

## تاثیر مصرف طولانی مدت اسپارتام بر کیفیت اسپرم، تستوسترون و پارامترهای اکسیدانی در موش های سفید کوچک آزمایشگاهی

محمدتقی شبیبانی<sup>۱\*</sup>، حجت عنبر<sup>۱</sup>، حسن مروتی<sup>۱</sup>، مزدک رازی<sup>۲</sup>، جمیله سالار آملی<sup>۱</sup>

(۱) گروه علوم پایه، دانشکده دام پزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

(۲) گروه علوم پایه، دانشکده دام پزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۸/۱۳

### چکیده

**مقدمه:** اسپارتام معروف ترین و پرمصرف ترین شیرین کننده مصنوعی می باشد که در مواد غذایی مختلف به طور گسترده ای استفاده می گردد. گزارش های بحث برانگیز زیادی در مورد سمیت اسپارتام بر روی بافت های مختلف بدن وجود دارد، با این حال در رابطه با عوارض اسپارتام بر روی دستگاه تولیدمثل اطلاعات زیادی در دسترس نیست. مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثرات اسپارتام بر کیفیت اسپرم و پارامترهای اکسیدانی در موش صورت گرفت.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه تعداد ۳۶ سر موش نر بالغ نژاد NMRI به صورت تصادفی به چهار گروه نه سری تقسیم شدند. سه گروه از گروه های فوق به ترتیب اسپارتام را به میزان ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت خوراکی از طریق گاواژ به مدت ۹۰ روز دریافت نموده و هم چنین گروه کنترل نیز در نظر گرفته شد. ۲۴ ساعت پس از آخرین تیمار، نمونه های خونی از طریق قلب جمع آوری و پارامترهای کیفیت اسپرم شامل شمارش، تحرک، قابلیت زنده مانی، تراکم کروماتین، اشکال غیرطبیعی و آسیب DNA اسپرم مورد بررسی قرار گرفتند.

**یافته های پژوهش:** نتایج نشان دهنده کاهش معنی دار ظرفیت آنتی اکسیدانی تام (TAC)، تستوسترون و نیز افزایش معنی دار سطح مالون دی آلدئید (MDA) در گروه های ۸۰ و ۱۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه کنترل بود ( $P < 0.01$ ). دریافت اسپارتام باعث کاهش تعداد، تحرک، زنده مانی و بلوغ اسپرم ( $P < 0.001$ ) و هم چنین افزایش میزان اشکال غیرطبیعی و آسیب به DNA اسپرم در گروه های ۸۰ و ۱۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه کنترل گردید ( $P < 0.001$ ).

**بحث و نتیجه گیری:** یافته های مطالعه حاضر آشکار ساخت که مصرف اسپارتام در موش می تواند به کاهش کیفیت اسپرم و تغییرات منفی در پارامترهای اکسیدانی منجر شود.

واژه های کلیدی: اسپارتام، تستوسترون، اسپرم، موش

\* نویسنده مسئول: گروه علوم پایه، دانشکده دام پزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

Email: tsheibani@yahoo.com

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

## مقدمه

انواع مختلف مواد افزودنی که در خوراکی ها موجود می باشد معمولاً به عنوان غذا مورد استفاده قرار نمی گیرند بلکه درون غذا و یا روی آن استفاده می گردد 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 کننده ها، افزودنی های رنگی، طعم دهنده ها و غیره می باشند. بیش از ۳۰۰۰ افزودنی مورد تایید برای استفاده در سراسر جهان وجود دارد و شیرین کننده های مصنوعی یکی از مواد افزودنی مهم غذایی هستند(۲). آسپارتام یک شیرین کننده مصنوعی است که در فرآورده غذایی و دارویی از جمله در نوشیدنی های کم کالری و بدون قند، بستنی ها، آبنبات ها، کیک های بدون قند، نوشیدنی های رژیمی، شکلات های بدون قند و غیره مورد استفاده قرار می گیرد(۳). این ماده معروف ترین و پرمصرف ترین شیرین کننده مصنوعی می باشد که در میان افراد مبتلا به دیابت و اضافه وزن طرفداران بسیاری داشته و از این رو تمایل یا نیاز به ساخت غذاها و نوشیدنی ها بدون اضافه کردن کالری اضافی، آسپارتام را محبوب می سازد(۳). آسپارتام، دی پپتیدی حاصل از ترکیب دو اسید آمینه اسید آسپارتیک و فنیل آلانین، با فرمول شیمیایی L-آسپارتیل-L-فنیل-آلانین متیل استر می باشد که در مقادیر یکسان با ساکاروز، میزان کالری مشابهی (۴ کیلوکالری بر گرم) را تولید می کنند، با این حال، شدت شیرین کنندگی آن ۱۶۰ تا ۱۸۰ برابر ساکارز می باشد(۳). میزان مصرف توصیه شده آسپارتام ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم در اروپا و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم در آمریکا می باشد 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. بنا بر این این طیف از افراد و به طور ضمنی و ناخودآگاه سایر افراد جامعه نیز از محصولات و مواد غذایی که حاوی آسپارتام هستند، استفاده می کنند و این چنین به راحتی از مرز میزان مصرف توصیه شده آسپارتام عبور می کنند(۴). در مطالعاتی که بر روی مصرف خوراکی

آسپارتام و در پی آن جذب روده ای و متابولیسم آسپارتام در پستانداران صورت گرفته است، نشان داده شده که این ماده در داخل دستگاه معده ای-روده ای توسط استرازاها و پپتیدازها به تقریباً ۵۰ درصد فنیل آلانین، ۴۰ درصد اسید آسپارتیک و ۱۰ درصد متانول هیدرولیز می گردد(۵،۴).

گزارش شده است که نه تنها متانول که برای اکثر بافت های بدن مخرب می باشد بلکه متابولیت های حاصل از آن یعنی فرم آلدئید و اسیدفرمیک که نتیجه متابولیسم اصلی متانول با وارد شدن به گردش سیاهرگی باب و سپس اکسیده شدن متانول در کبد می باشند موجب سمیت در اکثر سلول و بافت های بدن می گردند(۵،۶). مقدار نسبتاً کمی آسپارتام به طور قابل توجهی می تواند باعث افزایش سطح متانول در خون شود(۷). متابولیسم متانول به فرم آلدئید و اسیدفرمیک با تشکیل آنیون سوپراکسید و پراکسید هیدروژن همراه است(۷).

افزایش تولید رادیکال های آزاد یا کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی سلول ها سبب عدم تعادل در وضعیت بازسازی سلول می شود که خود منجر به پراکسیداسیون لیپیدی غشای پلاسمایی، القای شکستگی در DNA و غیر فعال شدن پروتئین ها می شود(۸). قرار گرفتن در معرض متانول به عنوان یک محصول جانبی آسپارتام، باعث آسیب به غشای میتوکندریایی شده و منجر به بیش تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) و ایجاد استرس اکسیداتیو می گردد(۸).

یافته های قبلی ثابت کرده است که آسپارتام سبب ایجاد سمیت در بافت های مختلف می شود(۸،۹). به تازگی، بسیاری از مطالعات تجربی تایید کرده اند که آسپارتام حتی بسیار کمتر از میزان مصرف توصیه شده روزانه یک ماده بالقوه سرطان زا می باشد و باعث افزایش خطر ابتلا به لنفوم، لوسمی، تومورهای دستگاه تناسلی و ادراری، تومورهای دستگاه عصبی مرکزی و آسیب به ساختار عصب سیاتیک می گردد(۸،۹،۵،۸). علاوه بر این، مطالعات گسترده ای ارتباط بین مصرف آسپارتام و خطر ابتلا به دیابت نوع ۲، زایمان زودرس،

۱- گروه اول کنترل (Control): حیوانات این گروه به مقدار ۰/۳ میلی لیتر سرم فیزیولوژی از طریق گاواژ دریافت کردند.

۲- گروه دوم آسپارتام ۴۰ یا دوز پایین آسپارتام (Low Dose Aspartam=LD ASP): این گروه آسپارتام را به میزان ۴۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت خوراکی از طریق گاواژ دریافت کردند (۱۰).

۳- گروه سوم آسپارتام ۸۰ یا دوز متوسط آسپارتام (Medium Dose Aspartam= MD ASP): این گروه آسپارتام را به میزان ۸۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت خوراکی از طریق گاواژ دریافت نمودند.

۴- گروه چهارم آسپارتام ۱۶۰ یا دوز بالا آسپارتام (High Dose Aspartam= HD ASP): حیوانات این گروه آسپارتام را به میزان ۱۶۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت خوراکی از طریق گاواژ دریافت کردند.

یک روز پس از پایان دوره تیمار ۹۰ روزه، کلیه حیوانات موجود در چهار گروه ذکر شده با مخلوط کتامین و زایلازین بی هوش شدند. سپس نمونه های خون با وارد کردن سرنگ های استریل از خلف زائده مانوبریوم جناغ و از قسمت بطن راست قلب جمع آوری و در انتها حیوانات توسط گاز CO<sub>2</sub> آسان کشی شدند. سپس نمونه های خونی با میانگین ۰/۵ سی سی از هر موش، در میکروتیوب های ۲ سی سی ریخته شده و پس از لخته شدن خون، جهت استحصال سرم، نمونه ها در ۳۰۰۰ دور به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شدند. نمونه های سرم جدا شده تا زمان انجام آزمایش های سرمی در دمای ۲۰- نگهداری شدند. سرم ها تا زمان سنجش هورمونی به دمای ۲۰- درجه سانتی گراد انتقال یافتند. برای سنجش تستوسترون، روش الیزا و رادیوایمونومتری با استفاده از کیت اختصاصی (Diaplus Inc. USA) مورد ارزیابی قرار گرفته و گروه ها با هم مقایسه شدند.

به منظور ارزیابی پارامترهای کیفیت اسپرم، به دنبال کالبدگشایی، ابتدا اپی دیدیم زیر لوپ با

سمیت کلیوی، آسیب به قشر مغز و مخچه، سمیت کبدی و ایجاد تغییرات هیستوپاتولوژیک در غدد بزاقی پاروتید را به اثبات رسانده است (۵،۸،۹).

از آن جایی که سایر شیرین کننده های مصنوعی همانند ساخارین و سیکلامات توانسته اند با افزایش رادیکال های آزاد موجب تغییراتی در دستگاه تناسلی شوند، پیش بینی می شود آسپارتام نیز بتواند موجب تغییرات اسپرمی، هورمونی و اکسیدانی در دستگاه تناسلی نر شود. لذا هدف از این مطالعه، بررسی اثرات آسپارتام بر روی پارامترهای کیفیت اسپرم، تغییرات هورمون تستوسترون و هم چنین پارامترهای اکسیدانی مانند ظرفیت آنتی اکسیدانی تام و میزان مالون دی آلدئید در موش های سوری تیمار شده طی یک دوره ۹۰ روزه بود.

### مواد و روش ها

برای انجام این پژوهش که به صورت یک کارآزمایی تجربی تصادفی شده شاهددار طرح ریزی شده بود، 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  $25 \pm 2$  سانتی گراد و رطوبت نسبی  $50 \pm 10$  درصد در قفس های پلی اتیلنی مخصوص نگهداری موش با دسترسی آزاد به آب آشامیدنی نگهداری شدند. تمامی حیوانات به صورت برابر از پیلت های مخصوص موش تغذیه می کردند. کلیه ضوابط و شرایط نگهداری و انجام آزمایش ها روی حیوانات در این مطالعه طبق دستورالعمل های مصوب کمیته اخلاق دانشکده دام پزشکی دانشگاه تهران با کد اخلاق ۷۵۰۶۰۲۵/۶/۲۴ صورت پذیرفت.

قبل از شروع دوره تیمار، به منظور سازگاری با شرایط جدید محیط، حیوانات به مدت دو هفته نگهداری شدند و بعد از نشاندار کردن، موش های 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 گاواژ دریافت کردند:

اختلالات مورفولوژیک بودند، به عنوان اسپرم های غیرطبیعی در نظر گرفته می شدند. تعداد ۲۰۰ اسپرم برای هر نمونه با درشت نمایی ۴۰۰ برابر مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل در قالب درصد بیان شدند (۱۱). برای ارزیابی هر گونه شکستگی در دو رشته DNA مربوط به اسپرم موش ها، رنگ آمیزی آکریدین اورنج (Acridine Orange) انجام گرفت. در صورتی که DNA اسپرم دچار شکستگی شده باشد متعاقب رنگ آمیزی، DNA در طیفی از رنگ زرد تا قرمز فلوئورسنت بستگی به میزان آسیب، نمایان می شود. DNA سالم به رنگ سبز دیده می شود. در این روش پس از سه بار شستشوی نمونه اسپرم با بافر (PBS) Phosphate buffer solution و حذف مایع رویی، رسوب حاصل به کمک بافر PBS به غلظت نهایی رسانده شد. اسمیرهای مورد نظر از محیط کشت حاوی اسپرم تهیه شد و پس از خشک شدن آن در محیط آزمایشگاه به مدت ۳۰ دقیقه در داخل ظرف حاوی استون- اتانول به نسبت یک به یک قرار گرفت. پس از خشک شدن لام ها در مجاورت هوا، لام های فوق به مدت هفت دقیقه در ظرف حاوی محلول رنگ آکریدین اورنج قرار گرفت و پس از خشک شدن نهایی توسط میکروسکوپ فلوئورسنت و عدسی  $100\times$  با فیلتر ۴۶۰ نانومتر بررسی شد و نتایج حاصل به صورت درصد بیان گردید (۱۱). برای ارزیابی بلوغ هسته اسپرم از رنگ آمیزی آنیلین بلو (Aniline Blue) استفاده شد. اساس این آنالیز بر این نکته استوار است که در طی مرحله اسپرمیوتز، پروتئامین بجای هیستون در کروماتین هسته قرار می گیرد که این جایگزینی در تراکم و پایداری اسپرم بسیار با اهمیت است. در این رنگ آمیزی، اسپرم های نابالغ به دلیل هیستون زیاد به رنگ آبی درآمده و اسپرم های بالغ از رنگ پذیری کمتری برخوردار هستند. همانند روش اشاره شده در بالا، پس از تثبیت لام ها در محلول استون- اتانول و خشک شدن لام ها در مجاورت هوا، لام ها به مدت هفت دقیقه در محلول حاوی رنگ آنیلین بلو قرار گرفته و پس از خشک شدن در مجاورت هوا با میکروسکوپ نوری و درشت نمایی ( $100\times$ ) بررسی شدند (۱۱).

بزرگ نمایی ۲۰ برابر از بافت بیضه جدا شده و بافت های اطراف آن تمیز گردید. سپس دم اپیدیدیم درون پتری دیش های حاوی یک میلی لیتر محیط کشت HTF که امروزه به عنوان محیط کشت مناسب برای اسپرم ها در نظر گرفته شده است، قرار گرفت. برای جلوگیری از ایجاد شوک حرارتی و آسیب به اسپرم ها، تمام وسایل مورد استفاده و محیط کشت قبل از مصرف در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شدند. سپس دم اپیدیدیم در داخل محیط کشت به قطعات کوچک تقسیم شده و به مدت ۲۰ دقیقه در درون محیط کشت در انکوباتور باقی ماند تا امکان خروج اسپرم ها از اپیدیدیم فراهم آید. در نهایت سوسپانسیون حاوی اسپرم با استفاده از محیط کشت به نسبت ۱ به ۲۰ رقیق گردید (۱۱). جهت ارزیابی میزان تحرک اسپرم ها، یک قطره از محلول رقیق شده فوق بر روی لام میکروسکوپی قرار داده شد و ۱۰ عدد میدان دید میکروسکوپی با درشت نمایی ۴۰۰ برابر مورد بررسی قرار گرفت. سپس میانگین کل اسپرم های متحرک در این ۱۰ میدان دید به عنوان درصد تحرک ثبت گردید (۱۱). به منظور ارزیابی تعداد اسپرم ها از هموسیتمتر استفاده شد. ۱۰ میکرولیتر از محلول رقیق شده اسپرم بر روی هموسیتمتر قرار گرفته و به مدت ۵ دقیقه بدون حرکت گذاشته شد تا تحرک اسپرم ها کاهش یابد. تعداد اسپرم ها در هر میلی لیتر با استفاده از فرمول  $n \times 5000 \times d$  و توسط میکروسکوپ نوری با درشت نمایی ۴۰۰ برابر محاسبه گردید که n، تعداد اسپرم های شمارش شده در پنج مربع هموسیتمتر، d عکس رقت سوسپانسیون حاوی اسپرم می باشد (۱۱). هم چنین برای ارزیابی درصد اسپرم های زنده و نیز اسپرم های غیرطبیعی از لحاظ مورفولوژی رنگ آمیزی اتوزین-نگروزین مورد استفاده قرار گرفت. مبنای تشخیص اسپرم های زنده از اسپرم های مرده در این روش رنگ آمیزی بر این اصل استوار است که در اثر آسیب به غشاء پلاسمایی، اسپرم ها در برابر رنگ مذکور نفوذ پذیر می گردند. بنا بر این آن دسته از اسپرم هایی که هر یک از قطعات سر، گردن و یا دم آن ها رنگ گرفته بود به عنوان اسپرم های مرده در نظر گرفته شدند. در همین راستا اسپرم هایی که دارای بقایای سیتوپلاسمی و نیز سایر

ارزیابی تحرک اسپرم: نتایج حاصل از مطالعه تحرک اسپرم نشان داد که تحرک اسپرم در گروه های دوز متوسط و دوز بالای آپاراتام به صورت معنی داری ( $P < 0.001$ ) نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا کرده بود، این در حالی بود که گروه دوز پایین آپاراتام فاقد اختلاف معنی دار ( $P < 0.05$ ) با گروه کنترل بود (نمودار شماره ۱).

بررسی میزان اسپرم های غیرطبیعی: در میانگین میزان اسپرم های غیرطبیعی در گروه های دوز متوسط آپاراتام و دوز بالای آپاراتام نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری ( $P < 0.001$ ) مشاهده گردید. هم چنین گروه دوز پایین آپاراتام نیز نسبت به گروه کنترل فاقد افزایش معنی دار ( $P < 0.05$ ) در میزان اسپرم های غیرطبیعی بود (نمودار شماره ۱).

قابلیت زنده مانی اسپرم: نتایج حاصل از بررسی درصد اسپرم های زنده بیانگر این است که میانگین درصد اسپرم زنده در گروه های دوز متوسط و دوز بالای آپاراتام به صورت معنی داری ( $P < 0.001$ ) نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا کرده بود. گروه دوز پایین آپاراتام فاقد اختلاف معنی دار ( $P < 0.05$ ) با گروه کنترل بود (نمودار شماره ۲، شکل شماره ۱ قسمت A).

ارزیابی اسپرم های بالغ: ارزیابی میانگین تعداد اسپرم های با هسته بالغ نشان داد که اسپرماتوزوئیدها در گروه های دوز متوسط و دوز بالای آپاراتام به صورت معنی داری ( $P < 0.001$ ) نسبت به گروه کنترل کاهش پیدا کرده بودند. تعداد اسپرم ها با هسته بالغ در گروه دوز پایین آپاراتام نیز فاقد اختلاف معنی دار ( $P < 0.05$ ) با گروه کنترل بود (نمودار شماره ۲، شکل شماره ۱ قسمت B).

ارزیابی آسیب DNA اسپرم: بررسی های حاصل از رنگ آمیزی آکریدین اورنج نشان دادند که درصد اسپرم هایی که DNA دو رشته ای ناپیوسته (آسیب دیده) داشتند در گروه های دوز متوسط آپاراتام و دوز بالای آپاراتام نسبت به گروه کنترل به طور قابل توجهی افزایش یافته و با این گروه دارای اختلاف معنی دار ( $P < 0.001$ ) بودند. آسیب DNA اسپرم در گروه دوز پایین آپاراتام نیز نسبت به گروه کنترل

سپس نمونه های سرمی جهت تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانت تام سرم (TAC)، با استفاده از روش FRAP (Ferric reducing ability of plasma) مورد اندازه گیری قرار گرفت. در این روش در pH اسیدی ایجاد شده توسط بافر استات، رنگ آبی تولید شده به واسطه احیای یون های فریک ( $Fe^{+3}$ ) کمپلکس  $Fe^{+3}$ -TPTZ و تبدیل آن ها به یون های فرو ( $Fe^{+2}$ )، در طول موج ۵۹۳ نانومتر و به صورت اسپکتروفوتومتریک مورد سنجش قرار می گیرد (۲۸). به منظور تعیین میزان پراکسیداسیون لیپیدی، سطح تولید مالون دی آلدئید (MDA) به عنوان شاخص ارزیابی این فرآیند در نمونه های سرمی بر اساس واکنش با اسید تیوباربتوریک و تولید محصولی رنگی با حداکثر جذب نوری در ۵۳۲ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت و بر اساس منحنی کالیبراسیون استاندارد MDA محاسبه و به صورت نانومول در هر میلی گرم پروتئین بیان شد (۱۲).

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

### یافته های پژوهش

بررسی تعداد اسپرم: نتایج حاصل از شمارش اسپرم ها و مقایسه آن ها بین گروه های مختلف آزمایشی و گروه کنترل نشان داد که دریافت آپاراتام در گروه های دوز متوسط و دوز بالای آپاراتام موجب کاهش معنی دار ( $P < 0.001$ ) در تعداد اسپرم ها با گروه کنترل گردید. هم چنین در گروه دوز پایین آپاراتام تعداد اسپرم ها نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری ( $P < 0.01$ ) داشت (نمودار شماره ۱).

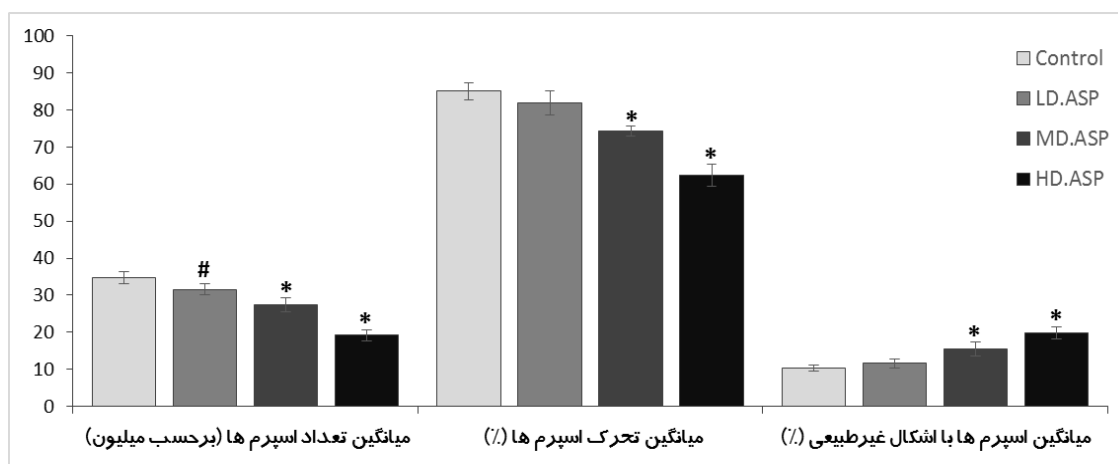
گروه کنترل دارای کاهش معنی دار ( $P < 0.001$ ) بود. در گروه دوز متوسط آسپارتام سطح ظرفیت آنتی اکسیدانی تام سرم نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری ( $P < 0.01$ ) داشت. ظرفیت آنتی اکسیدانی تام سرم در گروه دوز پایین آسپارتام نسبت به گروه کنترل فاقد اختلاف معنی دار ( $P < 0.05$ ) بود (جدول شماره ۱).

**سنجش میزان مالون دی آلدئید MDA:** بررسی میزان پراکسیداسیون چربی ها در حیوانات نشان داد که تجویز آسپارتام در گروه های دوز متوسط آسپارتام و دوز بالای آسپارتام باعث افزایش معنی داری ( $P < 0.001$ ) با گروه کنترل گشته و گروه دوز پایین آسپارتام فاقد افزایش معنی داری ( $P < 0.05$ ) در سطح مالون دی آلدئید خود در مقایسه با گروه کنترل بود (جدول شماره ۱).

افزایش معنی دار نداشته و فاقد اختلاف معنی دار ( $P < 0.05$ ) با گروه کنترل بود (نمودار شماره ۲، شکل شماره ۱ قسمت C).

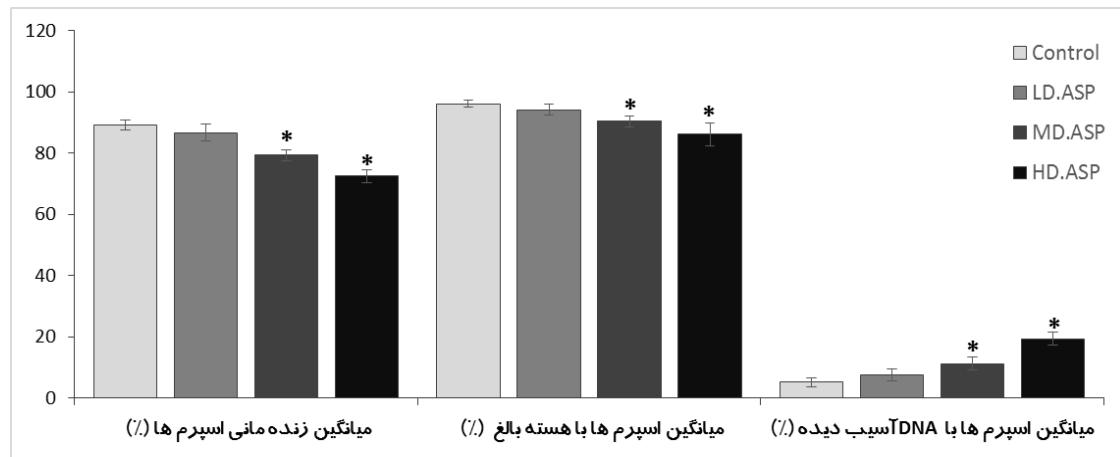
**ارزیابی حاصل از سنجش هورمون تستوسترون:** بررسی میزان هورمون تستوسترون در گروه های مختلف نشان داد که میزان این هورمون در گروه دوز بالای آسپارتام با گروه کنترل دارای کاهش معنی دار ( $P < 0.001$ ) بوده و گروه های دوز پایین و دوز متوسط آسپارتام نیز کاهش معنی داری ( $P < 0.05$ ) در سطح هورمون تستوسترون با گروه کنترل نداشتند (جدول شماره ۱).

**سنجش میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی تام سرم TAC:** سنجش میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی تام سرم در گروه های مختلف نشان داد که سطح ظرفیت آنتی اکسیدانی تام سرم در گروه دوز بالای آسپارتام با



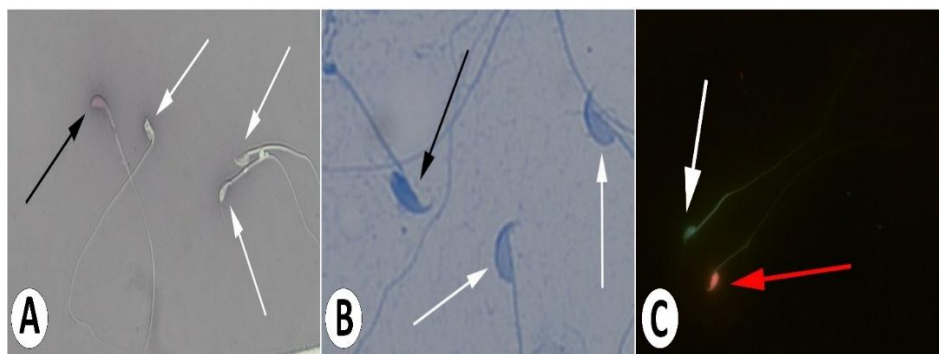
نمودار شماره ۱. مقایسه میانگین تعداد اسپرم ها، میانگین درصد تحرک اسپرم ها و میانگین درصد اسپرم ها با اشکال غیرطبیعی در گروه های مختلف آزمایشی

**Control:** کنترل، **LD.ASP:** آسپارتام را به میزان ۴۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، **MD.ASP:** آسپارتام را به میزان ۸۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، **HD.ASP:** آسپارتام را به میزان ۱۶۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن. داده ها بر اساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شده اند. \* نشان دهنده اختلاف معنی دار  $P < 0.001$  در مقایسه با گروه کنترل. # نشان دهنده اختلاف معنی دار  $P < 0.01$  در مقایسه با گروه کنترل.



نمودار شماره ۲. مقایسه میانگین قابلیت زنده ماندن اسپرم ها (درصد اسپرم های زنده)، میانگین درصد اسپرم ها با هسته بالغ و میانگین درصد اسپرم ها با DNA آسیب دیده در گروه های مختلف آزمایشی

**Control:** کنترل، LD.ASP: اسپارتام را به میزان ۴۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، MD.ASP: اسپارتام را به میزان ۸۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، HD.ASP: اسپارتام را به میزان ۱۶۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن. دوز بالا اسپارتام. داده ها بر اساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شده اند. \* نشان دهنده اختلاف معنی دار  $P < 0.001$  در مقایسه با گروه کنترل.



شکل شماره ۱. قسمت (A): نمای ریزبینی اسپرم در رنگ آمیزی انوزین-نگروزین، اسپرم های زنده با سر رنگ نگرفته (فلش های سفید رنگ) و اسپرم های مرده با سری رنگ شده (فلش سیاه رنگ) قابل رویت می باشند. قسمت (B): نمای ریزبینی اسپرم در رنگ آمیزی آنلین بلو، اسپرم های با هسته بالغ با سری به رنگ آبی کم رنگ (فلش های سفید رنگ) و اسپرم های با هسته نابالغ با سری به رنگ آبی پررنگ (فلش سیاه رنگ). قسمت (C): نمای ریزبینی اسپرم در رنگ آمیزی آکریدین اورنج، اسپرم های با DNA سالم با سر سبز رنگ (فلش سفید رنگ) و اسپرم های با آسیب DNA با سر قرمز رنگ (فلش قرمز رنگ).

جدول شماره ۱. نتایج میانگین آزمایشات بیوشیمیایی تستوسترون، ظرفیت آنتی اکسیدانی تام سرم و مالون دی آلدئید در گروه های مختلف آزمایشی

| گروه ها | تستوسترون (ng/ml) | TAC (nmol/mg)      | MDA (nmol/mg)    |
|---------|-------------------|--------------------|------------------|
| Control | ۶/۸۸ $\pm$ ۰/۳۲   | ۰/۹۲۷ $\pm$ ۰/۱۰۵  | ۱/۲۷ $\pm$ ۰/۲۲  |
| LD.ASP  | ۶/۴۴ $\pm$ ۰/۳۰   | ۰/۸۸۱ $\pm$ ۰/۰۴۸  | ۱/۵۶ $\pm$ ۰/۳۰  |
|         | P=۰/۳۴۸           | P=۰/۶۹۸            | P=۰/۵۵۵          |
| MD.ASP  | ۵/۲۲ $\pm$ ۰/۵۳   | ۰/۷۵۴ $\pm$ ۰/۰۶۷# | ۲/۳۸ $\pm$ ۰/۳۴# |
|         | P=۰/۰۸۴           | P=۰/۰۳۳            | P=۰/۰۰۱          |
| HD.ASP  | ۵/۱۰ $\pm$ ۰/۵۷*  | ۰/۶۰۱ $\pm$ ۰/۰۵۶* | ۴/۱۳ $\pm$ ۰/۲۲# |
|         | P=۰/۰۰۱           | P=۰/۰۰۱            | P=۰/۰۰۱          |

ng/ml: نانوگرم بر میلی لیتر، nmol/mg: نانو مول بر میلی گرم، Control: کنترل، LD.ASP: اسپارتام را به میزان ۴۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، MD.ASP: اسپارتام را به میزان ۸۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، HD.ASP: اسپارتام را به میزان ۱۶۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن. داده ها بر اساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شده اند. \* نشان دهنده اختلاف معنی دار  $P < 0.001$  در مقایسه با گروه کنترل. # نشان دهنده اختلاف معنی دار  $P < 0.01$  در مقایسه با گروه کنترل.

## بحث و نتیجه‌گیری

طبق نتایج این مطالعه آسپارتام سبب آسیب به پارامترهای کیفیت اسپرم در گروه‌های دوز متوسط و بالای آسپارتام می‌گردد به صورتی که باعث کاهش معنی‌دار در میزان تعداد اسپرم، تحرک اسپرم، زنده‌مانی اسپرم و بلوغ اسپرم شده و نیز افزایش معنی‌داری در اسپرم‌های غیر طبیعی و اسپرم‌های دارای DNA آسیب‌دیده می‌گردد. هم‌چنین مصرف آسپارتام در دوزهای متوسط و بالا موجب کاهش میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام‌سرم و تستوسترون شده و افزایش میزان مالون‌دی‌آلدئید را به دنبال خواهد داشت. در مورد دوز پایین آسپارتام به غیر از پارامتر تعداد اسپرم و میزان تستوسترون این گروه فاقد اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل بود. در طی دهه‌های اخیر، نگرانی‌های جوامع بشری در مورد افزایش ناباوری انسان که ریشه در ترکیبات سمی دارند رو به افزایش می‌باشد که در همین راستا افزودنی‌های مواد غذایی و تغذیه عامل مهم و تأثیرگذار در ورود این ترکیبات سمی به بدن و تأثیر آن بر روی توان باروری جنس نر می‌باشد (۱). می‌توان بیان نمود که نتایج فوق‌الذکر در مورد تأثیرات مصرف آسپارتام بر روی اکثریت پارامترهای کیفیت اسپرم و شاخص‌های استرس اکسیداتیو در این مطالعه که برای اولین بار بر روی موش و با هر سه دوز ذکر شده انجام شده است و تحقیق مشابهی با موارد یاد شده در موش وجود ندارد، می‌تواند پیامد متابولیت‌های حاصل از هیدرولیز آسپارتام طی فرآیند گوارش و جذب این متابولیت‌ها در بدن باشد (۵،۴). این مطالعات نشان داده‌اند که سمیت ناشی از مصرف خوراکی آسپارتام بیشتر به متابولیت‌های حاصل از گوارش و جذب روده‌ای این ماده مرتبط می‌باشد که طی متابولیسم آسپارتام در داخل دستگاه معده‌ای-روده‌ای توسط استرازها و پپتیدازها به تقریباً این ماده به فنیل‌آلانین، اسید آسپارتیک و متانول هیدرولیز می‌گردد (۵،۴). این گونه بیان شده است که نه تنها متانول که برای اکثر بافت‌های بدن مخرب می‌باشد بلکه دیگر متابولیت‌های حاصل از متانول یعنی فرم‌آلدئید و اسیدفرمیک نیز موجب سمیت در اکثر سلول و

بافت‌های بدن می‌گردند (۶،۵). متانول در داخل آنتروسیت‌ها متابولیزه نمی‌شود و خیلی سریع با ورود به گردش خون سیاهرگی باب‌وارد کبد شده و توسط آنزیم الکل‌دهیدروژناز به فرمالدئید اکسید می‌شود که این ماده موجب سمیت در اکثر سلول و بافت‌های بدن می‌گردند (۶،۵). مطالعات فراوانی اثرات مخرب فرمالدئید و اسیدفرمیک حاصل از آن را بر روی سیستم تولیدمثلی نر به اثبات رسانده است (۱۳). گزارشات حاکی از آن است که مقدار کمی آسپارتام به طور قابل‌توجهی قادر است باعث افزایش سطح متانول در خون شود که گفته می‌شود متابولیسم متانول به فرم‌آلدئید و اسیدفرمیک، با تشکیل آنیون سوپراکسید و پراکسید هیدروژن همراه است (۷). فنیل‌آلانین و اسید آسپارتیک متابولیت‌های دیگری از متابولیسم آسپارتام هستند که در مورد اثرات آن‌ها اطلاعات چندانی در دسترس نیست هر چند گزارشات بیان نموده‌اند که فنیل‌آلانین موجب تخریب و مختل کردن فرآیند تنظیم نوروترانسمیترها در سیستم عصبی مرکزی می‌شود (۵). هم‌چنین بیان گردیده است که اسید آسپارتیک در غلظت‌های بالا در نقش یک ماده سمی عمل می‌نماید که موجب بالا رفتن تحریک بیش از اندازه نورون‌ها می‌گردد و نیز اسید آسپارتیک به عنوان پیش‌ساز اسیدآمینو گلوتامات می‌باشد که تحریک‌کننده سیستم عصبی بوده و در نهایت منجر به تحلیل و آپوپتوز آستروسیت‌ها و نورون‌ها می‌شود (۱۴). بیشتر گزارشات حاکی از آن است که بیشترین و مخرب‌ترین اثرات سمی آسپارتام احتمالاً مربوط به متانول و متعاقباً فرم‌آلدئید 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 (۵). به وضوح مشخص شده است که دریافت آسپارتام و به دنبال آن افزایش سطح متانول و ایجاد فرم‌آلدئید و اسیدفرمیک، با تشکیل آنیون سوپراکسید و پراکسید هیدروژن باعث آسیب به غشای میتوکندریایی می‌شود،



که منجر به بیش تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) شده و باعث ایجاد استرس اکسیداتیو می گردد (۱۵،۱۰). شواهد حاکی از آن است که استرس اکسیداتیو می تواند اختلالات اسپرمی را از طریق مکانیسم های مختلفی از قبیل پراکسیداسیون لیپیدی غشای پلاسمایی اسپرم، اختلال در تحرک و مورفولوژی اسپرم و القای شکستگی در DNA اسپرم ایجاد نماید (۱۶،۱۰). هم چنین، مطالعات نشان می دهد که آسیب DNA اسپرم ناشی از استرس اکسیداتیو، باعث افزایش روند آپوپتوز سلول های جنسی نابالغ می شود که منجر به کاهش غلظت اسپرم می گردد (۱۷). در همین راستا، مطالعات ما نیز نشان داد که استفاده از اسپارتام باعث افزایش آسیب DNA اسپرم توسط مکانیسم های دخیل در استرس اکسیداتیو در دوزهای متوسط و بالای اسپارتام می شود. هم چنین نشان داده شده است که فرم آلدئید سبب افزایش آسیب به DNA اسپرم می گردد که با نتایج حاصل از دوزهای متوسط و بالای اسپارتام در این مطالعه هماهنگی دارد (۱۸).

بیشتر نشان داده شده است که استفاده از اسپارتام به میزان ۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن سبب افزایش اسپرم های غیرطبیعی می شود که در مطالعه حاضر نیز مشخص گردید که دریافت اسپارتام در دوزهای متوسط و بالای سبب افزایش اسپرم های غیرطبیعی می شود (۱۹). در مطالعه دیگری اثبات گردیده است که دریافت اسپارتام باعث افزایش اسپرم های غیرطبیعی شده است که دارای هم خوانی با نتایج حاصل از در دوزهای متوسط و بالای اسپارتام بوده ولی با دوز پایین دریافت اسپارتام هم خوانی ندارد (۱۵). هم چنین در مطالعه دیگری اثبات گردیده است که دریافت اسپارتام به میزان ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن که در واقع مشابه با گروه دوز پایین این مطالعه می باشد باعث افزایش اسپرم های غیرطبیعی در رت گردیده است که با دوز پایین مطالعه حاضر مطابقت ندارد (۱۰).

مطالعات پیشین نشان داده است که اسپارتام باعث کاهش میزان زنده مانی و تحرک اسپرم در رت گردیده است که با نتایج این تحقیق در مورد کاهش میزان

زنده مانی و تحرک اسپرم در دوزهای متوسط و بالای اسپارتام هم سو می باشد ولی با دوز پایین این تحقیق مطابقت ندارد (۱۵). هم چنین در مطالعه دیگری نیز اسپارتام به میزان ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن باعث کاهش میزان زنده مانی و تحرک اسپرم گردیده بود که با نتایج حاصل از دوز پایین اسپارتام در تحقیق حاضر همسو نمی باشد (۱۰). در مطالعه حاضر، دریافت اسپارتام باعث کاهش تعداد اسپرم در هر سه گروه دریافت کننده اسپارتام گردیده است که با نتایج مطالعات پیشین در مورد تاثیر اسپارتام در کاهش دادن تعداد اسپرم در رت های دریافت کننده این دارو کاملاً مطابقت دارد (۱۵،۱۰). در مورد بلوغ اسپرم اثبات گردیده است که اکسیداتیو باعث کاهش بلوغ اسپرم در موش گردیده است که این مطالعات با نتایج حاصل از مطالعه کنونی هم راستا می باشد (۱۶). مطالعات پیشین اثبات نموده اند که قرار گرفتن در معرض اسپارتام و متابولیت های حاصل از آن باعث کاهش میزان تستوسترون می شود (۲۱،۲۰). تستوسترون به عنوان مهم ترین هورمون آندروژن، در تکامل و تکثیر سلول های زایا و تمایز اسپرماتیدهای گرد به اسپرماتیدهای کشیده نقش اساسی ایفا می کند و هم چنین عملکرد جنسی را حمایت می کند (۲۲). در واقع سلامت سلول های زایا و توانایی آن ها برای انجام تقسیمات میتوزی در لوله های منی ساز، به ترشح هورمون تستوسترون توسط سلول های لیدیک وابسته می باشد (۲۳). بنا بر این اختلال در بیوستنز تستوسترون در سلول های لیدیک می تواند اثرات مضر روی باروری جنس نر داشته باشد (۲۴) مکانیسم عمل اسپارتام هم چنین ممکن است به دلیل اثر آن روی سلول های لیدیک باشد که منجر به کاهش سطح تستوسترون می شود (۲۱،۲۰). با دژنراسیون و آتروفی سلول های لیدیک تحت تاثیر فرم آلدئید حاصل از اسپارتام، میزان سنتز و ترشح تستوسترون کاهش می یابد (۱۸) که با یافته های حاصل از این مطالعه که کاهش معنی دار سطح سرمی تستوسترون در گروه دوز بالای اسپارتام را نشان می دهد، کاملاً مطابقت دارد. در این مطالعه اسپارتام میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی سرم را کاهش و میزان مالون دی آلدئید را در

تضعیف دستگاه دفاع آنتی اکسیدانی بدن، موجبات اختلالات مربوط به پارامترهای سرمی و کیفیت اسپرم را در موش های گروه دوز متوسط و دوز بالا را فراهم می آورد. در حالی که نتایج گروه دوز پایین آسپارتام تفاوت قابل توجهی با نتایج گروه کنترل نداشته و آسیب های مشاهده شده در دو گروه مذکور دیگر را از خود نشان نداد. با این وجود، تایید مضرات و سمی بودن آسپارتام در دستگاه تولیدمثلی نر، نیازمند طرح ریزی مطالعات تجربی گسترده تر و نیز کارآزمایی های بالینی می باشد.

### سپاسگزاری

نگارندگان مقاله بر خود لازم می دانند مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه تهران به سبب حمایت هایشان از این مطالعه و آقایان کیوان سهرابی فرد و علی شمسی کارشناسان بخش بافت شناسی و جنین شناسی دانشکده دام پزشکی دانشگاه تهران اعلام دارند. هم چنین در راستای انجام این مطالعه، کلیه ضوابط و شرایط نگهداری و انجام آزمایش ها روی حیوانات مطابق دستورالعمل های مصوب کمیته اخلاق دانشکده دام پزشکی دانشگاه تهران با کد اخلاق ۷۵۰۶۰۲۵/۶/۲۴ صورت پذیرفت.

### References

1. Yuetwan K, Chung WY, Benzie IF, Woo J. Colour additives in snack foods consumed by primary school children in Hong Kong. *Food Add Cont Surve* 2010; 3:148-55. doi:10.1080/19393210.2010.509815
2. Whitehouse CR, BoullWata J, McCauley LA. The potential toxicity of artificial sweeteners. *Aaohn J* 2008; 56:251-9.
3. Morovvati H, Anbara H, Sheibani M, Koohi M, Hasanzadeh A. [The effect of long term exposure to aspartame on histomorphometric and histochemical adrenal gland in adult NMRI Mice]. *Armaghane Danesh* 2019; 24:150-69. (Persian)
4. 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
5. Soffritti M, Belpoggi F, Padovani M, Lauriola M, Degli Esposti D, Minardi F.

گروه های دوز متوسط و دوز بالا افزایش داده بود. همان طور که قبلا نیز بیان شد دریافت آسپارتام و به دنبال آن افزایش سطح متانول و ایجاد فرم آلدئید موجب شکل گیری آنیون سوپراکسید و پراکسید هیدروژن می شود که این گونه های فعال اکسیژن باعث آسیب به غشای میتوکندریایی می شود و با ایجاد پراکسیداسیون لیپیدی موجبات آسیب غشاء های سلولی را فراهم می آورد(۱۰). گزارشات پیشین کاهش میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی سرم و افزایش میزان مالون دی آلدئید را در موش های دریافت کننده آسپارتام به میزان ۲۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن را نشان داده است(۲۵،۱۸) که با نتایج حاصل از گروه های دوز متوسط و بالای آسپارتام در این مطالعه هم سو می باشد ولی با گروه دوز پایین هم سو نمی باشد. هم چنین دریافت آسپارتام به میزان ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به مدت ۹۰ روز در موش صحرایی باعث افزایش میزان مالون دی آلدئید شده بود که با نتایج حاصل از گروه دوز پایین مطالعه حاضر هم سو نمی باشد(۲۶،۱۰).

با جمع بندی یافته های مطالعه حاضر چنین بر می آید که آسپارتام به واسطه افزایش تولید رادیکال های آزاد، پی ریزی تنش های اکسیداتیو و نیز

- Life time carcinogenicity bioassay of toluene given by stomach tube to Sprague Dawley Rats. *Eur J Oncol* 2004; 9:91-102.
6. 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; 18:43-50.
7. Ashok I, Sheeladevi R. Biochemical responses and mitochondrial mediated activation of apoptosis on long-term effect of aspartame in Rat brain. *Red Biol* 2014; 2:820-31. doi:10.1016/j.redox.2014.04.011
8. Ashok I, Sheeladevi R, Wankhar D. Long term effect of aspartame artificial sweetener on membrane homeostatic imbalance and histopathology in the Rat brain. *Free Rad Ant* 2013; 3:42-9. doi:10.1016/j.fra.2013.09.003

9. Okasha EF. Effect of long term administration of aspartame on the ultrastructure of sciatic nerve. *J Mic Ultra* 2016; 4:175-83. doi:10.1016/j.jmau.2016.02.001
10. 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 Imp Res* 2017; 29:164-70. doi:10.1038/ijir.2017.17
11. Anbara H, Shahrooz R, Razi M, Malekinejad H, Najafi G, Touni SR. [The sperm and invitro fertilization of mice with phenylhydrazine induced hemolytic anemia ameliorating the effect of royal jelly and vitamin C]. *J Isfahan Med Sch* 2016; 33:2193-203. (Persian)
12. Anbara H, Morovvati H, Adib Moradi M, Shahrooz R. [Histological and biochemical analyses of the effects of royal jelly and vitamin C against phenylhydrazine induced cardiotoxicity in Mice]. *J Arak Uni Med Sci* 2017; 20:77-88. (Persian)
13. Razi M, Malekinejad H, Sayrafi R, Hosseinchi MR, Feyzi S, Moshtagion SM, et al. Adverse effects of long time exposure to formaldehyde vapour on testicular tissue and sperm parameters in Rats. *Vet Res Forum* 2013; 4:213-9.
14. Rycerz K, Jaworskaadamu JE. Effects of aspartame metabolites on astrocytes and neurons. *Folia Neuropathol* 2013; 51:10-7. doi: <https://doi.org/10.5114/fn.2013.34191>
15. 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. *Res J Med Plant* 2016; 10:55-66. doi:10.3923/rjmp.2016.55.66
16. Anbara H, Shahrooz R, Razi M, Malekinejad H, Najafi G. The effect of vitamin C on mice hemolytic anemia induced by Phenylhydrazine an animal model study using histological changes in testis pre implantation embryo development and biochemical changes. *Iran J Bas Med Sci* 2018; 21:668-77. doi:10.22038/ijbms.2018.25819.6356
17. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fert Steril* 2003; 79:829-843. doi:org/10.1016/S0015-0282(02)04948-8
18. Soleimanzadeh A, Pourebrahim M, Delirezh N, Kian M. Ginger ameliorates reproductive toxicity of formaldehyde in male Mice evidences for Bcl-2 and bax. *J Hermed Pharmacol* 2018; 7:259-66. doi:10.15171/jhp.2018.39
19. Kamath S, Vijaynarayana K, Shetty DP, Shetty P. Evaluation of genotoxic potential of aspartame. *Pharmacologyonline* 2010; 1:753-69.
20. Soliman HAE, Hozayen WG, Desouky EM. Potential protective effects of rosemary extract against aspartame toxicity in male Rats. *J Int Acad Res Mult* 2014; 2:111-25.
21. Hozayen W G, Soliman HA, Abou Seif HS. Study of the chemopreventive effects of zingiber officinale roots against aspartame induced testicular toxicity in Rat model. *J Phys Pharm Adv* 2014; 4:360-7. doi:10.5455/jppa.20140410052106
22. Mclachlan RI, Odonnell L, Meachem SJ, Stanton PG, de Kretser DM, Pratis K, et al. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in Rats monkeys and man. *Rec Prog Horm Res* 2002; 57:149-79.
23. Shan L, Hardy DO, Catterall JF, Hardy MP. Effects of luteinizing hormone LH and androgen on steady state levels of messenger ribonucleic acid for LH receptors androgen receptors and steroidogenic enzymes in Rat Leydig cell progenitors invivo. *Endocrinology* 1995; 136:1686-93. doi:10.1210/endo.136.4.7895679
24. Yang J, Zhang Y, Wang Y, Cui S. Toxic effects of zearalenone and alpha zearalenol on the regulation of steroidogenesis and testosterone production in mouse Leydig cells. *Toxicol Invit* 2007; 21:558-65. doi:10.1016/j.tiv.2006.10.013
25. Lebda MA, Tohamy HG, Elsayed YS. Long term soft drink and aspartame intake induces hepatic damage via dysregulation of adipocytokines and alteration of the lipid profile and antioxidant status. *Nut Res* 2017; 41:47-55. doi:10.1016/j.nutres.2017.04.002
26. Ashok I, Sheeladevi R. Oxidant stress evoked damage in Rat hepatocyte leading to triggered nitric oxide synthase (NOS) levels on long term consumption of aspartame. *J Food Drug Anal* 2015; 23:679-91. doi:10.1016/j.jfda.2014.07.011

## Effect of Long Term-Administration of Aspartame on Sperm Quality, Testosterone and Oxidant Parameters in Mice

Sheibani M<sup>\*1</sup>, Anbara H<sup>1</sup>, Morovvati H<sup>1</sup>, Razi M<sup>2</sup>, Salaramoli J<sup>1</sup>

(Received: November 4, 2018

Accepted: March 6, 2019)

### Abstract

**Introduction:** Aspartame is the most famous and widely used artificial sweetener which is extensively used in food stuffs. Many controversial reports are presented on the toxicity of aspartame on different body tissues; nonetheless, little data is available about the the side effects of Aspartame on the reproductive system. The present study was conducted in order to evaluate the effects of aspartame on sperm quality and oxidant parameters in mice.

**Materials & Methods:** This study was carried out on 36 adult male NMRI which were randomly assigned into four groups of nine mice. The three experimental groups received Aspartam with the doses of 40, 80 and 160 mg/kg, by oral gavage for 90 days. The control group was considered as well. The blood samples were collected from the heart 24 hours after the last treatment and sperm quality parameters including, count, motility, viability, chromatin condensation, abnormality, and DNA damage were evaluated.

**Findings:** The results indicated a significant decrease in total antioxidant capacity (TAC) and testosterone, as well as a significant increase in malondialdehyde (MDA) in 80 and 160 mg/kg groups, compared to the control group ( $P < 0.01$ ). Aspartame reception decreased the number, motility, viability and maturation of the sperms ( $P < 0.001$ ) and increased abnormality and DNA damage to sperm in 80 and 160 mg/kg groups, compared to the control group ( $P < 0.001$ ). *Ethics code:* 7506025.6.24

**Discussion & Conclusions:** The findings of the present study revealed that aspartame consumption could lead to decreased sperm quality and negative changes in oxidant parameters.

**Keywords:** Aspartame, Testosterone, Sperm, Mice

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

2. Dept of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

\* Corresponding author Email:tsheibani@yahoo.com