

تأثیر ورزش اجباری تردمیل دوران نوجوانی بر علائم اضطراب و استرس اکسیداتیو روده رت‌های نر بالغ دچار استرس جدایی از مادر

علی خورجهانی^۱، *مقصود پیری^۲، محمدعلی آذربایجانی^۲

چکیده

مقدمه: اضطراب از شایع‌ترین اختلالات روانی شناخته شده است و ۳۰٪ اختلالات روانی شناخته شده در جوامع نیز ناشی از استرس‌های روزهای اولیه پس از تولد است. هدف از این مطالعه بررسی اثر ورزش اجباری بر علائم اضطراب و استرس اکسیداتیو روده رت‌های نر بالغ دچار استرس جدایی از مادر بود.

روش بررسی: در این پژوهش تجربی-آزمایشگاهی از روش اعمال استرس جدایی از مادر بر روی رت‌های نوزاد استفاده شد به طوری که موش‌های نوزاد از روز دوم الی روز چهاردهم پس از تولد روزانه به مدت ۱۸۰ دقیقه از مادرشان جدا شدند و سپس در روز ۲۸ پس از تولد به صورت تصادفی به ۵ گروه شامل کنترل، جدایی از مادر به تنهایی، ورزش اجباری تردمیل به تنهایی، جدایی از مادر به همراه تردمیل و یا به همراه تجویز داروی فلوکستین تقسیم شده و پس از اتمام برنامه‌های طراحی شده گروه‌ها، در روز ۶۰ پس از تولد آزمون‌های رفتاری و نمونه‌برداری‌های بافتی و بیوشیمیایی جهت سنجش بیومارکرهای استرس اکسیداتیو از نمونه‌ها انجام گرفت.

یافته‌ها: فقط تجویز فلوکستین در دوران نوجوانی توانسته بود، رفتارهای شبه اضطرابی و سطح ROS و میزان گلوتاتیون میتوکندریایی روده را به میزان معنی‌داری تغییر دهد؛ و تفاوت مشاهده شده بین سایر گروه‌های تحقیق نیز معنی‌دار نبود.

بحث و نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که استرس جداسازی نوزاد از مادر توانسته بود ضمن بروز رفتارهای شبه اضطرابی، وضعیت اکسایشی روده را نیز به میزان معنی‌داری تغییر دهد. به نظر می‌رسد که تأثیر ورزش بر اضطراب متأثر از شدت و مدت ورزش، زمان استراحت پس از ورزش و میزان اضطراب قبل ورزش نیز باشد.

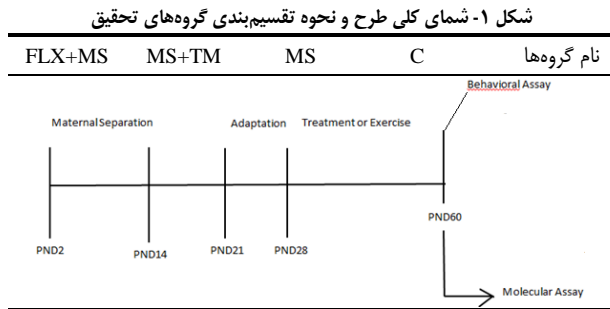
کلمات کلیدی: ورزش، استرس اکسیداتیو، اضطراب جدایی، موش

مقدمه

اضطراب احساس بیم یا تشویش مجموعه‌ای از ویژگی‌های رفتاری و روانی است که پاسخ‌های رفتاری مختلفی شامل لرزش، ناتوانی حافظه و پرخاشگری را به دنبال دارد. اضطراب ناشی از جدایی فرزند از مادر^۱، پدیده عالم‌گیر انسانی است که در دوران کودکی و نوجوانی می‌تواند تکامل رشد مغزی و شکل‌گیری شخصیت و توانایی‌های شناختی را دچار اختلال نماید. سیستم عصبی انسان در دوران نوزادی حساسیت بالایی به استرس‌های محیطی و روانی داشته و مواجه با استرس می‌تواند پیامدهای نامطلوبی در رفتار و عملکرد شخص در بزرگسالی به همراه داشته باشد [۱، ۲]. نوروهای مغزی در زمان تکامل دارای سیستم آنتی‌اکسیدانی ضعیفی بوده و مواجه با هرگونه عوامل استرس‌زا در این دوران با تولید مقادیر بالایی از رادیکال‌های آزاد در سلول‌ها همراه بوده که خود سبب فعال‌سازی فاکتورهای التهابی، تغییر در میانجی‌های عصبی همچون کاهش گابا^۲ به‌عنوان اصلی‌ترین ناقل شیمیایی مهاری مغز و افزایش ناقل‌های دیگر همچون سروتونین، آدرنالین و دوپامین شده و در نهایت منجر به شکل‌گیری بیماری‌های عصبی می‌گردد [۳]. مطالعات دهه اخیر پیشنهاد کرده‌اند، استرس در روزهای اول زندگی می‌تواند روند بیان ژن‌ها را تغییر داده و در نهایت منجر به ایجاد انواع بیماری‌های روانی در آینده گردد. بیش از ۳۰٪ بیماری‌های روانی شناخته‌شده در جامعه ناشی از استرس‌های روزهای نخستین پس از تولد است. نتایج بیشتر مطالعات حیوانی نشان داده‌اند که استرس در دوران نوزادی می‌تواند تغییرات پایداری را در وضعیت اپی‌ژنتیکی سلول‌ها ایجاد کرده و بیان ژن‌ها را دستخوش تغییر نماید و در نهایت بر روی خصوصیات رفتاری و نورونی جانور در بزرگسالی اثر گذارد [۲]. از طرفی به‌واسطه تعامل موجود بین دستگاه گوارش و مغز یکی از بافت‌های تحت تأثیر استرس می‌تواند بافت روده باشد که خود می‌تواند با برخی اختلالات روده‌ای

همچون سندرم روده تحریک‌پذیر^۳ ارتباط داشته باشند [۵]. متأسفانه روش‌های درمانی اضطراب بسیار متفاوت بوده و درجه اثربخشی متغیری هم دارند و از طرفی دو سوم بیماران نیز پاسخی به داروهای رایج توصیه‌شده نشان نداده که خود این موضوع کیفیت زندگی بیماران را نیز تحت تأثیر قرار داده است [۶، ۷]. یکی از رایج‌ترین داروهای مورد استفاده برای درمان اختلالات روانی، همچون اضطراب داروی فلوکستین است که به دلیل اثرات تعدیلی که بر میانجی‌های عصبی دارد مورد تأیید متخصصان و پژوهشگران عرصه علوم پزشکی بوده و در بیشتر تحقیقات انجام شده در این زمینه هم به‌عنوان مداخله دارویی از آن استفاده شده است [۸]. تمرینات ورزشی نیز به واسطه داشتن اثرات سودمند جسمی و روانی، به‌عنوان یک روش درمانی برای افسردگی و اضطراب نیز توصیه شده است [۹، ۱۰]. پژوهش‌های متعددی اثرات مثبت ورزش و فعالیت بدنی سلامت جسم و روان را نشان داده‌اند [۱۱، ۱۲]. در زمینه اختلالات اضطرابی برخی مطالعات گزارش کردند که تمرینات ورزشی به‌عنوان یک درمان الحاقی برای اختلالات اضطرابی مؤثر بوده و فعالیت ورزشی متوسط تا شدید، افزایش فشارخون ناشی از استرس را نیز کاهش می‌دهد [۱۱]. در برخی منابع مطالعه شده اثرات مثبت ورزش بر روی عملکرد سیستم عصبی به تغییرات ناشی از فاکتورهای رشد نورونی، تقویت سیستم ایمنی و آنتی‌اکسیدانی و همچنین تعدیل میانجی‌های عصبی نسبت داده شده است [۱۱، ۱۲]. تا به امروز مطالعات اندکی در خصوص بررسی تأثیر روش‌های تمرینی و ورزشی بر عوارض، نشانه‌های بیوشیمیایی و حتی رفتاری اختلالات اضطرابی ناشی از استرس دوران ابتدایی زندگی انسان انجام شده است. به همین منظور در این مطالعه به بررسی و مقایسه اثرات روش تمرینی ورزش اجباری در کنار مداخلات رایج پزشکی بر علائم اضطراب و استرس اکسیداتیو روده‌رت‌های نر بالغ دچار استرس جدایی از مادر پرداخته شد.

روش بررسی



C: کنترل؛ FLX: تجویز داروی فلوکستین؛

MS: استرس جدایی از مادر؛ TM: تمرین اجباری تردمیل

بین ۲۵ تا ۶۴ دقیقه و با سرعت بین ۱۵ تا ۲۲ متر در دقیقه از هفته اول تا هشتم، ۵ جلسه در هفته اجرا شد. شدت تمرین معادل ۵۷ تا ۷۵٪ اکسیژن مصرفی برآورد شد. برای گرم کردن در ابتدای هر جلسه تمرینی، آزمودنی‌ها به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۷ متر در دقیقه دویدند. برای سرد کردن در انتهای هر جلسه تمرینی نیز سرعت نوار گردان به‌طور معکوس تا رسیدن به سرعت اولیه کاهش یافت [۹].

برای سنجش اضطراب از مدل رفتاری ماز صلیبی مرتفع^۲ استفاده شد که بر اساس حس جستجوگرانه جوندگان و احتراز از محیط‌های باز و روشن طراحی گردیده است. در این روش حیوان در شرایط نرمال، تمایل بیشتر به گذراندن در این بازوهای باز را دارد. این ابزار از جنس چوب و دارای چهار بازو به شکل علامت صلیب (+) است. ابعاد راهرو باز و بسته ۱۰×۵۰ بوده و دو طرف و انتهای راهرو بسته دیواره‌ای به بلندی ۴۰ سانتی‌متر داشته و برای جلوگیری از افتادن موش‌های صحرائی در دو طرف و انتهای بازوی باز لبه‌های به ارتفاع یک سانتی‌متر از جنس شیشه نصب گردید. چهار راهرو به یک محدوده مرکزی به ابعاد ۱۰×۱۰ سانتی‌متر منتهی می‌شوند. ماز صلیبی شکل مرتفع توسط پایه‌هایی در ارتفاع ۵۰ سانتی‌متری از سطح زمین قرار می‌گیرد. موش‌ها درون محدوده مرکزی بازو قرار می‌گیرند، به‌طوری‌که رو به یک بازوی باز قرار می‌گرفتند. نور مناسب توسط یک لامپ ۱۰۰ واتی که در ارتفاع ۱۲۰ سانتی‌متری از مرکز ماز قرار داشت، تأمین می‌شد. در مدت

در پژوهش تجربی-آزمایشگاهی حاضر، ۱۰ موش ماده باردار نژاد ویستار از انستیتو پاستور خریداری گردید و به‌طور جداگانه در قفس نگهداری شدند (مرکز نگهداری از حیوانات گروه فیزیولوژی ورزش، واحد تهران مرکز). پس از وضع حمل، ۶۰ بچه موش نر محدوده وزنی ۲۸۰-۳۰۰ گرم به عنوان آزمودنی‌های تحقیق انتخاب شدند و از روز ۲ تا ۱۴ به مدت ۱۸۰ دقیقه از مادرشان به‌صورت جدا نگهداری می‌شدند. سپس برای تعیین گروه‌های تجربی و کنترل، در روز ۲۱ این موش‌ها به‌صورت تصادفی به ۵ گروه قسمت شدند. در طول تحقیق، حیوانات به‌صورت گروه‌های ۴ سر موش در قفس‌های پلی‌اتیلنی ۱۵×۱۵×۳۰ سانتیمتری ساخت شرکت رازی راد، دمای $2^{\circ}\text{C} \pm$ و رطوبت $5 \pm 5\%$ در شرایط کنترل‌شده نور (۱۲ ساعت تاریکی: ۱۲ ساعت روشنایی) نگهداری شدند و آزادانه به آب و غذای استاندارد (۱۰ گرم به ازای ۱۰۰ گرم وزن بدن) ساخت شرکت بهپور به شکل پلت دسترسی داشتند. پروتکل تجربی بر اساس رهنمودهایی برای تیمار و استفاده از آزمایشگاه حیوانات^۱ انجام شد. شمای کلی طرح پژوهش و تقسیم‌بندی گروه‌ها در شکل ۱ گزارش شده است.

داروی فلوکستین هیدروکلراید از شرکت سیگما خریداری‌شده بود و آماده‌سازی دارو (حل کردن در سالین) درست قبل از آزمایش صورت گرفته بود. دارو با دوز ۵mg/kg از روز ۲۸ الی ۶۰ به صورت تزریق داخل صفاقی استفاده شد. پروتکل تمرینی تردمیل به این صورت بود که در روز ۲۱، گروه تمرینی به مدت ۱ هفته با دستگاه تردمیل آشنا گردید. برنامه آشنایی شامل ۵ جلسه راه رفتن و دویدن با سرعت ۵ تا ۸ متر در دقیقه و شیب صفر درجه و به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه بود. برنامه اصلی تمرینی برای گروه تمرینی شامل ۴ هفته دویدن روی نوار گردان بدون شیب ویژه جوندگان (ساخت پژوهشگاه تربیت‌بدنی) بود که با رعایت اصل اضافه‌بار به‌صورت پیش‌رونده

2. EPM (Elevated Plus – Maze)

1. NIH publication, No. 86-23, revised 1996

انتقال داده و با سرعت 8000 g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده و محلول رویی را دور ریخته و رسوب ته لوله را که حاوی میتوکندری است را برحسب آزمون مورد آزمایش در بافر تریس یا تنفسی سرد پراکنده می کنیم [۱۵]. برای اطمینان از اینکه سوسپانسیون به دست آمده میتوکندری خالصی هستند با انجام آزمون MTT تأییدیه کار مطابق کارهای قبلی گرفته شد [۱۴]. برای اندازه گیری ^3ROS میتوکندریایی از معرف $^4\text{DCFH-DA}$ استفاده شد. این معرف غیریونی، غیرقطبی بوده و به راحتی از غشای میتوکندری عبور می کند و در داخل میتوکندری به وسیله استراز به DCFH غیر فلورسانس هیدرولیز می شود که به سرعت به وسیله ROS به یک محصول دارای فلورسانس به نام $2',7'\text{-dichlorofluorescein}$ اکسید می شود. برای اندازه گیری ROS ، میتوکندری ها در 30°C درجه سانتی گراد در بافر تنفسی (ساکاروز $0/32 \text{ mM}$ ، تریس 10 mM ، سوکسینات 5 mM ، پتاسیم دی هیدروژن فسفات 1 mM ، منیزیم کلراید $0/5 \text{ mM}$ ، EGTA $50 \mu\text{M}$ و 20 mM Mops) پراکنده کردیم؛ و پس از اضافه کردن معرف DCFH-DA به هر نمونه به مدت ۱۰-۵ دقیقه انکوباسیون در دمای 30°C درجه انجام گرفت. سپس در فواصل زمانی ۱۵ و ۶۰ دقیقه، جذب در طول موج $\lambda_{\text{ex}}=485 \text{ nm}$ و $\lambda_{\text{em}}=520 \text{ nm}$ برای هر نمونه، با استفاده از دستگاه فلوسیتومتر خوانده شد [۱۵].

برای اندازه گیری گلوکاتینون احیا در نمونه ها، بعد از استخراج میتوکندری، 1 I 500 از میتوکندری هر کدام از گروه ها را برداشته و به آن 1 I 750 میکرولیتر تری کلرواستیک اسید 10% اضافه نموده و تحت سانتریفیوژ 12000 rpm در دمای 4°C درجه به مدت ۱۵ دقیقه قرار می دهیم. سپس 250 میکرولیتر از سوپرناتانت را برداشته و 625 میکرولیتر بافر تریس کلراید و 125 میکرولیتر محلول DTNB به میکرو تیوب اضافه نموده و سپس میزان جذب را در طول موج 412 nm می خوانیم. غلظت

پنج دقیقه ای که حیوان آزادانه در قسمت های مختلف ماز حرکت می کرد، پارامترهای زیر به روش مشاهده اندازه گیری می شد: (۱) تعداد دفعاتی که حیوان وارد راهرو باز می شود؛ (۲) مدت زمانی که حیوان در راهرو باز باقی می ماند؛ (۳) مدت زمانی که حیوان در راهرو بسته باقی می ماند. لازم به ذکر است که ورود به راهرو باز هنگامی است که هر چهار پای حیوان در راهرو مورد نظر قرار می گرفت. زمان گذرانده شده در هر راهرو نیز بر همین اساس محاسبه شده بود.

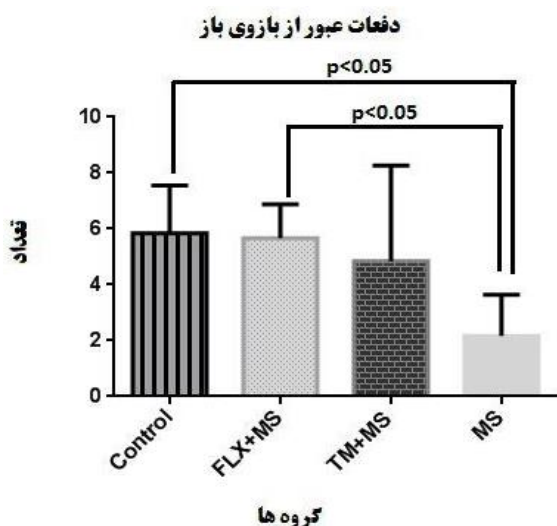
برای جداسازی میتوکندری از روده، 48 ساعت بعد از آخرین جلسه ورزش نمونه گیری انجام شد. حیوانات 24 ساعت قبل از انجام آزمایش ها ناشتا نگه داشته شدند. سپس موش صحرایی را با تزریق کتامین 75 mg/kg و زایلوزین 15 mg/kg بیهوش کرده و بعد از باز کردن حفره شکمی بافت روده حیوان تحت شرایط استریل سریعاً خارج شده و پس از شستشوی بافت روده با PBS^1 ، به سرعت بافت در محیط کشت DMEM^2 انتقال داده شد. سپس بافت روده به قطعات ریز برش داده شد و به لوله فالکن انتقال داده شد و کلاژناز به مدت ۶-۷ دقیقه به این محیط اضافه گردید و سپس با کاغذ صافی فیلتر گردید و دوباره محیط کشت DMEM اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه بر روی استیلر قرار داده شد که به طور یکنواخت جداسازی سلول های روده انجام گیرد. به دنبال آن سانتریفیوژ در دور 400 g در دمای 21°C درجه صورت گرفت و سوپرناتانت برداشته شد و دوباره در 1000 g در دمای 21°C درجه صورت گرفت و رسوب حاصل دوباره در محیط کشت DMEM به حالت سوسپانسیون درآمد. رسوب حاصله حاوی فیبروبلاست های روده است. در مرحله دوم استخراج میتوکندری از سلول های فیبروبلاست انجام گردید. فیبروبلاست های معلق شده در لوله فالکن را به سانتریفیوژ یخچال دار در دمای 4°C درجه سانتی گراد، با سرعت 2500 g به مدت ۱۰ دقیقه انتقال دادیم. بعد از اتمام زمان سانتریفیوژ، محلول رویی را به آرامی به لوله فالکن دیگر

3. Reactive oxygen species

4. Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA)

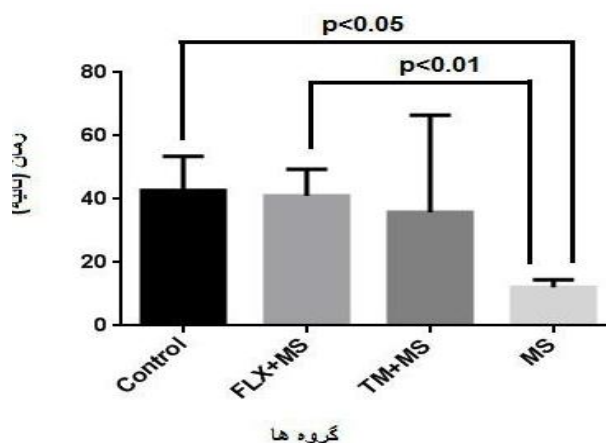
1. phosphate buffered saline

2. Dulbecco's Modified Eagle Medium



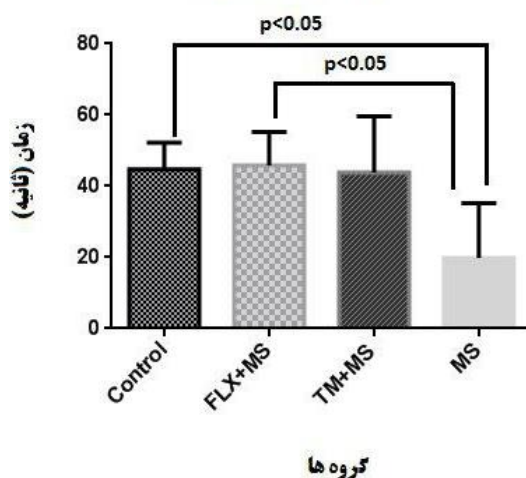
نمودار ۱- دفعات عبور از بازوی باز آزمون EPM، در گروه‌های تحقیق

مدت زمان ایستادن در مرکز



نمودار ۲- مدت زمان توقف در مرکز آزمون EPM، در گروه‌های تحقیق

مدت زمان ماندن در بازوی باز



نمودار ۳- مدت زمان توقف در بازوی باز آزمون EPM، در گروه‌های تحقیق

گلوکاتینون را از روی منحنی استاندارد گلوکاتینون برحسب nmol/ml به دست می‌آوریم [۱۵].

برای بررسی توزیع طبیعی داده‌ها از آزمون کولموگروف اسمیرنوف استفاده شد. سپس برای مقایسه اختلاف میانگین‌ها از آزمون تی مستقل و تحلیل واریانس یک‌طرفه استفاده گردید. تمام عملیات آماری یادشده با استفاده از نرم‌افزار Graph-pad prism انجام گردید و سطح معنی‌داری آزمون‌ها نیز $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بررسی تأثیر تمرین ورزشی اجباری و داروی فلوکستین بر رفتار اضطرابی با استفاده از آزمون ماز صلیبی شکل نشان داد که استرس جدایی از مادر، توانسته بود به میزان معنی‌داری موجب بروز رفتارهای شبه اضطرابی گردد (گروه استرس جدایی از مادر نسبت به گروه کنترل تعداد دفعات رفتن به بازوی باز کمتر و مدت زمان توقف در مرکز کمتر شده بود). در مقایسه رفتارهای اضطرابی گروه‌های تحقیق نسبت به گروه کنترل نیز، فقط در گروه با مداخله داروی فلوکستین تفاوت معنی‌داری مشاهده گردید. (نمودارهای ۱-۳)

نتایج نشان داد که استرس جدایی از مادر توانست به‌طور معنی‌داری میزان تولید ROS را در زمان ۱۵ و ۶۰ دقیقه به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش دهد، همچنین اعمال ورزش اجباری و همچنین داروی استاندارد افسردگی (فلوکستین) توانستند میزان تولید ROS را نسبت به گروه MS به میزان معنی‌داری کاهش دهند که می‌تواند نشان‌دهنده مهار اکسیداتیو استرس در میتوکندریهای ایزوله شده از روده است. (جدول ۱)

به ارتباط موجود بین سیستم عصبی مرکزی و احشایی یا همان محور مغزی احشایی^۱ که در منابع علمی مطالعه شده قبلی هم اشاره شده بود همخوانی دارد [۲، ۱۳]. از مکانیسم‌های محتمل مربوط به این تغییر مشاهده شده که در منابع مطالعه شده اشاره شده می‌توان به نقش سروتونین در اضطراب و حرکات دودی روده اشاره کرد لازم به توضیح اینکه این نوروترانسمیتر از نورون‌های سیستم عصبی مرکزی و سلول‌های انتروکرومافین روده سنتز می‌شود و تغییرات میزان آن بر اثر عوامل مختلف همچون استرس‌های فیزیکی و روانی می‌تواند بر عملکرد مغزی و روده‌ای تأثیرگذار باشد [۱۳، ۱۴].

نتایج این مطالعه نشان داد که هر دو مداخله انجام ورزش اجباری (تردمیل) و داروی فلوکستین توانسته بودند میزان رفتارهای شبه اضطرابی ناشی از استرس جدایی از مادر را در مقایسه با گروه کنترل سالم به‌طور معنی‌داری کاهش دهند. ولی وقتی نتایج آزمون‌های رفتاری گروه‌های تحقیق با گروه کنترل استرس جدایی از مادر مقایسه شد فقط اختلاف مشاهده شده بین گروه فلوکستین با گروه استرس جدایی از مادر معنی‌دار بود. که با نتایج جی ال لیشر (۲۰۰۸) و سامینا سلیم و همکاران (۲۰۱۰) همخوانی داشت [۱۰، ۱۵]. کاهش اضطراب به دنبال ورزش می‌تواند ناشی از یکسری تغییرات فیزیولوژیکی شامل افزایش در نورون‌های تحریکی به‌ویژه ناحیه هیپوکامپ که در جوندگان در پردازش احساسات، تنظیم استرس و اضطراب دخیل هستند، شده باشد [۹]؛ که در برخی منابع نیز اشاره شده بود که ورزش در موش‌های سوری و صحرائی باعث افزایش نورون‌ها در هیپوکامپ و افزایش فعالیت فاکتورهای رشد همانند IGF-1 و فاکتور نوروتروفیک مشتق شده از مغز گردد که خود این فاکتورها در تنظیم فرایندهای اضطرابی نقش دارند [۹، ۱۰].

نتایج تحقیق وانگ (۲۰۱۴) نشان داد، موش‌هایی که به مدت ۵ هفته با تردمیل تمرین داده شده بودند سطح هورمون‌های ACTH و کورتیکواسترون آنها کاهش یافته و متعاقباً میزان رفتارهای شبه اضطرابی نیز در آنها کاهش یافته

جدول ۱- اثر ورزش اجباری و داروها در استرس جدایی فرزند از مادر در دوران کودکی بر میزان ROS در میتوکندری‌های ایزوله شده از روده موش صحرائی

گروه‌ها	تشکیل ROS (%)	
	۱۵ دقیقه	۶۰ دقیقه
C	۴±۲	۱۳±۴
TM	۴±۲	۸±۳
MS+TM	۱۷±۸####	۱۳±۵##
MS	۳۲±۶***	۵۰±۹***
MS+FLX	۶±۴####	۷±۵####

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار حاصل از سه بار تکرار آزمایش گزارش شده است.

C: کنترل؛ FLX: تجویز داروی فلوکستین؛

MS: استرس جدایی از مادر؛ TM: تمرین اجباری تردمیل

***: نشاندهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل است ($p < 0.001$)؛

##: نشاندهنده اختلاف معنادار با گروه MS است ($p < 0.01$)؛

###: نشاندهنده اختلاف معنادار با گروه MS است ($p < 0.05$)

نتایج نشان داد که استرس جدایی فرزند از مادر در دوران کودکی، تأثیر معنی‌داری در کاهش گلوکاتیون احیاء میتوکندری بافت روده نسبت به گروه کنترل داشته است ($p < 0.05$)، درحالی‌که در گروه‌هایی که دارو (فلوکستین) یا ورزش اجباری (تردمیل) دریافت نموده بودند عملاً میزان گلوکاتیون افزایش مختصری داشته ولی تفاوت مشاهده شده در گروه‌ها نسبت به گروه کنترل استرس جدایی از مادر معنی‌دار نبود. (جدول ۲)

جدول ۲- مقایسه میانگین میزان گلوکاتیون احیا (nmol/ml) در میتوکندری‌های

گروه	میانگین گلوکاتیون (GSH)		نتیجه مقایسه با گروه کنترل	نتیجه مقایسه با MS
	روزه	روزه		
C	۶/۵۲±۰/۲	-	-	***
TM	۵/۸۹±۰/۴۳	-	-	***
MS	۴/۰۷±۰/۴۹	***	-	-
MS+TM	۴/۶۴±۰/۳۱	**	-	NS
MS+FLX	۴/۹۳±۰/۲۱	*	-	NS

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار حاصل از سه بار تکرار آزمایش گزارش شده است.

C: کنترل؛ FLX: تجویز داروی فلوکستین؛

MS: استرس جدایی از مادر؛ TM: تمرین اجباری تردمیل

*: نشاندهنده اختلاف معنادار در سطح $p < 0.05$

** : نشاندهنده اختلاف معنادار در سطح $p < 0.01$

***: نشاندهنده اختلاف معنادار در سطح $p < 0.001$

NS: غیر معنادار

بحث و نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که استرس جداسازی نوزاد از مادر توانسته بود ضمن بروز رفتارهای شبه اضطرابی، وضعیت اکسایشی روده را نیز به میزان معنی‌داری تغییر دهد که با توجه

1. The brain-gut axis

بافت روده افزایش داده باشد؛ و یا این احتمال وجود دارد که انجام تمرینات ورزشی استفاده‌شده سبب ایجاد سازگاری در سیستم آنتی‌اکسایشی بدن شده باشد از این رو می‌توان گفت که میزان طبیعی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، پاسخگویی مقابله با رادیکال‌های تولیدشده به دنبال این تمرین بوده‌اند که این امر می‌تواند توجیه مناسبی برای عدم تغییر در فعالیت آنزیم گلوکوتایون باشد. از دیگر دلایل احتمالی می‌توان به متفاوت بودن الگوی پاسخ‌دهی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بافت‌های مختلف بدن اشاره داشت و یا ماهیت اجباری بودن تمرین استفاده‌شده اشاره داشت [۱۷] به همین منظور پیشنهاد می‌گردد تحقیقات مشابهی با استفاده از الگوهای تمرینی طولانی‌تری و یا شکل اختیاری تمرین نیز انجام پذیرد تا ابعاد بیشتری از نوع تأثیر تمرینات ورزشی بر عوارض و اختلالات ایجادشده اضطراب جدایی از مادر روشن گردد.

با توجه به نتایج این تحقیق پیشنهاد می‌شود در تحقیقات آتی به بررسی تأثیر افزایش تعداد جلسات تمرین از ۴ هفته به ۶ هفته و بیشتر و یا استفاده از مدل ورزش اختیاری (دوچرخه دوار) به‌جای تردمیل هم پرداخته شود و یا به اثر تعاملی مصرف دارو و ورزش به‌صورت هم‌زمان نیز پرداخته شود و با سایر داروهای رایج در این زمینه نیز مقایسه شود؛ و همچنین از دیگر روش‌های ارزیابی و تشخیصی پزشکی برای بررسی اثرات مداخلات انجام‌شده همچون رادیوگرافی بافتی از روده، نیز استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از زحمات و حمایت‌های آقای شایان امیری در کمک به راه‌اندازی روش جدایی مادر از فرزند و آزمون‌های رفتاری کمال تشکر و قدردانی را داشته باشیم. این مقاله از رساله دوره دکتری تخصصی رشته بیوشیمی و متابولیسم ورزشی دانشکده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی دانشگاه آزاد اسلامی تهران مرکزی به تاریخ تصویب پروپوزال ۹۴/۴/۱۵ استخراج‌شده است و تمامی مراحل کار زیر نظر اساتید راهنما و

بود [۷، ۶]. به عبارت دیگر تمرین ورزش باعث افزایش کنترل محور هیپوفیز-هیپوتالاموس در پاسخ به عوامل استرس‌زا می‌گردد؛ و تغییرات همراه با ورزش در پاسخ محور هیپوفیز-هیپوتالاموس به استرس می‌تواند در نتیجه تغییر در آزادسازی هورمون کورتیکوسترون و مهار پاسخ این هورمون شده باشد. تغییر در آزادسازی هورمون کورتیکوسترون از غده آدرنال می‌تواند در نتیجه تغییر در حساسیت غده آدرنال به هورمون آدرنوکورتیکوتروپیک از هیپوفیز نیز باشد [۱۵]. نکته قابل‌تأمل درباره نتایج مطالعه اخیر و منابع بررسی شده این بود که نمونه تحقیقی مبنی بر تأثیر منفی ورزش بر رفتارهای شبه اضطرابی مشاهده نگردید. جمع‌بندی حاصل از نتایج منابع مطالعه شده و تحقیق حاضر این بود، که به نظر می‌رسد که تأثیر ورزش بر اضطراب متأثر از شدت و مدت ورزش، زمان استراحت پس از ورزش و میزان اضطراب قبل ورزش نیز باشد. و اختلافات مشاهده‌شده در نتایج این تحقیق با برخی منابع دیگر ممکن است ناشی از یک یا چند عامل از عوامل مذکور باشد [۱۶].

از دیگر یافته‌های این تحقیق کاهش معنی‌دار ROS بافت روده بر اثر انجام تمرین ورزش اجباری بود که با نتایج تحقیقات قبلی همچون تحقیق سامینا سلیم (۲۰۱۰) نیز همسو بود. در تفسیر این نتیجه تحقیق نیز می‌توان به بهبود سیستم آنتی‌اکسیدانی به دنبال انجام تمرینات ورزشی و یا احتمال کاهش تولید رادیکال سوپراکسید، پس از سازگاری با تمرین اشاره کرد [۱۰، ۱۷]. عدم تغییر معنی‌دار میزان گلوکوتایون بافت روده گروه تمرین ورزش اجباری از دیگر نتایج این تحقیق بود که همسو با نتایج تحقیق هوانلو (۱۳۹۰) بود. در بررسی تحقیقات پیشین مشاهده گردید که فعالیت‌های شدید و کوتاه‌مدت فعالیت آنزیم‌های اکسیدانی را افزایش می‌دهند [۱۰]، درحالی‌که در تحقیق حاضر تغییر مشاهده‌شده از نظر آماری معنی‌دار نبود تناقض مشاهده‌شده در این بخش از نتایج تحقیق را می‌توان توسط چندین عامل احتمالی گزارش‌شده در منابع تحقیق توجیه کرد. ممکن است تمرین به کار گرفته‌شده در حدی نبوده باشد که میزان تولید گونه‌های اکسیژن‌فعال را در

References

1. Ren T-H, Wu J, Yew D, Ziea E, Lao L, Leung W-K, et al. Effects of neonatal maternal separation on neurochemical and sensory response to colonic distension in a rat model of irritable bowel syndrome. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology.* 2007; 292(3):G849-G856.
2. O'Mahony SM, Marchesi JR, Scully P, Codling C, Ceolho A-M, Quigley EMM, et al. Early life stress alters behavior, immunity, and microbiota in rats: implications for irritable bowel syndrome and psychiatric illnesses. *Biological psychiatry.* 2009; 65(3):263-267.
3. Amiri S, Amini-Khoei H, Mohammadi-Asl A, Alijanpour S, Haj-Mirzaian A, Rahimi-Balaei M, et al. Involvement of D1 and D2 dopamine receptors in the antidepressant-like effects of selegiline in maternal separation model of mouse. *Physiology & behavior.* 2016; 163:107-114.
4. O'Mahony SM, Hyland NP, Dinan TG, Cryan JF. Maternal separation as a model of brain-gut axis dysfunction. *Psychopharmacology.* 2011; 214(1):71-88.
5. Vicario M, Alonso C, Guilarte M, Serra J, Martínez C, González-Castro AM, et al. Chronic psychosocial stress induces reversible mitochondrial damage and corticotropin-releasing factor receptor type-1 upregulation in the rat intestine and IBS-like gut dysfunction. *Psychoneuroendocrinology.* 2012; 37(1):65-77.
6. Wang D-C, Chen T-J, Lin M-L, Jhong Y-C, Chen S-C. Exercise prevents the increased anxiety-like behavior in lactational di-(2-ethylhexyl) phthalate-exposed female rats in late adolescence by improving the regulation of hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *Hormones and behavior.* 2014; 66(4):674-684.
7. Hare BD, Beierle JA, Toufexis DJ, Hammack SE, Falls WA. Exercise-associated changes in the corticosterone response to acute restraint stress: evidence for increased adrenal sensitivity and reduced corticosterone response duration. *Neuropsychopharmacology.* 2014; 39(5):1262-1269.
8. Pellow S, File SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology, biochemistry, and behavior.* 1986; 24(3):525-529.
9. Sadeghi M, Peeri M, Hosseini M-J. Adolescent voluntary exercise attenuated hippocampal innate immunity responses and depressive-like behaviors following maternal separation stress in male rats. *Physiology & behavior.* 2016; 163:177-183.
10. Salim S, Sarraj N, Taneja M, Saha K, Tejada-Simon MV, Chugh G. Moderate treadmill exercise prevents oxidative stress-induced anxiety-like behavior in rats. *Behavioural brain research.* 2010; 208(2):545-552.
11. Schoenfeld TJ, Rada P, Pieruzzini PR, Hsueh B, Gould E. Physical exercise prevents stress-induced activation of granule neurons and enhances local inhibitory mechanisms in the dentate gyrus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2013; 33(18):7770-7777.
12. Carek PJ, Laibstain SE, Carek SM. Exercise for the treatment of depression and anxiety. *International journal of psychiatry in medicine.* 2011; 41(1):15-28.
13. Kim DY, Camilleri M. Serotonin: a mediator of the brain-gut connection. *The American journal of gastroenterology.* 2000; 95(10):2698-2709.
14. Sholehvar F, Takhshid MA, Rafiei M. Review of metabolism, transport and role of serotonin in the body and the relation between serotonin and diseases. *The Journal of Fasa University of Medical Sciences.* 2013; 3(1):9-17. [Persian]
15. Leasure JL, Jones M. Forced and voluntary exercise differentially affect brain and behavior. *Neuroscience.* 2008; 156(3):456-465.
16. Wipfli BM, Rethorst CD, Landers DM. The anxiolytic effects of exercise: a meta-analysis of randomized trials and dose-response analysis. *Journal of sport & exercise psychology.* 2008; 30(4):392-410.
17. Hovanloo F, Hedayati M, Ebrahimi M, Abednazari H. Effect of various time courses of endurance training on alterations of antioxidant enzymes activity in rat liver tissue. *Research in medicine.* 2011; 35(1):14-19. [Persian]

The effect of mandatory treadmill exercise on anxiety-like behaviors and bowel oxidative stress following the maternal separation stress in male rats

Khoorjahani A¹, *Peeri M², Azarbayjani MA²

Abstract

Background: Anxiety has been identified as the most common mental health disorder and 30% of psychological disorders in societies are due to early-life stress. The aim of this study was to investigate the effect of mandatory exercise on anxiety and bowel oxidative stress in male rats following the maternal separation stress

Materials and methods: In this experimental study, the maternal separation stress on baby rats was applied, so that, babies were separated from their mother during postnatal day (PND) 2 to 14, for 180 minutes a day. At PND 28, rats were randomly divided into five groups including control group, maternal separation stress group, mandatory treadmill exercise, maternal separation with treadmill, and maternal separation with the intake of fluoxetine. At PND 60, after finishing the program, in addition to behavioral tests, biochemical and tissue biopsy, for measuring the oxidative stress biomarkers (ROS level), were applied.

Results: Our investigation revealed that only the intake of fluoxetine during adolescence can significantly make change on the anxiety-like behaviors, ROS level, and the level of mitochondrial glutathione; however, the observed difference among the other groups was not significant.

Conclusion: This study suggested that maternal separation stress was able to appear anxiety-like behaviors. In addition, a significantly change on the bowel oxidative stress was observed. It seems the effect of exercise on stress can be affected by intensity and duration of exercise, the rest time after exercise, and also the stress level before the exercise.

Keywords: Exercise, Oxidative Stress, Separation Anxiety, Rat

1. PhD student, Department of exercise physiology, Islamic Azad University, Central Tehran Branch, Tehran, Iran

2. Professor, Department of exercise physiology, Islamic Azad University, Central Tehran Branch, Tehran, Iran
(*Corresponding Author)
mpeeri@iauctb.ac.ir