

## Research Paper

# Anticonvulsant and Anti-anxiety Effects of Royal Jelly in Adult Male Syrian Rats



Hamid Yaghooti<sup>1</sup> , \*Samaneh Olapour<sup>2,3</sup> 

1. Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University Tehran, Iran.
2. Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3. Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.



**Citation:** Yaghooti H & Olapour S. [Investigating the Anticonvulsant and Anti-Anxiety Effects of Royal Jelly in Adult Male Mice (Persian)]. *Complementary Medicine Journal*. 2022; 12(3):246-259. <https://doi.org/10.32598/cmja.12.3.1188.1>

 <https://doi.org/10.32598/cmja.12.3.1188.1>



### Article Info:

Received: 05 Sep 2022

Accepted: 20 Jan 2023

Available Online: 01 Oct 2022

### Keywords:

Royal jelly, Seizure, Anxiety, Strychnine, Elevated plus maze

## ABSTRACT

**Objective** Royal jelly is a honey bee secretion with beneficial effects on the nervous system. The present study aims to investigate the effects of royal jelly in reducing seizure and anxiety-like behaviors in Syrian rats.

**Methods** This is an experimental study. In the seizure model, 25 male white Syrian rats were randomly divided into five groups: Control, royal jelly 100 mg/kg, royal jelly 200 mg/kg, royal jelly 400 mg/kg, and phenobarbital. After 30 minutes, strychnine was injected to induce seizure in animals. The time of seizure onset, seizure duration, and mortality rate in animals were recorded. In the anxiety model, 35 male white Syrian rats were randomly divided into five groups: Control, royal jelly 50 mg/kg, royal jelly 100 mg/kg, royal jelly 200 mg/kg, and diazepam. Anxiety-like behaviors were examined by using the elevated plus maze (EPM) test. Data analysis was performed using one-way ANOVA, and  $P < 0.05$  was statistically significant.

**Results** Royal jelly at doses of 200 and 400 mg/kg delayed the time of seizure onset and reduced the seizure duration compared to the control group ( $P < 0.05$ ). The mortality rate was also reduced after using different doses of royal jelly compared to the control group ( $P < 0.05$ ). Moreover, royal jelly at doses of 50 and 100 mg/kg increased the time spent in the open arms of the EPM platform and the number of entries to the open arms compared to the control group ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion** Administration of royal jelly can reduce strychnine-induced seizure and modulate anxiety-like behaviors in rats.

### \* Corresponding Author:

**Samaneh Olapour, PhD.**

**Address:** Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

**Tel:** +98 (916) 3004088

**E-mail:** [olapour.s@gmail.com](mailto:olapour.s@gmail.com)

## Extended Abstract

### Introduction

**S**eizure is a neurologic condition that occurs due to the excessive and abnormal discharge of cortical neurons [1]. The reason for seizure is unknown in most cases; in some patients, it occurs due to brain tumors, stroke, and hypoglycemia [2, 3]. Individuals with seizures may experience temporary changes in behavior, sensations, and consciousness [4, 5]. Anxiety is a type of psychological health disorder that causes fear and several physical symptoms such as heart palpitations, and chest pain. Anxiety is associated with reduced quality of life [6, 7].

Although several medications are clinically used for managing patients with seizures or anxiety disorders, long-term treatment with two or more drugs may cause drug interactions, increasing the risk of toxic effects [1, 3]. Selective serotonin reuptake inhibitors and serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors are mainly used for treating anxiety and social phobia. but these drugs have disadvantages, such as the slow onset of action, minimal efficacy in acute anxiety states, and relative risk of side effects [8, 9]. In this regard, complementary medicine combined with conventional medicine may offer more integrated therapeutic strategies with lower side effects [11]. Royal jelly is a honey bee secretion with anti-inflammatory, antioxidant, and neuroprotection properties. Royal jelly contains peptides, lipids, flavonoids, and other bioactive compounds [12-15]. In this study, we aim to examine the possible protective effects of royal jelly against seizure and anxiety-like behaviors in Syrian rats.

### Methods

Sixty adult male white Syrian rats weighing about 25-30 g were bought from the laboratory animal breeding center of Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences. They were kept under standard laboratory conditions and fed with proper food and water. Of 60 rats, 25 were randomly divided into five groups of 5. Animals were treated with intraperitoneal (i.p.) injections of normal saline, royal jelly (100, 200, and 400 mg/kg), and phenobarbital (40 mg/kg) 30 minutes prior to the induction of seizure with strychnine (3 mg/kg, i.p.). Then, the onset time of seizure, seizure duration, and mortality rate were recorded for each animal in 30 minutes.

The anti-anxiety effect of royal jelly was evaluated using the elevated plus maze (EPM) test [20]. The remaining 35 rats were randomly divided into five groups of 7. Animals received normal saline, royal jelly (50, 100, and 200 mg/kg), or diazepam (2 mg/kg) intraperitoneally. After 30 minutes, rats were individually placed in the center of the EPM device and let them explore the platform for 5 minutes. The time spent in the open arms of the platform and frequency of entries into open arms were measured for each animal. One-way analysis of variance (ANOVA) was applied to examine the differences between the study groups, followed by Tukey's post hoc test for multiple comparisons.  $P < 0.05$  was statistically significant.

### Results

As shown in Table 1, the intraperitoneal injection of royal jelly at both doses of 200 and 400 mg/kg, 30 minutes before strychnine administration, significantly delayed the time of seizure onset to the control group

**Table 1.** Effect of royal jelly on strychnine-induced seizure

Group	Mean±SD		%
	Time of Seizure Onset (S)	Seizure Duration (S)	Mortality Rate
Control (Normal saline)	71.4±45	48±7	100
Royal jelly, 100 mg/kg	73±34	37±3	61*
Royal jelly, 200 mg/kg	97±32*	23±2*	47*
Royal jelly, 400 mg/kg	101±31*	17±32*	39*
Phenobarbital, 40 mg/kg	135.5±21**	12±3**	16**

**Table 2.** Effect of royal jelly on anxiety-like behaviors in the EPM test

Group	Mean±SD	
	Time Spent in the Open Arms (S)	Number of Entries to the Open Arms
Control (Normal saline)	67.6±3.8	2.4±1.1
Royal jelly 50 mg/kg	78.4±8.4*	4.4±1.5*
Royal jelly 100 mg/kg	78±10.1*	4.6±1.6*
Royal jelly 200 mg/kg	68±4.1	2.8±0.8*
Diazepam 2 mg/kg	94.4±9.3**	6±1.2**

SD= Standard deviation; \*Compared to the control group at  $P \leq 0.05$ ; \*\*Compared to the control group  $P \leq 0.001$

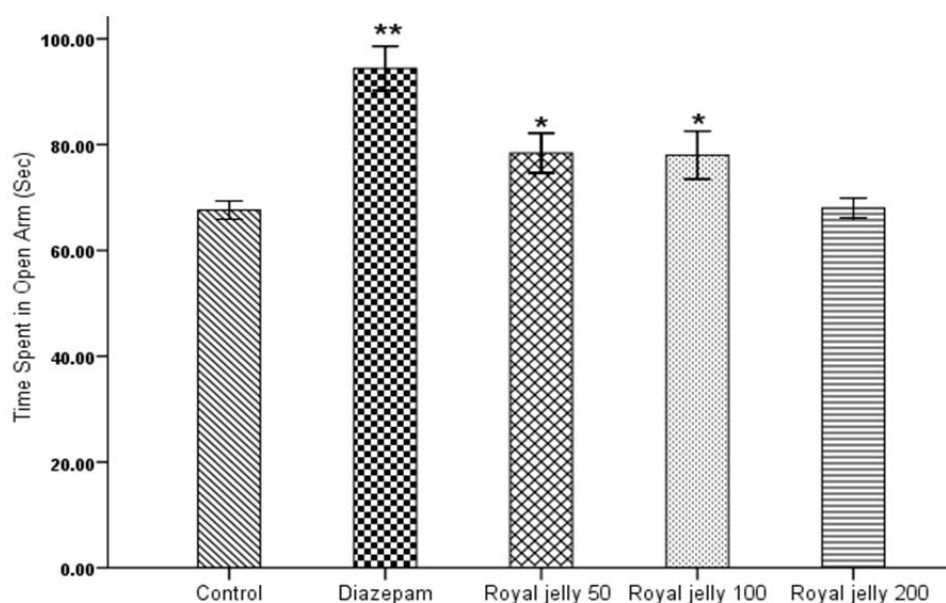
( $P < 0.001$ ). Results also showed that royal jelly (200 and 400 mg/kg) significantly reduced convulsion duration ( $P < 0.001$ ) compared to the control group (Table 1). However, intraperitoneal injection of royal jelly at a 100 mg/kg dose had no significant effects on these parameters. The mortality rate was also reduced significantly after using three doses of royal jelly compared to the control group ( $P \leq 0.001$ ). The standard anticonvulsant drug of phenobarbital (40 mg/kg, i.p.) blocked the seizures induced by strychnine.

As shown in Table 2, in the EPM test, intraperitoneal injection of royal jelly at two doses of 50 and 100 mg/kg

significantly increased the time spent in open arms and the number of open arm entries compared to the control group ( $P < 0.05$ ). In contrast, intraperitoneal injection of royal jelly at 200 mg/kg dose had no significant effect on these parameters. Diazepam, the standard anxiolytic benzodiazepine, significantly increased the number of open arm entries and the time spent in open arms ( $P < 0.001$ ) (Figures 1 and 2).

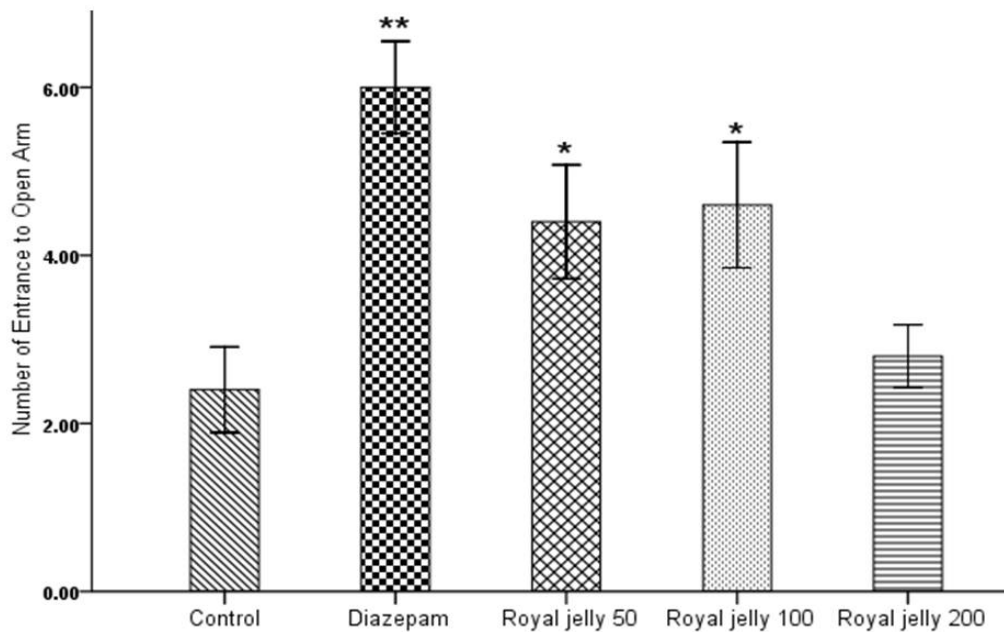
## Discussion

The findings revealed the anticonvulsant and anxiolytic-like properties of royal jelly in the experimental rats.



**Figure 1.** The time spent in the open arms of the EPM platform for different groups (Mean±SD)

\*Compared to the control group ( $P \leq 0.05$ ), \*\*Compared to the control group ( $P \leq 0.001$ )



**Figure 2.** Number of entries to the open arms of the EPM platform for different groups (Mean±SD)

\*Compared to the control group ( $P \leq 0.05$ ), \*\*Compared to the control group ( $P \leq 0.001$ )

Treatment with royal jelly dose-dependently increased the time for the onset of seizures. Furthermore, royal jelly administration reduced the seizure duration and the mortality rate, confirming its protective effect. In the EPM test, royal jelly injection increased the frequency of entries into open arms and the time spent in open arms. This suggests that royal jelly can modulate anxiety in rats. Our findings are consistent with the findings of Sefirin et al., who reported that royal jelly treatment of ovariectomized Wistar rats could reduce menopause-related anxiety and hot flashes using EPM and open-field tests [23]. Ito et al. demonstrated that administration of royal jelly or 10-hydroxy-trans-2-decenoic acid (the main lipid component of royal jelly) alleviated stress-induced symptoms of anxiety and depression in rats [24]. One of the royal jelly's pharmacological properties is the capacity to scavenge free radicals, indicating that royal jelly is an effective natural antioxidant. A recent study using a rabbit model of Alzheimer's disease reported that long-term administration of royal jelly reduced neuronal loss and enhanced anti-oxidative abilities in the rabbits' cerebral cortex and hippocampus [25]. Overall, royal jelly has a prominent role in modulating seizure and anxiety-like behaviors in rats. Further clinical studies should be conducted to evaluate the effectiveness of royal jelly in preventing and treating patients with neuropsychiatric disorders.

## Ethical Considerations

### Compliance with ethical guidelines

This study obtained its ethical approval from Ahvaz Jondishapur University of Medical Sciences (Code: IRA-JUMS.REC.1395.413).

### Funding

This study was funded by Ahvaz Jondishapur University of Medical Sciences.

### Authors' contributions

The authors equally contributed to preparing this article

### Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

This Page Intentionally Left Blank

## مقاله پژوهشی

# بررسی اثر ضد تشنجی و ضد اضطرابی ژل رویال در موش‌های سوری نر بالغ

حمید یاقوتی<sup>۱</sup>، \*سمانه اولی‌پور<sup>۲،۳</sup>

۱. گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۲. گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۳. گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.



**Citation:** Yaghoobi H & Olapour S. [Investigating the Anticonvulsant and Anti-Anxiety Effects of Royal Jelly in Adult Male Mice (Persian)]. *Complementary Medicine Journal*. 2022; 12(3):246-259. <https://doi.org/10.32598/cmja.12.3.1188.1>

**doi** <https://doi.org/10.32598/cmja.12.3.1188.1>

## چکیده

**اهداف:** ژل رویال یک فرآورده ترش‌جی زنبور عسل است که اثرات مفیدی بر سیستم عصبی دارد. در مطالعه حاضر، اثر ژل رویال در کاهش تشنج و اضطراب در موش سوری بررسی شده است.

**روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، جهت بررسی اثر ضد تشنجی ژل رویال، ۲۵ سر موش سوری نر به طور تصادفی در ۵ گروه کنترل، ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ژل رویال، ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ژل رویال، ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ژل رویال و فنوباریتال تقسیم شدند. پس از ۳۰ دقیقه، استریکنین جهت القای تشنج به حیوانات تزریق شد. زمان شروع تشنج، دوام تشنج و درصد مرگ ثبت شد. در مدل اضطراب، ۲۵ سر موش سوری نر به طور تصادفی در ۵ گروه کنترل، ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ژل رویال، ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ژل رویال، ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ژل رویال و دیازپام تقسیم شدند. با استفاده از ماز به علاوه ای مرتفع شاخص‌های اضطراب بررسی شد. تحلیل داده‌ها توسط آزمون آنالیز واریانس یک طرفه انجام شد و  $P < 0/05$  از نظر آماری معنادار تلقی شد.

**یافته‌ها:** دُزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ژل رویال سبب تأخیر در شروع و کاهش مدت تشنج در مقایسه با گروه کنترل شد ( $P < 0/05$ ). درصد مرگ در دُزهای مختلف ژل رویال نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ( $P < 0/05$ ). در مدل اضطراب، دُزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ژل رویال، زمان توقف و دفعات ورود به بازوهای ماز به علاوه ای مرتفع را نسبت به گروه کنترل افزایش داد ( $P < 0/05$ ).

**نتیجه‌گیری:** تجویز ژل رویال می‌تواند به طور مؤثری سبب کاهش تشنج القاشده با استریکنین و تعدیل رفتارهای اضطرابی در موش سوری شود.

## اطلاعات مقاله:

تاریخ دریافت: ۱۴ شهریور ۱۴۰۱  
تاریخ پذیرش: ۰۲ بهمن ۱۴۰۱  
تاریخ انتشار: ۰۹ مهر ۱۴۰۱

## کلیدواژه‌ها:

ژل رویال، تشنج، اضطراب، استریکنین، ماز به علاوه ای شکل مرتفع

## \* نویسنده مسئول:

دکتر سمانه اولی‌پور

نشانی: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، علوم پزشکی تهران، دانشکده پزشکی، گروه فارماکولوژی.

تلفن: ۳۰۰۴۰۸۸ (۹۱۶) +۹۸

رایانامه: olapour.s@gmail.com

## مقدمه

هستند که می‌توانند در درمان حملات تشنجی، اختلالات اضطرابی و حملات پانیک کاربرد داشته باشند، اما متأسفانه وابستگی فیزیکی، اعتیاد روانی، سندروم محرومیت از دارو (در صورت قطع مصرف دارو) و خواب‌آلودگی، از عوارض خطرناک این داروها به حساب می‌آیند [۷، ۱۰]. در همین راستا، امروزه بهره‌مندی از طب مکمل به عنوان روشی مقرون به صرفه و با عوارض جانبی محدود، برای پیشگیری و درمان بیماری‌های مختلف، از جمله اختلالات عصبی‌روانی ترویج یافته است [۱۱].

یکی از روش‌های مؤثر و بی‌خطر طب مکمل به‌کارگیری داروها و فرآورده‌های با منشأ بیولوژیک است که از جمله این ترکیبات می‌توان به ژل رویال<sup>۱</sup> اشاره کرد [۱۲، ۱۳]. ژل رویال یک ماده ژلاتینی سفید شیرین‌رنگ است که توسط غدد زیر حلقی و فکی زنبورهای کارگر ترشح شده و برای تغذیه زنبور ملکه مصرف می‌شود. این ماده ارزش غذایی فراوانی داشته و حاوی انواع ویتامین‌ها، مواد معدنی نظیر کلسیم، منیزیم، سدیم، پتاسیم، اسیدهای چرب (به‌ویژه ۱۰-هیدروکسی دکانویک اسید)، فلاونوئیدها و همچنین به میزان اندکی استرول‌ها نیز در ژل رویال یافت می‌شوند [۱۴، ۱۵].

از نتایج پژوهش‌های انجام‌شده در زمینه ژل رویال به برخی موارد نظیر افزایش ظرفیت یادگیری، بهبود حافظه، تخفیف علائم یائسگی و کاهش نشانه‌های سندروم پیش از قاعدگی می‌توان اشاره کرد [۱۴-۱۶]. اثربخشی ژل رویال در بهبود اضطراب و افسردگی در مدل تجربی آلزایمر القا شده با نوروتوکسین تری‌متیل تین کلرید در موش‌های صحرایی نشان داده شده که این ژل به واسطه خاصیت آنتی‌اکسیدانی سبب مهار رادیکال‌های آزاد، از جمله یون سوپراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل در مغز می‌شود و می‌تواند در بهبود اختلالات شناختی و خلق‌وخوی ناشی از بیماری آلزایمر مؤثر باشد [۱۷].

همچنین اثرات ۱۰-هیدروکسی دکانویک اسید، ماده فعال موجود در ژل رویال بر سیستم عصبی به صورت داخل بدن و خارج بدن ارزیابی شده و تأثیرات مثبت این ماده در افزایش رشد نورون‌ها و کاهش آسیب نورونی در محیط کشت و همچنین بهبود رفتارهای شبه اضطرابی در موش‌های صحرایی گزارش شده است [۱۸]؛ بنابراین با توجه به مزایای متعدد فرآورده فوق، پژوهش حاضر با هدف ارزیابی اثرات محافظتی احتمالی ژل رویال در مدل‌های تجربی تشنج و اضطراب در موش سوری انجام شد.

## مواد و روش‌ها

## حیوانات آزمایشگاهی

در این مطالعه، ۶۰ سر موش سفید کوچک نر جوان نژاد

تشنج نوعی اختلال عملکرد مغزی است که در اثر تخلیه الکتریکی غیرطبیعی نورون‌های مغز ایجاد می‌شود [۱]. عوامل متعددی در تشدید تحریکات نورونی و حملات تشنجی دخیل هستند که از جمله آن‌ها می‌توان به هیپوکسی، آلكالوز متابولیک، عفونت، تروما، تومور مغزی و هیپوگلیسمی اشاره کرد [۲، ۳]. همچنین در معدودی از بیماران نقایص ژنتیکی وارث عامل اصلی بیماری به حساب می‌آید [۳].

تشنج ممکن است به طور موقتی سبب تغییرات فیزیکی، رفتاری و هوشیاری در فرد مبتلا شود که بر اساس شدت و وسعت درگیری مغزی، میزان این تغییرات متفاوت است. همچنین تشنج می‌تواند بر طیف گسترده‌ای از کارایی‌های روان‌شناختی و فردی تأثیر بگذارد. این دسته از بیماران به شدت از اختلالاتی همچون افسردگی، اضطراب و استرس‌های روانی رنج می‌برند. بر اساس نتایج حاصل از مطالعات اپیدمیولوژیک، شیوع اضطراب در بیماران مبتلا به حملات تشنجی ۱۱ تا ۲۵ درصد است که این اضطراب ممکن است نتیجه غیرقابل پیش‌بینی بودن حملات تشنجی، کاهش فعالیت‌های روزانه و انزوای اجتماعی در این افراد باشد [۴، ۵].

اضطراب و نگرانی می‌تواند با تغییرات فیزیولوژیکی مهمی مثل افزایش ضربان قلب، فشار خون، تعریق و افزایش تعداد تنفس همراه باشد. اختلالات اضطرابی یکی از مشکلات عمده بشری است و سبب کاهش کیفیت زندگی و مختل شدن زندگی فردی می‌شود [۶، ۷].

کلاس‌های دارویی متعددی برای کنترل حملات تشنجی و درمان اختلالات اضطرابی در دسترس هستند. کاربامازپین، سدیم والپروات، توپیرامات و اتوسوکسیماید داروهای ضد تشنج قوی محسوب می‌شوند که قادر به مهار تشنج در بسیاری از بیماران هستند، اما نکته مهم در این رابطه، نیاز به دارودرمانی طولانی‌مدت و اغلب مصرف توأم چند دارو با هم است که می‌تواند به واسطه القا یا مهار آنزیمی زمینه‌ساز تداخلات دارویی و بروز عوارض ناخواسته متعدد شامل اختلالات دستگاه گوارش، سمیت عصبی و دیسکرازی‌های خونی در بیماران باشد [۱، ۳].

همچنین برای درمان اختلالات اضطرابی هم امروزه دسته‌های دارویی جدید نظیر مهارکننده‌های بازجذب اختصاصی سروتونین و مهارکننده‌های بازجذب سروتونین / نوراپی‌نفرین با تغییر در سطوح کتکول آمین‌ها در مغز، به عنوان انتخاب اول مطرح هستند. با وجود این، این داروها در وضعیت اضطراب حاد تأثیرگذاری اندک دارند و عوارض جانبی ناشی از آن‌ها سبب کاهش پذیرش و محدودیت مصرف آن‌ها شده است [۸، ۹].

همچنین بنزودیازپین‌ها از دسته داروهای آرام‌بخش / خواب‌آور

1. Royal Jelly

جدول ۱. اثر ژل رویال بر تشنج القاشده با استریکنین

درصد مرگومیر	میانگین $\pm$ انحراف معیار		گروه درمانی
	طول مدت تشنج (ثانیه)	زمان شروع تشنج (ثانیه)	
۱۰۰	۴۸ $\pm$ ۷	۴۵ $\pm$ ۴/۷۱	کنترل (نرمال سالین)
۶۱ <sup>*</sup>	۳۷ $\pm$ ۳	۷۳ $\pm$ ۳۴	۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم ژل رویال
۷ <sup>*</sup>	۲۳ $\pm$ ۲ <sup>*</sup>	۹۷ $\pm$ ۳۲	۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم ژل رویال
۳۹ <sup>*</sup>	۳۲ $\pm$ ۱۷ <sup>*</sup>	۱۰۱ $\pm$ ۳۱ <sup>*</sup>	۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم ژل رویال
۱۶ <sup>**</sup>	۱۲ $\pm$ ۳ <sup>**</sup>	۲۱ $\pm$ ۵/۱۳۵ <sup>**</sup>	۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم فنوباریتال



\* تفاوت معنادار با گروه کنترل نرمال سالین در سطح  $P < 0.001$

\*\* تفاوت معنادار با گروه کنترل نرمال سالین در سطح  $P < 0.0001$

در این بررسی، از ژل رویال (شرکت Santa Cruz Biotech-nology، ایالات متحده)، استریکنین (شرکت Sigma، ایالات متحده) و فنوباریتال (شرکت کیمیدارو، ایران) استفاده شد. حیوانات به کمک جدول اعداد تصادفی با استفاده از رایانه، به ۵ گروه ۵ تایی تقسیم شدند. گروه کنترل منفی: حیواناتی که ۳۰ دقیقه قبل از تجویز استریکنین، سرم فیزیولوژی استریل دریافت کردند. گروه‌های آزمایش: حیواناتی که ۳۰ دقیقه قبل از تجویز استریکنین، ژل رویال با دزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن دریافت کردند. گروه کنترل مثبت: حیواناتی که ۳۰ دقیقه قبل از تجویز استریکنین، تحت درمان با داروی ضد تشنج فنوباریتال با دز ۴۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن قرار گرفتند. همه تزریق‌ها به صورت داخل صفاقی انجام شد و از استریکنین با دز ۳ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن برای القای تشنجات استفاده شد. استریکنین یک آنتاگونیست گیرنده گلایسین است و سبب ایجاد انقباضات تونیک کلونیک در موش‌ها می‌شود [۱۹].

بلافاصله پس از تزریق استریکنین شاخص‌های تشنج شامل

NMRI با محدوده وزنی ۲۵ تا ۳۰ گرم از مرکز تکثیر حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز خریداری شدند که از این تعداد، ۲۵ سر برای بررسی اثر ضد تشنجی و ۳۵ سر برای بررسی اثر ضد اضطرابی ژل رویال اختصاص داده شدند. حیوانات به مدت ۱ هفته پیش از شروع مطالعه به شرایط محیط آزمایشگاه عادت داده شده و متعاقباً در قفس‌های مخصوص تحت چرخه نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در دمای ۲۲ تا ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. موش‌ها به جز زمان آزمایش، به آب و غذای فشرده مخصوص جوندگان به طور آزادانه دسترسی داشتند.

تمام اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی، طبق دستورالعمل معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز به شماره IRAJUMS.REC.1395.413 انجام شد و ارزیابی اثرات ضد تشنجی و ضد اضطرابی ژل رویال به شرح زیر انجام شد.

بررسی اثر ضد تشنجی ژل رویال در مدل تشنج القاشده با استریکنین

جدول ۲. اثر ژل رویال بر شاخص‌های اضطراب با استفاده از EPM

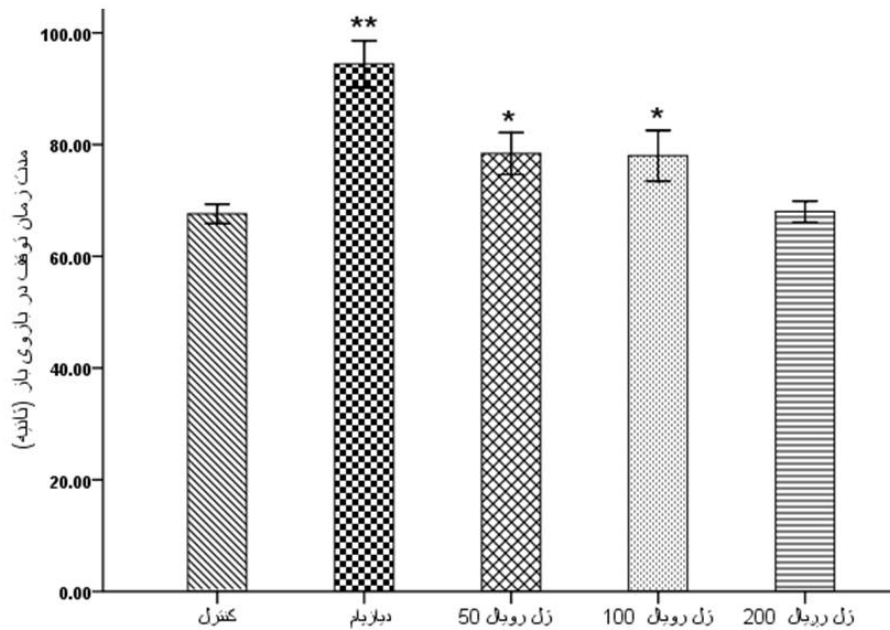
تعداد دفعات ورود به بازوی باز	میانگین $\pm$ انحراف معیار		گروه درمانی
	مدت زمان توقف در بازوی باز (ثانیه)	تعداد دفعات ورود به بازوی باز	
۴/۲ $\pm$ ۱/۱	۸/۳ $\pm$ ۶/۶۷		کنترل (نرمال سالین)
۵/۱ $\pm$ ۴/۴ <sup>*</sup>	۴/۸ $\pm$ ۴/۷۸ <sup>*</sup>		۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم ژل رویال
۶/۴ $\pm$ ۶/۱ <sup>*</sup>	۷/۸ $\pm$ ۱/۱۰ <sup>*</sup>		۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم ژل رویال
۸/۲ $\pm$ ۸/۰	۶/۸ $\pm$ ۱/۴		۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم ژل رویال
۶/۲ $\pm$ ۱/۱ <sup>**</sup>	۴/۹۴ $\pm$ ۳/۹ <sup>**</sup>		۲ میلی گرم بر کیلوگرم دیازپام



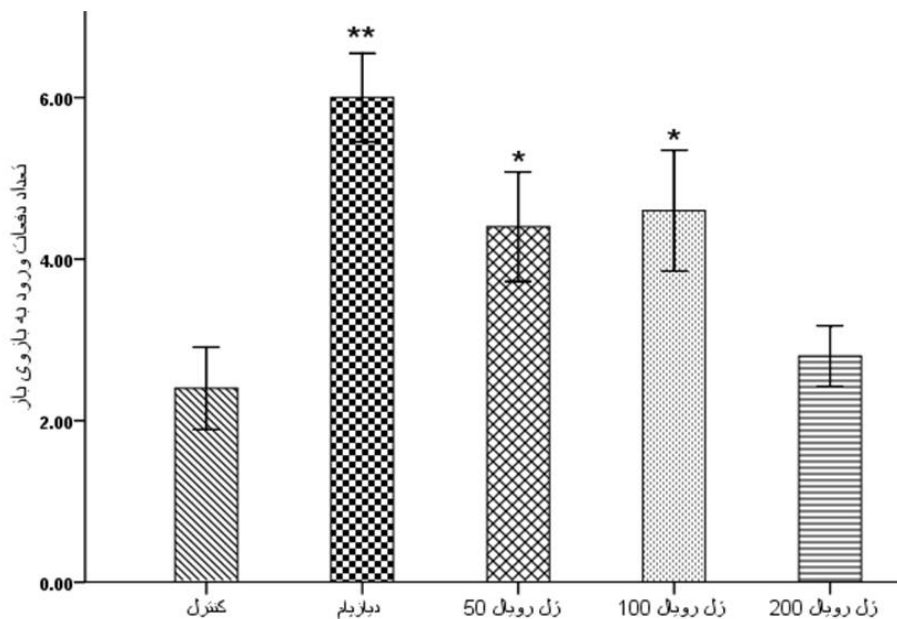
\* تفاوت معنادار با گروه کنترل نرمال سالین در سطح  $P < 0.05$

\*\* تفاوت معنادار با گروه کنترل نرمال سالین در سطح  $P < 0.001$





تصویر ۱. اثر ژل رویال بر مدت زمان حضور موش در بازوهای باز ماز به علاوه ای شکل مرتفع داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شده‌اند. \* و \*\* نشان‌دهنده تفاوت معنادار به ترتیب در سطح ( $P < 0.05$ ) و ( $P < 0.001$ ) با گروه کنترل است



تصویر ۲. اثر ژل رویال بر تعداد دفعات حضور موش در بازوهای باز ماز به علاوه ای شکل مرتفع داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شده‌اند. \* و \*\* نشان‌دهنده تفاوت معنادار به ترتیب در سطح ( $P < 0.05$ ) و ( $P < 0.001$ ) با گروه کنترل است.

## یافته‌ها

### اثر ضد تشنجی دُزهای مختلف ژل رویال

همان‌طور که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود، تجویز ژل رویال به صورت وابسته به دُز سبب تأخیر در زمان شروع تشنج ناشی از استریکنین شد که این اختلاف در دُز ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن با  $P=0/001$  نسبت به گروه کنترل منفی معنادار است. تزریق داخل صفاقی فنوباریتال با دُز ۴۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن زمان شروع تشنج را با  $P=0/000$  نسبت به گروه کنترل منفی به طور معناداری به تأخیر انداخت. دُزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن ژل رویال با  $P=0/001$  سبب کاهش معناداری در طول مدت تشنج در مقایسه با گروه کنترل منفی شد.

در گروه تحت درمان با فنوباریتال طول مدت تشنج به طور معناداری نسبت به گروه کنترل منفی کاهش یافت ( $P=0/000$ ). دُز ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن ژل رویال، با وجود اینکه باعث تأخیر در زمان شروع تشنج و کاهش در طول مدت تشنج در مقایسه با گروه کنترل منفی شد، اما این اختلاف از لحاظ آماری معنادار نبود. درصد مرگ‌ومیر متعاقب تجویز دُزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن ژل رویال با  $P=0/001$  در مقایسه با گروه کنترل منفی کاهش معناداری پیدا کرد. همچنین کاهش درصد مرگ‌ومیر در گروه دریافت‌کننده فنوباریتال نسبت به گروه کنترل منفی معنادار بود ( $P=0/000$ ).

### اثر ضد اضطرابی دُزهای مختلف ژل رویال

در جدول شماره ۲، میانگین مدت زمان توقف موش‌ها در بازوهای باز دستگاه باز علاوه بر شکل مرتفع و تعداد دفعات ورود به این بازوها در گروه‌های مختلف آزمایش و کنترل مشهود است. مدت زمان توقف در بازوهای باز در گروه‌های تحت درمان با دُزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن ژل رویال به صورت معناداری نسبت به گروه کنترل منفی بیشتر است ( $P<0/05$ ) (تصویر شماره ۱).

مدت زمان توقف در صفحه مرکزی تفاوتی در میان گروه‌های مختلف تحت آزمایش نداشت ( $P=24/0$ ). همچنین تعداد دفعات ورود به بازوهای باز در گروه‌های تحت درمان با دُزهای ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن ژل رویال به صورت معناداری نسبت به گروه کنترل منفی افزایش یافت ( $P<0/05$ ) (تصویر شماره ۲). دُز ۲۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن ژل رویال در شاخص‌های فوق تفاوت معناداری با گروه کنترل منفی نداشت. در گروه تحت درمان با دِیازپام در همه شاخص‌های اندازه‌گیری‌شده، اختلاف معناداری نسبت به گروه

زمان شروع تشنجات (فاصله زمانی از لحظه تزریق استریکنین تا شروع انقباضات تونیک کلونیک بر حسب ثانیه)، دوام تشنجات (فاصله زمانی از لحظه شروع تشنج تا خاتمه تشنج یا مرگ حیوان بر حسب ثانیه) و درصد مرگ‌ومیر (نسبت تعداد موش‌هایی که در اثر تزریق استریکنین مرده‌اند به کل موش‌های آن گروه) طی ۳۰ دقیقه اندازه‌گیری و ثبت شد.

### بررسی اثر ضد اضطرابی ژل رویال با استفاده از ماز به علاوه ای شکل مرتفع

در این بررسی، از ژل رویال (شرکت Santa Cruz Biotech-nology، ایالات متحده) و دیازپام (شرکت کیمیدارو، ایران) استفاده شد. حیوانات به کمک جدول اعداد تصادفی با استفاده از رایانه، به ۵ گروه ۷ تایی تقسیم شدند. گروه کنترل منفی: حیواناتی که ۳۰ دقیقه قبل از آزمون ارزیابی اضطراب، سرم فیزیولوژی استریل دریافت کردند. گروه‌های آزمایش: حیواناتی که ۳۰ دقیقه قبل از آزمون ارزیابی اضطراب، ژل رویال با دُزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن دریافت کردند. گروه کنترل مثبت: حیواناتی که ۳۰ دقیقه قبل از آزمون ارزیابی اضطراب، تحت درمان با داروی دیازپام با دُز ۲ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن قرار گرفتند. تزریق‌ها به صورت داخل صفاقی انجام و برای ارزیابی سطح اضطراب از دستگاه ماز به علاوه ای شکل مرتفع<sup>۲</sup>، ساخت شرکت پارس‌مدار آسیا (ایران) استفاده شد.

دستگاه ماز به علاوه ای شکل مرتفع یک مدل استاندارد برای سنجش میزان اضطراب در جوندگان است که شامل ۲ بازوی باز ( $50 \times 50$  سانتی‌متر) و ۲ بازوی بسته ( $50 \times 50$  سانتی‌متر) است که در ارتفاع ۵۰ سانتی‌متری از سطح زمین قرار گرفته است [۲۰]. در این پژوهش، هریک از موش‌ها به طور جداگانه در مرکز دستگاه ماز به علاوه ای شکل مرتفع رو به یکی از بازوهای باز قرار داده شد و به مدت ۵ دقیقه تعداد ورود به بازوهای باز و مدت زمان توقف در این بازوها با استفاده از Video Tracking ضبط شد. بین هر آزمایش دستگاه با یک دستمال مرطوب تمیز شد. افزایش دفعات ورود به بازوهای باز و افزایش زمان سپری‌شده در این بازوها، به عنوان شاخص کاهش اضطراب در موش‌ها تلقی می‌شود.

### تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد. از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه به منظور بررسی تفاوت بین گروهی و جهت مقایسه ۲ به ۲ گروه‌ها از تست توکی استفاده شد. اختلاف  $P<0/05$  بین گروه‌های آزمایش‌شده از نظر آماری معنادار تلقی شد.

2. Elevated Plus Maze (EPM)

کنترل منفی مشاهده شد ( $P < 0.001$ ).

## بحث

طی این پژوهش با استفاده از آزمون تشنج القاشده با نوروتوکسین استریکنین و آزمون رفتاری اضطراب به کمک دستگاه ماز به علاوه ای شکل مرتفع، به ارزیابی اثرات حفاظتی ژل رویال در موش کوچک آزمایشگاهی پرداخته شد. در آزمون تشنج استریکنین برای القای تشنج موضعی ساده استفاده می‌شود. تشنج موضعی ساده نوعی تشنج است که در آن عملکرد الکتریکی مغز فقط در چند ناحیه از مغز دچار اختلال می‌شود و کل ۲ نیمکره را فرامی‌گیرد، در نتیجه هوشیاری از بین نمی‌رود. برخی محققان تشنج القاشده با استریکنین را به عنوان مدل تشنج مقاوم به درمان معرفی کرده‌اند [۲۱].

در این مطالعه، تزریق ژل رویال به صورت وابسته به دُز سبب افزایش زمان تأخیری تا شروع تشنج شد. همچنین طول مدت تشنج و مرگ‌ومیر حیوانات تحت تأثیر ژل رویال به طور معناداری کاهش یافت. هم‌سو با نتایج حاصل از مطالعات قبلی، فنوباربتال به طور کامل از ایجاد تشنج به وسیله استریکنین جلوگیری کرد. در آزمون دیگر که ارزیابی اثر ضد اضطرابی ژل رویال بود، کاهش زمان حضور حیوانات در بازوهای باز دستگاه ماز به علاوه ای شکل مرتفع و کاهش تعداد دفعات ورود به این بازوها به عنوان شاخصی بر وجود رفتارهای اضطرابی تلقی می‌شود [۲۲].

در پژوهش حاضر، در گروه دریافت‌کننده ژل رویال، مدت زمان توقف و تعداد دفعات ورود به بازوهای باز دستگاه ماز به علاوه ای شکل مرتفع، نسبت به موش‌های دریافت‌کننده سرم فیزیولوژی افزایش یافت که نشان‌دهنده تأثیر مثبت این ماده بر کاهش اضطراب است. مطابق با نتایج مطالعه کنونی، سفیرین و همکاران نشان دادند تجویز خوراکی ژل رویال به موش‌های صحرایی ماده اواریکتومی‌شده، موجب کاهش اضطراب در آزمون زمینه باز و مدل دستگاه ماز به علاوه ای شکل مرتفع شد. همچنین میزان گرگرفتگی در این حیوانات کاهش یافت که مطرح‌کننده تأثیرات شبه استروژنی ژل رویال در بهبود علائم رفتاری در این حیوانات است [۲۳].

همچنین در مطالعه‌ای دیگر، ایتو و همکاران با استفاده از آزمون‌های رفتاری مختلف گزارش کردند ژل رویال به سبب داشتن اسید چرب ۱۰-هیدروکسی دکانویک اسید، موجب بهبود خلق‌وخو در مدل اضطراب و افسردگی القاشده به واسطه استرس، در موش‌های سفید کوچک شد [۲۴]. در پژوهشی که یانگ‌مینگ و همکاران در سال ۲۰۱۹ نشان دادند، مصرف خوراکی ژل رویال به مدت ۳ ماه سبب کاهش احتمال ابتلا به اختلالات شناختی و بیماری آلزایمر در خرگوش‌های تحت آزمایش شد که این اثرات ژل رویال به واسطه کاهش استرس اکسیداتیو، مالون‌دی‌آلدئید، آنزیم استیل کولین استراز و سطوح

آمیلوئید بتا در مغز این حیوانات بود [۲۵].

پژوهش‌های متعدد پیشنهاد کرده‌اند استرس اکسیداتیو و مواد حاصل از پراکسیداسیون لیپیدی نظیر مالون‌دی‌آلدئید می‌توانند در بروز و تشدید حملات تشنجی و رفتارهای اضطرابی نقش کلیدی داشته باشند [۲۶]. رادیکال‌های آزاد اکسیژن از طریق غیرفعال‌سازی آنزیم گلوتامین سنتتاز و همچنین مهار آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز به ترتیب سبب افزایش نوروترانسمیتر تحریکی گلوتامات و کاهش گابا در مغز می‌شوند [۲۷].

ژل رویال فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی داشته و توانایی مهار رادیکال‌های هیدروکسیل و یون‌های سوپراکسید را دارد [۲۸]. این فعالیت آنتی‌اکسیدانی اغلب به واسطه وجود ترکیبات بیواکتیو فراوانی است که در این ماده یافت می‌شود که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به فلاونوئیدها، پلی‌فنول‌ها، اسید چرب ۱۰-هیدروکسی دکانویک اسید و ویتامین‌ها اشاره کرد. مهم‌ترین فلاونوئیدهای موجود در ژل رویال شامل فلاونول‌ها، فلاون‌ها و فلاونون‌ها است [۲۹، ۲۸].

مطالعات اخیر نشان می‌دهند این ترکیبات علاوه بر داشتن اثرات آنتی‌اکسیدانی قوی، لیگاندهایی برای گیرنده‌های گابا-A در سیستم اعصاب مرکزی محسوب می‌شوند و قادر هستند به عنوان مولکول‌های شبه بنزودیازپینی عمل کنند [۳۰]. از سوی دیگر، اختلالات رفتاری نظیر افسردگی و اضطراب همراهی مستقیمی با مرگ نورو-ها عوامل در هیپوکامپ و التهابی دارد [۳۱].

در مطالعه‌ای گزارش شده تجویز ۱۰-هیدروکسی دکانویک اسید، اسید چرب فعال موجود در ژل رویال، به طور معناداری سبب مهار مرگ نورو-ها و کاهش رفتارهای اضطرابی در موش‌های صحرایی مسن شد [۱۸]. به نظر می‌رسد علاوه بر اثرات آنتی‌اکسیدانی، ویژگی‌های ضدالتهابی و افزایش نورون‌زایی این ژل رویال می‌تواند در بهبود یافته‌های رفتاری مطالعه حاضر نقش داشته باشد.

## نتیجه‌گیری

طبق نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر، مصرف مکمل ژل رویال سبب کاهش تشنج و تعدیل خلق‌وخو در موش‌های کوچک آزمایشگاهی شد. به نظر می‌رسد کاهش التهاب و مهار استرس اکسیداتیو توسط ترکیبات فعال موجود در این ژل نظیر ۱۰-هیدروکسی دکانویک اسید و فلاونوئیدها در اثرات مذکور نقش داشته باشند.

از محدودیت‌های این تحقیق می‌توان به عدم بررسی سازوکارهای مولکولی دخیل در اثرات این ماده بر سیستم اعصاب مرکزی اشاره کرد که پیشنهاد می‌شود در آینده تحقیقات بیشتری به این منظور انجام شود. همچنین کارآزمایی‌های بالینی برای اثبات اثربخشی و تعیین دُز دقیق این ژل در بیماران مبتلا

به اختلالات عصبی روانی انجام شود.

## ملاحظات اخلاقی

### پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این پژوهش توسط کمیته اخلاق معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز تأیید شده است (کد: IRA- (JUMS.REC.1395.413).

### حامی مالی

هزینه‌های مطالعه حاضر از محل اعتبار طرح‌های تحقیقاتی مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز تأمین شده است.

### مشارکت نویسندگان

همه نویسندگان برای تکمیل این مقاله به طور یکسان مشارکت کرده‌اند.

### تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

## References

- [1] Pieróg M, Socała K, Wyska E, Poleszak E, Wlaź P. Effect of ellagic acid on seizure threshold in two acute seizure tests in mice. *Molecules*. 2021; 26(16):4841. [DOI:10.3390/molecules26164841] [PMID] [PMCID]
- [2] Zaeri S, Emamghoreishi M. Acute and chronic effects of N-acetylcysteine on pentylenetetrazole-induced seizure and neuromuscular coordination in mice. *Iranian Journal of Medical Sciences*. 2015; 40(2):118-24. [PMID]
- [3] Ghosh S, Sinha JK, Khan T, Devaraju KS, Singh P, Vaibhav K, et al. Pharmacological and therapeutic approaches in the treatment of epilepsy. *Biomedicines*. 2021; 9(5):470. [DOI:10.3390/biomedicines9050470] [PMID] [PMCID]
- [4] Kwon OY, Park SP. Depression and anxiety in people with epilepsy. *Journal of Clinical Neurology*. 2014; 10(3):175-88. [DOI:10.3988/jcn.2014.10.3.175] [PMID] [PMCID]
- [5] Seyedshohadaee M, Salighedar G, Haghani H. [Evaluation of the relationship between life quality and circadian types and anxiety in Iranian Epilepsy association members with epilepsy in 2020 (Persian)]. *Iran Journal of Nursing*. 2021; 34(132):8-20. [DOI:10.52547/ijn.34.132.8]
- [6] Olivier JD, Vinkers CH, Olivier B. The role of the serotonergic and GABA system in translational approaches in drug discovery for anxiety disorders. *Frontiers in Pharmacology*. 2013; 4:74. [DOI:10.3389/fphar.2013.00074] [PMID] [PMCID]
- [7] Louvet S, Ischayek M, Danoff R, Faafp F. The current role of long-term benzodiazepines for the treatment of generalized anxiety. *Osteopathic Family Physician*. 2015; 7(1):19-25. [Link]
- [8] Lewis G, Duffy L, Ades A, Amos R, Araya R, Brabyn S, et al. The clinical effectiveness of sertraline in primary care and the role of depression severity and duration (PANDA): A pragmatic, double-blind, placebo-controlled randomised trial. *Lancet Psychiatry*. 2019; 6(11):903-14. [DOI:10.1016/S2215-0366(19)30366-9] [PMID]
- [9] Strawn JR, Geraciotti L, Rajdev N, Clemenza K, Levine A. Pharmacotherapy for generalized anxiety disorder in adult and pediatric patients: An evidence-based treatment review. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2018; 19(10):1057-70. [DOI:10.1080/14656566.2018.1491966] [PMID] [PMCID]
- [10] Kienitz R, Kay L, Beuchat I, Gelhard S, von Brauchitsch S, Mann C, et al. Benzodiazepines in the management of seizures and status epilepticus: A review of routes of delivery, pharmacokinetics, efficacy, and tolerability. *CNS Drugs*. 2022; 36(9):951-75. [PMID] [PMCID]
- [11] Yuan H, Ma Q, Ye L, Piao G. The traditional medicine and modern medicine from natural products. *Molecules*. 2016; 21(5):559. [DOI:10.3390/molecules21050559] [PMID] [PMCID]
- [12] Yoshida M, Hayashi K, Watadani R, Okano Y, Tanimura K, Kotoh J, et al. Royal jelly improves hyperglycemia in obese/diabetic KK-Ay mice. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2017; 79(2):299-307. [DOI:10.1292/jvms.16-0458] [PMID] [PMCID]
- [13] Arzi A, Olapour S, Yaghootti H, Sistani Karampour N. Effect of royal jelly on formalin induced-inflammation in rat hind paw. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*. 2015; 10(1):e22466. [DOI:10.17795/jjnpp-22466] [PMID] [PMCID]
- [14] Kunugi H, Mohammed Ali A. Royal jelly and its components promote healthy aging and longevity: From animal models to humans. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019; 20(19):4662. [DOI:10.3390/ijms20194662] [PMID] [PMCID]
- [15] Taavoni S, Barkhordari F, Goushegir A, Haghani H. Effect of Royal Jelly on premenstrual syndrome among Iranian medical sciences students: A randomized, triple-blind, placebo-controlled study. *Complementary Therapies in Medicine*. 2014; 22(4):601-6. [PMID]
- [16] Hasanloei A, Salamat KM, Hosseini SA. Antioxidant effect of swimming training and royal jelly consumption in the hippocampus tissue of rats with alzheimer's disease. *Hormozgan Medical Journal*. 2022; 26(1):62-7. [DOI:10.34172/hmj.2022.11]
- [17] Azimpour M, Fathi M, Dezfoulian O. [The effect of royal jelly on depression and anxiety in an animal model of alzheimer's disease (Persian)]. *The Neuroscience Journal of Shefaye Khatam*. 2021; 9(2):79-90. [DOI:10.52547/shefa.9.2.79]
- [18] 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*. 2017; 10(1):13. [DOI:10.3390/nu10010013] [PMID] [PMCID]
- [19] Annafi OS, Umukoro S, Eduviere AT. Evaluation of the anticonvulsant and anxiolytic potentials of methyl jasmonate in mice. *Scientia Pharmaceutica*. 2014; 82(3):643-54. [DOI:10.3797/scipharm.1310-22] [PMID] [PMCID]
- [20] Miladi-Gorji H, Vafaei AA, Rashidy-Pour A, Taherian AA, Jarrahi M, Emami-Abarghoie M, et al. Anxiolytic effects of Portulaca oleracea aqueous extracts in mice. *Journal of Medicinal Plants*. 2006; 5(19):23-8. [Link]
- [21] Zalkhani R. Several models of induction seizure and epilepsy in experimental animals. *Journal of Research in Applied and Basic Medical Sciences*. 2020; 6(4):252-61. [Link]
- [22] Aduema W, Osim EE, Nwankwo AA. Using the elevated plus maze task in assessing anxiety and fear in Swiss white mice. *Journal of Complementary Medicine and Alternative Healthcare*. 2018; 6(1):001 -6. [Link]
- [23] Sefirin D, Nange AC, Florette MT, Franklin ZG, Florence AC, Pierre K, et al. Royal jelly induced anxiolytic effects and prevent hot flushes in a menopausal model on wistar rat. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*. 2019; 19:14557-66. [DOI:10.26717/BJSTR.2019.19.003356]
- [24] Ito S, Nitta Y, Fukumitsu H, Soumiya H, Ikeno K, Nakamura T, et al. Antidepressant-like activity of 10-hydroxy-trans-2-decenoic acid, a unique unsaturated fatty acid of royal jelly, in stress-inducible depression-like mouse model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012; 2012:139140. [PMID] [PMCID]
- [25] 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*. 2019; 24(6):1149. [PMID] [PMCID]
- [26] Hassan W, Silva CE, Mohammadzai IU, da Rocha JB, J LF. Association of oxidative stress to the genesis of anxiety: Implications for possible therapeutic interventions. *Current Neuropharmacology*. 2014; 12(2):120-39. [DOI:10.2174/1570159X11666131120232135] [PMID] [PMCID]
- [27] Sudha K, Rao AV, Rao A. Oxidative stress and antioxidants in epilepsy. *Clinica Chimica Acta*. 2001; 303(1-2):19-24. [PMID]
- [28] Martinello M, Mutinelli F. Antioxidant activity in bee products: A review. *Antioxidants*. 2021; 10(1):71. [PMID] [PMCID]



- [29] Ali AM, Kunugi H. The effects of royal jelly acid, 10-hydroxy-trans-2-decenoic acid, on neuroinflammation and oxidative stress in astrocytes stimulated with lipopolysaccharide and hydrogen peroxide. *Immunology*. 2021; 1(3):212-22. [DOI:10.3390/immuno1030013]
- [30] Kahnberg P, Lager E, Rosenberg C, Schougaard J, Camet L, Sterner O, et al. Refinement and evaluation of a pharmacophore model for flavone derivatives binding to the benzodiazepine site of the GABAA receptor. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2002; 45(19):4188-201. [DOI:10.1021/jm020839k] [PMID]
- [31] Ye Z, Kappelmann N, Moser S, Davey Smith G, Burgess S, Jones PB, et al. Role of inflammation in depression and anxiety: Tests for disorder specificity, linearity and potential causality of association in the UK Biobank. *Eclinical Medicine*. 2021; 38:100992. [DOI:10.1016/j.eclinm.2021.100992] [PMID] [PMCID]