ORIGINAL ARTICLE

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

Fatemeh Rezaei-Tazangi [1]
Fereshtesadat Fakhredini [2,3]
Mohammad Ebrahim Astaneh[1]
Fereshteh Aliakbari[4]
Zahra Khoob [5]
Mohaddeseh Motamed Jahromi[6]

[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)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-01]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و ششم شماره ۲۶۰ شهریور سال ۱۴۰۵ (۸۱-۶۸)

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

فاطمه رضائی تزنگی[۱]
فرشته سادات فخردینی[۲،۳]
محمد ابراهیم آستانه[۱]
فرشته علی اکبری[۴]
زهرا خوب[۵]
محدثه معتمد جهرمی[۶]

چکیده

سابقه و هدف: بیسفنول A (BPA) یک ماده مختل کننده غدد درون‌ریز است که با استرس اکسیداتیو و اختلال عملکرد میتوکندری در سلول‌های تولید مثلی مرتبط است. روتین، یک فلاونوئید طبیعی با خواص آنتی اکسیدانی، ممکن است از سلول‌ها در برابر آسیب اکسیداتیو محافظت کند. این مطالعه با هدف بررسی اثرات محافظتی روتین در برابر استرس اکسیداتیو و اختلال عملکرد میتوکندری ناشی از BPA و ارزیابی تغییرات بیان ژن‌های مرتبط با میتوفاژی در سلول‌های سرتولی TM4 انجام شد.

مواد و روش ها: این مطالعه تجربی – آزمایشگاهی، سلول‌های سرتولی TM4 در معرض BPA به‌تنهایی یا همراه با غلظت‌های مختلف روتین قرار گرفتند. زنده‌مانی سلولی با آزمون MTT و میزان پروتئین با روش برادفورد ارزیابی شد. پتانسیل غشای میتوکندری و سطوح گونه‌های فعال اکسیژن با اسپکتروفلوریمتر اندازه‌گیری شدند. بیان ژن‌های *PINK1*، *BNIP3* و *Parkin* با واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) زمان واقعی ارزیابی شد. همچنین، سطوح مالون‌دی‌آلدئید، گلوتاتیون و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز با روش‌های اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شدند.

یافته‌ها: روتین به‌طور معنی‌داری سطوح مالون‌دی‌آلدئید را در سلول‌های سرتولی در معرض BPA کاهش داد. همچنین، روتین فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز و پتانسیل غشای میتوکندری را در گروه‌های در معرض BPA به‌طور معنی‌داری افزایش داد. روتین سطوح گلوتاتیون و گلوتاتیون پراکسیداز را نیز افزایش داد که نشان دهنده تقویت دفاع آنتی‌اکسیدانی سلولی در برابر آسیب ناشی از BPA است. تغییرات بیان *PINK1*، *BNIP3* و *Parkin* نشان داد که روتین ممکن است پاسخ‌های مرتبط با میتوفاژی را تحت استرس ناشی از BPA تعدیل کند.

استنتاج: روتین ممکن است آسیب اکسیداتیو و میتوکندریایی ناشی از BPA را در سلول‌های سرتولی TM4 کاهش داده و دفاع آنتی‌اکسیدانی سلولی را تقویت کند. تغییرات بیان ژن‌های مرتبط با میتوفاژی، احتمال نقش مسیرهای مرتبط با میتوفاژی را در اثرات محافظتی روتین مطرح می‌کند. با این حال، برای تأیید این مکانیسم، اعتبارسنجی در سطح پروتئین و ارزیابی عملکردی شار میتوفاژی ضروری است.

واژه های کلیدی: روتین، BPA، میتوکندری، سرتولی، TM4

مولف مسئول: فاطمه رضایی تزنگی- فسا، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران **E-mail:** f.rezaei67@yahoo.com
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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-01]

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 قوطی‌های کنسرو، رزین‌های پلاستیکی و پلی‌کربنات‌ها و همچنین در بطری‌های 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 اندروژن‌ها در طی تکامل منجر به ناهنجاری دستگاه تناسلی مردانه می‌شود 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(۵-۳). BPA باعث ایجاد نقص عملکردی میتوکندری و همچنین القای استرس اکسیداتیو در میتوکندری‌های بافت‌ها و سلول‌های مختلف مانند کبد، طحال، شبکیه و لنفوسیت می شود(۹-۶). 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 می‌شود(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 به‌طور 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 سلول‌های سرتولی تحت تاثیر انواع سموم قرار می گیرند(۱۳). در بیضه، سد خونی بیضه ای (BTB: Blood-Testis Barier)، نقش تعیین کننده‌ای در طول فرایند اسپرماتوژنز دارد(۱۴). این سد عمدتاً توسط اتصالات محکم بین سلول های سرتولی تشکیل می‌شود(۱۵). قرار گرفتن موش های صحرایی نر در معرض BPA قبل از بلوغ، بر نفوذپذیری سد خونی بیضه ای تاثیر گذاشته و سطح پروتئین‌های اتصالی سد را کاهش می‌دهد(۱۶). همچنین BPA یکپارچگی سد خونی بیضه‌ای 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 میتوکندری های آسیب دیده سلول توسط لیزوزوم‌ها تجزیه می‌شوند. *PINK1*، *BNIP3* و *Parkin* از جمله ژن‌های مرتبط با میتوکندری هستند که در زمان میتوفاژی میزان بیان آن ها افزایش می یابد. PINK1 در غشای خارجی میتوکندری آسیب دیده تجمع می‌یابد و به دنبال آن میزان Parkin افزایش یافته و باعث افزایش فرایند میتوفاژی می‌شود. BNIP3 به تجمع PINK1 در غشای خارجی میتوکندری کمک می کند(۱۹).

با وجود مطالعات متعدد درباره سمیت BPA، اطلاعات موجود درباره اثرات هم‌زمان آن بر فرایندهای میتوفاژی و سیستم آنتی‌اکسیدانی در سلول‌های سرتولی هنوز محدود است. از سوی دیگر، نقش محافظتی روتین در برابر آسیب‌های القا شده توسط BPA در رده سلولی TM4 و به‌ویژه بر شاخص‌های میتوفاژی، به‌طور کامل روشن نشده است. بنابراین، نوآوری این مطالعه در بررسی هم‌زمان اثر روتین بر استرس اکسیداتیو، پتانسیل غشای میتوکندری و بیان ژن‌های مرتبط با میتوفاژی در سلول‌های سرتولی TM4 در مواجهه با BPA است.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-01]

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 سلول‌ها بر اساس مشخصات ارائه شده توسط تأمین کننده تأیید گردید. سلول‌ها در محیط Dulbecco's Modified (DMEM) Eagle Medium حاوی ۲/۵ درصد Fetal (FBS) Bovine Serum و ۱ درصد Penicillin-Streptomycin کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت اشباع و اتمسفر حاوی ۵ درصد CO_2 نگهداری شدند. محیط کشت هر ۴۸ ساعت تعویض شد(۱۳).

گروه‌های مطالعه به این شرح، گروه کنترل، سلول‌های کشت شده در محیط فاقد سرم به مدت ۴۸ ساعت، گروه BPA، سلول‌های مواجهه شده با BPA با غلظت ۰/۸ میکرومول بر لیتر به مدت ۴۸ ساعت، گروه روتین ۲۵، سلول‌های مواجهه شده با روتین ۲۵ میکرومولار، گروه روتین ۵۰، سلول‌های مواجهه شده با روتین ۵۰ میکرومولار، گروه روتین ۱۰۰، سلول‌های مواجهه شده با روتین ۱۰۰ میکرومولار و گروه‌های پیش مواجهه، سلول‌ها 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)

سلول‌های TM4 با تراکم ۳×۱۰^{۳} سلول در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند. پس از مواجهه، ۲۰ میکرولیتر محلول MTT (5 mg/mL) به هر چاهک اضافه شد و پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس محیط حذف و کریستال‌های فورمازان در DMSO (Dimethyl Sulfoxide) حل شدند. جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر اندازه‌گیری شد. نتایج به‌صورت درصد زیست‌پذیری 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 Coomassie Brilliant Blue G-، اسید فسفریک ٪ ۸۵ و اتانول ٪ ۹۵ می‌باشد، تهیه گردید. در این روش، رنگ Coomassie Brilliant Blue G- 250 به اسیدهای آمینه بازی و آروماتیک پروتئین متصل شده و موجب تغییر رنگ محلول از قهوه‌ای مایل به قرمز به آبی می‌شود. شدت رنگ ایجاد شده متناسب با غلظت پروتئین می باشد. جهت اندازه‌گیری جذب رنگ حاصل، ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میتوکندریایی با ۲/۵ میلی‌لیتر از معرف برادفورد مخلوط شد و پس از انکوباسیون مناسب، جذب محلول در طول موج ۵۹۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید(۷).

برای تعیین غلظت پروتئین نمونه، ابتدا منحنی کالیبراسیون با استفاده از غلظت‌های مشخص آلبومین سرم گاوی (BSA) در محدوده ۱۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. پس از افزودن معرف برادفورد به استانداردها و نمونه‌ها و انکوباسیون در دمای اتاق به مدت ۱۰ – ۵ دقیقه، جذب نوری در ۵۹۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری 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 نمونه‌ها نیز از رابطه زیر محاسبه شد.

$$C=A-b/m$$

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-01]

اندازه گیری پتانسیل غشای میتوکندری

میـزان انتشـار مجـدد پـروب فلورسـنت کـاتیونی رودامین ۱۲۳ به عنوان معیاری در انـدازه گیـری پتانسـیل غشای میتوکندری سلول های سرتولی مورد استفاده قـرار می گیرد. کاهش Mitochondrial Membrane Potential (MMP)، باعـث نشـت Rhodamine123 (Rh123) از میتوکندری و در نتیجه کـاهش شـدت فلوئورسـانس مـی شود. برای این کار، سلول هـای TM4 ابتـدا بـا دوزهـای متفاوت BPA و روتین تحت درمان قرار گرفتـه و سـپس بـا اسـتفاده از آنـزیم تریپسـین و سـانتریفیوژ جمـع آوری شدند. سپس سـلول هـای گـروه هـای مختلـف بـا تـراکم یکسان، با محلول Rh123 در دمای ۳۴ درجه سـانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شده و سپس با PBS (Phosphate-Buffered Saline) شستشو داده شدند.

سوسپانسـیون میتوکنـدری را سـانتریفوژ کـرده و سوپرناتات دور ریخته شد. سپس محلول رودامین ۱۲۳ به رسوب اضافه گردید. شدت فلورسانس در طول موج‌های Excitation و Emission بـه ترتیـب 488 nm و 530 nm توسط اسـپکتروفلوریمتر انـدازه‌گیری شـد. تفـاوت میـان شـدت فلورسـانس نمونـه و کنتـرل بیـانگر میـزان آسـیب میتوکندری می‌باشد(۷).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بی‌درنگ (Real time RT-PCR)

ابتدا RNA مربوط به سلول‌های TM4 بـا اسـتفاده از کیـت اسـتخراج RNA و مطـابق دسـتورالعمل شـرکت سازنده استخراج شد. در مرحله بعد، cDNA با استفاده از کیـت سـنتز cDNA از ۱ میکروگـرم RNA کـل تهیـه گردید. سپس بیان ژن‌هـای *PINK1*، *BNIP3* و *Parkin* بـه روش Real-Time PCR و بـا اسـتفاده از دسـتگاه ABI StepOne (Applied Biosystems, USA) مـورد ارزیابی قـرار گرفـت. ژن *GAPDH* بـه عنـوان ژن مرجـع (Housekeeping Gene) در نظـر گرفتـه شـد. تـوالی پرایمرهـای اختصاصـی مـورد اسـتفاده بـرای هـر ژن در جدول شماره ۱، ارائه شده است.

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه

ژن	توالی پرایمر(3'→5') Forward	توالی پرایمر(3'→5') Reverse
PINK1	CATGGCTTTGGATGGAG AGT	TGGGAGTTTGCTCTTCAA GG
Bnip3	CAGGGCTCCTGG GTAGAACT	CTACTCCGTCCAGACTCA TGC
Parkin	CCGGGAGGATTACCCA GGAGA	GGGTATGCTCCCCCAGG ATGT
GAPDH	GGATACTGAGAGCAAG AGAGA	TTATGGGGTCTGGGATGG AA

واکـنش Real-Time PCR در حجـم نهـایی ۲۰ میکرولیتـر شـامل ۱۰ میکرولیتـر (2X) SYBR Green Master Mix، 1 میکرولیتـر cDNA، 0/5 میکرولیتـر از هـر یک از پرایمرهـای Forward و Reverse (بـا غلظـت نهـایی ۱۰ پیکومول) و ۸ میکرولیتـر آب بـدون نوکلئـاز انجـام شـد. شرایط سیکل حرارتی شامل دناتوراسیون اولیـه در ۹۵ درجـه سـانتی گراد بـه مـدت ۱۰ دقیقـه، سـپس ۴۰ سـیکل شـامل دناتوراسـیون در ۹۵ درجـه سـانتی گراد بـه مـدت ۱۵ ثانیـه، اتصال پرایمرها در ۶۰ درجه سانتی گراد بـه مـدت ۳۰ ثانیـه و طویل سازی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مـدت ۳۰ ثانیـه بـود. در پایـان واکـنش، آنـالیز منحنـی ذوب (Melting Curve Analysis) در محـدوده دمـایی ۶۰ تـا ۹۵ درجـه سـانتی گراد جهت بررسی اختصاصیت محصولات PCR انجام شد(۱۵).

سطح بیان نسبی ژن‌ها با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسـبه شـد. مقـادیر Ct ژن‌هـای هـدف ابتـدا نسـبت بـه ژن مرجـع *GAPDH* نرمال‌سازی شده (ΔCt) و سپس نسـبت بـه گـروه کنترل کـالیبره گردیدنـد (ΔΔCt). نتـایج بـه صـورت Fold Change نسبت به گروه کنترل گزارش شدند.

اندازه گیری میزان تشکیل ROS

میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) با استفاده از پـروب فلورسـنت ۷٫٬۲–دی‌کلروفلورسـئین دی‌اسـتات (DCFH-DA) اندازه‌گیری شد. DCFH-DA یـک ترکیـب غیرفلورسنت و نفوذپذیر به غشـا اسـت کـه پـس از ورود بـه نمونـه، توسـط اسـترازهای داخـل سـلولی یـا میتوکنـدریایی هیـدرولیز شـده و بـه ۷٫٬۲–دی‌کلروفلورسـئین (DCFH) تبـدیل می‌شـود. DCFH نیـز در حضـور گونـه‌های فعـال اکسیژن اکسید شده و به ۷٫٬۲–دی‌کلروفلورسئین (DCF) بـا خاصیت فلورسـانس بـالا تبـدیل می‌گـردد. بنـابراین، شـدت

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-01]

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

به طور خلاصه، پس از سانتریفیوژ سوسپانسیون میتوکندری، محلول تازه تهیه شده DCFH-DA به رسوب حاصل اضافه شد. سپس سوسپانسیون به‌آرامی مخلوط شده و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد 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 اندازه‌گیری شد. نتایج به صورت واحد شدت فلورسانس (Fluorescence Intensity Unit; FIU) گزارش گردید(۷).

اندازه گیری میزان GSH (Glutathione) میتوکندریایی

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

اندازه گیری MDA (Malondialdehyd) و SOD (Superoxide dismutase) میتوکندریایی

به یک میلی لیتر محلول میتوکندریایی ۲۵۰ میکرولیتر اسید تری کلرواستیک ۷۰ درصد اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ شد. به مایع رویی ۱ میلی لیتر تیو باربیتوریک اسید ۰/۸ درصد به آن اضافه گردید و به‌مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری در حال جوش قرار داده شد، سپس در طول موج ۵۳۲ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر جذب آن قرائت گردید. جهت رسم منحنی استاندارد مالون آلدئید، غلظت های مختلفی از ۱/۱/۳/۳-تترا اتوکسی پروپان برحسب نانومولار ساخته شد(۴).

جداسازی و تخلیص میتوکندری سلول های بیضه

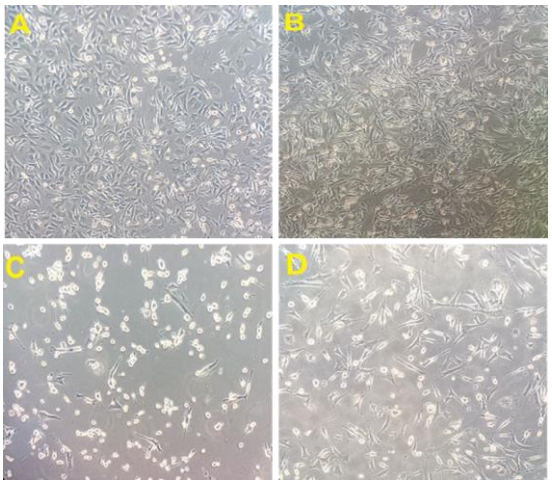
بافت بیضه را با سرم فیزیولوژی به سرعت شسته و بعد آن را وزن گردید و ده برابر وزن بیضه بافر تخلیص که شامل مانیتول، سوکروز، هپس و EGTA (Ethylene Glycol Tetraacetic Acid) بود اضافه شد. به ازای هر گرم وزن بیضه ۰/۰۲ گرم آلبومین سرم گاوی به بافر اضافه شد و به مدت دو دقیقه هموژن کردیم بافت هموژن شده را چندین بار توسط سرعت ها و زمان های مختلف در دمای چهار درجه سانتریفوژ گردید و در نهایت رسوب به دست آمده، سوسپانسیون میتوکندری سلول های بیضه بود(۷). داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSSتحلیل شدند. مقایسه بین گروه‌ها با آزمون One-way ANOVAو آزمون تعقیبی Tukey انجام شد. سطح معنی‌داری آماری کم‌تر 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 سلول‌ها مشابه گروه کنترل مشاهده شد. در گروه های تحت مواجهه با بیسفنول، شمار سلول‌های آپوپتوتیک و سلول‌های دارای ظاهر غیرطبیعی نسبت به گروه کنترل به طور قابل توجهی افزایش یافت. تجویز روتین به گروه مواجهه یافته با BPA باعث کاهش معنی‌دار سلول‌های آپوپتوتیک و بهبود ویژگی‌های مورفولوژیک سلول‌ها گردید (تصویر شماره ۱).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-01]



تصویر شماره ۱: مورفولوژی سلول‌های سرتولی TM4 در گروه‌های مختلف پس از مواجهه های آزمایشی، A: گروه کنترل، B: گروه مواجهه شده با روتین، C: گروه مواجهه شده با BPA، و D: گروه پیش‌مواجهه شده با روتین و سپس مواجهه با BPA، همان‌گونه 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، گردشدگی 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

سلول های سرتولی در دوره های 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 سلول ها با افزایش دوز روتین و طول مدت مواجهه با روتین افزایش یافت (جدول شماره ۲).

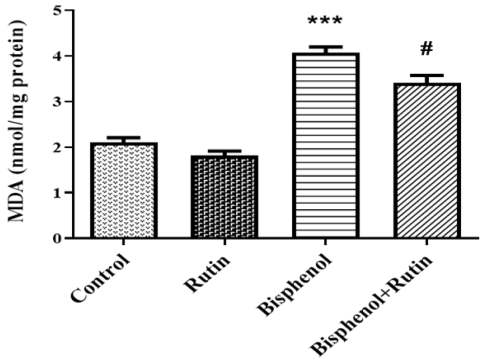
جدول شماره ۲: درصد زیست‌پذیری سلول‌های سرتولی TM4 پس از تیمار با غلظت‌های مختلف روتین (µg/mL) در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

Treatments	12 h	24 h	48 h	72 h
25 µg/mL	۰/۷۷±۰/۳۸	۰/۳۰±۰/۴۳	۰/۳۳±۰/۴۹	۰/۲۹±۰/۴۷
50 µg/mL	۶۴۰±۰/۴۶	۰/۶۷±۰/۳۹	*۰/۷۶±۰/۲۱	۰/۸۸±۰/۲۴
100 µg/mL	۰/۵۴±۱۹۰	*۰/۶۹±۰/۱۳	*۰/۷۱±۰/۱۵	*۰/۷۲±۰/۱۷
150 µg/mL	۰/۵۵±۰/۴۳	*۰/۶۱±۰/۰۶	*۰/۶۳±۰/۰۸	*۰/۶۱±۰/۰۵

داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار (n=4) گزارش شده‌اند. نماد * نشان دهنده اختلاف معنی‌دار آماری نسبت به زمان ۱۲ ساعت در همان ردیف (P <۰/۰۰۱) است.

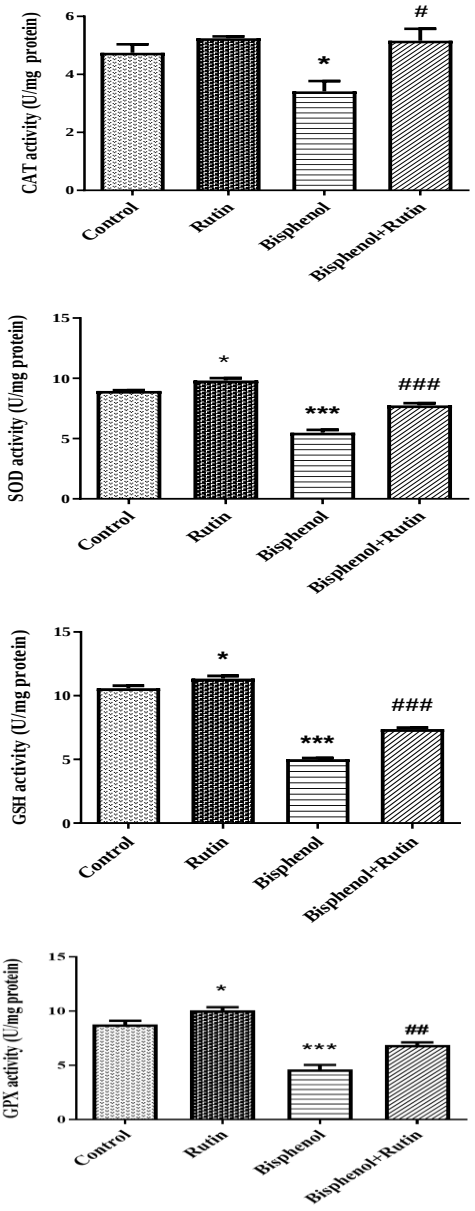
شاخص‌های استرس اکسیداتیو و سیستم آنتی‌اکسیدانی

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 <۰/۰۰۱). 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 ± انحراف معیار (Mean ± 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 و ***P<0.001 در مقایسه با گروه کنترل، #P<0.05، ##P<0.01 و ###P<0.001 در مقایسه با گروه BPA

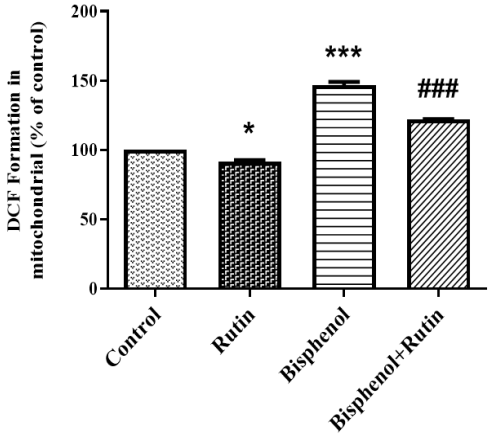
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-01]



تصویر شماره ۳: اثر روتین بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون احیا شده (GSH) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) در سلول‌های سرتولی TM4 پس از مواجهه با BPA، مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار (Mean ± SD، n = 4) گزارش شده‌اند. مواجهه با BPA موجب کاهش معنی‌دار فعالیت SOD، CAT و 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 و ***P<0.001 در مقایسه با گروه کنترل؛ #P<0.05، ##P<0.01 و ###P<0.001 در مقایسه با گروه BPA

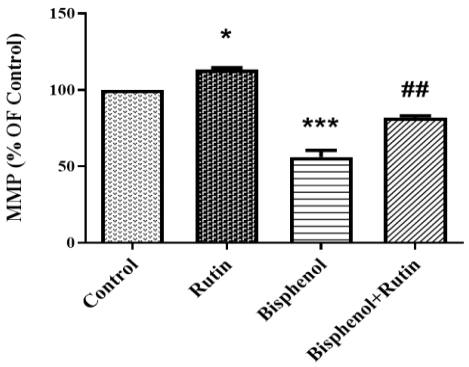
تولید گونه‌های فعال اکسیژن و عملکرد میتوکندری

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 <۰/۰۰۱). 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 <۰/۰۱). این یافته‌ها بیانگر نقش محافظتی روتین در حفظ عملکرد میتوکندری و کاهش آسیب اکسیداتیو هستند.



تصویر شماره ٤: اثر روتین بر تولید گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species; ROS) در سلول‌های سرتولی TM4 پس از مواجهه با بیسفنول A (BPA)، که با استفاده از شدت فلورسانس ۲′،۷′-دی‌کلروفلورسانس (DCF) اندازه‌گیری شد. مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار (Mean ± SD، n = 4) 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 و ***P<0.001 در مقایسه با گروه کنترل، #P<0.05، ##P<0.01 و ###P<0.001 در مقایسه با گروه BPA

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-01]



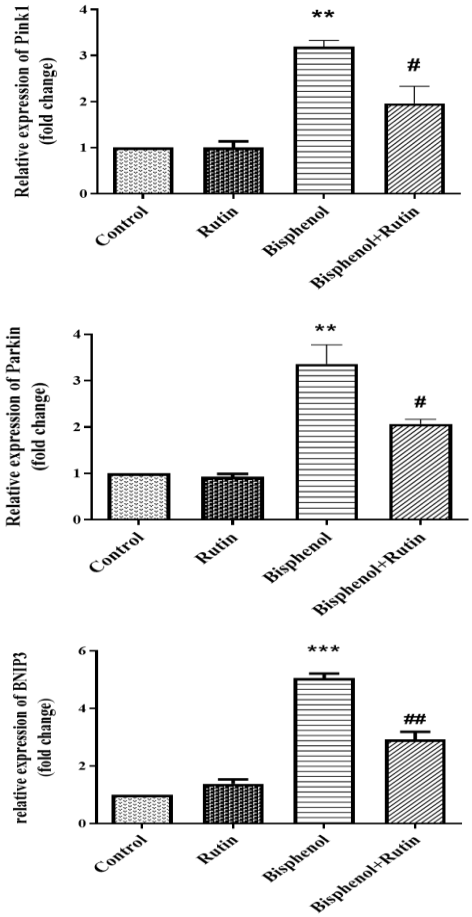
تصویر شماره ۵: اثر روتین بر پتانسیل غشای میتوکندری (Mitochondrial Membrane Potential; MMP) در سلول‌های سرتولی TM4 پس از مواجهه با بیسفنول A (BPA)، مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار (Mean ± SD، n = 4) گزارش شده‌اند. مواجهه با BPA موجب کاهش معنی‌دار MMP در مقایسه با گروه کنترل شد که نشان دهنده اختلال عملکرد میتوکندری است. پیش مواجهه با روتین کاهش MMP القا شده توسط BPA را به طور معنی‌داری بهبود بخشید و بیانگر اثر محافظتی روتین در حفظ عملکرد میتوکندری 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 و ***P<0.001 در مقایسه با گروه کنترل، #P<0.05، ##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 <۰/۰۱). مواجهه با روتین به تنهایی تغییر معنی‌داری در بیان این ژن‌ها ایجاد نکرد، اما پیش مواجهه با روتین افزایش بیان القا شده توسط BPA را به طور معنی‌داری کاهش داد (P <۰/۰۱)، 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 می‌کند و روتین عمدتاً از طریق اثرات آنتی‌اکسیدانی و حفظ عملکرد میتوکندری از این سلول‌ها محافظت می‌کند.



تصویر شماره ٦: اثر روتین بر بیان نسبی ژن‌های مرتبط با میتوفاژی شامل *PINK1*، *Parkin* و *BNIP3* در سلول‌های سرتولی TM4 پس از مواجهه با بیسفنول A (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 ± انحراف معیار (Mean ± SD، n = 4) 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. پیش مواجهه 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 و ***P<0.001 در مقایسه با گروه کنترل؛ #P<0.05، ##P<0.01 و ###P<0.001 در مقایسه با گروه BPA

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-01]

افزایش معنی‌دار 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 برهم‌خوردن 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 بیوانرژتیک 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).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-01]

در همین راستا، مواجهه با BPA با افزایش بیان ژن‌های مرتبط با میتوفاژی شامل *PINK1*، *Parkin* و *BNIP3* همراه بود که نشان دهنده فعال شدن سیگنال‌های مولکولی پاسخ دهنده به استرس میتوکندری 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 میتوکندری 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 میتوکندری نشان می‌دهد که روتین در شرایط استرس اکسیداتیو به حفظ یکپارچگی میتوکندری کمک می‌کند. کاهش بیان *PINK1*، *Parkin* و *BNIP3*در سلول‌های مواجه شده با روتین نیز حاکی از آن است که کاهش استرس اکسیداتیو و بهبود

وضعیت میتوکندری 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 میتوکندری جلوگیری نماید(۲۴، ۲۵).

در مجموع، ارزیابی هم‌زمان استرس اکسیداتیو، عملکرد میتوکندری 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 میتوکندری و فعال شدن مسیرهای کنترل کیفیت میتوکندری منجر می‌شود، در حالی که روتین با کاهش بار اکسیداتیو و پایدارسازی وضعیت میتوکندری 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 میتوکندری می‌شود. این مکانیسم‌ها احتمالاً در کنار حفظ پتانسیل غشای میتوکندری، موجب کاهش سیگنال‌های آغازگر میتوفاژی شده و کاهش بیان *PINK1*، *Parkin* 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 Ziv-Gal Ayelet و همکاران (۲۰۱۶) و Agnieszka Tomza-Marciniak و 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 میتوکندری و اندازه‌گیری مستقیم میتوفاژی ضروری است.

نتایج این مطالعه نشان داد که روتین می‌تواند آسیب اکسیداتیو القا شده توسط بیسفنول A را در سلول‌های سرتولیTM4 کاهش دهد. این اثر با کاهش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و سطح مالون‌دی‌آلدئید (MDA)، افزایش ظرفیت دفاع

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-01]

آنتی‌اکسیدانی سلول (شامل SOD، CAT، GSH و GPx)، حفظ پتانسیل غشای میتوکندری و تعدیل بیان ژن‌های مرتبط با میتوفاژی (*PINK1*، *Parkin* و *BNIP3*) همراه بود. این یافته‌ها نشان می‌دهند که روتین می‌تواند در شرایط آزمایشگاهی، اثرات محافظتی بر سلول‌های سرتولی در برابر آسیب ناشی از BPAداشته باشد.

با این حال، این مطالعه دارای محدودیت‌هایی است. نخست، تمامی آزمایش‌ها در شرایط in vitro و تنها بر روی رده سلولی TM4 انجام شده‌اند؛ بنابراین، تعمیم نتایج به بافت بیضه، فرآیند اسپرماتوژنز یا عملکرد باروری در موجود زنده امکان‌پذیر نیست. دوم، ارزیابی مسیرهای مرتبط با میتوفاژی تنها بر اساس تغییرات بیان ژن انجام شده و بررسی بیان پروتئین‌ها یا آزمون‌های عملکردی میتوفاژی انجام نشده است. همچنین، سایر شاخص‌های عملکرد میتوکندری مانند تولید ATP یا میزان تنفس میتوکندری نیز در این مطالعه بررسی نشدند.

بنابراین، انجام مطالعات آینده با استفاده از مدل‌های حیوانی، ارزیابی بیان پروتئین‌های مرتبط با میتوفاژی، سنجش mitophagic flux و بررسی شاخص‌های عملکردی میتوکندری برای تأیید مکانیسم‌های مولکولی و ارزیابی قابلیت تعمیم این یافته‌ها به شرایط in vivo ضروری است.

در تفسیر نتایج این مطالعه باید چند محدودیت مهم را مدنظر قرار داد. نخست آن‌که آزمایش‌ها صرفاً در شرایط in vitro و بر روی رده سلولیTM4 انجام شده‌اند؛ بنابراین تعمیم پذیری یافته‌ها به سایر رده‌های سلولی سرتولی، بافت بیضه در شرایط in vivo یا گونه‌های مختلف، نیازمند احتیاط و مطالعات تکمیلی است. دوم، ارزیابی‌ها تنها در سطح بیان ژن و mRNA انجام شده و هیچ‌گونه بررسی پروتئینی (نظیر وسترن بلات یا ایمونوفلورسانس) صورت نگرفته است؛ در نتیجه، نمی‌توان با قطعیت درباره تغییرات در سطح پروتئین‌ها 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 ژن‌های 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 شاخص‌های کلیدی عملکرد میتوکندری، از جمله سطح ATP، نرخ مصرف اکسیژن و پارامترهای تنفس میتوکندری، اندازه‌گیری نشده‌اند؛ بنابراین، تفسیر بهبود یا اختلال عملکرد میتوکندری بیش‌تر بر اساس تغییرات پتانسیل غشاء و نشانگرهای اکسیداتیو و نه یک ارزیابی جامع بیوانرژتیک، است. این محدودیت‌ها لزوم انجام مطالعات آینده با طراحی گسترده‌تر و استفاده از سنجش‌های پروتئینی و عملکردی را برجسته می‌سازد.

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, etal. Modulatory role of selenium and

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-01]

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, etal. 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, etal. 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, etal. 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 Rese 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, etal. 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, etal. 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,

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-01]

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, etal. 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, etal. 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, etal. 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, etal. Mitophagy and spermatogenesis: role and mechanisms. Biochem Biophys Rep 2024;38:101698 PMID: 38577271.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-11-01]