



Research Article

Evaluation the Effect of Crocin on Bisphenol A-Induced Memory Impairment in Rats: Role of ERK, CaMKII, and CREB Proteins in Hippocampus

Zeinab Bedrood¹ , Elaheh Masjedi² , Faezeh Vahdati Hassani³ , Mahboobeh Ghasemzadeh Rahbardar⁴ , Hossein Hosseinzadeh⁵ , Khalil Abnous⁶ , Soghra Mehri^{7*} 

¹MSc in Toxicology, Department of Pharmacodynamics and Toxicology, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

²MSc in Toxicology, Department of Pharmacodynamics and Toxicology, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

³Ph.D. in Toxicology, Department of Pharmacodynamics and Toxicology, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

⁴Ph.D. in Physiology, Department of Pharmacodynamics and Toxicology, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

⁵Professor, Department of Pharmacodynamics and Toxicology, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

⁶Professor, Pharmaceutical Research Center, Pharmaceutical Technology Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

⁷Associate Professor, Pharmaceutical Research Center, Pharmaceutical Technology Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

*Corresponding author: Soghra Mehri, Pharmaceutical Research Center, Pharmaceutical Technology Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. E-mail: mehris@mums.ac.ir

DOI: [10.32592/nkums.14.4.63](https://doi.org/10.32592/nkums.14.4.63)

How to Cite this Article:

Bedrood Z, Masjedi E, Vahdati Hassani F, Ghasemzadeh Rahbardar M, Hosseinzadeh H, Abnous Kh, Mehri S. Evaluation of the Effect of Crocin on Bisphenol A-Induced Memory Impairment in Rats: Role of ERK, CaMKII, and CREB Proteins in Hippocampus. J North Khorasan Univ Med Sci. 2022;14(4):63-74. DOI: [10.32592/nkums.14.4.63](https://doi.org/10.32592/nkums.14.4.63)

Received: 24 August 2022

Accepted: 17 December 2022

Keywords:

BPA
CREB
Crocin
ERK
Memory

Abstract

Introduction: Bisphenol A (BPA) is a toxic chemical that is used as a monomer in the production of plastic products. The BPA has an endocrine-disrupting effect and induces damage to the nervous system. Crocin, an active ingredient of *Crocus sativus L.* has neuroprotective effects. Therefore, this study aimed to evaluate crocin's effects on BPA-induced memory impairment in rats and the levels of Extracellular Signal-Regulated Kinases (ERK), Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase-II (CaMKII), and Cyclic AMP-Response Element-Binding Protein (CREB) proteins in the hippocampus.

Method: Bisphenol A (100 mg/kg, gavage) and crocin (10, 20, and 40 mg/kg, IP) were administered to adult male rats for 28 days. Memory and learning functions were evaluated by the Morris water maze, and the level of proteins was determined using the Western blot method.

Results: Administration of the BPA (100 mg/kg) significantly induced memory impairment and reduced the levels of ERK, p.ERK, CaMKII, and p.CREB proteins in the BPA group, compared to the control group. On the other hand, crocin (20 mg/kg) markedly improved learning and memory impairment and increased the levels of ERK, p.ERK, and CaMKII proteins in the hippocampus, compared to the BPA (100 mg/kg) group.

Conclusion: Administration of crocin (20 mg/kg) improves memory and learning defects induced by BPA (100 mg/kg). The enhancement of the p.ERK, ERK, and p. CaMKII protein levels in the hippocampus has an important role in crocin protective effects.



بررسی اثر کروسین بر اختلال حافظه ناشی از بیسفنول A در رت: ارزیابی نقش پروتئین‌های ERK، CaMKII و CREB در هیپوکامپ

زینب بدرود^۱، الهه مسجدی^۲، فائزه وحدتی حسنی^۳، محبوبه قاسم‌زاده رهباردار^۴، حسین حسین‌زاده^۵، خلیل آبنوس^۶، صغری مهری^{۷*}

^۱ کارشناس ارشد سم‌شناسی، گروه سم‌شناسی و داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
^۲ کارشناس ارشد سم‌شناسی، گروه سم‌شناسی و داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
^۳ دکترای سم‌شناسی، گروه سم‌شناسی و داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
^۴ دکترای فیزیولوژی، گروه سم‌شناسی و داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
^۵ استاد، گروه سم‌شناسی و داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
^۶ استاد، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
^۷ دانشیار، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
* نویسنده مسئول: صغری مهری، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران. ایمیل:

mehris@mums.ac.ir

DOI: 10.32592/nkums.14.4.63

چکیده	تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۲۶
مقدمه: بیسفنول A (BPA) مونومری است که در ساخت لایه رزینی محافظ در قوطی مواد غذایی و پلاستیک‌های پلی‌کربناته کاربرد دارد. BPA ماده تخریب‌کننده سیستم اندوکراین است و بر سیستم عصبی اثر می‌گذارد. کروسین از ترکیبات فعال و اصلی زعفران (<i>Crocus sativus</i> L.) است که اثرات متفاوتی بر سیستم عصبی از جمله اثرات ضد تشنج، ضد افسردگی، افزایش‌دهنده حافظه و محافظت عصبی دارد. هدف مطالعه حاضر بررسی اثر کروسین بر اختلال حافظه ناشی از BPA و ارزیابی سطح پروتئین‌های CaMKII (پروتئین کیناز وابسته به کالمدولین/کلسیم)، ERK (Extracellular signal-regulated kinases) و CREB (پروتئین متصل‌شونده به عامل واکنش‌دهنده به آدنوزین مونوفسفات حلقه‌ای) و انواع فسفریله آن‌ها در هیپوکامپ رت است.	واژگان کلیدی: بیسفنول A حافظه کروسین CREB ERK
روش کار: دز BPA، ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز (به صورت گاواژ) با دزهای مختلف کروسین (۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تزریق داخل صفاقی) به مدت ۲۸ روز به رت‌های بالغ تجویز شد. برای ارزیابی حافظه از آزمون ماز آبی موریس و برای بررسی سطح پروتئین‌ها از روش وسترن بلات استفاده شد.	
یافته‌ها: تجویز BPA باعث اختلال حافظه و یادگیری و کاهش سطح پروتئین‌های ERK، p.ERK، CaMKII و p.CREB در مقایسه با گروه کنترل شد. کروسین در دز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث بهبود عملکرد حافظه و افزایش سطح پروتئین‌های ERK، p.ERK و CaMKII در هیپوکامپ در مقایسه با گروه BPA ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم شد.	
نتیجه‌گیری: تجویز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کروسین، اختلال حافظه ناشی از BPA را بهبود می‌بخشد. افزایش سطح پروتئین‌های ERK، p.ERK و CaMKII در هیپوکامپ در اثرات محافظتی کروسین نقش مهمی دارد.	

مقدمه

شده است. نفوذ BPA از بطری‌های پلاستیکی پلی‌کربناتی به داخل آب با سرعت ۰/۲ تا ۰/۸ نانوگرم بر ساعت مشاهده شده است. با این حال، افزایش دمای آب باعث افزایش ۵۵ برابری میزان نفوذ BPA از ظروف می‌شود [۲]. مطالعات قبلی نشان داده‌اند قرار گرفتن در معرض BPA ممکن است باعث ایجاد سمیت ارگان‌های مختلف از جمله سمیت قلبی-عروقی، کبدی، کلیوی و بیضه شود [۳-۹]. با این حال، سمیت عصبی ناشی از BPA اهمیت ویژه‌ای دارد؛ زیرا BPA پس از مصرف، جذب

بیسفنول A (BPA) (۴/۴) - (پروپان-۲/۲-دییل) دی فنل) یک ترکیب سمی است که به‌عنوان مختل‌کننده غدد درون‌ریز زناستروژن مصنوعی طبقه‌بندی می‌شود و یک افزودنی در ساخت پلاستیک‌های پلی‌کربنات و رزین‌های اپوکسی است. همچنین، در تولید ظروف خانگی، بطری‌های آب، کاغذهای حرارتی، درزگیرهای دندان و پروتزها به‌عنوان ترکیبی از پوشش‌های داخلی ظروف نوشیدنی و غذا استفاده می‌شود [۱]. در BPA نمونه‌های ادرار انسان از جمعیت‌های کشورهای مختلف شناسایی

است. از این رو، در مطالعه حاضر اثر کروسین بر اختلال حافظه ناشی از BPA و تأثیر آن بر سطح پروتئین‌های p.ERK، CaMKII، CREB، p.CaMKII و p.CREB در هیپوکامپ بررسی شد. به منظور بررسی حافظه فضایی از آزمون ماز آبی موریس (Morris water maze) و برای سنجش سطح پروتئین‌ها از روش وسترن بلات استفاده شد.

روش کار

حیوانات آزمایشگاهی

رت‌های نر نژاد ویستار با وزن تقریبی 220 ± 30 گرم از بخش حیوانات دانشکده داروسازی مشهد تهیه و در شرایط دمایی ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. حیوانات از نظر مصرف آب و غذا هیچ‌گونه محدودیتی نداشتند. تمام آزمایشات حیوانی با توجه به قوانین کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام شد (۹۴۱۷۷۰).

مواد شیمیایی

در این مطالعه اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) و اتیلن گلیکول تترا استیک اسید (EGTA) از شرکت سیگما آمریکا تهیه شد. مهارکننده پروتئاز، فنیل متان سولفونیل فلوراید (PMSF)، سدیم ارتو وانادات، بتاگلیسیروفسفات، سدیم دزوکسی کولات، ۲-مرکاپتواتانول و توبین ۲۰ درصد از سیگما-آلد ریچ آلمان خریداری شد. تریس، سدیم دودسیل سولفات (SDS)، گلیسین، آکریل آمید، تترا اتیل اتیلن دی آمین (TEMED)، متانول، اتانول، شیرخشک بدون چربی و آلومین سرم گاوی (BSA) از شرکت مرک (کشور آلمان) تهیه شد. کاغذ پلی وینیلیدین فلوراید (PVDF) از شرکت Bio-Rad آمریکا خریداری شد. کلاله *C. sativus* L. از نوین زعفران خریداری و بر اساس ISO/TS 3632-2 ارزیابی شد. جداسازی و خالص‌سازی کروسین مطابق مطالعات قبلی انجام شد [۳۹].

گروه‌بندی حیوانات

رت‌های بالغ نر به ۶ گروه (در هر گروه ۶ رت) تقسیم شدند. گروه ۱: گروه کنترل، دریافت‌کننده حامل؛ گروه ۲: گروه دریافت‌کننده BPA دز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم از طریق گاواژ [۴۰-۴۲]؛ گروه ۳: گروه دریافت‌کننده کروسین دز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم از طریق داخل صفاقی [۴۳] + دریافت BPA دز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم از طریق گاواژ؛ گروه ۴: گروه دریافت‌کننده کروسین دز ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم از طریق داخل صفاقی [۴۳] + دریافت BPA دز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم از طریق گاواژ؛ گروه ۵: گروه دریافت‌کننده کروسین دز ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم از طریق داخل صفاقی [۴۳] + دریافت BPA دز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم از طریق گاواژ؛ گروه ۶: گروه دریافت‌کننده کروسین دز ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم از طریق صفاقی [۴۳]. طول مدت مطالعه ۴ هفته بود. وزن موش‌ها قبل از مطالعه ثبت و هرگونه تغییر

می‌شود و از سد خونی مغزی عبور می‌کند. علاوه بر این، BPA ممکن است در مغز به دلیل خاصیت چربی‌دوستی آن تجمع یابد [۱۰، ۱۱]. نقایص عصبی رفتاری مانند اضطراب، کاهش فعالیت اکتشافی و اختلال در حافظه فضایی در موش‌های نر پس از قرار گرفتن در معرض BPA در دوران بارداری گزارش شده است [۱۲]. قرار گرفتن در معرض BPA قبل از تولد با عقب‌ماندگی ذهنی کودکان در سن ۷ سالگی در یک مطالعه کوهورت در سوئد مرتبط بود [۱۳]. همچنین، گزارش داده شده است قرار گرفتن مادر در معرض BPA به‌طور وابسته به جنسیت، یادگیری و حافظه را مختل می‌کند و تعداد نورون‌ها و تراکم نخاع را در فرزندان موش کاهش می‌دهد [۱۴]. با این حال، گزارش‌هایی درباره ارزیابی اینکه توانایی یادگیری و حافظه چگونه با BPA مختل می‌شود، هنوز وجود ندارد و مکانیسم‌های مولکولی مرتبط نامشخص است. نقش BPA در بازسازی سیناپسی در نواحی مغز درگیر در یادگیری و حافظه نیز بحث‌برانگیز است. الفای استرس اکسیداتیو، کاهش فعالیت استیل کولین استراز، افزایش آپوپتوز، کاهش بیان گیرنده‌های گلوتمات و سرکوب پروتئین متصل‌شونده به عامل واکنش‌دهنده به آدنوزین مونوفسفات حلقه‌ای (CREB: Cyclic AMP-responsive element-binding protein) و فسفوریلاسیون فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (BDNF: Brain-derived neurotrophic factor) به‌عنوان مکانیسم‌های دخیل در اثرات BPA در سیستم عصبی گزارش شده است [۱۵-۱۸]. تحقیق دیگری نشان داد قرار گرفتن رت‌های باردار در معرض BPA، یادگیری و حافظه تشخیص اشیا را در موش‌های نر مختل کرد و این اختلال با مهار مسیر ERK/CREB/BDNF (Extracellular signal-regulated kinases) مرتبط بود [۱۶]. در مطالعه دیگری مشاهده شد قرار گرفتن حیوانات بعد از تولد در معرض BPA باعث اختلال در حافظه و یادگیری شد و تعداد سلول‌های حاوی پروتئین کیناز وابسته به کالمودولین/کلسیم (CaMKII: Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase-II) را در ناحیه CA3 کاهش داد [۱۹].

امروزه، اثرات مفید گیاهان دارویی مختلف و ترکیبات مؤثره آن‌ها از جمله *Crocus sativus* [۲۰]، *Rosmarinus officinalis* L. [۲۱، ۲۲]، *Ginkgo biloba* [۲۳] و *Curcuma longa* [۲۴] در درمان بیماری آلزایمر و اختلالات حافظه و یادگیری نشان داده شده است. لذا، استفاده از ترکیبات گیاهی برای کنترل اختلال حافظه ناشی از ترکیبات سمی محیطی مثل BPA مفید به نظر می‌رسد.

Crocus sativus (زعفران) از خانواده گیاهان Iridaceae است و ترکیب اصلی مونومر آن، کروسین، برای چندین دهه در درمان بیماری‌های مختلف سیستم عصبی از جمله افسردگی [۲۵، ۲۶]، نقص حافظه [۲۷]، پارکینسون [۲۸، ۲۹]، اضطراب [۳۰] و سایر بیماری‌های عصبی [۳۱] استفاده می‌شده است. مطالعات داروشناسی نشان داده‌اند اثرات درمانی کروسین به دلیل خواص ضد اکسیدان [۳۰، ۳۳]، ضد التهاب [۳۴، ۳۵]، ضد آپوپتوتیک [۳۶] و محافظت‌کننده عصبی [۳۷، ۳۸] آن

وزن در محاسبه دُر منظور شد. کروسین در نرمال سالین و BPA در مخلوط اتانول و روغن کنجد حل شد.

آزمون ماز آبی موریس

در مطالعه حاضر از آزمون ماز آبی موریس به منظور ارزیابی اثر مواد بر حافظه و یادگیری فضایی استفاده شد. دستگاه Morris water maze حوضچه‌ای استوانه‌ای شکل و سیاه‌رنگ با قطر ۱۳۶ و ارتفاع ۶۰ سانتی‌متر است که تا ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر آن با آب ۲۴ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد تنظیم می‌شود. یک سکوی کوچک از جنس فلز تیره‌رنگ با قطر ۱۰ سانتی‌متر، در یک سانتی‌متر زیر سطح آب در مرکز ربع جنوب غربی دایره قرار دارد [۴۴].

در مرحله یادگیری و آموزش، به حیوان اجازه داده می‌شود به مدت ۱۵ ثانیه روی سکو بماند و با جست‌وجوی اطراف و دیدن علائم موجود در آزمایشگاه موقعیت خود را شناسایی کند. این موضوع به حیوان کمک می‌کند تا در جلسات بعدی آزمایش با استفاده از علائم بینایی در اتاق محل آزمایش، جایگاه سکو را پیدا کند. موقعیت سکو در یکی از چهار قسمت ماز و علائم فضایی موجود در محل آزمایش در طول آزمایشات ثابت است. در صورتی که در مدت ۶۰ ثانیه حیوان نتواند سکو را پیدا کند، حیوان به آرامی به سوی سکو هدایت می‌شود تا سکو را بیابد و ۱۵ ثانیه روی آن قرار بگیرد. سپس، مجدداً حیوان از سکو برداشته شده و بعد از خشک شدن با حوله، به قفس خود برگردانده می‌شود. پس از ۱ تا ۲ دقیقه آزمایش تکرار می‌شود. با این تفاوت که محل رها شدن حیوان نسبت به مرحله قبل متفاوت است. این آزمون در گروه‌های آزمایش، برای هر حیوان روزانه ۴ بار با فاصله زمانی ۱ تا ۲ دقیقه انجام شد. در مجموع، این مرحله از آزمایش به مدت ۵ روز انجام شد [۴۴، ۴۵]. یک روز پس از تکمیل مرحله اول، مرحله بعد (مرحله بازیابی یا پروب) انجام شد. در این مرحله سکو برداشته شد و هر رت در حوضچه به مدت ۶۰ ثانیه از هر چهار جهت شنا کرد و زمان سپری شده در ربع هدف ثبت شد.

جدا سازی بافت مغزی

پس از آزمون رفتاری، بافت مغز از جمجمه خارج و قسمت هیپوکامپ جدا شد و بلافاصله در نیتروژن مایع قرار گرفت. بافت‌های منجمد شده تا زمان استفاده داخل فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

آزمون وسترن بلات

سطح پروتئین‌ها در هیپوکامپ با روش وسترن بلات بررسی شد. بافت هیپوکامپ در یک بافر حاوی ۵۰ میلی‌مولار تریس با pH=۷/۴، اتیلن دی آمین تترا استیک اسید ۲ میلی‌مولار، سدیم فلوئراید ۱۰ میلی‌مولار، سدیم وانادات ۱ میلی‌مولار، بتا گلیسروفسفات ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۲ درصد وزن/حجمی سدیم دزوکسی کولات و ۱ میکرولیتر مهارکننده پروتئاز هموزن شد. غلظت پروتئین نمونه‌های مختلف با استفاده از کیت سنجش برادفورد تعیین شد. سپس، نمونه‌ها با بافر آبی SDS 2X ترکیب شدند، به مدت ۵ تا ۷ دقیقه جوشانده، به مقادیر کمتری تقسیم و در

دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای تعیین سطح پروتئین‌های مختلف، نمونه‌ها روی ژل پلی آکریل آمید الکتروفورز شدند و به کاغذ PVDF منتقل شدند. کاغذها به مدت ۲ ساعت روی راکر در دمای اتاق با ۵ درصد شیر خشک بدون چربی یا آلبومین سرم گاوی (برای پروتئین‌های فسفریله) در TBST بلاک شدند.

سپس، کاغذها سه بار با TBST شسته و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق با آنتی‌بادی‌های اولیه (شرکت Cell Signalling آمریکا) شامل ERK (Cell Signaling # 9106)، p.ERK (Cell Signaling #9102)، CREB (Cell Signaling #9197)، p.CREB (Cell Signaling #9198)، CaMKII (Cell Signaling # 3362) و p.CaMKII (Cell Signaling # 3361) با رقت ۱:۱۰۰۰ مجاور شدند. سپس، کاغذها مجدداً شسته شدند و با آنتی‌بادی ثانویه خرگوشی (Anti rabbit IgG labeled with horseradish peroxidase, cell signaling#7074) یا موشی (Anti mouse IgG labeled with horseradish peroxidase, cell signaling #7076) با رقت ۱:۳۰۰۰ و به مدت ۱/۵ ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. مجدداً کاغذها سه بار، هر بار به مدت ۵ دقیقه TBST شست‌وشو شدند. در نهایت، از معرف ECL و دستگاه UV alliance Gel Doc (ساخت کشور انگلیس) برای مشاهده باندها و ثبت عکس استفاده شد. عکس‌های مربوطه ذخیره و با برنامه UV BAND تفسیر شدند. از پروتئین بتا اکتین به عنوان کنترل برای نرمالایز کردن داده‌ها استفاده شد.

تحلیل داده‌ها و محاسبات آماری

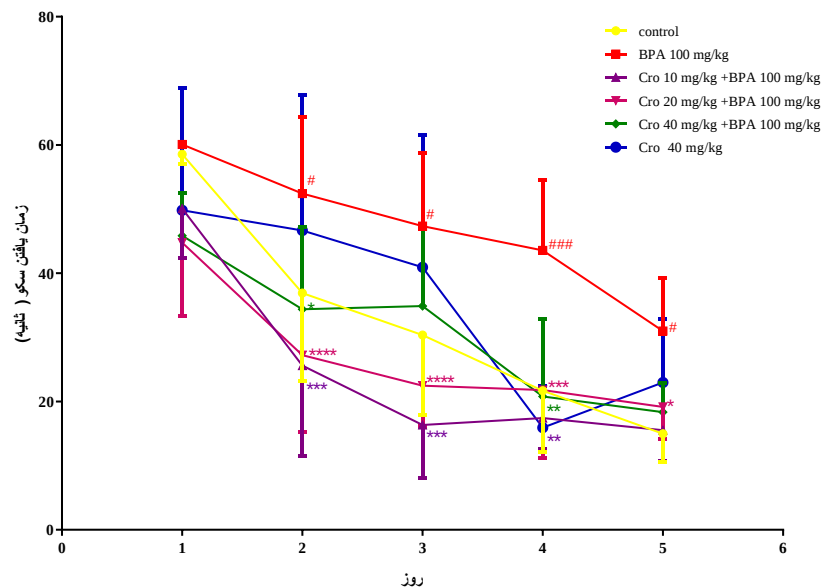
از نرم‌افزار Prism 8 برای محاسبات آماری استفاده شد. برای مقایسه مدت‌زمان حضور حیوانات در سکوی هدف و مقایسه سرعت حیوانات در روزهای مختلف از Two-way ANOVA و Tukey-kramer post test استفاده شد. برای سایر داده‌ها از آزمون One-way ANOVA و Tukey-kramer post test استفاده شد. نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شدند و $P < 0/05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

اثر کروسین بر زمان سپری شده برای پیدا کردن سکو از

روز اول تا پنجم در رت‌های دریافت‌کننده BPA

داده‌ها نشان داد تجویز BPA ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در مقایسه با گروه کنترل در روز دوم و سوم و $P < 0/05$ ، در روز چهارم و $P < 0/001$ و در روز پنجم و $P < 0/05$ به‌طور معنی‌داری زمان یافتن سکو را افزایش داد، اما تزریق کروسین در روز دوم با دُزهای ۱۰ و $P < 0/001$ ، ۲۰ و $P < 0/001$ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و $P < 0/05$ ، در روز سوم در دُزهای ۱۰ و $P < 0/001$ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و $P < 0/001$ ، در روز چهارم در دُزهای ۱۰ و $P < 0/001$ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و $P < 0/001$ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و $P < 0/001$ و در روز پنجم در دُز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و $P < 0/05$ به‌طور معنی‌داری زمان یافتن سکو را در مقایسه با گروه دریافت‌کننده BPA کاهش داد (شکل ۱).

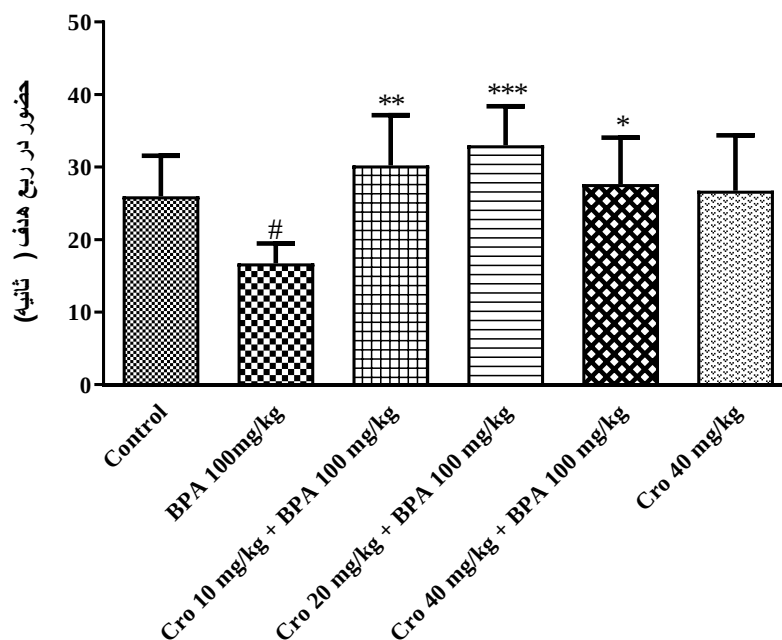


شکل ۱: اثر دُزهای مختلف کروسین بر مدت زمان سپری شده برای پیدا کردن سکو در ماز آبی موریس از روز اول تا پنجم در رت‌های دریافت‌کننده BPA مقادیر داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نمایش داده شده‌اند. تعداد حیوانات در هر گروه ۶ موش است. برای مقایسه آماری از آزمون Two-way ANOVA و Tukey-Kramer multiple comparison test به عنوان آزمون تعقیبی استفاده شد. $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$ و در مقایسه با گروه کنترل؛ $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$ و در مقایسه با BPA. BPA: بیسفنول A؛ Cro: کروسین

کنترل به‌طور معنی‌داری موجب کاهش زمان سپری شده حیوان در ربع صحیح شد ($P < 0.05$)، اما تزریق کروسین در دُزهای ۱۰ ($P < 0.01$)، ۲۰ ($P < 0.01$) و ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم ($P < 0.05$) به همراه BPA به‌طور معنی‌داری زمان سپری شده در ربع صحیح را در مقایسه با گروه دریافت‌کننده BPA افزایش داد (شکل ۲).

اثر کروسین بر مدت زمان حضور رت‌های دریافت‌کننده BPA در ربع صحیح ماز آبی موریس پس از برداشتن سکو در روز ششم

تجویز BPA به میزان ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم در مقایسه با گروه



شکل ۲: اثر دُزهای مختلف کروسین بر مدت زمان حضور رت‌های دریافت‌کننده BPA در ربع صحیح ماز آبی موریس پس از برداشتن سکو در روز ششم مقادیر داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نمایش داده شده‌اند. تعداد حیوانات در هر گروه ۶ موش است. برای مقایسه آماری از آزمون One-way ANOVA و Tukey-Kramer multiple comparison test به عنوان آزمون تعقیبی استفاده شد. $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$ و در مقایسه با گروه BPA. BPA: بیسفنول A؛ Cro: کروسین

اثر کروسین بر سرعت رت‌های دریافت‌کننده BPA از روز

اول تا پنجم در ماز آبی موریس

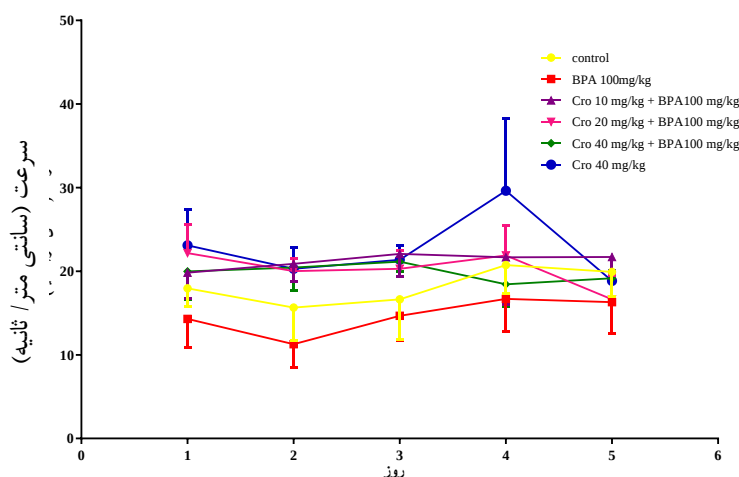
تجویز BPA در دُز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در روز اول تا پنجم آموزش باعث تغییری در سرعت رت‌ها در مقایسه با گروه کنترل نشد. علاوه‌براین، تجویز کروسین در دُزهای مختلف (۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به همراه BPA نیز تأثیری بر سرعت حیوانات در طول ۵ روز آموزش در مقایسه با گروه دریافت‌کننده BPA نداشت (شکل ۳A).

اثر کروسین بر سرعت رت‌های دریافت‌کننده BPA در ماز

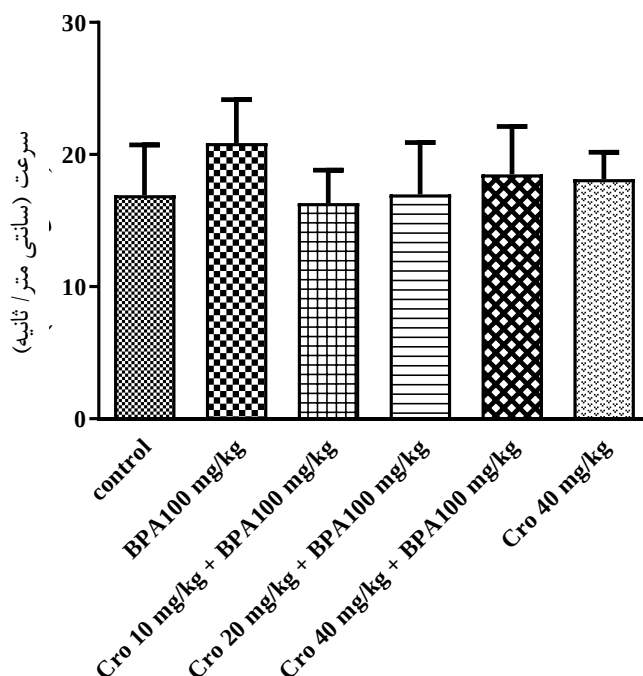
آبی موریس در روز ششم

تجویز BPA در دُز ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تغییر معنی‌داری در سرعت رت‌ها در روز ششم در مقایسه با گروه کنترل ایجاد نکرد. تجویز کروسین در دُزهای مختلف (۱۰، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به همراه BPA نیز تغییری در سرعت رت‌ها در روز ششم در مقایسه با گروه دریافت‌کننده BPA ایجاد نکرد (شکل ۳B).

A



B



شکل ۳: اثر دُزهای مختلف کروسین بر سرعت رت‌های دریافت‌کننده BPA در ماز آبی موریس

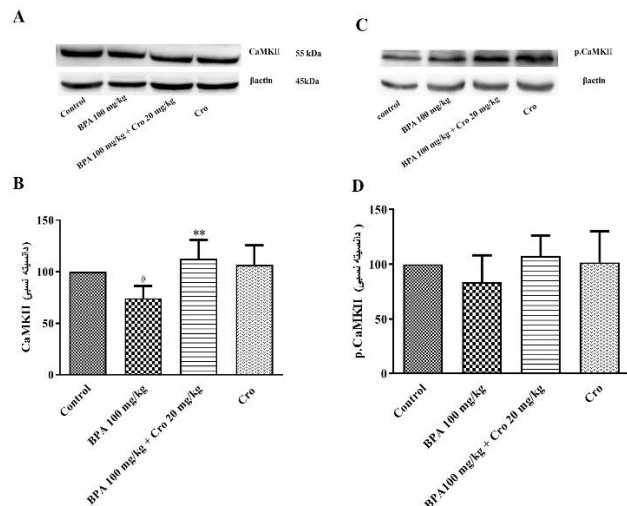
A: اثر دُزهای مختلف کروسین بر سرعت رت‌های دریافت‌کننده BPA در ماز آبی موریس در روز اول تا پنجم

B: اثر دُزهای مختلف کروسین بر سرعت رت‌های دریافت‌کننده BPA در ماز آبی موریس در روز ششم

مقادیر داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نمایش داده شده‌اند. تعداد حیوانات در هر گروه ۶ موش است. برای مقایسه آماری از آزمون Two-way ANOVA برای روزهای اول تا پنجم و آزمون One-way ANOVA برای روز ششم استفاده شد.

BPA: بیسفنول A؛ Cro: کروسین

($P < 0.05$)، اما تزریق کروسین ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم ($P < 0.01$) به همراه BPA باعث افزایش معنی دار سطح پروتئین CaMKII در مقایسه با گروه BPA شد (شکل ۴A-B). به دنبال تجویز BPA و کروسین تغییری در سطح پروتئین p.CaMKII در گروه های مختلف مشاهده نشد (شکل ۴C-D).

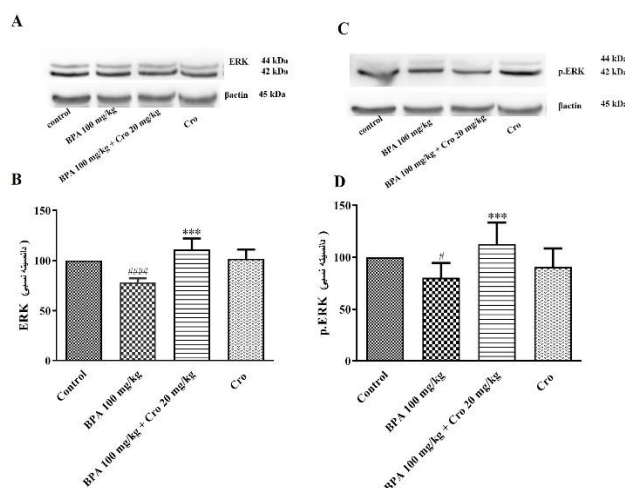


بررسی اثر BPA و کروسین بر سطح پروتئین CaMKII و نوع فسفریله آن در هیپوکامپ

تجویز BPA در دوز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم سطح پروتئین CaMKII را در هیپوکامپ در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری کاهش داد

شکل ۴: اثر BPA و کروسین بر سطح پروتئین CaMKII و p.CaMKII در هیپوکامپ رت. مقادیر داده ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نمایش داده شده اند. تعداد حیوانات در هر گروه ۴ موش است. نمودارهای A و C به ترتیب باندهای وسترن بلات پروتئین های CaMKII و p.CaMKII را نشان می دهد. نمودارهای B و D به ترتیب نتایج مربوط به تحلیل دانسیته پروتئین های CaMKII و p.CaMKII را نشان می دهد. برای مقایسه آماری از آزمون One-way ANOVA و Tukey-Kramer multiple comparison test به عنوان آزمون تعقیبی استفاده شد. $P < 0.05$ # در مقایسه با گروه کنترل. $P < 0.01$ ** در مقایسه با گروه BPA. BPA: بیسفنول A؛ Cro: کروسین

یافت ($P < 0.001$) برای پروتئین ERK و ($P < 0.05$) برای پروتئین p.ERK. تزریق کروسین ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم به همراه BPA به طور معنی داری سطح پروتئین ها را در هیپوکامپ در مقایسه با گروه دریافت کننده BPA افزایش داد ($P < 0.001$) (شکل ۵).



بررسی اثر BPA و کروسین بر سطح پروتئین ERK و p.ERK در هیپوکامپ

نتایج به دست آمده نشان داد سطح پروتئین های ERK و p.ERK در گروه دریافت کننده BPA به طور معنی داری در مقایسه با گروه کنترل کاهش

شکل ۵: اثر BPA و کروسین بر سطح پروتئین ERK و p.ERK در هیپوکامپ رت

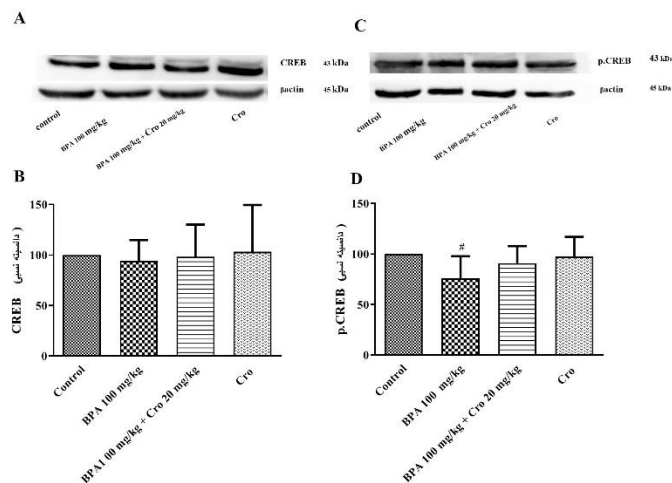
مقادیر داده ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نمایش داده شده اند. تعداد حیوانات در هر گروه ۴ موش است. نمودارهای A و C به ترتیب باندهای وسترن بلات پروتئین های ERK و p.ERK را نشان می دهد. نمودارهای B و D به ترتیب نتایج مربوط به تحلیل دانسیته پروتئین های ERK و p.ERK را نشان می دهد. برای مقایسه آماری از آزمون One-way ANOVA و Tukey-Kramer multiple comparison test به عنوان آزمون تعقیبی استفاده شد. $P < 0.05$ # $P < 0.001$ ### در مقایسه با گروه کنترل. $P < 0.01$ ** $P < 0.001$ *** در مقایسه با گروه BPA. BPA: بیسفنول A؛ Cro: کروسین

بررسی اثر BPA و کروسین بر سطح پروتئین CREB و

p.CREB در هیپوکامپ

سطح پروتئین p.CREB در گروه دریافت کننده BPA در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری کاهش یافت ($P < 0.05$). تزریق کروسین ۲۰

میلی گرم بر کیلوگرم به همراه BPA تغییری در سطح پروتئین p.CREB در مقایسه با گروه دریافت کننده BPA ایجاد نکرد (شکل C- ۶D). به دنبال تجویز BPA و کروسین تغییری در سطح پروتئین CREB در گروه های مختلف مشاهده نشد (شکل A-B- ۶A).



شکل ۶: اثر BPA و کروسین بر سطح پروتئین CREB و p.CREB در هیپوکامپ رت

مقادیر داده ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار نمایش داده شده اند. تعداد حیوانات در هر گروه ۴ موش است. نمودارهای A و C به ترتیب باندهای وسترن بلات پروتئین های CREB و p.CREB را نشان می دهد. نمودارهای B و D به ترتیب نتایج مربوط به تحلیل دانسیته پروتئین های CREB و p.CREB را نشان می دهد. برای مقایسه آماری از آزمون One-way ANOVA و Tukey-Kramer multiple comparison test به عنوان آزمون تعقیبی استفاده شد.

$P < 0.05$ # در مقایسه با گروه کنترل.

BPA: بیسفنول A، Cro: کروسین

بحث

هدف مطالعه کنونی بررسی اثر BPA بر اختلال حافظه در رت و تأثیر آن بر سطح پروتئین های ERK، p.ERK، CaMKII، p.CaMKII، CREB و p.CREB در هیپوکامپ و بررسی اثرات حفاظتی کروسین بر آن بود. داده های به دست آمده نشان داد تجویز BPA (۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) به مدت ۲۸ روز باعث کاهش معنی دار مدت زمان حضور رت در ربع صحیح ماز و کاهش سطح پروتئین های ERK، p.ERK، CaMKII و p.CREB در هیپوکامپ در مقایسه با گروه کنترل شد. تجویز کروسین (۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم) توانست باعث بهبود اختلال حافظه و افزایش سطح پروتئین های ERK، p.ERK، CaMKII در مقایسه با گروه BPA شود.

BPA به عنوان یک سم شیمیایی محیطی سبب اختلال در عملکرد غدد آندوکراین می شود. به دلیل کاربرد گسترده این ماده در محصولات پلاستیکی از جمله شیشه شیر اطفال و بطری های آب آشامیدنی، به طور متوسط روزانه ۵۲ تا ۷۴ نانوگرم بر کیلوگرم از این ماده سمی از طریق رژیم غذایی وارد بدن انسان می شود [۴۱] و از طریق تغییر در ساختارهای ایجادکننده حافظه بر سیستم عصبی مرکزی تأثیر منفی می گذارد [۴۶]. در مطالعه ای تماس موش ها در دوران بارداری با ۵/۵ میلی گرم بر کیلوگرم BPA باعث کاهش مدت زمان سپری شده در ربع صحیح ماز آبی مورس شد [۱۲]. در مطالعه دیگری نیز مشاهده شد

مواجهه طولانی مدت موش های بالغ با ۴ تا ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم در روز BPA باعث افزایش مدت زمان یافتن سکو در تست ماز آبی مورس، کاهش تراکم سیناپس و اثرات منفی بر ساختار سیناپس در هیپوکامپ حیوانات می شود [۴۷].

در مطالعه حاضر، تجویز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم BPA به مدت ۲۸ روز به رت های بالغ، زمان یافتن سکو را در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری افزایش داد. این افزایش معنی دار از روز اول مطالعه مشاهده شد، اما سطح معنی داری آن در روزهای سوم و چهارم به حداقل رسید. همچنین، تجویز BPA باعث تغییر معنی دار در مدت زمان حضور رت ها در ربع صحیح ماز بعد از برداشتن سکو در روز ششم، در مقایسه با گروه کنترل شد. در سرعت حرکت گروه BPA در مقایسه با گروه کنترل هیچ گونه اختلافی مشاهده نشد که نشان دهنده عدم ایجاد اختلال در اندام های حرکتی رت های دریافت کننده BPA است. نتایج آزمون رفتاری در مطالعه کنونی در راستای تحقیقات قبلی بوده است.

نتایج حاصل از آزمون ماز آبی مورس مشخص کرد اثر محافظتی کروسین بر تخریب حافظه ناشی از BPA در روز اول آزمایش معنی دار نبوده است، اما در روز دوم و چهارم اثرات معنی دار حفاظت از تخریب حافظه در هر سه گروه دریافت کننده کروسین مشاهده شد. در روز سوم، اثر حفاظتی فقط در دُزهای ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم کروسین مشاهده شد. اما در روز پنجم مطالعه، اثر کروسین در

کاهش سطح پروتئین p.ERK در دُزهای ۵، ۰/۵ و ۰/۰۵ میلی گرم بر کیلوگرم در مقایسه با گروه کنترل در هیپوکامپ شد [۱۶]. نتایج مطالعه کنونی نشان داد تجویز کروسین با دُز ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم همزمان با تجویز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم BPA موجب افزایش معنی دار سطح پروتئین ERK و p.ERK شده است. مطابق با نتایج پژوهش حاضر، در مطالعه دیگری اثر حفاظتی کروسین بر مدل پیری القا شده با دی-گالاکتوز دیده شد که تجویز داخل صفاقی کروسین (۳۰، ۱۵، ۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) به مدت ۸ هفته باعث افزایش سطح ERK / p.ERK در هیپوکامپ رت می شود [۲۰].

ERK می تواند CREB را با فعال کردن کیناز ریبوزومی S6 فعال کند و در نتیجه رونویسی وابسته به CREB را آغاز کند [۵۲]. به نظر می رسد فعال شدن بیان ژن وابسته به CREB گام مهمی در آبشار مولکولی است که واسطه شکل گیری خاطرات طولانی مدت است [۵۴]. نتایج مطالعه حاضر نشان داد BPA در سطح پروتئین CREB تغییر معنی داری ایجاد نکرد، اما سبب کاهش معنی دار سطح پروتئین p.CREB در هیپوکامپ شد. در پژوهش دیگری نیز مشاهده شد تیمار رت های باردار از روز ۹ تا ۲۰ بارداری با BPA در دُزهای ۵، ۰/۵ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت خوراکی موجب کاهش معنی دار در سطح پروتئین p.CREB در هیپوکامپ فرزندان نر شده است [۱۶]. در مطالعه کنونی، تجویز همزمان کروسین با BPA در رت های مورد آزمایش اگرچه باعث افزایش سطح پروتئین p.CREB در هیپوکامپ شد، این تغییر از نظر آماری قابل توجه نبود. در مطالعه دیگری اثر حفاظتی دُزهای ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم کروسین بر افسردگی بررسی شد و مشخص شد که تجویز کروسین اثری بر سطح پروتئین های CREB و p.CREB در مغز حیوانات نداشت [۵۵].

CaMKII یک پروتئین کیناز کلیدی در شکل پذیری عصبی و حافظه است که با هجوم Ca^{2+} از طریق گیرنده های ان-متیل-دی-آسپاراتات انجام می شود [۵۷، ۵۶]. نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد مواجهه با BPA موجب کاهش معنی دار سطح پروتئین CaMKII شده است، اما تغییر معنی داری در سطح پروتئین p.CaMKII مشاهده نشد. در مطالعه دیگری اثرات تماس نوزاد موش با تک دُز BPA بر سطح پروتئین های مهم در سیستم عصبی و دومین مرحله رشد مغز بررسی شد. در دهمین روز تولد موش، ۳۲/۰، ۲/۳ و ۴/۸ میلی گرم بر کیلوگرم BPA به صورت خوراکی تجویز شد و موش های نر پس از ۲۴ ساعت و ۵ ماه و موش های ماده پس از ۵ ماه کشته شدند. تغییری در سطح پروتئین CaMKII پس از تماس با BPA به مدت ۲۴ ساعت در هیپوکامپ و کورتکس نوزادان نر و همچنین در موش های بالغ نر که پس از ۵ ماه کشته شدند، مشاهده نشد. اما در موش های ماده که پس از ۵ ماه کشته شدند، میزان CaMKII در هر دو بافت هیپوکامپ کاهش یافت [۵۸]. نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد تجویز کروسین با دُز ۲۰

نمونه های دریافت کننده دُزهای ۱۰ و ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی داری نداشت و فقط دُز ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم کروسین در بهبود حافظه اثربخشی معنی داری داشت. در کل، به نظر می رسد کروسین در دُز ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم نسبت به سایر دُزها میزان حفاظت بیشتری در مقابل اثرات تخریبی BPA ایجاد می کند.

اثر محافظت عصبی کروسین در مقابل تخریب حافظه به صورت وابسته به دُز نیست و بهترین اثربخشی در دُز ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم کروسین ایجاد می شود. احتمالاً اثر کروسین در حافظه در دُزهای بیشتر از ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم به حالت پایدار می رسد و اثر افزایشی بر حافظه نخواهد داشت. در همین راستا، نتایج پژوهش دیگری نشان داد تجویز کروسین در دُز ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی و به مدت ۳ هفته، باعث بهبود اختلال حافظه در مدل آلزایمر ناشی از استرپتوزوسین شد [۴۸]. همچنین، گزارش شده است تزریق داخل صفاقی کروسین در دُز ۷/۵ میلی گرم بر کیلوگرم بر اختلال حافظه در رت های دیابتی ناشی از دریافت استرپتوزوسین اثری نداشته است، در حالی که کروسین در دُزهای ۱۵ و ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم به طور معنی داری از کاهش نورون های هیپوکامپ جلوگیری کرد و توانست باعث بهبود اختلال حافظه و یادگیری در حیوانات شود [۴۹].

در قدم بعدی، هدف مطالعه بررسی مسیرهای پیام رسان سلولی دخیل در اختلال حافظه ناشی از BPA و اثرات محافظت عصبی کروسین بود. آبشار سیگنالینگ ERK به عنوان یک نقطه همگرایی در سیگنال دهی عصبی شناخته شده است و نقش مهمی در انعطاف پذیری و بقای نورون ها ایفا می کند. برخی از مطالعات نشان داده اند آپوپتوز نورون ها ارتباط نزدیکی با مسیر سیگنالینگ ERK دارد [۵۱، ۵۰]. در سیتوپلاسم و دندریت ها، ERK فاکتورهای رونویسی را تنظیم می کند. در نتیجه، به طور غیرمستقیم سنتز پروتئین را القا می کند. فعال شدن این مسیر منجر به تغییراتی در مورفولوژی دندریت های هیپوکامپ می شود. بنابراین، ERK ممکن است در شکل گیری انعطاف پذیری عصبی دخیل باشد که دریافت و انتقال اطلاعات را ارتقا می دهد [۵۲]. یافته های مطالعه حاضر نشان داد مواجهه با ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم BPA به صورت خوراکی در رت های بالغ به مدت ۲۸ روز موجب کاهش معنی دار سطح پروتئین ERK و فرم فسفریله آن در هیپوکامپ در مقایسه با گروه کنترل شد. در بررسی اثر حفاظتی کورکومین بر آمیلوئید بتا در اختلال حافظه فضایی نیز مشاهده شد تجویز آمیلوئید بتا باعث ایجاد اختلال حافظه و کاهش سطح پروتئین ERK و فرم فسفریله آن در هیپوکامپ رت می شود و بهبود حافظه فضایی رت با افزایش نسبت p.ERK/ERK در هیپوکامپ همراه است [۵۳]. در مطالعه دیگری به منظور بررسی اثر BPA بر حافظه فضایی، تجویز خوراکی BPA به رت های باردار در روز ۹ تا ۲۰ بارداری موجب کاهش معنی دار سطح پروتئین ERK در دُز ۰/۰۵ و ۵ میلی گرم بر کیلوگرم و

داشتند.

نتیجه گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد تجویز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم BPA به صورت گاوژ به رت‌های بالغ به مدت ۲۸ روز سبب ایجاد اختلال حافظه می‌شود و این اختلال حافظه با حضور ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم کروسین بهبود می‌یابد. به نظر می‌رسد در افزایش حافظه ناشی از کروسین، افزایش سطح پروتئین‌های ERK، p.ERK و CaMKII در هیپوکامپ نقش بسزایی داشته باشند.

سپاسگزاری

این مقاله از پایان نامه با کد طرح ۹۴۱۷۷۰ گرفته شده است. هزینه طرح توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد تأمین شده است که از این معاونت تشکر می‌شود (کد اخلاق IR.MUMS.SP.1395.5).

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافی توسط نویسندگان بیان نشده است.

میلی گرم بر کیلوگرم هم‌زمان با تجویز ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم BPA موجب افزایش معنی‌دار سطح پروتئین CaMKII شده است. در مطالعه ادبی‌زاده و همکاران مشخص شد کروسین اثرات بهبوددهنده حافظه در اختلال ناشی از هیوسین در رت دارد. در مطالعه ذکرشده به دنبال تجویز هیوسین و کروسین، تغییری در سطح پروتئین‌های CaMKII و p.CaMKII در هیپوکامپ رت مشاهده نشد [۴۵].

از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به مدت زمان تحقیق اشاره کرد. تجویز ترکیبات برای مدت بیشتر از یک ماه احتمالاً تأثیرات قابل توجه‌تری ایجاد می‌کند که با توجه به شرایط موجود، امکان دوره تجویز بیش از یک ماه وجود نداشت.

به نظر می‌رسد در اثرات حفاظتی کروسین بر اختلال حافظه ناشی از BPA مکانیسم‌ها و مسیرهای پیام‌رسان سلولی مختلفی نقش دارند. در مطالعه قبلی، اثرات ضد اکسیدان و افزایش سطح پروتئین AMPA (3- α -amino-4-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) [۴۰] و در مطالعه کنونی افزایش سطح پروتئین‌های ERK، p.ERK و CaMKII اهمیت

References

- Hoekstra EJ, Simoneau C. Release of bisphenol A from polycarbonate—a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2013; **53**(4):386-402. DOI: 10.1080/10408398.2010.536919 PMID: 23320909
- Le HH, Carlson EM, Chua JP, Belcher SM. Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicol Lett*. 2008; **176**(2):149-156. DOI: 10.1016/j.toxlet.2007.11.001 PMID: 18155859
- Kazemi S, Kani SNM, Rezazadeh L, Pouramir M, Ghasemi-Kasman M, Moghadamnia AA. Low dose administration of Bisphenol A induces liver toxicity in adult rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017; **494**(1-2):107-112. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.10.074 PMID: 29050942
- Khodayar MJ, Kalantari H, Mahdavinia M, Khorsandi L, Alboghobeish S, Samimi A, et al. Protective effect of naringin against BPA-induced cardiotoxicity through prevention of oxidative stress in male Wistar rats. *Drug Chem Toxicol*. 2020; **43**(1):85-95. DOI: 10.1080/01480545.2018.1504958 PMID: 30264589
- Alekhyia Sita GJ, Gowthami M, Srikanth G, Krishna MM, Rama Sireesha K, Sajjarao M, et al. Protective role of luteolin against bisphenol A-induced renal toxicity through suppressing oxidative stress, inflammation, and upregulating Nrf2/ARE/HO-1 pathway. *IUBMB Life*. 2019; **71**(7):1041-1047. DOI: 10.1002/iub.2066 PMID: 31091348
- Alboghobeish S, Mahdavinia M, Zeidooni L, Samimi A, Oroojan AA, Alizadeh S, et al. Efficiency of naringin against reproductive toxicity and testicular damages induced by bisphenol A in rats. *Iran J Basic Med Sci*. 2019; **22**(3):315-323. DOI: 10.22038/ijbms.2019.29757.7184 PMID: 31156794
- Vahdati Hassani F, Abnous K, Mehri S, Jafarian A, Birner-Gruenberger R, Yazdian Robati R, et al. Proteomics and phosphoproteomics analysis of liver in male rats exposed to bisphenol A: Mechanism of hepatotoxicity and biomarker discovery. *Food Chem Toxicol*. 2018; **112**:26-38. DOI: 10.1016/j.fct.2017.12.021 PMID: 29269058
- Mohsenzadeh MS, Razavi BM, Imenshahidi M, Mohajeri SA, Rameshrad M, Hosseinzadeh H. Evaluation of green tea extract and epigallocatechin gallate effects on bisphenol A-induced vascular toxicity in isolated rat aorta and cytotoxicity in human umbilical vein endothelial cells. *Phytother Res*. 2021; **35**(2):996-1009. DOI: 10.1002/ptr.6861 PMID: 32893422
- Rameshrad M, Razavi BM, Imenshahidi M, Hosseinzadeh H. Vitis vinifera (grape) seed extract and resveratrol alleviate bisphenol-A-induced metabolic syndrome: Biochemical and molecular evidences. *Phytother Res*. 2019; **33**(3):832-844. DOI: 10.1002/ptr.6276 PMID: 30653759
- Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol*. 2007; **24**(2):139-177. DOI: 10.1016/j.reprotox.2007.07.010 PMID: 17825522
- Tavakkoli A, Abnous K, Vahdati Hassani F, Hosseinzadeh H, Birner-Gruenberger R, Mehri S. Alteration of protein profile in cerebral cortex of rats exposed to bisphenol a: a proteomics study. *Neurotoxicology*. 2020; **78**:1-10. DOI: 10.1016/j.neuro.2020.01.013 PMID: 32017977
- Xu XH, Zhang J, Wang YM, Ye YP, Luo QQ. Perinatal exposure to bisphenol-A impairs learning-memory by concomitant down-regulation of N-methyl-D-aspartate receptors of hippocampus in male offspring mice. *Horm Behav*. 2010; **58**(2):326-333. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2010.02.012 PMID: 20206181
- Tanner EM, Hallerback MU, Wikström S, Lindh C, Kiviranta H, Gennings C, et al. Early prenatal exposure to suspected endocrine disruptor mixtures is associated with lower IQ at age seven. *Environ Int*. 2020; **134**:105185. DOI: 10.1016/j.envint.2019.105185 PMID: 31668669
- Zhang H, Wang Z, Meng L, Kuang H, Liu J, Lv X, et al. Maternal exposure to environmental bisphenol A impairs the neurons in hippocampus across generations. *Toxicology*. 2020; **432**:152339. DOI: 10.1016/j.tox.2020.152393 PMID: 32027964
- Lee S, Suk K, Kim IK, Jang IS, Park JW, Johnson VJ, et al. Signaling pathways of bisphenol A-induced apoptosis in hippocampal neuronal cells: Role of calcium-induced reactive oxygen species, mitogen-activated protein kinases, and nuclear factor- κ B. *J Neurosci Res*. 2008; **86**(13):2932-2942. DOI:

- 10.1002/jnr.21739
16. Wang C, Li Z, Han H, Luo G, Zhou B, Wang S, et al. Impairment of object recognition memory by maternal bisphenol A exposure is associated with inhibition of Akt and ERK/CREB/BDNF pathway in the male offspring hippo-campus. *Toxicology*. 2016; **341**:56-64. DOI: 10.1016/j.tox.2016.01.010 PMID: 26827910
17. Chen Z, Li T, Zhang L, Wang H, Hu F. Bisphenol A exposure remodels cognition of male rats attributable to excitatory alterations in the hippocampus and visual cortex. *Toxicology*. 2018; **410**:132-141. DOI: 10.1016/j.tox.2018.10.002 PMID: 30312744
18. Gupta S, Khan J, Salhotra S, Abdi SAH, Sharma S, Ahmad S, et al. The protective effect of α -lipoic acid against bisphenol A-induced neurobehavioral toxicity. *Neuro-chem Int*. 2018; **118**:166-175. DOI: 10.1016/j.neuint.2018.06.005 PMID: 29908256
19. Bi N, Ding J, Zou R, Gu X, Liu ZH, Wang HL. Developmental exposure of bisphenol A induces spatial memory deficits by weakening the excitatory neural circuits of CA3-CA1 and EC-CA1 in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2021; **426**:115641. DOI: 10.1016/j.taap.2021.115641 PMID: 34242568
20. Heidari S, Mehri S, Hosseinzadeh H. Memory enhance-ment and protective effects of crocin against D-galactose aging model in the hippocampus of Wistar rats. *Iran J Basic Med Sci*. 2017; **20**(11):1250. DOI: 10.22038/ijbms.2017.9541 PMID: 29299203
21. Rahbardar MG, Hosseinzadeh H. Therapeutic effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and its active constituents on nervous system disorders. *Iran J Basic Med Sci*. 2020; **23**(9): 1100-1112. DOI: 10.22038/ijbms.2020.45269.10541 PMID: 32963731
22. Ghasemzadeh Rahbardar M, Hosseinzadeh H. Effects of rosmarinic acid on nervous system disorders: an updated review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2020; **393**(10):1779-1795. DOI: 10.1007/s00210-020-01935-w PMID: 32725282
23. Gregory J, Vengalasetti YV, Bredesen DE, Rao RV. Neuroprotective herbs for the management of Alzheimer's disease. *Biomolecules*. 2021; **11**(4):543. DOI: 10.3390/biom11040543 PMID: 33917843
24. Jiang Y, Gao H, Turdu G. Traditional Chinese medicinal herbs as potential AChE inhibitors for anti-Alzheimer's disease: a review. *Bioorg Chem*. 2017; **75**:50-61. DOI: 10.1016/j.bioorg.2017.09.004 PMID: 28915465
25. Hosseinzadeh H, Karimi G, Niapoor M. Antidepressant effects of *Crocus sativus* stigma extracts and its constituents, crocin and safranal, in mice. *J Med Plants*. 2004; **3**(11):48-58.
26. Razavi BM, Hosseini A, Hosseinzadeh H. Antidepressant activity of *Crocus sativus* L. and its main constituents: A review. *The Neuroscience of Depression*. Academic Press; 2021.
27. Shahidani S, Rajaei Z, Alaei H. Pretreatment with crocin along with treadmill exercise ameliorates motor and memory deficits in hemiparkinsonian rats by anti-inflammatory and antioxidant mechanisms. *Metab Brain Dis*. 2019; **34**(2):459-468. DOI: 10.1007/s11011-018-0379-z PMID: 30652256
28. Mohammadzadeh L, Hosseinzadeh H, Abnous K, Razavi BM. Neuroprotective potential of crocin against malathion-induced motor deficit and neurochemical alterations in rats. *Environl Sci Pollut Res*. 2018; **25**(5):4904-4914. DOI: 10.1007/s11356-017-0842-0 PMID: 29204935
29. Mohammadzadeh L, Rahbardar MG, Razavi BM, Hosseinzadeh H. Crocin Protects Malathion-induced Parkinson-like Disease by Inhibiting Apoptosis and α -synuclein Accumulation in Rats' Striatum. *J Mol Neurosci*. 2022; **72**(5):983-993. DOI: 10.1007/s12031-022-01990-3 PMID: 35274200
30. Hosseinzadeh H, Noraei NB. Anxiolytic and hypnotic effect of *Crocus sativus* aqueous extract and its consti-tuents, crocin and safranal, in mice. *Phytother Res*. 2009; **23**(6):768-774. DOI: 10.1002/ptr.2597 PMID: 19142981
31. Khalatbari-Mohseni A, Banafshe HR, Mirhosseini N, Asemi Z, Ghaderi A, Omid A. The effects of crocin on psychological parameters in patients under methadone maintenance treatment: a randomized clinical trial. *Subst Abuse Treat Prev Policy*. 2019; **14**(1):1-8. DOI: 10.1186/s13011-019-0198-1 PMID: 30795785
32. Shaterzadeh-Yazdi H, Samarghandian S, Farkhondeh T. Effects of crocins in the management of neurodegene-rative pathologies: a review. *Neurophysiology*. 2018; **50**(4):302-308. DOI: 10.1007/s11062-081-9752-0
33. Margaritis I, Angelopoulou K, Lavrentiadou S, Mavrovouniotis IC, Tsantariotou M, Taitzoglou I, et al. Effect of crocin on antioxidant gene expression, fibrinolytic parameters, redox status and blood biochemistry in nicotinamide-streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biol Rese- Thessaloniki*. 2020; **27**(1):1-15. DOI: 10.1186/s40709-020-00114-5 PMID: 32161725
34. Vahdati Hassani F, Naseri V, Razavi BM, Mehri S, Abnous K, Hosseinzadeh H. Antidepressant effects of crocin and its effects on transcript and protein levels of CREB, BDNF, and VGF in rat hippocampus. *DARU J Pharm Sci*. 2014; **22**(1):1-9. DOI: 10.1186/2008-2231-22-16 PMID: 24401376
35. Zeinali M, Zirak MR, Rezaee SA, Karimi G, Hosseinzadeh H. Immunoregulatory and anti-inflammatory properties of *Crocus sativus* (Saffron) and its main active constituents: A review. *Iran J Basic Med Sci*. 2019; **22**(4):334. DOI: 10.22038/ijbms.2019.34365.8158 PMID: 31223464
36. Mohammadzadeh L, Abnous K, Razavi BM, Hosseinzadeh H. Crocin-protected malathion-induced spatial memory deficits by inhibiting TAU protein hyperphosphorylation and antiapoptotic effects. *Nutr Neurosci*. 2020; **23**(3):221-236. DOI: 10.1080/1028415X.2018.1492772 PMID: 30789100
37. Mehri S, Abnous K, Mousavi SH, Shariaty VM, Hosseinzadeh H. Neuroprotective effect of crocin on acrylamide-induced cytotoxicity in PC12 cells. *Cell Mol Neurobiol*. 2012; **32**(2):227-235. DOI: 10.1007/s10571-011-9752-8 PMID: 21901509
38. Mehri S, Abnous K, Khooei A, Mousavi SH, Shariaty VM, Hosseinzadeh H. Crocin reduced acrylamide-induced neurotoxicity in Wistar rat through inhibition of oxidative stress. *Iran J Basic Med Sci*. 2015; **18**(9):902-908. PMID: 26523222
39. Hadizadeh F, Mohajeri S, Seifi M. Extraction and purification of crocin from saffron stigmas employing a simple and efficient crystallization method. *Pak J Biol Sci*. 2010; **13**(14):691-698. DOI: 10.3923/pjbs.2010.691.698 PMID: 21848061
40. Vahdati Hassani F, Masjedi E, Hosseinzadeh H, Bedrood Z, Abnous K, Mehri S. Protective effect of crocin on bisphenol A - induced spatial learning and memory impairment in adult male rats: Role of oxidative stress and AMPA receptor. *Iran J Basic Med Sci*. 2020; **23**(9):1146-1154. DOI: 10.22038/ijbms.2020.41097.9714 PMID: 32963736
41. Kim ME, Park HR, Gong EJ, Choi SY, Kim HS, Lee J. Exposure to bisphenol A appears to impair hippocampal neurogenesis and spatial learning and memory. *Food Chem Toxicol*. 2011; **49**(12): 3383-3389. DOI: 10.1016/j.fct.2011.09.017 PMID: 21959526
42. Richter CA, Birnbaum LS, Farabolini F, Newbold RR, Rubin BS, Talsness CE, et al. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod Toxicol*. 2007; **24**(2):199-224. DOI: 10.1016/j.reprotox.2007.06.004 PMID: 17683900
43. Razavi BM, Hosseinzadeh H, Movassaghi AR, Imenshahidi M, Abnous K. Protective effect of crocin on diazinon induced cardiotoxicity in rats in subchronic exposure. *Chem Biol Interact*. 2013; **203**(3):547-555. DOI: 10.1016/j.cbi.2013.03.010 PMID: 23523949
44. Ahmadi M, Rajaei Z, Hadjzadeh M, Nemati H, Hosseini M. Crocin improves spatial learning and memory deficits in the Morris water maze via attenuating cortical oxidative damage in diabetic rats. *Neuroscience Lett*. 2017; **642**:1-6. DOI: 10.1016/j.neulet.2017.01.049 PMID: 28137647
45. Adabizadeh M, Mehri S, Rajabpour M, Abnous K, Rashedinia M, Hosseinzadeh H. The effects of crocin on spatial memory impairment induced by hyoscine: Role of NMDA, AMPA, ERK, and CaMKII proteins in rat hippocampus. *Iran J Basic Med Sci*.

- 2019;**22**(6):601-609. DOI: 10.22038/ijbms.2019.30138.7266 PMID: 31231486
46. Xu X, Gu T, Shen Q. Different effects of bisphenol-A on memory behavior and synaptic modification in intact and estrogen-deprived female mice. *J Neurochem*. 2015;**132**(5):572-582. DOI: 10.1111/jnc.12998 PMID: 25421748
 47. Xu X, Liu X, Zhang Q, Zhang G, Lu Y, Ruan Q, et al. Sex-specific effects of bisphenol-A on memory and synaptic structural modification in hippocampus of adult mice. *Horm Behav*. 2013;**63**(5):766-775. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2013.03.004 PMID: 23523742
 48. Khalili M, Hamzeh F. Effects of active constituents of Crocus sativus L., crocin on streptozocin-induced model of sporadic Alzheimer's disease in male rats. *Iran Biomed J*. 2010;**14**(1-2):59. PMID: 20683499
 49. Tamaddonfard E, Farshid AA, Asri-Rezaee S, Javadi S, Khosravi V, Rahman B, et al. Crocin improved learning and memory impairments in streptozotocin-induced diabetic rats. *Iran J Basic Med Sci*. 2013;**16**(1):91-100. PMID: 23638297
 50. Huang L, Liu Y, Jin W, Ji X, Dong Z. Ketamine potentiates hippocampal neurodegeneration and persistent learning and memory impairment through the PKC γ -ERK signaling pathway in the developing brain. *Brain Res*. 2012;**1476**:164-171. DOI: 10.1016/j.brainres.2012.07.059 PMID: 22985497
 51. Straiko MM, Young C, Cattano D, Creeley CE, Wang H, Smith DJ, et al. Lithium protects against anesthesia-induced developmental neuroapoptosis. *Anesthesiology*. 2009;**110**(4): 862-868. DOI: 10.1097/ALN.0b013e31819b5eab PMID: 19293695
 52. Shi M, Ding J, Li L, Bai H, Li X, Lan L, et al. Effects of Ketamine on Learning and Memory in the Hippocampus of Rats through ERK, CREB, and Arc. *Brain Sci*. 2020;**11**(1):27. DOI: 10.3390/brainsci11010027 PMID: 33383707
 53. Zhang L, Fang Y, Xu Y, Lian Y, Xie N, Wu T, et al. Curcumin improves amyloid β -peptide (1-42) induced spatial memory deficits through BDNF-ERK signaling pathway. *PLoS one*. 2015;**10**(6):e0131525. DOI: 10.1371/journal.pone.0131525 PMID: 26114940
 54. Benito E, Barco A. CREB's control of intrinsic and synaptic plasticity: implications for CREB-dependent memory models. *Trends Neurosci*. 2010;**33**(5):230-240. DOI: 10.1016/j.tins.2010.02.001 PMID: 20223527
 55. Razavi BM, Sadeghi M, Abnous K, Hasani FV, Hosseinzadeh H. Study of the role of CREB, BDNF, and VGF neuropeptide in long term antidepressant activity of crocin in the rat cerebellum. *Iran J Pharm Sci*. 2017;**16**(4):1452-1462. PMID: 29552054
 56. Sanhueza M, Lisman J. The CaMKII/NMDAR complex as a molecular memory. *Mol Brain*. 2013;**6**(1):1-8. DOI: 10.1186/1756-6606-6-10 PMID: 23410178
 57. Zalman G, Federman N, Romano A. CaMKII isoforms in learning and memory: localization and function. *Front Mol Neurosci*. 2018;**11**:445. DOI: 10.3389/fnmol.2018.00445 PMID: 30564099
 58. Viberg H, Lee I. A single exposure to bisphenol A alters the levels of important neuroproteins in adult male and female mice. *Neurotoxicology*. 2012;**33**(5):1390-1395. DOI: 10.1016/j.neuro.2012.09.002 PMID: 22981971