

The Hepatoprotective Effect of Alpha-Lipoic Acid against Bisphenol A-Induced Liver Injury in Mice: Modulation of the Nrf2 Pathway and Oxidative Stress

Mohammad Joudaki¹

Mohammad Hossein Mozafari¹

Maryam Baazm²

Yousef Asadi-Fard³

Layasadat Khorsandi⁴

¹ MSc Student in Anatomical Sciences, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

² Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

³ Assistant Professor, Department of Anatomy, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

⁴ Professor, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

(Received May 16, 2026; Accepted June 30, 2026)

Abstract

Background and purpose: Bisphenol A (BPA), an endocrine-disrupting compound, causes hepatotoxicity through oxidative stress and inflammation. Alpha-lipoic acid (α -LA) is a potent antioxidant shown to protect against liver injury induced by various toxic agents. This study aimed to evaluate the protective effect of α -LA against BPA-induced liver damage in mice.

Materials and methods: In this experimental study, 28 NMRI mice were randomly assigned to four groups: control, α -LA (100 mg/kg), BPA (300 mg/kg), and BPA + α -LA co-treatment. After 35 days, blood and liver tissue samples were collected. Serum activities of AST and ALT, oxidative stress markers (MDA, SOD, and CAT), and the expression of the Nrf2 and NF- κ B genes were evaluated using RT-PCR. Histopathological changes were evaluated by H&E staining. Data were analyzed using SPSS software by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test.

Results: BPA administration significantly increased liver enzyme activities, MDA levels, and NF- κ B expression, while decreasing antioxidant enzyme activities and Nrf2 expression. In addition, marked histopathological alterations, including inflammatory cell infiltration and vascular congestion, were observed. Co-treatment with α -LA significantly attenuated these disturbances by reducing hepatic injury markers, improving oxidative stress parameters, upregulating Nrf2 expression, and downregulating NF- κ B expression.

Conclusion: The findings indicate that α -LA exerts a significant protective effect against BPA-induced hepatotoxicity, possibly by enhancing the antioxidant defence system through activation of the Nrf2 pathway, inhibiting lipid peroxidation, and suppressing the inflammatory response via downregulation of the NF- κ B pathway. These findings support the potential of α -LA as a promising therapeutic strategy for preventing chemically induced liver injury. Therefore, α -LA may represent a potential therapeutic agent for protecting against liver injury induced by endocrine-disrupting chemicals.

Keywords: Bisphenol A, Alpha-lipoic acid, hepatotoxicity, inflammation, oxidative stress

J Mazandaran Univ Med Sci 2026; 36 (258): 3-13 (Persian).

Corresponding Author: Yousef Asadi-Fard - Department of Anatomy, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran (E-mail: usef.fard@yahoo.com)

بررسی اثر محافظتی آلفا لیپوئیک اسید بر آسیب کبدی ناشی از بیسفنل-آ از طریق تعدیل مسیر Nrf2 و شاخص‌های استرس اکسیداتیو در مدل موش کوچک آزمایشگاهی

محمد جودکی^۱
محمد حسین مظفری^۱
مریم باعزم^۲
یوسف اسدی فرد^۳
لعیاسادات خرسندی^۴

چکیده

سابقه و هدف: بیسفنل آ (BPA) به عنوان یک ترکیب مختل کننده غدد درون‌ریز، از طریق القای استرس اکسیداتیو و التهاب باعث سمیت کبدی می‌شود. آلفا لیپوئیک اسید (α -LA) ترکیبی با خاصیت آنتی اکسیدانی است که می‌تواند از آسیب کبدی ناشی از عوامل آسیب زا جلوگیری کند. این مطالعه با هدف بررسی نقش محافظتی α -LA در برابر آسیب کبدی ناشی از BPA در موش کوچک آزمایشگاهی، انجام پذیرفت

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ۲۸ سر موش نژاد NMRI به صورت تصادفی به چهار گروه کنترل، دریافت کننده α -LA (۱۰۰ mg/kg)، دریافت کننده BPA (۳۰۰ mg/kg) و درمان ترکیبی (BPA+ α -LA) تقسیم شدند. پس از ۳۵ روز، نمونه‌های خون و بافت کبد جمع‌آوری شد. سطوح سرمی AST و ALT، شاخص‌های استرس اکسیداتیو MDA، SOD و CAT و بیان ژن‌های Nrf2 و NF- κ B با روش RT-PCR (واکنش زنجیره‌ای پلیمرز معکوس) اندازه‌گیری شد. آسیب بافتی با رنگ آمیزی H&E ارزیابی شد. داده‌ها با نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های ANOVA یک‌طرفه و Tukey's تحلیل شدند.

یافته‌ها: تجویز BPA به طور معنی‌داری باعث افزایش آنزیم‌های کبدی، سطح MDA و بیان NF- κ B، و نیز کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و بیان Nrf2 گردید. هم‌زمان، آسیب هیستوپاتولوژیک واضحی شامل نفوذ التهابی و احتقان عروقی مشاهده شد. درمان با α -LA به طور قابل توجهی این اختلالات را معکوس کرد و موجب کاهش نشانگرهای آسیب کبدی، بهبود شاخص‌های استرس اکسیداتیو، افزایش بیان Nrf2 و کاهش بیان NF- κ B شد.

استنتاج: α -LA از طریق تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی (احتمالاً با فعال‌سازی مسیر Nrf2)، مهار پراکسیداسیون لیپیدی و تعدیل پاسخ التهابی (با مهار مسیر NF- κ B)، اثر محافظتی قابل توجهی در برابر سمیت کبدی ناشی از BPA دارد. یافته‌ها از کاربرد α -LA به عنوان یک راهبرد درمانی امیدوار کننده برای پیشگیری از مواد شیمیایی حمایت می‌کنند. این ترکیب می‌تواند به عنوان یک عامل درمانی بالقوه در برابر آسیب‌های ناشی از مواد مختل کننده غدد درون‌ریز مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: بیسفنل آ، آلفا لیپوئیک اسید، آسیب کبدی، التهاب، استرس اکسیداتیو

مؤلف مسئول- یوسف اسدی فرد- اراک، بلوار کر بلا، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی
E-mail: usef.fard@yahoo.com

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد علوم تشریحی، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

۲. استاد، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۳. استادیار، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

۴. استاد، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۲/۲۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۵/۳/۳ تاریخ تصویب: ۱۴۰۵/۴/۹

مقدمه

کبد به عنوان بزرگ‌ترین غده و مرکز اصلی متابولیسم بدن، وظایف حیاتی متعددی از جمله سم‌زدایی، سنتز پروتئین‌های پلاسما، ذخیره‌سازی و تولید صفرا را بر عهده دارد (۱). با این حال، موقعیت استراتژیک و در معرض بودن مداوم این اندام به سموم محیطی، آن را به یکی از اصلی‌ترین هدف‌های آسیب‌های شیمیایی تبدیل کرده است (۲). در میان عوامل آسیب‌زای محیطی، ترکیبات مختل‌کننده غدد درون‌ریز به دلیل استفاده گسترده در صنایع پلاستیک و نفوذ به زنجیره غذایی، نگرانی‌های فزاینده‌ای را ایجاد کرده‌اند (۳). بیسفنول-A (BPA) به عنوان یک زنو-استروژن پرکاربرد، نمونه‌ای شاخص از این ترکیبات است که مطالعات متعددی حیوانی سمیت کبدی آن را در دوزهای حتی پایین (۱۰ تا ۵۰ میلی گرم به ازای وزن بدن) تأیید کرده‌اند (۴).

مکانیسم اصلی سمیت کبدی BPA به ایجاد اختلال در تعادل redox و القای استرس اکسیداتیو نسبت داده می‌شود. این ترکیب با تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کلیدی مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT)، دفاع آنتی‌اکسیدانی ذاتی کبد را تضعیف می‌کند (۵). شواهد نوین نشان می‌دهد که BPA با مختل کردن مسیر سیگنالینگ محوری Nrf2/Keap1، که تنظیم‌کننده اصلی بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و فاز دوم سم‌زدایی است، کبد را در برابر آسیب اکسیداتیو آسیب پذیرتر می‌سازد (۶). در این شرایط، استفاده از عوامل درمانی با قابلیت فعال سازی این مسیر و تقویت سیستم دفاعی درون‌زا، می‌تواند راهبردی امیدوارکننده باشد.

آلفا لیپوئیک اسید (α -LA)، یک اسید چرب ارگانوسولفور با زنجیره متوسط است که به‌طور طبیعی در موجودات زنده از جمله انسان تولید می‌شود و به عنوان یک کوفاکتور مهم برای کلاس‌های مختلف آنزیم است و در بافت‌های مختلف یافت می‌شود. همچنین به‌طور گسترده توسط گونه‌های سبزیجات تولید می‌شود. α -LA

یک آنتی‌اکسیدان زیستی قدرتمند، نه تنها به‌طور مستقیم رادیکال‌های آزاد را خنثی می‌کند، بلکه با القای فاکتور رونویسی Nrf2، بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را افزایش داده و به بازسازی سایر آنتی‌اکسیدان‌های حیاتی مانند ویتامین‌های C و E می‌پردازد (۷). همچنین این ترکیب با مهار فاکتور هسته‌ای کاپا-بی (NF- κ B)، می‌تواند پاسخ‌های التهابی ثانویه ناشی از استرس اکسیداتیو را تعدیل نماید (۸). با این وجود، اثرات محافظتی α -LA بر آسیب کبدی ناشی از BPA با تمرکز بر بازیابی مسیر Nrf2 شاخص‌های استرس اکسیداتیو به‌طور کامل شناخته نشده است. Nrf2 برای محافظت از بافت‌ها در برابر استرس اکسیداتیو بالا و آسیب سمی حیاتی است (۷). تحت شرایط عادی، فعالیت Nrf2 به شدت توسط Keap1 در سیتوپلاسم تنظیم می‌شود (۸). پس از قرارگیری در معرض محرک‌های خاص، Keap1 از Nrf2 جدا شده و اجازه می‌دهد تا Nrf2 به هسته منتقل شده و ژن‌های هدف را فعال کند (۹). این انتقال منجر به فعال‌سازی آنزیم‌ها و پروتئین‌های سم‌زدایی مانند Hmox-1، Nqo1، گلو‌تاتیون ترانسفراز (GST) و گلو‌تاتیون (GSH) می‌شود (۱۰). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که فعال‌سازی مسیر Nrf2 می‌تواند بیماری‌های مختلف کبدی از جمله بیماری کبد چرب مرتبط با اختلال عملکرد متابولیک، التهاب و کبد چرب غیر الکلی، التهاب و کبد چرب الکلی و فیروز کبدی را کاهش دهد (۱۱). بنابراین، هدف از مطالعه حاضر، بررسی اثر محافظتی α -LA در کاهش آسیب هیستوپاتولوژیک و بیوشیمیایی کبد ناشی از BPA در موش صحرایی و واکاوی مکانیسم‌های مولکولی آن با محوریت مسیر Nrf2 و مارکرهای استرس اکسیداتیو می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد شیمیایی

بیسفنل A با خلوص ۹۷ درصد و آلفا لیپوئیک اسید α -LA با خلوص ۹۹ درصد از شرکت Sigma-Aldrich تهیه شدند. اتانول مطلق مورد استفاده برای تهیه محلول‌های

آزمایشی از شرکت (Darmstadt, Germany) Merck خریداری شد. فرمالین از شرکت Merck (آلمان) تهیه گردید. کیت‌های سنجش آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) از شرکت Biorex Diagnostics (United Kingdom) تهیه شدند. همچنین، کیت‌های سنجش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) از شرکت ZellBio GmbH (Ulm, Germany) خریداری شدند. کیت استخراج (RNeasy Mini Kit) rRNA، کیت سنتز cDNA و مستر میکس SYBR Green مورد استفاده در آزمایش Real-time PCR (واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بی‌درنگ) از شرکت (Germany) Qiagen تهیه گردید. سایر مواد شیمیایی و معرف‌های آزمایشگاهی مورد استفاده در این پژوهش از شرکت‌های معتبر تجاری تهیه شدند. در مطالعه حاضر، تعداد ۲۸ سر موش بالغ نژاد NMRI با محدوده سنی ۶ تا ۸ هفته و وزن ۲۵-۳۰ گرم از مرکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز تأمین شدند. حیوانات در طول دوره تحقیق تحت شرایط استاندارد (دما: 22 ± 5 درجه سانتی‌گراد، رطوبت: 50 ± 5 درصد، و چرخه نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) نگهداری شدند. این پژوهش در سال ۱۴۰۴ در دانشگاه علوم پزشکی اراک انجام شد و پروتکل آن مطابق با دستورالعمل‌های اخلاقی پژوهش روی حیوانات دانشگاه علوم پزشکی اراک (کد اخلاق: IR.ARAKMU.AEC.1403.023) بود.

موش‌های مطالعه به‌طور تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند که هر گروه شامل هفت حیوان بود. گروه کنترل، آب آشامیدنی حاوی اتانول ۱ درصد به مدت ۳۵ روز، گروه BPA، ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر (همراه با آب آشامیدنی) به مدت ۳۵ روز، گروه α -LA، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر در آب آشامیدنی به مدت ۳۵ روز و گروه α -LA + BPA، دریافت BPA و α -LA به طور همزمان به مدت ۳۵ روز، دریافت کردند (۱۲، ۱۳).

محلول‌های BPA و α -LA در اتانول ۱ درصد تهیه شد. ۲۴ ساعت پس از آخرین تزریق، موش‌ها با تزریق داخل صفاقی کتامین (۵۰ mg/kg) و زایلازین (۵ mg/kg) بیهوش شده و تحت جراحی قرار گرفتند. سپس بافت کبد برداشته شد؛ بخشی از آن بلافاصله در فرمالین ۱۰ درصد فیکس گردید و بخش دیگر برای ارزیابی شاخص‌های استرس اکسیداتیو و تست PCR در دمای ۲۰- و ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. هم‌زمان، نمونه خون از قلب جمع‌آوری و پس از سانتریفیوژ، سرم جداسازی شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید.

ارزیابی هیستوپاتولوژیکی

برای بررسی‌های بافت‌شناسی و ارزیابی آثار BPA و α -LA بر کبد، نمونه‌های بافتی به مدت ۲۴ ساعت در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت گردیدند. سپس با طی مراحل استاندارد پردازش و قالب‌گیری در پارافین، مقاطعی به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه و با هماتوکسیلین - ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شدند تا تغییرات آسیب‌شناختی کبد مورد بررسی قرار گیرد. مشاهده و تصویربرداری از مقاطع با استفاده از میکروسکوپ نوری Olympus BX43 (ژاپن) مجهز به دوربین DP26 و در بزرگنمایی $100 \times$ انجام شد (۱۴).

تعیین سطوح ALT و AST سرم

در پایان دوره ۳۵ روزه، نمونه‌های خون از کلیه گروه‌های آزمایشی شامل گروه کنترل و گروه‌های تحت درمان جمع‌آوری گردید. پس از سانتریفیوژ در شرایط استاندارد، سرم جداسازی شده و بلافاصله در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا از هر گونه تغییر در فعالیت آنزیم‌ها جلوگیری شود. جهت ارزیابی عملکرد و یکپارچگی کبدی، سطوح سرمی دو آنزیم کلیدی آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) به عنوان نشانگرهای روتین و حساس آسیب کبدی اندازه‌گیری شد. این سنجش با

به کارگیری کیت‌های تجاری اختصاصی شرکت Biorex و بر اساس پروتکل رنگ‌سنجی توصیه شده توسط تولید کننده انجام شد.

ارزیابی پراکسید/سیون لیپیدی

در این ارزیابی MDA، عنوان یک شاخص کلیدی استرس اکسیداتیو و محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی مورد سنجش قرار گرفت. برای اندازه‌گیری سطح MDA در بافت کبد، ابتدا نمونه‌ها هموژنه شدند. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت حاصل با اسید تری کلرواستیک ۱۰ درصد مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور ۷۰۰g × سانتریفیوژ شد. پس از جداسازی فاز شفاف، ۲ میلی لیتر اسید تری کلرواستیک به آن اضافه گردید. در مرحله بعد، N- بوتانول به هر لوله افزوده شد و نمونه‌ها مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۷۵۰g × سانتریفیوژ شدند. در نهایت، جذب نوری فاز رویی در طول موج ۵۳۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر قرائت شد. غلظت MDA بر اساس منحنی استاندارد و با واحد نانومول بر میلی گرم پروتئین محاسبه شد.

سنجش سطوح آنتی اکسیدان های SOD و CAT

سنجش آنزیم‌های آنتی اکسیدانی SOD و CAT با استفاده از کیت‌های اختصاصی شرکت Zellbio و مطابق با دستورالعمل کیت انجام پذیرفت. برای ارزیابی بیومارکرهای استرس اکسیداتیو، ابتدا نمونه‌های بافت کبد هموژنیزه شد. سپس به مقدار معینی از هموژنیت، اسید تری کلرواستیک (TCA) ۲۰ درصد افزوده و پس از مخلوط سازی کامل (ورتکس)، نمونه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با استفاده از دستگاه اولتراسانتریفیوژ و در دور ۱۶۰۰g × سانتریفیوژ شد. فاز شفاف رویی (سوپرناتانت) با دقت جدا گردید. در ادامه، به این فاز، محلول دی سدیم هیدروژن فسفات و معرف DTNB اضافه و مخلوط حاصل به مدت ۱۵

دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد تا واکنش به طور کامل انجام گیرد. در نهایت، جذب نوری محصول تشکیل شده در طول موج ۴۱۲ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و ثبت شد.

روش واکنش زنجیره ای پلیمرز بی درنگ (Real time PCR)

استخراج RNA از بافت‌های کبدی با استفاده از کیت Rneasy شرکت Qiagen آلمان انجام شد. RNA خالص سازی شده به عنوان الگو برای سنتز cDNA در فرآیند رونویسی معکوس مورد استفاده قرار گرفت که مطابق با پروتکل سازنده (Qiagen) انجام پذیرفت. برای انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز کمی (qPCR)، مخلوط واکنش شامل الگوی cDNA، آب DEPC، پرایمرهای اختصاصی Forward و Reverse و Master Mix مبتنی بر SYBR Green شرکت Qiagen بود. RT-PCR با استفاده از ۴۵ چرخه، ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۵۰ ثانیه، ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی گراد برای ۳۵ ثانیه، انجام شد. بیان نسبی ژن‌ها با استفاده از GAPDH نرمالیزه شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار REST تحلیل شدند. پرایمرهای مورد استفاده برای PCR، (F): Nrf2 CAGCATAGAGCAGGACATGGAG; (R): GAACAGCGGTAGTATCAGCCAG NF-kB (F): طول پرایمر: ۱۰۷ bp (R): GCTGCCAAAGAAGGACACGACA NF-kB (R): GGCAGGCTATTGCTCATCACAG GAPDH (F): پرایمر: ۱۳۱ bp (R): CATCACTGCCACCCAGAAGACTG; (R): GAPDH (R): ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTTCAG طول پرایمر: ۱۵۳ bp بودند.

تمامی داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار حاصل از سه بار تکرار مستقل ارائه شده‌اند. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و به دنبال آن آزمون تکمیلی توکی (Tukey's post-hoc test) برای داده‌های پارامتریک انجام گرفت. برای داده‌های ناپارامتریک از

آزمون کروسکال-والیس (Kruskal-Wallis test) استفاده شد. سطح معنی داری در تمامی آزمون‌ها به صورت $P < 0.05$ ، $P < 0.01$ و $P < 0.001$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

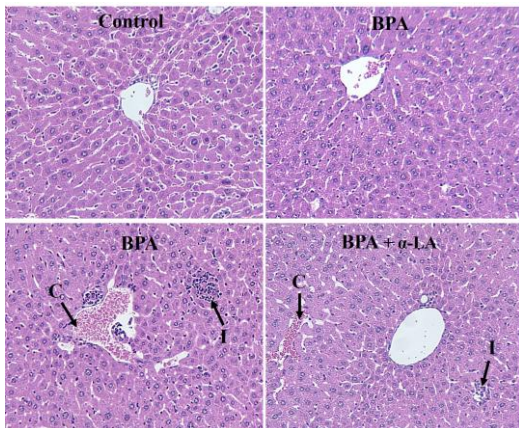
ارزیابی هیستوپاتولوژیکی

در بررسی‌های هیستوپاتولوژیک انجام شده، بافت کبد در گروه‌های کنترل و گروه تیمار شده با α -LA با دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم، ساختار طبیعی و فاقد هر گونه تغییرات آشکار آسیب شناختی نشان دادند. هپاتوسیت‌ها در این گروه‌ها دارای آرایش منظم، سیتوپلاسم شفاف و هسته‌های مرکزی واضح بودند و هیچ نشانه‌ای از نکروز، دژنراسیون یا نفوذ التهابی قابل توجه مشاهده نشد. در مقابل، تجویز BPA منجر به بروز آسیب‌های بارز باقی گردید که به صورت افزایش نفوذ سلول‌های التهابی در فضای پرپورتال و همچنین احتقان عروقی و تجمع گلبول‌های قرمز (RBCs) در سینوزوئیدهای کبدی تظاهر یافت. این تغییرات نشان دهنده ایجاد هپاتیت حاد و اختلال در جریان خون مویرگی کبد بود. نکته حائز اهمیت، اثر تعدیل کننده α -LA بر این آسیب‌ها بود. در گروهی که به طور هم‌زمان BPA و α -LA دریافت کرده بودند، کاهش قابل توجهی در شدت احتقان عروقی و همچنین کاهش محسوس نفوذ سلول‌های التهابی در مقایسه با گروه تحت درمان تنها با BPA مشاهده شد (تصویر شماره ۱).

یافته‌های آنزیم‌های کبدی

نتایج سنجش آنزیم‌های کبدی نشان داد که تجویز BPA به طور معنی داری باعث افزایش سطح سرمی AST و ALT در مقایسه با گروه کنترل شد ($P < 0.05$). این افزایش که نشان دهنده آسیب غشای سلول‌های کبدی و اختلال در عملکرد هپاتوسیت‌ها است، تأییدی بر اثرات سمی BPA بر بافت کبد بود. در گروه تحت درمان هم‌زمان با BPA و α -LA، سطوح این آنزیم‌ها به شکل قابل توجهی تعدیل یافت. به طور مشخص، α -LA

سبب کاهش معنی دار AST سرم در مقایسه با گروه دریافت کننده BPA به تنهایی شد ($P < 0.05$) به طور مشابه، α -LA به طور قابل توجهی سطح ALT سرم را نیز در این گروه در مقایسه با گروه BPA کاهش داد ($P < 0.05$). نزدیک شدن مقادیر AST و ALT در گروه درمان ترکیبی به سطوح طبیعی گروه کنترل، مؤید پتانسیل محافظتی α -LA در مقابله با سمیت کبدی القا شده توسط BPA است (نمودار شماره ۲).

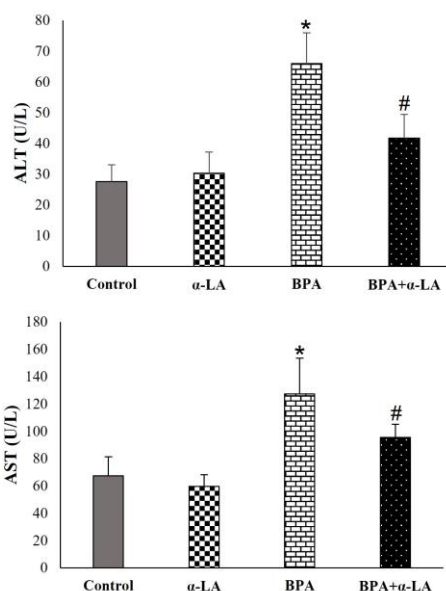


تصویر شماره ۱: تصاویر نمای میکروسکوپ نوری از مقاطع بافت کبد در گروه‌های مختلف آزمایشی. در گروه کنترل (Control)، ساختار طبیعی لبول کبدی، آرایش منظم هپاتوسیت‌ها و عدم حضور آسیب‌های آشکار هیستوپاتولوژیک مشاهده می‌شود. در مقابل، بافت کبد در گروه دریافت کننده BPA تغییرات آسیب شناختی واضحی از جمله نفوذ گسترده سلول‌های التهابی و احتقان عروقی را نشان می‌دهد. گروه تیمار شده با ترکیب BPA و α -LA در مقایسه با گروه BPA به تنهایی، بهبود چشمگیری را در زمینه کاهش نفوذ التهابی و احتقان عروقی نشان می‌دهد. تمامی مقاطع با روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین (H&E) تهیه و در بزرگنمایی ۴۰۰× مورد بررسی قرار گرفته‌اند.

یافته‌های مارکرهای استرس اکسیداتیو

بررسی شاخص‌های استرس اکسیداتیو در بافت کبد نشان داد که تجویز α -LA به تنهایی، تأثیر معنی داری بر سطح آنزیم‌های آنتی اکسیدانی SOD و CAT در مقایسه با گروه کنترل نداشت که این موضوع می‌تواند بیانگر عدم ایجاد اختلال در تعادل اکسیدانی توسط خود

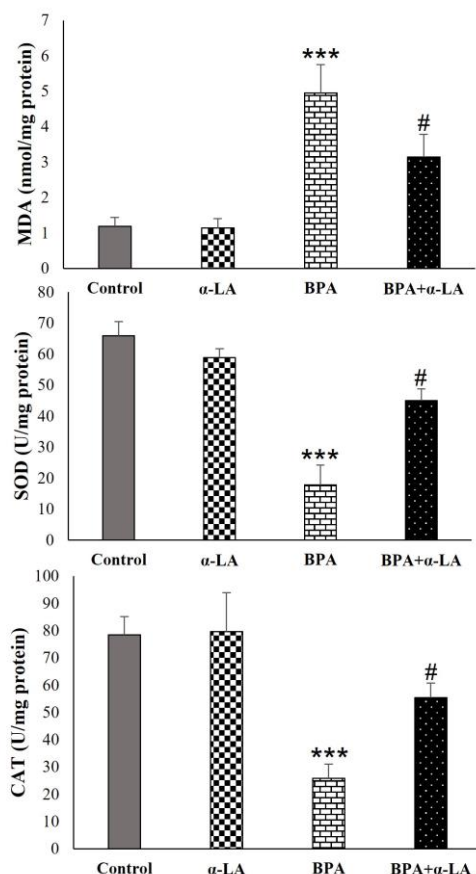
α -LA و در واقع تأیید کننده پروفایل ایمنی این ترکیب باشد. در مقابل، مواجهه با BPA به طور چشمگیری باعث کاهش سطح هر دو مارکر آنتی اکسیدانی مذکور در مقایسه با گروه کنترل گردید ($P < 0.05$).



نمودار شماره ۲: مقادیر سرمی آنزیم‌های ALT و AST در گروه‌های آزمایشی، داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ($n=4$) ارائه شده‌اند. * $P < 0.05$ ، # $P < 0.01$. نمادها مقایسه با گروه کنترل (*) و گروه SA (#) را نشان می‌دهند.

این کاهش نشان دهنده تضعیف سیستم دفاع آنزیمی در برابر رادیکال‌های آزاد و تشدید استرس اکسیداتیو در اثر تماس با BPA است. در گروه ترکیبی (α -LA + BPA)، سطوح آنزیم‌های آنتی اکسیدانی به طور قابل توجهی نسبت به گروه دریافت کننده BPA به تنهایی افزایش یافت ($P < 0.05$). این بهبود آشکار در ظرفیت آنتی اکسیدانی، حاکی از توانایی α -LA در خنثی کردن اثر سرکوب کننده BPA بر سیستم دفاعی سلول است. در مورد MDA به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی، هیچ تفاوت آماری معنی‌داری بین گروه دریافت کننده α -LA و گروه کنترل مشاهده نشد. با این حال، سطح MDA در گروه BPA افزایشی

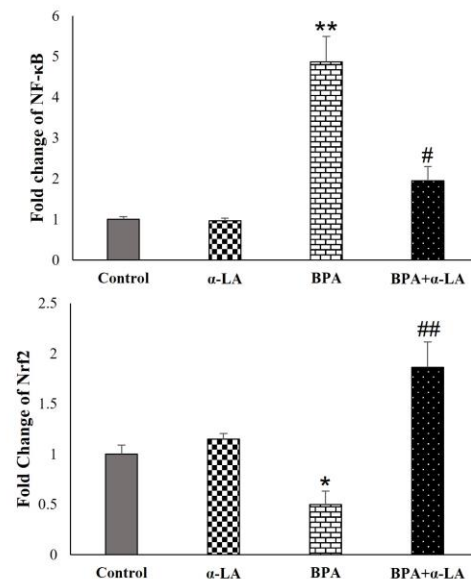
چشمگیر و بسیار معنی‌دار را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد ($P < 0.01$) که دلیلی قوی بر وقوع آسیب اکسیداتیو به لیپیدهای غشایی تحت تأثیر این ترکیب است. مهم‌تر آن که، در گروه ترکیبی (α -LA + BPA)، میزان MDA به شکل قابل توجهی نسبت به گروه BPA کاهش یافت ($P < 0.01$). این کاهش محسوس در غلظت MDA، به وضوح مؤثر بودن α -LA را در مهار واکنش‌های زنجیره‌ای پراکسیداسیون چربی و محافظت از یکپارچگی غشاهای سلولی در برابر آسیب ایجاد شده توسط BPA نشان می‌دهد. این یافته‌ها در نمودار شماره ۳، نشان داده شده‌اند.



نمودار شماره ۳: سطوح MDA و آنتی اکسیدان‌ها در گروه‌های مورد مطالعه، داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ($n=4$) نمایش داده شده‌اند. * $P < 0.05$ ، *** $P < 0.001$ ، # $P < 0.05$. نمادها مقایسه با گروه کنترل (*) و گروه SA (#) را نشان می‌دهند.

نتایج RT-PCR

بررسی‌های بیان ژن با روش RT-PCR نشان داد که تجویز α -LA به تنهایی تأثیر معنی‌داری بر سطح بیان ژن‌های $Nrf2$ و $NF-\kappa B$ در مقایسه با گروه کنترل نداشت. این یافته حاکی از آن است که α -LA در شرایط پایه، محرک قوی برای تغییر بیان این فاکتورهای رونویسی نیست. در مقابل، مواجهه با BPA تغییرات چشمگیری را ایجاد کرد. سطح بیان ژن $NF-\kappa B$ به عنوان میانجی کلیدی التهاب، به طور بسیار معنی‌داری در گروه دریافت کننده BPA در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت ($P < 0.001$). همزمان، بیان ژن $Nrf2$ که نقش محوری در فعال سازی پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی دارد، در این گروه به شکل قابل توجهی کاهش پیدا کرد ($P < 0.05$). در گروه ترکیبی (α -LA + BPA)، α -LA توانست این الگو را به نحو مؤثری معکوس کند. بیان ژن $NF-\kappa B$ به طور قابل توجهی نسبت به گروه BPA به تنهایی کاهش یافت ($P < 0.05$), در سوی دیگر، بیان ژن $Nrf2$ در این گروه در مقایسه با گروه BPA افزایش معنی‌داری پیدا کرد ($P < 0.001$) (نمودار شماره ۴).



نمودار شماره ۴: سطوح بیان ژن‌های $NF-\kappa B$ و $Nrf2$ در گروه‌های مطالعه، داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (n=4) نمایش داده شده‌اند. $P < 0.05$ *, $P < 0.01$ **, $P < 0.001$ ###, نمادها مقایسه با گروه کنترل (*) و گروه SA (#) را نشان می‌دهند.

بحث

این مطالعه به بررسی پتانسیل حفاظتی α -LA در برابر آسیب کبدی ناشی از BPA در مدل موش صحرایی پرداخت و مکانیسم‌های احتمالی آن را با تمرکز بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو، التهاب و مسیرهای سیگنالینگ مرتبط $Nrf2$ و $NF-\kappa B$ مورد بررسی قرار داد. یافته‌های مطالعه حاضر به طور همسو نشان می‌دهند که α -LA با تعدیل این مسیرهای کلیدی، آسیب‌های هیستوپاتولوژیک و بیوشیمیایی القا شده توسط BPA را به میزان قابل توجهی کاهش می‌دهد. مشاهدات هیستوپاتولوژیک به وضوح سمیت کبدی BPA را که با نفوذ شدید سلول‌های التهابی و احتقان عروقی همراه بود، تأیید کرد. این آسیب‌های بافتی با افزایش چشمگیر سطح سرمی آنزیم‌های ALT و AST، که نشانگر اختلال در یکپارچگی غشای هپاتوسیت‌ها هستند، همخوانی داشت. Abdulhameed و همکاران نیز نشان داده است که افزایش ALT و AST، همراه با استئاتوز، نکروز و نفوذ سلول‌های التهابی، از شایع‌ترین پیامدهای مواجهه با BPA در مدل‌های حیوانی است و این تغییرات عمدتاً ناشی از افزایش استرس اکسیداتیو و التهاب کبدی هستند (۴). اهمیت بالینی این یافته‌ها زمانی آشکار می‌شود که α -LA باعث بهبود قابل توجه ساختار بافتی و کاهش سطوح این آنزیم‌ها به نزدیکی مقادیر طبیعی شد. این اثر محافظتی با گزارش‌های قبلی که نشان می‌دادند α -LA از اندام‌های مختلف در برابر سمیت ناشی از مواد شیمیایی محافظت می‌کند، مطابقت دارد (۷، ۱۵). در سطح مکانیسمی، داده‌های مطالعه حاضر نشان داد که سمیت کبدی BPA عمیقاً با ایجاد استرس اکسیداتیو و پاسخ التهابی مرتبط است. تجویز BPA منجر به افزایش قابل توجه MDA، کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD و CAT و افزایش بیان ژن پیش‌التهابی $NF-\kappa B$ شد. این یافته‌ها با مطالعات پیشین همخوانی دارد که BPA را عامل ایجاد عدم تعادل اکسیدان - آنتی‌اکسیدان معرفی کرده‌اند؛

به گونه‌ای که افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن موجب پراکسیداسیون لیپیدی، کاهش ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی و فعال شدن مسیرهای التهابی وابسته به NF- κ B می‌شود (۴، ۱۶، ۱۷). فعال شدن NF- κ B یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مولکولی در ایجاد آسیب کبدی ناشی از BPA است و با افزایش بیان سایتوکاین‌های التهابی نظیر TNF- α ، IL-1 β و IL-6 همراه می‌شود (۴). اگر چه در مطالعه حاضر این سایتوکاین‌ها اندازه‌گیری نشدند، اما افزایش بیان NF- κ B مشاهده شده می‌تواند بیانگر فعال شدن همین محور التهابی باشد.

از سوی دیگر، کاهش معنی‌دار بیان ژن *Nrf2* در گروه دریافت‌کننده BPA مشاهده شد. *Nrf2* مهم‌ترین تنظیم‌کننده پاسخ آنتی‌اکسیدانی سلول محسوب می‌شود و از طریق القای ژن‌های پایین دستی نظیر *HO-1*، *NQO1* و *GCLC* از سلول‌های کبدی در برابر آسیب اکسیداتیو محافظت می‌کند (۱۱). Galicia-Moreno و همکاران نشان دادند که کاهش فعالیت *Nrf2* یکی از ویژگی‌های مشترک بسیاری از بیماری‌های کبدی از جمله آسیب‌های ناشی از سموم شیمیایی است و مهار این مسیر موجب افزایش حساسیت هپاتوسیت‌ها به استرس اکسیداتیو و مرگ سلولی می‌شود (۱۱). بنابراین، کاهش بیان *Nrf2* در مطالعه حاضر احتمالاً یکی از عوامل اصلی تشدید آسیب کبدی ناشی از BPA بوده است (۱۸، ۱۹).

نقطه قوت و تمایز مطالعه حاضر، اثبات نقش تعدیل‌کننده دوگانه α -LA بر این محورهای آسیب‌زا است. α -LA نه تنها به عنوان یک آنتی‌اکسیدان مستقیم عمل کرد (کاهش MDA و افزایش نسبی فعالیت SOD و CAT)، بلکه در سطح مولکولی نیز باعث باز تنظیم تعادل بین مسیرهای NF- κ B و *Nrf2* گردید. بهبود فعالیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی در گروه ترکیبی را می‌توان به توانایی شناخته شده α -LA در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد، کلیت کردن فلزات واسطه و احیای آنتی‌اکسیدان‌های درون‌زا نسبت داد (۷).

از دیدگاه مولکولی، افزایش بیان *Nrf2* همراه با کاهش بیان NF- κ B در گروه دریافت‌کننده α -LA نشان می‌دهد که اثر محافظتی این ترکیب تنها ناشی از خاصیت آنتی‌اکسیدانی مستقیم آن نیست، بلکه احتمالاً از طریق فعال‌سازی پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی وابسته به *Nrf2* و مهار مسیرهای التهابی وابسته به NF- κ B اعمال می‌شود. این موضوع با نتایج Galicia-Moreno و همکاران که *Nrf2* را به عنوان یک هدف درمانی بالقوه در بیماری‌های کبدی معرفی کرده‌اند، مطابقت دارد (۱۱). همچنین، مهار همزمان مسیر NF- κ B می‌تواند از گسترش پاسخ التهابی و آسیب ثانویه بافتی جلوگیری کند که این موضوع با یافته‌های مطالعات پیشین نیز همخوانی دارد (۲۰).

اگر چه این مطالعه مکانیسم‌های مولکولی محافظت کبدی توسط α -LA را تا حدی روشن می‌کند، اما دارای محدودیت‌هایی است. اولاً، بررسی‌ها بر روی یک گونه حیوانی و یک دوز خاص از BPA و α -LA انجام شد. تعمیم‌پذیری این نتایج به سایر گونه‌ها یا دوزهای مختلف نیازمند مطالعات آینده است. ثانیاً، اگر چه تغییرات در سطح رونوشت ژن‌های *Nrf2* و NF- κ B اندازه‌گیری شد، اما ارزیابی مستقیم پروتئین‌های این فاکتورها (به ویژه فرم هسته‌ای فعال آن‌ها) و ژن‌های پایین دست هدف آن‌ها (مانند *HO-1* برای *Nrf2* یا سایتوکین‌های التهابی برای NF- κ B) می‌تواند درک عمیق‌تری از مکانیسم ارائه دهد.

به طور خلاصه، یافته‌های این پژوهش نشان داد که تجویز α -LA موجب کاهش آسیب کبدی ناشی از BPA در مدل موش آزمایشگاهی شد. این اثر حفاظتی با بهبود تغییرات هیستوپاتولوژیک، کاهش سطوح سرمی ALT و AST، کاهش پراکسیداسیون لیپیدی، افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD و CAT و نیز تغییر در بیان ژن‌های *Nrf2* و NF- κ B همراه بود. این نتایج نشان می‌دهد که اثرات محافظتی α -LA احتمالاً با تعدیل استرس اکسیداتیو و پاسخ التهابی و در ارتباط با تغییرات مسیرهای *Nrf2* و NF- κ B همراه است. با این حال، برای اثبات نقش

سپاسگزاری

مطالعه‌ی حاضر بر اساس طرح تحقیقاتی مصوب معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اراک با شماره طرح ۴۶۰۹ انجام شده است. صمیمانه از همه افرادی که با این مطالعه همکاری نمودند تشکر می‌کنیم.

مستقیم این مسیرهای مولکولی، انجام مطالعات تکمیلی در سطح پروتئین و بررسی ژن‌ها و مولکول‌های پایین‌دستی ضروری است. بر این اساس، α -LA می‌تواند به عنوان یک ترکیب امیدوار کننده برای کاهش آسیب کبدی ناشی از مواجهه با BPA مطرح باشد، هر چند تأیید اثربخشی و مکانیسم عمل آن نیازمند مطالعات بیش‌تر در مدل‌های پیش بالینی و بالینی است.

References

- 1- Mitra V, Metcalf J. Metabolic functions of the liver. *Anaesth Intensive Care Med* 2012; 13(2): 54-55.
- 2- Zare H, Jamshidi S, Piryaee A, Dehghan MM, Sasani F, Molaei S, et al. Induction of acute hepatic failure by carbon tetrachloride in the nmri mouse model. *Qom Univ Med Sci J* 2015; 9(4): 74-84.
- 3- Taghikhani A, Ansarisamani R, Afrogh H, Shahinfard N, Ganji F, Asgari A, et al. The hepatotoxic and nephrotoxic effects of *Stachys lavandulifolia* Vahl in rat. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2012; 22(88): 84-90.
- 4- Abdulhameed AAR, Lim V, Bahari H, Khoo BY, Abdullah MNH, Tan JJ, et al. Adverse Effects of Bisphenol A on the Liver and Its Underlying Mechanisms: Evidence from In Vivo and In Vitro Studies. *Biomed Res Int* 2022; 2022: 8227314.
- 5- Khorsandi L, Heidari-Moghadam A, Younesi E, Javad Khodayar M, Asadi-Fard Y. Naringenin ameliorates cytotoxic effects of bisphenol A on mouse Sertoli cells by suppressing oxidative stress and modulating mitophagy: An experimental study. *Int J Reprod Biomed* 2024; 22(3): 219-228.
- 6- Ishibashi H, Watanabe N, Matsumura N, Hirano M, Nagao Y, Shiratsuchi H, et al. Toxicity to early life stages and an estrogenic effect of a bisphenol A metabolite, 4-methyl-2,4-bis(4-hydroxyphenyl)pent-1-ene on the medaka (*Oryzias latipes*). *Life Sci* 2005; 77(21): 2643-2655. PMID: 15978635.
- 7- Viana MDM, Lauria PSS, Lima AA, Opretzka LCF, Marcelino HR, Villarreal CF. Alpha-Lipoic Acid as an Antioxidant Strategy for Managing Neuropathic Pain. *Antioxidants (Basel)* 2022; 11(12): 2420-2439. PMID: 36552635.
- 8- Kudoh K, Uchinami H, Yoshioka M, Seki E, Yamamoto Y. Nrf2 activation protects the liver from ischemia/reperfusion injury in mice. *Ann Surg* 2014; 260(1): 118-127. PMID: 24646549.
- 9- Qiu M, Wei W, Zhang J, Wang H, Bai Y, Guo DA. A scientometric study to a critical review on promising anticancer and neuroprotective compounds: Citrus flavonoids. *Antioxidants (Basel)* 2023; 12(3): 669-692. PMID: 36978934.
- 10- Han X, Parker TL. Antiinflammatory activity of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) bark essential oil in a human

- skin disease model. *Phytother Res* 2017; 31(7): 1034-1038. PMID: 28493412.
- 11- Galicia-Moreno M, Lucano-Landeros S, Monroy-Ramirez HC, Silva-Gomez J, Gutierrez-Cuevas J, Santos A, Armendariz-Borunda J. Roles of Nrf2 in Liver Diseases: Molecular, Pharmacological, and Epigenetic Aspects. *Antioxidants (Basel)* 2020; 9(10): 980. PMID: 33050578.
 - 12- Li C, Shen N, Yang S, Wang HL. Effects of BPA Exposure and Recovery on the Expression of Genes Involved in the Hepatic Lipid Metabolism in Male Mice. *Toxics* 2023; 11(9): 775. PMID: 37755779.
 - 13- Stanković MN, Mladenović D, Ninković M, Ethuričić I, Sobajić S, Jorgačević B, et al. The effects of α -lipoic acid on liver oxidative stress and free fatty acid composition in methionine-choline deficient diet-induced NAFLD. *J Med Food* 2014; 17(2): 254-561. PMID: 24576052.
 - 14- Barai M, Ahsan N, Paul N, Hossain K, Rashid MA, Kato M, et al. Amelioration of arsenic-induced toxic effects in mice by dietary supplementation of *Syzygium cumini* leaf extract. *Nagoya J Med Sci* 2017; 79(2): 167. PMID: 28626323.
 - 15- Sena CM, Cipriano MA, Botelho MF, Seica RM. Lipoic Acid Prevents High-Fat Diet-Induced Hepatic Steatosis in Goto Kakizaki Rats by Reducing Oxidative Stress Through Nrf2 Activation. *Int J Mol Sci* 2018; 19(9): 2706. PMID: 30205570.
 - 16- Cimmino I, Fiory F, Perruolo G, Miele C, Beguinot F, Formisano P, et al. Potential Mechanisms of Bisphenol A (BPA) Contributing to Human Disease. *Int J Mol Sci* 2020; 21(16): 5761. PMID: 32824083
 - 17- Nawaz F, Ullah A, Ara C, Mehboob M, Idnan M. The Assessment of Histopathological Impacts of Bisphenol-A on the Liver in Mice Model. *Unknown Journal* 2021; 12(2): 90-97.
 - 18- He F, Ru X, Wen T. NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *Int J Mol Sci* 2020; 21(13): 4777. PMID: 32635539.
 - 19- Tang J, Wang K, Shen D, Li C. Oxidative Stress and Keap1-Nrf2 Pathway Involvement in Bisphenol A-Induced Liver Damage in Rats. *Toxics* 2024; 12(12): 864. PMID: 39671040.
 - 20- Ogborne RM, Rushworth SA, O'Connell MA. Alpha-lipoic acid-induced heme oxygenase-1 expression is mediated by nuclear factor erythroid 2-related factor 2 and p38 mitogen-activated protein kinase in human monocytic cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25(10): 2100-2105. PMID: 16037570