علوم زیستی ورزشی - بهار ۱۳۹۸
دورهٔ ۱۱، شمارهٔ ۱، ص: ۸۱ - ۶۳
تاریخ دریافت : ۱۷ / ۰۸ /۹۶
تاریخ پذیرش : ۲۹ / ۰۸/ ۹۷

تأثیر چهار هفته تمرین ورزشی داوطلبانه بر رفتار شبه‌افسردگی ناشی از استرس دوران کودکی و استرس اکسیداتیو موش‌های صحرایی

ابوالفضل جعفرزاده باغان [۱] – مقصود پیری [*۲] – محمدعلی آذربایجانی [۳]

۱. دانشجوی دکتری بیوشیمی و متابولیسم ورزشی، دانشکدهٔ تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، تهران، ایران ۲. استاد گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکدهٔ تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران ۳. استاد گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکدهٔ تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران

چکیده

هدف پژوهش حاضر بررسی تأثیر چهار هفته دویدن اختیاری روی چرخ دوی گردان در دوران نوجوانی بر رفتار افسردگی و تأثیر آن بر میزان استرس اکسیداتیو در مخچه است. به همین منظور ۲۴ سر موش نر به‌صورت تصادفی به سه گروه کنترل، جداشده از مادر (MS) و جداشده از مادر و دویدن اختیاری (MS+RW) تقسیم شدند. موش‌های گروه MS و MS+RW از روز دوم پس از تولد تا روز چهاردهم به مدت ۱۸۰ دقیقه از مادرشان جدا شدند. سپس آزمودنی‌ها به‌صورت چهارتایی تا روز بیست‌وهشتم در قفس نگهداری شدند. گروه MS+RW از روز بیست‌وهشتم به چرخ گردان به‌صورت ۲۴ ساعت شبانه‌روز دسترسی داشت. در روز شصتم بعد از تولد رفتارهای افسردگی به‌وسیلهٔ آزمون‌هایFST ، SPT، OPT، و Splash test ارزیابی شد. بیومارکر استرس اکسیداتیو که شامل میزان ROS میتوکندریایی در بافت مخچه بود نیز اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد دویدن اختیاری به‌طور معناداری رفتارهای شبه‌افسردگی ناشی از استرس جداسازی از مادر را خنثی کرد و استرس اکسیداتیو را کاهش داد. همچنین نتایج نشان داد دویدن اختیاری می‌تواند به‌عنوان روش درمانی غیردارویی برای اختلالات افسردگی مفید باشد.

واژه‌های کلیدی

استرس اکسیداتیو، استرس اولیهٔ دوران زندگی، دویدن اختیاری، رفتار شبه‌افسردگی.

* نویسندهٔ مسئول : تلفن:۰۹۱۲۱۱۲۴۴۳۴ Email: m.peeri@iauctb.ac.ir

مقدمه

امروزه اختلالات استرس و اضطراب از بیماری‌های شایع با شیوع بالاست (۱). استرس حالت متعادل بدن را از طریق آبشاری از واکنش‌های فیزیولوژیکی تطبیقی، در تلاش برای حفظ هموستاز تغییر می‌دهد (۲). مقدار این واکنش‌های فیزیولوژیکی به نوع و مدت زمان استرس ایجادشده بستگی دارد. وقتی مدت زمان استرس طولانی شود، ممکن است بدن نتواند واکنش‌های تطبیقی مناسب نشان دهد و به افزایش فعالیت محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال منجر می‌شود، در نتیجه موجب ایجاد اختلالاتی مانند اضطراب و افسردگی در ادامه زندگی می‌شود (۳).

نتیجهٔ پژوهشی نشان داد که ناملایمات اوایل زندگی در توسعهٔ اختلالات روحی در انسان و جوندگان نقش مهمی داشت (۴). در تحقیقات اخیر جدایی از مادر در مراحل اولیهٔ زندگی به‌عنوان مدل حیوانی معتبر برای بررسی رفتارهای شبه‌افسردگی در جوندگان استفاده شده است (۶، ۵). یکی از موارد استرس‌زا که در دورهٔ شیرخوارگی ایجاد می‌شود، استرس جدایی از مادر است. جدایی از مادر ممکن است موجب افزایش پاسخ غدهٔ آدرنال و افزایش ترس در بزرگسالی شود (۷). همچنین جدایی از مادر موجب برهم خوردن برخی از روابط مادر و فرزندی مانند لمس، گرما، لیسیدن و مکیدن شیر می‌شود (۸). این تغییرات در طول زمان به تغییر رفتار و بر هم خوردن سیستم عصبی خودکار و غدد منجر می‌شود و فرایند رشد نوزاد را مختل می‌کند (۷، ۳). بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند جدایی بچه موش از مادر در اوایل زندگی توانایی آنها برای پاسخ به عوامل استرس‌زا را در بزرگسالی تغییر می‌دهد. بچه موش‌هایی که از روز بعد از تولد به مدت ۳ ساعت در هر روز از مادران خود جدا می‌شوند، و پس از آن در معرض یک عامل استرس‌زا قرار می‌گیرند، به‌طور چشمگیری با کاهش سطوح ACTH[1] و کورتیکواسترون ناشتای پلاسما نسبت به گروه کنترل مواجهند (۹). همچنین فعالیت حرکتی آنها کاهش یافت و دارای اضطراب یا رفتار ترس‌مانند بیشتری نسبت به گروه کنترل بودند (۱۰، ۹). از سوی دیگر، محققان عقیده دارند که اختلال در عملکرد میتوکندری به‌سبب نقش مهم آن در برخی اعمال حیاتی سلول مانند سوخت‌وساز انرژی، پاسخ به گلوکوکورتیکوئیدها و تولید گونه‌های فعال اکسیژن[2] (ROS) احتمالاً از دلایل ایجاد اختلال افسردگی ماژور[3]است (۱۱، ۶). برخی محققان احتمال می‌دهند یکی از مکانیسم‌های درگیر در واکنش‌های

1. Adrenocorticotropic hormone
2. Reactive oxygen species
3. Major Depressive Disorder

فیزیولوژیکی به استرس، عملکرد میتوکندریایی است. براساس تحقیقات این گروه از محققان استرس مزمن، تولید بیش‌ازحد نیترواکساید را در پی دارد و ممکن است عملکرد زنجیرهٔ تنفسی میتوکندری را مهار کند و به استرس اکسیداتیو منجر شود (۱۲). وقتی تولید رادیکال‌های آزاد مانند ROS توسط میتوکندری بیش از توان سلول‌های عصبی برای خنثی‌سازی آنها باشد، ممکن است موجب اختلال در عملکرد میتوکندری، و مرگ عصب‌ها و در نهایت اختلالات عصبی شود (۱۳).

از سوی دیگر اثرات ضد افسردگی ورزش در مطالعات بالینی و حیوانی از مسیرهای متفاوتی بررسی شده است. تحقیقات نشان داده‌اند که ورزش احتمالاً با افزایش بیان و تولید فاکتور رشد نورونی مشتق‌شده از مغز[1](BDNF)، موجب کاهش فاکتورهای التهابی، افزایش میزان فعالیت سیستم سروتونرژیک و کاهش استرس اکسیداتیو می‌شود که اثرات ضد افسردگی دارد (۱۴). در این زمینه نتایج مطالعات نشان داد که ورزش و فعالیت بدنی در دوران بلوغ تأثیرات مفیدی در تعدیل رفتارهای شبه‌افسردگی ناشی از استرس اوایل زندگی دارد (۱۵، ۵). پاتکی[2]و همکاران (۲۰۱۴) نیز ثابت کرد که ورزش‌های اختیاری و اجباری می‌تواند رفتارهای شبه‌افسردگی در جوندگان را کاهش دهد (۱۶). از سوی دیگر نتایج پژوهشی حکایت از عدم تأثیر مطلوب ورزش در این زمینه دارد (۵). نتایج برخی تحقیقات نیز بیانگر آن است که ورزش‌های هوازی، پراکسیداسیون چربی و آسیب اکسیداتیو به DNA و پروتئین را با افزایش سطح دفاع آنتی‌اکسیدان درونی مانند گلوتاتیون افزایش می‌دهد (۱۷، ۱۴).

سومانی[3]و همکاران (۱۹۹۶) در تحقیقی که بخش‌های مختلفی از مغز را بررسی می‌کرد، نشان دادند که پس از ورزش اجباری تردمیل، میزان آنتی‌اکسیدان‌ها در قشر مغز و هیپوکامپ افزایش یافت، ولی میزان آن در مخچه کاهش یافت، و در مدولا و جسم مخطط مغز بدون تغییر ماند (۱۸). در همین زمینه بروکاردو[4]و همکاران (۲۰۱۲)گزارش کردند که ورزش به‌طور چشمگیری موجب آسیب اکسیداتیو ناشی از اتانول به چربی‌ها را در شکنج دندانه‌دار[5]هیپوکامپ افزایش می‌دهد، درحالی‌که موجب کاهش سطح پراکسیداسیون لیپیدی در مخچه می‌شود (۱۹). حال با توجه به برخی تناقضات بیان‌شده در تحقیقات گذشته و اینکه پژوهش‌های قبل، اطلاعات اندکی از تأثیر ورزش اختیاری در دوران نوجوانی بر روی رفتار

1. Brain-Derived Neurotrophic Factor
2. Patki
3. Somani
4. Brocardo
5. Dentate gyrus

افسردگی ناشی از استرس دوران کودکی و تأثیر آن در میزان استرس اکسیداتیو مخچه در اختیار ما قرار داده است، ازاین‌رو هدف از این پژوهش تعیین تأثیر استرس جدایی از مادر بر بروز رفتارهای شبه‌افسردگی و نقش ورزش اختیاری در دوران نوجوانی بر روی رفتار افسردگی ناشی از استرس دوران کودکی و یافتن تأثیر آن در میزان استرس اکسیداتیو مخچه در موش‌های صحرایی نر ویستار بود.

روش‌شناسی

در این تحقیق تجربی و آزمایشگاهی ۱۰ موش مادهٔ باردار نژاد ویستار از انستیتو پاستور خریداری و به‌طور جداگانه در قفس نگهداری شد (مرکز نگهداری از حیوانات گروه فیزیولوژی ورزش، واحد تهران مرکز دانشگاه آزاد اسلامی). پس از وضع حمل، ۲۴ بچه موش نر به‌عنوان آزمودنی‌های تحقیق انتخاب شدند. از این تعداد ۸ موش به‌صورت تصادفی در گروه کنترل سالم قرار گرفتند و تعداد ۱۶ بچه موش از روز دوم تولد تا روز چهاردهم به مدت ۱۸۰ دقیقه از مادرشان جدا شدند. سپس در روز بیست‌ویکم این موش‌ها برای تعیین دو گروه MS (جداشده از مادر) و MS+RW (جداشده از مادر + ورزش داوطلبانه)، به‌صورت تصادفی به دو گروه ذکرشده تقسیم شدند و به‌صورت چهارتایی تا روز بیست‌وهشتم در قفس نگهداری شدند. در طول تحقیق، حیوانات به‌صورت گروه‌های چهار سر موش در قفس‌های پلی‌اتیلنی ۱۵×۱۵×۳۰ ساخت شرکت رازی راد، دمای۲°C± ۲۲و رطوبت ۵±٪۵۰ در شرایط کنترل‌شده نور (۱۲ ساعت تاریکی : ۱۲ ساعت روشنایی) نگهداری شدند و آزادانه به آب و غذای استاندارد (۱۰ گرم به ازای ۱۰۰گرم وزن بدن) ساخت شرکت بهپور به شکل پلت دسترسی داشتند. در انتهای تحقیق رت‌ها تحت آزمون‌های رفتاری و فیزیولوژیکی قرار گرفتند. وزن موش‌ها هنگام آزمون‌ها بین ۲۸۰ تا ۳۰۰ گرم بود. پروتکل تجربی براساس دستورالعمل انستیتوی ملی سلامت (NIH)[1]که برای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی است، انجام گرفت (NIH publication # 80-23).

پروتکل تمرینی چرخ گردان جوندگان

پیش از اجرای پروتکل تمرینی، در روز بیست‌ویکم، گروه تجربی MS+RW به مدت یک هفته با چرخ گردان مخصوص جوندگان آشنا شدند. سپس به مدت ۳۲ روز تا روز شصتم، دو موش در هر قفس با چرخ گردان جوندگان قرار گرفت. در طول تمرین هر موش فقط به چرخ گردان خود دسترسی داشت (برای

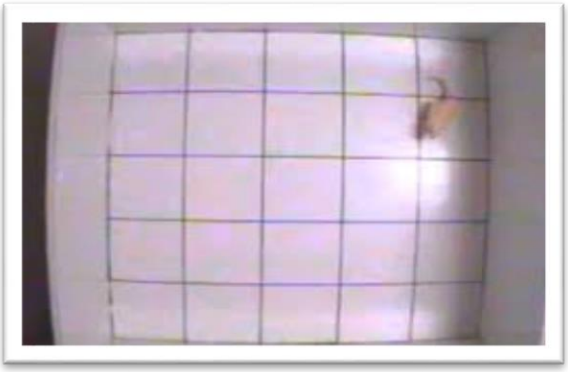
1. National Institutes of Health

جلوگیری از استرس انزوای اجتماعی بین دو موش یک ورق شیشه‌ای پلکسی گلس منفذدار قرار داده شد). هر چرخ گردان از پلکسی گلس ساخته شده بود (محیط= ۱۰۵cm، طول=۱۰cm ، نویدان طب، ایران) و به‌راحتی با مقاومت ۵g می‌چرخید. هر چرخ به یک کلید مغناطیسی که به شمارشگری که بیرون قفس حیوان قرار داشت، و تعداد چرخش را نشان می‌داد، وصل شده بود. موش‌های صحرایی به‌راحتی به چرخ گردان جوندگان به‌صورت ۲۴ ساعته و به مدت ۳۲ روز تا روز شصتم دسترسی داشتند و مقدار مسافت دویدن آنها روزانه و به‌صورت متر گزارش و ثبت می‌شد (۲۰).

تست‌های رفتاری (behavioral tests)

آزمون جعبه باز (Open Field Test (OFT

برای سنجش و بررسی تأثیرات نگهداری و درمان بر روی فعالیت حرکتی، استرس، ثبات احساسی جوندگان و همچنین معتبرسازی نتایج تست شنای اجباری از این تست استفاده شد (۲۰). ابزار آزمون جعبه باز از جنس پلاستیک رزینی مات و در ابعاد ۶۰ × ۶۰ × ۴۰ سانتی‌متر است و کف آن به ۲۵ مربع مساوی تقسیم شده است (شکل ۱).



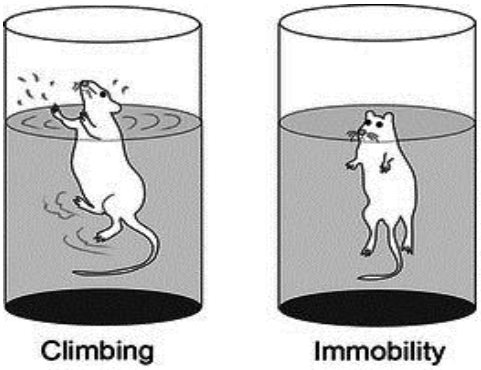
شکل ۱. ابزار مورد استفاده در تست جعبه باز

هنگام آزمایش موش‌ها در گوشه جعبه قرار گرفتند و رفتار و حرکات آنها به مدت ۵ دقیقه داخل جعبه ضبط شد. سطح داخلی جعبه و دیواره‌ها بعد از هر بار آزمایش و قبل از ورود موش جدید با اتانول ۷۰٪ به‌طور کامل ضدعفونی شد. با توجه به اینکه هدف از این تست، بررسی فعالیت دوپامینرژیک بود، صرفاً تعداد واحدهای حرکتی حیوان که همان عبور و حرکت افقی به‌طور کامل و با هر چهار عضو حرکتی

از یک مربع به مربع دیگر بود و تعداد حرکات عمودی به‌صورت ایستادن بر روی دو پا[1] محاسبه و ارزیابی شد (۲۰).

آزمون شنا اجباری Forced Swimming Test (FST)

به‌منظور ارزیابی رفتار افسردگی در جوندگان از این تست استفاده می‌شود. در این آزمون هر یک از رت‌ها به‌تنهایی درون محفظه یا سیلندر استوانه‌ای‌شکل از جنس شیشه با ارتفاع ۵۰ سانتی‌متر و قطر ۲۰ سانتی‌متر قرار گرفتند (شکل ۲).



شکل ۲. ابزار مورد استفاده در تست شنای اجباری

سیلندر با آب تمیز دارای دمای ۱± ۲۳ سانتی‌گراد و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر پر شده بود. برای انجام این تست رت‌ها ۲۴ ساعت قبل از تست اصلی به مدت ۱۵ دقیقه درون سیلندر آب قرار گرفتند. در روز تست رت‌ها به مدت ۵ دقیقه در سیلندر قرار گرفتند و رفتار آنها در این مدت با دوربین به‌طور کامل ضبط و بررسی شد (۲۱). در این تست زمان بی‌حرکتی معادل افسردگی ثبت شد؛ این رفتار در انسان معادل یأس و ناامیدی در نظر گرفته شده است. به همین دلیل فاکتوری که در این تست برای ما اهمیت داشت، مدت زمانی بود که حیوان بی‌حرکت و شناور بر روی آب قرار می‌گرفت، به‌صورتی که هیچ حرکتی، اعم از شنا یا تلاش برای بالا آمدن از استوانه، انجام نمی‌داد و تنها سرش بالای آب قرار داشت. این مدت به‌عنوان زمان بی‌حرکتی تلقی شد و به‌عنوان شاخصی برای آنالیز میزان ناامیدی و افسردگی استفاده شد (۲۱).

1. Rearing

Splash test

به‌منظور ارزیابی و سنجش سطوح فقدان احساس لذت، انگیزه و میزان پاسخ به پاداش ناشی از استرس و سختی مراقبت از خود در حیوانات از این تست استفاده شد. در این تست رت‌ها درون قفس قرار گرفتند و محلول ساکارز ۱۰درصد به ناحیهٔ پشتی (درسال) رت اسپری شد (۲۲). رفتار لیسیدن[1]ناحیهٔ پشتی می‌تواند به‌طور غیرمستقیم نشان‌دهندهٔ دلپذیری محلول اسپری‌شده به ناحیهٔ پشت، برای حیوان باشد، به‌طوری‌که حیوان افسرده، علاقه‌ای به لیسیدن محلول شیرین و تمیز کردن خود نشان نمی‌دهد، که نشانه‌ای از فقدان اهمیت به خود [2]است. در ضمن بی‌علاقگی به مزهٔ شیرین برابر با بروز رفتار فقدان احساس لذت در مدل‌های حیوانی مورد تأیید است. فاکتوری که در این تست برای ما اهمیت داشت، مدت زمان طی‌شده برای اولین لیسیدن و کل زمان سپری‌شده در حال لیسیدن در مدت ۵ دقیقه تست بود (۲۲).

آزمون ترجیح ساکارز[3](SPT)

در این تحقیق آزمون ترجیح ساکارز به‌منظور ارزیابی وضعیت لذت در حیوانات با استفاده از پروتکلی که قبلاً توسط والاس و همکاران (۲۰۰۹) توصیف شده است، استفاده شد (۲۳). در این آزمون، حیوانات با دو ظرف آب، که در قفس هر موش در دو روز اول قرار داده شد، آشنا شدند. یکی از دو بطری با یک بطری حاوی محلول ساکارز ۱ درصد در جریان روز دوم جایگزین شد. در روز تست، حیوانات از غذا و آب به مدت ۸ ساعت محروم بودند و پس از آن آزمون ترجیح ساکارز در طول یک ساعت مصرف مایع و با استفاده از دو بطری محلول ساکارز ۱ درصد و آب انجام گرفت. آزمون ترجیح ساکارز با استفاده از معادلهٔ زیر، که نسبت محلول ۱ درصد ساکارز مصرف‌شده به کل مایع مصرف‌شده را ارزیابی می‌کند، اندازه‌گیری شد (۲۳).

(ساکارز مصرف‌شده + آب مصرف‌شده) / ساکارز مصرف‌شده = ترجیح ساکاروز

جداسازی میتوکندری از مخچه

در آزمایش‌ها از موش صحرایی نژاد Wistar-albino در محدودهٔ وزنی ۳۰۰-۲۸۰ گرم که در شرایط استاندارد از نظر دسترسی به آب و غذا و سیکل ۱۲ ساعته روشنایی- تاریکی نگهداری می‌شدند، استفاده

1. Grooming
2. Self-care difficulties
3. Sucrose Preference Test

شد. حیوانات ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش‌ها ناشتا نگه داشته شدند (۲۴). سپس موش صحرایی را با تزریق کتامین ۷۵ mg/kg و زایلوزین ۱۵ mg/kg بی‌هوش کردند و بعد از باز کردن حفرهٔ شکمی و شکستن جمجمه، مغز حیوان به‌سرعت خارج شده و در بافر مانیتول سرد (مانیتول ۰/۲۵۵ M ، ساکاروز ۷۵ mM و EDTA ۰/۲ mM) شست‌وشو داده شدند. سپس بخش مخچه از مغز جدا شد (تمامی بافرها در این مراحل سرد است و تمامی مراحل در یخ انجام شد). سپس با قیچی بافت مخچه تکه‌تکه شده و با هموژنایزر دستی شیشه‌ای، بافت آنها هموژن شد. سپس بافت‌های هموژن‌شده به میکروتیوب‌ها انتقال داده شد و در سانتریفیوژ یخچال‌دار در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد، ابتدا با سرعت ۲۰۰۰g و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. بعد از اتمام زمان سانتریفیوژ، محلول رویی به‌آرامی به میکروتیوب‌های دیگر انتقال داده شد و رسوب زیرین که حاوی سلول‌های شکسته‌شده و هسته‌ها بود، دور ریخته شد. میکروتیوب‌های سری دوم با سرعت ۱۰۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و محلول رویی دور ریخته شد و رسوب ته لوله که حاوی میتوکندری بود، برحسب تست مورد آزمایش در بافر تریس یا تنفسی سرد پراکنده شد (۲۴).

اندازه‌گیری ROS با روش فلوسیتومتری

برای اندازه‌گیری ROS میتوکندریایی از معرف DCFH-DA استفاده شد. DCFH-DA غیریونی، غیرقطبی است و به‌راحتی از غشای میتوکندری عبور می‌کند و در داخل میتوکندری به‌وسیلهٔ استراز به DCFH غیر فلورسانس هیدرولیز می‌شود که به‌سرعت به‌وسیلهٔ ROS به محصول دارای فلورسانس به نام 2′,7′-dichlorofluorescein اکسید می‌شود. برای اندازه‌گیری ROS، میتوکندری‌ها در ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد در بافر تنفسی (ساکارز ۰/۳۲ mM، تریس ۱۰ mM، سوکسینات ۵ mM ، پتاسیم دی هیدروژن فسفات ۰/۱ mM، منیزیم کلراید ۰/۵ mM، EGTA μ ۵۰M و Mops ۲۰ mM) پراکنده شد. پس از اضافه کردن معرف DCFH-DA به هر نمونه به مدت ۱۰-۵ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه انجام گرفت. سپس در فواصل زمانی ۱۵ و ۶۰ دقیقه، جذب در طول موج λex =۴۸۵ nm و λem =۲۵۰ nm برای هر نمونه، با استفاده از دستگاه فلوسیتومتر خوانده شد (۲۵).

روش تهیهٔ DCFH-DA (۱۰ μM)

۴۳/۲ mg مادهٔ DCFH-DA را در یک سی‌سی بافر تنفسی حل کرده و در فریزر نگهداری می‌کنیم. برای هر بار استفاده می‌توان ۱۰۰ میکرولیتر از DCFH-DA را به ۵۰ سی‌سی بافر تنفسی اضافه کرد.

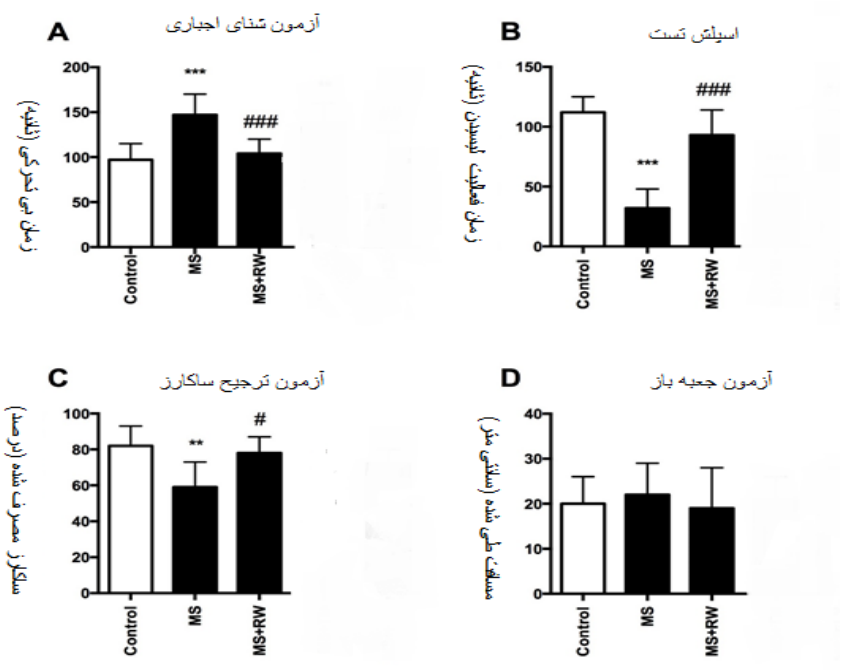
تجزیه‌وتحلیل آماری

پس از جمع‌آوری داده‌ها از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف برای بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌ها و آزمون one-way ANOVA با پست تست Tukey برای تحلیل یافته‌ها استفاده شد. آنالیزهای آماری با استفاده نرم‌افزار آماری Graph-pad prism انجام گرفت. حد معناداری به‌صورت P< ۰/۰۵، P< ۰/۰۱ و P< ۰/۰۰۱ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

اثر دویدن اختیاری بر روی رفتارهای ناشی از استرس جدایی از مادر اثر MS بر رفتارهای شبه‌افسردگی حیوانات در آزمون‌های FST،SPT، splash test وOFT تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس نشان داد که MS رفتارهای شبه افسردگی در حیوانات ایجاد می‌کند.

براساس نتایج به‌دست‌آمده از آزمون واریانس یکطرفه مشخص شد که تفاوت معناداری بین مشخصات رفتاری گروه‌های مختلف در آزمون‌هایFST (P<۰/۰۰۱ , شکل ۳ A)، اسپلش تست (P< ۰/۰۰۱، شکل ۳ B) و (P< ۰/۰۰۱ SPT شکل ۳ C) وجود دارد. با استفاده از آزمون تعقیبی توکی مشخص شد زمان بی‌حرکتی موش‌های گروه MS + RW در تست FST نسبت به گروه MS به‌طور معناداری کمتر بود (شکل ۳A)، P< ۰/۰۰۱ ، ۱۰/۴۳= (۳۵و۴) F و همچنین زمان نظافت (لیسیدن) گروه دویدن اختیاری (MS + RW) در آزمون اسپلش تست (شکل ۳B) ، (P<۰/۰۰۱ و ۳۰/۴۲ = (۳۵و۴) F و میزان مصرف محلول ساکارز در آزمون SPT به‌طور معناداری بیشتر از گروه MS بود (شکلC ۳) (P< /۰۰۱ و ۹/۰۷۱ = (۳۵و۴) F. . دربارهٔ آزمون OFT، پس از تحلیل نتایج با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یکطرفه و در پی آن آزمون تعقیبی توکی هیچ‌گونه تفاوت معناداری در فعالیت حرکتی سه گروه مشاهده نشد (شکل) (D ۳) (P<۰/۰۵ و ۰/۲۰۳۹ = (۳۵و۴) F.



شکل ۳. اثر دویدن اختیاری بر رفتارهای شبه‌افسردگی ناشی از ترس جدایی از مادر

اثر دویدن اختیاری در جدایی فرزند از مادر در دوران کودکی بر میزان تولید ROS

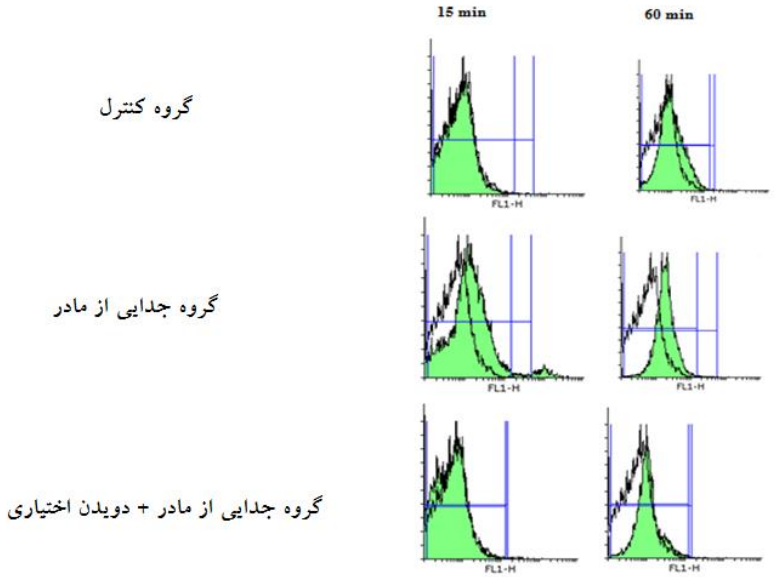
میتوکندری مهم‌ترین منبع تولید ROS به‌ویژه سوپراکساید داخل سلول است. برای اندازه‌گیری میزان تولید ROS از معرف DCFH-DA استفاده شد. DCFH-DA غیریونی، غیرقطبی است و به‌راحتی از غشای میتوکندری عبور می‌کند و در داخل میتوکندری به‌وسیلهٔ استراز به DCFH غیر فلورسانس هیدرولیز می‌شود که به‌سرعت از طریق هیدروژن پراکساید به محصول دارای فلورسانس به نام 2′,7′- dichlorofluorescein اکسید می‌شود. در روش فلوسیتومتری شیفت منحنی به سمت راست و افزایش سطح زیر منحنی به معنی افزایش تولید ROS است. همان‌طورکه در جدول ۱ نشان داده شده است، MS میزان تولید ROS را در زمان ۱۵ و ۶۰ دقیقه به‌طور معناداری افزایش داد، درحالی‌که در سایر گروه‌ها تفاوت معناداری نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد. به‌علاوه، گروه دویدن اختیاری توانستند به‌طور معناداری میزان تولید ROS را نسبت به گروه MS کاهش دهند که نشان‌دهندهٔ مهار استرس اکسیداتیو در میتوکندری‌های ایزوله‌شده در مخچه است.

جدول ۱. نتایج میزان تولید ROS میتوکندریایی بافت مخچه در زمان‌های ۱۵ دقیقه و ۶۰ دقیقه

گروه	تشکیل گونه های فعال اکسیژن (ROS) (٪)	
	۱۵ دقیقه	۶۰ دقیقه
گروه کنترل (C)	۷ ± ۴	۱۷ ± ۸
گروه جدایی از مادر (MS)	۲۳ ±**۶	۱۲۹ ± **۷*
گروه جدایی از مادر + ورزش اختیاری (MS+RW)	۵ ± ۲ ##	۲۰ ± ۵ ###

*: نشان‌دهندهٔ اختلاف معنادار با گروه کنترل است (P<۰/۰۵) ؛ **: نشان‌دهندهٔ اختلاف معنادار با گروه کنترل است (P<۰/۰۱) ؛ ***: نشان‌دهندهٔ اختلاف معنادار با گروه کنترل است (P<۰/۰۰۱) ؛ #: نشان‌دهندهٔ اختلاف معنادار با گروه MS است (P<۰/۰۵) ؛ ##: نشان‌دهندهٔ اختلاف معنادار با گروه MS است (P<۰/۰۱) ؛ ###: نشان‌دهندهٔ اختلاف معنادار با گروه MS است (P<۰/۰۰۱)

جدول ۲. گراف‌های مربوط به سنجش ROS توسط روش فلوسایتومتری در دو زمان مختلف



بحث

نتایج مطالعهٔ ما نشان داد استرس جدایی از مادر در مراحل اولیهٔ زندگی (MS) موجب بروز رفتارهای شبه‌افسردگی و همچنین استرس اکسیداتیو میتوکندری مخچهٔ رت‌ها می‌شود. همچنین تحقیق ما تأیید

می‌کند که دویدن اختیاری می‌تواند موجب بهبود رفتارهای شبه‌افسردگی در حیوانات شود و با استرس اکسیداتیو ناشی از MS مقابله کند. بر طبق فرضیهٔ منوآمینی که محققان در اوایل دههٔ ۱۹۵۰ بیان کردند، افسردگی در اثر کمبود مونوآمین‌ها به‌ویژه نورآدرنالین و سروتونین ایجاد می‌شود. مونوآمین‌ها یک‌سری از نوروترانسمیترها دارای گروه آمین هستند. در سطح مولکولی افسردگی به‌دلیل اختلال در ترانسمیترهای شیمیایی در مغز ایجاد می‌شود که این عوامل شیمیایی در کنترل خلق، حافظه، خواب و دیگر فعالیت‌های بدن نقش دارند. براساس این فرضیه داروهایی که مونوآمین را کاهش می‌دهند، در افسردگی نقش دارند و داروهایی که مونوامین‌ها را افزایش می‌دهند، موجب بهبود افسردگی می‌شوند. در حقیقت افسردگی به‌دلیل کمبود مونوآمین‌ها از جمله نوراپی نفرین، دوپامین و سروتونین ایجاد می‌شود (۱۲).

شواهد بسیاری نشان داد که حوادث استرس‌زا در مراحل اولیهٔ زندگی تأثیرات مخربی بر مغز و خلق‌وخو می‌گذارد (۲۶، ۴). همسو با نتایج ما، برخی مطالعات گزارش کردند MS می‌تواند رفتارهای شبه‌افسردگی در جوندگان ایجاد کند (۶، ۵). یکی از رفتارهای دارای علائم افسردگی در جوندگان افزایش زمان بی‌تحرکی در تست FST است (۲۱).

در این پژوهش دویدن اختیاری، زمان بی‌تحرکی رت‌هایی را که استرس جدایی از مادر را تجربه کرده بودند، کاهش داد. این نتایج ثابت کرد که دویدن اختیاری تأثیرات ضد افسردگی در موش‌ها می‌گذارد. همسو با تحقیقات گذشته (۲۷، ۶) نتایج پژوهش حاضر نشان داد که دویدن اختیاری توانست کاستی‌های فقدان حس لذت و انگیزشی را کاهش و شرایط حس لذت را افزایش دهد. همچنین در پژوهش دیگری بر روی رت‌های دارای افسردگی ناشی از جدایی از مادر، مشخص شد که دویدن اختیاری با رانینگ ویل در زمان بلوغ علائم افسردگی را کاهش می‌دهد (۱۵).

با ملاحظهٔ این نکته که برخی از تحقیقات گذشته عنوان کرد که تمرینات اجباری با توجه به ماهیت اجباری بودن و احتمالاً وجود عامل ناخوشایند شوک الکتریکی در حین تمرین در درمان رفتارهای شبه‌افسردگی مفید واقع نشدند (۵)، نتایج پژوهش حاضر و برخی نتایج تحقیقات دیگر بیان می‌کنند که تمرینات اختیاری و داوطلبانه با فواید بیشتری نسبت به تمرینات اجباری بر روی تردمیل می‌توانند به‌عنوان یک غنی‌ساز محیطی و درمان غیردارویی در رت‌های نوجوان مورد توجه قرار گیرند (۲۹، ۲۸). در این زمینه برخی مطالعات عنوان کردند که رفتار بازی در دورهٔ نوجوانی رت‌ها بروز می‌کند و در شکل‌گیری مدارهای عصبی مرتبط با انگیزش و رفتار اجتماعی نقش مهمی دارد (۳۰).

بر همین اساس احتمالاً دویدن داوطلبانه در این دوره می‌تواند با تأثیر بر خصوصیات رفتاری و فرایند شکل‌گیری اعصاب رت‌ها در برابر رویدادهای استرس‌زای اوایل زندگی آنها مقابله کند (۲۸، ۷). پیش از این برخی تحقیقات تفاوت بسیاری بین اثرات تمرینات اجباری و اختیاری بر روی خصوصیات رفتاری جوندگان را تأیید کردند (۳۱). با این حال یافته‌هایی نیز تأثیرات مثبت ورزش اجباری در برابر شرایط استرس‌زا را نشان دادند، ولی در این مورد به اثر ورزش اجباری در کاهش پاسخ استرس نسبت به عامل استرس‌زای جدید اشاره شد، از طرفی نباید فراموش کرد که دویدن اجباری بر روی تردمیل با استرس ناشی از شوک الکتریکی همراه است (۳۲، ۱۶). پس با توجه به اینکه جدایی از مادر با پاسخ‌های استرس اولیه در حیوانات همراه می‌شود، تمرینات اختیاری برخلاف دویدن اجباری بر روی تردمیل (۵) می‌تواند در کاهش رفتارهای شبه‌افسردگی کارساز باشد.

همچنین نتایج این پژوهش نشان داد که استرس اوایل زندگی ممکن است با برخی اختلالات در میتوکندری همچون ایجاد استرس اکسیداتیو همراه باشد. نتایج تحقیقات سال‌های اخیر نشان می‌دهد که استرس می‌تواند به عملکرد میتوکندری آسیب برساند و در ادامه با اختلال در عملکرد میتوکندری احتمالاً موجب ایجاد آسیب‌های ذهنی و روانی مانند افسردگی شود (۳۴، ۳۳، ۱۱). به گفتهٔ محققان ممکن است مغز در طول تکامل خود از شرایط استرس اکسیداتیو آسیب ببیند و کاهش انرژی موجب تشکیل تعداد زیادی از سلول‌های نابالغ، سطوح آنتی‌اکسیدان پایین و نیاز به انرژی بالا شود (۳۵). بر این اساس سطوح ROS میتوکندریایی مخچه ارزیابی شد و یافته‌ها نشان داد که MS می‌تواند موجب تولید بیشتر ROS میتوکندری مخچه موش‌ها شود.

آلانو[1] و همکاران (۲۰۰۷) در تحقیقی روی مغز و قلب ثابت کردند که در برابر استرس اکسیداتیو مغز حساسیت بیشتری نسبت به قلب دارد و دلیل آن را داشتن میتوکندری کمتر در آستروسیت‌ها نسبت به میوسیت‌ها عنوان کردند. همچنین سلول‌های عصبی سطوح بالاتری از NAD[2] و SDH[3] را نسبت به میوسیت‌ها دارند. به‌علاوه میوسیت‌ها برای تولید انرژی سوبستراهای گوناگونی همچون اسیدهای چرب آزاد، گلوکز و اسیدهای آمینه را برای تولید انرژی به‌کار می‌برد، درحالی‌که تولید انرژی در سلول‌های عصبی و آستروسیت‌ها تقریباً به‌طور کامل وابسته به وجود گلوکز است (۳۶).

1. Alano
2. Nicotinamide adenine dinucleotide
3. Succinate dehydrogenase

در این زمینه یافته‌های این پژوهش با نتایج سونه ای[1]و همکاران (۲۰۱۶) همسو بود که گزارش کردند اختلال در عملکرد میتوکندری در اندام‌هایی مثل مغز و قلب با افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش سطوح گلوتاتیون یا[2]GSH همراه است. این محققان با استناد به نتایج تحقیقشان احتمال دادند که تضعیف سیستم آنتی‌اکسیدانی با آسیب سلولی ناشی از ROS همراه است (۳۷). از سوی دیگر، برای تعیین تأثیرات ورزش بر سطوح ROS میتوکندریایی پس از افسردگی در این پژوهش اثر دویدن اختیاری مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد دویدن اختیاری می‌تواند از تولید بیش‌ازحد ROS در میتوکندری مخچهٔ رت‌ها جلوگیری کند. براساس نتایج تحقیقات گذشته، تأثیرات ضدالتهابی فعالیت ورزشی ممکن است از طریق مکانیسم‌های دخیل در ایجاد شرایط ضدالتهابی مانند کاهش جرم چربی احشایی و کاهش فیلتراسیون ماکروفاژها به بافت چرب، و ماکروفاژها، کاهش تعداد مونوسیت‌های پیش‌التهابی در خون، افزایش سلول‌های T تنظیمی در گردش خون و محدودیت حرکت سلول‌های تک‌هسته‌ای خون به بافت‌های چربی صورت گیرد. تأثیرات ضدالتهابی ورزش به‌طور گسترده‌ای مربوط به اثر مهاری آن بر روی استرس اکسیداتیو ناشی از نقص عملکرد میتو کندریایی است (۱۴). همچنین ورزش با افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مانع بروز آثار مخرب رادیکال‌های آزاد و تولید ساختارهای ناشی از آسیب سلولی[3](DAMPs) می‌شود (۱۴).

این یافته با نتایج اکسو[4]و همکاران (۲۰۰۹) همسو بود که گزارش کردند ورزش طولانی‌مدت احتمالاً با کاهش تشکیل رادیکال سوپراکسید دارای اثر مطلوب در هیپوکامپ است (۲۶). شایان ذکر است که در پژوهش موردنظر از تمرین اجباری استفاده شده بود. برخی تحقیقات اشاره کردند که ورزش به‌طور قابل توجهی آسیب اکسیداتیو به چربی‌ها را در شکنج دندانه‌دار[5]هیپوکامپ افزایش می‌دهد، درحالی‌که موجب کاهش سطح پراکسیداسیون لیپیدی در مخچه می‌شود (۱۹). دانشمندان مکانیسم احتمالی این موضوع را این‌طور بیان می‌کنند که ممکن است سلول‌های گرانول (که جمعیت عصبی اولیهٔ هر دو بخش شکنج دانه‌دار هیپوکامپ و مخچه را تشکیل می‌دهند) تا حدودی بیشتر مستعد ابتلا به استرس اکسیداتیو باشند. در ادبیات پیشین گزارش شده است که سلول‌های گرانول مخچه نسبت به دیگر انواع سلول‌های عصبی

1. Sonie
2. Glutathione
3. Damage associated molecular patterns
4. Aksu
5. dentate gyrus

دارای سطوح پایهٔ بالاتر گلوتاتیون (۳۸) هستند و آنها برخلاف سایر نورون‌ها میزان زیادی از گلوتاتیون را در دورهٔ بلوغ حفظ می‌کنند (۳۹). این امر نشان می‌دهد که احتمالاً سلول‌های گرانول مخچه برای عملکرد مطلوب به سطوح بالاتری از گلوتاتیون نیاز دارند و در نتیجه ممکن است بیشتر در معرض آسیب استرس اکسیداتیو باشند (۴۰).

بسیاری از شواهد نشان می‌دهد که ورزش‌های هوازی پراکسیداسیون چربی و آسیب اکسیداتیو به DNAو پروتئین را با افزایش سطح دفاع آنتی‌اکسیدان درونی مانند افزایش گلوتاتیون افزایش می‌دهد (۱۷، ۱۴). بروکاردو[1]و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که ورزش داوطلبانهٔ سطوح کاهش‌یافته گلوتاتیون مخچه و هیپوکامپ را به‌طور کامل بازگشت داده است. این محققان عنوان کرده‌اند احتمالاً فعالیت فیزیکی مانند دویدن به افزایش اشتها (مصرف پروتئین) منجر می‌شود، که خود می‌تواند به افزایش سطح اسیدهای آمینه (برای مثال، ال - سیستئین، ال -گلوتامیک اسید، و گلایسین) که برای سنتز گلوتاتیون در دسترس‌اند، منجر شود و این خود با افزایش این آنتی‌اکسیدان قوی موجب تعدیل میزان استرس اکسیداتیو خواهد شد (۱۹). همچنین با توجه به نقش محوری میتوکندری در تأمین ATP سلولی و تنظیم کلسیم درون‌سلولی، مشخص شد که اختلال عملکرد میتوکندریایی موجب اختلال در تولید ATP و در نهایت افزایش سیگنال‌های آپوپتوزی و مرگ سلولی می‌شود. ازاین‌رو، به‌عنوان یکی از عوامل مهم در ایجاد حفاظت عصبی معرفی شد (۴۱). فعالیت ورزشی عملکرد و میزان میتوکندری‌های مغز را تحت تأثیر قرار می‌دهد، در مطالعه‌ای نشان دادند که هشت هفته تمرین استقامتی، با افزایش بیان $\propto \boldsymbol{PGC-1}$[2]و SIRT1 mRNA[3] و افزایش محتوای DNA میتوکندریایی همراه بود که نشان‌دهندهٔ افزایش بیوژترمیتوکندریایی است (۴۱). این یافته‌ها در مجموع نشان می‌دهند که فعالیت ورزشی می‌تواند موجب افزایش بیوژتر میتوکندریایی و بهبود عملکرد میتوکندری‌های مغز شود. در تأیید نتایج تحقیق ما برخی پژوهش‌ها نشان دادند که ورزش سطوح آنتی‌اکسیدانی محیطی (۴۲) و مغزی را افزایش می‌دهد. این می‌تواند برابر آسیب استرس اکسیداتیو مفید واقع شود (۱۸).

1. Brocardo
2. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator
3. Silent information regulator T1 (SIRT1)

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج تحقیق حاضر می‌توان نتیجه گرفت دویدن اختیاری می‌تواند عوارض ناشی از استرس جدایی از مادر مانند رفتارهای شبه‌افسردگی را از طریق کاهش تولید رادیکال‌های آزاد و مهار استرس اکسیداتیو کاهش دهد و دویدن اختیاری می‌تواند به‌عنوان روش غیردارویی مفید در درمان افسردگی به‌تنهایی یا در کنار دارودرمانی استفاده شود.

قدردانی و تشکر

در پایان از تمامی دوستان و همکاران که طی مراحل این پژوهش یاری‌کنندهٔ ما بودند، صمیمانه سپاسگزاریم.

منابع و مآخذ

1. Costello EJ, Egger HL, Angold A. The developmental epidemiology of anxiety disorders: phenomenology, prevalence, and comorbidity. Child and Adolescent Psychiatric Clinics. 2005;14(4):631-48.
2. Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. Endocrinology of the stress response. Annu Rev Physiol. 2005;67:259-84.
3. Heim C, Newport DJ, Bonsall R, Miller AH, Nemeroff CB. Altered pituitary-adrenal axis responses to provocative challenge tests in adult survivors of childhood abuse. American Journal of Psychiatry. 2001;158(4):575-81.
4. Rao U, Chen L-A, Bidesi AS, Shad MU, Thomas MA, Hammen CL. Hippocampal changes associated with early-life adversity and vulnerability to depression. Biological psychiatry. 2010;67(4):357-64.
5. 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;163:177-83.
6. Marco EM, Llorente R, López-Gallardo M, Mela V, Llorente-Berzal Á, Prada C, et al. The maternal deprivation animal model revisited. Neuroscience & Biobehavioral Reviews. 2015;51:151-63.
7. Faure J, Uys JD, Marais L, Stein DJ, Daniels WM. Early maternal separation followed by later stressors leads to dysregulation of the HPA-axis and increases in hippocampal NGF and NT-3 levels in a rat model. Metabolic brain disease. 2006;21(2-3):172-9.
8. Hofer MA. Cardiac rate regulated by nutritional factor in young rats. Science. 1971;172(3987):1039-41.
9. Amini-Khoei H, Amiri S, Shirzadian A, Haj-Mirzaian A, Alijanpour S, Rahimi-Balaei M, et al. Experiencing neonatal maternal separation increased the seizure threshold in adult male mice: involvement of the opioid system. Epilepsy & Behavior. 2015;52:37-41.

10. Haj-Mirzaian A, Amiri S, Amini-Khoei H, Rahimi-Balaei M, Kordjazy N, Olson CO, et al. Attenuation of oxidative and nitrosative stress in cortical area associates with antidepressant-like effects of tropisetron in male mice following social isolation stress. Brain research bulletin. 2016;124:150-63.
11. Picard M, Juster R-P, McEwen BS. Mitochondrial allostatic load puts the'gluc'back in glucocorticoids. Nature Reviews Endocrinology. 2014;10(5):303.
12. Madrigal JL, Olivenza R, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Rodrigo J, et al. Glutathione depletion, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction are induced by chronic stress in rat brain. Neuropsychopharmacology. 2001;24(4):420.
13. Beal MF. Mitochondria, free radicals, and neurodegeneration. Current opinion in neurobiology. 1996;6(5):661-6.
14. Navarro A, Gomez C, López-Cepero JM, Boveris A. Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. American journal of physiology-regulatory, integrative and comparative physiology. 2004;286(3):R505-R11.
15. Daniels WM, Marais L, Stein DJ, Russell VA. Exercise normalizes altered expression of proteins in the ventral hippocampus of rats subjected to maternal separation. Experimental physiology. 2012;97(2):239-47.
16. 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. Physiology & behavior. 2014;130:47-53.
17. Kalani R, Judge S, Carter C, Pahor M, Leeuwenburgh C. Effects of caloric restriction and exercise on age-related, chronic inflammation assessed by C-reactive protein and interleukin-6. The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences. 2006;61(3):211-7.
18. Somani S, Husain K, Diaz-Phillips L, Lanzotti D, Kareti K, Trammell G. Interaction of exercise and ethanol on antioxidant enzymes in brain regions of the rat. Alcohol. 1996;13(6):603-10.
19. Brocardo PS, Boehme F, Patten A, Cox A, Gil-Mohapel J, Christie BR. Anxiety-and depression-like behaviors are accompanied by an increase in oxidative stress in a rat model of fetal alcohol spectrum disorders: Protective effects of voluntary physical exercise. Neuropharmacology. 2012;62(4):1607-18.
20. Miladi-Gorji H, Rashidy-Pour A, Fathollahi Y. Anxiety profile in morphine-dependent and withdrawn rats: effect of voluntary exercise. Physiology & behavior. 2012;105(2):195-202.
21. Cryan JF, Holmes A. Model organisms: the ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. Nature reviews Drug discovery. 2005;4(9):775.
22. Amiri S, Haj-Mirzaian A, Rahimi-Balaei M, Razmi A, Kordjazy N, Shirzadian A, et al. Co-occurrence of anxiety and depressive-like behaviors following adolescent social isolation in male mice; possible role of nitrergic system. Physiology & behavior. 2015;145:38-44.

23. Wallace DL, Han M-H, Graham DL, Green TA, Vialou V, Iniguez SD, et al. CREB regulation of nucleus accumbens excitability mediates social isolation–induced behavioral deficits. Nature neuroscience. 2009;12(2):200.
24. Shaki F, Hosseini M-J, Ghazi-Khansari M, Pourahmad J. Toxicity of depleted uranium on isolated rat kidney mitochondria. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. 2012;1820(12):1940-50.
25. Jafarian I, Eskandari MR, Mashayekhi V, Ahadpour M, Hosseini M-J. Toxicity of valproic acid in isolated rat liver mitochondria. Toxicology mechanisms and methods. 2013;23(8):617-23.
26. Aksu I, Topcu A, Camsari UM, Acikgoz O. Effect of acute and chronic exercise on oxidant–antioxidant equilibrium in rat hippocampus, prefrontal cortex and striatum. Neuroscience letters. 2009;452(3):281-5.
27. Campbell EJ, James MH, Hodgson DM, Dayas CV, editors. Effects of maternal separation on brain stress systems: Modulation by voluntary exercise in male rats. International Journal of Exercise Science: Conference Proceedings; 2013.
28. Bekinschtein P, Oomen CA, Saksida LM, Bussey TJ, editors. Effects of environmental enrichment and voluntary exercise on neurogenesis, learning and memory, and pattern separation: BDNF as a critical variable? Seminars in cell & developmental biology; 2011: Elsevier.
29. Olson AK, Eadie BD, Ernst C, Christie BR. Environmental enrichment and voluntary exercise massively increase neurogenesis in the adult hippocampus via dissociable pathways. Hippocampus. 2006;16(3):250-60.
30. Ernst M, Romeo RD, Andersen SL. Neurobiology of the development of motivated behaviors in adolescence: a window into a neural systems model. Pharmacology Biochemistry and Behavior. 2009;93(3):199-211.
31. Patki G, Solanki N, Atrooz F, Ansari A, Allam F, Jannise B, et al. Novel mechanistic insights into treadmill exercise based rescue of social defeat-induced anxiety-like behavior and memory impairment in rats. Physiology & behavior. 2014;130:135-44.
32. Dishman RK, Renner KJ, White-Welkley JE, Burke K, Bunnell BN. Treadmill exercise training augments brain norepinephrine response to familiar and novel stress. Brain research bulletin. 2000;52(5):337-42.
33. Haj-Mirzaian A, Amiri S, Kordjazy N, Momeny M, Razmi A, Rahimi-Balaei M, et al. Lithium attenuated the depressant and anxiogenic effect of juvenile social stress through mitigating the negative impact of interlukin-1β and nitric oxide on hypothalamic–pituitary–adrenal axis function. Neuroscience. 2016;315:271-85.
34. Blomgren K, Hagberg H. Free radicals, mitochondria, and hypoxia–ischemia in the developing brain. Free radical biology and medicine. 2006;40(3):388-97.
35. Ikonomidou C, Kaindl AM. Neuronal death and oxidative stress in the developing brain. Antioxidants & redox signaling. 2011;14(8):1535-50.

36. Alano CC, Tran A, Tao R, Ying W, Karliner JS, Swanson RA. Differences among cell types in NAD+ compartmentalization: a comparison of neurons, astrocytes, and cardiac myocytes. Journal of neuroscience research. 2007;85(15):3378-85.
37. Sonei N, Amiri S, Jafarian I, Anoush M, Rahimi-Balaei M, Bergen H, et al. Mitochondrial dysfunction bridges negative affective disorders and cardiomyopathy in socially isolated rats: pros and cons of fluoxetine. The World Journal of Biological Psychiatry. 2017;18(1):39-53.
38. Huang J, Philbert MA. Distribution of glutathione and glutathione-related enzyme systems in mitochondria and cytosol of cultured cerebellar astrocytes and granule cells. Brain research. 1995;680(1-2):16-22.
39. Beiswanger C, Diegmann M, Novak R, Philbert M, Graessle T, Reuhl K, et al. Developmental changes in the cellular distribution of glutathione and glutathione S-transferases in the murine nervous system. Neurotoxicology. 1995;16(3):425-40.
40. Sun X, Shih AY, Johannssen HC, Erb H, Li P, Murphy TH. Two-photon imaging of glutathione levels in intact brain indicates enhanced redox buffering in developing neurons and cells at the cerebrospinal fluid and blood-brain interface. Journal of Biological Chemistry. 2006;281(25):17420-31.
41. Vetulani J. Early maternal separation: a rodent model of depression and a prevailing human condition. Pharmacological reports. 2013;65(6):1451-61.
42. Ji LL, Katz A, Fu R, Griffiths M, Spencer M. Blood glutathione status during exercise: effect of carbohydrate supplementation. Journal of Applied Physiology. 1993;74(2):788-92.