



مطالعه ارتباط هیستومورفومتری و عملکرد کبد با بیان ژن‌های Bcl2، Bax، Caspase III و

P53 متعاقب تجویز آسپارتام در موش سوری

مسلم دهمرده^{۱*}، نرگس زادسر^۲، حسن مروتی^۳، زهرا طوطیان^۳

۱- استادیار گروه دامپزشکی، معاونت علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، بجنورد، ایران.

۲- دکتری تخصصی آناتومی و جنین‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۳- استادیار گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۹/۱۶، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۲/۱۸

چکیده

مقدمه: هدف از انجام این مطالعه، ارزیابی ارتباط هیستومورفومتری و عملکرد کبد موش‌های بالغ نر با بیان ژن‌های Bcl2، Bax، Caspase III و P53 متعاقب تجویز آسپارتام است.

مواد و روش‌ها: در مطالعه تجربی-آزمایشگاهی حاضر، ۳۶ سر موش نر بالغ نژاد NMRI به یک گروه کنترل و سه گروه آزمایشی تقسیم شدند. موش‌ها در گروه تجربی به ترتیب ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن آسپارتام را به مدت ۹۰ روز به روش گاوژ و خوراکی دریافت کردند. گروه کنترل نیز به همان روش ۰/۳ میلی‌لیتر آب مقطر دریافت نمودند. یک روز پس از دوره تیمار، نمونه‌های خون و بافتی از کبد جهت ارزیابی شاخص‌های بیوشیمیایی، هیستومورفومتری و بیان ژن دریافت گردید.

نتایج: تجزیه و تحلیل شاخص‌های هیستومورفومتری، بیوشیمیایی و بیان ژن در بافت کبد موش‌های مورد آزمایش نشان داد که متعاقب افزایش میزان دوز مصرفی آسپارتام شاخص‌هایی از قبیل قطر هیاتوسیت، قطر هسته هیاتوسیت، میزان مواد نکروره، واکوئولاسیون، وجود هسته‌های پیکنوزه در هیاتوسیت‌ها و همچنین میزان آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز، آسپارات آمینوترانسفراز، آلکالین فسفاتاز و نیز بیلی روبین در کبد افزایش یافته است که این افزایش میزان در برخی گروه‌ها به صورت معنی‌دار بود ($P < 0/05$). علاوه بر آن کاهش معنی‌داری در اندازه فضای سینوزوئیدی در همه گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید ($P < 0/05$). در مورد بیان ژن‌های وابسته به آپوپتوز در اثر تجویز آسپارتام مشاهده گردید بیان ژن‌های Caspase III و P53 در گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل به صورت معنی‌دار بود ($P < 0/05$).

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان داد که بین فرآیندهایی که به کاهش راندمان عملکردی و تخریب بافت در کبد از طریق تولید رادیکال‌های آزاد ناشی از متابولیت‌های آسپارتام منجر می‌شود با میزان بیان ژن‌هایی که باعث افزایش سرعت آپوپتوز سلولی می‌شوند رابطه مستقیم وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: آسپارتام، هیستومورفومتری، بیان ژن‌های Bcl2، Bax، Caspase III و P53.

*نویسنده مسئول: خراسان شمالی، بجنورد، دانشگاه آزاد اسلامی بجنورد کدپستی ۳۶۱۴۷۷۳۹۴۷، تلفن: ۰۹۱۲۰۳۷۶۹۶۱، نامبر: ۰۵۸۲۲۲۹۶۹۷۷
Email: Moslem.dahmardeh10@iau.ir

ارجاع: دهمرده مسلم، زادسر نرگس، مروتی حسن، طوطیان زهرا. مطالعه ارتباط هیستومورفومتری و عملکرد کبد با بیان ژن‌های Bcl2، Bax، Caspase III و P53 متعاقب تجویز آسپارتام در موش سوری. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۴۰۴؛ ۲۰(۴): ۵۰-۶۰.



مقدمه

اسپاراتام شیرین‌کننده‌ای مصنوعی و غیرقندی است که از آن در بعضی از غذاها و نوشابه‌ها استفاده می‌شود. اسپاراتام یک متیل استر دی پیتید از اسید آمینه‌های طبیعی ال اسپارتیک اسید، ال فینیل آلانین و متانول می‌باشد (۱). این جایگزین قند برای افراد دارای رژیم، بیماران دیابتی و دیگر کسانی است که باید شکر را به صورت محدود مصرف کنند، مناسب می‌باشد (۲). در حال حاضر، مصرف روزانه قابل قبول اسپاراتام برای انسان در ایالات متحده ۵۰ میلی‌گرم بر گیلوگرم و در اروپا ۴۰ میلی‌گرم بر گیلوگرم است (۳). پس از مصرف، اسپاراتام در دستگاه گوارش به اجزای سازنده‌اش از جمله اسپاراتات، فینیل آلانین، متانول و همچنین محصولات دیگر حاصل از تجزیه متانول، مانند فرمالدئید و اسید فرمیک، تجزیه می‌شود و سپس جذب گردش خون می‌گردد (۴) و (۵). در آن زمان، متانول در لومن روده هیدرولیز شده، به همراه دی پیتید اسپارتیل فینیل آلانین به سلول‌های مخاطی منتقل می‌شود که در آن به اسپاراتات و فینیل آلانین متابولیزه و جذب خون می‌شود. همچنین اسپاراتام ممکن است توسط سلول‌های مخاط روده جذب شود و آنجا به اجزاء سازنده‌اش هیدرولیز شود و سپس جذب گردش خون شود (۶). از بین همه متابولیت‌های این ماده افزودنی، متانول سمی‌تر است و سبب سمیت سیستماتیک می‌شود (۷). به طرز حیرت‌انگیزی گاهی اوقات مشتقات حاصل از تجزیه مواد بیشتر از ماده اصلی سمی است. متانول در کبد به فرمالدئید و فرمات اکسیده می‌شود و سبب آسیب به سلول‌های کبدی می‌شود (۸). شدت یافته‌های بالینی در مسمومیت متانول بیشتر وابسته به سطح فرمات است (۹). اثرات سمی فرمات سبب مهار کمپلکس سیتوکروم اکسیداز و پایان زنجیره تنفسی میتوکندری می‌شود (۱۰). تعدادی از مطالعات نشان می‌دهند که مکانیسم سمیت اسپاراتام در بافت‌های مختلف بر اساس القاء استرس اکسیداتیو است (۱۱ و ۱۲). مصرف خوراکی ۷۵ میلی‌گرم بر گیلوگرم اسپاراتام در روز علت استرس اکسیداتیو در مغز و کبد (۱۳ و ۱۴) و مصرف خوراکی ۴۰ میلی‌گرم بر گیلوگرم در روز علت استرس اکسیداتیو در مغز (۱۵)، کبد و کلیه (۱۶) و اندام‌های ایمنی است (۱۷). در همین زمینه نتایج کیم و دیگران بر روی ماهی زبرا نشان داد که مصرف اسپاراتام باعث التهاب شدید سلول‌های کبدی در ماهی زبرا می‌گردد. همچنین این محققین اعلام کردند که اسپاراتام باعث نقص شدید نورون‌های حرکتی و عضلات خصوصاً زمانی که جیره حاوی کلسترول بالا باشد، می‌گردد. نتایج این محققین نشان داد که مصرف اسپاراتام و ساخارین تأثیر منفی بر متابولیسم چربی و اندام‌های داخلی خصوصاً قلب، کبد و مغز دارد (۱۸). علاوه بر موارد ذکر شده گزارش شده است که مصرف طولانی مدت

اسپاراتام منجر به آسیب هیپاتوسلولار و تغییر واکنش‌های آنتی‌اکسیدانی کبد می‌شود (۱۱). از این‌رو جهت بررسی تغییرات ایجاد شده در کبد این عضو انتخاب گردید. هدف از این مطالعه، بررسی ارتباط تأثیر اسپاراتام بر عملکرد هیستومورفومتري کبد با بیان ژن‌های Bax، Bcl2، Caspase 3 و P53 در موش سوری بالغ تیمار شده در یک دوره ۹۰ روزه با این ترکیب که تا به حال مورد بررسی قرار نگرفته است، می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در مطالعه تجربی- آزمایشگاهی حاضر حیوانات مورد آزمایش، از ۳۶ سر موش سوری نر بالغ نژاد NMRI با وزن ۲۵ تا ۳۵ گرم که از انستیتو پاستور ایران تهیه شده بود، استفاده شد. حیوانات در شرایط محیطی فاقد پاتوژن و تحت شرایط استاندارد دمایی $22 \pm 2^\circ\text{C}$ و رطوبت $50 \pm 10\%$ و با سیکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با دسترسی کامل به آب و غذای کافی نگهداری شدند. در این مطالعه تمام اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید. موش‌های نر توسط محلول ثبوتی بوئن نشان‌دار شده و به ۳ گروه تجربی و یک گروه کنترل ۹ تایی تقسیم گردیدند

گروه اول (کنترل) $0/3$ میلی‌لیتر آب مقطر به روش گاوآژ از طریق خوراکی روزانه به مدت ۹۰ روز (۱۹) و گروه دوم (اسپاراتام ۱)، گروه سوم (اسپاراتام ۲) و چهارم (اسپاراتام ۳) به ترتیب mg/kg BW، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ اسپاراتام به روش گاوآژ از طریق خوراکی روزانه به مدت ۹۰ روز دریافت کردند (۲۰).

یک روز پس از پایان دوره تیمار، موش‌ها با رعایت قوانین و اخلاق (کد اخلاق ۳۰۰۲۹/۶/۱۴ دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران) آسان‌کشی شده بدین صورت که خونگیری از موش‌ها پس از بیهوشی با کتامین (۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) - زایلازین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) انجام شد و سپس با استفاده از گاز CO_2 آسان‌کشی شدند. پس از باز کردن محوطه شکمی موش‌ها، نمونه‌های بافتی نیز استخراج شدند.

و در لوله‌های آزمایش فاقد ماده ضدانعقاد جمع‌آوری گردید. پس از باز کردن محوطه شکمی موش‌ها، بافت کبد خارج شد. جهت بررسی شاخص‌های هیستومورفومتري، کبد را در فرمالین قرار داده و پس از ثبوت و آبیگری نمونه‌ها با اتانول صعودی ۷۰، ۹۰، ۹۵ و ۱۰۰ درصد به مدت یک ساعت و شفاف‌سازی با محلول گزپول، قالب‌های پارافینی تهیه شده و مقاطع بافتی ۵-۶ میکرونی با میکروتوم تهیه گردید. برش‌ها، پس از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین مورد مطالعه قرار گرفتند (۲۱).

خون به دست آمده هر نمونه تا زمان انجام آزمایش در دمای 4°C - ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند سپس سرم نمونه‌های خون

ترتیب ۶۸، ۶۱، ۵۸، ۶۲ و ۶۱ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ ثانیه، در نهایت تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه انجام شد. برای پرایمرهای *bcl2* و *Bax*، ۳۷ سیکل و برای پرایمرهای *Caspase 3*، *P53* و *GAPDH* به ترتیب ۳۵، ۴۰ و ۳۳ سیکل انجام شد. پس از اتمام واکنش تکثیر، برای هر واکنش PCR یک نمودار رسم و سپس براین اساس *Ct* تعیین شد. بیان نسبی ژن‌های *Bcl2*، *Bax*، *Caspase III* و *P53* در موش‌های تحت تیمار و کنترل با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ که به دست آمد.

$Expression\ Ratio = 2^{-\Delta\Delta Ct}$
 $\Delta\Delta Ct = (Ct, Target-Ct, Ref) Sample - (Ct, Target-Ct, Ref) Control$

داده‌های هیستولوژیک، بیوشیمیایی و نتایج حاصل از PCR با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شد. توزیع نرمال داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف انجام و برای مقایسه بین گروه‌ها از آزمون آماری ANOVA یک طرفه و آزمون تکمیلی توکی و در صورت توزیع غیرنرمال داده‌ها از آزمون آماری کروسکال والیس و من ویتنی استفاده شد. مقدار $P < 0.05$ به عنوان معیار معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج

بررسی نتایج حاصل از شاخص‌های مورفومتریک کبد و مقایسه آن مابین گروه کنترل (گروه اول) و گروه‌های تجربی نشان داد که در مورد قطر هپاتوسیت‌های کبدی، مصرف این ماده افزودنی سبب افزایش معنی‌دار در گروه چهارم ($9/91 \pm 0/98$ میکرومتر) نسبت به گروه کنترل ($9/66 \pm 0/93$ میکرومتر) و همچنین گروه چهارم در مقایسه با گروه‌های دوم ($10/17 \pm 0/81$ میکرومتر) و سوم ($9/74 \pm 0/61$ میکرومتر) گردیده است ($P < 0/05$). تجزیه و تحلیل شاخص قطر هسته هپاتوسیت نشان داد که تنها در گروه چهارم ($5/77 \pm 0/67$ میکرومتر) در مقایسه با گروه کنترل ($4/43 \pm 0/68$ میکرومتر) افزایش معنی‌دار مشاهده گردید ($P < 0/05$). در نتایج حاصل از اندازه فضای سینوزوئیدی کاهش معنی‌داری مابین گروه‌های سوم ($5/25 \pm 0/45$ میکرومتر) و چهارم ($3/96 \pm 0/24$ میکرومتر) در مقایسه با گروه کنترل ($6/28 \pm 0/86$ میکرومتر) و نیز گروه چهارم نسبت به گروه دوم ($5/25 \pm 0/45$ میکرومتر) و سوم مشاهده گردید ($P < 0/05$). مقایسه داده‌های حاصل از شمارش تعداد سلول‌های کوپفر نشان داد که هیچگونه اختلاف معنی‌داری مابین گروه‌های تجربی با گروه کنترل وجود نداشت (شکل ۱). در مورد وجود مواد نکروزه در هپاتوسیت تنها در گروه چهارم نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید ($P < 0/05$). در مورد تورم هپاتوسیت‌ها گروه‌های تجربی دوم و سوم و چهارم دارای اختلاف

جمع‌آوری شده، توسط دستگاه اتوآنالایزر (مدل ۵۴۳۰، شرکت سیگما، کشور آلمان) با دور 1500 rpm به مدت ۱۰ دقیقه جدا گردید و سنجش فاکتورهای بیوشیمیایی کبد (آنزیم‌های آلانین آمینو ترانسفراز، آسپارات آمینو ترانسفراز، آلکالین فسفاتاز و بیلیروبین) به روش اسپکتروفوتومتری با کیت‌های شرکت پارس آزمون انجام شد.

برای بررسی بیان ژن‌های آپوپتوتیک از ۵ سر موش در هر گروه استفاده شد. ابتدا مقداری از بافت کبد به وسیله تیغ بیستوری جدا و خرد شد و سپس توسط محلول RNX-Plus شرکت سیناژن استخراج RNA انجام شد. همچنین از کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis شرکت فرمنتاز جهت سنتز cDNA استفاده شد. ابتدا مقدار مشخصی از RNA مربوط به هر ژن را با ۱ میکرولیتر Oligo dT و ۱ میکرولیتر پرایمر Random Hexamer ترکیب کرده و به حجم ۱۲ میکرولیتر رساندیم و پس از سانتیفریژ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد انکوبه گردید و محلولی شامل ۴ میکرولیتر 5x Reaction Buffer، ۱ میکرولیتر Ribolock RNase Inhibitor، ۲ میکرولیتر 10Mm dNTP، ۱ میکرولیتر Reverse M-Mulv به آن اضافه گردید و پس از سانتیفریژ ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، ۱۲۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد قرار داده و در آخر یک گرمای ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه به محلول وارد شد. برای انجام Real time pcr، از ژن‌های *Bcl2*، *Bax*، *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، ۰/۴ میکرولیتر Master Mix، ۰/۴ میکرولیتر پرایمر F، ۰/۴ میکرولیتر پرایمر R، ۵ میکرولیتر cDNA و ۱/۷ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز بود. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه از شرکت سیناژن تهیه شدند. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ ارائه شده است.

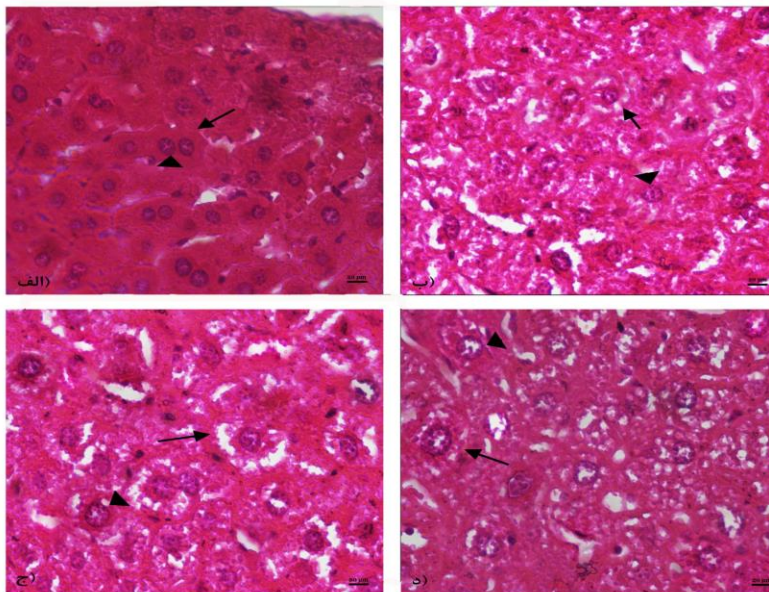
جدول ۱- توالی و تعداد پرایمر ژن‌های *bcl2*، *Bax*، *Caspase 3*، *P53* و ژن کنترل داخلی *GAPDH* (۲۲ و ۲۳).

| 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: AGTTGGACCCACTTGTGAG REV: AGTCTGCAGCTCCTCCACAT | ۲۹۸ جفت باز |
| <i>P53</i> | FWD: ACATAGTGTGGTGGCCCT REV: ACCTCAAAGCTGTCCGTC | ۱۵۲ جفت باز |
| <i>GAPDH</i> | FWD: GAACATCATCCCTGCATCCA REV: CCAAGTGAAGTCCCGTCA | ۶۸ جفت باز |

دستورالعمل حرارتی جهت انجام این Real time PCR به شرح زیر بهینه شد: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه، ۴۰ سیکل تکثیر شامل مرحله دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۵ ثانیه، دمای اتصال برای پرایمرهای *Bcl2*، *Bax*، *Caspase 3*، *P53* و *GAPDH* به

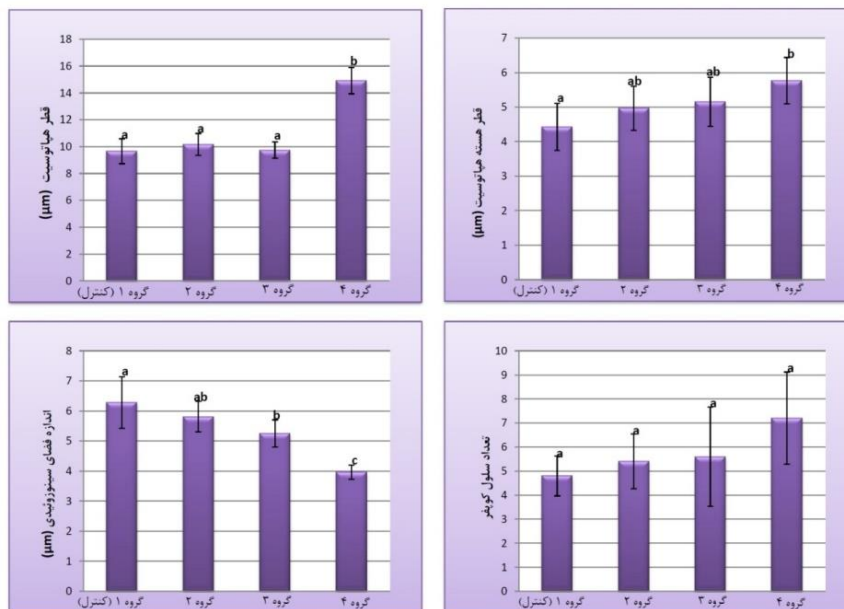
سیتوپلاسم در هیاتوسیت گروه‌های تجربی دوم و سوم و چهارم نسبت به گروه کنترل دارای اختلاف معنی‌دار بودند ($P < 0.05$) (جدول ۲) (شکل ۲ و ۳).

معنی‌دار با گروه کنترل بودند ($P < 0.05$). از نظر وجود هسته‌های پیکنوزه در هیاتوسیت گروه‌های سوم و چهارم در مقایسه با گروه کنترل و گروه‌های تجربی دوم و سوم نسبت به گروه چهارم دارای اختلاف معنی‌دار بودند ($P < 0.05$). از نظر واکوتولاسیون

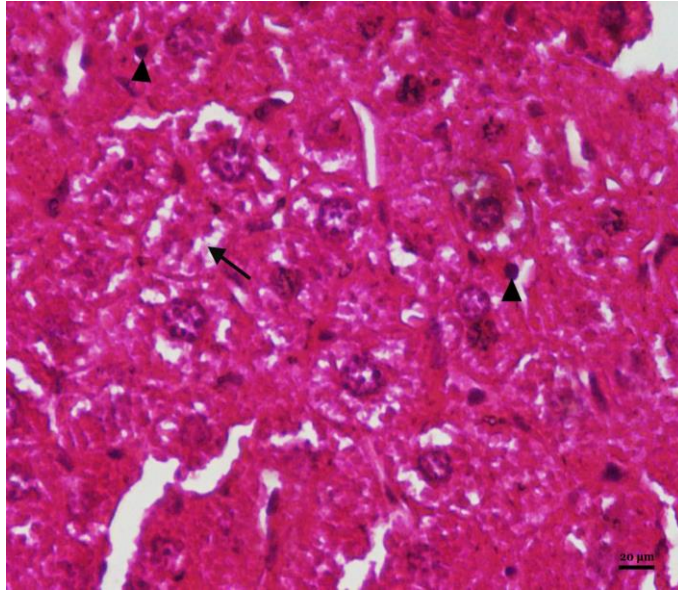


شکل ۱- نمای میکروسکوپی کبافت کبد در گروه کنترل (الف)، گروه‌های تجربی شامل دوزهای ۴۰ mg/kg .BW (ب)، ۸۰ mg/kg .BW (ج) و ۱۶۰ mg/kg .BW (د) با استفاده از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-انئوزین.

علامت ▲ نشان‌دهنده هیاتوسیت و علامت ▲ نشان‌دهنده هسته هیاتوسیت می‌باشد که تغییرات حاصل از استفاده از دوزهای مختلف اسپارتام مشخص می‌باشد.



شکل ۲- مقایسه قطر هیاتوسیت، قطر هسته هیاتوسیت، اندازه فضای سینوزوئیدی و تعداد سلول کوپفر بین گروه کنترل (گروه ۱) و گروه‌های تیمار شامل دوزهای ۴۰ mg/kg .BW (گروه دوم)، ۸۰ mg/kg .BW (گروه سوم) و ۱۶۰ mg/kg .BW (گروه چهارم). حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) مابین گروه‌ها است.



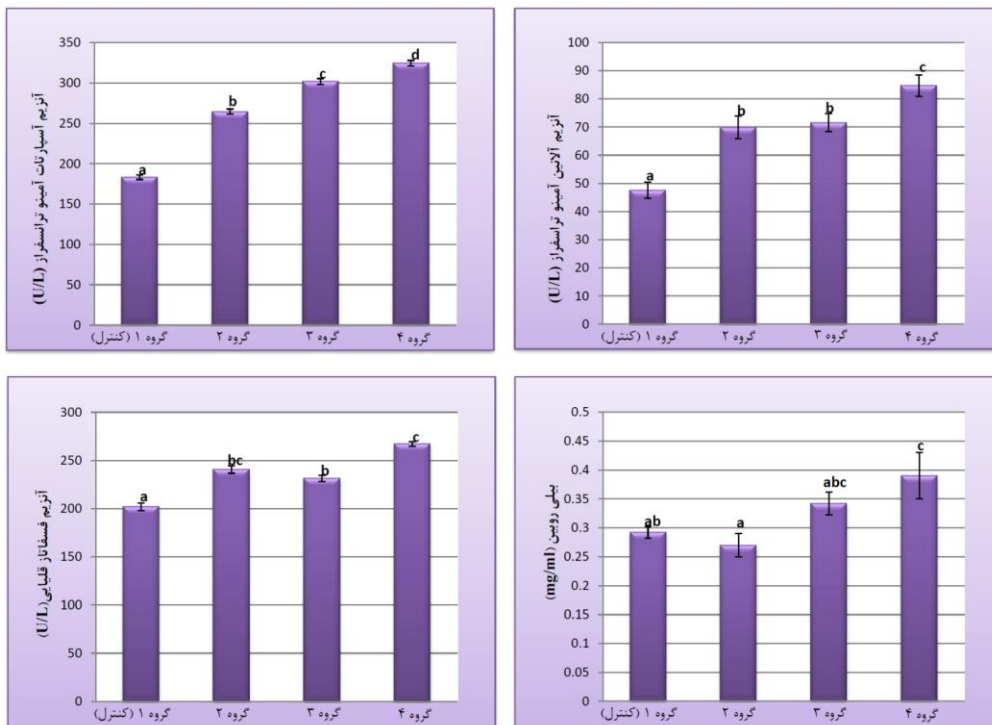
شکل ۳- نمای میکروسکوپی بافت کبد با استفاده از رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین علامت آ واکوتله شدن هپاتوسیت و علامت ▲ نشان دهنده پیکنوز هسته می باشد و نشان می دهد در اثر استفاده از اسپارتام این تغییرات در هسته سلول های کبدی ایجاد گردیده است.

جدول ۲- مقایسه شاخص های هیستولوژی کبد بین گروه کنترل (گروه ۱) و گروه های تجربی شامل دوزهای mg/kg .BW ۴۰ (گروه دوم)، mg/kg .BW ۸۰ (گروه سوم) و mg/kg .BW ۱۶۰ (گروه چهارم) اسپارتام

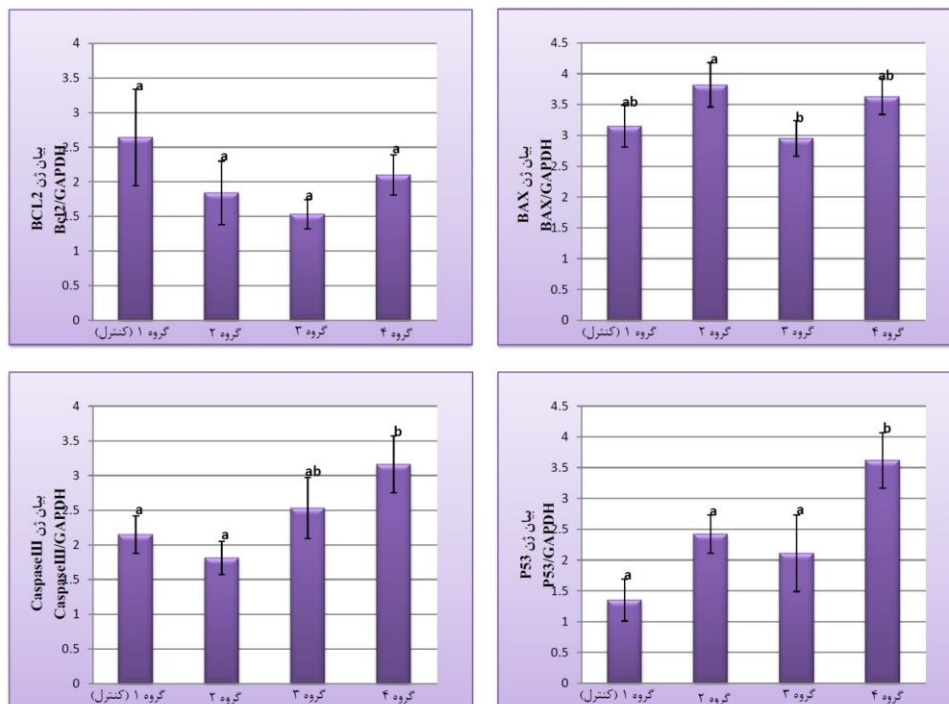
| شاخص | گروه کنترل (اول) | گروه تجربی (دوم) | گروه تجربی (سوم) | گروه تجربی (چهارم) |
|-------------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------|
| مواد نکروزه در هپاتوسیت | - | ++ | ++ | +++ |
| تورم هپاتوسیت | - | ++ | +++ | +++ |
| وجود هسته های پیکنوزه | - | + | b | b |
| واکوتولاسیون سیتوپلاسم | - | + | ab | c |
| | - | + | ++ | ++ |
| | a | b | b | b |

بررسی نتایج حاصل از آزمایشات بیوشیمیایی کبد نشان داد که میزان آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) در گروه های تجربی نسبت به گروه کنترل افزایش یافت و این افزایش مقدار در گروه های تجربی دوم (۶۹/۹۴±۴/۰۴) و سوم (۷۱/۵۷±۳/۲) و چهارم (۸۴/۷۳ ± ۳/۸) در مقایسه با گروه کنترل (۴۷/۶۱±۲/۸۸) و نیز در گروه چهارم نسبت به گروه دوم و سوم دارای اختلاف معنی دار بود (P<۰/۰۵). در مورد آنزیم اسپارتات آمینوترانسفراز (AST) در همه گروه های تجربی دوم (۲۶۴/۷۲±۳/۰۲)، سوم (۳۰۱/۸۷±۳/۷۳) و چهارم (۳۲۴/۵۹±۳/۳۱) نسبت به گروه کنترل (۱۸۳/۴±۲/۸۶) و همچنین در گروه های تجربی در مقایسه با یکدیگر افزایش معنی دار و چشمگیری مشاهده گردید. مقدار آنزیم فسفاتاز قلیایی (ALP) در گروه های تجربی دوم (۲۴۰/۴۳±۳/۷۹)، سوم (۲۳۱/۱۶±۳/۳) و چهارم (۲۶۷/۱۱±۲/۳۸) نسبت به گروه کنترل (۲۰۱/۸۵±۴/۱۱) و نیز در گروه چهارم در مقایسه با گروه سوم دارای افزایش معنی دار بود (P<۰/۰۵). در گروه تجربی چهارم

تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از بیان ژن Bcl2 در کبد نشان داد که در گروه های تجربی نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی داری مشاهده نگردید. بررسی میزان بیان ژن Bax در کبد نشان داد که تنها گروه دوم در مقایسه با گروه سوم اختلاف معنی دار بود (P<۰/۰۵) تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از بیان ژن Caspase III اینگونه بود که میزان بیان این ژن در گروه تجربی چهارم نسبت به گروه های کنترل و دوم اختلاف معنی دار داشت (P<۰/۰۵). مشاهده و بررسی مقدار بیان ژن P53 در کبد نشان داد که میزان این فاکتور در گروه چهارم نسبت به گروه های کنترل، دوم و سوم معنی دار بوده (P<۰/۰۵) (شکل ۵).



شکل ۴- مقایسه مقدار آنزیم‌های کبدی (آلانین آمینو ترانسفراز، آسپارتات آمینو ترانسفراز و فسفاتاز قلیایی) و بیلی روبین بین گروه کنترل (گروه ۱) و گروه‌های تیمار شامل دوزهای ۴۰ mg/kg .BW، (گروه دوم)، ۸۰ mg/kg .BW (گروه سوم) و ۱۶۰ mg/kg .BW اسپارتام (گروه چهارم). حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) مابین گروه‌ها است.



شکل ۵- مقایسه بیان ژن‌های Bcl2, Bax, Caspase 3 و P53 نسبت به ژن کنترل داخلی GAPDH بین گروه کنترل (گروه ۱) و گروه‌های تیمار شامل دوزهای ۴۰ mg/kg .BW، (گروه دوم)، ۸۰ mg/kg .BW (گروه سوم) و ۱۶۰ mg/kg .BW اسپارتام (گروه چهارم). حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) مابین گروه‌ها است.

بحث

امروزه اثبات گردیده است که تجزیه آسپاراتام به متابولیت‌های سازنده آن در دستگاه گوارش و در نتیجه، جذب و القاء فرآیند استرس اکسیداتیو توسط این متابولیت‌ها می‌تواند سهم عمده‌ای در تخریب سلول‌های کبدی داشته باشد (۲۴). کبد از ارگان‌های مهم و حیاتی بدن محسوب می‌شوند که متابولیسم و سم‌زدایی اکثر مواد خوراکی و دارویی مورد استفاده از طریق آن‌ها انجام می‌پذیرد و اختلال در این ارگان در اثر استفاده بی‌رویه برخی از افزودنی‌ها و داروها می‌تواند خطرآفرین باشد.

در مطالعه حاضر، تغییرات در شاخص‌های هیستومورفومتریک کبد از قبیل قطر هپاتوسیت، قطر هسته هپاتوسیت، فضای سینوزییدی و تعداد سلول‌های کوپفر و همچنین شاخص‌های هیستولوژی کبد مانند وجود مواد نکروزه در هپاتوسیت، تورم هپاتوسیت، وجود هسته‌های پیکنوزه و واکوئولاسیون سیتوپلاسم، بین گروه‌هایی که دوزهای مختلفی از آسپاراتام را دریافت کرده بودند در مقایسه با گروه کنترل مورد ارزیابی قرار گرفتند. در همین راستا مطالعات مختلفی در زمینه تأثیر شیرین‌کننده‌ها و افزودنی‌های خوراکی بر شاخص‌های هیستومورفومتری کبد انجام پذیرفته است که از قبیل آن‌ها می‌توان به مطالعه پتروس و هومفریس در سال ۲۰۰۸ اشاره نمود، آن‌ها در این مطالعه مشاهده کردند که تجویز خوراکی آسپاراتام با دوزهای ۳۴، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به مدت ۳۷ روز در خرگوش سبب کاهش معنی‌دار فضای سینوزییدی می‌گردد ($P < 0.05$) و همچنین در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۱۱ توسط الحلیم و محمد انجام پذیرفت مشاهده گردید که آسپاراتام با دوز ۲۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن سبب بی‌نظمی و بهم ریختگی پارانشیم، ایجاد سیتوپلاسم واکوئل و همچنین ایجاد هسته‌هایی با مرز نامشخص در هپاتوسیت کبد موش‌های مورد آزمایش گردید (۲۶). همان‌طور که مشاهده می‌شود نتایج حاصل از این مطالعات با نتایج حاصل از مطالعه حاضر همسو می‌باشد. در نهایت بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه و مطالعات دیگر می‌توان این گونه بیان نمود که‌هایپرتروفی و افزایش قطر هسته هپاتوسیت‌ها بازتابی از افزایش فعالیت هپاتوسیت‌ها در پاسخ به جراحات دژنراتیو است (۲۷) همچنین واکوئل‌های سیتوپلاسمی در هپاتوسیت‌ها علت تغییرات فیزیکی در ساختار پروتئین و لیپید غشای پلاسمایی در ارگان‌های مختلف هستند که این خود بر روی عملکرد پمپ سدیم-پتاسیم اثر می‌گذارد و سبب تجمع سدیم و انتقال آب به داخل سلول می‌شود. در نتیجه این امر متعاقباً باعث افزایش حجم هپاتوسیت‌ها و هسته آن‌ها و به دنبال آن کاهش فضای سینوزییدی و یا حتی نکروز هسته و یا سایر ارگان‌ها

می‌گردد. که این خود می‌تواند یکی از دلایل رویت هسته‌های پیکنوزه باشد. در مجموع تمام این اتفاقات می‌تواند در اثر انتشار رادیکال‌های آزاد تولید شده از متانول و اسید آسپارتیک بعد از مصرف آسپاراتام رخ دهد (۲۸). علاوه بر این، همان‌گونه که در مطالعه ایناس و دیگران در سال ۲۰۰۲ مشاهده گردید که استفاده از ساخارین سبب نفوذ سلول‌های تک هسته‌ای سیستم ایمنی به ویژه ماکروفاژها و لنفوسیت‌ها به اطراف فضاهای پورت و فضای سینوزییدی، ایجاد واکنش‌های التهابی و متعاقب آن کاهش فضا در این ناحیه از کبد موش‌های صحرایی می‌گردد (۲۹)، پس می‌توان دلیل دیگر کاهش فضای سینوزییدی در مطالعه حاضر متعاقب استفاده از آسپاراتام را به این مسأله نسبت داد. طبق نتایج مطالعه حاضر متعاقب استفاده از آسپاراتام تعداد سلول‌های کوپفر افزایش یافته است، از آن جایی که سلول‌های کوپفر نوعی نقش دفاعی در کبد ایفا می‌کنند می‌توان بیان نمود که متعاقب ایجاد واکنش‌های التهابی در کبد، سلول‌های کوپفر جهت دفاع و تولید سایتوکاین‌ها افزایش می‌یابند (۳۰). با افزایش سلول‌های کوپفر تولید اکسیژن فعال نیز افزایش یافته که این خود می‌تواند باعث تخریب هپاتوسیت‌ها و آسیب بیشتر به بافت کبد گردد.

همچنین در مطالعه حاضر مشاهده گردید که میزان آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST)، آلکالین فسفاتاز (ALP) و همچنین میزان بیلی روبین کبدی در گروه‌های تجربی که دوزهای مختلفی از آسپاراتام را دریافت کرده بودند در مقایسه با گروه کنترل به‌طور کلی روند افزایشی داشته است، البته میزان معنی‌داری این روند در بین گروه‌های مختلف و گروه کنترل متفاوت بوده است. نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج بسیاری از مطالعات که در این زمینه انجام شده است هم راستا می‌باشد. از قبیل این مطالعات می‌توان به مطالعه‌ای که بر روی موش‌های صحرایی انجام شد، اشاره کرد به‌طوری که متعاقب استفاده از دو نوع شیرین‌کننده مصنوعی (ساخارین و آسپاراتام) میزان آنزیم‌های کبدی ALT، AST و ALP در گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است به گونه‌ای که این میزان افزایش در آنزیم ALT در مقایسه با دو آنزیم دیگر بیشتر بوده است (۲۹). از آن جایی که افزایش در سطح آمینوترانسفرازهای سرم خون به ویژه آلانین ترانس آمیناز با اثرات فیزیولوژیک ایجاد شده به‌وسیله واکنش رادیکال‌های آزاد حاصله از متابولیت‌های آسپاراتام با غشاهای سلولی و همچنین با تخریب و آسیب پارانشیم کبد در ارتباط می‌باشد (۳۱). پس می‌توان افزایش در میزان این آنزیم در مطالعه حاضر و سایر مطالعات را به این موضوع نسبت داد. از سوی دیگر سنتز و ترشح ALP به داخل صفرا بر عهده سلول‌های کبدی است، پس افزایش سطح این آنزیم در سرم ممکن

می‌توکندری تحت تأثیر قرار می‌دهد (۴۱). به نظر می‌رسد افزایش استرس اکسیداتیو ناشی از تجویز این نوع افزودنی هومئوستاز غشای می‌توکندری را بی‌ثبات کرده و بنابراین تشکیل منافذ نفوذپذیر غشای می‌توکندری را تحریک می‌کند و باعث آزادسازی فاکتورهای پروآپوپتوتیک همانند سیتوکروم c می‌شود (۴۲). از طرفی دیگر سلول‌های حساس به آسیب می‌توکندریایی و آپوپتوتیک از قبیل هپاتوسیت‌ها که سلول‌هایی هستند که اسیدهای چرب آزاد در آن‌ها موجب بروز آپوپتوز می‌گردد، پس افزایش بیش از حد اسیدهای چرب آزاد ناشی از التهابات کبدی متعاقب استفاده از اسپارتام نیز می‌تواند مسیر لیزوزومی مرگ سلولی را فراهم نماید. همچنین این اسیدهای چرب آزاد می‌توانند آپوپتوز را از طریق فعال‌سازی Bax تحریک کند و منجر به نفوذپذیری غشای می‌توکندریایی، فعال‌سازی سیتوکروم c، فعالیت کاسپاز ۹ و متعاقب آن فعال‌سازی کاسپاز ۳ و در نهایت آپوپتوز سلول‌های کبدی شود (۴۳). پس می‌توان بیان نمود که با کاهش بیان ژن Bcl2 و افزایش بیان ژن‌های Bax و Caspase III برخی از فاکتورهای اندازه‌گیری شده از قبیل قطر هپاتوسیت‌ها، قطر هسته هپاتوسیت، وسعت فضای سینوزوئیدی و وجود هسته‌های پیکنوزه تحت تأثیر قرار خواهند گرفت.

در مورد افزایش بیان ژن P53 متعاقب استفاده از اسپارتام در مطالعه حاضر می‌توان بیان نمود که فعالیت‌های پروتئین P53 شامل توقف چرخه سلولی در پاسخ به نکروز هسته و آسیب به DNA و در نتیجه القای آپوپتوز در صورت عدم ترمیم DNA می‌باشد. ژن P53 و پروتئین حاصل از آن به‌طور طبیعی تقسیم و رشد سلول را تحت نظارت دارد. متعاقب استفاده از اسپارتام و افزایش بیان ژن‌های Bax و Caspase III از روش‌های مختلف می‌تواند سبب آسیب به غشای پلاسمایی سلول و سایر ارگانل‌های آن از جمله هسته گردد که متعاقباً بسیاری از ارگانل‌ها از بین رفته و هسته نیز نکروزه می‌گردد. پس نکروز هسته و آسیب وارد شده به DNA به اندازه‌ای است که پروتئین P53 وارد فاز تخریب گر خود شده و آپوپتوز سلولی را بیش از پیش القا می‌کند (۴۴). به‌طور کلی می‌توان این گونه نتیجه‌گیری نمود که بین فرآیندهایی که به کاهش راندمان عملکردی و تخریب بافت در کبد از طریق تولید رادیکال‌های آزاد ناشی از متابولیت‌های اسپارتام منجر می‌شود با میزان بیان ژن‌هایی که باعث افزایش سرعت آپوپتوز سلولی می‌شوند رابطه مستقیم وجود دارد، بدین معنی که متعاقب آن تغییرات فاکتورهای هیستومتریکی و هیستولوژیکی در جهت کاهش راندمان عملکرد طبیعی اندام اتفاق خواهد افتاد و براساس نتایج حاصل از این مطالعه پیشنهاد می‌گردد در صورت استفاده از این افزودنی‌ها به ویژه

است با آسیب‌های کبدی کلوستاتیک (انسداد مجاری صفراوی) که عمدتاً بافت پارانشیم کبد را تحت تأثیر قرار می‌دهد در ارتباط باشد (۳۲). به‌طور کلی می‌توان گفت بیشترین میزان افزایش این آنزیم در اثر انسداد مجاری صفراوی رخ می‌دهد (۳۳). همچنین از آنجا که استرس اکسیداتیو ناشی از متابولیت‌های اسپارتام از طریق افزایش بیان ژن فاکتور رشد در سلول‌های اندوتلیال و مزانشیمال بافت کبد سبب افزایش سطح سرمی آنزیم‌های کبدی می‌شود (۳۴) پس می‌توان بیان نمود که مصرف اسپارتام از این طریق می‌تواند سبب افزایش سطح سرمی آنزیم AST گردد. علاوه بر این، اختلال در ساختار و عملکرد هپاتوسیت‌ها در نتیجه هجوم گونه‌های فعال اکسیژن که به دنبال تداخل ناشی از متابولیت‌های اسپارتام با سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن صورت می‌گیرد سبب نشت آنزیم‌های کبدی به جریان خون در موش‌های تیمار شده با اسپارتام می‌شود (۳۵). همچنین افزایش سطح سرمی بیلی روبین در این مطالعه را می‌توان به استرس اکسیداتیو و متعاقباً واکنش‌های التهابی ناشی از آن نسبت داد که این خود باعث جلوگیری از انتقال بیلی روبین کونژوگ به کیسه صفرا می‌شود و سبب افزایش سطح آن در خون می‌گردد (۳۶).

طبق نتایج حاصل از مطالعه حاضر مشاهده گردید به دنبال استفاده از اسپارتام میزان بیان ژن‌های Bax، P53 و Caspase III در گروه‌های دریافت‌کننده اسپارتام نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری داشته است ($P < 0.05$). نتایج این مطالعه می‌تواند با نتایج حاصل از مطالعاتی که اثرات حفاظتی آنتی‌اکسیدان‌ها را مورد بررسی قرار می‌دهند در تضاد باشد که از جمله آن‌ها می‌توان به مطالعه‌ای که مرادی و دیگران در سال ۲۰۲۰ بر روی بیان ژن‌های بافت کبد رت‌ها انجام دادند اشاره کرد. آن‌ها دریافتند که مصرف کروسین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان باعث افزایش بیان ژن Bcl2 و کاهش بیان ژن Bax می‌گردد و متعاقباً باعث جلوگیری از آپوپتوز سلول‌های کبدی در مقابل اثرات مخرب داروی دوکسوروبیسین می‌شود (۳۷).

همچنین به نظر می‌رسد می‌توکندری نقش مهمی در تنظیم آپوپتوز سلول‌های مختلف بازی می‌کند (۳۸). به‌طوری که Bcl2 با فعالیت پیش آپوپتوزی Bax به‌وسیله جلوگیری از جابجایی آن به می‌توکندری مخالفت می‌کند. هنگامی که Bax وارد می‌توکندری می‌شود، منافذی را در غشای می‌توکندری شکل می‌دهد که در نتیجه پروتئین‌هایی از جمله سیتوکروم c آزاد شده و وارد سیتوزول می‌شود و باعث فعال‌سازی آبشار کاسپازی می‌شود (۳۹). علاوه بر این، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) تولید شده ناشی از متابولیت‌های اسپارتام یک محرک قوی برای فعال کردن آپوپتوز در سلول‌های کبدی می‌باشند (۴۰). از این رو ROS، آپوپتوز را به‌طور عمده از طریق تعدیل مسیر مربوط به

8. Osterloh JD, Pond SM, Grady S, Becker CE. Serum formate concentrations in methanol intoxication as a criterion for hemodialysis. *Ann Intern Med* 2000;104:2000-3.
9. Johlin FC, Fortman CS, Nghiem D, Tephly TR. Studies on the role of folic acid and folate-dependent enzymes in human methanol poisoning. *Mol Pharmacol* 1987;31:557-61. doi: 10.1016/S0026-895X(25)10468-9
10. Abhilash M, Sauganth Paul MV, Varghese MV, Nair RH. Effect of long term intake of aspartame on antioxidant defense status in liver. *Food Chem Toxicol* 2011;3:1-5.
11. Mourad IM, Noor NA. Aspartame (a widely used artificial sweetener) and oxidative stress in the rat cerebral cortex. *Int J Pharm* 2011;2:4-10.
12. Ashok I, Sheeladevi R. Biochemical responses and mitochondrial mediated activation of apoptosis on long-term effect of aspartame in rat brain. *Redox Biol* 2014;2:820-31. doi: 10.1016/j.redox.2014.04.011
13. Ashok I, Sheeladevi R. Oxidant stress evoked damages in rat hepatocyte leading to triggered Nitric oxide synthase (NOS) levels on long term consumption of aspartame. *Anal* 2015;1-13. doi: 10.1016/j.jfda.2014.07.011
14. Iman MM, Naveen AN. Aspartame (a widely used artificial sweetener) and oxidative stress in cerebral cortex. *Int J Pharm* 2011;2:4-10.
15. Iman MM. Effect of aspartame on some oxidative stress parameters in liver and kidney of rats. *Afr J Pharm Pharmacol* 2011;5:678-82. doi: 10.5897/AJPP10.302
16. Arbind KC, Sheeladevi R. Imbalance of oxidant-antioxidant status by aspartame in the organs of immune system of wistar albino rats. *J Pharm Pharmacol* 2014;7:3019-25.
17. 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;49:2899-905. doi: 10.1016/j.fct.2011.08.001
18. Onalapo AY, Onalapo 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. doi: 10.1016/j.nlm.2016.12.021
19. Onalapo AY, Abdusalam SZ, Onalapo OJ. Silymarin attenuates aspartame-induced variation in mouse behaviour, cerebrocortical morphology and oxidative stress markers. *Pathophysiology* 2017; 24:51-62. doi: 10.1016/j.pathophys.2017.01.002
20. Tavafi M, Ahmadvand H, Tamjidipoor A, Delfan B, Khalatbari AR. Satureja khozestanica essential oil ameliorates progression of diabetic nephropathy in uninephrectomized diabetic rats. *Tissue and Cell* 2011;43:45-50. doi:10.1016/j.tice.2010.11.004
21. Tamatani M, Mitsuda N, Matsuzaki H, Okado H, Miyake S, Vitek MP, et al. A pathway of neuronal apoptosis induced by hypoxia/reoxygenation: roles of nuclear factor-kappaB and Bcl-2. *J Neurochem* 2000;75:683-93. doi: 10.1046/j.1471-4159.2000.0750683.x
22. Harrison DC, Davis RP, Bond BC, Campbell CA, James MF, Parsons AA, et al. Caspase mRNA expression in a rat model of focal cerebral ischemia. *Brain Res Mol Brain Res* 2001;89:133-46. doi: 10.1016/s0169-328x(01)00058-4
23. Marinovich M, Galli CL, Bosetti C, Gallus S, Vecchia CL. Aspartame, low-calorie sweeteners and disease: regulatory safety and epidemiological issues. *Food Chem Toxicol* 2013;60:109-15. doi: 10.1016/j.fct.2013.07.040
24. Pretorius E, Humphries, PA. review of the histological morphology of the liver and kidney affected by aspartame. University of Pretoria South Africa, 8, 137-80.

آسپارتام در زندگی روزمره به میزان و مدت زمان مصرف آن توجه گردد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان مطالعه حاضر مراتب قدردانی خود را از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران برای حمایت از پژوهش حاصل اعلام می کنند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تضاد منافع را اعلام نکردند.

حمایت مالی

این تحقیق با حمایت معاونت محترم پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انجام شده است.

ملاحظات اخلاقی

تمام بررسی های مطالعه با رعایت حقوق حیوانات و کد اخلاق ۳۰۰۲۹/۶/۱۴ دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انجام شده است.

مشارکت نویسندگان

نویسنده اول: انجام مداخله و نگارش مقاله

نویسنده دوم: جمع آوری نمونه و انجام مداخله

نویسنده سوم: استاد راهنما و انجام تجزیه و تحلیل داده های آماری

نویسنده چهارم: استاد راهنما و ویرایش مقاله و در پایان مقاله مورد تأیید نویسندگان می باشد.

کد اخلاق

کد اخلاق ۳۰۰۲۹/۶/۱۴ می باشد.

References

1. 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;37:629-727. doi: 10.1080/10408440701516184
2. Alleva R, Borghi B, Santarelli L, Straffella E, Carbonari D, Bracci M, et al. In vitro effect of aspartame in angiogenesis induction. *Toxicol in Vitro* 2011;25:286-93. doi: 10.1016/j.tiv.2010.09.002
3. Vences-Mejia A, Labra-Ruiz N, Hernandez-Martinez N, Dorado-Gonzalez V, Gomez-Garduno J, Perez-Lopez I, et al. The effect of aspartame on rat brain xenobiotic-metabolizing enzymes. *Hum Exp Toxicol* 2006;25:453-9. doi: 10.1191/0960327106het6460a
4. Roberts HJ. Aspartame disease: a possible cause for concomitant Graves disease and pulmonary hypertension. *Tex Heart Inst J* 2004;31:105-6.
5. Kroger M, Meister K, Kava R. Low-calorie sweeteners and other sugar substitutes: a review of the safety issues. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2006;5:35-47. doi: 10.1111/j.1541-4337.2006.tb00081.x
6. Humphries P, Pretorius E, Naude H. Direct and indirect cellular effects of aspartame on the brain. *Eur J Clin Nutr* 2008;62:451-62. doi: 10.1038/sj.ejcn.1602866
7. Cederbaum AI. Alcohol metabolism. *Clin Liver Dis* 2012;16:667-685. doi: 10.1016/j.cld.2012.08.002

25. El Haliem NGA, Mohamed DS. The effect of aspartame on the histological structure of the liver and renal cortex of adult male albino rat and the possible protective effect of Pimpinella anisum oil. *Egyptian Journal of Histology* 2011;34:715-26. doi: [10.1097/01.EHX.0000406589.05585.8d](https://doi.org/10.1097/01.EHX.0000406589.05585.8d)
26. Miyaoka Y, Ebato K, Kato H, Arakawa S, Shimizu S, Miyajima A. Hypertrophy and unconventional cell division of hepatocytes underlie liver regeneration. *Curr Biol* 2012;22:1166-75. doi: [10.1016/j.cub.2012.05.016](https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.05.016)
27. Butchko HH, Stargel WW, Comer CP, Mayhew DA, Benninger C, Blackburn GL, et al. Aspartame: review of safety. *Regul Toxicol Pharmacol* 2002;35:81-93. doi: [10.1006/rtph.2002.1542](https://doi.org/10.1006/rtph.2002.1542)
28. Inas Z, Abdallah A. Physiological changes induced by long term administration of saccharin compared with aspartame to male albino rats. *Egypt J Hosp Med* 2002;8:70-81. doi: [10.21608/ejhm.2002.18747](https://doi.org/10.21608/ejhm.2002.18747)
29. Kawaratani H, Tsujimoto T, Douhara A, Takaya H, Moriya K, Namisaki T, et al. The effect of inflammatory cytokines in alcoholic liver disease. *Mediators Inflamm* 2013;2013:495156. doi: [10.1155/2013/495156](https://doi.org/10.1155/2013/495156)
30. El-Elaimy A, El-Nabi SEH. Influence of thiola on pesticide induced intoxication to preventive effect of liver damage. *Int J Environ Sci Technol* 1990;1:67-82.
31. Kasper D, Fauci, A, Hauser S, Longo D, Jameson J, et al. *Harrison's Principles of Internal Medicine* (19th ed.). New York: McGraw-Hill Education. 2015.
32. Molzemi S, Bolbolhaghghi N, Sedighi M, Hadizade Bazaz M, Hassan Vaezi, G. Effect of Ritalin on liver histology and some liver enzymes in streptozotocin-safe and diabetic rats. *Tehran University Medical Journal* 2018;76:103-10.[Persian].
33. Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado JA, Pina E, Geller DA. Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 2008;147:153-9. doi: [10.1016/j.jss.2007.06.015](https://doi.org/10.1016/j.jss.2007.06.015)
34. Adaramoye OA, Akanni OO. Effects of long-term administration of aspartame on biochemical indices, lipid profile and redox status of cellular system of male rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2016; 27:29-37. doi: [10.1515/jbcpp-2014-0130](https://doi.org/10.1515/jbcpp-2014-0130)
35. Moradi M, Shakerian S, Nikbakht M. Effect of eight weeks of high intensity interval training and crocin consumption on the apoptotic genes expression in the liver tissue of male rats under chronic doxorubicin induction. *J Birjand Univ Med Sci* 2020;27:323-35.[Persian]. doi: [10.32592/JBirjandUnivMedSci.2020.27.4.101](https://doi.org/10.32592/JBirjandUnivMedSci.2020.27.4.101)
36. Peterson J M, Bryner RW, Sindler A, Frisbee JC, Always SE. Mitochondrial apoptotic signaling is elevated in cardiac but not skeletal muscle in the obese Zucker rat and is reduced with aerobic exercise. *J Appl Physiol* 2008;105:1934-43. doi: [10.1152/jappphysiol.00037.2008](https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00037.2008)
37. Koçtürk S, Kayatekin BM, Resmi H, Açıkgöz O, Kaynak C, Özer E. The apoptotic response to strenuous exercise of the gastrocnemius and solues muscle fibers in rats. *Eur J Appl Physiol* 2008;102:515-24. doi: [10.1007/s00421-007-0612-7](https://doi.org/10.1007/s00421-007-0612-7)
38. Liu WY, He W, Li H. Exhaustive training increases uncoupling protein 2 expression and decreases Bcl-2/Bax ratio in rat skeletal muscle. *Oxid Med Cell Longev* 2013;2013:780719. doi: [10.1155/2013/780719](https://doi.org/10.1155/2013/780719)
39. Kalyani RR, Corriere M, Ferrucci L. Age-related and disease-related muscle loss: the effect of diabetes, obesity, and other diseases. *Lancet Diabetes & Endocrinology* 2014;2:819-29. doi: [10.1016/S2213-8587\(14\)70034-8](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(14)70034-8)
40. Naito H, Powers SK, Demirel HA, Junichiro A. Exercise training increases heat shock protein in skeletal muscles of old rats. *Med Sci Sports Exerc* 2001;33:729-34. doi: [10.1097/00005768-200105000-00008](https://doi.org/10.1097/00005768-200105000-00008)
41. Wree A, Kahraman A, Gerken G, Canbay A. Obesity affects the liver the link between adipocytes and hepatocytes. *Digestion* 2011; 83:124-33. doi: [10.1159/000318741](https://doi.org/10.1159/000318741)
42. Wang K. Molecular mechanisms of hepatic apoptosis. *Cell Death Dis* 2014;10:1038-42. doi: [10.1038/cddis.2013.499](https://doi.org/10.1038/cddis.2013.499)
43. Gombos K, Varjas T, Orsos Z, Polyak E, Peredi J, Varga Z. The effect of aspartame administration on oncogene and suppressor gene expressions. *In Vivo* 2007;21:89-92.



Study of Histomorphometry Correlation and Liver Function with Bcl2, Bax, Caspase 3 and P53 Genes Expression Following Aspartam-Induced in Mice

Moslem Dahmardeh (Ph.D.)^{1*}, Narges Zadsar (Ph.D.)², Hassan Morovvati (Ph.D.)³, Zahra Tootian (Ph.D.)³

1- Dept of Veterinary Medicine, Vice President of Medical Sciences, Islamic Azad University of Bojnord, Bojnord, Iran.

2- Ph.D. Graduated in Comparative Anatomy and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

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

Received: 7 December 2025, Accepted: 9 March 2026

Abstract:

Introduction: This study aimed to investigate the histomorphometric correlation and liver function in relation to Bcl2, Bax, Caspase 3, and P53 gene expression following aspartame-induced changes in adult mice.

Methods: In this experimental in vitro study, 36 adult male NMRI mice were divided into one control group and three experimental groups. Mice in the experimental groups received 40, 80, and 160 mg/kg aspartame orally, daily for 90 days, while the control group received 0.3 ml of distilled water. One day after treatment, blood and histology samples were collected to evaluate biochemical, histomorphometric, and gene expression parameters in the liver.

Results: The results showed that the amount of hepatocyte diameter, hepatocyte nucleus diameter, necrosis, vacuolization, and pyknosis of the nucleus as well as the levels of liver enzymes such as alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase and bilirubin increased following aspartame-induced. This increase was significant in some groups ($P < 0.05$). In addition, a significant reduction in sinusoidal space size was observed in all experimental groups compared to the control group ($P < 0.05$). Regarding the expression of apoptosis-dependent genes due to aspartame administration, it was observed that expression of Bax, Caspase-3 and p53 genes was significant in the experimental groups compared to the control group ($P < 0.05$).

Conclusion: Our research revealed that aspartame metabolite-induced free radicals in the liver, causing damage and functional decline, directly correlate with the upregulation of genes involved in cellular apoptosis.

Keywords: Aspartame, Histomorphometry, Bcl2, Bax, Caspase 3 and P53 genes.

Conflict of Interest: No

*Corresponding author: M. Dahmardeh, Email: Moslem.dahmardeh10@iau.ir

Citation: Dahmardeh M, Zadsar N, Morovvati H, Tootian Z. Study of histomorphometry correlation and liver function with Bcl2, Bax, Caspase 3 and P53 genes expression following aspartam-induced in mice. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2026;20(4):50-60.

