

---

Nenad Velemir

## Ispitivanje toksičnosti, citotoksičnosti i genotoksičnosti veštačkog zaslađivača aspartama metodom *Allium* testa

---

*Aspartam se primenjuje u prehrambenoj industriji kao veštački zaslađivač jer je dokazano da ima 200 puta veću slatkoću u odnosu na prirodni šećer. Iako je našao široku primenu u svim vrstama hrane i pića, mali broj istraživanja se bavio efektima aspartama. Ovim istraživanjem ispitana je toksičnost, citotoksičnost i genotoksičnost različitih koncentracija veštačkog zaslađivača aspartama primenom *Allium* testa. Testirane su koncentracije aspartama koje su niže i više od 50 mg/L, odnosno prihvatljive dnevne doze unosa. Analizirani makroskopski parametri su pokazali da ispitivane koncentracije aspartama nemaju toksičan efekat. Mikroskopski parametri testa su pokazali da aspartam ima genotoksični efekat pri čemu je izraženiji efekat delovanja aspartama na aberacije na nivou deobnog vretena u odnosu na aberacije na nivou hromozoma. Koncentracija aspartama koja predstavlja prihvatljivu dnevnu dozu unosa je pokazala najveći efekat na povećano formiranje hromozomskih aberacija, što je u skladu sa literarnim podacima koji ukazuju na genotoksično delovanje aspartama. Rezultati ukazuju na potrebu za revidiranjem vrednosti prihvatljive dnevne doze unosa aspartama.*

---

### Uvod

Mnogi veštački zaslađivači su korišćeni u hrani i piću kako bi omogućili ljudima da uživaju pri konzumiranju veoma slatkih, ali nisko kaloričnih namirnica. Jedan od nisko kaloričnih zaslađivača, sa 200 puta većom slatkoćom u odnosu

na prirodni šećer, a drastično manjom kalorijskom vrednošću je aspartam. Nastao je 1965. godine kao posledica neuspešnog farmakološkog istraživanja prilikom kojeg je ispitivan kao potencijalni inhibitor hormona gastrina. Iako je projekat bio neuspešan, aspartam je našao primenu u prehrambenoj industriji. Ovaj veštački zaslađivač ima veoma široku primenu u raznim vrstama hrane i pića (gazirani napici, skoro sva nisko kalorična hrana, žvakaće gume, itd.). Aspartam je 1981. godine zvanično prihvaćen od strane FDA (eng. Food and Drug Administration) kao prvi nisko kalorični veštački zaslađivač sa prihvatljivom dnevnom dozom konzumacije od 50 mg/L.

Aspartam je dipeptid koji se sastoji iz fenilalanina i metil estra koji daljim razlaganjem izdvajaju metanol, odnosno formaldehid i mravlju kiselinu. Metanol je najprostiji alkohol, vrlo otrovan jer količina od 30 mL može usmrtiti čoveka. Formaldehid ili metanal (HCHO) je gasovito jedinjenje rastvorljivo u vodi. Ahmed i Thomas (1992) su pokazali da fenilalanin i metanol, kao metabolički produkti aspartama pokazuju genotoksičan rizik za ljude.

Analizom literature uočeno je da postoje oprečna mišljenja po pitanju genotoksičnog efekta aspartama. Jeffrey i Williams (2000) su pokazali da aspartam ne dovodi do DNK oštećenja u hepatocitima pacova, i da nema mutageni efekat kada se miševima unosi oralno (Durnev *et al.* 1995). Sem toga, Molinary (1984) je pokazao da aspartam nema mutageni i genotoksični efekat primenom Amesovog testa.

---

*Nenad Velemir (1996), Veternik, Rodina 48, učenik 3. razreda Medicinske škole „7. april” u Novom Sadu*

*MENTOR: dr Tanja Adnađević, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković” Beograd*

AlSuhaibani (2010) je pokazao negenotoksični efekat aspartama jedino u veoma niskim koncentracijama, dok je u višim obrnuti slučaj. Kamath *et al.* (2010) su primenom mikronukleus testa pokazali da aspartam dovodi do hromozomskih prekida i to već na koncentraciji koja predstavlja prihvatljivu dnevnu dozu unosa. Slični rezultat su objavili i Rencüzogullari *et al.* (2004) gde je pokazano povećano formiranje hromozomskih aberacija u humanim limfocitima pri svim testiranim koncentracijama aspartama i svim testiranim periodima. Studije u kojima je pokazano genotoksično delovanje aspartama imaju zajedničko to što je u svima pokazana dozna zavisnost aspartama u indukovanju hromozomskih aberacija.

*Allium* test je relevantan kratkotrajan test koji koristi luk (*Allium cepa*) kao test organizam za ispitivanje genotoksičnosti. Prednosti korišćenja biljnih sistema predstavlja činjenicu da je organizacija hromozoma kod biljaka slična onoj kod čoveka prilikom koje se mogu ispitati mutageni efekti u širokom rasponu. Osim toga biljke se lako gaje i održavaju, a cena izvođenja je relativno niska. Levan je 1938. godine uveo *Allium* test u upotrebu prilikom kojeg je prikazao da kolhicin onemogućava organizaciju deobnog vretena i prouzrokuje poliploidiju u meristemskim ćelijama korena *Allium cepa*. Kasnije je pokazao da različite koncentracije soli uzrokuju nastanak čitavog niza hromozomskih aberacija u meristemskim ćelijama korena *Allium cepa* (Fiskesjö, 1985).

Test je standardizovan 1985. godine i zasniva se na procenivanju toksičnog i genotoksičnog potencijala nekog hemijskog jedinjenja i to merenjem rasta korena, što predstavlja makroskopski parametar i određivanjem mitotičke aktivnosti, mitotičke abnormalnosti i hromozomskih aberacija tokom anafaze i telofaze meristemskih ćelija što predstavlja mikroskopski parametar. Meristemske ćelije korena luka zadržavaju sposobnost deobe tokom čitavog života i podložne su uticajima raznih agenasa koji mogu dovesti do promena u njihovoj deobi. Promene na genetičkom materijalu se ogledaju u aberacijama na nivou hromozoma koje čine anafazni most, telofazni most, višestruke aberacije i fragmenat, i aberacijama na nivou deobnog vretena u koje spadaju c-mitoza i multipolarnost.

Cilj ovog istraživanja je ispitivanje toksičnog, citotoksičnog i genotoksičnog efekta veštačkog zaslađivača aspartama analiziranjem njegovih efekata na nivou ćelijske deobe, ali i praćenjem broja hromozomskih aberacija, upotrebom standardizovanog *Allium* testa.

## Metode i materijal

U istraživanju su korišćene lukovice *Allium cepa* težine 2-4 g. Lukovice su podeljene u sedam grupa:

1. negativna kontrola (flaširana voda)
2. pozitivna kontrola – MMS (metil metanolsulfat – 10mg/L)
3. saharoza (S – 700 mg/L) i
- 4-7. aspartam u četiri različite koncentracije (a1 – 40 mg/L; a2 – 80 mg/L; a3 – 100 mg/L; a4 – 120 mg/L).

Za svaku od grupa smo koristili po četrnaest lukovica. Nakon završene inicijacije u trajanju od 24 h i na temperaturi od 25°C, lukovice su gajene u ispitivanim uzorcima u trajanju od 48 h i na temperaturi od 25°C. U svakoj od grupa smo nakon 48 h isključivali lukovice sa najmanjim rastom korena. Poslednjeg dana je merena dužina korenova preostalih lukova, kao makroskopski parametar toksičnosti vode. Svaki koren dužine ispod 5 mm nije korišten u daljoj analizi. Korenovi svake lukovice su podvrgavani hidrolizi 1 M hlorovodoničnom kiselinom na temperaturi 60°C u trajanju od 12 min. Odsečeni vrhovi korenova u dužini od 1-2 mm su bojeni orceinom, a mikroskopski preparati su napravljeni squash metodom.

Kao mikroskopski parametar genotoksičnosti praćene su hromozomske aberacije u anafazi i telofazi ćelijske deobe. U moguće aberacije spadaju: anafazni most, zaostali hromozom, višestruka aberacija, multipolarnost, c-mitoza i telofazni most. Mikroskopski preparati su pregledani na svetlosnom mikroskopu (Leica DM500) pod uvećanjem od 400 puta. Iz svake serije pregledano je 150 ćelija, gde su detektovane i prebrojane promene u genetičkom materijalu.

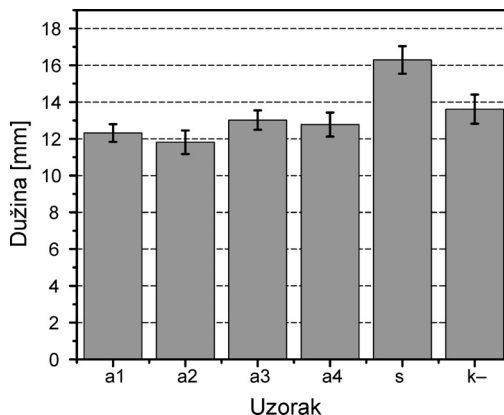
Rezultati su obrađeni programskim softverom STATISTICA Version 5.0. Primenom One-Way ANOVA testa i post hoc Turkey HSD testa poređene su srednje vrednosti dužine rasta

korena u analiziranim grupama. Fišerovim testom egzaktne verovatnoće (2×2) međusobno su poređene vrednosti broja aberacija u analiziranim uzorcima.

## Rezultati i diskusija

U istraživanju smo koristili četiri različite koncentracije aspartama, saharozu, ali i negativnu i pozitivnu kontrolu. Kao makroskopski parametar toksičnosti praćena je dužina korena. Dužina korena zavisi od broja deoba meristemskih ćelija. Toksični efekat neke supstance se ispoljava u smanjenom broju deoba ćelija korena odnosno u manjoj dužini korena. Statističkom obradom rezultata utvrđeno je da aspartam ne inhibira rast korena jer se dužine korena u svim ispitivanim uzorcima aspartama statistički ne razlikuju od negativne kontrole (slika 1). Međusobnim upoređivanjem dužine korena u zavisnosti od koncentracije aspartama utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlike među uzorcima gajenim u različitim koncentracija aspartama (tabela 1). Navedeni rezultati ukazuju na to da aspartam nema toksični efekat odnosno da ne deluje na nivou ćelijske deobe. Slične rezultate je objavio AlSuhaibani (2010) gde nije pokazao efekat aspartama na mitotički indeks ćelija koštane srži miša, koji predstavlja odnos ćelija u deobi i ukupnog broja ćelija. Nasuprot tome Rencüzogullari *et al.* (2004) su pokazali da u prisustvu aspartama dolazi do smanjenja mitotičkog indeksa limfocita u svim ispitivanim koncentracijama i vremenima izlaganja.

Jedina statistički značajna razlika među vrednostima makroskopskih parametara primećena je



Slika 1. Srednje vrednosti dužina korenova luka analiziranih uzoraka: a1 – koncentracija aspartama 40 mg/L, a2 – koncentracija aspartama 80mg/L, a3 – koncentracija aspartama 100mg/L, a4 – koncentracija aspartama 120 mg/L, s – koncentracija saharoze 700mg/L, k – negativna kontrola

Figure 1. The average root lengths of analyzed samples: a1 – concentration of aspartame 40 mg/L, a2 – the concentration of aspartame 80 mg/L, the concentration of aspartame A3 – 100 mg/L, the concentration of aspartame a4 – 120 mg/L, the concentration of s - sucrose 700 mg/L, k – negative control

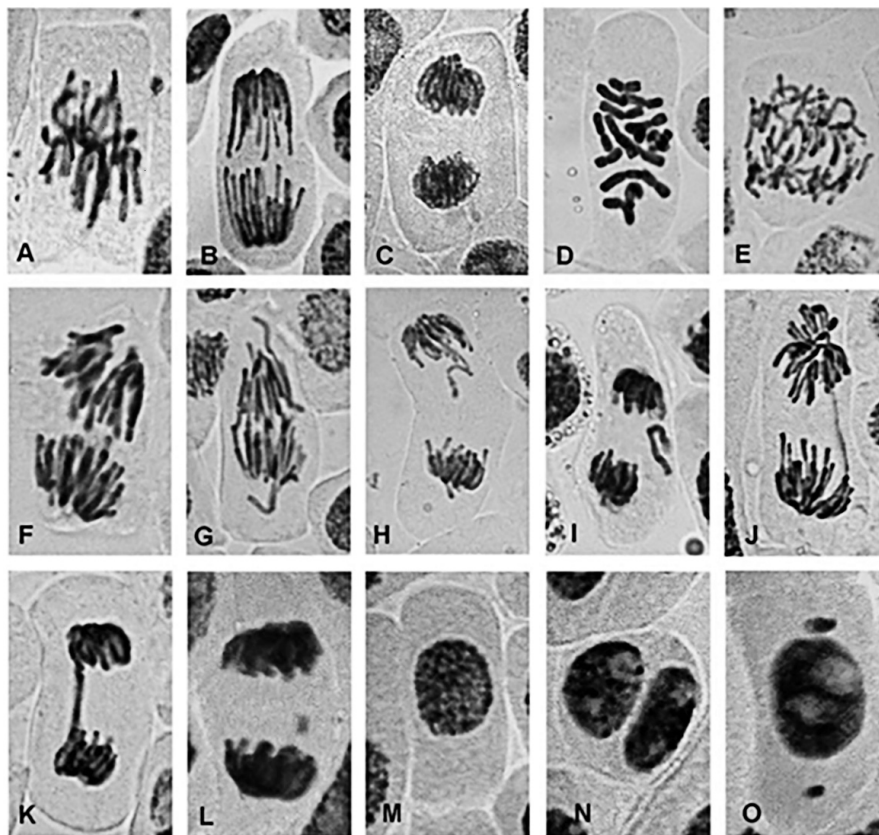
prilikom poređenja dužine korenova uzoraka gajenih u rastvoru saharoze i ostalih uzoraka (tabela 1). Na osnovu ovog rezultata možemo da zaključimo da saharoza stimuliše rast korena, povećavajući broj deoba.

Kao mikroskopski parametar genotoksičnosti praćene su hromozomske aberacije u anafazi i telofazi ćelijske deobe kako na nivou hromozoma tako i na nivou deobnog vretena. U moguće aberacije spadaju: anafazni most, zaostali hro-

Tabela 1. Značajnost razlika u dužini korenova

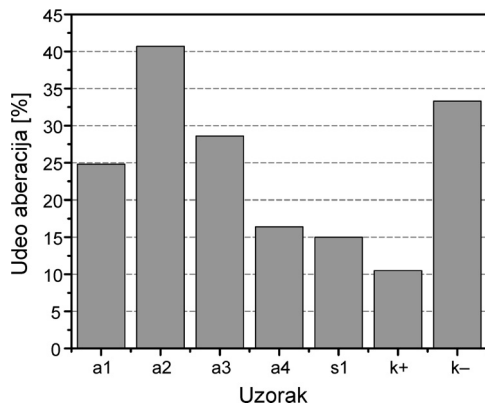
	a1	a2	a3	a4	s
a2	0.9955				
a3	0.9650	0.8514			
a4	0.9944	0.9350	0.9998		
s	0.0000***	0.0000***	0.0028**	0.0007***	
k-	0.7236	0.5546	0.9907	0.9559	0.05050

a1 – koncentracija aspartama 40 mg/L, a2 – koncentracija aspartama 80 mg/L, a3 – koncentracija aspartama 100 mg/L, a4 – koncentracija aspartama 120 mg/L, s – koncentracija saharoze 700 mg/L, k – negativna kontrola (p < 0.01), \*\*\* (p < 0.001)



Slika 2. Hromozomi *Allium cepa*: A – normalna metafaza, B – normalna anfaza, C – normalna telofaza, D – C-mitoza, E, F – aberacija na nivou deobnog vretena, G – zaostali hromozom, H, I – zaostali hromozom u anafazi-teofazi, J – anafazni most, K – telofazni most, L – anafaza-telofaza sa fragmentom, M – normalna interfaza, N – bijedarna ćelija, O – mikronukleus u interfaznoj ćeliji

Figure 2. Chromosomes of *Allium cepa*: A – normal metaphase, B – normal anaphase, C – normal telophase, D – C-mitosis, E, F – aberration of the mitotic spindle level, G – lagged chromosome, H, I – lagged chromosome in the anaphase-telophase, J – anaphase bridge, K – telophase bridge, L – anaphase-telophase with a fragment, M – normal interphase, N – binuclear cells, O – micronucleus in interphase cell.



Slika 3. Raspodela učestalosti hromozomskih aberacija u ispitivanim uzorcima: a1 – aspartam 40 mg/L, a2 – aspartam 80 mg/L, a3 – aspartam 100 mg/L, a4 – aspartam 120 mg/L, s – saharoze 700 mg/L, k- – negativna kontrola, k+ – pozitivna kontrola

Figure 3. The distribution of the chromosomal aberrations frequency in analyzed samples a1 – aspartame 40 mg/L, a2 – aspartame 80 mg/L, a3 – aspartame 100 mg/L, a4 – aspartame 120 mg/L, s – sucrose 700 mg/L, k- – negative control, k+ – positive control

Tabela 2. Značajnost razlika u broju hromozomskih aberacija ispitivanih uzoraka

	a1	a2	a3	a4	s	k-
a2	0.0119*					
a3	0.3744	0.0369*				
a4	0.0803	0.0001***	0.0298*			
s	0.0554	0.0000***	0.0190*	0.5000		
k-	0.0043**	0.0000***	0.0010**	0.1465	0.1964	
k+	0.4360	0.0260*	0.5000	0.0422*	0.0277*	0.0016**

a1 – koncentracija aspartama 40 mg/L, a2 – koncentracija aspartama 80 mg/L, a3 – koncentracija aspartama 100 mg/L, a4 – koncentracija aspartama 120 mg/L, s – koncentracija saharoze 700 mg/L, k- – negativna kontrola, k+ – pozitivna kontrola  
\* (p < 0.05), \*\* (p < 0.01), \*\*\* (p < 0.001)

mozom, višestruka aberacija, multipolarnost, c-mitoza i telofazni most (slika 2).

Uzorak sa brojem aberacija koji je sličan broju aberacija u negativnoj kontroli možemo smatrati da nije genotoksičan. Nasuprot tome uzorak sa brojem aberacija koji je sličan broju aberacija u pozitivnoj kontroli možemo smatrati da jeste genotoksičan. Broj aberacija u svim uzorcima aspartama se statistički značajno razlikuju od negativne kontrole, pošto imaju veći procenat aberantnih ćelija u odnosu na negativnu kontrolu, što je bilo i očekivano. Saharoza ima povećan procenat aberantnih ćelija u odnosu na negativnu kontrolu, ali bez statističke značajnosti. Ono što je zanimljivo je da saharoza ne pokazuje statistički značajan manji broj aberacija u odnosu na najnižu i najvišu testiranu koncentraciju aspartama, što nije slučaj sa ostalim testiranim koncentracijama.

Na osnovu prethodno rađene studije Renčuzogullari *et al.* (2004) pretpostavljali smo da će procenat aberacija u rastvorima aspartama rasti sa porastom koncentracije, ali istraživanje je pokazalo drugačije. Najveći procenat aberantnih ćelija ima a2 uzorak sa koncentracijom aspartama od 80 mg/L. Obzirom na to da je procenat aberacija kod a2 veći u odnosu na sve ispitivane koncentracije aspartama, kao i saharoze, negativne i pozitivne kontrole možemo zaključiti da sa porastim koncentracije ne raste i broj aberacija. Slični rezultati prikazani su u studiji Kamath *et al.* (2010) gde su nakon tretmana u trajanju od 24 h detektovali veći procenat mikronukleusa u uzorcima testiranim dozama aspartame koje su odgovarale dnevnoj prihvatljivoj dozi unosa odnosno 50 mg/L. Sa povećanjem dužine delovanja tretmana u trajanju od 48 h i 72 h, u svim uzorcima je primećeno povećano for-

Tabela 3. Zastupljenost aberacija u ispitivanim uzorcima

Uzorak	Broj promena					
	Višestruke aberacije	Fragment	Anafazni most	C-mitoza	Telofazni most	Multipolarnost
a1	1	8	7	2	2	18
a2	2	9	16	6	1	27
a3	2	16	2	7	0	13
a4	0	6	4	6	0	7
s	2	3	6	3	0	7
k-	0	5	2	2	0	6
k+	10	13	11	8	9	19

a1 – koncentracija aspartama 40 mg/L, a2 – koncentracija aspartama 80 mg/L, a3 – koncentracija aspartama 100mg/L, a4 – koncentracija aspartama 120 mg/L, s – koncentracija saharoze 700 mg/L, k- – negativna kontrola, k+ – pozitivna kontrola



miranje mikronukleusa. Činjenicu da broj aberacija ne raste sa porastom koncentracije pripisali su vremenskom činiocu jer se broj aberantnih ćelija iste serije razlikuje u zavisnosti od vremena provedenog u određenom rastvoru.

Najčešći tip aberacija u ispitivanim uzorcima je multipolarna mitozna (tabela 3). Na osnovu ovog podatka možemo da kažemo da aspartam ima najveći efekat na nivou deobnog vretena. Do ovog tipa promena dolazi usled prevremenog formiranja deobnog vretena, što kao rezultat ima neravnomernu deobu i aneuploidiju kod obe ćerke ćelije. Najveći broj aberacija ovog tipa je primećen kod uzoraka aspartama sa a2 koncentracijom (80 mg/L). Poređenje učestalosti aberacija na nivou deobnog vretena između ispitivanih uzoraka pokazalo je da se uzorak a2 značajno razlikuje od ostalih ispitivanih uzoraka (tabela 4). Poređenjem svih uzoraka aspartama sa pozitivnom kontrolom pokazana je značajna razlika

učestalosti aberacija na nivou deobnog vretena svih uzoraka aspartama sem a2 koncentracije. Ova značajna razlika je usled većeg učešća aberacija na nivou deobnog vretena u a2 koncentracije aspartama nego u pozitivnoj kontroli.

Poređenje učestalosti aberacija na nivou hromozoma između ispitivanih uzoraka je dalo neočekivane rezultate. AlSuhaibani (2010) je *in vivo* ispitivanjem efekta aspartama na ćelije koštane srži miša, pokazao da aspartam dovodi do formiranja hromozomskih prekida na dozno zavistan način. Do istog rezultata je došao i Rencüzogullari *et al.* (2004), ispitivanjem na humanim limfocitima. Rezultati našeg ispitivanja nisu to u potpunosti potvrdili. Naime, sve ispitivane koncentracije, sem najveće a4, ne razlikuju se značajno od pozitivne kontrole, odnosno značajno se razlikuju od negativne (tabela 5). Uzorak a4 sa najvišom koncentracijom aspartama ima najmanji broj aberacija na nivou hromozoma.

Tabela 4. Značajnost razlika u hromozomskim aberacijama na nivou deobnog vretena ispitivanih uzoraka

	a1	a2	a3	a4	s	k-
a2	0.0492*					
a3	0.8650	0.0965				
a4	0.3572	0.0036**	0.2659			
s	0.1224	0.0004***	0.0807	0.6642		
k-	0.0301*	0.0001***	0.0167*	0.2637	0.6336	
k+	0.6698	0.0019**	0.3827	0.5442	0.1638	0.0432*

a1 – koncentracija aspartama 40 mg/L, a2 – koncentracija aspartama 80 mg/L, a3 – koncentracija aspartama 100 mg/L, a4 – koncentracija aspartama 120 mg/L, s – koncentracija saharoze 700 mg/L, k- – negativna kontrola, k+ – pozitivna kontrola  
\* (p < 0.05), \*\* (p < 0.01), \*\*\* (p < 0.001)

Tabela 5. Značajnost razlika u broju hromozomskih aberacija ispitivanih uzoraka na nivou hromozoma

	a1	a2	a3	a4	s	k-
a2	0.1100					
a3	0.6024	0.3456				
a4	0.2329	0.0049**	0.0807			
s	0.3285	0.0920	0.1265	1.000		
k-	0.0376*	0.0030**	0.0082**	0.4630	0.3392	
k+	0.2984	0.3774	0.7922	0.0120*	0.0236*	0.0070**

a1 – koncentracija aspartama 40 mg/L, a2 – koncentracija aspartama 80 mg/L, a3 – koncentracija aspartama 100 mg/L, a4 – koncentracija aspartama 120 mg/L, s – koncentracija saharoze 700 mg/L, k- – negativna kontrola, k+ – pozitivna kontrola  
\* (p < 0.05), \*\* (p < 0.01), \*\*\* (p < 0.001)

## Zaključak

Analizirani makroskopski parametri su pokazali da aspartam nema inhibitorno dejstvo na rast korenčića, odnosno nema toksičan efekat. Ispitivane koncentracije aspartama su pokazale da uzrokuju impozantan broj hromozomskih aberacija širokog dijapazona, među kojima prednjači broj aberacija na nivou deobnog vretena, što ukazuje na genotoksično dejstvo aspartama, koje se najviše ispoljilo u a2 koncentraciji (80 mg/L). Međusobnim poređenjem uzoraka sa različitom koncentracijom aspartama i broja aberacija smo utvrdili da sa porastom koncentracije ne raste i broj aberacija. Rezultati ove studije ukazuju na potrebu za revidiranjem vrednosti prihvatljive dnevne doze unosa aspartama.

## Literatura

Ahmed F. E., Thomas D. B. 1992. Assessment of the carcinogenicity of the nonnutritive sweetener cyclamate. *Critical Reviews in Toxicology*, **22** (2): 81.

AlSuhaihani E. S. 2010. *In vivo* cytogenetic studies on aspartame. *Comparative and Functional Genomics*, Article ID 605921

Durnev A. D., Oreshchenko A. V., Kulakova A. V., Beresten N. F., Seredenin S. B. 1995. Clastogenic activity of dietary sugar substitutes. *Voprosy meditsinskoj khimii*, **41** (4): 31.

Fiskesjö G. 1985. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, **102**: 99.

Jeffrey A. M., Williams G. M. 2000. Lack of DNA-damaging activity of five nonnutritive sweeteners in the rat hepatocyte/DNA repair assay. *Food and Chemical Toxicology*, **38** (4): 335.

Kamath S., Vijaynarayana K., Shetty D. P., Shetty P. 2010. Evaluation of genotoxic potential of aspartame. *Pharmacologyonline*, **1**: 753.

Molinary S. V. 1984. Preclinical studies of aspartame in non-primate animals. U

*Aspartame Physiology and Biochemistry* (ur. L. D. Stegink i L. S. Filer Jr.) New York: Marcel Dekker, str. 289-306.

Rencüzogullari E., Tüylü B. A., Topaktaş M., İla H. B., Kayraldiz A., Arslan M., Diler S. B. 2004. Genotoxicity of aspartame. *Drug and chemical toxicology*, **27** (3): 257.

---

Nenad Velemir

## Toxicity, Cytotoxicity and Genotoxicity Testing of Artificial Sweetener Aspartame using *Allium* Test

Aspartame has been used in the food industry since 1974 as a sweetener, since it was proved to be 200 times sweeter than sugar. Despite its wide application in all kinds of food and drinks, there are a small number of conflicting studies dealing with the effects of aspartame.

In this study we examined the toxicity, cytotoxicity and genotoxicity of different concentrations of the artificial sweetener aspartame using the *Allium* test. The used concentrations of the aspartame are lower and higher than 50 mg/L, which is the acceptable daily dose intake, and are identical to the concentrations found in foods and drinks.

The macroscopic parameters showed that the effect of aspartame does not affect cell division. Microscopic parameters showed that aspartame has a greater effect on the number of aberrations at the level of formation of the mitotic spindle in relation to the aberration at the chromosome level. The concentration of aspartame, which is the acceptable daily dose intake, has demonstrated the greatest effect on the number of aberrations, which is in concordance with the part of literary data indicating a harmful effect of aspartame on the cellular level. The results of this study indicate the need to revise the value of the acceptable daily intake dose of aspartame which is in concordance with a part of literary data. ☹