

## ***Comparing the Effect of Treadmill Exercise and Fluoxetine on Sex Hormones, Testicular Histopathology, and Fear Extinction in Adult Wistar Rats with Post-Traumatic Stress Disorder***

Fereshteh Talebpour Amiri<sup>1</sup>,

Mehri Mirhoseini<sup>2</sup>,

Pardis Seyedpour<sup>3</sup>,

Sepideh Khalili Savadkouhi<sup>4</sup>,

Sakineh Shafia<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Associate Professor, Department of Anatomy, Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Anatomy, Amol Faculty of Paramedicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>3</sup> MSc Student in Psychology, Rahian Novin Danesh Higher Education Institute, Sari, Iran

<sup>4</sup> MSc in Developmental Biology, Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>5</sup> Assistant Professor, Immunogenetics Research Center, Department of Physiology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received March 14, 2022 ; Accepted July 2, 2022)

### **Abstract**

**Background and purpose:** Post-traumatic stress disorder (PTSD) is a mental and physical complication. Fluoxetine (FLX) as a selective serotonin reuptake inhibitor is considered as the first line of treatment for PTSD. Exercise can improve the symptoms of PTSD. The aim of this study was to determine the effects of exercise and FLX on testicular tissue and sex hormones in rats with PTSD.

**Materials and methods:** In this experimental study, 80 adult male rats were divided into two groups: PTSD and healthy. Then, each group was divided into four subgroups: control, exercise, fluoxetine, and fluoxetine + exercise. PTSD was induced by single prolonged stress. Fourteen days after induction of PTSD, moderate forced treadmill exercise was performed for 4 weeks, 5 days/week. Fluoxetine was administered at 10 mg/kg/day dissolved in drinking water for 4 weeks. Four weeks after treatment, the fear extinction test, testicular structure, and testosterone and FSH levels were evaluated.

**Results:** PTSD decreased testosterone level and fear extinction but increased follicle-stimulating hormone. Fluoxetine and exercise had protective effect on testicular damage and also increased testosterone level and extinction index but decreased FSH level. Findings showed that co-administration of exercise and fluoxetine was more effective on these parameters. Combination of exercise and fluoxetine significantly increased fear extinction in PTSD rats ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** Exercise and fluoxetine had a protective effect on testicular tissue structure and hormonal disorders caused by PTSD and also decreased fear caused by stress, which is one of the symptoms of this disease.

**Keywords:** post-traumatic stress disorder, testis, testosterone, follicle-stimulating hormone, fear extinction

**J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 32 (212): 17-28 (Persian).**

**Corresponding Author:** Sakineh Shafia - Immunogenetics Research Center, Department of Physiology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: srshafia@yahoo.com)

# مقایسه تاثیر ورزش و فلوکستین بر هورمون های جنسی، هیستوپاتولوژی بیضه، خاموشی ترس در رت های مبتلا به عارضه استرسی بعد از تروما

فرشته طالب پور امیری<sup>1</sup>مهری میرحسینی<sup>2</sup>پردیس سیدپور<sup>3</sup>سپیده خلیلی سوادکوهی<sup>4</sup>سکینه شفیعا<sup>5</sup>

## چکیده

**سابقه و هدف:** عارضه استرسی بعد از تروما (PTSD) یک عارضه روانی جسمانی است. فلوکستین (FLX) به عنوان یک مهار کننده های انتخابی باز جذب سروتونین برای درمان مبتلایان به PTSD شناخته شده است. ورزش قادر است علائم ناشی از PTSD را بهبود ببخشد. این مطالعه با هدف تعیین اثرات ورزش و فلوکستین بر بافت بیضه و هورمون های جنسی در رت های مبتلا به PTSD، انجام پذیرفت.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه تجربی، 80 سر رت بالغ نر به دو گروه PTSD و سالم تقسیم شدند. سپس هر گروه به 4 زیر گروه کنترل، ورزش، فلوکستین و فلوکستین + ورزش تقسیم شدند. PTSD از طریق استرس طولانی مدت منفرد القاء شد. 14 روز بعد از القاء PTSD، ورزش اجباری متوسط با استفاده از Treadmill به مدت 4 هفته، هر هفته 5 روز انجام شد. فلوکستین با دوز 10mg/kg/day به مدت 4 هفته به شکل حل شده در آب آشامیدنی تجویز شد. 4 هفته بعد از درمان، تست خاموشی ترس، هیستولو پاتولوژی بیضه و هورمون های جنسی بیضه و هورمون محرکه فولیکولی مورد ارزیابی قرار گرفت. **یافته ها:** عارضه استرسی بعد از تروما (PTSD) منجر به کاهش هورمون جنسی بیضه و افزایش هورمون محرکه فولیکولی و کاهش خاموشی ترس شد. فلوکستین و ورزش توانست بر آسیب بافتی بیضه اثر محافظتی داشته باشد و همچنین باعث افزایش میزان هورمون جنسی بیضه و کاهش هورمون هیپوفیز قدامی و افزایش ایندکس خاموشی شود. اما تجویز توام ورزش و فلوکستین نقش موثرتری بر این پارامترها داشت. ورزش توام با داروی فلوکستین باعث افزایش معنی دار خاموشی ترس در رت های PTSD شد ( $P < 0/05$ ).

**استنتاج:** ورزش و فلوکستین توانستند اثر محافظتی بر ساختار بافتی بیضه و اختلالات هورمونی ناشی از PTSD داشته باشند و همچنین ترس ناشی از استرس را که از علائم این بیماری می باشد، کاهش دهند.

**واژه های کلیدی:** عارضه استرسی بعد از تروما، بیضه، تستوسترون، هورمون تحریک کننده فولیکول، خاموشی ترس

## مقدمه

اختلال استرس پس از سانحه  
روانی و رفتاری ناتوان کننده است که می تواند به دلیل قرار گرفتن در معرض یک رویداد آسیب زا مانند (Post-traumatic stress disorder: PTSD) اختلال

E-mail: srshafia@yahoo.com

**مؤلف مسئول :** سکینه شفیعا - ساری: کیلومتر 17 جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر (ص)، دانشکده پزشکی

1. دانشیار، گروه علوم تشریح، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

2. استادیار، گروه آناتومی، دانشکده پیراپزشکی آمل، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

3. دانشجوی کارشناسی ارشد روانشناسی، موسسه آموزش عالی راهیان نوین دانش، ساری، ایران

4. کارشناس ارشد تکوین، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

5. استادیار، مرکز تحقیقات ایمونژنتیک، گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: 1400/12/23 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1401/2/4 تاریخ تصویب: 1401/4/12

تجاوز جنسی، جنگ، تصادفات رانندگی، کودک آزاری، خشونت خانگی یا سایر موارد تهدیدکننده سلامت انسان ایجاد شده و بر جنبه‌های مختلف روانی و جسمانی زندگی فرد تاثیر بگذارد (1). امروزه شیوع PTSD به علت ویروس کووید-19 بسیار افزایش پیدا کرده است (2). میزان شیوع در گروه‌های پرخطر که حوادث تروماتیک را تجربه می‌کنند، 5-75 درصد گزارش شده است. میزان شیوع در زنان 10-12 درصد و در مردان 5-6 درصد است. به علت این که بزرگسالان جوان بیش تر در معرض موقعیت‌های خطرناک قرار می‌گیرند، شیوع PTSD در آن‌ها بیش تر است. کودکان نیز می‌توانند این ناهنجاری را نشان دهند و نوع ترومایی که منجر به وقوع PTSD در مردان و زنان می‌شود هم متفاوت است. معمولاً ترومای مردان مربوط به جنگ و ترومای زنان مربوط به تجاوز می‌باشد (3). در PTSD فعالیت و عملکرد بسیاری از سیستم‌های فیزیولوژیک مختل می‌شود. مطالعات انسانی و حیوانی نشان می‌دهد که چندین سیستم نوروترانسمیتری مهم از قبیل نور آدرنژیک، اوپیوید داخلی، سروتونرژیک و محور هیپوتالاموس-هیپوفیز (HPA) در طی این بیماری دچار اختلال می‌شوند (4،5). یکی از درمان‌های دارویی لازم برای بیماران PTSD مهارکننده‌های انتخابی باز جذب سروتونین (Selective Serotonin Reuptake Inhibitors: SSRIs) می‌باشد. ترکیبات SSRIs به عنوان اولین خط درمانی برای مبتلایان به PTSD شناخته می‌شوند (6). محققین در مطالعات خود تاثیر مثبت SSRIs از قبیل fluoxetine، citalopram و fluvoxamine را بر روی بیماران PTSD نشان داده‌اند که منجر به بهبود مشخصی در کیفیت زندگی آنان می‌شوند (7). فلوکستین (Fluoxetine, FLX) یکی از انواع مهارکننده‌های انتخابی باز جذب سروتونین است که برای مبتلایان به PTSD پیشنهاد می‌شود. همچنین آزمایشات نشان داده‌اند که SSRIs قادر هستند ارتباطات سیناپسی در آمیگدال و هیپوکمپ موش‌ها را از طریق فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز

(Brain-derived neurotrophic factor: BDNF) افزایش داده و همچنین باعث پاک شدن حافظه ترس شوند (8). در مطالعات زیادی اثر FLX با دوزهای مختلف، در طول مدت زمان متفاوت و در دوره سنی گوناگون بر روی بافت بیضه ارزیابی شده است و در اکثر مطالعات دیده شده این دارو بر روی حجم لوله‌های اسپرم ساز و تعداد سلول‌های ژرمینال و سرتولی و همچنین بر روی رفتارهای جنسی تاثیر می‌گذارد (9،10). اخیراً از فعالیت فیزیکی به عنوان یک عامل درمانی برای اصلاح آسیب‌های عصبی استفاده می‌شود (11).

محققین دریافتند انجام ورزش‌های منظم طولانی مدت بر تغییرات بافتی بیضه و میزان ریسک کانسره‌های احتمالی که به دنبال افزایش سن ایجاد می‌شود را کاهش می‌دهد (12). از طرفی برخی محققین اظهار می‌کنند استرس اکسیداتیو ناشی از ورزش سنگین، ممکن است در فعالیت‌های تناسلی مردان تداخل ایجاد کند (13). جستجو برای راه‌های درمانی جدیدی که قادر باشند علاوه بر اصلاح اختلالات سیستم عصبی، از آسیب به بافت‌های ژنیتال (بیضه) در حین درمان ممانعت نماید، اهمیت بالینی زیادی دارد. براین اساس در این مطالعه جهت یافتن روش درمانی کم هزینه و با حداقل اثرات جانبی، از ورزش به عنوان یک عامل موثر در درمان بیماری‌های نورودژنراتیو به تنهایی و به صورت توأم با داروی ضد افسردگی فلوکستین از گروه SSRIs استفاده شد.

با توجه به موارد فوق سوال اساسی این است که آیا ورزش تردمیل با شدت متوسط قادر است علاوه بر بهبود علائم روانی ناشی از PTSD، از عوارض ایجاد شده بر بافت ژنیتال توسط داروی فلوکستین ممانعت به عمل آورد یا خیر؟ از این رو این مطالعه با هدف تعیین اثرات ورزش تردمیل و داروی فلوکستین بر روی ساختار بافتی بیضه، میزان هورمون‌های تستوسترون و FSH و خاموشی ترس در رت‌های مبتلا به PTSD، انجام گرفت.

## مواد و روش‌ها

## حیوانات

در این مطالعه تجربی با کد اخلاق IR.MAZUMS.REC.1393.1117، 80 سررت نر بالغ آزمایشگاهی نژاد ویستار با میانگین وزنی 200-250 گرم از مرکز تحقیقات حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری تهیه شد. رت‌ها به صورت تصادفی به 2 گروه سالم و مبتلا به عارضه استرسی بعد از تروما (PTSD) تقسیم و سپس هر گروه به 4 زیر گروه دسته بندی گردید. این 4 گروه شامل، گروه Fluoxetine (FLX)، رت‌هایی که فقط تحت درمان با داروی فلوکستین قرار گرفتند، گروه (EXC) Exercise، رت‌هایی که فقط تحت ورزش اجباری قرار گرفتند، گروه FLX+EXC، رت‌هایی که تحت درمان با داروی فلوکستین به همراهم ورزش اجباری قرار گرفتند و گروه (CON) Control، رت‌هایی که تحت هیچ مداخله‌ای قرار نگرفتند، می‌باشد.

رت‌ها در درجه حرارت محیط حدود  $24 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد با دوره نوری طبیعی (12 ساعت روشنایی و 12 ساعت تاریکی) در حیوان‌خانه دانشگاه علوم پزشکی مازندران نگهداری شدند. در طول دوره آزمایش نیز آب و غذای کافی در اختیار رت‌ها قرار گرفت. تمام آزمایشات بر روی حیوانات مطابق با دستورالعمل‌های کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شد.

القا مدل PTSD از طریق SPS<sup>1</sup>

القا مدل PTSD از طریق SPS در سه مرحله انجام شد. به‌طور خلاصه محدود نمودن حیوان به مدت 2 ساعت در یک restrainer، شنای قدرتی به مدت 20 دقیقه و سپس بیهوشی با اتر بود. سپس در شرایطی بدون آشفته‌گی و شلوغی به مدت 14 روز در قفس‌هایشان ماندند (4).

## آموزش ورزش اجباری متوسط با استفاده از Treadmill

از دستگاه Treadmill برقی ساخت شرکت برج صنعت استفاده شد. 14 روز پس از SPS، جهت مطالعه اثرات ورزش اجباری، ابتدا رت‌های بالغ نر به سیستم ورزشی عادت کردند تا حداقل استرس در مواجهه با محیط جدید ایجاد شود و حیواناتی که مقاومت کردند و ورزش انجام نمی‌دادند از پروسه آزمایش حذف شدند تا گروه‌های حیوانات مورد آزمایش یکسان باشند. سازش دادن حیوانات به این ترتیب انجام شد که به مدت 3 روز، هر روز 15 دقیقه با حداقل سرعت (0/3-0/5 متر بر دقیقه) حیوانات روی دستگاه قرار گرفته و ورزش کردند (13). سپس رت‌ها به دو گروه، گروه کنترل و گروه ورزش اجباری تقسیم شدند. حیوانات گروه کنترل به اتاق آزمایش منتقل شدند، دست‌ورزی (handled) شده و به مدت 5 دقیقه روی تردمیل خاموش باقی ماندند. در گروه ورزش اجباری، به مدت 4 هفته، هر هفته 5 روز ورزش انجام دادند. سرعت و مدت زمان دویدن در هفته اول، 30 دقیقه در روز با سرعت 15 متر در ثانیه (5 دقیقه استراحت بعد از 15 دقیقه دویدن)، هفته دوم تا چهارم، 60 دقیقه در روز با سرعت 15 متر در ثانیه (15 دقیقه استراحت بعد از 30 دقیقه ورزش)، بوده است (14).

## مداخله دارویی

14 روز پس از SPS، به گروه‌های دریافت‌کننده دارو، فلوکستین با دوز 10 mg/kg/day به مدت 4 هفته تجویز شد. فلوکستین در آب آشامیدنی حل شد و حیوانات گروه کنترل آب آشامیدنی بدون دارو دریافت کردند (15).

## بررسی خاموشی ترس

برای این تست از دستگاه احترازی دو قسمتی، دستگاه شاتل باکس استفاده شد. این دستگاه از 2 اتاقک مجزا با ابعاد 30 در 20 سانتی متر و ارتفاع 20 سانتی متر تشکیل

1. Single prolonged stress

شده است. دو اتاقک مذکور به وسیله یک دریچه گیوتینی از هم جدا می شوند که در هنگام باز بودن، حیوان می تواند از آن عبور کند. دیواره و کف یکی از اتاقک ها سفید (اتاقک روشن) و دیگری سیاه (اتاقک تیره) است. کف هر دو اتاقک دارای میله های فلزی موازی است که از طریق آن، کف قسمت تاریک شوک الکتریکی (با فرکانس، شدت و مدت مشخص) به پای حیوان وارد می کرد.

#### مراحل آزمایش

مرحله شرطی شدن (Conditioning): حیوان در داخل اتاقک روشن قرار می گیرد و هنگامی که به طور غریزی وارد اتاقک تاریک می شود، دریچه گیوتینی بسته خواهد شد و پس از 20 ثانیه شوک الکتریکی با فرکانس 50 هرتز و شدت 1 میلی آمپر به مدت 3 ثانیه به کف پای حیوان اعمال می گردد. لذا به طور شرطی یاد خواهد گرفت که وارد اتاقک تاریک نشود. هر حیوان به مدت 60 ثانیه در قسمت تاریک باقی مانده، سپس از اتاق تاریک برداشته شده و به قفس منتقل شدند.

تست خاموشی (Extinction): 24 ساعت بعد، رت ها به داخل دستگاه منتقل شده و زمان ورود به داخل قسمت تاریک اندازه گیری شد. اگر پس از مدت 180 ثانیه به اتاقک تاریک وارد نشدند، به آرامی با کمک دست به داخل قسمت تاریک رانده می شدند. در این مرحله شوکی به حیوان وارد نمی شد و به آن ها اجازه داده می شد که به مدت 180 ثانیه در قسمت تاریک باقی بمانند. این فرایند برای 4 روز ادامه داشت و در نهایت درصد خاموشی ترس محاسبه گردید (16).

#### ارزیابی هیستولوژیکی

پس از آخرین تجویز دارو و انجام فعالیت ورزشی، و پس از تست خاموشی ترس، حیوانات با کتامین و زایلازین بیهوش شدند. سپس بیضه رت ها در فرمالین 10 درصد فیکس گردید. از نمونه ها پس از پردازش بافتی، بلوک های پارافینی تهیه شد و برش های 5 میکرونی با

هماتوکسیلین و اتوزین رنگ آمیزی شدند. در ارزیابی هیستومورفومتريک، قطر و ضخامت اپیتلیوم لوله های سمی نیفر توسط میکروسکوپ مجهز به دوربین (EUROMEX) اندازه گیری شد. همچنین ساختار بافتی بیضه براساس وضعیت سلول های رده اسپرما توژنز در اپیتلیوم لوله سمینفر در سیستم نمره دهی جانسون با نمره یک تا ده توسط هیستولوژیست که بی اطلاع به گروه های مورد مطالعه بود، مورد ارزیابی قرار گرفت.

#### سنجش میزان FSH و تستوسترون

بعد از تجویز دارو و انجام ورزش، میزان FSH و تستوسترون در سرم خون به وسیله کیت های تجاری طبق پروتکل شرکت سازنده Mouse/Rat Testosterone ELISA و FSH (Rodent) ELISA Kit از شرکت Abnova و با روش اسپکتروفتومتری سنجش شد. میزان هورمون تستوسترون با واحد nmol/L و میزان هورمون FSH با واحد ng/ml بیان شدند. تمام نمونه ها دو بار تکرار شد.

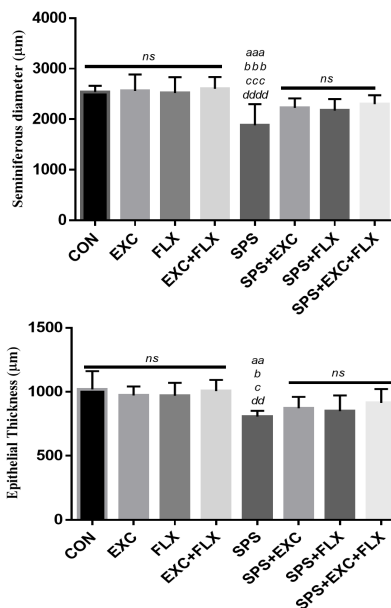
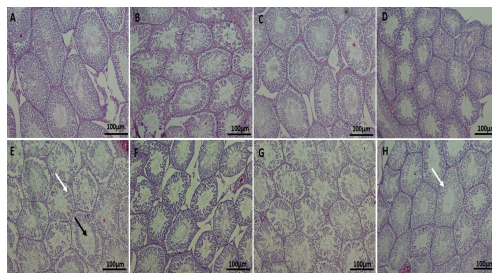
#### ارزیابی آماری

جهت تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار SPSS 22 استفاده شد. توصیف اطلاعات به وسیله شاخص های میانگین و انحراف معیار و نمودارهای مناسب انجام شد. آزمون های مناسب پارامتریک، از جمله آنالیز واریانس دو طرفه و آزمون داده های تکراری بررسی شدند. همچنین داده های گروه ها با آزمون های تعقیبی (Post Hoc) مناسب تحت بررسی قرار گرفتند و سطح معنی داری در کلیه آزمایش ها،  $P < 0/05$  در نظر گرفته شد.

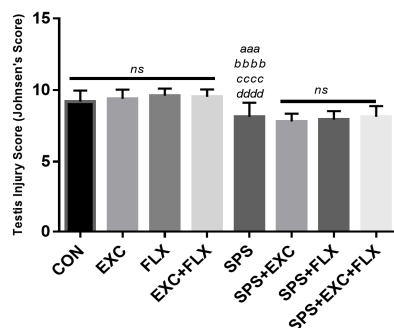
#### یافته ها

ترس شرطی شده و خاموشی ترس Fear conditioning & extinction

نمودار شماره 1، تاثیر فلوکستین و ورزش را در رت های مبتلا به PTSD و گروه سالم نشان می دهد. آنالیز واریانس داده های مربوط به درصد extinction، اثر معنی دار درمان (ورزش و فلوکستین) ( $P = 0/001$ ،



**تصویر شماره 1:** هیستوگرامی از آنالیز نیمه کمی قطر و ضخامت لایه اپیتلیالی لوله‌های سمی نیفر در تمام گروه‌ها. کاهش در ضخامت لایه اپیتلیالی و قطر لوله‌های سمینفر در گروه SPS در مقایسه با گروه کنترل، EXC و FLX نشان داده شد. a معنی دار بودن در مقایسه با گروه کنترل، b در مقایسه با EXC، c در مقایسه با FLX، d در مقایسه با EXC+FLX را نشان می‌دهد. EXC = ورزش، FLX = فلوکستین.



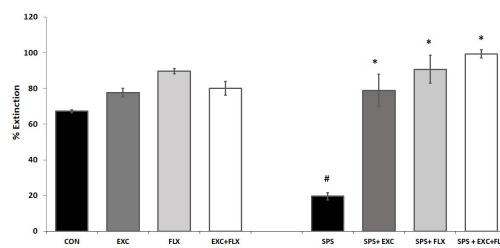
**نمودار شماره 2:** هیستوگرامی از آنالیز نیمه کمی آسیب بیضه با تست جانسون را در تمام گروه‌ها نشان می‌دهد. a معنی دار بودن در مقایسه با گروه کنترل، b در مقایسه با EXC، c در مقایسه با FLX، d در مقایسه با EXC+FLX را نشان می‌دهد. EXC = ورزش، FLX = فلوکستین.

$F_{3,48} = 6/915$  و عدم وجود اثر معنا دار برای SPS ( $P = 0/276$ ) و همچنین تعامل معنی دار بین دو متغیر SPS و درمان ( $P = 0/003$ ) را نشان داد. مقایسه بین گروهی نشان داد که کاهش درصد extinction در گروه SPS به‌طور معنی داری کم‌تر از گروه CON ( $P = 0/001$ ) است. همچنین کاهش درصد extinction در گروه‌های EXC+SPS و FLX+SPS و SPS+EXC+FLX به‌طور معنی داری بیش‌تر از گروه SPS بود ( $P = 0/0001$ ).

#### یافته‌های هیستوپاتولوژیکی و مورفومتریک

تصویر شماره 1، یافته‌های هیستوپاتولوژیک تأثیر ورزش و فلوکستین را در موش‌های سالم و مدل PTSD نشان می‌دهد. در ساختار بافتی بیضه، کاهش تراکم اسپرم در لومن لوله‌های سمی نیفر، کاهش ضخامت اپیتلیال و آتروفی لوله‌های سمی نیفر در رت‌های مدل PTSD نشان می‌دهد. ورزش و فلوکستین توانست اثر مثبتی در بهبودی در ساختار بافتی بیضه داشته باشد.

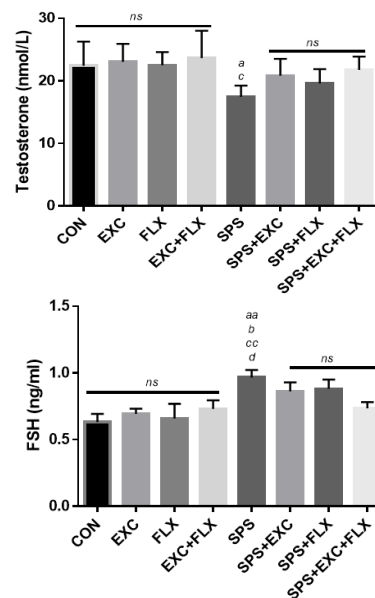
نمودار شماره 2، ارزیابی نیمه کمی ساختار بافتی بیضه را نشان می‌دهد. همان‌گونه که نمودار نشان می‌دهد PTSD منجر به کم شدن نمره جانسون در بافت بیضه شد. ورزش و فلوکستین به‌صورت توأم نقش موثرتری در مقایسه با ورزش و فلوکستین به تنهایی داشتند.



**نمودار شماره 3:** اثر ورزش اجباری با شدت متوسط و داروی فلوکستین بر % Extinction در رت‌های نر مبتلا به PTSD و سالم ( $P = 0/001$ )، # گروه SPS نسبت به گروه CON ( $P = 0/0001$ )، \* گروه‌های SPS+EXC و SPS+FLX و SPS+EXC+FLX نسبت به گروه SPS

## یافته‌های هورمونی

نمودار شماره 4، میزان هورمون‌های تستوسترون و FSH را در گروه‌ها نشان می‌دهد. همان‌گونه که نمودار نشان می‌دهد SPS با القاء PTSD منجر به کم شدن میزان هورمون‌های تستوسترون و افزایش FSH در سرم خون شد. ورزش در مقایسه با فلوکستین توانست به میزان بیش‌تر این اختلالات هورمونی را بهبود ببخشد. همان‌گونه که نمودار نشان می‌دهد انجام ورزش با تردمیل برای مدت 4 هفته توام با تجویز فلوکستین با دوز 10 میلی گرم/کیلوگرم به صورت توام نقش موثرتری در مقایسه با ورزش و فلوکستین به تنهایی داشتند.



نمودار شماره 4: هیستوگرامی از آنالیز کمی هورمون‌های جنسی تستوسترون و FSH. کاهش درمیزان هورمون جنسی تستوسترون و FSH در گروه SPS در مقایسه با گروه کنترل، EXC و FLX نشان داده شد. ورزش و فلوکستین توانست این کاهش را بهبود ببخشد. a معنی‌دار بودن در مقایسه با گروه کنترل، b در مقایسه با EXC، c در مقایسه با FLX، d در مقایسه با EXC+FLX را نشان می‌دهد. EXC = ورزش، FLX = فلوکستین.

## بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که PTSD منجر به کاهش ترشحات هورمون‌های جنسی مردانه و آتروفی و

کاهش ضخامت اپیتلیال لوله‌های سمی نیفر و کاهش میزان اسپرم در لومن لوله سمی نیفر بیضه شد. فلوکستین و ورزش توانست نقش موثری بر آسیب در ساختار بافتی بیضه و اختلالات هورمونی ناشی از PTSD داشته باشد. همچنین فلوکستین و ورزش توانست تاثیر مثبتی بر کنترل ترس در رت‌های مدل PTSD داشته باشد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که PTSD باعث کاهش خاموشی ترس می‌شود. همچنین نشان داد که ورزش، داروی فلوکستین و درمان توأم ورزش و دارو با هم، باعث کاهش آسیب وارد شده به خاموشی ترس در رت‌های مدل PTSD می‌شوند، اما تأثیر ورزش و درمان توأم دارو و ورزش بیش از تأثیر دارو به تنهایی بود و زودتر از اثر فلوکستین نیز ظاهر شده بود. این مطالعه هم راستا با مطالعه Keller است که بیان داشت PTSD علاوه بر این که باعث کاهش خاموشی ترس می‌شود، up regulation رسپتورهای گلوکو کورتیکوئید در هیپوکمپ را نیز موجب می‌گردد (17).

خاموشی شکلی از یادگیری است که به وسیله تکرار یک موقعیت بدون شوک طراحی می‌شود و پزشکان نیز در درمان PTSD از این روش استفاده می‌کنند (Exposure therapy). این نکته قابل توجه است که تعلیم خاموشی سبب حذف یا برگشت حافظه ترس اولیه نمی‌شود، بلکه منجر به تشکیل یک حافظه مهاري جديد می‌گردد (18). اختلال در خاموشی ترس از نشانه‌های

اصلی بیماری‌های اضطرابی مانند PTSD و بیماری ترس است. این خصوصیت به روش‌های درمانی موجود مانند دارو درمانی و شناخت درمانی رفتاری مقاوم است (19). درک امن بودن یک محیط در غیاب هر عامل تهدیدکننده‌ای، از عواملی است که در بیماران PTSD دچار آسیب می‌شود و بدین لحاظ بیماران PTSD از ناتوانی در خاموشی ترس رنج می‌برند. مطالعه حاضر نیز نشان داد که در رت‌های مدل PTSD، اجتناب مهاري و خاموشی ترس نسبت به رت‌های گروه سالم به‌طور قابل توجهی آسیب می‌بیند. هم جهت با مطالعه حاضر،

مکانیسم اثر ورزش و داروهای آنتی‌دپرسانت در بهبود خاموشی ترس بسیار مورد توجه بوده و محققین نشان داده‌اند که ورزش قادر است یادگیری خاموشی ترس و حفظ آن را از طریق فعال کردن مدارهای نورونی مرتبط با یادگیری و حافظه تسهیل نماید (20). ورزش هوازی حاد و مزمن با افزایش سطح BDNF در هیپوکمپ باعث افزایش خاموشی حافظه می‌گردد (21).

اثر داروهای SSRIs مانند فلوکستین نیز بر تسهیل بازخوانی فراموشی اثبات شده است (22). فلوکستین از طریق تأثیر بر میزان BDNF در آمیگدال و هیپوکمپ باعث افزایش ارتباطات سیناپسی و خاموشی ترس می‌گردد (23). در این مطالعه، نتایج به‌دست آمده از استفاده هر دو مداخله ورزشی و دارویی، نشان داد که تأثیر توأم این دو عامل سبب بهبود خاموشی ترس شده است، اما در پاسخ این مسئله که به چه دلیل اثر دارو دیرتر ظاهر شده است؟ شاید بتوان به دوز دارویی استفاده شده در این مطالعه اشاره نمود و این احتمال را داد که اگر دوز دارو بالاتر بود خاموشی ترس زودتر ظاهر می‌گردد و احتمال دوم این که شاید برای مشاهده تأثیر کامل فلوکستین، می‌بایست مدت بیش‌تری مداخله دارویی ادامه پیدا کرد و پس از آن تست Extinction انجام می‌شد (17).

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که القاء PTSD منجر به کاهش هورمون تستوسترون در رت‌ها شد. تستوسترون و متابولیت‌های آن اثراتی از قبیل از بین برنده اضطراب و افزایش‌دهنده شناخت را در جوندگان‌نر دارند (24). دهیدرواپی آندروسترون (DHEA) و ترکیب سولفات آن (DHEA-S) دو هورمون مهم آزاد شده از قشر غده آدرنال می‌باشند که رشد و تکامل بافت عصبی را در هیپوکمپ تحریک کرده و اثرات آنابولیکی و ضد گلوکوکورتیکویدی و ضدتخریب نورونی دارند. محققین گزارش کردند که مقادیر DHEA و DHEA-S با بهبود بیماران مبتلا به PTSD مرتبط با جنگ افزایش می‌یابد (25). قرار گرفتن در معرض استرس و خصوصاً فعالیت محور هیپوتالاموس - هیپوفیز (HPA) القا شده توسط

استرس، ترشح استروژن و تستوسترون را مهار می‌کند (26) مطالعه حاضر هم نشان داد که در رت‌های مدل PTSD میزان تستوسترون کاهش و میزان FSH افزایش داشت. تجویز فلوکستین توانست اثر محافظتی بر اختلالات هورمونی داشته باشد. Bataineh و همکاران در سال 2007 نشان داده‌اند که مصرف طولانی مدت فلوکستین باعث کاهش روند اسپرماتوزن، کاهش تحرک و تراکم اسپرم، کاهش وزن اندام‌های تناسلی (بیضه‌ها، اپیدیدیم، پروستات و کیسه منی) کاهش قابل توجهی در میزان هورمون تستوسترون و FSH می‌شود (27). مطالعه Sharef نیز در سال 2020 آسیب ناشی از فلوکستین بر بافت بیضه را بررسی نمود (10). تفاوت مشاهده بین نتایج مطالعه ما و مطالعه فوق می‌تواند در ارتباط با میزان دوز دارو باشد. آن‌ها از دوز 200 میلی‌گرم/کیلوگرم برای مدت 60 روز استفاده کردند. در حالی که در این مطالعه از دوز 10 میلی‌گرم/کیلوگرم برای مدت 28 روز استفاده شد. در سال 2008 Gouvea و همکاران نشان داده‌اند که FLX با دوز 7/5 میلی‌گرم/کیلوگرم در دوران بارداری و شیردهی بر غلظت تستوسترون پلازما و وزن اندام‌های ژنیتال تأثیری ندارد، اما منجر به کاهش در انگیزه جنسی می‌شود (28). Camara و همکاران نیز در مطالعه خود نشان دادند فلوکستین با دوز 20 میلی‌گرم بر کیلوگرم برای مدت یازده روز منجر به نامرتب شدن آرایش اپیتلیالی و سلول‌های زایا در لوله‌های اسپرم ساز شد (9). Aggarwal و همکاران در سال 2012 اثرات هیستوپاتولوژیک فلوکستین را بر بافت بیضه موش بالغ بررسی کردند. آن‌ها نشان داده‌اند که تجویز فلوکستین به‌صورت داخل صفاقی برای مدت 2، 4 و 12 هفته با سه دوز 10، 20 و 40 میلی‌گرم/کیلوگرم منجر به کاهش در ضخامت اپی تلیوم ژرمینال، قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و کاهش در تعداد سلول‌های ژرمینال در گروه تحت درمان شد (29). به نظر می‌رسد تفاوت در یافته مطالعه حاضر با این مطالعه به دلیل زمان و دوز دریافت دارو باشد.

داده‌های این مطالعه تاثیر مثبت ورزش را بر ساختار بافتی بیضه رت‌های مدل PTSD نشان داد. Chigurupati و همکاران بیان داشتند ورزش منظم مادام‌العمر تغییرات سلولی وابسته به سن را در بیضه محافظت می‌کند. کاهش آسیب استرس اکسیداتیو به پروتئین، چربی و DNA در سلول‌های زایای اسپرم و لیدینگ با انجام ورزش تایید شد. ورزش تاثیر مثبت بر توبول‌های اسپرم ساز، سلول‌ها در مراحل مختلف پروسه اسپرماتوزن دارد (12). همچنین تاثیر ورزش‌های هوازی بر استرس اکسیداتیو و آسیب‌های بافتی بیضه توسط محققین تایید شد (30). از طرفی تاثیر مداخله ورزشی مقاومتی توسط محققین بر سیتوکین‌های التهابی ( $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ ,  $IL-8$  و  $TNF-\alpha$ )، استرس اکسیداتیو (MDA، SOD) و 8-ایزوپروکسان و آنتی اکسیدان‌های تقویت شده (SOD و کاتالاز) مایع منی نشان داده شد. همچنین این تغییرات با بهبود مطلوب بر پارامترهای مایع منی و یکپارچگی ساختار DNA اسپرم بر میزان بارداری در بیماران نابارور موثر است (31). همچنین دیده شده در بیماران دیابتی نوع 2 انجام ورزش اختیاری توانست اسپرم‌زایی و آپوپتوز بیضه را از طریق بهبود استرس اکسیداتیو و مهار مارکرهای آپوپتوزی بهبود ببخشد (32). اما عده‌ای از محققین اظهار داشتند ورزش سنگین می‌تواند به اختلال در دستگاه تناسلی مردان منجر شود و برخی یافته‌های پژوهشی در این زمینه نشان داده است که تمرین ورزشی طولانی میزان تستوسترون را کاهش می‌دهد (33-36).

Can و همکاران در مطالعه خود نشان داده‌اند که تمرین ورزشی بر روی تردمیل جوندگان با سرعت 20 متر در دقیقه و با شیب 20 درجه برای 30 روز متوالی، 90 دقیقه در روز، منجر به کاهش ضخامت اپیتلیوم ژرمینال در لوله‌های اسپرم‌ساز می‌شود. همچنین بیان کردند که لومن

لوله‌های اسپرم‌ساز عاری از اسپرماتید بود (37). ممکن است تفاوت یافته‌های این دو مطالعه در مدت زمان و نوع ورزش با تردمیل (ورزش با شدت متوسط) باشد. برای مشاهده دقیق‌تر تاثیر فلوکستین بر بافت بیضه بهتر است از دوزهای مختلف دارو استفاده کرد تا دقیقاً مشخص گردد چه دوزی از دارو در رت‌های PTSD منجر به آسیب روند اسپرماتوزن می‌گردد که با توجه به زیاد بودن تست‌ها این امر در این مطالعه امکان پذیر نبود. اما توصیه می‌گردد به عنوان یک فاکتور مورد بررسی برای مطالعات بعدی مدنظر قرار گیرد.

داده‌های مطالعه حاضر به وضوح نشان می‌دهد که القاء PTSD منجر به آسیبی در ساختار بافتی بیضه و کاهش هورمون تستوسترون و افزایش FSH شد. ورزش و فلوکستین توانست اثر ترمیمی بر اختلالات ناشی از PTSD داشته باشد. ولی تاثیرات توامان ورزش و فلوکستین موثرتر از تجویز هر یک از آن‌ها به تنهایی بوده است. بنابراین، می‌توان پیشنهاد کرد که ورزش در کنار دارودرمانی می‌تواند اختلالات تولیدمثلی را در بیماران PTSD بهبود ببخشد.

## سپاسگزاری

این مطالعه حاصل طرح تحقیقاتی مصوب به شماره 1117 می‌باشد که از محل معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران (مرکز تحقیقات ایمونوزنتیک) تامین اعتبار گردیده است و دارای کد اخلاق به شماره IR.MAZUMS.REC.1393.1117 می‌باشد. بدین وسیله از همکاری معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران و مرکز تحقیقات ایمونوزنتیک در این مطالعه قدردانی می‌گردد.

## References

1. Akhtar A, Pilkhwal Sah S. Advances in the pharmacotherapeutic management of post-traumatic stress disorder. Expert Opin Pharmacother 2021; 22(14): 1919-1930.

2. Zhang L, Pan R, Cai Y, Pan J. The prevalence of post-traumatic stress disorder in the general population during the COVID-19 pandemic: a systematic review and single-arm meta-analysis. *Psychiatry Investig* 2021; 18(5): 426-433.
3. Nemeroff CB, Bremner JD, Foa EB, Mayberg HS, North CS, Stein MB. Posttraumatic stress disorder: a state-of-the-science review. *J Psychiatri Res* 2006; 40(1): 1-21.
4. Ding J, Han F, Shi Y. Single-prolonged stress induces apoptosis in the amygdala in a rat model of post-traumatic stress disorder. *J Psychiatr Res* 2010; 44(1): 48-55.
5. Sherin JE, Nemeroff CB. Post-traumatic stress disorder: the neurobiological impact of psychological trauma. *Dialogues Clin Neurosci* 2022; 263-278.
6. Fluyau D, Mitra P, Jain A, Kailasam VK, Pierre CG. Selective serotonin reuptake inhibitors in the treatment of depression, anxiety, and post-traumatic stress disorder in substance use disorders: a Bayesian meta-analysis. *European Journal of Clinical Pharmacology* 2022; 78: 931-942.
7. Laux G. Serotonin Reuptake Inhibitors: Citalopram, Escitalopram, Fluoxetine, Fluvoxamine, Paroxetine, and Sertraline. *NeuroPsychopharmacotherapy*: Springer; 2021; 1-13.
8. Notaras M, van den Buuse M. Brain-Derived Neurotrophic Factor and Its Role in Stress-Related Disorders. *Stress: Genetics, Epigenetics and Genomics*: Elsevier; 2021; 253-261.
9. Camara ML, Almeida TB, de Santi F, Rodrigues BM, Cerri PS, Beltrame FL, et al. Fluoxetine-induced androgenic failure impairs the seminiferous tubules integrity and increases ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 (UCHL1): Possible androgenic control of UCHL1 in germ cell death? *Biomed Pharmacother* 2019; 109: 1126-1139.
10. Sharef AY, Aziz FM, Adham AN. The protective effect of *Fumaria officinalis* against the testicular toxicity of fluoxetine in rat. *Zanco Journal of Medical Sciences* 2020; 24(1): 117-131.
11. Mahalakshmi B, Maurya N, Lee S-D, Bharath Kumar V. Possible neuroprotective mechanisms of physical exercise in neurodegeneration. *International Journal of Molecular Sciences* 2020; 21(16): 5895.
12. Chigurupati S, Son TG, Hyun D-H, Lathia JD, Mughal MR, Savell J, et al. Lifelong running reduces oxidative stress and degenerative changes in the testes of mice. *Journal of Endocrinology* 2008; 199(2): 333-341.
13. Yi X, Tang D, Cao S, Li T, Gao H, Ma T, et al. Effect of different exercise loads on testicular oxidative stress and reproductive function in obese male mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2020; 2020.
14. Shafia S, Vafaei AA, Samaei SA, Bandegi AR, Rafiei A, Valadan R, et al. Effects of moderate treadmill exercise and fluoxetine on behavioural and cognitive deficits, hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysfunction and alternations in hippocampal BDNF and mRNA expression of apoptosis-related proteins in a rat model of post-traumatic stress disorder. *Neurobiol Learn Mem* 2017; 139: 165-178.
15. Schmidt U, Herrmann L, Hagl K, Novak B, Huber C, Holsboer F, et al. Therapeutic action of fluoxetine is associated with a reduction in prefrontal cortical miR-1971 expression levels in a mouse model of posttraumatic stress disorder. *Front Psychiatry* 2013; 4: 66.
16. Ganon-Elazar E, Akirav I. Cannabinoid receptor activation in the basolateral amygdala blocks the effects of stress on the conditioning and

- extinction of inhibitory avoidance. *J Neurosci* 2009; 29(36): 11078-11088.
17. Keller SM, Schreiber WB, Stanfield BR, Knox D. Inhibiting corticosterone synthesis during fear memory formation exacerbates cued fear extinction memory deficits within the single prolonged stress model. *Behavioural Brain Research* 2015; 287: 182-186.
  18. Goswami S, Rodríguez-Sierra O, Cascardi M, Paré D. Animal models of post-traumatic stress disorder: face validity. *Front Neurosci* 2013; 7(89): 3389.
  19. Muigg P, Hetzenauer A, Hauer G, Hauschild M, Gaburro S, Frank E, et al. Impaired extinction of learned fear in rats selectively bred for high anxiety—evidence of altered neuronal processing in prefrontal-amygdala pathways. *European Journal of Neuroscience* 2008; 28(11): 2299-2309.
  20. Hartley CA, Gorun A, Reddan MC, Ramirez F, Phelps EA. Stressor controllability modulates fear extinction in humans. *Neurobiology of learning and memory* 2014; 113: 149-156.
  21. Powers MB, Medina JL, Burns S, Kauffman BY, Monfils M, Asmundson GJ, et al. Exercise augmentation of exposure therapy for PTSD: Rationale and pilot efficacy data. *Cogn Behav Ther* 2015; 44(4): 314-327.
  22. Gunduz-Cinar O, Flynn S, Brockway E, Kaugars K, Baldi R, Ramikie TS, et al. Fluoxetine Facilitates Fear Extinction Through Amygdala Endocannabinoids. *Neuropsychopharmacology* 2016; 41(6): 1598-1609.
  23. Karpova NN, Pickenhagen A, Lindholm J, Tiraboschi E, Kuleskaya N, Ágústssdóttir A, et al. Fear erasure in mice requires synergy between antidepressant drugs and extinction training. *Science* 2011; 334(6063): 1731-1734.
  24. Maeng LY, Milad MR. Sex differences in anxiety disorders: interactions between fear, stress, and gonadal hormones. *Horm Behav* 2015; 76: 106-117.
  25. Spivak B, Maayan R, Kotler M, Mester R, Gil-Ad I, Shtaf B, et al. Elevated circulatory level of GABA A-antagonistic neurosteroids in patients with combat-related post-traumatic stress disorder. *Psychol Med* 2000; 30(05): 1227-1231.
  26. Son YL, Ubuka T, Tsutsui K. Regulation of stress response on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis via gonadotropin-inhibitory hormone. *Front Neuroendocrinol* 2022; 64: 100953.
  27. Bataineh HN, Daradka T. Effects of long-term use of fluoxetine on fertility parameters in adults male rats. *Neuro Endocrinol Lett* 2007; 28(3): 321-325.
  28. Gouvêa TS, Morimoto HK, de Faria MJS, Moreira EG, Gerardin DCC. Maternal exposure to the antidepressant fluoxetine impairs sexual motivation in adult male mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2008;90(3):416-419.
  29. Aggarwal A, Jethani S, Rohatgi R, Kalra J. Effects of fluoxetine on testis of albino rats—a histological assessment. *International Journal of Scientific and Engineering Research* 2012; 3(7): 1-5.
  30. Nikbin S, Derakhshideh A, Karimi Jafari S, Mirzahamedani A, Moslehi A, Ourzamani S, et al. Investigating the protective effect of aerobic exercise on oxidative stress and histological damages of testicular tissue associated with chlorpyrifos in male rats. *Andrologia* 2020; 52(2): e13468.
  31. Maleki BH, Tartibian B. Resistance exercise modulates male factor infertility through anti-inflammatory and antioxidative mechanisms in infertile men: A RCT. *Life Sci* 2018; 203: 150-160.
  32. Gaderpour S, Ghiasi R, Hamidian G, Heydari H, Keyhanmanesh R. Voluntary exercise improves

- spermatogenesis and testicular apoptosis in type 2 diabetic rats through alteration in oxidative stress and mir-34a/SIRT1/p53 pathway. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 2021; 24(1): 58-65 (Persian).
33. Manna I, Jana K, Samanta P. Effect of intensive exercise-induced testicular gametogenic and steroidogenic disorders in mature male Wistar strain rats: a correlative approach to oxidative stress. *Acta Physiol Scand* 2003; 178(1): 33-40.
34. Hackney AC. The male reproductive system and endurance exercise. *Med sci sports Exerc* 1996; 28(2): 180-189.
35. Hackney A. Endurance exercise training and reproductive endocrine dysfunction in men alterations in the hypothalamic-pituitary-testicular axis. *Curr Pharm Des* 2001; 7(4): 261-273.
36. Raastad T, Bjørø T, Hallen J. Hormonal responses to high-and moderate-intensity strength exercise. *Eur J Appl Physiol* 2000; 82(1-2): 121-128.
37. Can S, Selli J, Buyuk B, Aydin S, Kocaaslan R, Guvendi GF. The effect of estrogen usage on eccentric exercise-induced damage in rat testes. *Iran Red Crescent Med J* 2015; 17(4): E22521.