Shubin S, Saleh S, Andres B, Ubungen R, et al. Effect of developmental NMDAR antagonism with CGP 39551 on aspartame-induced hypothalamic and adrenal gene expression. *PLoS One* 2018; 13(3): e0194416.
22. Kamath S, Vijaynarayana K, Shetty DP, Shetty P. Evaluation of genotoxic potential of aspartame. *Pharmacologyonline* 2010; 1: 753-69.

23. Ikpeme EV, Udensi OU, Ekerette EE, Okon UH. Potential of ginger (*Zingiber officinale*) rhizome and watermelon (*Citrullus lanatus*) seeds in mitigating aspartame-induced oxidative stress in rat model. *Research Journal of Medicinal Plants* 2016; 10(1): 55-66.
24. Raees K, Ishfaq R, Ullah A, Tahir MZ, Abbas T, Tahir HM, et al. Histological and micrometric effects of diazinon exposure on adrenal medulla and cortex in mice. *Journal of Applied Animal Research* 2012; 40(4): 267-72.
25. Louei Monfared A, Jaafari A, Sheibani MT. Histological and histometrical evidences for phenol immunotoxicity in mice. *Comp Clin Path* 2012; 23(3): 529-34.
26. Fazelipour S, Kiaei M, Adhemi Moghadam F, Tootian Z, Sheibani MT, Gharahjeh MR. Effects of methylphenidate on the mice Adrenal glands and lymphoid organs: Results of histochemical, histometrical and histopathological investigations. *Iran J Vet Med* 2017; 11(4): 335-45.
27. Erfani Majd N, Sadeghi N, Hosseini SH. Histomorphometrical effects of Aloe Vera on diabetic rat adrenal gland. *Iranian Veterinary Journal* 2017; 13(2): 48-57.
28. Louei Monfared A, Hamoon Naward S, Bahrami AM, Hosseini E. Histologic and histometric assessments of the potential formaldehyde immunotoxicity in the mice. *European Journal of Experimental Biology* 2013; 3(1): 429-33.
29. Anbara H, Shahrooz R, Malekinejad H. The protective effect of royal jelly and vitamin C coadministration on detrimental effects of phenylhydrazine-induced hemolytic anemia on the parameters of testicular tissue in adult laboratory mice. *Qom Univ Med Sci J* 2015; 9(8): 1-12.
30. Ajdzanovic V, Jaric I, Miler M, Filipovic B, Sosic-Jurjevic B, Ristic N, et al. Diosgenin-caused changes of the adrenal gland histological parameters in a rat model of the menopause. *Acta Histochem* 2017; 119(1): 48-56.
31. Olukole SG, Adeagbo MA, Oke BO. Histology and histochemistry of the adrenal gland African giant rat (*Cricetomys gambianus*, waterhouse). *Int J Morphol* 2016; 34: 1455-60.
32. Kawanami O, Ferrans VJ, Fulmer JD, Crystal RG. Ultrastructure of pulmonary mast cells in patients with fibrotic lung disorders. *Lab Invest* 1979; 40(6): 717-34.
33. Trabucchi E, Radaelli E, Marazzi M, Foschi D, Musazzi M, Veronesi AM, et al. The role of mast cells in wound healing. *Int Wound J* 1988; 10(6): 367-72.

# The Effect of Long-term Exposure to Aspartame on Histomorphometric and Histochemical Adrenal Gland in Adult NMRI Mice

Morovvati H \*, Anbara H, Sheibani MT, Koochi MK, Hasanzadeh A

Department of Veterinary Basic Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: 08 Feb 2019 Accepted: 16 Apr 2019

## Abstract

**Background & aim:** Aspartame is an artificial sweetener that has been used extensively in over 200 million people in more than 90 countries in various food products and pharmaceuticals. There are many controversial reports about the toxicity of aspartame on various tissues of the body. Therefore, the aim of the present study was to determine the effect of long-term aspartame on histomorphometric and histochemical adrenal glands in NMRI mice.

**Methods:** In the present experimental study, 36 male NMRI male rats weighing 20-25grs were perched from Pasteur Institute of Experimental Animals. The rats were randomly divided into four groups: three groups received aspartate at dose of 40 (low dose of aspartame), 80 (medium dose of aspartame) and 160 (high dose of aspartame) mg/kg body weight by oral gavage for 90 days, respectively. And the control group was also considered. 24 hours after the last treatment, histological and histomorphometric changes were evaluated by digital microscopy. Also, specific stains of periodic acid schiff, trichrome masson and toluidine blue were used to determine carbohydrate compounds, amount of fibrosis and the number of mast cells in adrenocortical tissue. The collected data were analyzed by one-way ANOVA and Tukey's test.

**Results:** Aspartate in the high dose group resulted in the collusion of cellular structure between glomerular cell and reticularis cells. Also, aspartame in the fasciculate region in medium to high dose groups caused cellular collusion and disintegration of the cellular columns and inflammatory and necrosis coronals were also observed in the feccilata region. In the central part of the adrenal gland, there were medium and high necrosis points in the adrenal gland. Histometric changes showed a significant increase in the size of the sponge cells, the number of mast cells, and the thickness of the layers of the fasciculate and reticularis. A significant reduction was observed in the large diameter of the central region of the adrenal gland in medium and high dose groups. No significant changes were seen in glomerular layer thickness and adrenal gland capsule parameters. In the histochemical studies of Trichromus Mason staining, it was found that aspartame increased the fibrosis tissue in the high dose group. Also, there was no significant change in the level of carbohydrate in the periodic acid staining in the groups.

**Conclusion:** The results of this study revealed that aspartame as an oxidant in medium and high dose groups resulted in negative effects on histomorphometry parameters and tissue damage in the adrenal gland by producing reactive oxygen species. It also increased the number of mast cells and fibrosis of the adrenocortical gland tissue.

**Keywords:** Aspartame, Adrenal gland, Histomorphometry, NMRI Mice

**Corresponding author:** Morovvati H, Department of Veterinary Basic Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran.

**Email:** hmorovvati@ut.ac.ir

## Please cite this article as follows:

Morovvati H, Anbara H, Sheibani MT, Koochi MK, Hasanzadeh A. The Effect of Long-term Exposure to Aspartame on Histomorphometric and Histochemical Adrenal Gland in Adult NMRI Mice. Armaghane-danesh 2019; 24(1): 150-169