

The Effect of Aspartame on the Structure and Function of Prostate and Sperm Parameters in Adult Mice

R. Zare Gashti (PhD)¹ , V. Jaderi (Pharm D)² , M. Shokrzadeh (Pharm D, PhD)^{*3} 

1.Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, I.R.Iran.

2.Ramsar Campus, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Ramsar, I.R.Iran.

3.Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, I.R.Iran.

*Corresponding Author: M. Shokrzadeh (Pharm D, PhD)

Address: Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, I.R.Iran.

Tel: +98 (11) 33543084. E-mail: mslamuk@yahoo.com

Article Type ABSTRACT

Research Paper

Background and Objective: Aspartame is a dipeptide composed of L-phenylalanine methyl ester and L-aspartic acid that is used as an artificial sweetener in diet sodas and chewing gum. It is metabolized in the body to produce phenylalanine, aspartic acid, and methanol. The aim of this study was to investigate the negative effects of aspartame on prostate structure and function and sperm parameters in adult mice.

Methods: 24 male mice weighing 20-25 grams and 8-10 weeks old were used in this experimental study, which were obtained from the university research institute. The mice were divided into 4 groups of 6. The four groups included control group, the sham group that received only the solvent aspartame, and the treatment groups that received aspartame at doses of 16 mg/kg and 32 mg/kg through intraperitoneal injection. After 28 days, surgery was performed and prostate tissue was removed for histopathological changes and blood was removed from the heart for enzymatic studies. Furthermore, to determine sperm health factors, the epididymis was isolated and sperm count, motility, and structural health were examined.

Findings: Aspartame at doses of 16 mg/kg and 32 mg/kg caused a significant decrease in serum biomarkers of LH hormone (6.34 ± 0.07 and 5.14 ± 0.05) compared to the control group (9.27 ± 0.07) ($p < 0.001$). FSH hormone (4.34 ± 0.04 and 3.21 ± 0.07) significantly decreased compared to the control group (6.48 ± 0.04) ($p < 0.001$). Testosterone (4.36 ± 0.05 and 3.22 ± 0.06) also significantly decreased compared to the control group (6.08 ± 0.04) ($p < 0.001$). In addition, serum PSA levels (6.66 ± 0.07 and 11.99 ± 0.27) significantly increased compared to the control group (0.52 ± 0.03) ($p < 0.001$). Aspartame also negatively affected sperm parameters (count, motility, and structural integrity) and caused histopathological damage to prostate tissue.

Conclusion: The results of this study indicate the destructive and dose-dependent effects of aspartame on mouse prostate tissue.

تأثیرات آسپارتام بر ساختار و عملکرد پروستات و پارامترهای اسپرم در موش‌های سوری بالغ

روزبه زارع گشتی^۱ (PhD)، ولید جادری^۲ (Pharm D)، محمد شکرزاده^۳ (Pharm D, PhD)

۱. گروه آموزشی سم شناسی و فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. گروه آموزشی پردیس رامسر، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، رامسر، ایران

۳. مرکز تحقیقات علوم دارویی، پژوهشکده هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

نوع مقاله	چکیده
مقاله پژوهشی	سابقه و هدف: آسپارتام یک دی پپتید متیل استر ال-فنیل آلانین و ال-اسپارتیک اسید است که به عنوان شیرین کننده مصنوعی در نوشابه‌های رژیمی و آدامس‌ها وجود دارد. در بدن متابولیزه می‌شود و فنیل آلانین، اسید اسپارتیک و متانول تولید می‌کند. هدف از این مطالعه بررسی تأثیرات منفی آسپارتام بر ساختار و عملکرد پروستات و پارامترهای اسپرم در موش‌های سوری بالغ می‌باشد. مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی از ۲۴ موش سوری نر با وزن ۲۵-۳۰ گرم و سن ۸-۱۰ هفته‌ای که از انستیتو تحقیقات دانشگاه تهیه شده، استفاده شد. موش‌ها در ۴ گروه ۶ تایی قرار گرفتند. گروه کنترل، گروه شش که فقط حلال آسپارتام را دریافت کرده و گروه‌های درمانی آسپارتام در دوزهای ۱۶ mg/kg و ۳۲ mg/kg به صورت تزریق داخل صفاقی به موش‌ها داده شد و پس از ۲۸ روز جراحی صورت گرفت و بافت پروستات برای بررسی تغییرات هیستوپاتولوژیکی و خون از قلب برای بررسی‌های آنزیمی خارج گردید. همچنین برای تعیین فاکتورهای سلامت اسپرم نیز اپیدیدم جدا گردید و شمارش و تحرک و سلامت ساختاری اسپرم نیز بررسی گردید. یافته‌ها: آسپارتام در دوزهای ۱۶ mg/kg و ۳۲ mg/kg در بیومارکر سرمی هورمون LH (۶/۳۴±۰/۰۷) و (۵/۱۴±۰/۰۵) نسبت به گروه کنترل (۹/۲۷±۰/۰۷) باعث کاهش معنی‌داری گردید ($p<۰/۰۰۱$). هورمون FSH (۴/۳۴±۰/۰۴) و (۳/۲۱±۰/۰۷) نسبت به گروه کنترل (۶/۴۸±۰/۰۴) به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<۰/۰۰۱$). همچنین تستوسترون (۴/۳۶±۰/۰۵) و (۳/۲۲±۰/۰۶) نسبت به گروه کنترل (۶/۰۸±۰/۰۴) به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<۰/۰۰۱$). علاوه بر این، سطوح سرمی PSA (۶/۶۶±۰/۰۷) و (۱۱/۹

مقدمه

آسپارتام یک دی پپتید متیل استر ال- فنیل آلانین و ال- اسپارتیک اسید است که به عنوان شیرین کننده مصنوعی در نوشابه‌های رژیمی و آدامس‌ها وجود دارد و دارای یک گروه آمینه در موقعیت α از کربن پیوند پپتیدی (α -آسپارتام) است (۱). محصولات اصلی هیدرولیز و تجزیه آسپارتام عبارت از L- فنیل آلانین، اسپارتیک اسید، متانول و دی کتو پپرازین (diketopiperazine) هستند. دی کتو پپرازین از طریق واکنش درون مولکولی آمین اولیه با گروه متیل استر آسپارتام، β -آسپارتام تشکیل می‌شود. β -آسپارتام یک ایزومر غیر شیرین آلفا آسپارتام است. آسپارتام در بدن متابولیزه می‌شود و فنیل آلانین، اسید اسپارتیک و متانول تولید می‌کند. فنیل آلانین یک اسید آمینه ضروری است که برای سنتز پروتئین مورد نیاز است، در حالی که اسید اسپارتیک یک اسید آمینه غیر ضروری است که در تولید انرژی و سایر فرآیندهای متابولیک نقش دارد. متانول یک ماده سمی است که می‌تواند در دوزهای بالا باعث آسیب شود، اما مقدار کمی که توسط آسپارتام تولید می‌شود عموماً بی خطر در نظر گرفته می‌شود (۲).

متانول به طور گسترده در سراسر بدن از جمله مغز، ماهیچه، چربی و بافت عصبی توزیع می‌شود. سپس به فرمالدئید متابولیزه می‌شود که وارد سلول‌ها می‌شود و به پروتئین‌ها و DNA متصل می‌شود. اثرات سیتوتوکسیک آسپارتام ناشی از تماس سلول‌های بدن با فرمالدئید و آسیب DNA از فرمالدئید ناشی از این تماس اتفاق می‌افتد. ماهیت آسیب به طور کلی شامل شکستن و سپس ایجاد پیوند متقابل در ماده ژنتیکی است که سلول‌ها را تغییر می‌دهد. تغییرات در ماده ژنتیکی با سرطان در انسان مرتبط است. افزایشی در تومورهای بدخیم مغزی وجود دارد که با مصرف آسپارتام مرتبط است (۳).

اکثریت قریب به اتفاق مردم می‌توانند آسپارتام را در مقادیر متوسط مصرف کنند. با این وجود، تحقیقات بیشتری برای درک کامل اثرات آن بر سلامت انسان مورد نیاز است. سازمان غذا و داروی ایالات متحده (FDA) میزان مصرف روزانه قابل قبول را ۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تعیین کرده است که معادل حدود ۲۲ قوطی نوشابه رژیمی برای یک بزرگسال متوسط است (۴).

از طرف دیگر، برخی مطالعات عوارض مخرب و کارسینوژن ناشی از آسپارتام گزارش کرده‌اند (۵). نتیجه مطالعه Gezginici Oktayoglu و همکارانشان نشان داد که قرار گرفتن در معرض طولانی مدت آسپارتام جمعیت سلول‌های بنیادی سرطانی و تهاجمی سلول‌های تومور را از طریق p21، NICD، GLI1 افزایش می‌دهد (۶).

در مطالعه دیگری Maghiari و همکارانشان با هدف بررسی نقش بالقوه آسپارتام در سرطان کولورکتال دو مکانیسم احتمالی را در سرطان‌زایی آسپارتام بررسی کردند که یکی غرب

داده شد تا به طور کامل اسپرم‌ها از لوله‌های سمی نیفروس وارد محیط شوند. پس از آن به ارزیابی انواع پارامترهای اسپرم از جمله تحرک، زنده بودن، تعداد و مورفولوژی پرداخته شد و در نهایت بافت پروستات موش برای ارزیابی پاتولوژیک در فرمالین ۱۰٪ قرار داده شد (۸).

اندازه گیری سطح هورمون‌های جنسی و آنزیم PSA: برای اندازه گیری سطح هورمون‌های جنسی ۱/۵ ml نمونه خون از قلب حیوان به وسیله سرنگ دارای هیپارین کشیده می‌شود. سپس خون در دور ۳۵۰۰ rpm سانتریفوژ شده تا سرم آن جدا شود. سرم را در ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری کرده و هورمون‌های LH، FSH، تستوسترون و آنزیم PSA را با کیت استاندارد به روش الایزا اندازه گیری کردیم (۸).

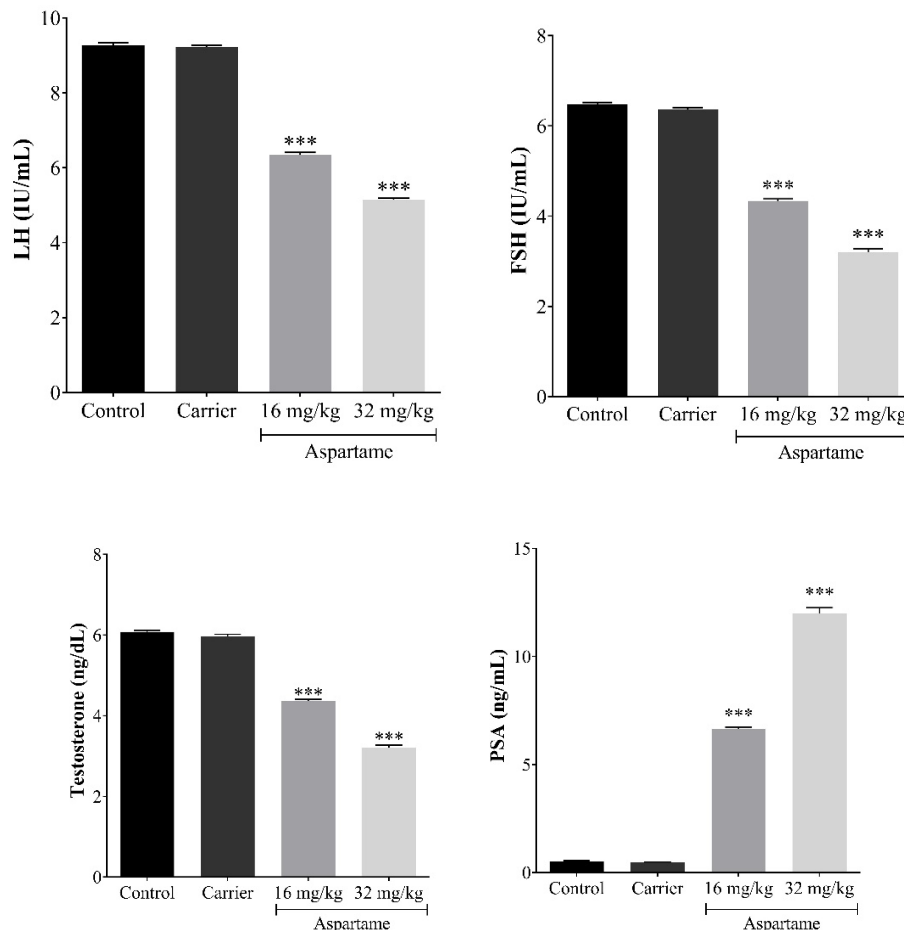
ارزیابی پارامترهای اسپرم:

تحرک اسپرم: سنجش حرکت اسپرم بر اساس دستورالعمل سازمان جهانی بهداشت (WHO) انجام شد به این ترتیب که قبل از برداشتن نمونه سیمین آن را کاملاً هموژن و میکس می‌کنیم، سپس ۱۰ μL از سوسپانسیون اسپرم و محیط کشت را روی لام قرار دادیم و روی آن لامل گذاشتیم. بلافاصله آن را با بزرگنمایی ۴۰ میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار دادیم. حداقل ۵ میدان میکروسکوپی و ۲۰۰ اسپرم را در هر حیوان مورد بررسی قرار دادیم و درصد اسپرم‌های متحرک محاسبه شد. شمارش برای هر نمونه ۳ بار انجام گرفت و میانگین آن اعلام شد. سپس درصد اسپرم‌های متحرک نسبت به تعداد کل اسپرم‌های شمارش شده در هر تکرار محاسبه و در نهایت میانگین اسپرم‌های متحرک در هر حیوان تعیین شد (۸).

مورفولوژی اسپرم: تعداد اسپرم‌های طبیعی در یک نمونه باید بیش از ۵۰٪ باشد و شامل اسپرم‌هایی است که از نظر ریخت شناسی در ناحیه سر، گردن و دم مشکلی نداشته باشند. مقداری از سوسپانسیون اسپرم به نسبت ۱۰ به ۱ با اتوزین ۱٪ میکس شد و بعد از آن اسمیر تهیه شد. اجازه داده شد در هوای آزاد خشک شود و سپس مونته شد. ۲۰۰ اسپرم در هر سوسپانسیون و در هر حیوان با کمک میکروسکوپ نوری و بزرگنمایی ۱۰۰ ارزیابی شد. انواعی از نقص در مورفولوژی اسپرم شامل اسپرم‌های دارای سر کوچک، بدون سر، سر دوکی، گردن خمیده، دو سر، دو دم، دم خمیده، دم پیچ خورده، دم کوتاه و بدون دم بود (۸).

تعداد اسپرم: شمارش اسپرم توسط لام هموسایتومتر و دستورالعمل ارائه شده توسط سازمان جهانی بهداشت انجام شد. پس از تهیه رقت مناسب از سوسپانسیون اسپرم حدود ۱۰ μL از آن به هر اتاقک لام نتوبار منتقل و روی آن لامل گذاشته شد. پس از گذشت ۵ دقیقه به شمارش ۲۰۰ اسپرم در خانه RBC لام نتوبار پرداختیم و بر اساس فرمول ارائه شده تعداد اسپرم در هر حیوان محاسبه شد. کلیه مشاهده‌ها توسط میکروسکوپ نوری و بزرگنمایی ۴۰ آن انجام شد (۸).

PSA (۴/۳۶±۰/۰۵) و (۳/۲۲±۰/۰۶) نسبت به گروه کنترل (۶/۰۸±۰/۰۴) به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<۰/۰۰۱$). علاوه بر این، سطوح سرمی PSA (۶/۶۶±۰/۰۷) و (۱۱/۹۹±۰/۲۷) نسبت به گروه کنترل (۰/۵۲±۰/۰۳) به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p<۰/۰۰۱$).



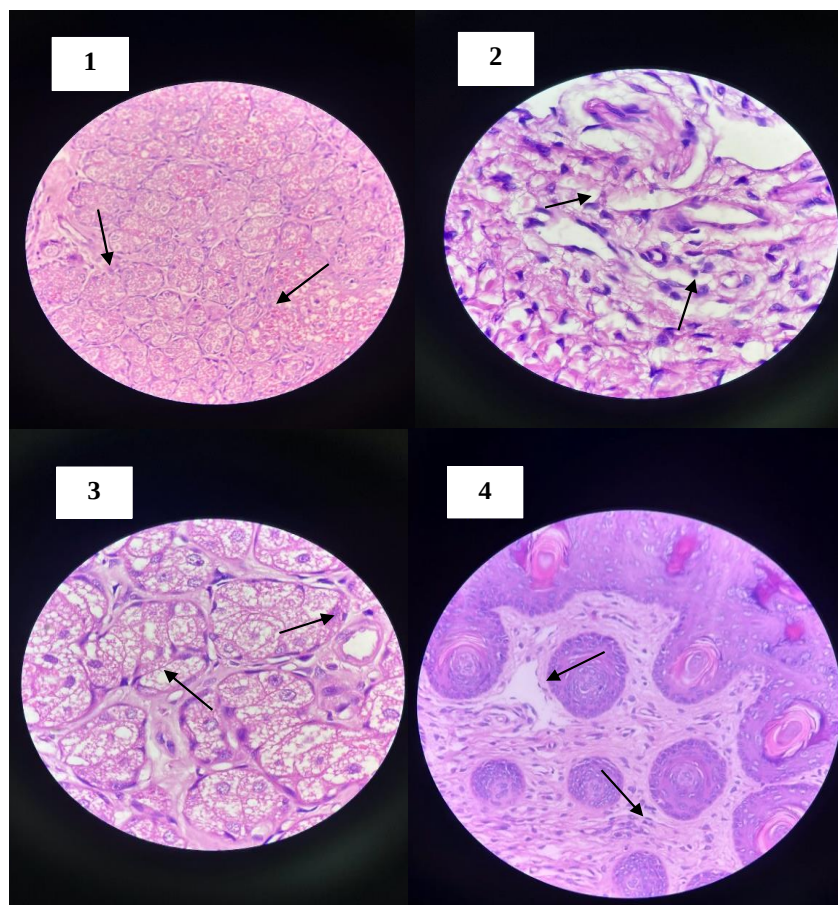
نمودار ۱. اثر آسپارتام در غلظت‌های ۱۶ و ۳۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم بر میزان LH، FSH، Testosterone و PSA سرم موش سوری پس از ۲۸ روز تزریق داخل صفاقی. داده‌ها بر اساس Mean±SD در هر گروه (۶ تایی) می‌باشد. *** ($p<۰/۰۰۱$): معنی‌داری نسبت به گروه کنترل می‌باشد.

نتایج مربوط به پارامترهای حرکت و مورفولوژی و تعداد اسپرم: بر اساس نتایج به دست آمده بیشترین میزان اسپرم در گروه کنترل و کمترین در گروه آسپارتام (۳۲ mg/kg) می‌باشد. حرکت اسپرم در گروهی که آسپارتام (۳۲ mg/kg) دریافت کرده‌اند به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است. مورفولوژی اسپرم‌ها نیز در گروهی که آسپارتام (۳۲ mg/kg) دریافت کرده‌اند به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است و درصد اسپرم‌های ناقص افزایش پیدا کرده است (جدول ۱).

نتایج حاصل از مطالعات هیستوپاتولوژی بافت پروستات: در گروه دریافت کننده آسپارتام ۱۶ mg/kg، تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی A و B نسبت به گروه کنترل کاهش داشته است. سلول‌های سرتولی تغییری نداشته است. اسپرماتوژنز کمتر شده و تراکم پروستات و ضخامت پروستات کاهش یافته است. تعداد سلول‌های ترش‌جی پروستات کمتر شده است. همچنین در گروه دریافت کننده آسپارتام ۳۲ mg/kg، تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی و اسپرماتوسیت کاهش زیادی داشته، عوارض شدید در پروستات (قطر و ضخامت تبول) دیده می‌شود. تعداد سلول‌های واحد ترش‌جی پروستات بسیار کاهش یافته است (شکل ۱).

جدول ۱. نتایج مربوط به پارامترهای حرکت و مورفولوژی و تعداد اسپرم

گروه‌ها	مورفولوژی درصد اسپرم‌های غیر عادی	تحرک (%)		شمار اسپرم‌ها $\times 10^6$ Mean $\pm$ SD
		غیر متحرک	متحرک	
کنترل	۱۴	۲۹	۷۱	۴۷ $\pm$ ۵/۱۱
حامل یا شم	۱۵	۳۱	۶۹	۴۶ $\pm$ ۴/۸۲
آسپارتام (۱۶ mg/kg)	۳۱	۳۹	۶۱	۴۰ $\pm$ ۶/۲۴
آسپارتام (۳۲ mg/kg)	۴۲	۴۳	۵۷	۳۶/۳۳ $\pm$ ۴/۵۱



شکل ۱. فتومیکروگراف از بخش‌های پروستات موش که این مقاطع در فرمالین بافر ۱۰٪ تثبیت شدند، در پارافین جاسازی شدند، برش داده شدند و با هماتوکسیلین-ئوزین رنگ‌آمیزی شدند. بررسی میکروسکوپی نوری (عدسی شیئی $\times 40$) بافت‌ها. ۱- مقاطع بافتی از گروه کنترل ۲- گروه حامل یا شم ۳- آسپارتام ۱۶ mg/kg، ۴- آسپارتام ۳۲ mg/kg

بحث و نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که تماس با آسپارتام منجر به آسیب بافت پروستات و مسمومیت تولید مثلی در موش‌های نر می‌شود که با کاهش معنی‌دار غلظت هورمون‌های محور هیپوفیز-بیضه و افزایش معنی‌دار PSA سرم در مقایسه با گروه کنترل همراه می‌باشد. همچنین آسپارتام باعث آسیب هیستوپاتولوژیکی بافت پروستات و کاهش کیفیت اسپرم گردیده است که با مطالعات دیگر محققین همخوانی دارد (۱۰ و ۱۱). محققان سمیت آسپارتام را به تولید متانول و متابولیت‌های آن به دنبال متابولیسم آسپارتام در بدن نسبت دادند. متانول تقریباً ۱۰٪ از محصولات متابولیزه شده آسپارتام را تشکیل می‌دهد (۱۲ و ۱۳).

کاهش غلظت هورمون‌های مشاهده شده در گروه‌های تحت درمان با آسپارتام در مقایسه با گروه کنترل ممکن است به تغییرات نوروژنراتیو، به ویژه در هیپوتالاموس نسبت داده شود. این تغییرات می‌تواند منجر به تغییرات عملکردی و ساختاری قابل توجهی در محور هیپوتالاموس هیپوفیز شود که منجر به کاهش سطوح FSH، LH و تستوسترون و افزایش معنی‌دار PSA سرم شده است (۱۴). در این مطالعه، تزریق آسپارتام در دوزهای ۱۶ و ۳۲ میلی گرم بر کیلوگرم منجر به کاهش معنی‌دار سطوح سرمی هورمون‌های FSH، LH و تستوسترون و افزایش معنی‌دار PSA سرم در مقایسه با گروه کنترل گردید. در مطالعه‌ای که توسط Anbara و همکارانشان بر روی مکانیسم سمیت ناشی از آسپارتام در دستگاه تناسلی نر به دنبال مصرف طولانی مدت در مدل موش صورت گرفت، نتایج نشان داد که تجویز طولانی مدت آسپارتام در دوزهای بالا به طور قابل توجهی باعث کاهش شاخص گنادوسوماتیک، غلظت سرمی هورمون‌های محور هیپوفیز-بیضه (FSH، LH و تستوسترون) می‌شود (۱۰). کاهش غلظت FSH، LH و تستوسترون و افزایش سطح PSA در سرم می‌تواند به اثرات منفی مستقیم و یا غیرمستقیم مصرف آسپارتام و متعاقب آن القای استرس اکسیداتیو بر محور هیپوفیز-گناد مربوط باشد. بررسی‌های فراساختاری در موش‌ها و خرگوش‌های جوان در مطالعات Puica و همکارانشان نشان داد که تجویز مزمن آسپارتام ساختار سلول‌های گنادوتروپیک غده هیپوفیز قدامی را تغییر می‌دهد (۱۵و۱۶).

در این مطالعه آسپارتام پارامترهای مرتبط با اسپرم موش‌های سوری از جمله تحرک اسپرم، تعداد اسپرم و مورفولوژی اسپرم را آسیب رسانده است. با توجه به نقش FSH، LH و تستوسترون در اسپرم‌زایی، کاهش تعداد اسپرم در مطالعه ما می‌تواند در نتیجه کاهش تولید این هورمون‌ها باشد (۱۷). همچنین مکانیسم دوم شامل مسمومیت با متانول است که متابولیت اولیه آسپارتام است. تصور می‌شود که با آسیب رساندن به ساختار و عملکرد پروتئین‌های شوک حرارتی (HSP) باعث آسیب مستقیم به پروستات و بیضه‌ها می‌شود. این پروتئین‌ها برای تنظیم اسپرماتوزن، ارائه اقدامات محافظتی سلولی و افزایش مقاومت سلولی در برابر استرس محیطی حیاتی هستند. این آسیب همچنین می‌تواند به صورت تغییرات هیستوپاتولوژیک قابل توجهی ظاهر شود که با نتایج مطالعات Ali و همکاران و Azeez و همکاران مطابقت داشت (۱۴و۱۸). در مطالعه ما آسپارتام باعث آسیب هیستوپاتولوژیک بافت پروستات گردیده است. در مطالعه‌ای که توسط El-Alfy و همکارانشان بر روی بررسی اثرات بافتی آسپارتام بر بافت بیضه موش آلبینو صورت گرفت، تجزیه و تحلیل بافت شناسی تفاوت‌های قابل توجهی را در گروه‌های تحت درمان در مقایسه با گروه کنترل نشان داد. موش‌های تحت درمان با آسپارتام تغییرات وابسته به دوز را در لوله‌های اسپرم ساز و فضاهای بینابینی نشان دادند. تغییرات در لوله‌های اسپرم‌ساز توسط لوله‌های اسپرم‌ساز آتروفی شده، واکوئالسیون، سلول‌های زایای لایه برداری شده، هیپوپلازی اپیتلیوم ژرینال و توقف اسپرماتوژنیک در مراحل مختلف اسپرماتوژن نشان داده شد. با این حال، تغییرات بین لوله‌ای شامل گرفتگی عروق خونی و ادم بینابینی بود. این یافته‌ها ن

References

1. Finamor IA, Bressan CA, Torres-Cuevas I, Rius-Pérez S, da Veiga M, Rocha MI, et al. Long-Term Aspartame Administration Leads to Fibrosis, Inflammasome Activation, and Gluconeogenesis Impairment in the Liver of Mice. *Biology (Basel)*. 2021;10(2):82.
2. Kirkland D, Gatehouse D. "Aspartame: A review of genotoxicity data". *Food Chem Toxicol*. 2015;84:161-8.
3. Czarnecka K, Pilarz A, Rogut A, Maj P, Szymańska J, Olejnik Ł, et al. Aspartame-True or False? Narrative Review of Safety Analysis of General Use in Products. *Nutrients*. 2021;13(6):1957.
4. Haighton L, Roberts A, Walters B, Lynch B. Systematic review and evaluation of aspartame carcinogenicity bioassays using quality criteria. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2019;103:332-44.
5. Soffritti M. Understanding the link between aspartame and cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2024;24(9):793-802.
6. Gezginici-Oktayoglu S, Ercin M, Sancar S, Celik E, Koyuturk M, Bolkent S, et al. Aspartame induces cancer stem cell enrichment through p21, NICD and GLI1 in human PANC-1 pancreas adenocarcinoma cells. *Food Chem Toxicol*. 2021;153:112264.
7. Maghiari AL, Coricovac D, Pinzaru IA, Macașoi IG, Marcovici I, Simu S, et al. High Concentrations of Aspartame Induce Pro-Angiogenic Effects in Ovo and Cytotoxic Effects in HT-29 Human Colorectal Carcinoma Cells. *Nutrients*. 2020;12(12):3600.
8. Sadeghzadeh F, Mehranjani MS, Mahmoodi M. Vitamin C ameliorates the adverse effects of dexamethasone on sperm motility, testosterone level, and spermatogenesis indexes in mice. *Hum Exp Toxicol*. 2019;38(4):409-18.
9. Fávaro WJ, Cagnon VH. Morphometric and morphological features of the ventral prostate in rats submitted to chronic nicotine and alcohol treatment. *Tissue Cell*. 2006;38(5):311-23.
10. Anbara H, Sheibani MT, Razi M, Kian M. Insight into the mechanism of aspartame-induced toxicity in male reproductive system following long-term consumption in mice model. *Environ Toxicol*. 2021;36(2):223-37.
11. Anbara H, Sheibani MT, Razi M. Long-Term Effect of Aspartame on Male Reproductive System: Evidence for Testicular Histomorphometrics, Hsp70-2 Protein Expression and Biochemical Status. *Int J Fertil Steril*. 2020;14(2):91-101.
12. 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.
13. Tephly TR, McMartin KE. Methanol metabolism and toxicity. In: Stegink F, editors. *Aspartame: Physiology and Biochemistry*, 1st ed. CRC Press; 2020. p. 111-40.
14. Ali WA, Mohamed MA, Ali Salama EH, Ahmed NA, Said AM. Long Term Toxicity of Aspartame on Ovaries and Blood Components of Adult Female Albino Rats. *Ain Shams J Forensic Med Clin Toxicol*. 2024;42(1):87-93.
15. Puica C, Crăciun C, Rusu M, Cristescu M, Borsa M, Roman I. Ultrastructural aspects concerning the hypothalamus-pituitary complex reactivity following chronic administration of aspartame in juvenile rats. *Studia Universitatis "Vasile Goldiș" Seria Științele Vieții*. 2009;19(1):19-24.
16. Puica C, Craciun C, Rusu M, Cristescu M, Borsa M, Roman I. Ultrastructural Aspects Concerning The Hypothalamus-Pituitary Complex Reactivity Following Chronic Administration of Aspartame In Juvenile Rabbits. *Bull Univ Agric Sci Vet Med*. 2008

- 17.Ramaswamy S, Weinbauer GF. Endocrine control of spermatogenesis: Role of FSH and LH/ testosterone. Spermatogenesis. 2014;4(2):e996025.
- 18.Azeez OH. Evaluation of some male and female rats' reproductive hormones following administration of aspartame with or without vitamin C or E. Iraqi J Vet Med. 2021;45(2):14-20.
- 19.El-Alfy NZI, Mahmoud MF, Said MSE, El-Ashry SRGE. Evaluation of The Histological Effects of Aspartame on Testicular Tissue of Albino Mice. Egypt J Hosp Med. 2023;93:7349-55.
- 20.Morovvati H, Khaksar Z, Sheibani MT, Anbara H, Kafiabad MA, Moradi HR. Effect of aspartame on histological and histometrical structure of prostate gland in adult mice. Qom Univ Med Sci J. 2019;12(12):14-27.