

The Effects of Rutin on Mitophagy and Oxidative Stress Induced by Bisphenol A in Sertoli Cells (TM4 Cell Line)

Fatemeh Rezaei-Tazangi¹
 Fereshtesadat Fakhredini^{2,3}
 Mohammad Ebrahim Astaneh¹
 Fereshteh Aliakbari⁴
 Zahra Khoob⁵
 Mohaddeseh Motamed Jahromi⁶

¹ Assistant Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran

² Cellular and Molecular Research Center, Medical Basic Sciences Research Institute, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

³ Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

⁴ Assistant Professor, Department of Urology, Urology Research Center, Guilan University of Medical Sciences, Guilan, Iran

⁵ Medical student, Student Research Committee, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran

⁶ Assistant Professor, Department of Public Health, School of Health, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran

(Received February 21, 2026; Accepted August 15, 2026)

Abstract

Background and purpose: Bisphenol A (BPA) is an endocrine-disrupting chemical associated with oxidative stress and mitochondrial dysfunction in reproductive cells. Rutin, a naturally occurring flavonoid with antioxidant properties, may protect cells against oxidative damage. This study aimed to investigate the protective effects of rutin against BPA-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction and to evaluate changes in the expression of mitophagy-related genes in TM4 Sertoli cells.

Materials and methods: In this experimental study, TM4 Sertoli cells were exposed to BPA alone or in combination with different concentrations of rutin. Cell viability was assessed using the MTT assay, and protein content was determined by the Bradford method. Mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species (ROS) levels were measured using a spectrofluorimeter. The expression of PINK1, BNIP3, and Parkin genes was evaluated by real-time PCR. Malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), and the activities of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GPx) were measured using spectrophotometric methods.

Results: Rutin significantly reduced MDA levels in BPA-exposed Sertoli cells. Moreover, rutin significantly increased SOD and CAT activities and improved mitochondrial membrane potential in BPA-exposed cells. Rutin also increased GSH and GPx levels, indicating an enhancement of cellular antioxidant defences against BPA-induced damage. Changes in PINK1, BNIP3, and Parkin expression suggested that rutin may modulate mitophagy-related pathways under BPA-induced stress.

Conclusion: Rutin may attenuate BPA-induced oxidative and mitochondrial damage in TM4 Sertoli cells and enhance antioxidant defences. The observed changes in mitophagy-related gene expression suggest a potential role for mitophagy-related pathways in rutin-mediated protection. However, protein-level validation and functional assessment of mitophagic flux are needed to confirm this proposed mechanism.

Keywords: rutin, BPA, mitochondria, Sertoli cells, TM4 cells

J Mazandaran Univ Med Sci 2026; 36 (260): 68-81 (Persian).

Corresponding Author: Fatemeh Rezaei-Tazangi - School of Medicine, Fasa University of Medical Science
 (E-mail: f.rezaei67@yahoo.com)

اثر رنگدانه روتین بر فرایندهای میتوفاژی و استرس اکسیداتیو ناشی از بیسفنل-آ در رده سلول های سرتولی (TM4 cell line)

فاطمه رضائی تنگی^۱فرشته سادات فخردینی^{۳،۲}محمد ابراهیم آستانه^۱فرشته علی اکبری^۴زهرا خوب^۵محدثه معتمد جهرمی^۶

چکیده

سابقه و هدف: بیسفنول (BPA) یک ماده مختل کننده غدد درون ریز است که با استرس اکسیداتیو و اختلال عملکرد میتو کندری در سلول های تولید مثلی مرتبط است. روتین، یک فلاونوئید طبیعی با خواص آنتی اکسیدانی، ممکن است از سلول ها در برابر آسیب اکسیداتیو محافظت کند. این مطالعه با هدف بررسی اثرات محافظتی روتین در برابر استرس اکسیداتیو و اختلال عملکرد میتو کندری ناشی از BPA و ارزیابی تغییرات بیان ژن های مرتبط با میتوفاژی در سلول های سرتولی TM4 انجام شد.

مواد و روش ها: این مطالعه تجربی - آزمایشگاهی، سلول های سرتولی TM4 در معرض BPA به تنهایی یا همراه با غلظت های مختلف روتین قرار گرفتند. زنده مانای سلولی با آزمون MTT و میزان پروتئین با روش برادفورد ارزیابی شد. پتانسیل غشای میتو کندری و سطوح گونه های فعال اکسیژن با اسپکتروفلوریمتر اندازه گیری شدند. بیان ژن های *BNIP3*، *PINK1* و *Parkin* با واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) زمان واقعی ارزیابی شد. همچنین، سطوح مالون دی آلدئید، گلو تاتیون و فعالیت آنزیم های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلو تاتیون پراکسیداز با روش های اسپکتروفتومتری اندازه گیری شدند.

یافته ها: روتین به طور معنی داری سطوح مالون دی آلدئید را در سلول های سرتولی در معرض BPA کاهش داد. همچنین، روتین فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز و پتانسیل غشای میتو کندری را در گروه های در معرض BPA به طور معنی داری افزایش داد. روتین سطوح گلو تاتیون و گلو تاتیون پراکسیداز را نیز افزایش داد که نشان دهنده تقویت دفاع آنتی اکسیدانی سلولی در برابر آسیب ناشی از BPA است. تغییرات بیان *BNIP3*، *PINK1* و *Parkin* نشان داد که روتین ممکن است پاسخ های مرتبط با میتوفاژی را تحت استرس ناشی از BPA تعدیل کند.

استنتاج: روتین ممکن است آسیب اکسیداتیو و میتو کندری ناشی از BPA را در سلول های سرتولی TM4 کاهش داده و دفاع آنتی اکسیدانی سلولی را تقویت کند. تغییرات بیان ژن های مرتبط با میتوفاژی، احتمال نقش مسیرهای مرتبط با میتوفاژی را در اثرات محافظتی روتین مطرح می کند. با این حال، برای تأیید این مکانیسم، اعتبارسنجی در سطح پروتئین و ارزیابی عملکردی شار میتوفاژی ضروری است.

واژه های کلیدی: روتین، BPA، میتو کندری، سرتولی، TM4

E-mail: f.rezaei67@yahoo.com

مؤلف مسئول: فاطمه رضائی تنگی - فسا، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران

۱. استادیار علوم تشریح، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران

۲. مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

۳. استادیار علوم تشریح، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

۴. استادیار بیولوژی تولید مثل، مرکز تحقیقات ارولوژی، بیمارستان رازی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

۵. دانشجوی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران

۶. استادیار آموزش بهداشت و ارتقاء سلامت، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران * تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۲/۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات:

۱۴۰۴/۱۲/۵ تاریخ تصویب: ۱۴۰۵/۵/۲۴

مقدمه

بیسفنل A- (Bisphenol A: BPA) یک ترکیب شیمیایی است که در فرآورده های مختلف وجود داشته و اثرات نامطلوبی بر موجودات دارد و یکی از مواد شیمیایی است که به طور گسترده در سرتاسر جهان تولید شده است (۱). BPA یک مونومر پلی کربنات پلاستیکی و اپوکسی رزین است که در تولید انواع وسایل و مواد از جمله مواد پر کننده دندان، ظروف یک بار مصرف و پوشش داخلی قوطی های کنسرو، رزین های پلاستیکی و پلی کربنات ها و همچنین در بطری های نگهدارنده آب و شیشه های تغذیه اطفال استفاده می شود (۱،۲). BPA به دلیل شباهت ظاهری به استروژن می تواند به گیرنده های استروژن در بدن متصل شده و در فرآیند های مختلفی مانند رشد پس از تولد، تکامل و عملکرد ارگان های تناسلی نقش داشته باشد. مداخله BPA با فعالیت اندروژن ها در طی تکامل منجر به ناهنجاری دستگاه تناسلی مردانه می شود که کاهش ظرفیت تولید اسپرم را به دنبال دارد. تحقیقات نشان داده است که BPA می تواند باعث القای تولید ROS (Reactive Oxygen Species) و استرس اکسیداتیو در بافت های مختلف به ویژه کبد و بیضه شود (۳-۵). BPA باعث ایجاد نقص عملکردی میتوکنندری و همچنین القای استرس اکسیداتیو در میتوکنندری های بافت ها و سلول های مختلف مانند کبد، طحال، شبکه و لنفوسیت می شود (۶-۹). مشخص شده است که دوزهای پایین BPA اثرات منفی بر تولید مثل داشته و باعث کاهش معنی دار تولید روزانه اسپرم و کاهش وزن بیضه در موش های صحرایی می شود (۱۰). مطالعات متعددی بیانگر این مطلب هستند که در معرض قرار گرفتن با دوزهای محیطی BPA باعث کاهش تعداد اسپرم، آسیب DNA اسپرم، آپوپتوز اسپرم و اختلال در فرایند تقسیم میوز می شود و به طور کلی تضعیف فرآیند اسپرماتوژنز را سبب می شود (۱۱). سلول های سرتولی به عنوان یکی از اجزای سوماتیک بیضه، سلول های پشتیبان اولیه هستند که محیط های ساختاری و فیزیولوژیکی لازم برای رشد سلول ها در طی اسپرماتوژنز ایجاد می کنند (۱۲). تعداد سلول های

سرتولی، تعداد و فعالیت اسپرم های تولید شده را تعیین می کند (۱۲). مطالعات اخیر نشان داده است که سلول های سرتولی تحت تاثیر انواع سموم قرار می گیرند (۱۳). در بیضه، سد خونی بیضه ای (BTB: Blood-Testis Barrier)، نقش تعیین کننده ای در طول فرایند اسپرماتوژنز دارد (۱۴). این سد عمدتاً توسط اتصالات محکم بین سلول های سرتولی تشکیل می شود (۱۵). قرار گرفتن موش های صحرایی نر در معرض BPA قبل از بلوغ، بر نفوذپذیری سد خونی بیضه ای تاثیر گذاشته و سطح پروتئین های اتصالی سد را کاهش می دهد (۱۶). همچنین BPA یکپارچگی سد خونی بیضه ای را مختل می کند (۱۷).

روتین یک فلاونوئید گلیکوزیدی است که در گیاهان بسیاری از جمله مرکبات وجود داشته و خاصیت آنتی اکسیدانی دارد (۱۸).

میتوفاژی نوعی از ماکرو اتوفاژی است که طی آن میتوکنندری های آسیب دیده سلول توسط لیزوزوم ها تجزیه می شوند. *PINK1*، *BNIP3* و *Parkin* از جمله ژن های مرتبط با میتوکنندری هستند که در زمان میتوفاژی میزان بیان آن ها افزایش می یابد. *PINK1* در غشای خارجی میتوکنندری آسیب دیده تجمع می یابد و به دنبال آن میزان *Parkin* افزایش یافته و باعث افزایش فرایند میتوفاژی می شود. *BNIP3* به تجمع *PINK1* در غشای خارجی میتوکنندری کمک می کند (۱۹).

با وجود مطالعات متعدد درباره سمیت BPA، اطلاعات موجود درباره اثرات هم زمان آن بر فرایندهای میتوفاژی و سیستم آنتی اکسیدانی در سلول های سرتولی هنوز محدود است. از سوی دیگر، نقش محافظتی روتین در برابر آسیب های القا شده توسط BPA در رده سلولی TM4 و به ویژه بر شاخص های میتوفاژی، به طور کامل روشن نشده است. بنابراین، نوآوری این مطالعه در بررسی هم زمان اثر روتین بر استرس اکسیداتیو، پتانسیل غشای میتوکنندری و بیان ژن های مرتبط با میتوفاژی در سلول های سرتولی TM4 در مواجهه با BPA است.

مواد و روش‌ها

مطالعه به صورت تجربی، در محیط آزمایشگاه و بر روی نمونه های کشت سلولی صورت گرفته است (مطابق با دستورالعمل های اخلاقی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی فسا، کد اخلاق: IR.FUMS.REC.1404.208).

کشت سلول های سرتولی

رده سلولی سرتولی موشی TM4 از بانک سلولی مرکز ذخایر ژنتیک تهیه شد. هویت سلول ها بر اساس مشخصات ارائه شده توسط تأمین کننده تأیید گردید. سلول ها در محیط Dulbecco's Modified (DMEM) Eagle Medium (FBS) ۲/۵ درصد و Bovine Serum Penicillin-Streptomycin ۱ درصد کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، رطوبت اشباع و اتمسفر حاوی ۵ درصد CO₂ نگهداری شدند. محیط کشت هر ۴۸ ساعت تعویض شد (۱۳).

گروه های مطالعه به این شرح، گروه کنترل، سلول های کشت شده در محیط فاقد سرم به مدت ۴۸ ساعت، گروه BPA، سلول های مواجهه شده با BPA با غلظت ۰/۸ میکرومول بر لیتر به مدت ۴۸ ساعت، گروه روتین ۲۵، سلول های مواجهه شده با روتین ۲۵ میکرومولار، گروه روتین ۵۰، سلول های مواجهه شده با روتین ۵۰ میکرومولار، گروه روتین ۱۰۰، سلول های مواجهه شده با روتین ۱۰۰ میکرومولار و گروه های پیش مواجهه، سلول ها ابتدا به مدت ۱۵ دقیقه با روتین مواجهه شده و سپس در معرض BPA قرار گرفتند، تعریف گردید.

تست زیست پذیری سلول ها با استفاده از MTT (Methyl Thiazolyl Tetrazolium)

سلول های TM4 با تراکم ۳×۱۰^۳ سلول در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند. پس از مواجهه، ۲۰ میکرولیتر محلول (5 mg/mL) MTT به هر چاهک اضافه شد و پلیت ها به مدت ۴ ساعت در دمای

۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سپس محیط حذف و کریستال های فورمازان در DMSO (Dimethyl Sulfoxide) حل شدند. جذب نوری نمونه ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر اندازه گیری شد. نتایج به صورت درصد زیست پذیری نسبت به گروه کنترل بیان شدند (۴).

تعیین میزان پروتئین به روش برادفورد

برای تعیین میزان پروتئین، از روش برادفورد استفاده شد. در این روش، معرف برادفورد که حاوی 250 G-Co massie Brilliant Blue، اسید فسفریک ۸۵٪ و اتانول ۹۵٪ می باشد، تهیه گردید. در این روش، رنگ اتانول ۹۵٪ به اسیدهای آمینه Co massie Brilliant Blue G-250 به واسطه تغییر بازی و آروماتیک پروتئین متصل شده و موجب تغییر رنگ محلول از قهوه ای مایل به قرمز به آبی می شود. شدت رنگ ایجاد شده متناسب با غلظت پروتئین می باشد. جهت اندازه گیری جذب رنگ حاصل، ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میتوکندریایی با ۲/۵ میلی لیتر از معرف برادفورد مخلوط شد و پس از انکوباسیون مناسب، جذب محلول در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری گردید (۷).

برای تعیین غلظت پروتئین نمونه، ابتدا منحنی کالیبراسیون با استفاده از غلظت های مشخص آلومین سرم گاوی (BSA) در محدوده ۱۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه شد. پس از افزودن معرف برادفورد به استانداردها و نمونه ها و انکوباسیون در دمای اتاق به مدت ۱۰-۵ دقیقه، جذب نوری در ۵۹۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. سپس معادله خط استاندارد به صورت زیر به دست آمد.

$$A = mC + b$$

در فرمول بالا، A، جذب نوری در ۵۹۵ نانومتر، C، غلظت پروتئین (μg/mL)، m، شیب منحنی استاندارد، b، عرض از مبدأ، می باشد. غلظت پروتئین نمونه ها نیز از رابطه زیر محاسبه شد.

$$C = (A - b) / m$$

اندازه گیری پتانسیل غشای میتوکندری

میزان انتشار مجدد پروپ فلورسنت کاتیونی رودامین ۱۲۳ به عنوان معیاری در اندازه گیری پتانسیل غشای میتوکندری سلول های سرتولی مورد استفاده قرار می گیرد. کاهش Mitochondrial Membrane Potential (MMP)، باعث نشت Rhodamine123 (Rh123) از میتوکندری و در نتیجه کاهش شدت فلورسانس می شود. برای این کار، سلول های TM4 ابتدا با دوزهای متفاوت BPA و روتین تحت درمان قرار گرفته و سپس با استفاده از آنزیم تریپسین و سانتیفریوژ جمع آوری شدند. سپس سلول های گروه های مختلف با تراکم یکسان، با محلول Rh123 در دمای ۳۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شده و سپس با PBS (Phosphate-Buffered Saline) شستشو داده شدند. سوپانسیون میتوکندری را سانتیفریوژ کرده و سوپرناتانت دور ریخته شد. سپس محلول رودامین ۱۲۳ به رسوب اضافه گردید. شدت فلورسانس در طول موج های Excitation و Emission به ترتیب ۴۸۸ nm و ۵۳۰ nm توسط اسپکتروفلوریمتر اندازه گیری شد. تفاوت میان شدت فلورسانس نمونه و کنترل بیانگر میزان آسیب میتوکندری می باشد (۷).

واکنش زنجیره ای پلیمرز بی درنگ (Real time RT-PCR)

ابتدا RNA مربوط به سلول های TM4 با استفاده از کیت استخراج RNA و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. در مرحله بعد، cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA از ۱ میکروگرم RNA کل تهیه گردید. سپس بیان ژن های *PINK1*، *BNIP3* و *Parkin* به روش Real-Time PCR و با استفاده از دستگاه ارزیابی قرار گرفت. ژن *GAPDH* به عنوان ژن مرجع (Housekeeping Gene) در نظر گرفته شد. توالی پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده برای هر ژن در جدول شماره ۱، ارائه شده است.

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه

ژن	توالی پرایمر (5'→3')	توالی پرایمر (3'→5')
<i>PINK1</i>	CATGGCTTTGGATGGAG AGT	TGGGAGTTTGCTCTTCAA GG
<i>BNIP3</i>	CAGGGCTCCTGG GTAGAACT	CTACTCCGTCCAGACTCA TGC
<i>Parkin</i>	COGGGAGGATTACCCA GGAGA	GGGTATGCTCCCCCAGG ATGT
<i>GAPDH</i>	GGATACTGAGAGCAAG AGAGA	TTATGGGGTCTGGGATGG AA

واکنش Real-Time PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر SYBR Green (2X) Master Mix، ۱ میکرولیتر cDNA، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای Forward و Reverse (با غلظت نهایی ۱۰ پیکومول) و ۸ میکرولیتر آب بدون نوکلئاز انجام شد. شرایط سیکل حرارتی شامل دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، سپس ۴۰ سیکل شامل دناتوراسیون در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال پرایمرها در ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و طولی سازی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه بود. در پایان واکنش، آنالیز منحنی ذوب (Melting Curve Analysis) در محدوده دمایی ۶۰ تا ۹۵ درجه سانتی گراد جهت بررسی اختصاصیت محصولات PCR انجام شد (۱۵). سطح بیان نسبی ژن ها با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد. مقادیر ΔCt ژن های هدف ابتدا نسبت به ژن مرجع *GAPDH* نرمال سازی شده (ΔCt) و سپس نسبت به گروه کنترل کالیبره گردیدند ($\Delta\Delta Ct$). نتایج به صورت Fold Change نسبت به گروه کنترل گزارش شدند.

اندازه گیری میزان تشکیل ROS

میزان تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) با استفاده از پروپ فلورسنت ۲،۷-دی کلروفلورسئین دی استات (DCFH-DA) اندازه گیری شد. DCFH-DA یک ترکیب غیرفلورسنت و نفوذپذیر به غشا است که پس از ورود به نمونه، توسط استرازهای داخل سلولی یا میتوکندریایی هیدرولیز شده و به ۲،۷-دی کلروفلورسئین (DCFH) تبدیل می شود. DCFH نیز در حضور گونه های فعال اکسیژن اکسید شده و به ۲،۷-دی کلروفلورسئین (DCF) با خاصیت فلورسانس بالا تبدیل می گردد. بنابراین، شدت

فلورسانس DCF به عنوان شاخصی از میزان تولید ROS در نمونه در نظر گرفته شد.

به طور خلاصه، پس از سانتیفریوژ سوسپانسیون میتو کندری، محلول تازه تهیه شده DCFH-DA به رسوب حاصل اضافه شد. سپس سوسپانسیون به آرامی مخلوط شده و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. در پایان، شدت فلورسانس نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفلوریمتر در طول موج‌های تحریک (Excitation) و نشر (Emission) به ترتیب ۵۰۰ و ۵۲۰ نانومتر اندازه گیری شد. نتایج به صورت واحد شدت فلورسانس (Fluorescence Intensity Unit; FIU) گزارش گردید (۷).

اندازه گیری میزان *GSH* (Glutathione) میتو کندریایی

محتوای گلو تاتیون توسط واکنش گلو تاتیون با معرف المن (DTNB) و ایجاد رنگ زرد اندازه گیری شد به طور خلاصه ۱ میلی لیتر محلول میتو کندریایی به ۲ میلی لیتر معرف المن اضافه و رنگ زرد ایجاد شده در طول موج ۴۱۲ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. از استاندارد گلو تاتیون برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. محتوای گلو تاتیون بر حسب میکرومول بر میلی گرم پروتئین بیان گردید (۷).

اندازه گیری *MDA* (Malondialdehyd) و *SOD* (Superoxide dismutase) میتو کندریایی

به یک میلی لیتر محلول میتو کندریایی ۲۵۰ میکرولیتر اسید تری کلرواستیک ۷۰ درصد اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۳۰۰۰ سانتیفریوژ شد. به مایع رویی ۱ میلی لیتر تیو باربیتوریک اسید ۰/۸ درصد به آن اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری در حال جوش قرار داده شد، سپس در طول موج ۵۳۲ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر جذب آن قرائت گردید. جهت رسم منحنی استاندارد مالون آلدئید، غلظت های

مختلفی از ۱/۱۳/۳-ترا اتوکسی پروپان بر حسب نانومولار ساخته شد (۴).

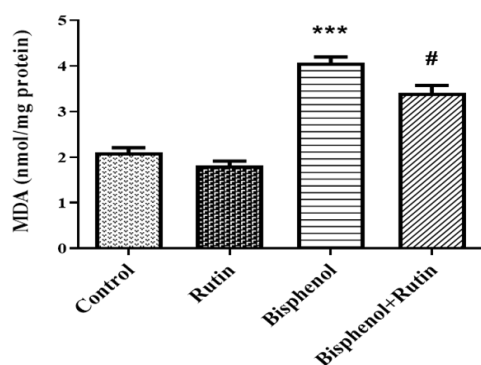
جداسازی و تخلیص میتو کندری سلول های بیضه بافت بیضه را با سرم فیزیولوژی به سرعت شسته و بعد آن را وزن گردید و ده برابر وزن بیضه بافر تخلیص که شامل مانیتول، سوکروز، هپس و EGTA (Ethylene Glycol Tetraacetic Acid) بود اضافه شد. به ازای هر گرم وزن بیضه ۰/۰۲ گرم آلبومین سرم گاوی به بافر اضافه شد و به مدت دو دقیقه هموژن کردیم بافت هموژن شده را چندین بار توسط سرعت ها و زمان های مختلف در دمای چهار درجه سانتیفریوژ گردید و در نهایت رسوب به دست آمده، سوسپانسیون میتو کندری سلول های بیضه بود (۷). داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS تحلیل شدند. مقایسه بین گروه ها با آزمون One way ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey انجام شد. سطح معنی داری آماری کم تر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. کلیه آزمایش ها حداقل ۴ بار تکرار شدند.

یافته ها

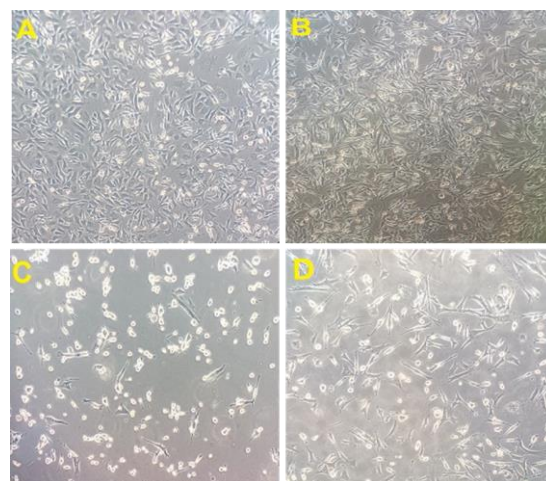
مورفولوژی

در گروه دریافت کننده روتین، شکل و ساختار سلول ها مشابه گروه کنترل مشاهده شد. در گروه های تحت مواجهه با بیسفنول، شمار سلول های آپوپتوتیک و سلول های دارای ظاهر غیر طبیعی نسبت به گروه کنترل به طور قابل توجهی افزایش یافت. تجویز روتین به گروه مواجهه یافته با BPA باعث کاهش معنی دار سلول های آپوپتوتیک و بهبود ویژگی های مورفولوژیک سلول ها گردید (تصویر شماره ۱).

شاخص‌های استرس اکسیداتیو و سیستم آنتی‌اکسیدانی همان گونه که در تصاویر شماره ۲ و ۳ نشان داده شده است، مواجهه با BPA موجب افزایش معنی‌دار سطح MDA و کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD، CAT و GPx و همچنین سطح GSH در مقایسه با گروه کنترل شد ($P < 0.001$). مواجهه با روتین به تنهایی تغییر معنی‌داری نسبت به گروه کنترل ایجاد نکرد. با این حال، پیش مواجهه با روتین توانست افزایش MDA ناشی از BPA را به طور معنی‌داری کاهش داده و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و سطح GSH را در مقایسه با گروه BPA به طور معنی‌داری افزایش دهد ($P < 0.05$) یا ($P < 0.01$)، که نشان دهنده اثر محافظتی روتین در کاهش استرس اکسیداتیو است (تصاویر شماره ۲ و ۳).



تصویر شماره ۲: اثر روتین بر میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA) در سلول‌های سرتولی TM4 پس از مواجهه با BPA، مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (Mean $\pm$ SD، $n = 4$) بیان شده‌اند. گروه‌ها شامل کنترل، روتین، BPA و BPA + روتین هستند. افزایش معنی‌دار MDA در گروه BPA نشان دهنده افزایش پراکسیداسیون لیپیدی و استرس اکسیداتیو است، در حالی که مواجهه با روتین موجب کاهش معنی‌دار MDA در مقایسه با گروه BPA شد. داده‌ها با آزمون One-way ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey تحلیل شدند. * $P < 0.05$ ، ** $P < 0.01$ ، *** $P < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل، # $P < 0.05$ ، ## $P < 0.01$ و ### $P < 0.001$ در مقایسه با گروه BPA



تصویر شماره ۱: مورفولوژی سلول‌های سرتولی TM4 در گروه‌های مختلف پس از مواجهه‌های آزمایشی، A: گروه کنترل، B: گروه مواجهه شده با روتین، C: گروه مواجهه شده با BPA، و D: گروه پیش مواجهه شده با روتین و سپس مواجهه با BPA، همان گونه که مشاهده می‌شود، سلول‌های گروه کنترل و روتین مورفولوژی طبیعی، چسبندگی مناسب و تراکم سلولی مطلوب را حفظ کرده‌اند. در مقابل، سلول‌های گروه BPA کاهش تراکم سلولی، تغییر شکل، گردش‌گی سلول‌ها، جدا شدن از سطح کشت و افزایش سلول‌های آپوپتوتیک را نشان می‌دهند. پیش مواجهه با روتین این تغییرات مورفولوژیک را به طور قابل توجهی کاهش داده و موجب حفظ مورفولوژی طبیعی و بهبود بقای سلولی در مقایسه با گروه BPA شده است.

MTT

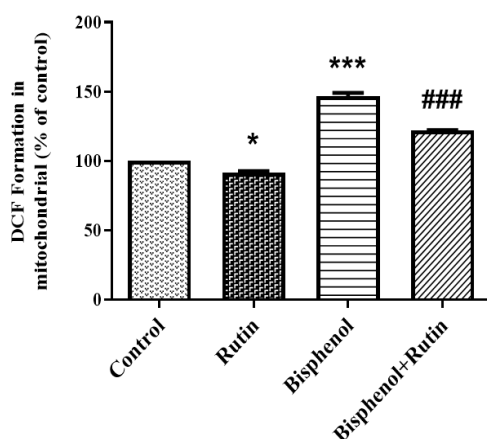
سلول‌های سرتولی در دوره‌های زمانی ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در مواجهه با دوزهای ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکروگرم بر لیتر روتین قرار داده شدند. قابلیت حیات سلول‌ها با افزایش دوز روتین و طول مدت مواجهه با روتین افزایش یافت (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲: درصد زیست‌پذیری سلول‌های سرتولی TM4 پس از تیمار با غلظت‌های مختلف روتین ($\mu\text{g/mL}$) در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

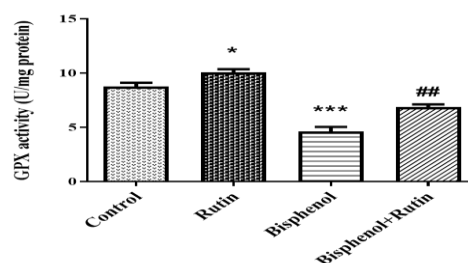
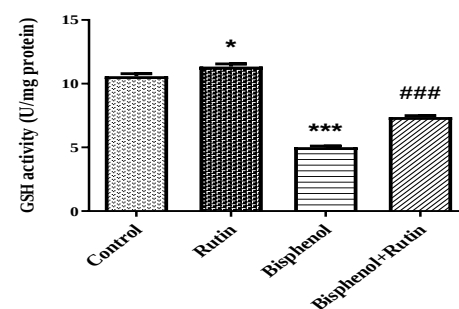
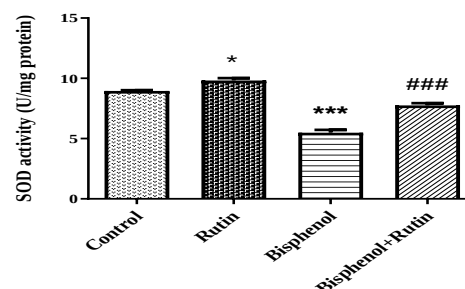
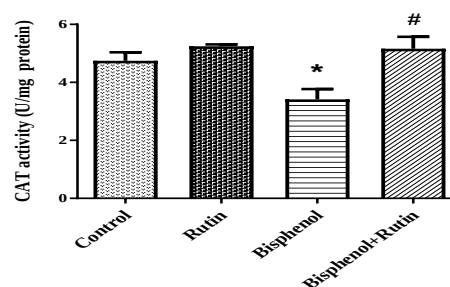
Treatments	12 h	24 h	48 h	72 h
25 $\mu\text{g/mL}$	0.77 $\pm$ 0.38	0.70 $\pm$ 0.43	0.72 $\pm$ 0.49	0.79 $\pm$ 0.47
50 $\mu\text{g/mL}$	0.60 $\pm$ 0.46	0.67 $\pm$ 0.39	0.66 $\pm$ 0.41	0.68 $\pm$ 0.44
100 $\mu\text{g/mL}$	0.54 $\pm$ 0.40	0.64 $\pm$ 0.43	0.61 $\pm$ 0.45	0.62 $\pm$ 0.47
150 $\mu\text{g/mL}$	0.55 $\pm$ 0.43	0.61 $\pm$ 0.46	0.63 $\pm$ 0.48	0.61 $\pm$ 0.45

داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ($n=4$) گزارش شده‌اند. نماد * نشان دهنده اختلاف معنی‌دار آماری نسبت به زمان ۱۲ ساعت در همان ردیف ($P < 0.001$) است.

تولید گونه‌های فعال اکسیژن و عملکرد میتوکندری مطابق تصاویر شماره ۴ و ۵، مواجهه با BPA باعث افزایش معنی‌دار تولید ROS و کاهش پتانسیل غشای میتوکندری (MMP) در مقایسه با گروه کنترل شد ($P < 0.001$). پیش مواجهه با روتین هر دو شاخص را به طور معنی‌داری بهبود بخشید؛ به طوری که تولید ROS کاهش یافت و MMP در مقایسه با گروه BPA افزایش پیدا کرد ($P < 0.001$). این یافته‌ها بیانگر نقش محافظتی روتین در حفظ عملکرد میتوکندری و کاهش آسیب اکسیداتیو هستند.

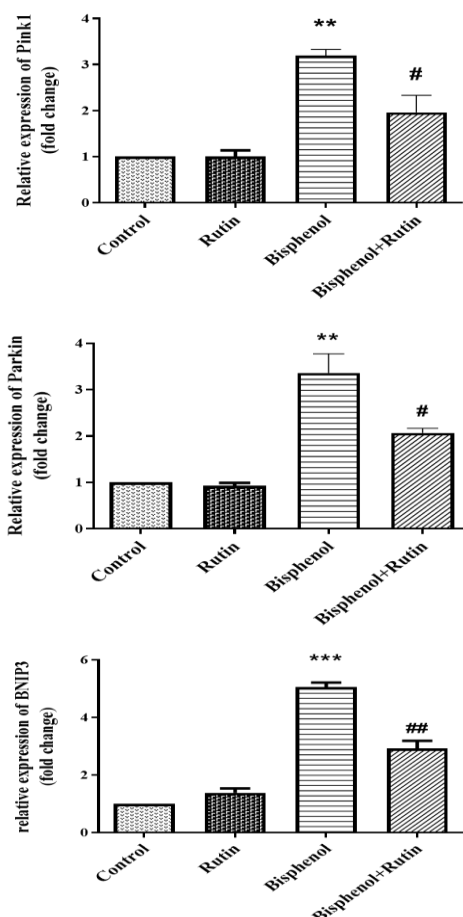


تصویر شماره ۴: اثر روتین بر تولید گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species; ROS) در سلول‌های سرتولی TM4 پس از مواجهه با بیسفنول (BPA)، که با استفاده از شدت فلورسانس ۲،۷-دی‌کلروفلورسانس (DCF) اندازه‌گیری شد. مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ($n = 4$, Mean $\pm$ SD) گزارش شده‌اند. مواجهه با BPA موجب افزایش معنی‌دار تولید ROS در مقایسه با گروه کنترل شد که نشان دهنده القای استرس اکسیداتیو است. پیش مواجهه با روتین به طور معنی‌داری میزان ROS را در مقایسه با گروه BPA کاهش داد و اثر محافظتی آن در کاهش آسیب اکسیداتیو را نشان داد. داده‌ها با استفاده از آزمون One-way ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. $P < 0.05$ *, $P < 0.01$ **, $P < 0.001$ *** در مقایسه با گروه کنترل، $P < 0.05$ #, $P < 0.01$ ## و $P < 0.001$ ### در مقایسه با گروه BPA

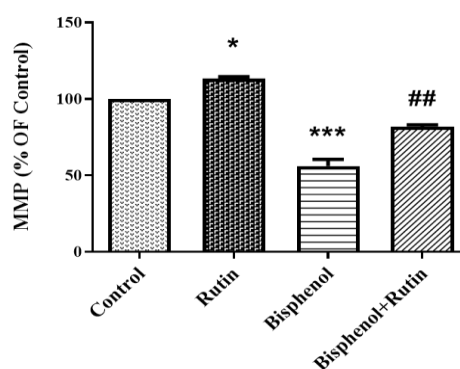


تصویر شماره ۳: اثر روتین بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلوکاتیون احیا شده (GSH) و گلوکاتیون پراکسیداز (GPX) در سلول‌های سرتولی TM4 پس از مواجهه با BPA، مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ($n = 4$, Mean $\pm$ SD) گزارش شده‌اند. مواجهه با BPA موجب کاهش معنی‌دار فعالیت SOD، CAT، GSH نسبت به گروه کنترل شد که نشان دهنده اختلال در سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی سلول است. پیش مواجهه با روتین فعالیت این آنزیم‌ها را به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه BPA افزایش داد و بیانگر اثر محافظتی روتین در برابر استرس اکسیداتیو القا شده توسط BPA است. داده‌ها با استفاده از آزمون One-way ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. $P < 0.05$ *, $P < 0.01$ **, $P < 0.001$ *** در مقایسه با گروه کنترل؛ $P < 0.05$ #, $P < 0.01$ ## و $P < 0.001$ ### در مقایسه با گروه BPA

می‌کند و روتین عمده‌تاً از طریق اثرات آنتی‌اکسیدانی و حفظ عملکرد میتوکنندری از این سلول‌ها محافظت می‌کند.



تصویر شماره ۶: اثر روتین بر بیان نسی ژن‌های مرتبط با میتوفاژی شامل *PINK1*، *Parkin* و *BNIP3* در سلول‌های سرتولی TM4 پس از مواجهه با بیسفنول (BPA)، میزان بیان ژن‌ها با استفاده از Real-time PCR و روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ نسبت به ژن مرجع *GAPDH* محاسبه و به صورت Fold change نسبت به گروه کنترل گزارش شد. مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ($n = 4$, Mean $\pm$ SD) بیان شده‌اند. مواجهه با BPA موجب افزایش معنی‌دار بیان ژن‌های *PINK1*، *Parkin* و *BNIP3* در مقایسه با گروه کنترل شد که نشان دهنده فعال شدن مسیرهای مرتبط با میتوفاژی در پاسخ به آسیب میتوکندریایی است. پیش‌مواجهه با روتین بیان این ژن‌ها را به طور معنی‌داری در مقایسه با گروه BPA کاهش داد که بیانگر اثر محافظتی روتین در تعدیل پاسخ‌های مرتبط با میتوفاژی و کاهش آسیب اکسیداتیو است. داده‌ها با استفاده از آزمون One-way ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. $P < 0.05$ ، $P < 0.01$ ، $P < 0.001$ *** و $P < 0.05$ ## در مقایسه با گروه کنترل؛ $P < 0.05$ ## و $P < 0.001$ #### در مقایسه با گروه BPA



تصویر شماره ۵: اثر روتین بر پتانسیل غشای میتوکنندری (Mitochondrial Membrane Potential; MMP) در سلول‌های سرتولی TM4 پس از مواجهه با بیسفنول (BPA)، مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ($n = 4$, Mean $\pm$ SD) گزارش شده‌اند. مواجهه با BPA موجب کاهش معنی‌دار MMP در مقایسه با گروه کنترل شد که نشان دهنده اختلال عملکرد میتوکنندری است. پیش‌مواجهه با روتین کاهش MMP القا شده توسط BPA را به طور معنی‌داری بهبود بخشید و بیانگر اثر محافظتی روتین در حفظ عملکرد میتوکنندری و کاهش آسیب اکسیداتیو است. داده‌ها با استفاده از آزمون One-way ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. $P < 0.05$ ، $P < 0.01$ ، $P < 0.001$ *** و $P < 0.05$ ## در مقایسه با گروه کنترل، $P < 0.01$ ## و $P < 0.001$ #### در مقایسه با گروه BPA

بیان ژن‌های مرتبط با میتوفاژی

همان گونه که در تصویر شماره ۶، مشاهده می‌شود، بیان نسبی ژن‌های *PINK1*، *Parkin* و *BNIP3* در گروه BPA به طور معنی‌داری بیش‌تر از گروه کنترل بود ($P < 0.01$). مواجهه با روتین به تنهایی تغییر معنی‌داری در بیان این ژن‌ها ایجاد نکرد، اما پیش‌مواجهه با روتین افزایش بیان القا شده توسط BPA را به طور معنی‌داری کاهش داد ($P < 0.01$ ، که نشان دهنده تعدیل پاسخ‌های مولکولی مرتبط با آسیب میتوکندریایی است.

بحث

این مطالعه نشان می‌دهد که مواجهه با BPA یک الگوی هماهنگ از اختلالات اکسیداتیو و میتوکندریایی در سلول‌های سرتولی TM4 ایجاد

افزایش معنی دار استرس اکسیداتیو، که با بالا رفتن سطوح ROS و MDA و کاهش دفاع‌های آنتی‌اکسیدانی از جمله SOD، CAT، GSH و GPx همراه بود، تأیید می‌کند که برهم خوردن تعادل ردوکس یکی از مکانیسم‌های اصلی اختلال عملکرد سلول‌های سرتولی ناشی از BPA است. در همین راستا، یافته‌های Ayelet Ziv-Gal و همکاران (۲۰۱۶) و Agnieszka Tomza-Marciniak و همکاران (۲۰۱۸) نیز نشان دادند که BPA می‌تواند با اثر بر مورفولوژی و عملکرد تخمدان، رحم و محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-تخمدان، ظرفیت باروری زنان را کاهش دهد و همچنین اثرات سمی بر اندام‌های تولید مثلی و کیفیت اسپرم داشته باشد. این شواهد نشان می‌دهد که BPA از طریق القای استرس اکسیداتیو و اختلال در تنظیمات تولید مثلی، آثار زیان‌بار قابل توجهی بر باروری دارد (۲۰، ۲۱).

علاوه بر مطالعات ذکر شده، گزارش‌های متعددی نشان داده‌اند که BPA با القای تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن، کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و آسیب به میتوکندری، موجب اختلال عملکرد سلول‌های سرتولی می‌شود. مطالعات Presunto و همکاران (۲۰۲۳)، Tiwari و همکاران (۲۰۱۷)، Vanage و همکاران (۲۰۰۹) و Huang و همکاران (۲۰۲۱) نیز نشان داده‌اند که استرس اکسیداتیو یکی از مکانیسم‌های اصلی سمیت تولید مثلی BPA بوده و سلول‌های سرتولی به دلیل نقش کلیدی در حفظ ریز محیط اسپرماتوژنز، نسبت به این آسیب بسیار حساس هستند. یافته‌های حاضر که افزایش ROS و MDA و کاهش GSH، SOD، CAT و GPx را نشان می‌دهد، با این مطالعات همخوانی کامل دارد (۱۲، ۲۲، ۲۳، ۲۴).

هم‌سو با این تغییرات، BPA موجب اختلال در عملکرد میتوکندری نیز شد؛ به‌طوری‌که کاهش پتانسیل غشای میتوکندری مشاهده گردید. این موضوع

نشان می‌دهد که میتوکندری هم منبع اصلی و هم هدف مهم تولید ROS است و آسیب به آن می‌تواند چرخه‌ای از تولید بیش‌تر گونه‌های فعال اکسیژن و تشدید اختلال سلولی را ایجاد کند. کاهش پتانسیل غشای میتوکندری در شرایط استرس اکسیداتیو پایدار می‌تواند به برهم خوردن هموستاز میتوکندری، فعال شدن مسیرهای کنترل کیفیت و در نهایت تحریک پاسخ‌های جبرانی مانند میتوفاژی منجر شود. در تأیید اهمیت مسیرهای مرتبط با استرس اکسیداتیو، Huang و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند که روتین می‌تواند سمیت سلولی ناشی از BisGMA را از طریق کاهش ROS، القای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و مهار مسیرهای وابسته به آپوپتوز میتوکندریایی سرکوب کند (۲۵). همچنین Yang و همکاران (۲۰۲۲) گزارش کردند که روتین با کاهش تولید ROS و غیر فعال‌سازی مسیرهای مرتبط با سمیت TEGDMA از طریق مسیر Nrf-2/AMPK، اثر محافظتی قابل توجهی ایجاد می‌کند (۲۶).

مطالعات اخیر همچنین نشان داده‌اند که اختلال عملکرد میتوکندری تنها محدود به کاهش پتانسیل غشای میتوکندری نیست، بلکه با تغییر در دینامیک میتوکندری، اختلال در بیوانرژی‌تیک سلولی و فعال شدن مسیرهای کنترل کیفیت میتوکندری همراه است. گزارش‌های Yao و همکاران و نیز سایر مطالعات مربوط به مسیر PINK1/Parkin نشان داده‌اند که تجمع PINK1 بر روی میتوکندری‌های آسیب دیده موجب جذب Parkin و آغاز فرآیند میتوفاژی می‌شود. بنابراین، افزایش بیان این ژن‌ها در مطالعه حاضر احتمالاً بیانگر فعال شدن پاسخ جبرانی سلول در برابر آسیب میتوکندریایی ناشی از BPA است، هر چند همان گونه که اشاره شد، بدون ارزیابی پروتئینی و سنجش شار میتوفاژی نمی‌توان درباره افزایش واقعی میتوفاژی نتیجه‌گیری قطعی کرد (۲۷).

در همین راستا، مواجهه با BPA با افزایش بیان ژن‌های مرتبط با میتوفاژی شامل *Parkin*، *PINK1* و *BNIP3* همراه بود که نشان دهنده فعال شدن سیگنال‌های مولکولی پاسخ دهنده به استرس میتوکنندری است. با این حال، از آن‌جا که در این مطالعه تنها سطح mRNA بررسی شده است، این تغییرات باید بیش‌تر به‌عنوان شواهدی از تغییر در سیگنالینگ میتوفاژی، نه اثبات قطعی افزایش فعالیت میتوفاژی، تفسیر شوند. نبود ارزیابی‌های مکمل در سطح پروتئین و آزمون‌های عملکردی مانند LC3-II، جایگیری میتوکنندری یا شار مستقیم میتوفاژی، یک محدودیت مهم محسوب می‌شود و انجام پژوهش‌های آینده را برای روشن شدن ارتباط بین تغییرات رونویسی و فعالیت واقعی میتوفاژی ضروری می‌سازد. در مقابل، روتین توانست بخش قابل توجهی از اثرات زیان‌بار BPA را خنثی کند. کاهش تولید ROS، بهبود دفاع‌های آنتی‌اکسیدانی و بازیابی پتانسیل غشای میتوکنندری نشان می‌دهد که روتین در شرایط استرس اکسیداتیو به حفظ یکپارچگی میتوکنندری کمک می‌کند. کاهش بیان *Parkin*، *PINK1* و *BNIP3* در سلول‌های مواجهه شده با روتین نیز حاکی از آن است که کاهش استرس اکسیداتیو و بهبود

وضعیت میتوکنندری با تعدیل سیگنالینگ‌های مرتبط با میتوفاژی همراه است. این نتایج با گزارش‌های Huang و همکاران (۲۰۲۱) و Yang و همکاران (۲۰۲۲) هم‌خوانی دارد که نشان داده‌اند روتین قادر است گونه‌های فعال اکسیژن را کاهش دهد، دفاع آنتی‌اکسیدانی درون‌زاد را تقویت کند و از طریق مسیرهای حساس به ردوکس از آسیب میتوکنندری جلوگیری نماید (۲۴، ۲۵).

در مجموع، ارزیابی هم‌زمان استرس اکسیداتیو، عملکرد میتوکنندری و بیان ژن‌های مرتبط با میتوفاژی در یک مدل تجربی واحد، دید جامع‌تری از پاسخ

سلولی به BPA در سلول‌های سرتولی TM4 فراهم می‌کند. داده‌های این مطالعه از مدلی حمایت می‌کنند که در آن استرس اکسیداتیو القا شده توسط BPA به اختلال عملکرد میتوکنندری و فعال شدن مسیرهای کنترل کیفیت میتوکنندری منجر می‌شود، در حالی که روتین با کاهش بار اکسیداتیو و پایدارسازی وضعیت میتوکنندری نقش محافظتی ایفا می‌کند. نتایج مطالعه حاضر همچنین با سایر مطالعات انجام شده بر روی فلاونوئیدها همخوانی دارد. گزارش شده است که روتین علاوه بر مهار تولید ROS، موجب فعال شدن مسیرهای وابسته به Nrf2، افزایش بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش آپوپتوز وابسته به میتوکنندری می‌شود. این مکانیسم‌ها احتمالاً در کنار حفظ پتانسیل غشای میتوکنندری، موجب کاهش سیگنال‌های آغازگر میتوفاژی شده و کاهش بیان *Parkin*، *PINK1* و *BNIP3* مشاهده شده در مطالعه حاضر را توضیح می‌دهند (۲۸).

همچنین نتایج به‌دست آمده با شواهد پیشین درباره اثرات زیان‌بار BPA بر دستگاه تولید مثل، از جمله گزارش‌های Ayelet Ziv-Gal و همکاران (۲۰۱۶) و Tomza-Marciniak و Agnieszka همکاران (۲۰۱۸)، و نیز نقش محافظتی روتین در برابر سمیت القا شده توسط ترکیبات شیمیایی، از جمله مطالعات Huang و همکاران (۲۰۲۱) و Yang و همکاران (۲۰۲۲)، هم‌راستا است (۲۴، ۲۵). با این حال، برای تبیین دقیق‌تر مکانیسم‌های مولکولی، انجام مطالعات آینده با تمرکز بر سنجش پروتئین‌های کلیدی، ارزیابی بیوانرژتیک میتوکنندری و اندازه‌گیری مستقیم میتوفاژی ضروری است.

نتایج این مطالعه نشان داد که روتین می‌تواند آسیب اکسیداتیو القا شده توسط بیسفنول A را در سلول‌های سرتولی TM4 کاهش دهد. این اثر با کاهش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و سطح مالون‌دی‌آلدئید (MDA)، افزایش ظرفیت دفاع

آنتی اکسیدانی سلول (شامل SOD، CAT، GSH و GPx)، حفظ پتانسیل غشای میتوکندری و تعدیل بیان ژن های مرتبط با میتوفاژی (*Parkin*، *PINK1* و *BNIP3*) همراه بود. این یافته ها نشان می دهند که روتین می تواند در شرایط آزمایشگاهی، اثرات محافظتی بر سلول های سرتولی در برابر آسیب ناشی از BPA داشته باشد.

با این حال، این مطالعه دارای محدودیت هایی است. نخست، تمامی آزمایش ها در شرایط *in vitro* و تنها بر روی رده سلولی TM4 انجام شده اند؛ بنابراین، تعمیم نتایج به بافت بیضه، فرآیند اسپرماتوژنز یا عملکرد باروری در موجود زنده امکان پذیر نیست. دوم، ارزیابی مسیرهای مرتبط با میتوفاژی تنها بر اساس تغییرات بیان ژن انجام شده و بررسی بیان پروتئین ها یا آزمون های عملکردی میتوفاژی انجام نشده است. همچنین، سایر شاخص های عملکرد میتوکندری مانند تولید ATP یا میزان تنفس میتوکندری نیز در این مطالعه بررسی نشدند.

بنابراین، انجام مطالعات آینده با استفاده از مدل های حیوانی، ارزیابی بیان پروتئین های مرتبط با میتوفاژی، سنجش *mitophagic flux* و بررسی شاخص های عملکردی میتوکندری برای تأیید مکانیسم های مولکولی و ارزیابی قابلیت تعمیم این یافته ها به شرایط *in vivo* ضروری است.

در تفسیر نتایج این مطالعه باید چند محدودیت مهم را مدنظر قرار داد. نخست آن که آزمایش ها صرفاً در شرایط *in vitro* و بر روی رده سلولی TM4 انجام شده اند؛ بنابراین تعمیم پذیری یافته ها به سایر رده های سلولی سرتولی، بافت بیضه در شرایط *in*

vivo یا گونه های مختلف، نیازمند احتیاط و مطالعات تکمیلی است. دوم، ارزیابی ها تنها در سطح بیان ژن و mRNA انجام شده و هیچ گونه بررسی پروتئینی (نظیر وسترن بلات یا ایمونوفلورسانس) صورت نگرفته است؛ در نتیجه، نمی توان با قطعیت درباره تغییرات در سطح پروتئین ها و فعال شدن واقعی مسیرهای سیگنالینگ اظهار نظر کرد. سوم، شار میتوفاژی (*mitophagic flux*) یا عملکرد واقعی فرآیند میتوفاژی مورد سنجش قرار نگرفته و شواهد موجود صرفاً مبتنی بر تغییرات بیان ژن های مرتبط با میتوفاژی است؛ از این رو، نتایج صرفاً نشان دهنده ارتباط مولکولی با مسیرهای کنترل کیفیت میتوکندری بوده و اثبات کننده افزایش یا کاهش قطعی فعالیت میتوفاژی نیست. چهارم، سایر شاخص های کلیدی عملکرد میتوکندری، از جمله سطح ATP، نرخ مصرف اکسیژن و پارامترهای تنفس میتوکندری، اندازه گیری نشده اند؛ بنابراین، تفسیر بهبود یا اختلال عملکرد میتوکندری بیش تر بر اساس تغییرات پتانسیل غشاء و نشانگرهای اکسیداتیو و نه یک ارزیابی جامع بیوانرژتیک، است. این محدودیت ها لزوم انجام مطالعات آینده با طراحی گسترده تر و استفاده از سنجش های پروتئینی و عملکردی را برجسته می سازد.

سپاسگزاری

مطالعه حاضر بر اساس پایان نامه مقطع پزشکی عمومی مصوب معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی فسا با کد مصوب: ۴۰۱۰۰۴ انجام شده است.

References

- 1- Allard P. Biomarkers in toxicology: Elsevier; 2014: 459-474.
- 2- Konieczna A, Rutkowska A, Rachon DJ. Health risk of exposure to Bisphenol A (BPA). *Rocz Państw Zakł Hig* 2015;66(1):5-11 PMID: 25813067.
- 3- Amraoui W, Adjabi N, Bououza F, Boumendjel M, Taibi F, Boumendjel A, et al. Modulatory role of selenium and

- vitamin E, natural antioxidants, against bisphenol A-induced oxidative stress in Wistar albinos rats. *Toxicol Res* 2018;34(3):231-239 PMID: 30057697.
- 4- Rafiee Z, Rezaee-Tazangi F, Zeidooni L, Alidadi H, Khorsandi L. Protective effects of selenium on Bisphenol A-induced oxidative stress in mouse testicular mitochondria and sperm motility. *JBRA Assist Reprod* 2021;25(3):459-465 PMID: 33899458.
 - 5- Tiwari D, Vanage G. Bisphenol A induces oxidative stress in bone marrow cells, lymphocytes, and reproductive organs of Holtzman rats. *Int J Toxicol* 2017;36(2):142-152 PMID: 28403740.
 - 6- Khan S, Beigh S, Chaudhari BP, Sharma S, Aliul Hasan Abdi S, Ahmad S, et al. Mitochondrial dysfunction induced by Bisphenol A is a factor of its hepatotoxicity in rats. *Environ Toxicol* 2016;31(12):1922-1934 PMID: 26450347.
 - 7- Rezaee-Tazangi F, Zeidooni L, Rafiee Z, Fakhredini F, Kalantari H, Alidadi H, et al. Taurine effects on Bisphenol A-induced oxidative stress in the mouse testicular mitochondria and sperm motility. *JBRA Assist Reprod* 2020;24(4):428-435 PMID: 32550655.
 - 8- Dong Y, Zhai L, Zhang L, Jia L, Wang X. Bisphenol A impairs mitochondrial function in spleens of mice via oxidative stress. *Molecular & Cellular Toxicology* 2013;9:401-406.
 - 9- Chiang YW, Su CH, Sun HY, Chen SP, Chen CJ, Chen WY, et al. Bisphenol A induced apoptosis via oxidative stress generation involved Nrf2/HO-1 pathway and mitochondrial dependent pathways in human retinal pigment epithelium (ARPE-19) cells. *Environ Toxicol* 2022;37(1):131-141 PMID: 34664771.
 - 10- Meng Y, Lin R, Wu F, Sun Q, Jia L. Decreased capacity for sperm production induced by perinatal bisphenol a exposure is associated with an increased inflammatory response in the offspring of C57BL/6 male mice. *Int J Environ Res Public Health* 2018;15(10):2158 PMID: 30275377.
 - 11- Dobrzyńska MM, Radzikowska J. Genotoxicity and reproductive toxicity of bisphenol A and X-ray/bisphenol A combination in male mice. *Drug Chem Toxicol* 2013;36(1):19-26 PMID: 22263531.
 - 12- Presunto M, Mariana M, Lorigo M, Cairrao E. The effects of bisphenol A on human male infertility: A review of current epidemiological studies. *Int J Mol Sci* 2023;24(15):12417 PMID: 37569791.
 - 13- Li D, Liu Q, Gong Y, Huang Y, Han X. Cytotoxicity and oxidative stress study in cultured rat Sertoli cells with methyl tert-butyl ether (MTBE) exposure. *Reprod Toxicol* 2009;27(2):170-176 PMID: 19150650.
 - 14- Jiang XH, Bukhari I, Zheng W, Yin S, Wang Z, Cooke HJ, et al. Blood-testis barrier and spermatogenesis: lessons from genetically-modified mice. *Asian J Androl* 2014;16(4):572-580 PMID: 24713828.
 - 15- Fink C, Weigel R, Hembes T, Lauke-Wettwer H, Kliesch S, Bergmann M, et al. Altered expression of ZO-1 and ZO-2 in Sertoli cells and loss of blood-testis barrier integrity in testicular carcinoma in situ. *Neoplasia* 2006;8(12):1019-1027 PMID: 17217619.
 - 16- Pérez CV, Sobarzo CM, Jacobo PV, Pellizzari EH, Cigorraga SB, Denduchis B,

- etal. Loss of occludin expression and impairment of blood-testis barrier permeability in rats with autoimmune orchitis: effect of interleukin 6 on Sertoli cell tight junctions. *Biol Reprod* 2012;87(5):122 PMID: 23018187.
- 17- Li MW, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. Disruption of the blood-testis barrier integrity by bisphenol A in vitro: is this a suitable model for studying blood-testis barrier dynamics? *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41(11):2302-2314 PMID: 19497385.
 - 18- Wei SM, Yan ZZ, Zhou J. Protective effect of rutin on testicular ischemia-reperfusion injury. *J Pediatr Surg* 2011;46(7):1419-1424 PMID: 21763845.
 - 19- Yao J, Wang J, Xu Y, Guo Q, Sun Y, Liu J, et al. CDK9 inhibition blocks the initiation of PINK1-PRKN-mediated mitophagy by regulating the SIRT1-FOXO3-BNIP3 axis and enhances the therapeutic effects involving mitochondrial dysfunction in hepatocellular carcinoma. *Autophagy* 2022;18(8):1879-1897 PMID: 34890308.
 - 20- Ziv-Gal A, Flaws JA. Evidence for bisphenol A-induced female infertility: a review (2007–2016). *Fertil Steril* 2016;106(4):827-856 PMID: 27417731.
 - 21- Tomza-Marciniak A, Stępkowska P, Kuba J, Pilarczyk B. Effect of bisphenol A on reproductive processes: A review of in vitro, in vivo and epidemiological studies. *Journal of Applied Toxicology* 2018; 38(1):5 1-80.
 - 22- Tiwari D, Vanage G. Bisphenol A induces oxidative stress in bone marrow cells, lymphocytes, and reproductive organs of Holtzman rats. *Int J Toxicol* 2017;36(2):142-152 PMID: 28403740.
 - 23- Vanage GR, Salian S, Doshi T, Padwal V. Bisphenol A Induces Functional Alterations of the Hypothalamus-Pituitary-Gonadal Axis in Neonatally Exposed Male Rats Leading to Impairment of Fertility During Adulthood: Cellular and Molecular Effects at the Testicular Level. *Biology of Reproduction* 2009;81(1):190.
 - 24- Huang FM, Chang YC, Su CH, Wu SW, Lee SS, Lee MW, et al. Rutin-protected BisGMA-induced cytotoxicity, genotoxicity, and apoptosis in macrophages through the reduction of the mitochondrial apoptotic pathway and induction of antioxidant enzymes. *Environ Toxicol* 2021;36(1):45-54 PMID: 32830914.
 - 25- Yang LC, Chang YC, Yeh KL, Huang FM, Su NY, Kuan YH. Protective effect of rutin on triethylene glycol dimethacrylate-induced toxicity through the inhibition of caspase activation and reactive oxygen species generation in macrophages. *Int J Mol Sci* 2022;23(19):11773 PMID: 36233071.
 - 26- Yao J, Wang J, Xu Y, Guo Q, Sun Y, Liu J, et al. CDK9 inhibition blocks the initiation of PINK1-PRKN-mediated mitophagy by regulating the SIRT1-FOXO3-BNIP3 axis and enhances the therapeutic effects involving mitochondrial dysfunction in hepatocellular carcinoma. *Autophagy* 2022;18(8):1879-1897 PMID: 34890308.
 - 27- Rotimi DE, Iyobhebhe M, Oluwayemi ET, Evbuomwan IO, Asaleye RM, Ojo OA, et al. Mitophagy and spermatogenesis: role and mechanisms. *Biochem Biophys Rep* 2024;38:101698 PMID: 38577271.