

Effects of Moderate Treadmill Exercise and Fluoxetine on Spatial Memory, Anxiety, and Positive Tunnel Cells in the Hippocampus in a Rat Model of PTSD

Fereshteh Talebpour Amiri^{1,2},
 Mehrnoosh Behnia³,
 Mansoureh Mirzae^{4,2},
 Pardis Seyedpour⁵,
 Sara Assadpour^{6,2},
 Sakineh Shafia^{7,2}

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

² Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Medical Student, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ PhD in Comparative Histology, Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ MSc Student in Psychology, Rahian Novin Danesh Higher Education Institute, Sari, Iran

⁶ PhD in Pharmaceutical Sciences, Molecular and Cell Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁷ Assistant Professor, Immunogenetics Research Center, Department of Physiology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received July 6, 2021 ; Accepted October 20, 2021)

Abstract

Background and purpose: Post-traumatic stress disorder (PTSD) is a condition that develops after experiencing major trauma. Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) are first-line treatment for PTSD. This study aimed at investigating the effects of moderate treadmill exercise and fluoxetine on anxiety, spatial memory, and positive tunnel cells in the hippocampus in a rat model of PTSD.

Materials and methods: We used single prolonged stress (SPS) model as an animal model for PTSD. Male and female rats were divided into two groups: Sham and SPS. After Two weeks, interventions, including treadmill exercise (4 weeks, 5 days per week), fluoxetine (10 mg/kg/day), and combined treatment were performed. Then, anxiety and memory test and tunnel assessments were done.

Results: SPS rats exhibited increased anxiety levels in light/dark box and enhanced hippocampal apoptotic cells. Male SPS rats showed impaired spatial memory in object-location memory task. Treadmill exercise, fluoxetine, and combined treatment reduced anxiety levels, improved spatial memory, and decreased positive tunnel cells in the hippocampus. Furthermore, combined treatment with fluoxetine and treadmill exercise was found to be more effective than fluoxetine alone. Female rats had more resilience than male rats.

Conclusion: Combined intervention with moderate exercise and fluoxetine is more useful in treatment of behavioral and cellular injuries in PTSD patients.

Keywords: post-traumatic stress disorder, single prolonged stress, moderate exercise, fluoxetine, spatial memory, positive tunnel cells

J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 31 (203): 23-38 (Persian).

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

اثرات ورزش تردمیل متوسط و فلوکستین بر حافظه فضایی، اضطراب، و سلول‌های تانل مثبت در هیپوکمپ رت مدل سندرم استرس پس از سانحه

فرشته طالب پور امیری^{2,1}مهرنوش به نیا³منصوره میرزایی^{2,4}پردیس سیدپور⁵سارا اسدپور^{2,6}سکینه شفیعا^{2,7}

چکیده

سابقه و هدف: سندرم استرس پس از سانحه (PTSD) یک اختلال روانی است که به دنبال حوادث تروماتیک ایجاد می‌شود. داروهای مهارکننده انتخابی برداشت سروتونین (SSRI s) اولین خط درمانی می‌باشند. هدف این مطالعه بررسی اثر ورزش تردمیل با شدت متوسط و داروی فلوکستین و اثر توأم آنان بر رفتار اضطرابی و حافظه فضایی و همچنین بررسی سلول‌های آپوپتوزی در ناحیه هیپوکمپ در رت‌های نر و ماده مبتلا به PTSD بود.

مواد و روش‌ها: رت‌های نر و ماده به دو گروه Sham و SPS تقسیم شدند. از SPS (Single prolonged stress) به عنوان یک مدل برای القای PTSD استفاده شد. بعد از دو هفته، مداخله ورزشی (4 هفته، 5 روز در هفته)، مداخله دارویی (فلوکستین با دوز 10mg/kg/day) و مداخله توأم انجام گرفت و سپس تست‌های حافظه فضایی و اضطراب و تست تانل انجام شد.

یافته‌ها: رت‌های نر و ماده با مدل SPS، افزایش سطح اضطراب را در اتاق تاریک - روشن و افزایش سلول‌های آپوپتوتیک را نشان دادند. آسیب حافظه فضایی فقط در رت‌های نر مشاهده شد. مداخله ورزش، دارو و تأثیر توأم آن‌ها سبب کاهش رفتارهای شبه اضطراب و بهبود حافظه فضایی و کاهش سلول‌های تانل مثبت شد. علاوه بر آن درمان توأم ورزش و دارو در مقایسه با درمان دارویی به تنهایی، موثرتر بود. در جنس ماده، تست‌های رفتاری نتیجه بهتری را نشان داد.

استنتاج: مداخله توأم ورزش و فلوکستین، می‌تواند یک روش درمانی مفیدتر در درمان آسیب‌های رفتاری و سلولی در بیماران PTSD باشد.

واژه‌های کلیدی: سندرم استرس پس از سانحه، استرس طولانی مدت تک‌واحدی، ورزش متوسط، فلوکستین، اضطراب، حافظه فضایی، سلول‌های تانل مثبت

مقدمه

قرارگیری فرد در معرض حوادث آسیب‌رسان در طول زندگی از قبیل تصادف، بلایای طبیعی، جنگ و... منجر به یک عارضه روانی جسمانی موسوم به عارضه استرسی بعد از تروما (Posttraumatic stress disorder: PTSD) می‌گردد.

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. دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

3. دانشجوی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

4. دکترای بافت شناسی مقایسه‌ای، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

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

6. دکترای پژوهشی علوم دارویی، مرکز تحقیقات زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

7. استادیار، گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات ایمونونیتیک، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

© تاریخ دریافت: 1400/4/15 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1400/5/11 تاریخ تصویب: 1400/7/28

می‌شود (3-1). این عارضه بر سلامت و عملکرد ذهنی و جنبه‌های مختلف زندگی فرد تاثیر می‌گذارد (5,4). از علائم PTSD، تجربه مجدد و پایدار تروما، انزواطلبی، کرختی، دوری کردن از محرک‌هایی که به شکلی مرتبط با حادثه آسیب‌رسان می‌باشند، است (8-6). در این بیماران فعالیت سه ساختار مهم مغزی شامل آمیگدال، هیپوکمپ و قشر پرفرونتال تغییر می‌کند (9,10). تغییر در ساختار هیپوکمپ با اختلالاتی در شناخت و اضطراب و افسردگی همراه است. احتمال ابتلا به PTSD پس از تروما در زنان دو برابر مردان می‌باشد و همچنین مشخص شده است زنانی که در معرض تروما یا PTSD قرار گرفته‌اند، حساسیت بیش‌تر و مقاومت کم‌تری نسبت به هیجانات منفی از خود نشان می‌دهند (8,11). مشاهدات نشان داده است که اختلاف جنس، زمینه‌ساز تفاوت‌های نورویولوژیکی در پاسخ‌های استرس تروماتیک می‌باشد (11). با وجود مطالعات متعدد انجام شده بررسی اختلاف جنس و مدارهای نورونی آن در ابتلا به PTSD بسیار محدود می‌باشد. ورزش می‌تواند تاثیر مثبتی بر عملکرد مغز خصوصاً ناحیه هیپوکمپ داشته باشد، بنابراین می‌تواند به عنوان یک مداخله غیردارویی جهت مهار و درمان پاتولوژی PTSD محسوب شود (1). ورزش به عنوان یک عامل موثر قادر است با تأثیر بر عملکرد فیزیولوژیک بسیاری از سیستم‌ها موجب کاهش رفتارهای شبه اضطراب شود. بررسی‌ها نشان داده است که ورزش از طریق کاهش استرس اکسیداتیو (12)، بهبود عملکرد میانجی‌های عصبی مختلف مانند سروتونین (13) و نورآدرنالین (14) و BDNF (15) و عملکرد محور هیپوتالاموس - هیپوفیز - آدرنال (HPA) (16) می‌تواند به کاهش رفتارهای اضطرابی کمک کند.

یکی از درمان‌های رایج PTSD استفاده از مهارکننده‌های انتخابی برداشت سروتونین (SSRI s) می‌باشد. فلوکستین به عنوان یک داروی ضد افسردگی اولین خط درمانی برای مبتلایان به PTSD شناخته شده است (4)، زیرا اثربخشی آن‌ها نسبت به سایر داروها بیش‌تر

است (1,24). براساس مطالعات، هیچکدام از درمان‌های دارویی و غیردارویی کاملاً موثر نبوده و درصدی از بیماران، پس از درمان مجدداً علائم بیماری را نشان می‌دهند (17)، بنابراین پیدا کردن راه‌های درمانی جدید که علاوه بر داشتن سودمندی بیش‌تر، کم‌ترین اثرات جانبی را داشته باشند از اهمیت بسیار برخوردار است. اثرات مثبت فعالیت فیزیکی در بیماران PTSD شناسایی شده است (7). اما این نیاز وجود دارد که ورزش موثر از نظر فرکانس و شدت و طول مدت برای درمان این افراد شناسایی شود. بر این اساس هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر ورزش به عنوان یک عامل موثر در درمان بیماری‌های نورودژنراتیو به تنهایی و به صورت توأم با داروی ضد افسردگی فلوکستین می‌باشد.

مطالعات مختلف از ورزشهایی با طول مدت بیش‌تر و سرعت متفاوت و همچنین ورزش اختیاری در درمان PTSD استفاده نموده‌اند، هدف ما در این مطالعه تعیین حداقل دوره ورزش اجباری است که قادر باشد آسیب‌های رفتاری و شیمیایی ایجاد شده پس از مواجهه با استرس را بهبود ببخشد.

مواد و روش‌ها

طراحی تحقیق و گروه بندی حیوانات

موش‌های بزرگ سفید آزمایشگاهی نر و ماده (ماده‌ها بدون سابقه بارداری) به تعداد 112 حیوان (56 رت نر و 56 رت ماده)، نژاد ویستار به وزن 200-250 گرم در مرکز تحقیقات حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی مازندران و در محیط با درجه حرارت 24 ± 2 درجه سانتی‌گراد و سیکل شبانه‌روزی منظم (12 ساعت تاریکی و 12 ساعت روشنایی) نگهداری شدند و آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند. هر یک از گروه‌های نر و ماده به دو گروه SPS (Single prolonged stress) و Sham تقسیم شدند.

گروه Sham: رت‌هایی که در معرض SPS قرار نگرفتند و گروه SPS: رت‌هایی که در معرض SPS قرار

نشد و چنانچه حیوانی در دستگاه آسیب می‌دید، بلافاصله خارج و تیمار می‌شد.

جهت سازش دادن حیوانات به دستگاه تردمیل، به مدت 3 روز، هر روز 15 دقیقه (5 دقیقه اول با سرعت 5 متر بر دقیقه، 5 دقیقه دوم با سرعت 10 متر بر دقیقه و 5 دقیقه سوم با سرعت 15 متر بر دقیقه) حیوانات روی دستگاه قرار گرفته و ورزش کردند. حیواناتی که مقاومت کرده و از انجام ورزش خودداری کردند، از پروسه آزمایش حذف شدند تا گروه حیوانات مورد آزمایش کاملاً یکسان باشد. ورزش به صورت 5 روز در هفته در طی سیکل نوری بین ساعات 9:00 صبح تا 2 بعدازظهر به مدت 4 هفته با سرعت 10 متر بر دقیقه و هر روز 30 دقیقه انجام شد (18). در هر جلسه ورزشی، بعد از 15 دقیقه ورزش یک استراحت 5 دقیقه‌ای در نظر گرفته شد.

مداخله دارویی:

داروی فلوکستین هیدروکلراید (Fluoxetine hydrochloride) (تهیه شده از لابراتوار دکتر عبیدی، تهران، ایران) استفاده شد. دوز دارو برای کلیه گروه‌های دریافت کننده دارو 10mg/kg/day به صورت حل شده در آب آشامیدنی بود. حیوانات گروه کنترل فقط آب آشامیدنی دریافت کردند. دوز انتخابی دارو بر اساس مطالعات قبلی انتخاب شده بود (19).

ارزیابی اضطراب با جعبه تاریک - روشن (Light-dark box) (L/D BOX):

جعبه استفاده شده برای ارزیابی اضطراب از جنس پلکسی گلاس به ابعاد 30 × 27 × 46 سانتی متر است که از دو بخش تاریک و روشن درست شده بود که با یک درب گیوتینی به یکدیگر اتصال داشتند. در بالای بخش روشن یک لامپ 100 وات تعبیه شد. بخش تاریک به رنگ مشکی بود. برای انجام تست در روز آزمایش، حیوان به مدت 5 دقیقه در بخش روشن قرار داده می‌شد. پس از 5 دقیقه، فاکتورهای زیر اندازه گیری شد:

گرفتند. بر روی هر یک از دو گروه Sham و SPS یکی از مداخله‌های زیر انجام می‌شود:

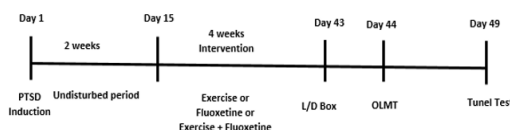
الف) گروه غیر ورزشی دریافت کننده حامل Sedentary-Vehicle (SED-VEH)

ب) گروه غیر ورزشی دریافت کننده دارو Sedentary- Fluoxetine (SED-FLX)

ج) گروه ورزشی دریافت کننده حامل Exercise-Vehicle (EXE-VEH)

د) گروه ورزشی دریافت کننده دارو Exercise-Fluoxetine (EXE-FLX)

در مجموع 8 گروه رت نر و 8 گروه رت ماده (4 گروه Sham و 4 گروه SPS) (گروه 7/ حیوان بررسی شدند. طراحی مطالعه در تصویر شماره 1 نشان داده شده است.



تصویر شماره 1: نمودار طراحی آزمایش ها

ایجاد PTSD به روش SPS

ایجاد مدل SPS از طریق القای 3 نوع استرس مختلف تشکیل شده است: محدود نمودن حیوان به مدت 2 ساعت در یک restrainer (استرس سایکولوژیک)، Forced swim به مدت 20 دقیقه (استرس فیزیکی) و بیهوشی با اتر (استرس اندوکرینولوژیک) (9).

ورزش اجباری:

14 روز پس از SPS رت‌های گروه Exercise روی یک تردمیل برقی (ساخت شرکت برج صنعت، تهران، ایران)، با شیب صفر درجه دویدند. حیوانات گروه Sedentary به اتاق آزمایش منتقل شدند، دست ورزی (handling) شدند و به مدت 5 دقیقه روی تردمیل خاموش باقی ماندند. حیوانات گروه ورزشی طبق پروتکل تعیین شده که بر اساس مطالعات قبلی بود، ورزش را انجام دادند. در طی ورزش هیچ شوکی به حیوانات داده

مدت (TN) Time exploring Novel location

زمان صرف شده برای کشف موقعیت جدید

مدت (TF) Time exploring Familiar location

زمان صرف شده برای کشف موقعیت قبلی

درصد ضریب شناخت اگر در یک حافظه تشخیص

فضایی دست نخورده در فاز تست بزرگ تر از 50 درصد

باشد، نشان دهنده سپری کردن زمان بیش تر برای کشف

موقعیت جدید می باشد (22).

تست تانل:

در آزمایش تانل، DNA قطعه قطعه شده در هسته

را می توان در حین آپوپتوز تشخیص داد. این روش با

استفاده از کیت In Situ Cell Death Detection Kit،

POD; REF, 11684817910 انجام شد. برای انجام این

تست ابتدا مغز رت خارج شد و برای 48 ساعت در

فرمالین 10 درصد فیکس شد. از بافت مغز فیکس شده

بعد از آبگیری، شفاف سازی و غوطه ور شدن در

پارافین، سکشن هایی با 5 میکرون ضخامت تهیه شد.

سپس بعد از پارافین زدایی و آب دهی، پراکسیداز درون

زا بوسیله محلول H_2O_2 برای مدت 10 دقیقه بلاک شد.

بعد با پروتئیناز K برای مدت 30 دقیقه انکوبه شدند. در

مرحله بعد سکشن ها با مخلوط واکنشی تانل که حاوی

terminal deoxynucleotidyl transferase enzyme بودند

برای مدت 60 دقیقه در محیط کاملاً مرطوب انکوبه

شدند. بعد از بلاک کردن نمونه ها با BSA برای

20 دقیقه، نمونه ها با کروموزن DAB رنگ آمیزی شدند.

فعالیت آپوپتوزی در بافت مغز در زیر میکروسکوپ

نوری با هسته های مثبت که به رنگ قهوه ای تیره

بودند تعیین شدند. دو اسلاید از هر حیوان و 5 میدان

دید از هر اسلاید برای ارزیابی نیمه کمی مورد بررسی

و شمارش قرار گرفت. میانگین تعداد سلول های

آپوپتو تیک به عنوان سلول هایی با رنگ قهوه ای

تیره گزارش شد.

مدت زمان صرف شده در بخش روشن، تعداد عبور و

مرور از هر دو بخش و تعداد rearing در بخش روشن.

حیواناتی که اضطراب کم تری داشتند زمان تقریباً

برابری را جهت جستجوی هر دو بخش تاریک و روشن

طی می کردند (20).

ارزیابی حافظه مکان اشیاء

(Object Location Memory Task, OLMT):

این تست جهت ارزیابی حافظه فضایی در رت

استفاده می شود (21). در یک فضای محدود در باکس،

حیوان با دو شیء مواجه می شدند. ابتدا مدت زمانی

صرف کشف اجسام می شد. در مرحله بعدی قبل از قرار

دادن حیوان در این مکان، موقعیت یکی از اشیاء عوض

می شد. به طور طبیعی حیوان مدت زمان بیش تری را

صرف کشف جسم جابجا شده می کرد. آسیب به حافظه

فضایی حیوان این واکنش را مختل می کرد.

شرح آزمایش: دو جسم کوچک سرامیکی

(5-cm diameter and 10-cm height) در یک مکعب

بزرگ به نام Open field قرار می گرفت. این تست در

سه مرحله انجام می شود:

1- مرحله عادت دادن Habituation Phase: در

مرحله اول، ابتدا به مدت 10 دقیقه در هر روز، به مدت

4 روز، به حیوان فرصت داده می شود تا با محیط

Open field بدون اشیاء آشنا شود.

2- مرحله تعلیم دادن Training Phase: در مرحله

دوم، دو شیء کاملاً شبیه به هم در دو قسمت متفاوت از

open field قرار داده شده و اجازه داده می شود تا

موش ها به مدت 5 دقیقه با اشیاء مواجه شوند.

3- مرحله تست Test Phase: در مرحله سوم (فاز

تست)، بعد از 24 ساعت یک شیء به موقعیت جدید منتقل

می شود و مدت زمانی که صرف کشف اجسام در موقعیت های

قدیم و جدید می شود، به مدت 5 دقیقه ثبت می گردد.

Discrimination Index (DI) یا ضریب شناخت که در

این تست برای هر حیوان برابر است با: $TN/TN+TF$

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

جهت تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار SPSS با نسخه 22 استفاده شد. توصیف اطلاعات به وسیله شاخص‌های میانگین و انحراف معیار انجام شد. آزمون کولموگروف اسمیرنوف جهت بررسی نحوه توزیع داده‌ها استفاده شد. داده‌ها توسط آزمون‌های مناسب پارامتریک، آنالیز واریانس دوطرفه و سه‌طرفه بررسی شدند. همچنین داده‌های گروه‌ها با آزمون‌های تعقیبی (Post Hoc) مناسب تحت بررسی قرار گرفتند. سطح معنی‌داری در کلیه آزمایش‌ها ($P < 0/05$) در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

یافته‌های رفتارهای شبه اضطراب در تست Light Dark Box

تعداد ورود به ناحیه روشن TLC (Time Light Compartment) در رت‌های نر، اثر معنی‌دار SPS ($F_{1/48} = 98/081, P = 0/0001$) و درمان ($F_{3/48} = 14/594, P = 0/0001$) و همچنین عدم وجود تعامل معنی‌دار بین SPS و درمان ($F_{3/48} = 1/0381, P = 0/381$) را نشان داد.

مقایسه بین گروه‌ها نشان داد که TLC در گروه M.SPS/SED-VEH به‌طور معنی‌داری از گروه M.Sham/SED-VEH ($P = 0/001$) کم‌تر است و همچنین در گروه‌های M.SPS/EXC-VEH ($P = 0/007$) و M.SPS/EXC-FLX ($P = 0/0001$) به‌طور معنی‌داری از گروه M.SPS/SED-VEH طولانی‌تر می‌باشد.

اختلاف بین گروه‌های M.SPS/EXC-FLX و M.SPS/SED-FLX معنی‌دار بود ($P = 0/024$). همچنین اختلاف‌های بین گروه‌های M.Sham/SED-VEH با M.Sham/EXC-VEH ($P = 0/0001$) و M.Sham/SED-FLX ($P = 0/0001$) و گروه M.Sham/EXC-FLX ($P = 0/0001$) همه معنی‌دار بودند.

در گروه رت‌های ماده، زمان گذرانده شده در ناحیه روشن L/D box اثر معنی‌دار SPS ($F_{1/48} = 10/949, P = 0/001$) و درمان ($F_{3/48} = 17/453, P = 0/0001$) و همچنین عدم وجود تعامل معنی‌دار بین SPS و درمان ($F_{3/48} = 0/064, P = 0/979$) را نشان داد. مقایسه بین گروه‌ها نشان داد TLC در گروه F.Sham/SED-VEH کاهش معنی‌داری نسبت به گروه‌های F.Sham/EXC-VEH ($P = 0/007$) و F.Sham/EXC-FLX ($P = 0/0001$) دارد. همچنین اختلاف بین F.Sham/SED-FLX و F.Sham/EXC-FLX نیز معنی‌دار بود ($P = 0/001$).

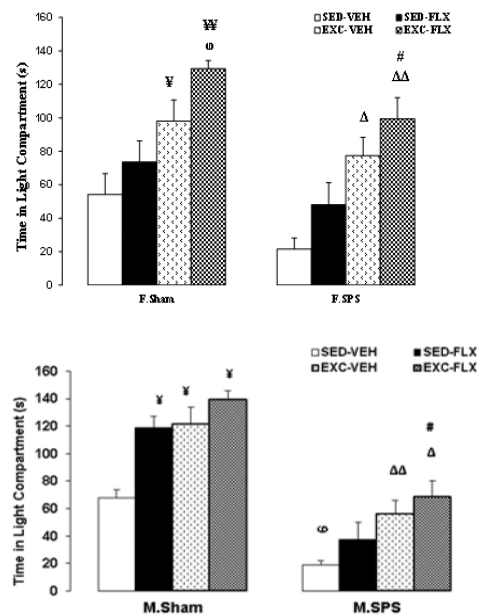
همچنین اختلاف بین گروه F.SPS/SED-VEH با گروه‌های F.SPS/EXC-VEH ($P = 0/002$) و F.SPS/EXC-FLX ($P = 0/0001$) و نیز گروه SPS/SED-FLX با گروه F.SPS/EXC-FLX ($P = 0/002$) هم معنی‌دار بود. در مقایسه تعداد کل ورود به ناحیه روشن بین گروه رت‌های نر و ماده، آنالیز واریانس سه‌طرفه (جنس $\times$ درمان $\times$ SPS) تعداد ورود به ناحیه روشن، نشان‌دهنده اثر معنی‌دار SPS ($F_{1/96} = 80/099, P = 0/0001$) و اثر معنی‌دار درمان ($F_{3/96} = 31/192, P = 0/0001$) و عدم اثر معنی‌دار برای جنس ($F_{1/96} = 0/214, P = 0/644$)، تعامل معنی‌دار بین جنس و SPS ($F_{3/96} = 15/350, P = 0/0001$) و عدم وجود تعامل معنی‌دار برای درمان و SPS ($F_{3/96} = 0/428, P = 0/733$) و همچنین عدم وجود تعامل معنی‌دار برای درمان و جنس ($F_{3/96} = 1/326, P = 0/268$) بود. تعامل بین سه متغیر SPS و درمان و جنس نیز معنی‌دار نبود ($F_{3/96} = 0/523, P = 0/666$). باوجود این مقایسه بین گروهی نشان داد که تعداد کل ورود به ناحیه روشن در رت‌های نر در گروه‌های Sham/SED-FLX ($P = 0/002$) و SPS/EXC-FLX ($P = 0/036$) اختلاف معنی‌داری با رت‌های ماده در همین گروه‌ها دارد (نمودار شماره 1).

VEH ($P=0/0001$) بود. همچنین NC در گروه M.SPS/SED-VEH کاهش معناداری نسبت به گروه های M.SPS/EXC-FLX ($P=0/002$)، M.Sham/SED-VEH و M.SPS/EXC-VEH ($P=0/015$) داشت. ($P=0/007$)

در گروه رت های ماده، داده های مربوط به NC، اثر معنی دار درمان ($F_{3/48}=29/861$, $P=0/0001$) و عدم اثر معنی دار SPS ($F_{13/48}=1/389$, $P=0/242$) و عدم وجود تعامل معنی دار بین فاکتورهای SPS و درمان را نشان داد ($F_{3/48}=2/188$, $P=0/097$). مقایسه بین گروهی نشان داد که NC در گروه Sham/SED-VEH به طور معناداری کم تر از گروه های F.Sham/SED-FLX و F.Sham/EXC-VEH ($P=0/005$) و F.Sham/EXC-FLX ($P=0/0001$) بود.

همچنین تعداد عبور بین دو کمپارتمنت در گروه F.Sham/EXC-FLX افزایش معناداری نسبت به گروه های F.Sham/SED-FLX ($P=0/015$) و F.Sham/EXC-VEH ($P=0/005$) داشت. علاوه بر این، NC در گروه F.SPS/SED-VEH کاهش معنی داری نسبت به گروه های F.SPS/EXC-FLX ($P=0/0001$) و F.SPS/EXC-VEH ($P=0/0001$) داشت. اختلاف بین دو گروه F.SPS/SED-FLX و F.SPS/EXC-VEH معنی دار بود ($P=0/011$).

در مقایسه NC بین گروه رت های نر و ماده، آنالیز واریانس سه طرفه جنس $\times$ درمان $\times$ SPS، نشان دهنده اثر معنی دار SPS ($F_{1/96}=22/882$, $P=0/0001$) و اثر معنی دار درمان ($F_{3/96}=36/354$, $P=0/0001$) و عدم اثر معنی دار برای جنس ($F_{1/96}=1/803$, $P=0/181$)، تعامل معنی دار بین جنس و SPS ($F_{3/96}=10/994$, $P=0/001$) و تعامل معنی دار برای درمان و SPS ($F_{3/96}=3/073$, $P=0/030$) و همچنین عدم وجود تعامل معنی دار برای درمان و جنس ($F_{3/96}=1/659$, $P=0/178$) بود. تعامل بین سه متغیر SPS و درمان و جنس نیز معنی دار نبود ($P=0/208$).



نمودار شماره 1: اثر ورزش اجباری با شدت متوسط و داروی فلورکستین بر مدت حضور در ناحیه روشن در رت های ماده و نر مبتلا به PTSD و کنترل

گروه Φ ($P=0/001$) M.SPS/SED-VEH نسبت به گروه M.Sham/SED-VEH
 گروه $\Delta\Delta$ ($P=0/007$) M.SPS/EXC-VEH نسبت به گروه M.SPS/SED-VEH
 گروه Δ ($P=0/0001$) M.SPS/EXC-FLX نسبت به گروه M.SPS/SED-VEH
 گروه $\#$ ($P=0/024$) M.SPS/SED-FLX نسبت به گروه M.SPS/EXC-FLX
 گروه Ψ ($P=0/0001$) M.Sham/EXC-VEH و M.Sham/EXC-FLX نسبت به گروه M.Sham/SED-VEH

(Number of Crossing: NC) در رت های نر، ماده و مقایسه دو جنس

در گروه رت های نر، داده های مربوط به NC، اثر معنی دار SPS ($F_{1/48}=26/802$, $P=0/0001$) و درمان ($F_{3/48}=12/139$, $P=0/0001$) و عدم وجود تعامل معنی دار بین فاکتورهای SPS و درمان را نشان داد ($F_{3/48}=2/385$, $P=0/076$). مقایسه بین گروهی نشان داد که NC در گروه M.Sham/EXC-FLX به طور معناداری بیش تر از گروه های M.SPS/EXC-FLX و M.Sham/SED-VEH ($P=0/0001$) و M.Sham/EXC-VEH ($P=0/001$) بود.

گروه Δ (P=0/0001) F.SPS/EXC-FLX نسبت به گروه F.Sham/EXC-FLX
 © (P=0/015) گروه F.SPS/EXC-VEH نسبت به گروه F.Sham/EXC-VEH
 ¥ (P=0/0001) گروه F.SPS/EXC-FLX نسبت به گروه F.SPS/SED-VEH
 € (P=0/0001) گروه F.Sham/EXC-VEH و F.Sham/EXC-FLX نسبت به گروه FLX
 * (P=0/002) گروه F.SPS/EXC-FLX نسبت به گروه F.SPS/SED-FLX
 # (P=0/0001) گروه F.Sham/SED-FLX نسبت به گروه F.Sham/EXC-FLX
 ## (P=0/006) گروه F.Sham/EXC-VEH نسبت به گروه F.Sham/EXC-FLX

اثر ورزش تردمیل با شدت متوسط و فلوکستین بر حافظه فضایی در OLMT در یک مدل PTSD

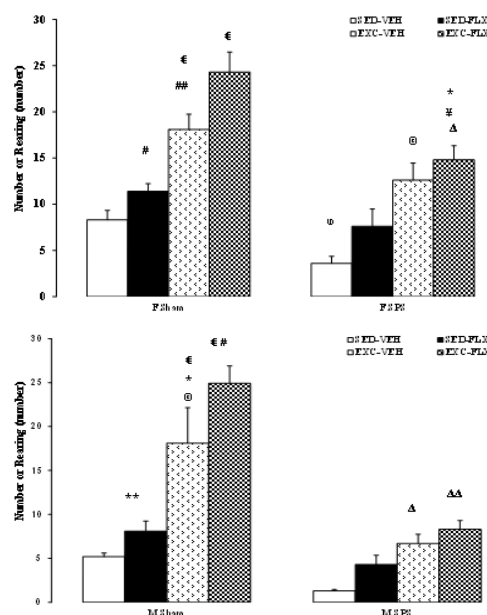
در گروه رت‌های نر آنالیز واریانس دوطرفه بر روی داده‌های مربوط به ضریب شناخت (DI) اثر معنادار SPS ($F_{1/48}=3/999$, $P=0/049$) و درمان ($P=0/0001$), $F_{3/48}=8/58$ و عدم تعامل معنادار بین SPS و درمان ($F_{3/48}=0/759$, $P=0/521$) را نشان داد. با وجود این، مقایسه بین گروه‌ها نشان داد که DI در گروه M.SPS/SED-VEH به‌طور معنی‌داری کم‌تر از گروه M.SPS/M.EXC-FLX و M.Sham/SED-VEH ($P=0/031$) و M.Sham/SED-FLX ($P=0/018$) می‌باشد. DI در گروه‌های M.Sham/EXC-VEH ($P=0/004$) و M.Sham/EXC-FLX ($P=0/0001$) به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از گروه M.Sham/SED-VEH بود.

در گروه رت‌های ماده آنالیز واریانس دوطرفه بر روی داده‌های مربوط به ضریب شناخت (DI) اثر معنادار و درمان ($F_{3/48}=3/453$, $P=0/021$) و عدم اثر معنی‌دار SPS ($F_{1/48}=1/398$, $P=0/241$) و عدم تعامل معنادار بین SPS و درمان ($F_{3/48}=0/418$, $P=0/740$) را نشان داد، با وجود این، مقایسه بین گروه‌ها نشان داد که DI در گروه F.Sham/SED-VEH به‌طور معناداری کم‌تر از گروه F.Sham/EXC-FLX ($P=0/015$) است.

در مقایسه ضریب شناخت بین گروه رت‌های نر و ماده، آنالیز واریانس سه‌طرفه (جنس × درمان × SPS)،

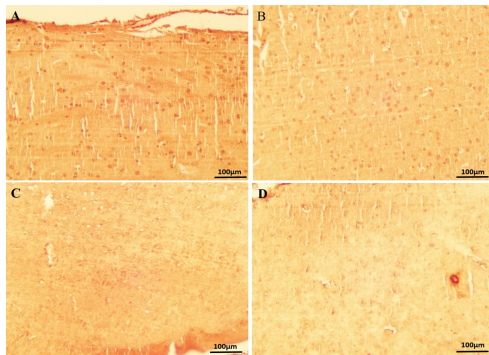
گروه F.SPS/SED-FLX با گروه F.SPS/EXC-VEH ($P=0/026$) نیز معنی‌دار بود.

در مقایسه NR بین گروه رت‌های نر و ماده، آنالیز واریانس سه‌طرفه جنس × درمان × SPS، نشان‌دهنده اثر معنی‌دار SPS ($F_{1/96}=78/157$, $P=0/0001$) و اثر معنی‌دار درمان ($F_{3/96}=53/800$, $P=0/0001$) و اثر معنی‌دار جنس ($F_{1/96}=13/730$, $P=0/0001$) و عدم وجود تعامل معنی‌دار بین جنس و SPS ($F_{3/96}=3/450$, $P=0/065$) و تعامل معنی‌دار برای درمان SPS و ($F_{3/96}=6/514$, $P=0/0001$) و همچنین عدم وجود تعامل معنی‌دار برای درمان و جنس ($F_{3/96}=0/038$, $P=0/990$) بود. تعامل بین سه متغیر SPS و درمان و جنس نیز معنی‌دار نبود ($F_{3/96}=1/504$, $P=0/216$). با وجود این مقایسه بین گروهی نشان داد که NR در رت‌های نر در گروه‌های SPS/EXC-VEH ($P=0/013$) و SPS/EXC-FLX ($P=0/007$) افزایش معنی‌داری با رت‌های ماده در همین گروه دارند (تصویر شماره 3).

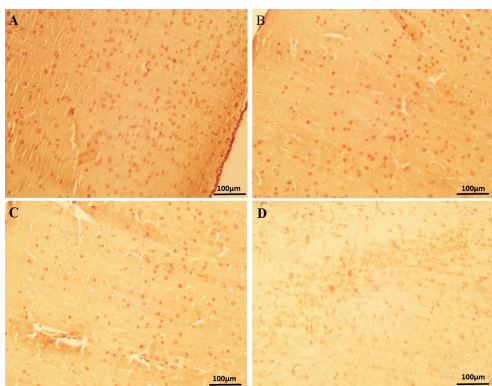


نمودار شماره 3: اثر ورزش اجباری با شدت متوسط و داروی فلوکستین بر تعداد rearing در رت‌های ماده و نر مبتلا به PTSD و کنترل ($P=0/0001$) گروه F.SPS/SED-VEH نسبت به گروه F.Sham/SED-VEH

اثر ورزش تردمیل با شدت متوسط و فلوکستین بر سلول‌های تانل مثبت در ناحیه هیپوکمپ در یک مدل PTSD سلول‌های تانل مثبت در گروه PTSD به تعداد زیاد در هر دو گروه جنس نر و ماده دیده شد که نشان‌دهنده میزان بیش‌تر آپپتوز در این گروه می‌باشد (تصویر شماره 2و3).

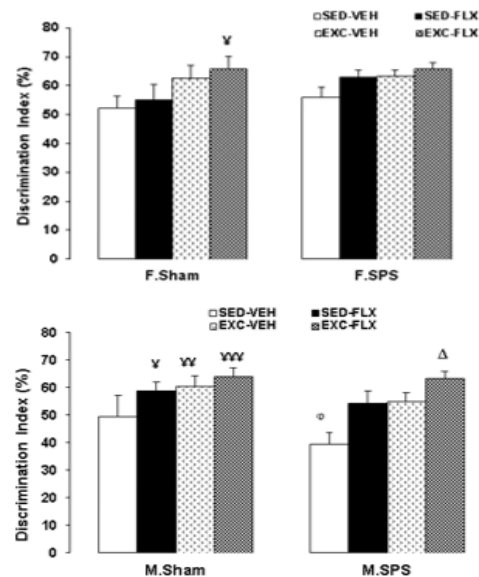


تصویر شماره 2: فتومیکروگرافی از رنگ آمیزی TUNEL در منطقه هیپوکمپ در گروه‌های مختلف آزمایشی در جنس مونث سلول‌های TUNEL مثبت پراکنده در نرون‌های پیرامیدال هیپوکمپ در رت‌های گروه PTSD (A)، سلول‌های TUNEL مثبت کم‌تر در نرون‌های پیرامیدال در رت‌های مدل PTSD که با ورزش (B) و یا تحت درمان با فلوکستین (C) بودند و یا درمان توأم ورزش و فلوکستین که آپپتوز بسیار کم‌تری را نشان دادند (D).



تصویر شماره 3: فتومیکروگرافی از رنگ آمیزی TUNEL در منطقه هیپوکمپ در گروه‌های مختلف آزمایشی در جنس مذکر. سلول‌های TUNEL مثبت پراکنده در نرون‌های پیرامیدال هیپوکمپ در رت‌های گروه PTSD (A)، سلول‌های TUNEL مثبت کم‌تر در نرون‌های پیرامیدال در رت‌های مدل PTSD که با ورزش (B) و یا تحت درمان با فلوکستین (C) بودند و یا درمان توأم ورزش و فلوکستین که آپپتوز بسیار کم‌تری را نشان دادند (D).

نشان‌دهنده عدم وجود اثر معنی‌دار SPS ($F_{1/96}=0/479$, $P=0/490$) و اثر معنی‌دار درمان ($F_{3/96}=11/438$, $P=0/0001$) و اثر معنی‌دار برای جنس ($F_{1/96}=6/741$, $P=0/010$) و تعامل معنی‌دار بین جنس و SPS ($F_{3/96}=5/182$, $P=0/024$) و عدم وجود تعامل معنی‌دار برای درمان و SPS ($F_{3/96}=0/446$, $P=0/720$) و همچنین عدم وجود تعامل معنی‌دار برای درمان و جنس ($F_{3/96}=1/115$, $P=0/345$) بود. تعامل بین سه متغیر SPS و درمان و جنس نیز معنی‌دار نبود ($P=0/515$), با وجود این مقایسه بین گروهی نشان داد که ضریب شناخت در رت‌های نر در گروه SPS/SED-VEH نسبت به رت‌های ماده در این گروه کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد (نمودار شماره 4).



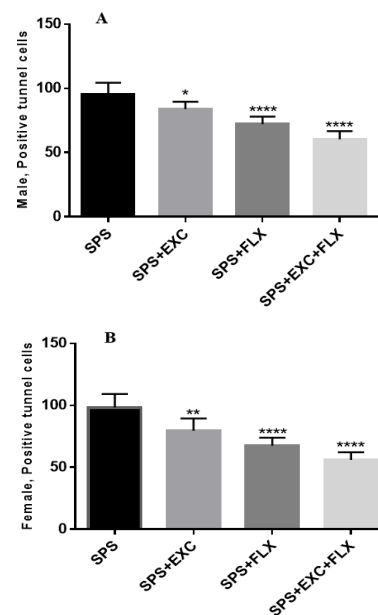
نمودار شماره 4: اثر ورزش اجباری با شدت متوسط و داروی فلوکستین، بر ضریب شناخت در حافظه فضایی در رت‌های ماده و نر مبتلا به PTSD و کنترل

نسبت به گروه M.SPS/SED-VEH ($P=0.031$)
 M.Sham/SED-VEH
 نسبت به گروه M.SPS/EXC-FLX ($P=0.018$)
 M.SPS/SED-VEH
 نسبت به گروه M.Sham/SED-FLX ($P=0.004$)
 M.Sham/SED-VEH
 نسبت به گروه M.Sham/EXC-VEH ($P=0.003$)
 M.Sham/SED-VEH
 نسبت به گروه M.Sham/EXC-FLX ($P=0.0001$)
 M.Sham/SED-VEH

شدت متوسط، داروی فلوکستین و تأثیر توام این دو عامل باعث کاهش رفتار شبه اضطراب و همچنین آپوپتوز ناشی از SPS شد. تأثیر ورزش و ورزش و دارو به صورت توام، بیش تر از تأثیر دارو به تنهایی بود. ارزیابی تست تانل از ناحیه هیپوکمپ نیز تایید کننده اثر SPS در افزایش سلول های تانل مثبت در گروه های بدون مداخله می باشد و همچنین تأثیر مثبت ورزش و دارو اثر توام آن ها را بر کاهش این سلول ها مشخص می کند. در این مطالعه رت های مدل SPS نسبت به گروه کنترل رفتار شبه اضطراب بیش تری را از خود نشان دادند، در مطالعاتی مشابه نیز رفتارهای شبه اضطراب در حیوانات SPS در تست open field و EPM و L/D box مشاهده شده است (18، 23-25). در مورد علت ایجاد تغییرات رفتاری در صورت مواجهه با عوامل استرس زا نظرات مختلفی وجود دارد. برخی تغییر عملکرد در سیستم های سمپاتوآدرنال و محور HPA را عامل اصلی می دانند که با افزایش کورتیکوسترون پلازما همراه است (18). گمان می رود که کورتیکوسترون نقش مهمی در وساطت اثرات SPS بر مغز و دیگر ارگان ها بازی می کند. قرار گرفتن طولانی مدت در معرض گلوکوکورتیکوئیدها، اثرات نورو توتوکسیک بر روی سطوح مغزی در گیر در اضطراب و دپرسیون مانند نواحی هیپوکمپ و آمیگدال اعمال می کند (26). SPS باعث افزایش سطح سرمی گلوکوکورتیکوئیدها شده و این افزایش تا مدت طولانی پس از SPS باقی می ماند (25).

آسیب هیپوکمپ نقش مهمی در شروع بیماری های روانپریشی و تضعیف یادگیری و حافظه دارد (1). قرار گرفتن در معرض استرس شدید همراه با آسیب این ناحیه می باشد. تحقیقات ارتباط نزدیک بین بیماری های روانپریشی مرتبط با استرس و کاهش حجم هیپوکمپ را نشان داده اند (27، 28). تغییرات عملکردی و ساختمانی در هیپوکمپ با پاتولوژی PTSD در ارتباط می باشد (29)، حیوانات PTSD نشانه های رفتاری افسردگی، اضطراب و کاهش یادگیری و حافظه و افزایش سلول های تانل

این تعداد سلول های تانل مثبت در گروه PTSD در مقایسه با گروه کنترل به طور قابل توجه ای بیش تر و معنی دار بوده است ($P < 0/0001$). تعداد سلول های تانل مثبت با انجام ورزش و همچنین دریافت داروی فلوکستین در رت های با PTSD کاهش معنی داری در مقایسه با گروه PTSD تنها داشت. نمودار شماره 5 نشان می دهد در هر دو جنس داروی فلوکستین موثرتر از ورزش بود. درمان توام ورزش با فلوکستین در هر دو جنس موثرتر از مداخله تنهای آن ها بود. سلول های تانل مثبت در گروه کنترل تقریباً دیده نشد.



تصویر شماره 5: نمودار ارزیابی کمی تعداد سلول های TUNEL مثبت در منطقه هیپوکمپ را در تمام گروه های دو جنس مذکر (A) و جنس مونث (B) نشان می دهد. داده ها به صورت $M \pm SD$ بیان شدند. * : معنی دار بودن را در مقایسه با گروه SPS نشان می دهد. **: $P < 0/05$, ***: $P < 0/01$, ****: $P < 0/0001$ در مقایسه با گروه SPS.

بحث

در این مطالعه، رت های نر و ماده SPS، رفتارهای شبه اضطراب را نشان دادند. آسیب حافظه فضایی در رت های نر مدل SPS مشاهده شد، اما در رت های ماده آسیبی در حافظه فضایی دیده نشد. ورزش تردمیل با

مثبت در ناحیه هیپوکمپ را نشان می‌دهند (1) که تاییدکننده نتایج مطالعه ما می‌باشد. ما مشاهده کردیم که فلوکستین در کاهش رفتار اضطرابی نقش موثری دارد. تحقیقات نشان داده‌اند که سیستم سروتونریک نقش مهمی در کنترل رفتارهای اضطرابی داشته (30) و فلوکستین به عنوان یکی از داروهای مهارکننده انتخابی برداشت سروتونین قادر است سطح سروتونین در مغز را افزایش دهد. افزایش در سنتز سروتونین، متابولیسم و آزادسازی آن به دنبال ورزش نیز توسط محققین گزارش شده است (31). با توجه به نقش سروتونین در کنترل رفتارهای اضطرابی، این احتمال داده شده که ورزش یا فلوکستین از طریق تأثیر بر سیستم سروتونریک می‌تواند نقش مهمی در کاهش اضطراب داشته باشند (18، 32). مقاطع بافتی تهیه شده در این مطالعه نیز نشان داد که فلوکستین تأثیر کاملاً واضحی در کاهش سلول‌های تانل مثبت در ناحیه هیپوکمپ در هر دو جنس داشته است. احتمال داده می‌شود که کاهش آسیب بافتی در این ناحیه منجر به بهبود آسیب‌های رفتاری ایجاد شده به وسیله SPS شده است. در تایید مطالعه ما، در مطالعه Lee و همکاران تزریق فلوکستین به مدت 7 روز به رت‌ها پس از استرس، منجر به کاهش سلول‌های تانل مثبت در ناحیه هیپوکمپ شد (33). مطالعه شفیع و Huang نیز تأثیر فلوکستین بر کاهش اپوپتوز در ناحیه هیپوکمپ را نشان داد (25، 34). داده‌های این مطالعه تایید کرد ورزش در کاهش رفتارهای اضطرابی نقش موثری داشت. در بررسی عوامل مؤثر بر بهبود رفتارهای شبه اضطراب، ورزش با تأثیر بر عملکرد فیزیولوژیک بسیاری از سیستم‌ها در کاهش این رفتارها نقش موثری دارد. ورزش از طریق کاهش استرس اکسیداتیو (12)، بهبود عملکرد میانجی‌های عصبی مانند سروتونین (13) و نور آدرنالین (14) و BDNF (15) و عملکرد محور HPA (16) می‌تواند به کاهش رفتارهای اضطرابی کمک کند. در برخی مطالعات حیوانی نظرات متناقضی در مورد تأثیر ورزش بر اضطراب وجود دارد (12، 35). در حالی که گروهی دیگر اثر استرس‌زای

ورزش را بیان نموده‌اند (36). در مطالعاتی مشابه و هم راستا با مطالعه ما، نیز اثر ورزش تردمیل بر کاهش رفتارهای اضطرابی و افزایش بیان BDNF در هیپوکمپ مشاهده شد (22). یافته‌های ما در این مطالعه هم راستا با مطالعات حیوانی است که نشان داده استفاده از ورزش تردمیل و فلوکستین اثر ضد اضطراب دارند (37، 38). مطالعه مقاطع بافتی گروه‌های ورزشی در مطالعه ما نیز تاییدکننده اثر ورزش در کاهش آسیب بافتی در ناحیه هیپوکمپ می‌باشد.

مطالعه ما نشان داد که ورزش به صورت توأم با فلوکستین در کاهش اضطراب القاشده توسط SPS مؤثر بودند. تأثیر فلوکستین بر اضطراب کم‌تر از ورزش و درمان توأم ورزش و فلوکستین بود. در رت‌های ماده، تأثیر توأم دو مداخله بر متغیرهای NR، TLC و NC بیش از حیوانات نر بود. در مقایسه دو جنس، پاسخگویی بهتر جنس مؤنث به مداخله‌های دارویی و ورزش دیده شد که این مشاهده همسو با مطالعه محققین دیگر بود (38).

در مطالعه موجود رت‌های نر در گروه SPS آسیب طولانی مدت حافظه موقعیتی را نشان دادند. این یافته‌ها هم‌راستا با مطالعه‌ای است که نشان داد SPS به حافظه فضایی رت‌ها آسیب می‌زند (18، 24، 39). Ji و Goswami نیز نشان داده‌اند که بیماران PTSD، هیپوکمپ کوچک‌تری داشته و آسیب در حافظه کاری و دیگر مهارت‌های مرتبط با هیپوکمپ را نشان می‌دهند (40، 41).

در این مطالعه، مشاهده شد که در گروه SPS رت‌های نر، با توجه به آسیب هیپوکمپ به دلیل استرس اعمال شده، فقط به مداخله توأم پاسخ داده شد. ورزش ارادی و غیرارادی باعث افزایش حافظه فضایی و شناختی در جوندگان بالغ می‌شود و با تغییرات نوروپلاستیستی در نواحی مختلف مغز بر اشکال مختلف یادگیری و حافظه تأثیر می‌گذارند (44-42). هم راستا با مطالعه ما بیان شده است که ورزش تردمیل باعث کاهش آسیب حافظه و رفتارهای هیجانی پس از PTSD می‌شود و این عمل را از طریق افزایش تکثیر

توام در بهبود حافظه نقش داشت (48,25). مطالعه بر روی مدل‌های حیوانی تاثیر فاکتورهای بیولوژیکی را در زمینه پاسخگویی متفاوت دو جنس به استرس نشان داده است (49).

در مجموع، بر اساس نتایج به دست آمده رت‌های نر نسبت به رت‌های ماده واکنش شدیدتری به SPS بروز دادند، حتی ممکن است مدل‌های حیوانی موجود برای رت‌های ماده مناسب نباشند و رت‌های ماده به طور متفاوتی این استرس‌ها را درک می‌کنند، بنابراین گسترش پروتکل‌های رفتاری جدید برای ارزیابی تغییرات رفتاری در جنس مؤنث پس از مواجهه با استرس، مورد نیاز است.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مستخرج از پایان‌نامه مصوب به شماره 3194 متعلق به دانشجوی رشته پزشکی خانم مهنوش به نیا می‌باشد که از محل معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران (مرکز تحقیقات ایمونونوتیک) تامین اعتبار شده است و دارای کد اخلاق به شماره IR.MAZUMS.REC.1398.1070 می‌باشد.

سلولی در هیپوکمپ انجام می‌دهد (46,45). در رت‌های ماده، SPS باعث آسیب به حافظه فضایی نشد و مداخله‌های انجام شده بر روی رت‌های SPS نیز تأثیر معناداری بر بهبود حافظه فضایی نداشت. در گروه Sham ورزش و فلوکستین باهم قادر به بهبود حافظه فضایی شدند و هیچیک از این دو فاکتور به تنهایی اثر معنی‌داری بر بهبود حافظه فضایی در گروه Sham نداشتند. در مقایسه بین رت‌های نر و ماده، تنها اختلاف مشاهده شده، آسیب بیش‌تر حافظه فضایی در رت‌های نر در مقایسه با رت‌های ماده تحت تأثیر SPS بود. Conrad نیز اثر استرس حاد را بر روی حافظه فضایی در رت‌های نر و ماده بررسی نمود و نشان داد که استرس حاد باعث آسیب حافظه فضایی در رت‌های نر می‌شود، در حالی که باعث بهبود این شکل از حافظه در رت‌های ماده می‌گردد، اثرات متفاوت استرس بر روی حافظه در دو جنس مختلف با میزان استروئیدهای تخمدانی در طی فازهای مختلف سیکل استروس ارتباط دارد (47). در مطالعه شفیعاً نیز SPS منجر به آسیب حافظه شناختی و حافظه فضایی مرتبط با هیپوکمپ در تست T-maze در رت‌های نر شد و ورزش و داروی فلوکستین به صورت

References

1. Seo JH, Park HS, Park SS, Kim CJ, Kim DH, Kim TW. Physical exercise ameliorates psychiatric disorders and cognitive dysfunctions by hippocampal mitochondrial function and neuroplasticity in post-traumatic stress disorder. *Experimental neurology* 2019; 322(113043).
2. Jia Y, Han Y, Wang X, Han F. Role of apoptosis in the post-traumatic stress disorder model-single prolonged stressed rats. *Psychoneuroendocrinology* 2018; 95: 97-105.
3. Tseilikman V, Komelkova M, Lapshin M, Alliluev A, Tseilikman O, Karpenko M, et al. High and low anxiety phenotypes in a rat model of complex post-traumatic stress disorder are associated with different alterations in regional brain monoamine neurotransmission. *Psychoneuroendocrinology* 2020; 117: 104691.
4. Hendriksen H, Olivier B, Oosting RS. From non-pharmacological treatments for post-traumatic stress disorder to novel therapeutic targets. *European Journal of Pharmacology*. 2014; 732: 139-158.
5. Meiser-Stedman R, McKinnon A, Dixon C, Boyle A, Smith P, Dalgleish T. A core role for cognitive processes in the acute onset and maintenance of post-traumatic stress in children and adolescents. *J Child Psychol*

- Psychiatry 2019; 60(8): 875-884.
6. Lee B, Lee H. Systemic administration of curcumin affect anxiety-related behaviors in a rat model of posttraumatic stress disorder via activation of serotonergic systems. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2018; 2018: 12.
 7. Vancampfort D, Richards J, Stubbs B, Akello G, Gbiri CA, Ward PB, et al. Physical activity in people with posttraumatic stress disorder: A systematic review of correlates. J Phys Act Health 2016; 13(8): 910-918.
 8. Albrechet-Souza L, Schratz CL, Gilpin NW. Sex differences in traumatic stress reactivity in rats with and without a history of alcohol drinking. Biol Sex Differ 2020; 27: 1-11.
 9. Lee B, Choi GM, Sur B. Silibinin prevents depression-like behaviors in a single prolonged stress rat model: the possible role of serotonin. BMC Complement Med Ther 2020; 20(70): 1-12.
 10. Malivoire BL, Girard TA, Patel R, Monson CM. Functional connectivity of hippocampal subregions in PTSD: relations with symptoms. BMC Psychiatry 2018; 18(1): 129.
 11. Pooley AE, Benjamin RC, Sreedhar S, Eagle AL, Robison AJ, Mazei-Robison MS, et al. Sex differences in the traumatic stress response: PTSD symptoms in women recapitulated in female rats. Biol sex differ 2018; 9(1): 31.
 12. 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. Behav Brain Res 2010; 208(2): 545-552.
 13. Greenwood BN, Kennedy S, Smith TP, Campeau S, Day H, Fleshner M. Voluntary freewheel running selectively modulates catecholamine content in peripheral tissue and c-Fos expression in the central sympathetic circuit following exposure to uncontrollable stress in rats. Neuroscience 2003; 120(1): 269-281.
 14. Stranahan AM, Zhou Y, Martin B, Maudsley S. Pharmacomimetics of exercise: novel approaches for hippocampally-targeted neuroprotective agents. Curr med chem 2009; 16(35): 4668-4678.
 15. Li Y, Luikart BW, Birnbaum S, Chen J, Kwon C-H, Kernie SG, et al. TrkB regulates hippocampal neurogenesis and governs sensitivity to antidepressive treatment. Neuron 2008; 59(3): 399-412.
 16. Droste SK, Schweizer MC, Ulbricht S, Reul J. Long-Term Voluntary Exercise and the Mouse Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Axis: Impact of Concurrent Treatment with the Antidepressant Drug Tianeptine. J neuroendocrinol 2006; 18(12): 915-925.
 17. Hendriksen H, Prins J, Olivier B, Oosting RS. Environmental enrichment induces behavioral recovery and enhanced hippocampal cell proliferation in an antidepressant-resistant animal model for PTSD. PLoS One 2010; 5(8): e11943.
 18. Patki G, Li L, Allam F, Solanki N, Dao AT, Alkadhi K, et al. Moderate treadmill exercise rescues anxiety and depression-like behavior as well as memory impairment in a rat model of posttraumatic stress disorder. Physiol Behav 2014; 130: 47-53.
 19. Han F, Xiao B, Wen L, Shi Y. Effects of fluoxetine on the amygdala and the hippocampus after administration of a single prolonged stress to male Wistar rats: In vivo proton magnetic resonance spectroscopy findings. Psychiatry Res 2015; 232(2): 154-161.
 20. Belovicova K, Bogi E, Csatosova K, Dubovicky M. Animal tests for anxiety-like and depression-like behavior in rats. Interdiscip Toxicol 2017; 10(1): 40-43.

21. Wang W, Li S, Dong H-p, Lv S, Tang Y-y. Differential impairment of spatial and nonspatial cognition in a mouse model of brain aging. *Life Sciences* 2009; 85(3): 127-135.
22. Hoffman JR, Ostfeld I, Kaplan Z, Zohar J, Cohen H. Exercise Enhances the Behavioral Responses to Acute Stress in an Animal Model of PTSD. *Medicine and science in sports and exercise* 2015;47(10): 2043-2052
23. Su AS, Zhang JW, Zou J. The anxiolytic-like effects of puerarin on an animal model of PTSD. *Biomed Pharmacother* 2019; 115: 108978.
24. Tanaka K-I, Yagi T, Nanba T, Asanuma M. Application of single prolonged stress induces post-traumatic stress disorder-like characteristics in mice. *Acta Medica Okayama* 2018; 72(5): 479-85.
25. 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.
26. MacQueen GM, Campbell S, McEwen BS, Macdonald K, Amano S, Joffe RT, et al. Course of illness, hippocampal function, and hippocampal volume in major depression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(3): 1387-1392.
27. Woon FL, Sood S, Hedges DW. Hippocampal volume deficits associated with exposure to psychological trauma and posttraumatic stress disorder in adults: a meta-analysis. *Prog NeuroPsychopharmacol Biol Psychiatry* 2010; 34(7): 1181-1188.
28. McEwen BS. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev* 2007; 87(3): 873-904.
29. Hughes KC, Shin LM. Functional neuroimaging studies of post-traumatic stress disorder. *Expert Rev Neurother* 2011; 11(2): 275-285.
30. Charney DS, Woods SW, Goodman WK, Heninger GR. Serotonin function in anxiety. *Psychopharmacology* 1987; 92(1): 14-24.
31. Dey S, Singh RH, Dey P. Exercise training: significance of regional alterations in serotonin metabolism of rat brain in relation to antidepressant effect of exercise. *Physiol Behav* 1992; 52(6): 1095-1099.
32. Wang W, Liu Y, Zheng H, Wang HN, Jin X, Chen YC, et al. A modified single-prolonged stress model for post-traumatic stress disorder. *Neurosc Lett* 2008; 441(2): 237-241.
33. Lee H, Kim J, Yim S, Kim M, Kim S, Kim Y, et al. Fluoxetine enhances cell proliferation and prevents apoptosis in dentate gyrus of maternally separated rats. *Mol psychiatry* 2001; 6(6): 725-728.
34. Huang M, Liang Y, Chen H, Xu B, Chai C, Xing P. The role of fluoxetine in activating Wnt/ β -catenin signaling and repressing β -amyloid production in an Alzheimer mouse model. *Front Aging Neurosci* 2018; 10: 164.
35. Binder E, Droste SK, Ohl F, Reul JM. Regular voluntary exercise reduces anxiety-related behaviour and impulsiveness in mice. *Behav Brain Res* 2004; 155(2): 197-206.
36. Cacciaglia R, Krause-Utz A, Vogt MA, Schmahl C, Flor H, Gass P. Voluntary exercise does not ameliorate context memory and hyperarousal in a mouse model for post-traumatic stress disorder (PTSD). *The World Journal of Biological Psychiatry* 2013; 14(5): 403-409.
37. Burghardt PR, Fulk LJ, Hand GA, Wilson MA. The effects of chronic treadmill and

- wheel running on behavior in rats. *Brain Res* 2004; 1019(1-2): 84-96.
38. 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. *Behav Brain Res* 2015; 287: 182-186.
 39. Abush H, Akirav I. Cannabinoids ameliorate impairments induced by chronic stress to synaptic plasticity and short-term memory. *Neuropsychopharmacology* 2013; 38(8): 1521-1534.
 40. Ji L-L, Tong L, Xu B-K, Fu C-H, Shu W, Peng J-B, et al. Intra-hippocampal administration of ZIP alleviates depressive and anxiety-like responses in an animal model of posttraumatic stress disorder. *Behav Brain Funct* 2014; 10(1): 28.
 41. Goswami S, Samuel SK, Rodríguez Sierra O, Cascardi M, Paré D. A rat model of post-traumatic stress disorder reproduces the hippocampal deficits seen in the human syndrome. *Front Behav Neurosci* 2012; 6: 1-8.
 42. Vivar C, Potter MC, van Praag H. All about running: synaptic plasticity, growth factors and adult hippocampal neurogenesis. *Curr Top Behav Neurosci* 2013; 15: 189-210.
 43. Ang ET, Dawe GS, Wong PT, Moolchala S, Ng Y-K. Alterations in spatial learning and memory after forced exercise. *Brain Res* 2006; 1113(1): 186-193.
 44. Liu YF, Chen Hi, Wu CL, Kuo YM, Yu L, Huang AM, et al. Differential effects of treadmill running and wheel running on spatial or aversive learning and memory: roles of amygdalar brain-derived neurotrophic factor and synaptotagmin I. *J Physiol* 2009; 587(Pt 13): 3221-3231.
 45. Kim BK, Seo JH. Treadmill exercise alleviates post-traumatic stress disorder-induced impairment of spatial learning memory in rats. *J Exerc Rehabil* 2013; 9(4): 413-419.
 46. Sun L, Cui K, Xing F, Liu X. Akt dependent adult hippocampal neurogenesis regulates the behavioral improvement of treadmill running to mice model of post-traumatic stress disorder. *Behav Brain Res* 2020; 379: 112375.
 47. Conrad CD, Jackson JL, Wiczorek L, Baran SE, Harman JS, Wright RL, et al. Acute stress impairs spatial memory in male but not female rats: influence of estrous cycle. *Pharmacol Biochem Behav* 2004; 78(3): 569-579.
 48. Shafia S, Vafaei AA, Rashidy Pour A. Effects of Moderate Treadmill Exercise and Fluoxetine on Spatial Memory and Serum BDNF Levels in an Animal Model of Post-traumatic Stress Disorder. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2019; 29(179): 1-17 (Persian).
 49. Bangasser DA, Valentino RJ. Sex differences in stress-related psychiatric disorders: neurobiological perspectives. *Front Neuroendocrinol* 2014; 35(3): 303-319.