

The Effect of Royal Jelly on Depression and Anxiety in an Animal Model of Alzheimer's Disease

Maryam Azimpour¹, Mohammad Fathi^{*2}, Omid Dezfoulan³¹Department of Physical Education and Sport Sciences, Faculty of Literature, Lorestan University, Khorramabad, Iran²Department of Physical Education, Faculty of Humanities, Lorestan University, Khorramabad, Iran³Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran

Article Info:

Received: 28 June 2020

Revised: 29 Nov 2020

Accepted: 14 Dec 2020

ABSTRACT

Introduction: Royal Jelly (RJ) may exert positive effects on the function of the central nervous system. The aim of the present study was to investigate the effect of RJ on depression and anxiety in trimethyltin (TMT)-induced Alzheimer's disease (AD) model in rats. **Materials and Methods:** 32 rats were randomly divided into four groups; healthy (HC), AD, sham (SH), and RJ-treated. Forced Swimming Test (FST) for depression and Elevated Plus-Maze (EPM) for anxiety assessment were performed. Gene expression in the samples was measured using Real-Time PCR. **Results:** The dependent variable of immobility significantly increased in the AD group compared to the HC and RJ groups. Furthermore, the SH group has shown greater immobility than the HC group. The antioxidant indexes of superoxide dismutase and glutathione peroxidase were significantly greater in the RJ group compared to the SH and AD groups. These indexes were also higher in the HC group than in the SH and AD groups. The RJ and HC groups exhibited a significant reduction in anxiety behaviours compared to the other groups. **Conclusion:** RJ supplementation has the ability to modulate the mood in the TMT model of AD in rats and may exert beneficial effects in the treatment of AD.

Keywords:

1. Depression
2. Anxiety
3. Swimming

*Corresponding Author: Mohammad Fathi

Email: Fathi.m@lu.ac.ir

تأثیر ژل رویال بر افسردگی و اضطراب در مدل حیوانی بیماری آلزایمر

مریم عظیم پور^۱، محمد فتحی^{۲*}، امید دزفولیان^۳

^۱گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده ادبیات، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران
^۲گروه تربیت بدنی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران
^۳گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

اطلاعات مقاله:

پذیرش: ۲۴ آذر ۱۳۹۹

اصلاحیه: ۹ آذر ۱۳۹۹

دریافت: ۸ تیر ۱۳۹۹

چکیده

مقدمه: ژل رویال ممکن است اثرات مثبتی بر عملکرد سیستم اعصاب مرکزی اعمال نماید، هدف از تحقیق حاضر بررسی تأثیر ژل رویال بر افسردگی و اضطراب در مدل موش‌های آلزایمری شده ناشی از تری‌متیل‌تین بوده است. **مواد و روش‌ها:** ۳۲ سر موش صحرایی به طور تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند؛ سالم (HC)، (AD)، (SH) و تحت درمان با ژل رویال (RJ). آزمون شنای اجباری (FST) برای افسردگی و آزمون ارزیابی اضطراب با ماز بعلاوه (صلیبی) مرتفع (EMP) انجام شد. بیان ژن در نمونه‌ها با استفاده از تکنیک ریل‌تام اندازه‌گیری شد. **یافته‌ها:** متغیر وابسته بی‌حرکتی به طور معنی‌داری در گروه AD نسبت به گروه‌های HC و RJ افزایش یافته است؛ به‌علاوه گروه SH شاخص بی‌حرکتی بیشتری را نسبت به گروه HC نشان داده است. شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی سوپر اکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پروکسیداز به‌طور معنی‌داری در گروه RJ بیشتر از گروه‌های SH و AD شد، همچنین این شاخص‌ها در گروه HC بیشتر از گروه‌های SH و AD گردید؛ گروه‌های RJ و HC در مقایسه با سایر گروه‌ها کاهش معنی‌داری در رفتارهای اضطرابی از خود نشان دادند. **نتیجه‌گیری:** مکمل RJ توانایی تعدیل خلق و خو را در موش‌های صحرایی مدل تری‌متیل‌تینی آلزایمر دارد و ممکن است اثرات مفیدی در درمان آلزایمر داشته باشد.

واژه‌های کلیدی:

- ۱- افسردگی
- ۲- اضطراب
- ۳- شنا کردن

*نویسنده مسئول: محمد فتحی

پست الکترونیک: Fathi.m@lu.ac.ir

مقدمه

سالمندی، مرحله‌ای حساس در تحول روانی انسان است و تغییرات جسمانی، شناختی و اجتماعی خاصی به همراه دارد (۱). هم‌زمان با افزایش نسبت سالمندان در اکثر کشورهای جهان، شمار افراد مبتلا به دمانس^۱ (زوال عقل) نیز افزایش یافته است (۲). این مسئله به‌عنوان یک مشکل بهداشت جهانی، تلفات سنگینی بر افراد، جامعه و اقتصاد وارد کرده است (۲). گزارش‌ها حاکی است که در سال ۲۰۱۰ جمعیت بالای ۶۰ سال جهان ۷۵۵/۵۴ میلیون نفر و افراد مبتلا به آلزایمر حدود ۳۵/۵۶ میلیون نفر بوده و تخمین زده می‌شود که در سال ۲۰۵۰ افراد مبتلا به این بیماری به حدود ۱۱۵/۳۸ میلیون نفر برسند (۳). بیماری آلزایمر^۲ (AD) به‌عنوان مهم‌ترین و شایع‌ترین علت زوال عقل، نوعی اختلال مزمن، پیچیده و پیش‌رونده عصبی است که سبب از دست رفتن تدریجی حافظه، تغییرات شخصیتی و رفتارهای مخرب مانند انزوا، زودرنجی، افسردگی، بیقراری و پرخاشگری، توهم و اضطراب و اختلال در انجام فعالیت‌های روزانه بیمار می‌شود (۴). در مراحل آغازین AD، اختلالات شناختی غالباً با ناپایداری‌های خلقی و نشانه‌های افسردگی و اضطراب همراه است (۱). از طرفی شیوع AD در افرادی که سابقه افسردگی شدید را داشته‌اند بیشتر است (۵). اضطراب نیز خود در پیشرفت افسردگی انسانی دخیل است به‌طوری‌که از طریق اختلال در عملکرد هیپوکامپ سبب بروز افسردگی می‌گردد (۶)؛ بنابراین یکی از دلایل اصلی ابتلا به افسردگی، استرس مداوم و ناملایمات زندگی است، اما مکانیسم‌های سلولی و مولکولی، همچنین افسردگی ناشی از استرس هنوز به‌طور کامل مشخص نشده است (۷). اختلالات خلقی ازجمله اضطراب و افسردگی که شایع‌ترین بیماری‌های روانی -عاطفی هستند و توسط استرس در انسان ایجاد می‌شوند نیز در زمره شناخته شده‌ترین بیماری‌هایی هستند که همواره گریبانگیر انسان بوده و تلاش‌های زیادی جهت شناخت عوامل ایجادکننده، درمان و کنترل آن‌ها صورت گرفته است (۸). اضطراب (استرس) هسته اصلی و مرکزی اختلالات نوروتیک و یک احساس منتشر بسیار ناخوشایند و اغلب مبهم همراه با دلواپسی است و محققان عنوان کرده‌اند که هم پوشانی وسیعی بین اضطراب و افسردگی وجود دارد (۵). اختلال خلقی افسردگی که توأم با احساس مداوم غم و بی‌ارزشی است، با عوارض فیزیولوژیک و جسمی باعث کاهش کیفیت زندگی و احساس بی‌ارزشی و کم شدن کارایی فرد مبتلا در همه زمینه‌های شغلی، روابط اجتماعی و خانوادگی می‌گردد (۹). حدود ۳۵۰ میلیون نفر در سراسر جهان درگیر اختلالات افسردگی

هستند و به قدری متداول است که گاهی از آن به‌عنوان (سرماخوردگی روانی) یاد می‌شود (۱۰). نشان داده شده است که در اختلالات خلقی افسردگی و اضطراب مزمن ترکیبات پیش برنده آپوپتوز در هیپوکامپ افزایش می‌یابد؛ که در نهایت منجر به آتروفی و مرگ نورون‌ها و کاهش نورون‌زایی این نواحی می‌گردد (۶). در بروز اختلالات اضطرابی و افسردگی عوامل عصبی و هورمونی متعدد و مراکز عصبی مختلفی از جمله سیستم لیمبیک و هیپوکامپ درگیر می‌شوند (۱۱، ۱۲). اختلالات اضطرابی و افسردگی خود عمدتاً با نقص دفاع آنتی‌اکسیدانی و به دنبال افزایش فاکتورهای پیش التهابی و عوامل اکسیداتیو نیز به وجود می‌آیند که می‌تواند به بیماری آلزایمر منجر شود (۱۳-۱۴). محققان در حال کشف راه‌های جدید درمان AD هستند، درمان‌های جدید اصل بیماری را درمان نمی‌کنند، بلکه تنها علائم شناختی را بهبود می‌بخشد. استفاده از رژیم غذایی مناسب و تغییر در عادات و محیط زندگی، روش‌های غیر دارویی جلوگیری یا درمان اختلالات رفتاری ناشی از آلزایمر هستند (۱۵). با توجه به سبک زندگی افراد در دنیای مدرن و ماشینی امروز، انسان از طریق غذا، آب و هوا دائماً در معرض سموم شیمیایی مختلف قرار دارد، لذا مواجهه با برخی سموم و ترکیبات ارگانوتینی^۳، همچنین عناصر و فلزاتی که توسط انسان در طبیعت رها می‌شوند، نیز می‌توانند در بروز این بیماری دخیل باشند (۱۶-۱۷). یکی از سموم ارگانوتینه تری‌متیل‌تین کلراید^۴ (TMT) است، ترکیبی که در پلی و نیل کلراید^۵ و محصولات سیلیکونی مانند ظروف آشپزخانه، بسته‌بندی‌های مختلف مواد غذایی و آفت‌کش‌ها و سیستم آب خانگی و آب آشامیدنی و محیط‌های آبی و دریایی نیز دیده می‌شود (۱۶). مسمومیت با TMT سبب القای ضایعاتی در سیستم عصبی مرکزی^۶ (CNS) و بروز حالت شبه آلزایمر، اختلالات رفتاری -شناختی، اختلالات فراموشی، بی‌خوابی و افسردگی و پرخاشگری در انسان و حیوانات آزمایشگاهی شده است (۱۸). این ماده نوروٹوکسیک به‌طور انتخابی سبب القاء مرگ نورونی در سیستم لیمبیک و بخصوص تشکیلات هیپوکامپ می‌گردد (۱۹). در افرادی که به واسطه شغل خود در صنایع کشاورزی و کارخانه‌های تولید قلع، در معرض TMT قرار دارند سندرمی مشاهده می‌شود که با پرخاشگری، اختلال شناختی، از دست دادن شنوایی، عدم تعادل، نیستایوس و تشنج عضلانی همراه است (۲۰). روش‌های متفاوتی جهت القای آلزایمر تجربی در نمونه‌های آزمایشگاهی وجود دارد که تزریق درون صفاقی نروتوکسین TMT یکی از آن‌ها است، به‌منظور شبیه‌سازی مرگ سلول‌های مغز و القای آلزایمر در این تحقیق ترکیب بسیار قوی و سمی

^۱ Dementia^۲ Alzheimer's disease; AD^۳ Organotin^۴ Trimethyltin chloride; TMT^۵ PVC^۶ Central nervous system; CNS

نگهداری شدند. بر اساس راهنمایی شورای پژوهش ملی برای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی تلاش بر این شد که هرگونه استرس غیرضروری به حیوانات حذف گردد. موش‌ها به مدت یک هفته جهت سازگاری در شرایط استاندارد نگهداری شدند. در ادامه در روز هشتم تعداد ۲۴ سر از موش‌های صحرایی به‌وسیله TMT القای آلزایمر شدند. مقدار ۸ میلی‌گرم از این ماده را درون ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال (نرمال سالین) حل نموده و برای تزریق به موش‌های صحرایی آماده و مقدار ۸ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن موش‌های صحرایی سم TMT به موش‌های صحرایی به صورت صفاقی تزریق شد (۲۵). پس از تزریق TMT، جهت تشخیص آلزایمر با مشاهده یک سری علائم رفتاری در موش‌های صحرایی بررسی گردید. این علائم بالینی عبارت‌اند از: رعشه‌های عضلانی، افزایش دمای بدن، خونریزی از چشم و بینی، حالت تهوع، تشنج و پیچ و تاب‌های دمی (۲۶). در ادامه ۸ موش صحرایی در گروه کنترل سالم (HC) (بدون دستکاری تجربی)، قرار گرفتند و ۲۴ موش صحرایی آلزایمری شده با القای TMT به طور تصادفی به سه گروه ۱- کنترل آلزایمر (ADC) (دریافت سم TMT)، ۲- شم (SH) (حلال ژل رویال، سرم فیزیولوژی)، ۳- مصرف ژل رویال (RJ) (دریافت سم TMT + مصرف RJ) تقسیم شدند. کلیه مراحل کار با حیوانات، طبق قوانین حمایت از حیوانات آزمایشگاهی و با نظارت کمیته اخلاقی دانشگاه لرستان با کد اخلاق Lu.acra ۲۰۲۰، ۴۱ انجام شد. جهت تهیه عصاره ژل، ۱۰ گرم RJ را در ۱۰۰۰ سی‌سی آب مقطر دیونیزه ریخته و مخلوط را به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه کرده سپس محلول از صافی عبور داده خواهد شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و در هنگام تزریق با دوز ۱۰۰ mg/kg روزانه به مدت هشت هفته به‌صورت درون صفاقی تزریق شد (۲۷).

آزمون ارزیابی افسردگی با آزمون شنای اجباری (FST)

رفتارهای شبه افسردگی مبتنی بر ناامیدی در موش‌ها در آزمون شنای اجباری ارزیابی شد (۲۸). بر اساس نظریه درماندگی مارتین سلیگمن، در صورتی که حیوان در معرض استرس مداوم قرار گیرد و راه گریزی از آن نداشته باشد، رفته رفته امید به گریز از این شرایط را از دست داده و تحرک و فعالیت خود را متوقف می‌نماید و بی‌حرکت می‌شود (۲۹). برای اندازه‌گیری زمان بی‌حرکتی مجموعه زمان‌هایی که جانور بی‌حرکت می‌ماند را طی یک محدوده زمانی مشخص که شامل ۶ دقیقه که یک دقیقه برای تطابق حیوان با محیط و ۵ دقیقه مابقی زمان ثبت گردید. افزایش زمان

TMT بر روی موش استفاده شده است (۱۹). از آنجا که یکی از عوامل آسیب‌رسان به سیستم عصبی و اختلالات عصبی استرس‌های اکسیداتیو و گونه‌های واکنشی فعال است؛ و افسردگی نیز به دنبال افزایش فاکتورهای پیش التهابی و عوامل اکسیداتیو به وجود می‌آید، بنابراین به نظر می‌رسد استفاده از رژیم غذایی حاوی آنتی‌اکسیدان‌ها بتواند بر اختلالات خلقی و افسردگی ناشی از آلزایمر مؤثر باشد (۱۳، ۷). یکی از مواد غذایی طبیعی سرشار از آنتی‌اکسیدان‌ها ژل رویال^۷ (RJ) است. RJ نوعی ماده غذایی است که توسط غدد تحت فکی زنبورهای کارگر جوان ترشح می‌شود و غذای ضروری برای لاروهای جوان زنبور عسل و ملکه است (۲۱). RJ به طور عمده از پروتئین‌ها، قندها، چربی‌ها (شامل استرول‌ها و اسیدهای چرب) و مقادیر ناچیزی از نمک‌های معدنی و ویتامین‌ها تشکیل شده است (۲۲). مشخص شده است که این مواد فعالیت‌های فارماکولوژیکی متفاوتی از قبیل خواص ضد توموری، آنتی‌اکسیدانی و مهار رادیکال‌های آزاد، نوروتروفیک، تقویت سیستم ایمنی بدن، ضد آلرژیک، ضد پیری، اتساع‌دهنده عروق، کاهش دهنده فشار خون، ضد هایپرکلسترولمی، فعالیت‌های ضدالتهابی و همچنین تحریک‌کننده رشد و نورون‌ها را نشان می‌دهند. به همین دلیل بیش از ۳۰ سال است که RJ برای استفاده‌های تجاری در تولیدات دارویی، غذاهای مقوی و لوازم آرایشی بکار می‌رود (۲۳). اکثر مطالعاتی که تاکنون انجام شده به صورت مولکولی و بیوشیمیایی بوده و کمتر به جنبه‌های رفتاری توجه شده است (۲۴)؛ بنابراین در این تحقیق میزان اثر بخشی RJ به‌عنوان یک مکمل غذایی بی‌ضرر و طبیعی برای کاهش اختلالات خلقی ناشی از القای آلزایمر با سم نروتوکسین TMT مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

جامعه تحقیق حاضر را ۳۲ سر موش صحرایی نژاد اسپراگ داوولی^۸ نر تشکیل دادند که در پاییز سال ۱۳۹۷ از بین موش‌های نر هشت هفته‌ای مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت انتخاب شده و به آزمایشگاه فیزیولوژی دانشگاه آزاد مرودشت منتقل گردیدند. دمای مطلوب سالن نگهداری حیوانات ۲۰ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی حدود ۵۵ تا ۶۵ درصد کنترل و ثبت شد. چرخه روشنایی- تاریکی نیز هر ۱۲ ساعت یک بار به طور دقیق توسط تنظیم‌کننده الکترونیکی نور سالن نگهداری حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد. حیوانات با دسترسی آزادانه به آب و غذا و به صورت چهارتایی در قفس‌ها

⁷ Royal Jelly; RJ

⁸ Sprag dowley

بررسی میزان بیان ژنهای SOD و GPX

پس از پایان یافتن آزمون‌های رفتاری حیوانات با کتامین ۱۰ درصد (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و زایلین ۲ درصد (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) بیهوش شده و پس از خون‌گیری از قلب، بافت هیپوکامپ از مغز جدا شده و بلافاصله در میکروتیوب‌هایی با حجم ۱/۵ میلی لیتر با برچسب متناسب با بافت، موش‌های صحرایی و ساعت تشریح و گروه مورد آزمایش، به سرعت و با ازت مایع منجمد و برای تجزیه و تحلیل بعدی به یخچال ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. در ابتدا بافت‌ها با روش‌های مکانیکی خرد و هموژنیز شدند. برای استخراج RNA ابتدا ۳۵۰ میکرولیتر از بافر لیزکننده RB Buffer به نمونه (رسوب سلولی حاصل از سانتریفیوژ) اضافه شد (از قبل به ازای هر ۱ میلی لیتر ۱۰ میکرولیتر β -mercaptoethanol به بافر اضافه شده است) و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد؛ در مرحله بعد Filter Column درون Collection Tube قرار گرفت و با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ گردید. بعد از سانتریفیوژ محلول روشن به یک تیوپ میکروسانتریفیوژ جدید انتقال یافت. پس از طی مراحل سانتریفیوژ محلول درون RNA Elution Tube های استخراج شده بود که در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سنتز cDNA طبق دستورالعمل موجود در کیت فرمنتاز (K۱۶۲۱) تهیه گردید. جهت بررسی بیان ژن‌ها با استفاده از Real-time PCR تمام پرایمرها توسط نرم‌افزار Allele ID۷,۸ طراحی شد و از ژن $\beta 2m$ (بتا ۲ میکروگلوبولین) به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید (جدول ۱). تمام پرایمرها به صورت اتصال اگزون -اگزون طراحی شد. جهت اطمینان از عدم تکثیر DNA ژنومی از ۲۵ نانوگرم cDNA و ۲۵ نانوگرم RNA تیوب‌های جداگانه از واکنش PCR و به کارگیری از ژل آگاروز ۱/۵ درصد استفاده شد. تکثیر cDNA و مشاهده باند مورد انتظار توسط پرایمر اختصاصی و عدم تکثیر RNA پس از واکنش PCR نمایانگر عدم تکثیر DNA ژنومی می‌باشد. سپس برای هر یک از پرایمرها کارایی PCR اندازه‌گیری و منحنی استاندارد برای آن‌ها رسم گردید. جهت بررسی بیان ژن‌ها برای گروه‌های سلولی از مخلوط PCR، RealQ 2x Master mix Green Dye (ساخت AMPLQON آلمان) طبق دستورالعمل کیت استفاده شد. پس از اتمام فعالیت دستگاه و مشاهده نمودارها مبنی بر افزایش تعداد قطعه مورد نظر و میزان نشر فلورسانس با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ میزان بیان ژن

بی‌حرکتی را معادل افسردگی و کاهش آن را به مثابه اثر بخشی درمان ضد افسردگی در نظر می‌گیرند. روش آزمایش به این صورت بود که ظرف شیشه‌ای به طول ۲۵ سانتی‌متر و عرض ۱۲ سانتی‌متر با ارتفاع ۱۵ سانتی‌متر از آب ۲۵ درجه پر شده و حیوان از ارتفاع ۲۰ سانتی‌متری و به ملایمت درون آب قرار داده شد و به طور قراردادی، قطع حرکات دست و پای موش به عنوان بی‌حرکت شدن در نظر گرفته شد (۲۸).

آزمون ارزیابی اضطراب در ماز به علاوه (صلیبی) مرتفع یا دستگاه (EMP)

دستگاه EMP^۹ برای ارزیابی آزمون رفتاری اضطراب استفاده شد که مدلی استاندارد جهت ارزیابی سطح اضطراب در جوندگان است. این دستگاه شامل دو بازوی باز (هر یک ۵۰ الی ۱۰۰ سانتی‌متر و دو بازوی بسته ۵۰ سانتی‌متری) و یک کفه مرکزی (۴۰×۱۰) می‌باشد. بازوهای باز روبروی هم و بازوهای بسته هم روبروی یکدیگر قرار دارند. این دستگاه حدود ۵۰ سانتی‌متر از کف اتاق بالاتر قرار می‌گیرد. هر موش به مدت ۵ دقیقه در ماز قسمت کفه و رو به بازوی باز قرار داده شد و شاخص‌های استاندارد ارزیابی اضطراب از طریق مشاهده آن‌ها بررسی و فعالیت‌های جستجوگرانه ثبت گردید که شامل: ۱- زمانی که هر حیوان در بازوهای بسته و یا باز سپری کرده ۲- تعداد ورود به بازوهای باز و بسته. افزایش ورود به بازوهای باز و افزایش مدت سپری شده در بازوی باز شاخص کاهش اضطراب در موش تلقی می‌شود. منظور از ورود به بازوی باز یا بسته، قرار گرفتن هر چهار پای حیوان در بازوی موردنظر است. برای هر حیوان درصد ورود به بازوی باز (OAE)^{۱۰} و درصد ماندن در بازوی باز (OAT)^{۱۱} به طریق زیر محاسبه شد (۳۰):

$$OAT = \frac{\text{مدت زمان ماندن در بازوی باز}}{\text{مدت زمان توقف در بازوی باز} + \text{مدت زمان توقف در بازوی بسته}} \times 100$$

$$OAE = \frac{\text{تعداد ورود به بازوی باز}}{\text{تعداد ورود به بازوی باز} + \text{تعداد ورود به بازوی بسته}} \times 100$$

⁹ Elevated Plus Maze¹⁰ Open Arm Entries¹¹ Open Arm Time

جدول ۱- لیست پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

Genes	Primer Sequences	Sizes (bp)
B2m	Forward: 5'- CGTGCTTGCCATTTCAGAAA -3'	244
	Reverse: 5'- ATATACATCGGTCTCGGTGG -3'	
SOD	Forward: 5'- CAAGGAACCCACAGGCCTTAT -3'	133
	Reverse: 5'- GGCTAACATTCTCCCAGTTGA -3'	
Gpx1	Forward: 5'- CATTGAGAATGTCGCGTCCC -3'	141
	Reverse: 5'- TTGCCATTCTCCTGATGTCCG -3'	

وابسته در گروه‌ها از طریق روش تحلیل واریانس چند متغیره^{۱۲} (MANOVA) مورد مقایسه قرار گرفتند. جدول ۲ یافته‌های توصیفی متغیرهای وابسته مربوط به شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی SOD, GPX و شاخص بی‌حرکتی مربوط به آزمون افسردگی شنای اجباری و شاخص‌های OAT و OAE که به ترتیب معرف درصد ورود به بازوی باز و درصد ماندن در بازوی باز، مربوط

مورد نظر نسبت به B2m و گروه کنترل سنجیده شد. ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو ویلک ارزیابی و برای مقایسه گروه‌ها از آزمون مانووا و آزمون تعقیبی شفه استفاده گردید.

یافته‌ها

برای تجزیه و تحلیل داده‌های پژوهش، متغیرهای

جدول ۲- یافته‌های توصیفی به تفکیک گروه‌ها

گروه	متغیر وابسته	انحراف استاندارد	میانگین
ژل شم کنترل سالم کنترل آلزایمر	بی‌حرکتی	۲۷/۲۴۵۷۹	۱۳۰/۰۰۰۰
		۲۱/۳۷۹۹۰	۱۶۸/۵۰۰۰
		۲۶/۰۷۱۰۶	۱۱۷/۲۰۰۰
		۲۵/۳۱۷۳۲	۲۰۷/۱۶۶۷
ژل شم سالم هفته آخر کنترل آلزایمر	SOD	۰/۲۰۷۸۳	۱/۱۷۴۳
		۰/۱۶۹۸۷	۰/۶۹۸۳
		۰/۰۹۶۸۰	۱/۰۲۸۰
		۰/۰۵۰۹۹	۰/۴۶۰۰
ژل شم کنترل سالم کنترل آلزایمر	GPX	۰/۱۴۲۴۷	۰/۱۴۳۳
		۰/۱۱۷۱۱	۰/۶۰۰۹
		۰/۱۲۳۰۷	۰/۵۹۶۶
		۰/۱۳۷۱۸	۰/۷۰۶۵
ژل شم کنترل سالم کنترل آلزایمر	OAE	۱۰/۲۴۹۸۵	۵۹/۶۴۲۹
		۸/۲۵۲۸۴	۴۰/۵۰۳۳
		۹/۱۳۰۵۴	۵۶/۶۶۸۰
		۱۴/۴۰۴۸۶	۲۸/۵۰۰۰
ژل شم کنترل سالم کنترل آلزایمر	OAT	۱/۶۱۱۲۷	۷/۶۸۵۱
		۱/۰۱۲۰۳	۵/۰۳۱۲
		۱/۲۸۸۴۷	۸/۳۷۰۹
		۱/۴۸۸۹۹	۵/۰۳۱۸

¹² Multivariate analysis of variances

ریشه روی^{۱۸} ۴۱/۰۰۲ حاکی از معنی‌داری شاخص‌ها لااقل در یکی از گروه‌ها و متغیرها بود ($P < ۰/۰۵$).

جدول ۴ نتایج آزمون تحلیل واریانس چند متغیری به تفکیک متغیرهای وابسته را نشان می‌دهد. همان‌طور که در جدول مشاهده می‌شود برای متغیرهای SOD, GPX, OAE, OAT و بی‌حرکتی شاخص F واجد معنی‌داری است ($P < ۰/۰۵$). بررسی اندازه اثر نشان می‌دهد که مداخله‌ها بیشترین اثر را بر روی SOD اعمال

به آزمون اضطراب ماز بعلاوه مرتفع است را به تفکیک گروه‌ها نشان می‌دهد.

پس از بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها با آزمون شاپیرو ویلک^{۱۳} و همگنی واریانس با آزمون لون^{۱۴} با سطح معنی‌داری بیشتر از ۰/۰۵، نتایج کلی تحلیل واریانس چندگانه مطابق جدول ۳ بررسی گردید که در هر چهار شاخص زیر ۰/۰۵ بود و اثر پیلایی^{۱۵} (۵/۳۲۳)، لامبادای ویلکس^{۱۶} ۹/۵۹۷، رد هاتلینگ^{۱۷} ۱۳/۹۵۷ و بزرگ‌ترین

جدول ۳- نتایج کلی تحلیل واریانس چندگانه

اثر کلی	F	معنی‌داری	مجذور اتا
اثر پیلایی	۵/۳۲۳	۰/۰۰۰۱	۰/۵۹۷
لامبادای ویلکس	۹/۵۹۷	۰/۰۰۰۱	۰/۷۳۵
رد هاتلینگ	۱۳/۹۵۷	۰/۰۰۰۱	۰/۸۲۶
بزرگ‌ترین ریشه روی	۴۱/۰۰۲	۰/۰۰۰۱	۰/۹۱۹

شماره

جدول ۴- نتایج آزمون تحلیل واریانس چند متغیری به تفکیک متغیرهای وابسته

متغیر وابسته	مجذور اتا	معنی‌داری	F
بی‌حرکتی	۰/۶۹۵	۰/۰۰۰۱	۱۵/۲۱۷
SOD	۰/۸۱۱	۰/۰۰۰۱	۲۸/۵۶۳
GPX	۰/۷۸۴	۰/۰۰۰۱	۲۴/۲۰۹
OAE	۰/۶۲۴	۰/۰۰۰۱	۱۱/۰۶۲
OAT	۰/۵۸۱	۰/۰۰۰۱	۹/۲۳۲

شماره

بیشتر از شم و کنترل آلازایمر شد؛ و GPX در گروه ژل بیشتر از شم و کنترل سالم و کنترل آلازایمر شد؛ و در مورد شاخص‌های مربوط به اضطراب OAE گروه ژل بیشتر از شم و کنترل آلازایمر و گروه کنترل سالم بیشتر از کنترل آلازایمر شد؛ و OAT در گروه ژل بیشتر از شم و کنترل آلازایمر و در گروه کنترل سالم بیشتر از گروه‌های شم و کنترل آلازایمر شد.

بحث و نتیجه‌گیری

طی این پژوهش به بررسی اثر سمیت TMT در القای حالت شبه آلازایمر و ارتباط آن با اختلالات رفتاری افسردگی و اضطراب در موش‌های صحرایی بالغ پرداخته شد، سپس اثر آنتی‌اکسیدانی RJ در مهار التهاب مغزی و بهبود افسردگی و اضطراب ناشی از این مسمومیت مورد بررسی قرار گرفت. در پژوهش‌های پیشین عنوان

کرده‌اند. نتایج تحلیل واریانس چند متغیری نشان می‌دهد که در هر پنج متغیرهای GPX, SOD, OAT, OAE و بی‌حرکتی حداقل در یکی از گروه‌ها تفاوت معنی‌دار وجود دارد. برای بررسی این که در کدامیک از گروه‌ها تفاوت معنی‌دار است از آزمون تعقیبی شفه^{۱۹} استفاده شده است که در جدول شماره ۵ به تفکیک متغیرهای وابسته، با ($P < ۰/۰۵$) تفاوت‌های معنی‌دار ما بین گروه‌ها مشخص شده است.

در کل با عطف به نتایج آزمون شفه و تفاضل میانگین‌های گروه‌های معنی‌دار شده، یافته‌های تحقیق حاضر نشان می‌دهد که متغیر وابسته بی‌حرکتی در گروه‌های کنترل آلازایمر نسبت به گروه کنترل سالم و ژل افزایش یافته است؛ و در گروه شم بیشتر از کنترل سالم شد؛ و شاخص آنتی‌اکسیدانی SOD در گروه ژل بیشتر از شم و کنترل آلازایمر و در گروه کنترل سالم

¹³ Shapiro-Wilk Test

¹⁴ Levene's Test

¹⁵ Pillai's Trace

¹⁶ Wilks' Lambda

¹⁷ Hotelling's Trace

¹⁸ Roy's Largest Root

¹⁹ Scheffé post hoc test

جدول ۵- آزمون تعقیبی شفه به تفکیک متغیرهای وابسته

متغیر مستقل	گروه	گروه	معنی داری
بی حرکتی	کنترل سالم	کنترل آلزایمر	۰/۰۰۰
		شم	۰/۰۲۷
	کنترل آلزایمر	ژل	۰/۰۰۰
GPX	ژل	شم	۰/۰۰۰
		کنترل آلزایمر	۰/۰۰۰
		کنترل سالم	۰/۰۰۰
OAE	ژل	شم	۰/۰۳۹
		کنترل آلزایمر	۰/۰۰۱
	کنترل سالم	کنترل آلزایمر	۰/۰۰۴
OAT	ژل	شم	۰/۰۲۳
		کنترل آلزایمر	۰/۰۲۳
	کنترل سالم	شم	۰/۰۰۸
		کنترل آلزایمر	۰/۰۰۸
SOD	ژل	شم	۰/۰۰۰
		کنترل آلزایمر	۰/۰۰۰
	کنترل سالم	شم	۰/۰۱۶
		کنترل آلزایمر	۰/۰۰۰

شفاخته

مسئله را اختلال در انتقال عصبی نوروآدرنژیکی می دانند (۱۶، ۳۲)؛ همچنین نشان داده اند که مسمومیت با TMT سبب القا ضایعاتی در CNS و افزایش فعالیت های پرخاشگرانه و رفتارهای توأم با اضطراب در موش های صحرایی می شود (۱۹، ۱۷)؛ هر چند مشاهده شده است که بروز این گونه رفتارها در حیوانات مختلف بسته به گونه، نژاد، سن، دوز تزریق TMT و یا شیوه تجویز TMT متفاوت است (۳۳). در تست اضطراب با دستگاه (EMP) حیوان مضطرب از حضور در فضایی باز و بدون دیوار هراس و اضطراب دارد و ترجیح می دهد که در بازوهای بسته باقی بماند. از طرفی، کاهش دفعات ورود حیوان به بازوهای باز همراه با کاهش زمان حضور آن ها نیز بود

شده است که TMT سبب القا آسیب انتخابی و مرگ نرونی در سیستم عصبی می شود همچنین دارای اثرات نوروتوکسیک بالقوه در سیستم لیمبیک به ویژه هیپوکامپ است که موجب القای آلزایمر تجربی می شود (۱۶). مطالعات چندی نشان داده اند که پاتوژنز مشترکی بین اختلالات سایکولوژیک و بیماری های تحلیل برنده عصبی دیده می شود و در واقع بین اختلالاتی نظیر افسردگی و اضطراب با مرگ نرونی در هیپوکامپ و عوامل التهابی رابطه مستقیمی وجود دارد (۳۱، ۲۳، ۵). هم سو با نتایج این تحقیق پژوهشگرانی عنوان نموده اند که تجویز TMT سبب کاهش رفتارهای اکتشافی و زمان حرکت گریزی در موش های صحرایی می شود و علت این

اسیدهای چرب غیراشباع هستند که در مقابل حملات رادیکال‌های آزاد آسیب‌پذیری خاصی دارند (۲۱)؛ بنابراین مواد حاوی آنتی‌اکسیدان می‌توانند نقش مهمی در جلوگیری و درمان بیماری‌های مزمن، تحلیل برنده عصبی بازی کنند (۳۶). در شرایط نرمال، یک تعادل بین تولید رادیکال‌های آزاد و تخریب آن‌ها به وسیله سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی وجود دارد (۱۹). آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند با سازوکارهای مختلفی عمل کنند مکانیسم‌هایی همانند برداشت اکسیژن یا کاهش غلظت موضعی اکسیژن و قطع کردن واکنش‌های زنجیره‌ای و به طور کلی قابلیت یک آنتی‌اکسیدان در خنثی کردن گونه‌های فعال اکسیژن و رادیکال‌های آزاد به عوامل مختلفی بستگی دارد که ازجمله آن‌ها می‌توان به محل تولید رادیکال آزاد و میزان فعالیت آن و تداخل با دیگر آنتی‌اکسیدان‌ها و جذب و توزیع متابولیسم آنتی‌اکسیدان‌ها اشاره کرد (۳۷). آنتی‌اکسیدان‌ها هم در داخل بدن سنتز و هم از طریق رژیم غذایی جذب می‌شوند. آنتی‌اکسیدان‌ها به طور کلی به دو دسته تقسیم‌بندی می‌شوند: آنزیمی و غیر آنزیمی. مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز SOD و گلوکاتایون پراکسیداز GPX هستند (۳۶). در مطالعه حاضر افزایش سطح GPX و SOD در گروه تیمار ژل نسبت به گروه‌های شام و آلزایمر هفته آخر دیده شد؛ که نشان‌دهنده تأثیر خاصیت آنتی‌اکسیدانی RJ در مهار عوامل بروز استرس‌های اکسیداتیو است. بیشتر نیز گزارش شده است که RJ فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی داشته و توانایی مهار رادیکال‌های آزاد مانند یون سوپراکساید و رادیکال هیدروکسیل را دارد؛ همچنین باعث تقویت سیستم کولینرژیک شده و از این طریق باعث تقویت سیستم عصبی خود مختار می‌شود (۲۲، ۳۸). RJ حاوی استرول‌ها و اسیدهای چرب، نمک‌های معدنی و ویتامین‌ها است (۲۳). مشخص شده است که این مواد فعالیت‌های فارماکولوژیکی متفاوتی از قبیل خواص ضدتوموری، ضد میکروبی، اتساع دهنده عروق، کاهش دهنده فشارخون، تحریک‌کننده رشد، مقاومت در مقابل عفونت‌ها، ضد هایپرکلسترولمی و فعالیت‌های ضدالتهابی دارند که این خصوصیات می‌تواند باعث افزایش طول عمر و به تعویق افتادن سالمندی گردد (۲۴). اثرات مفید ناشی از RJ بر روی مغز را به یکسری ترکیبات موجود در آن نسبت داده‌اند که از طریق دستگاه گوارش جذب و از سد خونی-مغزی عبور می‌کنند. در بین مواد فعالی که در RJ موجود است پپتیدهای کوچک و اسیدهای چرب غیراشباع کوچک مولکول جالب توجه هستند که از هیدرولیز پروتئین‌های بزرگ

که خود شاخصی برای وجود رفتارهای اضطرابی در موش‌ها می‌باشد (۳۰). با این اوصاف، با توجه به نتایج تحقیق که میزان اضطراب را در گروه آلزایمر هفته آخر نسبت به گروه سالم هفته آخر بیشتر نشان داده است (از طریق کاهش OAE, OAT) لذا می‌توان عنوان کرد که به دنبال مسمومیت با TMT میزان اضطراب افزایش داشته است؛ نیز در گروه ژل نسبت به شام و آلزایمر هفته آخر افزایش OAE و OAT نشان‌دهنده کاهش اضطراب به دنبال تزریق هشت هفته ژل رویال بوده است که نشان‌دهنده تأثیر مثبت مصرف ژل رویال در کاهش اضطراب ناشی از مسمومیت با TMT است. یکی از نواحی مغز بالغ که نورون‌زایی به طور مستمر در آن رخ می‌دهد ناحیه شکنج دنداندار از تشکیلات هیپوکامپ است (۶). از آنجا که هیپوکامپ از ساختارهای مهم مغز می‌باشد که در رابطه با بروز رفتارهای افسردگی و اضطراب هست (۳۴)؛ تحقیقات نشان داده‌اند شرایطی که باعث افزایش نورون‌زایی و یا ممانعت از مرگ نورونی تحت شرایط متفاوت پاتولوژیکی و یا بهبود فرایند یادگیری و حافظه و خلق و خو می‌گردند (۶)؛ بنابراین می‌توان به این موارد نیز اشاره داشت که کاهش اضطراب و افسردگی به دنبال مصرف ژل می‌تواند از تغییرات در هیپوکامپ ناشی شود. یافته‌های تحقیق حاضر نشان می‌دهد که در تست شنای اجباری متغیر وابسته بی‌حرکتی گروه‌های ژل نسبت به گروه آلزایمر هفته آخر و سالم هفته آخر نسبت به گروه شام و آلزایمر هفته آخر کاهش یافته است که تأثیر مثبت RJ را در کاهش افسردگی نشان می‌دهد. محققان دپارتمان روانپزشکی و مطالعات خودکشی، گروه مک‌گیل در کبک کانادا دریافتند که بعضی از سلول‌های مغز در بیماران متأثر از افسردگی بزرگ‌تر و ملتهب می‌شوند که این تغییرات می‌تواند به عنوان تأیید نظریه التهاب نورونی در افسردگی شناخته شود (۳۵، ۵). با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد مصرف RJ با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی و نورون‌زی در مدل مسمومیت ناشی از TMT به عنوان الگویی از بیماری آلزایمر، بیش‌فعالی و سطح بالای اضطراب و افسردگی ناشی از آن را کاهش می‌دهد. یکی از فاکتورهایی که در پاتونز فرایند پیری و بیماری‌های تحلیل برنده عصبی نقش اصلی را بازی می‌کند استرس اکسیداتیو (عدم تعادل بین رادیکال‌های آزاد و سیستم آنتی‌اکسیدان) است (۲۱). رادیکال‌های اکسیژن می‌توانند به پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و غشاهای چربی حمله کرده و در پی آن منجر به ایجاد اختلال در رشد و نمو و عملکرد سلول شوند (۱۹). بافت‌های مغز حاوی مقادیر زیادی از

افزایش رفتار جستجوگرانه و کاهش اضطراب از طریق تست ماز به علاوه و شنای اجباری تأثیری را نشان نداد (۲۲). در مطالعه‌ای که توسط یانگمینگ^{۲۲} و همکاران انجام شد نشان داد که مصرف خوراکی RJ به مدت ۱۲ هفته به میزان قابل توجهی باعث بهبود عملکرد مغزی در خرگوش شد و باعث کاهش سطح آمیلویید بتا، افزایش SOD و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و رفتارهای شناختی در مغز شد (۲۳). مطالعات نشان داده‌اند که بیماری آلزایمر با سطح بالای کلسترول نیز در ارتباط است چرا که تجمع کلسترول می‌تواند باعث تسریع تشکیل پلاک آمیلویید بتا شود (۴۱) بنابراین از آنجایی که RJ می‌تواند چربی و کلسترول خون را نیز کاهش دهد و احتمالاً از طریق فعال کردن فرم بتای گیرنده‌های استروژن^{۲۳} (ER) نیز می‌تواند بر روی اختلالات رفتاری اثر مثبت بگذارد (۲۳). در پایان، مطابق با پیش‌بینی‌های مطالعات اخیر، نتایج ما از نظر رفتاری نشان دادند که RJ اثرات مفیدی بر کاهش اختلالات رفتاری ناشی از تخریب عصبی ایجاد شده توسط TMT دارد و ممکن است بتواند به عنوان ابزاری نوید بخش برای تقویت عملکرد عصبی و بازسازی نورون‌ها؛ در نتیجه بهبود فرآیندهای حافظه و شناخت و خلق و خو باشد. از آنجایی که طی این مطالعه مشخص گردید تجویز TMT سبب بروز رفتارهای شبه افسردگی و اضطرابی در موش‌های صحرایی می‌گردد؛ لذا مدل تخریب عصبی القا شده با TMT می‌تواند به عنوان یک مدل پایدار در مطالعه اختلالات رفتاری ناشی از بیماری آلزایمر مورد بررسی قرار گیرد و مدل معتبری برای بررسی فرضیات آن باشد همچنین مطالعه حاضر با بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی و ضدافسردگی و اضطراب RJ نشان داد که مصرف مکمل RJ قابلیت تعدیل خلق را در مدل حاضر دارد و می‌تواند به عنوان یک روش سودمند مورد استفاده انسانی قرار گیرد.

RJ به دست می‌آیند، آمینواسیدهای آزاد، اسیدهای چرب ۱۰ کربنه (HDA-۱۰) و AMP-N1 oxide و ترکیب منحصر به فرد اسید ۱۰- هیدروکسی ترانس ۲- دکانویک (HDEA)، از جمله آن‌هاست (۲۲). عنوان شده است که HDEA اثرات فاکتور نورون‌زایی مشتق شده از مغز^{۲۰} (BDNF) را تقلید کرده و احتمالاً نورون‌زایی در مغز بالغ را تحریک می‌کند (۲۲). نشان داده شده است که پپتیدهای کوچک مستخرج از RJ با ۲-۴ اسید آمینه که در انتهای c خود حاوی tyr است، خاصیت آنتی‌اکسیدانی بسیار قوی دارد که باعث پاکسازی رادیکال هیدروکسیل می‌شود (۲۲)، همچنین احتمالاً HDA-۱۰ می‌تواند باعث کاهش اضطراب در موش‌های صحرایی مسن از طریق کاهش مرگ نرونی شود (۳۹). دیگر ترکیب سودمند اثرگذار بر روی سیستم عصبی که تنها در RJ موجود است، آدنوزین منو فسفات AMP N1-oxide (adenosine monophosphate) است که به عنوان یک فاکتور نروتروفیک عمل می‌کند (۲۴). در کل این ترکیبات بیواکتیو موجود در RJ بر عملکردهای مغز اثرات مفید دارد و ممکن است در حفظ سلامت و یا استفاده‌های کلینیکی در پیشگیری و درمان برخی از اختلالات عصبی نقش استراتژیک داشته باشد (۲۲). همچنین تحقیقات بر روی موش‌های مسن آزمایشگاهی نشان داده است که تجویز طولانی مدت RJ می‌تواند بر انتقال دهنده‌های عصبی مغز در موش‌های صحرایی و روند کپولت سن تأثیر بگذارد (۴۰). مطابق با پیش‌بینی‌های مطالعات اخیر، نتایج ما از نظر رفتاری نشان دادند که RJ اثرات مفیدی بر عملکردهای عصبی دارد. در تحقیقی که توسط تیاگو^{۲۱} و همکاران بر روی تیمار از طریق خوردن RJ بر روی موش‌های صحرایی آلزایمری صورت گرفت نشان داد که RJ باعث کاهش استرس‌های اکسیداتیو و افزایش نورون‌زایی در هیپوکامپ موش‌های صحرایی شد و عملکردهای شناختی را بهبود بخشید و برخلاف تحقیق حاضر RJ خوراکی بر روی

منابع

- Jiang W. Depression and Cardiovascular Disorders in the Elderly. *Clinics in geriatric medicine*. 2020; 36(2): 211-9.
- Rector S, Stiritz S, Morley JE. Editorial: Sexuality, Aging, and Dementia. *The journal of nutrition, health & aging*. 2020; 24(4): 366-70.
- Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP. The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's & dementia*. 2013; 9(1): 63-75.
- Lopez C, Sanchez JL, Martin J. [Exploratory analysis of the influence of cognitive reserve on the benefits of cognitive stimulation therapy in patients with sporadic late-onset Alzheimer's disease]. *Revista de neurologia*. 2020; 70(8): 271-81.
- Slavich GM, Irwin MR. From stress to inflammation and major depressive disorder: a social signal transduction theory of depression. *Psychological bulletin*. 2014; 140(3): 774.
- Guest PC, Rahmoune H, Martins-de-Souza D. Proteomic Analysis of Rat Hippocampus for Studies of Cognition and Memory Loss with Aging. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2020; 2138: 407-17.
- Seymen CM, Cakir Gundogdu A, Bulut DI, Yilmaz

²⁰ Brain-Derived Neurotrophic Factor

²¹ Tigo

²² Yangming

²³ Estrogen Receptor

- Demirtas C, Elmas C. Royal jelly increased map-2 expression in hippocampal neurons of hypothyroid rats: an immunohistochemical study. *Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission*. 2020; 95(1): 46-54.
8. Micheli L, Ceccarelli M, D'Andrea G, Tirone F. Depression and adult neurogenesis: Positive effects of the antidepressant fluoxetine and of physical exercise. *Brain Res Bull*. 2018; 143: 1-93-81.
9. Bashi Abdolabadi H, Pilevar S, Saram AA. The Effect of Cognitive Rehabilitation on Cognitive Function, Memory, Depression, and Anxiety in Patients with Multiple Sclerosis. *The Neuroscience Journal of Shefaye Khatam*. 2016; 4(3): 28-40.
10. Markadeh RA, Dehghani A. The Effectiveness of Group-Based Dialectic Behavioral Therapy on Depression and Perceived Stress of Female Students. *Journal of Nursing Education (JNE)*. 2019; 7(6).
11. Zhong H, Rong J, Zhu C, Liang M, Li Y, Zhou R. Epigenetic modifications of GABAergic interneurons contributes to the deficits in adult hippocampus neurogenesis and depression-like behavior in prenatally stressed mice. *The international journal of neuropsychopharmacology*. 2020.
12. Habtemariam S. Antioxidant and anti-inflammatory mechanisms of neuroprotection by ursolic acid: addressing brain injury, cerebral ischemia, cognition deficit, anxiety, and depression. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2019.
13. Miki T, Eguchi M, Kochi T, Akter S, Hu H, Kashino I, et al. Prospective study on the association between dietary non-enzymatic antioxidant capacity and depressive symptoms. *Clinical nutrition ESPEN*. 2020;36:91-8.
14. Tu C-H, MacDonald I, Chen Y-H. The Effects of Acupuncture on Glutamatergic Neurotransmission in Depression, Anxiety, Schizophrenia, and Alzheimer's Disease: A Review of the Literature. *Frontiers in psychiatry*. 2019; 10: 14.
15. Bhatti GK, Reddy AP, Reddy PH, Bhatti JS. Lifestyle Modifications and Nutritional Interventions in Aging-Associated Cognitive Decline and Alzheimer's Disease. *Frontiers in aging neuroscience*. 2019; 11: 369.
16. Park SK, Kang JY, Kim JM, Yoo SK, Han HJ, Chung DH, et al. Fucoidan-Rich Substances from *Ecklonia cava* Improve Trimethyltin-Induced Cognitive Dysfunction via Down-Regulation of Amyloid beta Production/Tau Hyperphosphorylation. *Marine drugs*. 2019; 17(10).
17. Lee S, Yang M, Kim J, Son Y, Kim J, Kang S, et al. Involvement of BDNF/ERK signaling in spontaneous recovery from trimethyltin-induced hippocampal neurotoxicity in mice. *Brain research bulletin*. 2016; 121: 48-58.
18. Zhu HB, Ouyang GL, Lai YY, Zhong SQ. [Clinical analysis of sequelae of acute trimethyltin oxide poisoning]. *Zhonghua lao dong wei sheng zhi ye bing za zhi = Zhonghua laodong weisheng zhiyebing zazhi = Chinese journal of industrial hygiene and occupational diseases*. 2019; 37(5): 376-9.
19. Kim J, Kim CY, Oh H, Ryu B, Kim U, Lee JM, et al. Trimethyltin chloride induces reactive oxygen species-mediated apoptosis in retinal cells during zebrafish eye development. *The Science of the total environment*. 2019; 653: 36-44.
20. Hou J, Xue J, Wang Z, Li W. Ginsenoside Rg3 and Rh2 protect trimethyltin-induced neurotoxicity via prevention on neuronal apoptosis and neuroinflammation. *Phytotherapy research : PTR*. 2018; 32(12).
21. Guardia de Souza EST, do Val de Paulo MEF, da Silva JRM, da Silva Alves A, Britto LRG, Xavier GF, et al. Oral treatment with royal jelly improves memory and presents neuroprotective effects on icv-STZ rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Heliyon*. 2020; 6(2): e03281.
22. e Silva TGdS, da Silva JRM, da Silva Alves A, Britto LRG, Xavier GF, Sandoval MRL. Oral treatment with royal jelly improves memory and presents neuroprotective effects on icv-STZ rat model of sporadic Alzheimer's disease. *Heliyon*. 2020; 6(2): e03281.
23. Pan Y, Xu J, Jin P, Yang Q, Zhu K, You M, et al. Royal Jelly Ameliorates Behavioral Deficits, Cholinergic System Deficiency, and Autonomic Nervous Dysfunction in Ovariectomized Cholesterol-Fed Rabbits. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2019; 24(6): 1149.
24. You M, Pan Y, Liu Y, Chen Y, Wu Y, Si J, et al. Royal Jelly Alleviates Cognitive Deficits and beta-Amyloid Accumulation in APP/PS1 Mouse Model

Via Activation of the cAMP/PKA/CREB/BDNF Pathway and Inhibition of Neuronal Apoptosis. *Frontiers in aging neuroscience*. 2018; 10: 428.

25. Bazyar Y, Rafiei S, Hosseini A, Edalatmanesh MA. Effect of endurance exercise training and gallic acid on tumor necrosis factor- α in an animal model of alzheimer's disease. 2015.

26. Moghadas M, Edalatmanesh MA. The lithium chloride effect on anxiety, exploratory activity, and brain derived neurotrophic factor levels of the hippocampus in a rat model of TMT Intoxication. *The Neuroscience Journal of Shefaye Khatam*. 2015; 3(2): 1-10.

27. Arzi A, Houshmand G, Goudarzi M, Khadem Haghighian H, Rashidi Nooshabadi M. Comparison of the analgesic effects of royal jelly with morphine and aspirin in rats using the formalin. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2015; 17(2): 50-6.

28. Petit-Demouliere B, Chenu F, Bourin M. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology*. 2005; 177(3): 245-55.

29. Sadock BJ, Sadock VA, Ruiz P. Comprehensive textbook of psychiatry: lippincott Williams & wilkins Philadelphia, PA; 2000.

30. Wang Y, Kim SC, Wu T, Jiao Y, Jin H, Hyo Lee B, et al. Isoliquiritigenin Attenuates Anxiety-Like Behavior and Locomotor Sensitization in Rats after Repeated Exposure to Nicotine. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. 2020; 969.

31. Remus JL, Dantzer R. Inflammation models of depression in rodents: relevance to psychotropic drug discovery. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2016; 19(9).

32. Mignini F, Nasuti C, Artico M, Giovannetti F, Fabrizi C, Fumagalli L, et al. Effects and trimethyltin on hippocampal dopaminergic markers and cognitive behaviour. *International journal of immunopathology and pharmacology*. 2012;25(4):1107-19. <https://doi.org/10.1177/039463201202500428>

33. Harry GJ, d'Hellencourt CL. Dentate

gyrus: alterations that occur with hippocampal injury. *Neurotoxicology*. 2003; 24(3): 343-56.

34. Xiang D, Xiao J, Sun S, Fu L, Yao L, Wang G, et al. Differential Regulation of DNA Methylation at the CRMP2 Promoter Region Between the Hippocampus and Prefrontal Cortex in a CUMS Depression Model. *Front Psychiatry*. 2020; 11: 141.

35. Nemoda Z, Massart R, Suderman M, Hallett M, Li T, Coote M, et al. Maternal depression is associated with DNA methylation changes in cord blood T lymphocytes and adult hippocampi. *Translational psychiatry*. 2015; 5(4): e545-e.

36. Toczewska J, Konopka T. Activity of enzymatic antioxidants in periodontitis: A systematic overview of the literature. *Dental and medical problems*. 2019; 56(4): 419-26.

37. Unsal V, Dalkiran T, Cicek M, Kolukcu E. The Role of Natural Antioxidants Against Reactive Oxygen Species Produced by Cadmium Toxicity: A Review. *Adv Pharm Bull*. 2020; 10(2): 184-202.

38. Pan Y, Xu J, Jin P, Yang Q, Zhu K, You M, et al. Royal Jelly Ameliorates Behavioral Deficits, Cholinergic System Deficiency, and Autonomic Nervous Dysfunction in Ovariectomized Cholesterol-Fed Rabbits. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2019; 24(6).

39. Weiser MJ, Grimshaw V, Wynalda KM, Mohajeri MH, Butt CM. Long-Term Administration of Queen Bee Acid (QBA) to Rodents Reduces Anxiety-Like Behavior, Promotes Neuronal Health and Improves Body Composition. *Nutrients*. 2018; 10(1): 13.

40. Pyrzanowska J, Piechal A, Blecharz-Klin K, Joniec-Maciejak I, Graikou K, Chinou J, et al. Administration of Greek Royal Jelly produces fast response in neurotransmission of aged Wistar male rats. *Journal of Pre-Clinical and Clinical Research*. 2015; 9(2).

41. Notkola I-L, Sulkava R, Pekkanen J, Erkinjuntti T, Ehnholm C, Kivinen P, et al. Serum total cholesterol, apolipoprotein E {FC12} e4 allele, and Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology*. 1998; 17(1): 14-20.