

Effects of hydroalcoholic extract of *Melissa officinalis* on anxiety-like behavior and oxidative stress markers in the hippocampus of aged mice

Mobina Mansouryar¹, Fereshteh Farajdokht¹, Javad Mahmoudi¹, Saeed Sadigh-Eteghad^{1*}

Neurosciences Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 7 Jan 2026

Revised: 15 Mar 2026

Accepted: 19 Mar 2026

ePublished: 26 May 2026

Keywords:

- *Melissa officinalis*
- Aging
- Anxiety
- Oxidative stress

Abstract

Background. The increasing prevalence of mood disorders among the elderly, together with the growing interest in medicinal plants and complementary therapies, highlights the need for further research in this field. The present study investigated the effects of the hydroalcoholic extract of *Melissa officinalis* on anxiety-like behavior and oxidative stress parameters in the hippocampus of aged mice.

Methods. In this study, a total of 45 male albino mice were used, including young (2 months old) and aged (24 months old) animals. The animals in the aged intervention group received *Melissa officinalis* extract orally at a dose of 150 mg/kg body weight per day, while the aged and young control groups received normal saline orally for 14 days. At the end of the treatment period, behavioral assessments, including the Open Field Test and the Elevated Plus Maze, were performed. In addition, serum corticosterone levels, total antioxidant capacity, and hippocampal levels of malondialdehyde, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase were measured.

Results. Anxiety-like behavior was significantly increased in the aged control group compared with the young control group ($P < 0.001$). This change was accompanied by elevated serum corticosterone levels, increased malondialdehyde concentrations, and reduced antioxidant enzyme activities in the hippocampus ($P < 0.01$). Administration of the extract significantly improved anxiety-like behavior ($P < 0.01$) and reduced serum corticosterone levels ($P < 0.05$) in the intervention group compared with the aged control group. Moreover, treatment with the extract resulted in reduced malondialdehyde levels ($P < 0.01$) and improved antioxidant enzyme activities ($P < 0.05$).

Conclusion. Overall, the findings suggest that the anxiolytic effects of *Melissa officinalis* in aged mice are mediated, at least in part, through attenuation of stress axis activity, reduction of oxidative stress, and enhancement of hippocampal antioxidant status.

Practical Implications. The use of *Melissa officinalis* extract may exert anxiolytic effects in the elderly by improving hippocampal antioxidant defenses.

How to cite this article: Mansouryar M, Farajdokht F, Mahmoudi J, Sadigh-Eteghad S. Effects of hydroalcoholic extract of *Melissa officinalis* on anxiety-like behavior and oxidative stress markers in the hippocampus of aged mice. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2026;48(2): . doi: 10.34172/mj.026.35339. Persian.

Extended Abstract

Background

Aging is accompanied by progressive structural and functional alterations in the central nervous system, which can lead to cognitive and emotional impairments, including an increased prevalence of anxiety-like behaviors. Accumulating evidence indicates that advancing age disrupts the balance of

neurochemical and hormonal systems in the brain, resulting in stress responses. Among brain regions, the hippocampus plays a pivotal role in the regulation of emotion, memory, and stress responsiveness. Additionally, it is particularly vulnerable to age-related pathological processes.

*Corresponding author; Email: saeed.sadigetegad@gmail.com

© 2026 The Authors. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution CC BY 4.0 License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

One of the major mechanisms underlying aging-related neural damage is oxidative stress. An age-dependent increase in reactive oxygen species production, together with a decline in endogenous antioxidant defense systems, contributes to lipid peroxidation, protein oxidation, and neuronal dysfunction. Previous studies have reported elevated oxidative stress markers and reduced activity of antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx), in the hippocampus of aged animals. These biochemical alterations are closely associated with elevated levels of stress hormones, including corticosterone, and the manifestation of anxiety-like behaviors.

In recent years, growing attention has been directed toward plant-derived compounds with antioxidant and neuromodulatory properties as potential interventions to prevent or attenuate age-related neural dysfunction. *Melissa officinalis* is a well-known medicinal herb traditionally used to alleviate anxiety, improve the quality of sleep, and enhance the function of nervous system. Pharmacological studies have demonstrated that *M. officinalis* contains phenolic and flavonoid compounds with antioxidant, anti-inflammatory, and neuroprotective effects. However, evidence regarding its efficacy in ameliorating aging-associated anxiety-like behaviors and oxidative stress, particularly in specific regions of the brain such as the hippocampus, remains limited and sometimes inconsistent.

Given the central role of the hippocampus in stress regulation and its susceptibility to aging-related damage, together with the therapeutic potential of *M. officinalis* as a natural herbal compound, further experimental investigation is warranted. Therefore, the present study aimed to evaluate the effects of a hydroalcoholic extract of *M. officinalis* on anxiety-like behaviors, serum corticosterone levels, and oxidative stress and antioxidant markers in the hippocampus of aged mice.

Methods

This experimental study was approved by the Regional Ethics Committee of Tabriz University of Medical Sciences (IR.TBZMED.AEC.1400.005). A total of 45 male albino mice were used in this study

and housed under standard laboratory conditions ($24 \pm 2^\circ\text{C}$, 12-h light/dark cycle) with free access to food and water.

Animals were randomly divided into three groups ($n = 15$ per group): (1) young control mice (2 months old) receiving normal saline, (2) aged control mice (24 months old) receiving normal saline, and (3) aged mice treated with hydroalcoholic extract of *M. officinalis* (150 mg/kg; Aged + MO). All treatments were administered orally by gastric gavage for 14 consecutive days at a fixed volume of 10 mL/kg.

The aerial parts of *M. officinalis* were collected before flowering from an organic farm in East Azerbaijan Province, Iran, authenticated, and deposited in the herbarium of Tabriz University of Medical Sciences. The collected plant material was shade-dried, powdered, and extracted using a 30:70 ethanol–water solvent by warm maceration. The solvent was removed under reduced pressure, and the resulting dry extract was stored at 4°C in darkness until use.

Behavioral assessments were performed in a quiet room by an experimenter blinded to group allocation. Anxiety-like behaviors were evaluated using the Open Field Test (OFT) and the Elevated Plus Maze (EPM). All sessions were video-recorded and analyzed using EthoVision™ software.

Following behavioral testing, animals were anesthetized with ketamine/xylazine and euthanized. Blood samples were collected for serum separation, and hippocampal tissues were rapidly dissected, frozen in liquid nitrogen, and stored at -70°C . Serum corticosterone levels were measured using an ELISA kit. Hippocampal homogenates were prepared for biochemical analyses, including malondialdehyde (MDA) as a marker of lipid peroxidation, total antioxidant capacity (TAC), and the activities of SOD and GPx, using standard commercial kits.

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8. The normality of data distribution was assessed by the Kolmogorov–Smirnov test. Results were presented as mean \pm SEM and analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. $P < 0.05$ was considered statistically significant in this study.

Results

In the OFT, locomotor activity did not differ significantly among the experimental groups, indicating that motor function was not affected by aging or treatment. However, the time spent in the central zone was significantly reduced in aged control mice compared with young controls, reflecting increased anxiety-like behavior. Treatment with *M. officinalis* significantly increased central zone exploration in aged mice relative to aged controls.

In the EPM, aged control mice exhibited a marked reduction in both the percentage of time spent in open arms (OAT%) and the percentage of open arm entries (OAE%) compared with young controls. Administration of *M. officinalis* to aged mice significantly increased both parameters, indicating an anxiolytic-like effect.

Serum corticosterone levels were significantly elevated in aged control mice compared with young controls. Treatment with *M. officinalis* significantly reduced corticosterone levels in aged mice.

Biochemical analyses of hippocampal tissue showed significantly higher MDA levels and lower

TAC and SOD activity in aged control mice compared with young controls, indicating enhanced oxidative stress and impaired antioxidant defense. Treatment with *M. officinalis* significantly reduced MDA levels and increased TAC and SOD activity in aged mice. Moreover, GPx activity did not differ significantly among groups.

Conclusion

Overall, the findings of this study suggest that the anxiolytic effects of *M. officinalis* in aged mice are mediated, at least in part, through attenuation of stress axis activity, reduction of oxidative stress, and improvement of antioxidant status in the hippocampus. The phenolic and flavonoid constituents of *M. officinalis*, which possess antioxidant and neuromodulatory properties, likely play a crucial role in these protective effects. Nevertheless, further studies are required to elucidate the precise molecular mechanisms and receptor pathways involved in the neuroprotective actions of this medicinal plant during aging.

تأثیر عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه بر رفتار اضطرابی و فاکتورهای استرس اکسیداتیو در هیپوکمپ موش‌های سالخورده

مبینا منصوریار^{ID}، فرشته فرج‌دخت^{ID}، جواد محمودی^{ID}، سعید صدیق اعتقاد^{ID}*

مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

چکیده

زمینه. شیوع اختلالات خلقی در میان سالمندان و اعتقاد بیماران به استفاده از گیاهان دارویی و طب مکمل نیاز به مطالعات در این زمینه را بیش از پیش برجسته می‌نماید. در این مطالعه، به بررسی اثر عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه بر رفتار اضطرابی و فاکتورهای استرس اکسیداتیو در هیپوکمپ موش‌های سالخورده پرداخته شده است.

روش کار. در مطالعه حاضر از ۴۵ سر موش آزمایشگاهی کوچک جنس نر از نژاد آلبینو در محدوده سنی ۲ ماه برای گروه جوان و ۲۴ ماه برای گروه سالخورده استفاده گردید. برای گروه مداخله به موش‌های سالخورده عصاره خوراکی بادرنجبویه به مقدار ۱۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز و برای گروه کنترل سالخورده و جوان، نرمال سالین به مدت ۱۴ روز به صورت خوراکی تجویز گردید. در پایان آزمون‌های رفتاری شامل آزمون میدان باز و ماز بعلاوه‌ای مرتفع‌شده به عمل آمد. همچنین، سطح سرمی کورتیکوسترون، ظرفیت آنتی‌اکسیدان تام و مقادیر مالون دی‌آلدئید، سوپراکسید دسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز هیپوکمپ مورد سنجش قرار گرفتند.

یافته‌ها. رفتار اضطرابی در گروه کنترل سالخورده نسبت به کنترل جوان به میزان معنی‌داری افزایش داشت ($P < 0.001$)، این تغییر همراه با افزایش سرمی کورتیکوسترون و افزایش مقادیر مالون دی‌آلدئید و کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها در هیپوکمپ بود ($P < 0.01$). تجویز عصاره، رفتار اضطرابی ($P < 0.01$) و سطح سرمی کورتیکوسترون ($P < 0.05$) را در گروه مداخله نسبت به گروه کنترل سالخورده به طور معنی‌دار اصلاح کرد. به‌علاوه، تجویز عصاره منجر به کاهش سطح مالون دی‌آلدئید ($P < 0.01$) و بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شد ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری. در مجموع، به نظر می‌رسد اثرات ضد اضطرابی بادرنجبویه در موش‌های سالخورده، حداقل تا حدودی از طریق کاهش فعالیت محور استرس، کاهش استرس اکسیداتیو و بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانی هیپوکمپ اعمال می‌شود.

پیامدهای عملی. استفاده از عصاره بادرنجبویه ممکن است با بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانی هیپوکمپ اثرات ضد اضطرابی در سالمندان داشته باشد.

اطلاعات مقاله

سابقه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۴/۱۰/۱۷
اصلاح نهایی: ۱۴۰۴/۱۲/۲۴
پذیرش: ۱۴۰۴/۱۲/۲۸
انتشار برخط: ۱۴۰۵/۳/۵

کلیدواژه‌ها:

- بادرنجبویه
- سالمندی
- اضطراب
- استرس اکسیداتیو

مقدمه

تنظیم هیجان، حافظه و پاسخ به استرس نقش اساسی دارد، به‌طور ویژه در برابر فرآیندهای وابسته به پیری آسیب‌پذیر است.^۱ یکی از مکانیسم‌های مهم دخیل در آسیب‌های عصبی مرتبط با پیری، استرس اکسیداتیو است. افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و کاهش ظرفیت سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی در مغز سالمندان، منجر به پراکسیداسیون لیپیدها، آسیب به پروتئین‌ها و اختلال در عملکرد سلول‌های عصبی می‌شود.^۳ مطالعات متعددی افزایش

پیری با بروز تغییرات ساختاری و عملکردی در دستگاه عصبی مرکزی همراه است که می‌تواند منجر به اختلالات شناختی و هیجانی، از جمله افزایش رفتارهای اضطرابی شود. شواهد نشان می‌دهد که با افزایش سن، تعادل سیستم‌های نوروشیمیایی و هورمونی مغز دچار اختلال شده و پاسخ به استرس تشدید می‌گردد. در این میان، هیپوکمپ به‌عنوان یکی از نواحی کلیدی مغز که در

*نویسنده مسؤول؛ ایمیل: saeed.sadigetegad@gmail.com

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کپی‌رایت کامنز 4.0 (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه^۹ (Aged + MO) تقسیم شدند. کلیه تجویزها از راه خوراکی (گاواژ معدی) و به مدت ۱۴ روز و با حجم ثابت ۱۰ میلی‌لیتر به ازای هر کیلوگرم وزن بدن انجام گرفت.

اندام هوایی گیاه بادرنجبویه با نام علمی *Melissa officinalis* قبل از گل‌دهی از یک مزرعه ارگانیک در استان آذربایجان شرقی، شهرستان بستان‌آباد بخش تکمه‌دانش جمع آوری گردید و با کد (NO: Fph-Tbz 4031) در هراریوم دانشگاه علوم پزشکی تبریز حفظ سابقه گردید. سپس اندام هوایی گیاه در سایه در دمای طبیعی اتاق با هوادهی ملایم خشک گردید. به منظور ایجاد سطح تماس بیشتر گیاه با حلال، گیاه خشک شده توسط آسیاب برقی پودر گردید. مقدار ۱۰۰ گرم پودر حاصله با حلال اتانول-آب با نسبت (۳۰:۷۰؛ حجمی:حجمی) حل و به روش ماسراسیون گرم عصاره‌گیری انجام شد. فرآیند عصاره‌گیری در مکانی دور از تابش مستقیم نور خورشید و با هم‌زدن‌های مکرر طی چند روز متوالی در دمای آزمایشگاه انجام شد. پس از اتمام عصاره‌گیری، عصاره حاصل صاف و حلال موجود تحت خلأ توسط دستگاه روتاری اواپراتور تبخیر شد و در دمای کمتر از ۴۵ درجه سانتی‌گراد و در فشار پایین خشک و سپس پودر آن تهیه گردید. این پودر در ظرف شیشه‌ای مخصوص، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری گردید.

تمامی آزمون‌های رفتاری در یک اتاق ساکت و آرام توسط یک آزمایشگر بدون اطلاع از گروه‌بندی‌ها (کورسازی‌شده)، انجام شد. موش‌ها پس از انتقال به اتاق حداقل مدت ۴۵ دقیقه قبل از آزمایش وقت داشتند تا با محیط اتاق سازگار شوند. برای سنجش سطح اضطراب از آزمون‌های میدان باز (Open Field Test; OFT) و ماز بعلاوه مرتفع (Elevated plus-maze; EPM) استفاده شد. تمام آزمون‌ها توسط دوربین فیلم‌برداری دیجیتال ضبط و متعاقباً با استفاده از یک برنامه ردیابی ویدیویی EthoVisionTM مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. پس از هر آزمایش برای از بین بردن اثرات بویایی حیوانات قبلی، تجهیزات آزمون‌های رفتاری با الکل ۷۰ درصد تمیز شد.

در آزمون تست میدان باز، از جعبه‌ای مکعبی شکل به رنگ مشکی و با ابعاد ۳۳×۳۳×۳۳ سانتی‌متر استفاده شد. برای انجام آزمون هر موش در داخل جعبه قرار گرفت و فعالیت حرکتی خودبخودی آن در مدت ۱۰ دقیقه ثبت شد. دو شاخص مدت زمان حضور در محدوده مرکزی میدان و میزان مسافت کلی طی شده توسط موش مورد ارزیابی قرار گرفت. ماز مورد استفاده برای آزمون ماز، از جنس چوب بوده و از دو بازوی باز (۵×۳۰ سانتی‌متر) و دو بازوی بسته (۵×۳۰ سانتی‌متر) با دیواره‌ای با بلندی ۱۵ سانتی‌متر

شاخص‌های استرس اکسیداتیو و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر سوپراکسید دیسموتاز و گلوکاتایون پراکسیداز را در هیپوکمپ حیوانات سالخورده گزارش کرده‌اند.^{۵،۴} این تغییرات با افزایش سطح هورمون‌های استرس از جمله کورتیکوسترون و بروز رفتارهای اضطرابی ارتباط نزدیکی دارند.^۶

در سال‌های اخیر، توجه فزاینده‌ای به استفاده از ترکیبات گیاهی با خواص آنتی‌اکسیدانی و تنظیم‌کننده عصبی در پیشگیری یا کاهش عوارض عصبی سالخوردگی معطوف شده است. بادرنجبویه یکی از گیاهان دارویی شناخته‌شده است که در طب سنتی برای کاهش اضطراب، بهبود خواب و تقویت عملکردهای عصبی مورد استفاده قرار می‌گیرد. مطالعات فارماکولوژیک نشان داده‌اند که این گیاه دارای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی با خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و محافظت‌کننده عصبی است.^۷ با این حال، شواهد موجود در خصوص تأثیر بادرنجبویه بر رفتارهای اضطرابی مرتبط با سالمندی و تغییرات استرس اکسیداتیو در نواحی خاصی از مغز، به‌ویژه هیپوکمپ، محدود و گاه متناقض است.^{۸،۹}

با توجه به نقش کلیدی هیپوکمپ در تنظیم پاسخ به استرس و آسیب‌پذیری آن در فرآیند سالمندی و همچنین پتانسیل درمانی بادرنجبویه به‌عنوان یک ترکیب گیاهی طبیعی، انجام مطالعات تجربی در این زمینه ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین، هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیر عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه بر رفتارهای اضطرابی و شاخص‌های استرس اکسیداتیو و آنتی‌اکسیدانی در هیپوکمپ موش‌های پیر بود. نتایج این پژوهش می‌تواند شواهد تجربی جدیدی در خصوص نقش محافظتی بادرنجبویه در برابر اختلالات عصبی ناشی از سالمندی فراهم آورد و زمینه‌ساز مطالعات بیشتر در این حوزه باشد.

روش کار

پژوهش حاضر یک مطالعه تجربی بود. مجوز اخلاقی انجام پژوهش از کمیته منطقه‌ای اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی تبریز با شماره IR.TBZMED.AEC.1400.005 کسب شد. در این مطالعه از ۴۵ سر موش آزمایشگاهی کوچک جنس نر از نژاد آلبینو استفاده شد. موش‌ها به مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه منتقل شدند و تحت دمای ۲۴±۲ و در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی و دسترسی آزادانه به آب و غذا نگهداری شدند. موش‌ها به ۳ گروه ۱۵ تایی شامل: (۱) گروه کنترل جوان (۲ ماهه) (Young Control) که روزانه نرمال سالیان دریافت کردند، (۲) گروه کنترل سالخورده (۲۴ ماهه) (Aged Control) که روزانه نرمال سالیان دریافت کردند و (۳) گروه سالخورده دریافت‌کننده ۱۵۰

دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج نوری ۵۴۰ نانومتر ثبت و به صورت nmol/mgprotein گزارش گردید.

میزان ظرفیت تام آنتی اکسیدانی (TAC): میزان TAC با روش ABTS با استفاده از کیت آزمایشگاهی Randox بر اساس پروتکل کارخانه سازنده (Randox Laboratories Ltd, Crumlin, UK) اندازه گیری شد. میزان جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر ثبت و غلظت TAC به صورت nmol/L گزارش گردید.

فعالیت آنزیم سوپر اکسید دسموتاز (SOD): فعالیت آنزیم SOD نیز با استفاده از کیت آزمایشگاهی RANSOD بر اساس پروتکل کارخانه سازنده (Randox Laboratories Ltd, Crumlin, UK) اندازه گیری شد. میزان جذب در طول موج ۵۰۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در ۳۷ درجه سانتی گراد ثبت و غلظت SOD به صورت U/mg protein گزارش گردید.

فعالیت آنزیم گلوکوتایون پراکسیداز (GPx): فعالیت آنزیم GPx با استفاده از کیت آزمایشگاهی RANSEL بر اساس پروتکل کارخانه سازنده اندازه گیری شد. کاهش جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در ۳۷ درجه سانتی گراد ثبت و غلظت GPx به صورت U/mg protein گزارش گردید.

داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری Graph Pad Prism نسخه ۸ تحلیل شد. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov بررسی شدند. جهت توصیف داده‌های کمی از میانگین \pm خطای استاندارد استفاده شد. برای تحلیل داده‌های کمی، از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد. در تمام مراحل $\alpha=0.05$ و فاصله اطمینان ۹۵٪ در نظر گرفته شد. از روش تصادفی سازی ساده در تخصیص موش‌ها به گروه‌های مورد مطالعه و در انتخاب نمونه‌ها برای آزمایش استفاده گردید.

یافته‌ها

مقایسه میزان فعالیت حرکتی (Locomotor activity) در گروه‌های مورد مطالعه در شکل ۱-A نشان داده شده است. همان‌طور که در این شکل مشاهده می‌شود، میزان فعالیت حرکتی در بین گروه‌های مورد مطالعه تفاوت معناداری را نشان نداد ($p>0.05$). در حالی که زمان سپری شده در ناحیه مرکزی در گروه کنترل سالخورده در مقایسه با گروه کنترل جوان به طور معناداری کاهش یافته است ($p<0.001$); همچنین، تجویز بادرنجبویه در گروه

بعلاوه‌ای شکل تشکیل شده بود که ۵۰ سانتی‌متر از سطح زمین ارتفاع داشت. جهت انجام آزمون، موش‌ها در محدوده مرکزی ماز قرار گرفته، به صورتی که رو به راهروی باز بودند. تعداد دفعات و مدت زمانی که موش در مدت ۵ دقیقه وارد راهروهای باز یا بسته می‌شد، مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. بر همین اساس، درصد زمان و درصد ورود به راهروهای باز محاسبه گردید. منظور از ورود به راهروی باز یا بسته هنگامی است که هر چهار تا پای موش در راهروی مورد نظر قرار می‌گیرد. زمان گذرانده شده در هر راهرو نیز بر همین اساس محاسبه گردید.

درصد زمان سپری شده در بازوی باز (Open Arm Time; OAT %)

$$\frac{\text{مدت زمان سپری شده در بازوی باز}}{\text{مجموع زمان‌های سپری شده در بازوهای باز و بسته}} \times 100$$

درصد دفعات ورود به بازوی باز (Open Arm Entry; OAE %)

$$\frac{\text{تعداد دفعات ورود به بازوی باز}}{\text{مجموع تعداد دفعات ورود به بازوهای باز و بسته}} \times 100$$

برای نمونه برداری، پس از پایان آزمون‌های رفتاری، موش‌ها با مخلوطی از کتامین و زایلازین به ترتیب با دوزهای ۱۰۰ و ۱۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن از طریق تزریق داخل صفاقی بیهوش شدند. بعد از آسان‌کشی نمونه خون اخذ و سرم جداسازی گردید. همچنین، پس از استخراج مغز بافت هیپوکمپ جداسازی و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد شد و سپس به فریزر منفی ۷۰ درجه منتقل گردید.

سطح کورتیکوسترون سرم با استفاده از کیت (Abcam, ELISA, ab108821, Cambridge, UK) با رعایت پروتکل کارخانه سازنده مورد سنجش قرار گرفت.

بافت هیپوکمپ با استفاده از هموزنایزر در محلول کلرید پتاسیم ۱/۱۵ درصد هموزن شدند. در مرحله بعد، محلول به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در شرایط ۶۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس لایه رویی جمع‌آوری و میزان پروتئین نسج به روش برادفورد (Bradford) تعیین گردید.

برای اندازه‌گیری شاخص‌های استرس اکسیداتیو به شرح زیر، از کیت‌های تجاری مربوطه و طبق دستورالعمل آنها استفاده گردید.

میزان مالون دی‌آلدئید (MDA): سطح MDA یک بیومارکری است که نشانگر استرس اکسیداتیو و شاخص پراکسیداسیون لیپیدها است. سطح MDA با استفاده از روش رنگ سنجی واکنش اسید تیوباربیتوریک اسیدمورد بررسی قرار گرفت. غلظت آن با

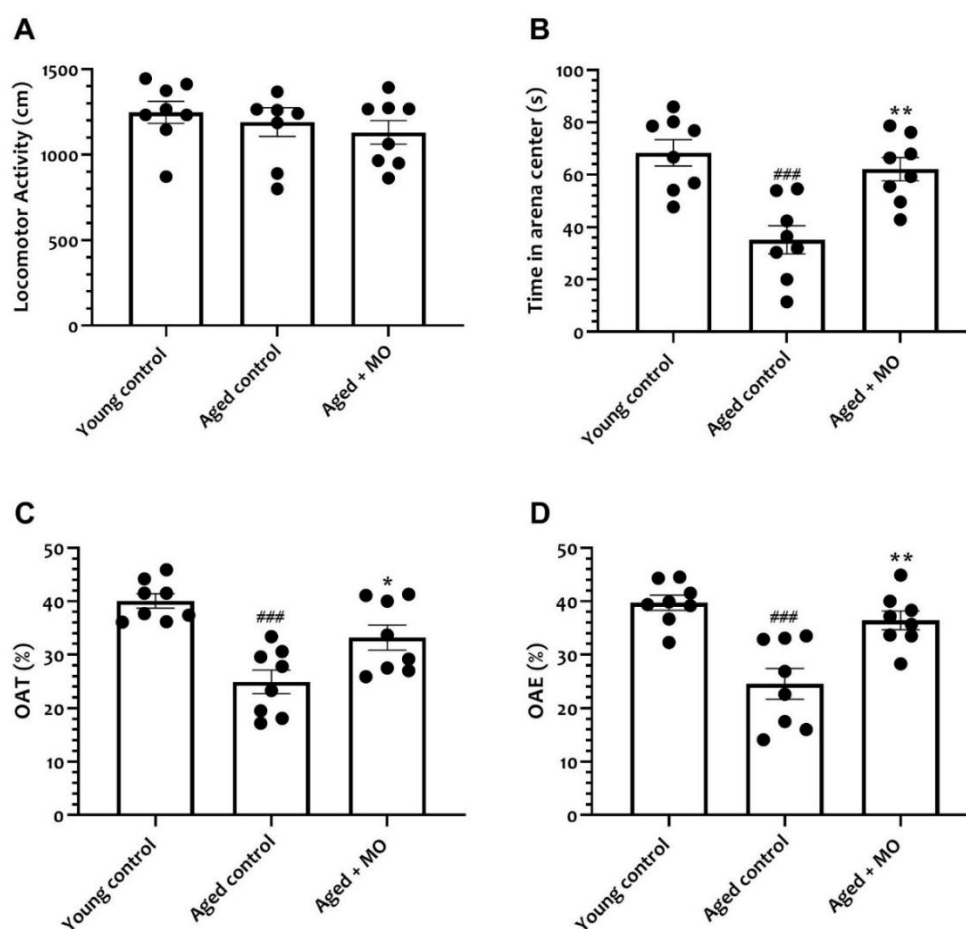
است که در گروه سالخورده دریافت‌کننده بادرنجبویه در مقایسه با گروه کنترل سالخورده، درصد ورود به راهرو باز افزایش معناداری داشت ($p < 0/01$) (شکل ۱-D).

نتایج بررسی مقادیر کورتیکوسترون سرمی نشان داد که گروه کنترل سالخورده در مقایسه با گروه کنترل جوان، سطح سرمی بالاتری دارند ($p < 0/01$); از طرفی عصاره بادرنجبویه در حیوانات سالخورده سبب کاهش معنادار این شاخص در مقایسه با گروه کنترل سالخورده شد ($p < 0/05$) (شکل ۲).

سالخورده سبب افزایش معنادار زمان سپری‌شده در ناحیه مرکزی در مقایسه با گروه کنترل سالخورده شد ($p < 0/01$) (شکل ۱-B).

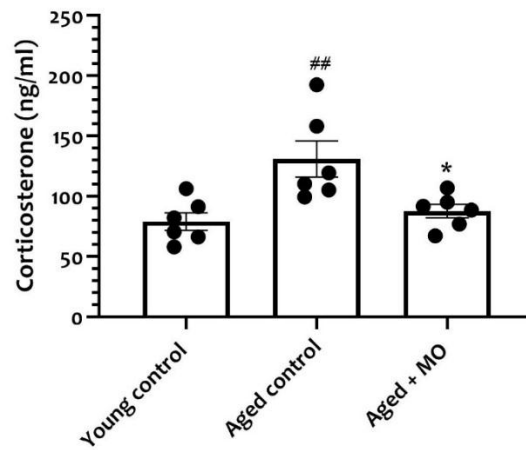
نتایج آزمون ماز بعلاوه مرتفع نشان داد که گروه کنترل سالخورده در مقایسه با گروه کنترل جوان، کاهش معناداری در درصد OAT دارند ($p < 0/001$); از طرفی عصاره بادرنجبویه در گروه سالخورده دریافت‌کننده آن سبب افزایش معنادار درصد مدت زمان ماندن در راهرو باز در مقایسه با گروه کنترل سالخورده شد ($p < 0/05$) (شکل ۱-C).

همچنین درصد OAE در گروه کنترل سالخورده در مقایسه با گروه کنترل جوان، کاهش معناداری داشت ($p < 0/001$). این در حالی

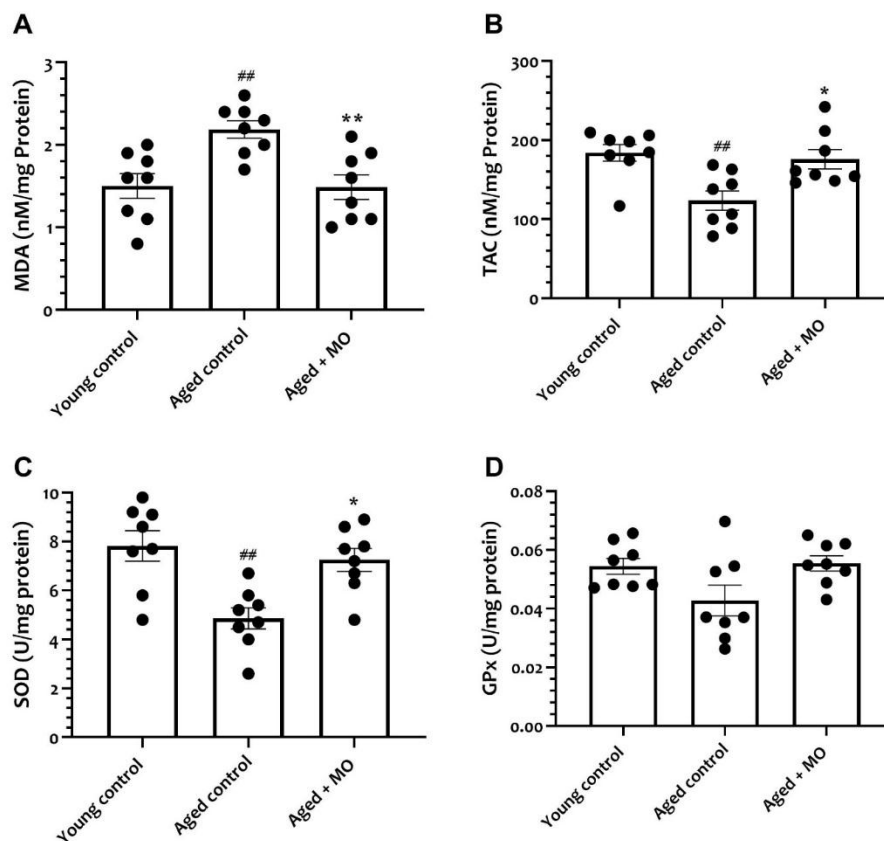


شکل ۱: تأثیر تجویز عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه بر: (A) فعالیت حرکتی (Locomotor activity)، (B) میزان حضور در مرکز میدان (Time in arena center) در آزمون میدان باز، (C) درصد زمان حضور در راهرو باز (OAT%) و (D) درصد ورود به راهرو باز (OAE%) در آزمون ماز بعلاوه‌ای شکل. داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد گزارش شده‌اند ($n=8$). $p < 0/001$ ### در مقایسه با گروه کنترل جوان؛ $p < 0/05$ * و $p < 0/01$ ** در مقایسه با گروه کنترل سالخورده.

OAT: Open Arm Time; OAE: Open Arm Entry; MO: *Melissa officinalis* extract



شکل ۲: تأثیر تجویز عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه بر مقادیر کورتیکوسترون سرم در گروه‌های مورد مطالعه. داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد گزارش شده‌اند (n=۶). $^{##}p < 0.01$ در مقایسه با گروه کنترل جوان؛ $^{*}p < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل سالخورده. MO: *Melissa officinalis* extract.



شکل ۳: تأثیر تجویز عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه بر: (A) مقادیر مالون دی‌آلدئید (MDA)، (B) ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی (TAC)، (C) فعالیت آنزیم سوپر اکسید دسموتاز (SOD)، (D) فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون پراکسیداز (GPx). داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای استاندارد گزارش شده‌اند (n=۸). $^{##}p < 0.01$ در مقایسه با گروه کنترل جوان؛ $^{*}p < 0.05$ و $^{**}p < 0.01$ در مقایسه با گروه کنترل سالخورده.

MDA: Malondialdehyde; TAC: Total anti-oxidant capacity; SOD: Super oxide dismutase; GPx: Glutathione peroxidase; MO: *Melissa officinalis* extract

بادرنجبویه می‌تواند رفتار اضطرابی را در حیوانات تحت استرس در آزمون میدان باز کاهش دهد.^۹ نتایج آزمون ماز بعلاوه مرتفع نیز این یافته‌ها را تأیید کرد. به طوری که کاهش درصد زمان ماندن و تعداد ورود به بازوهای باز در گروه کنترل سالخورده نشان‌دهنده افزایش اضطراب وابسته به سن است. در مقابل، افزایش معنادار هر دو شاخص OAT و OAE در گروه دریافت‌کننده بادرنجبویه بیانگر کاهش رفتارهای اجتنابی و بهبود وضعیت اضطرابی حیوانات سالخورده است. هم راستا با نتایج ما، در مطالعه چن و همکاران، موش‌های سالخورده رفتارهای شبه اضطرابی در آزمون ماز بعلاوه مرتفع نشان دادند.^{۱۲} همچنین، مطالعه حاتمی و همکاران نشان دهنده تأثیرات ضد اضطرابی عصاره بادرنجبویه در حیوانات تغذیه شده با رژیم غذایی پرچرب بود.^{۱۳} در مطالعه دیگری بر روی موش‌های دچار اضطراب خفیف، عصاره بادرنجبویه باعث بهبود وضعیت اضطرابی در آزمون ماز بعلاوه‌ای شکل شده است.^{۱۴} این شواهد رفتاری در مطالعه حاضر و مطالعات پیشین، منعکس‌کننده توانایی بالقوه بادرنجبویه در کاهش سطح اضطراب تحت شرایط مختلف در جوندگان آزمایشگاهی می‌باشد.

در سطح هورمونی، افزایش معنادار کورتیکوسترون سرمی در موش‌های پیر نسبت به موش‌های جوان نشان‌دهنده فعال شدن محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال (HPA) در اثر سالمندی است. فعالیت بیش از حد این محور یکی از مکانیسم‌های شناخته شده در بروز اختلالات اضطرابی و آسیب‌های هیپوکمپ محسوب می‌شود.^{۱۴} در مطالعه لی و همکاران موش‌های سالخورده ۱۸ ماهه کورتیکوسترون سرمی بیشتری نسبت به موش‌های جوان ۲ ماهه داشته‌اند.^{۱۵} در مطالعه حاضر کاهش معنادار سطح کورتیکوسترون در گروه موش‌های سالخورده دریافت‌کننده بادرنجبویه نشان می‌دهد که این گیاه می‌تواند از طریق تعدیل پاسخ استرسی و مهار فعالیت بیش‌ازحد محور HPA، در بهبود رفتارهای اضطرابی نقش داشته باشد. به طور مشابه، در مطالعه یو و همکاران، تجویز سه هفته‌ای بادرنجبویه (۲۰۰-۵۰ میلی‌گرم به ازاء کیلوگرم وزن بدن) توانست مقدار کورتیکوسترون سرمی را به نحو چشمگیری کاهش دهد.^{۱۶}

از منظر بیوشیمیایی، افزایش سطح MDA و کاهش TAC و فعالیت آنزیم SOD در هیپوکمپ موش‌های سالخورده، نشان‌دهنده تشدید استرس اکسیداتیو در این ناحیه حساس مغزی است. هیپوکمپ به دلیل مصرف بالای اکسیژن و غنای لیپیدی، نسبت به آسیب‌های اکسیداتیو بسیار آسیب‌پذیر است و این تغییرات می‌توانند زمینه‌ساز اختلالات هیجانی و شناختی در سالمندی باشند.

سطح MDA در گروه کنترل سالخورده در مقایسه با گروه کنترل جوان به طور معناداری بالاتر بود ($p < 0/01$). با این حال، این شاخص در گروه سالخورده دریافت‌کننده بادرنجبویه در مقایسه با گروه کنترل سالخورده کاهش معناداری داشت ($p < 0/01$) (شکل ۳-A). در عین حال، سطح TAC در گروه کنترل سالخورده در مقایسه با گروه کنترل جوان به طور معناداری پایین‌تر بود ($p < 0/01$). در حالی که این میزان در گروه سالخورده دریافت‌کننده عصاره بادرنجبویه در مقایسه با گروه کنترل سالخورده افزایش معناداری داشت ($p < 0/05$) (شکل ۳-B).

همچنین، شاخص SOD در گروه کنترل سالخورده در مقایسه با گروه کنترل جوان، پایین‌تر بود ($p < 0/01$). در حالی که این شاخص در گروه سالخورده دریافت‌کننده عصاره در مقایسه با گروه کنترل سالخورده، افزایش معنادار داشت ($p < 0/01$) (شکل ۳-C). همچنین، سطح GPx در بین گروه‌های مورد مطالعه تفاوت معناداری نداشت ($p > 0/05$) (شکل ۳-D).

بحث

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که سالمندی با بروز رفتارهای اضطرابی، افزایش سطح کورتیکوسترون سرمی و تشدید استرس اکسیداتیو در هیپوکمپ همراه است و تجویز عصاره هیدروالکلی بادرنجبویه توانست به طور معناداری این تغییرات را در موش‌های سالخورده تعدیل کند. این نتایج از نقش بالقوه بادرنجبویه در کاهش اختلالات اضطرابی و بیوشیمیایی مرتبط با سالمندی حمایت می‌کند.

در آزمون میدان باز، کاهش زمان سپری شده در ناحیه مرکزی در گروه کنترل سالخورده نسبت به گروه جوان، بیانگر افزایش رفتار اضطرابی در اثر سالمندی است. در عین حال، عدم تفاوت معنادار در فعالیت حرکتی کلی بین گروه‌ها نشان می‌دهد که تغییرات مشاهده شده در شاخص‌های اضطرابی مستقل از اختلالات روانی - حرکتی بوده و ناشی از کاهش تحرک عمومی حیوانات نیست. مطالعه ایبارا و همکاران نیز نشان داد که تجویز این عصاره تأثیری بر فعالیت حرکتی حیوانات مورد مطالعه در آزمون میدان باز ندارد.^{۱۰} از طرفی دیگر، افزایش معنادار زمان حضور در ناحیه مرکزی در موش‌های سالخورده دریافت‌کننده بادرنجبویه نشان‌دهنده اثرات ضد اضطرابی این عصاره است. گورینا و همکاران نشان دادند که با افزایش سن در جوندگان میزان زمان سپری شده در ناحیه مرکزی در آزمون میدان باز کاهش می‌یابد که این عمل بیانگر اضطراب در این حیوانات می‌باشد.^{۱۱} در مقابل، قاضی‌زاده و همکاران نشان دادند که

رفتاری، هورمونی و برخی فاکتورهای استرس اکسیداتیو مورد ارزیابی قرار گرفتند، سایر مکانیسم‌های مولکولی و سلولی دخیل در رفتارهای اضطرابی مرتبط با پیری، از جمله تغییرات سیستم‌های نوروترانسمیتری، بیان گیرنده‌ها و مسیرهای انتهایی، در این مطالعه بررسی نشدند. همچنین، استفاده از موش‌های نر امکان تعمیم نتایج به جنس ماده را محدود می‌کند، چرا که تفاوت‌های جنسی می‌توانند در پاسخ به استرس و مداخلات دارویی نقش مهمی ایفا کنند. از این رو، انجام مطالعات آینده با در نظر گرفتن هر دو جنس، بررسی شاخص‌های مولکولی تکمیلی و همچنین مقایسه اثرات بادرنجوبیه با داروهای ضد اضطراب استاندارد می‌تواند به تبیین دقیق‌تر مکانیسم‌های اثر و پتانسیل بالینی این گیاه دارویی کمک نماید.

نتیجه‌گیری

در مجموع، به نظر می‌رسد اثرات ضد اضطرابی بادرنجوبیه در موش‌های سالخورده، حداقل تا حدودی از طریق کاهش فعالیت محور استرس به واسطه کورتیکوسترون، کاهش استرس اکسیداتیو و بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانی هیپوکمپ اعمال می‌شود. احتمالاً ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی موجود در بادرنجوبیه، که واجد خواص آنتی‌اکسیدانی و تنظیم‌کننده عصبی هستند، می‌توانند نقش مهمی در این اثرات محافظتی ایفا کنند. با این حال، شناسایی دقیق مسیرهای مولکولی و درگیری احتمالی گیرنده‌های مختلف در این فرآیند نیازمند مطالعات تکمیلی می‌باشد.

قدردانی

نویسندگان از مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی تبریز تشکر و قدردانی می‌کنند.

مشارکت پدیدآوران

فرشته فرج‌دخت: طراحی مطالعه، مشارکت در طراحی روش-شناسی؛ سعید صدیق اعتقاد: طراحی مطالعه، مشارکت در طراحی روش‌شناسی، نظارت بر بخش عملی، بررسی نتایج؛ جواد محمودی: انجام بخش عملی پژوهش و نگارش گزارش اولیه؛ مبینا منصوریار: مشارکت در طراحی روش‌شناسی، نظارت بر مراحل پژوهش، تحلیل آماری داده‌ها، بررسی نتایج، نگارش اولیه و ویرایش مقاله. تمامی نویسندگان نسخه نهایی مقاله را مطالعه و تأیید نموده‌اند.

منابع مالی

منابع مالی ندارد.

شواهد نشان می‌دهد که فعالیت بیش از حد محور HPA به‌همراه افزایش کاتکولامین‌ها منجر به افزایش نفوذ گلوکز در بافت‌ها و متابولیسم هرچه بیشتر آن شده و افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و سرانجام تخریب اکسیداتیو مغز را موجب می‌گردد.^{۱۷، ۱۸} از طرف دیگر، از آنجایی که سلول‌های عصبی توانایی بسیار کمی در تولید آنتی‌اکسیدان‌های داخلی دارند، لذا در مقابل اکسیداتیو استرس بسیار آسیب‌پذیر بوده و زودتر دچار تخریب می‌شوند.^{۱۹} یک مطالعه فراتحلیل نشان داده است که در کارآزمایی‌های بالینی، اضطراب و افسردگی با کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدان داخلی مرتبط هستند.^{۲۰} کاهش سطح MDA و افزایش TAC و SOD در گروه دریافت‌کننده بادرنجوبیه نشان می‌دهد که این عصاره قادر است تا با تقویت دفاع آنتی‌اکسیدانی در هیپوکمپ تعادل میان اکسیدان-آنتی‌اکسیدان را در هیپوکمپ بهبود بخشد و بدین ترتیب آسیب‌های عصبی احتمالی و پیامدهای رفتاری آن را موش‌های سالخورده کاهش دهد.

عدم تغییر معنادار فعالیت آنزیم GPx بین گروه‌ها می‌تواند بیانگر آن باشد که اثرات آنتی‌اکسیدانی بادرنجوبیه در این مطالعه عمدتاً از طریق افزایش TAC و تقویت برخی آنزیم‌های دفاعی، نظیر SOD، اعمال شده است.

در مطالعه خازن و همکاران عصاره بادرنجوبیه در دوز مشابه توانسته باعث کاهش سطح MDA و افزایش TAC و SOD در موش-های مدل سالخورده ناشی از دی‌گالاکتوز/کلرید آلومینیوم گردد.^{۲۱} در مطالعه مارتینز و همکاران، تجویز عصاره آبی بادرنجوبیه با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای کیلوگرم وزن بدن توانست پراکسیداسیون چربی را کاهش داده و منجر به بهبود فعالیت SOD شد.^{۲۲} همچنین، یافته‌های آزمایشگاهی حاکی از تأثیر عصاره بادرنجوبیه بر کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از آمیلوئید و همچنین کاهش بروز آپوپتوزیس در سلول‌های عصبی مخچه می‌باشد.^{۲۳} در مطالعه دیگری بر روی مدل اسکوبولامین در ماهی زبرا، تجویز بادرنجوبیه ضمن تعدیل سیستم آنتی‌اکسیدانی باعث بهبود وضعیت ضد اضطرابی گردید.^{۲۴} به‌طور کلی، این یافته‌ها بیانگر خاصیت حفاظت عصبی (Neuroprotective) بادرنجوبیه است که می‌تواند به‌عنوان یک درمان کمکی در شرایطی مانند سالمندی به کار رود.

با وجود یافته‌های قابل توجه مطالعه حاضر، برخی محدودیت‌ها نیز باید مدنظر قرار گیرند. نخست، این پژوهش تنها بر یک دوز مشخص از عصاره هیدروالکلی بادرنجوبیه و یک بازه زمانی نسبتاً کوتاه مداخله تمرکز داشت؛ بنابراین بررسی اثرات دوزهای مختلف و مداخلات طولانی‌مدت می‌تواند درک دقیق‌تری از الگوی پاسخ-دوز و پایداری اثرات این گیاه فراهم آورد. دوم، اگرچه شاخص‌های

دسترس پذیری داده‌ها

داده‌ها در صورت درخواست معقول از نویسنده مسئول قابل دسترسی است.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافی ندارند.

ملاحظات اخلاقی

مقاله فوق حاصل طرح مصوب کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تبریز با کد IR.TBZMED.AEC.1400.005 می‌باشد.

References

- Pedersen WA, Wan R, Mattson MP. Impact of aging on stress-responsive neuroendocrine systems. Mechanisms of ageing and development. 2001;122(9):963-83. doi: 10.1016/s0047-6374(01)00250-0
- Vida C, M Gonzalez E, De la Fuente M. Increase of oxidation and inflammation in nervous and immune systems with aging and anxiety. Current Pharmaceutical Design. 2014;20(29):4656-78. doi: 10.2174/1381612820666140130201734
- Anik MI, Mahmud N, Masud AA, Khan MI, Islam MN, Uddin S, Hossain MK. Role of reactive oxygen species in aging and age-related diseases: a review. ACS applied bio materials. 2022;5(9):4028-54. doi: 10.1021/acsabm.2c00411
- Marosi K, Bori Z, Hart N, Sárga L, Koltai E, Radák Z, Nyakas C. Long-term exercise treatment reduces oxidative stress in the hippocampus of aging rats. Neuroscience. 2012;226:21-8. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.09.001
- Siqueira IR, Fochesatto C, da Silva Torres IL, Dalmaz C, Netto CA. Aging affects oxidative state in hippocampus, hypothalamus and adrenal glands of Wistar rats. Life sciences. 2005;78(3):271-8. doi: 10.1016/j.lfs.2005.04.044
- Aquino GA, Sousa CN, Medeiros IS, Almeida JC, Cysne Filho FM, Santos Júnior MA, et al. Behavioral alterations, brain oxidative stress, and elevated levels of corticosterone associated with a pressure injury model in male mice. Journal of basic and clinical physiology and pharmacology. 2022;33(6):789-801. doi: 10.1515/jbcpp-2021-0056
- López V, Martín S, Gómez-Serranillos MP, Carretero ME, Jäger AK, Calvo MI. Neuroprotective and neurological properties of *Melissa officinalis*. Neurochemical research. 2009;34(11):1955-61. doi: 10.1007/s11064-009-9981-0
- Ghazizadeh J, Sadigh-Eteghad S, Marx W, Fakhari A, Hamedeyazdan S, Torbati M, et al. The effects of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) on depression and anxiety in clinical trials: A systematic review and meta-analysis. Phytotherapy research. 2021;35(12):6690-705. doi: 10.1002/ptr.7252
- Ghazizadeh J, Hamedeyazdan S, Torbati M, Farajdokht F, Fakhari A, Mahmoudi J, et al. hydro-alcoholic extract inhibits anxiety and depression through prevention of central oxidative stress and apoptosis. Experimental physiology. 2020;105(4):707-20. doi: 10.1113/EP088254
- Ibarra A, Feuillere N, Roller M, Lesburgere E, Beracochea D. Effects of chronic administration of *Melissa officinalis* L. extract on anxiety-like reactivity and on circadian and exploratory activities in mice. Phytomedicine. 2010;17(6):397-403. doi: 10.1016/j.phymed.2010.01.012
- Gorina YV, Komleva YK, Lopatina OL, Volkova VV, Chernykh AI, Shabalova AA, Semenchukov AA, Olovyannikova RY, Salmina AB. The battery of tests for experimental behavioral phenotyping of aging animals. Advances in Gerontology. 2017;7(2):137-42. doi: 10.1134/S2079057017020060
- Chen GH, Wang C, Yangcheng HY, Liu RY, Zhou JN. Age-related changes in anxiety are task-specific in the senescence-accelerated prone mouse 8. Physiology & behavior. 2007;91(5):644-51. doi: 10.1016/j.physbeh.2007.03.023
- Hatami K, Hassanpourezatti M, Khalili M. *Melissa officinalis* extract improved high-fat-diet-induced anxiety-like behaviors, depression, and memory impairment by regulation of serum BDNF levels in rats. Avicenna Journal of Phytomedicine. 2024;14(5):617. doi: 10.22038/AJP.2024.24343
- Fekri K, Mahmoudi J, Sadigh-Eteghad S, Farajdokht F, Nayebi AM. Coumestrol alleviates oxidative stress, apoptosis and cognitive impairments through hippocampal estrogen receptor-beta in male mouse model of chronic restraint stress. Pharm Sci. 2021;28(2):260-74. doi: 10.34172/PS.2021.44

15. Lee JE, Kwon HJ, Choi J, Seo JS, Han PL. Aging increases vulnerability to stress-induced depression via upregulation of NADPH oxidase in mice. *Communications biology*. 2020;3(1):292. doi: 10.1038/s42003-020-1010-5
16. Yoo DY, Choi JH, Kim W, Yoo KY, Lee CH, Yoon YS, et al. Effects of *Melissa officinalis* L. (lemon balm) extract on neurogenesis associated with serum corticosterone and GABA in the mouse dentate gyrus. *Neurochemical research*. 2011;36(2):250-7. doi: 10.1007/s11064-010-0312-2
17. Spiers JG, Chen HJ, Sernia C, Lavidis NA. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis induces cellular oxidative stress. *Frontiers in neuroscience*. 2015;8:456. doi: 10.3389/fnins.2014.00456
18. Teague CR, Dhabhar FS, Barton RH, Beckwith-Hall B, Powell J, Cobain M, et al. Metabonomic studies on the physiological effects of acute and chronic psychological stress in Sprague–Dawley rats. *Journal of proteome research*. 2007;6(6):2080-93. doi: 10.1021/pr060412s
19. Salim S. Oxidative stress and the central nervous system. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2017;360(1):201-5. doi: 10.1124/jpet.116.237503
20. Liu T, Zhong S, Liao X, Chen J, He T, Lai S, et al. A meta-analysis of oxidative stress markers in depression. *PloS one*. 2015;10(10):e0138904. doi: 10.1371/journal.pone.0138904
21. Khazen G, Farajdokht F, Sadigh-Eteghad S, Rajabi-Jourshari M, Sheikhalizadeh Z, Mohammadi AB, et al. *Melissa officinalis* Alleviates Cognitive Impairments in a Mouse Model of Accelerated Aging; Possible Involvement of the Hippocampal Sirt-1/Nrf2/NF-κB Signaling Pathway. *Pharmaceutical Sciences*. 2026;32(1):110-20. doi: 10.34172/PS.026.42565
22. Martins EN, Pessano NT, Leal L, Roos DH, Folmer V, Puntel GO, et al. Protective effect of *Melissa officinalis* aqueous extract against Mn-induced oxidative stress in chronically exposed mice. *Brain research bulletin*. 2012;87(1):74-9. doi: 10.1016/j.brainresbull.2011.10.003
23. Soodi M, Dashti A, Hajimehdipoor H, Akbari S, Ataei N. *Melissa officinalis* acidic fraction protects cultured cerebellar granule neurons against beta amyloid-induced apoptosis and oxidative stress. *Cell Journal (Yakhteh)*. 2016;18(4):556. doi: 10.22074/cellj.2016.4722
24. Brinza I, Boianu RS, Bagci E, Todirascu-Ciornea E, Hritcu L, Dumitru G. *Melissa officinalis* essential oil modulates oxidative balance, cholinergic activity, and cognitive performance in a scopolamine-induced zebrafish model: implications for neuroprotective strategies in cognitive disorders. *Scientific Reports*. 2025;15(1):38171. Doi: 10.1038/s41598-025-22125-9