



## Effects of mandatory aerobic exercise in adolescence on the negative impact of maternal separation stress on cardiac oxidative stress in adult male rats

Entram alsadat Sahafi<sup>1</sup>, Maghsoud Peeri<sup>2\*</sup>

1. PhD of Exercise Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Full Professor, Department of Exercise Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

### Abstract

**Background and Aim:** Early life stress is known as a risk factor for the development of depression and its associated comorbidities. Mitochondrial dysfunction plays a critical role in the pathophysiology of depression and cardiovascular diseases. Evidence indicated that regular physical activity during adolescence may be able to adjust the negative impact of maternal separation stress as a valid animal model of depression on behavior and cardiac mitochondrial function of adult rats. **Materials and Methods:** In this experimental study, maternal separation stress was applied to 72 male rat pups by separating them from their mothers for 180 minutes during second to fourteenth day of postnatal. Then, the animals were randomly divided into different treatment six groups (fluoxetine and treadmill) and received the treatments during adolescence. Further, we evaluated the effects of maternal separation stress on the rat behaviors test. Finally, we assessed the reactive oxygen species, mitochondrial glutathione, ATP and cytochrome c release in the cardiac tissue of animals. Comparison between groups were analyzed using independent t-test and one-way analysis of variance and statistically significant was considered if  $p \leq 0.05$ . **Result:** The results of this study showed tha depressive-like behaviors following maternal separation stress in adult male rats were associated with oxidative stress in cardiac tissue. Also the results showed that treating animals with fluoxetine or compulsory exercise on the treadmill during adolescence improved some cardiac mitochondrial function. **Conclusion:** The results of this study highlights the importance of adolescence as a period during which treating animals by performing a treadmill exercise has significant protective effects on cardiac energy homeostasis disorders caused by maternal separation stress.

**Key words:** Maternal separation stress, Cardiomiopaty, Mandatory aerobic exercise, Reactive oxygen species.



## تاثیر یک دوره تمرین هوازی اجباری در دوران نوجوانی بر اثرات منفی استرس جدایی از مادر بر استرس اکسیداتیو قلبی در رت‌های نر بالغ

احترام السادات صحافی<sup>۱</sup>، مقصود پیری<sup>۲\*</sup>

۱. دکترای فیزیولوژی ورزش، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکز، تهران، ایران.

۲. استاد گروه فیزیولوژی ورزش، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکز، تهران، ایران.

### چکیده

**زمینه و هدف:** استرس زودرس به عنوان عامل خطر توسعه افسردگی و آسیب‌های مرتبط با آن شناخته شده است. کاردیومیوپاتی نقش مهمی در پاتوفیزیولوژی افسردگی و بیماری‌های قلبی - عروقی بازی می‌کند. شواهد نشان می‌دهد که فعالیت بدنی منظم در دوران نوجوانی ممکن است بتواند اثرات منفی استرس جدایی از مادر را به عنوان یک مدل حیوانی معتبر افسردگی بر رفتار و عملکرد میتوکندریایی قلبی رت‌های بالغ تعدیل کند. **روش تحقیق:** در این مطالعه تجربی، استرس جدایی از مادر در ۷۲ نوزاد رت صحرایی نر بوسیله جدایی آن‌ها از مادرانشان برای ۱۸۰ دقیقه در روز پس از زایمان روز دوم تا چهاردهم اعمال شد. سپس حیوانات به طور تصادفی در گروه‌های مختلف شش تایی (فلوکستین و نوارگردان) تقسیم شدند و معالجات را طی دوران بلوغ دریافت نمودند. سرانجام اثرات استرس جدایی از مادر در آزمون‌های رفتاری رت‌ها ارزیابی شد. نهایتاً، گونه‌های اکسیژن واکنشی، گلوکاتیون میتوکندریایی، ATP و رهایش سیتوکروم c در بافت قلبی حیوانات اندازه‌گیری گردید. با استفاده از آزمون t مستقل و تحلیل واریانس یک طرفه و در سطح معنی داری  $p \leq 0.05$ ؛ داده‌ها تجزیه و تحلیل شدند. **یافته‌ها:** رفتارهای شبه افسردگی بدنبال استرس جدایی از مادر در رت‌های صحرایی نر بالغ با اختلال عملکرد میتوکندری قلبی در حیوانات همراه بود. علاوه بر این، نتایج نشان داد که درمان حیوانات با فلوکستین و تمرین اجباری روی نوارگردان طی دوره نوجوانی برخی رفتارهای حیوانی و عملکردهای میتوکندری قلبی را بهبود می‌بخشد. **نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه قویاً بیانگر اهمیت نوجوانی به عنوان دوره‌ای است که طی آن درمان حیوانات با اجرای تمرین نوارگردان، اثرات محافظتی قابل توجهی بر اختلالات هموستاز انرژی قلبی ناشی از استرس جدایی از مادر دارد.

**واژه‌های کلیدی:** استرس جدایی از مادر، کاردیومیوپاتی، تمرین ورزشی اجباری، گونه‌های فعال اکسیژن.

\* نویسنده مسؤل، آدرس: تهران، ابتدای خیابان ایران زمین، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، گروه

فیزیولوژی ورزش؛

پست الکترونیک: m.peeri@iauctb.ac.ir

DOI: 10.22077/JPSBS.2018.1540.1398

## مقدمه

بیماری‌های قلبی، متابولیکی و اختلالات مغزی از مشکلات مهم رو به افزایش جوامع مختلف هستند که امروزه طیف گسترده‌ای از تحقیقات به بررسی آثار فعالیت بدنی بر این گونه بیماری‌ها پرداخته اند (تایلور<sup>۱</sup> و دیگران<sup>۲۰۱۹</sup>؛ صادقی و دیگران<sup>۲۰۱۶</sup>؛ صانعی و دیگران<sup>۲۰۱۷</sup>). فعالیت بدنی اثرات مثبتی بر سلامتی از طریق انواع مسیرهای بیولوژیکی می‌گذارد، اما مکانیزم دقیق تأثیرات آن بر سلامت به خوبی تعیین نشده است. در این رابطه، شواهد نشان می‌دهد که ورزش عملکرد میتوکندریایی و سیستم آنتی اکسیدان را بهبود می‌بخشد و سطوح استرس اکسیداتیو را در شرایط پاتولوژیک کاهش می‌دهد (پاورز<sup>۳</sup> و دیگران<sup>۲۰۱۴</sup>). میتوکندری‌ها با فراهم آوردن انرژی مورد نیاز برای هموستاز و فعالیت‌های سلولی، نقش مهمی در سلول‌ها بر عهده دارند. همچنین، میتوکندری‌ها چندین ترکیب ضروری کلیدی برای بقا و عملکرد سلول را سنتز می‌کنند (لیسا و شریهای<sup>۴</sup>، ۲۰۱۳). با این حال، تحت شرایط پاتولوژیک، میتوکندری‌ها مقدار بیش از حد گونه‌های اکسیژن واکنشی<sup>۴</sup> (ROS)، را تولید می‌کنند که موجب فعال کردن مسیرهای آپوپتوتیک<sup>۵</sup>، القاء پاسخ‌های ایمنی- التهابی بدن و در نتیجه آسیب و مرگ سلول می‌شوند (گرین و کرامر<sup>۶</sup>، ۲۰۰۴). اختلال در عملکرد میتوکندری‌ها نقش مهمی در پاتوفیزیولوژی بسیاری از اختلالات جمله افسردگی و کاردیومیوپاتی‌ها دارد (بالینگر<sup>۷</sup>، ۲۰۰۵؛ کلیندینست و رگنولد<sup>۸</sup>، ۲۰۱۵).

افسردگی یک بیماری پزشکی ناتوان کننده با سطح بالای اختلالات روان‌تنی چون اختلالات قلب و عروق است (لیچمن<sup>۹</sup> و دیگران<sup>۲۰۰۸</sup>). بیماری‌های زودرس و عوامل استرس‌زای اجتماعی به عنوان یک عامل خطر برای توسعه اختلالات روانپزشکی با خطر بالای هم آسیبی با بیماری‌های قلبی، از قبیل کاردیومیوپاتی در زندگی شناخته شده است (استپو و کیویماکی<sup>۱۰</sup>، ۲۰۱۳). تجربه کردن وقایع استرسی مزمن در طول عمر، تأثیرات منفی زیادی بر سیستم قلب و عروق دارند و موجب

ایجاد بیماری‌های قلبی - عروقی از طریق راه‌های مختلف از جمله اختلال عملکرد میتوکندری قلبی می‌شوند (صانعی و دیگران<sup>۲۰۱۷</sup>). شواهد بسیاری در پی بردن به مسیرهای مشترک هم آسیبی افسردگی ماژور<sup>۱۱</sup> و اختلالات قلبی-عروقی به نقش مسیرهای استرس نیتروزاتیو و اکسیداتیو<sup>۱۲</sup> و عوامل التهابی اشاره می‌کنند (میس<sup>۱۳</sup> و دیگران<sup>۲۰۱۱</sup>). از طرفی شواهد فراوان دیگری نشان داده است که ورزش و فعالیت بدنی منظم در دوران نوجوانی و کودکی منافع بالقوه‌ای دارند و قادر به محافظت افراد از اثرات منفی استرس هستند (جانسون و لبلانس<sup>۱۴</sup>، ۲۰۱۰). اخیراً این فرضیه مطرح شده که اثرات مفید ورزش ممکن است با تأثیر آن بر عملکرد میتوکندری هیپوکامپ همراه باشد (پیری و امیری<sup>۱۵</sup>، ۲۰۱۵). در مطالعه حاضر، با در نظر گرفتن هم آسیبی افسردگی و اختلالات قلب و عروقی و اهمیت دوران نوجوانی به عنوان یک دوره مهم زندگی و تأثیرات طولانی مدت استرس زودرس<sup>۱۵</sup> (ELS) بر عملکرد میتوکندری فرض کردیم که آیا ELS با اثرات چشمگیر آن تا بزرگسالی در قالب استرس جدایی از مادر<sup>۱۶</sup> (MS) به عنوان یکی از گسترده ترین مدل‌های ELS قادر به تغییر عملکرد میتوکندری‌های قلب در بزرگسالی هست؟ همچنین هدف این بود که بررسی شود که آیا درمان حیوانات با داروی ضدافسردگی کلاسیک فلوکستین<sup>۱۷</sup> (FLX) یا انجام تمرین دویدن اجباری در طی نوجوانی، می‌تواند اثر محافظتی بر رفتارهای افسردگی و عملکرد میتوکندری‌های قلبی ناشی از اثرات منفی ELS داشته باشد؟

## روش تحقیق

شانزده سر رت‌های آلبینو ویستار<sup>۱۸</sup> باردار از موسسه پاستور (تهران، ایران) خریداری شد و به صورت جداگانه تحت شرایط آزمایشگاهی استاندارد با چرخه روشنایی- تاریکی ۱۲:۱۲ ساعته و دسترسی آزاد به غذا و آب در مرکز خدمات حیوانی بخش فیزیولوژی ورزش دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکز قرار گرفتند. در این مطالعه، رت‌ها به ۶ گروه تجربی مساوی (۱۲ سر رت صحرایی در هر گروه) شامل (۱) گروه کنترل (C)، (۲) گروه

1. Taylor  
2. Powers  
3. Liesa & Shirihai  
4. Reactive oxygen species  
5. Apoptotic  
6. Green & Kromer  
7. Ballinger

8. Klinedinst & Regenold  
9. Lichtman  
10. Steptoe & Kivimäki  
11. Major depression  
12. Oxidative and nitrosative stress  
13. Maes  
14. Janssen & LeBlanc

15. Early life stress  
16. Maternal separation  
17. Fluoxetine  
18. Albino Wistar rats

اصلی تمرین اجباری رت‌های گروه تمرین به مدت ۴ هفته، هر هفته ۵ روز روی نوار گردان بدون شیب با رعایت اصل اضافه بار به شکل پیشرونده انجام شد (بین ساعت ۹ صبح تا ۳ بعدازظهر). در دو هفته اول رت‌ها یک ساعت با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه، در هفته سوم ۴۵ دقیقه و هفته چهارم یک ساعت با سرعت ۱۵ متر بر دقیقه روی نوارگردان دویدند؛ به گونه ای که هر ۱۵ دقیقه، به حیوانات استراحت داده شد (ساداتی و دیگران، ۲۰۱۵).

از آزمون میدان باز<sup>۴</sup> (OFT) برای ارزیابی اثرات MS و شرایط درمان بر فعالیت حرکتی استفاده شد هر رت در گوشه‌ای از میدان باز قرار گرفت و از رفتارها به مدت ۵ دقیقه فیلم برداری شد. تعداد مربعات متقاطع (فعالیت افقی و عمودی) توسط آزمایشگر برای هر دو شرایط اثرات MS و درمان، مورد ارزیابی قرار گرفت (صانعی و دیگران، ۲۰۱۷). در آزمون شنای اجباری<sup>۵</sup> (FST) رت‌ها به صورت جداگانه وادار به شنا در مخزن استوانه‌ای شیشه‌ای شدند. دوره بی‌حرکتی (معادل ناامیدی و یأس در انسان) اندازه‌گیری شد (صانعی و دیگران، ۲۰۱۷). در آزمون اسپلاش<sup>۶</sup> (جهت ارزیابی عدم درک لذت و مشکلات خود مراقبتی حیوانات)، محلول ساکارز<sup>۷</sup> ۱۰٪ بر سطح پشتی حیوان اسپری شد و زمان لیسیدن در مدت ۵ دقیقه ثبت گردید (امیری و دیگران، ۲۰۱۶). از آزمون ترجیح محلول ساکارز (SPT) جهت ارزیابی وضعیت لذت جویی حیوانات استفاده شد. در این راستا، در دو روز اول در قفس هر رت، دو بطری آب شیرین قرار گرفت. در دو روز دوم، یکی از بطری‌ها با یک بطری حاوی محلول ساکارز ۱٪ جایگزین شد. در روز آزمون، رت‌ها به مدت ۸ ساعت از غذا و آب محروم شدند. SPT با استفاده از فرمول نسبت ۱٪ محلول ساکارز مصرفی به کل مایع مصرف شده محاسبه شد (صادقی و دیگران، ۲۰۱۶).

آن تعداد از حیواناتی که در آزمایش‌های رفتاری استفاده نشده بودند، در بررسی عملکرد میتوکندری بافت‌های قلب مورد استفاده قرار گرفتند. میوکارد سریعاً پس از خرد شدن بر روی یخ بریده شد، در نیتروژن مایع خیس‌انده شد و نگهداری گردید. اندازه‌گیری غلظت پروتئین به روش پروتئین آبی کماسی<sup>۸</sup> و استخراج قطعات میتوکندری به روش برادفورد<sup>۹</sup> انجام شد (شاکسکی<sup>۱۰</sup> و دیگران،

کنترل + تمرین روی نوارگردان<sup>۱</sup> (C + TM)، ۳) گروه کنترل + درمان فلوکستین (FLX + C)، ۴) گروه استرس جدایی از مادر (MS)، ۵) گروه استرس جدایی از مادر + تمرین روی نوارگردان (MS + TM)، ۶) گروه استرس جدایی از مادر + درمان فلوکستین (MS + FLX) تقسیم شدند. پس از پایان پروتکل ورزش و درمان FLX در روز ۶۰، آزمایش‌های رفتاری (بر روی ۶ تا ۸ سر از هر گروه) انجام شد. در گروه‌های آزمایشی پس از بیهوشی خفیف، رت‌ها (هر گروه ۳ تا ۴ سر) قربانی شدند.

جداسازی مادر نوزادان بر اساس مطالعات قبلی انجام شد (امیری و دیگران، ۲۰۱۶؛ صحافی و دیگران، ۲۰۱۸). به طور خلاصه، روز تولد به عنوان روز پس از زایمان در نظر گرفته شد و بچه‌ها متعاقباً به دو گروه ۳۶ تایی MS و کنترل تقسیم شدند. بچه رت‌های گروه MS، از روز دوم تا چهاردهم روزانه به مدت ۳ ساعت از مادرانشان جدا شدند. در روز ۲۱ این رت‌ها به صورت چهارتایی در هر قفس قرار گرفتند. تمامی دستورات عملی در این مطالعه مطابق با تایید شورای اخلاق در پژوهش پژوهشکده تربیت بدنی تهران با کد اخلاق IR.SSRI.REC.1397.241 رعایت و بر طبق راهنمایی بنیاد ملی سلامت<sup>۲</sup> برای مراقبت از حیوانات آزمایشگاهی؛ اجرا شد. تجویز مزمن FLX به عنوان یک درمان مؤثر برای اصلاح رفتارهای افسردگی در جوندگان گزارش شده است (صادقی و دیگران، ۲۰۱۶؛ صحافی و دیگران، ۲۰۱۸). بدین منظور هیدروکلراید FLX (شرکت سیگمای<sup>۳</sup> آمریکا) در محلول سالین حل شد. محلول FLX در حجم ثابت (۵ میلی گرم/کیلوگرم) به صورت داخل صفاقی از روز ۲۸ تا ۶۰ تجویز شد (امیری و دیگران، ۲۰۱۶؛ صادقی و دیگران، ۲۰۱۶).

سازگاری با تمرین، در روز ۲۱ به مدت یک هفته در تمامی گروه‌ها انجام شد. برای تحریک دویدن، شوک الکتریکی ملایمی در عقب دستگاه تعبیه شد. جهت جلوگیری از آثار احتمالی شوک الکتریکی بر نتایج تحقیق، آشناسازی حیوانات با فعالیت روی نوارگردان، از طریق شرطی سازی با صدا صورت گرفت تا از نزدیک شدن و استراحت در بخش انتهایی دستگاه خودداری شود. برنامه آشنایی ۵ جلسه راه رفتن و دویدن با سرعت ۵ تا ۸ متر در دقیقه و شیب صفر درصد و به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه بود. برنامه<sup>۴</sup>

1. Treadmill

2. National institutes of health

3. Sigma

4. Open field test

5. Forced swimming test

6. Splash test

7. Sucrose preference test

8. Coomassie

9. Bradford

10. Shaki

تغییرات معنی‌دار در بین گروه‌های تحقیق در آزمون FST [F(34,5) = 8/45, (p < 0/001)]، آزمون اسپلاش [F(34,5) = 6/14, (p < 0/001)] و آزمون SPT [F(34,5) = 18/12, (p < 0/001)] بود. نتایج نشان دادند که رت‌های MS زمان بی‌حرکتی بیشتری را در مقایسه با گروه کنترل در تست شنای اجباری داشته‌اند (p < 0/001). همچنین رت‌های MS + TM و FLX + MS زمان بی‌حرکتی کمتری در مقایسه با گروه MS به‌عنوان تاثیرات مثبت تغییرات رفتاری داشتند؛ اما این تغییرات تنها در مورد FLX + MS معنی‌دار بود (p < 0/01). همچنین گروه C + TM نسبت به گروه MS بی‌حرکتی کمتری را نشان داد (p < 0/001). رفتار مشابه دیده شده در آزمون اسپلاش با کاهش در مدت زمان لیسیدن در رت‌های MS در مقایسه با گروه کنترل تایید شد (p < 0/001). افزایش معنی‌دار مدت لیسیدن در گروه FLX + MS در مقایسه با گروه MS (p < 0/008) و نه رت‌های گروه MS + TM، مشاهده شد. با آزمون توکی در مورد SPT مشخص شد که MS مصرف ساکارز را به طور معنی‌داری در مقایسه با دیگر گروه‌ها کاهش داده است (p < 0/001). هر چند تمرین TM و درمان FLX درصد مصرف ساکارز را به طور غیرمعنی‌داری در حیوانات MS افزایش داد (p > 0/05)؛ تمرین TM در گروه کنترل (TM) و درمان FLX در رت‌های کنترل، اثرات معنی‌داری بر مصرف ساکارز در مقایسه با رت‌های گروه کنترل نداشت (p > 0/05). همچنین تفاوت معنی‌داری در گروه‌های تحقیق نسبت به گروه‌های کنترل در OFT دیده نشد [F(34,5) = 2/03, (p > 0/05)].

به علاوه، آزمون تحلیل واریانس یک طرفه نتایج بیانگر تغییرات معنی‌داری در سطوح ROS در گروه‌های تحقیق بود [F(12,5) = 5/36, (p < 0/01)] و افزایش قابل توجه تشکیل ROS در گروه MS در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. رت‌های MS درمان با TM و درمان با FLX کاهشی را در تولید ROS در مقایسه با گروه MS نشان دادند (شکل ۱، p < 0/05).

۲۰۱۲). فعالیت سوکسیناد دهیدروژناز<sup>۱</sup> (SDH) به منظور تایید خلوص میتوکندری، مورد سنجش قرار گرفت (صادقی و دیگران، ۲۰۱۶). میزان ATP در نمونه‌ها به روش بیولومینسانس<sup>۲</sup> با آنزیم لوسیفراز<sup>۳</sup> اندازه‌گیری شد (امیری و دیگران، ۲۰۱۶). شدت بیولومینسانس با دستگاه لومینومتر لوله ای سیریوس<sup>۴</sup> سیستم ردیاب برتولد آلمانی<sup>۵</sup> اندازه‌گیری شد. سطوح گلوکوتیون<sup>۶</sup> (GSH) با استفاده از اندیکاتور DTNB به عنوان یک واکنش‌گر با استفاده از اسپکتروفوتومتر (ساخت شرکت شیماتزو ژاپن<sup>۷</sup>) تعیین و نتایج به صورت میکروگرم بر میلی گرم پروتئین بر اساس کالیبراسیون منحنی استاندارد گزارش شد (امیری و دیگران، ۲۰۱۶). جهت اندازه‌گیری تشکیل ROS میتوکندری قلبی، سوسپانسیون میتوکندری با ۷،۲-دی کلروفلوئورسئین دی استات<sup>۸</sup> (غلظت نهایی ۱۰ میکرومولار) در بافر تنفسی حاوی ۱۳۰ میلی مول محلول کلرید پتاسیم، ۵ میلی مول کلرید منیزیم، ۲۰ میلی مول NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>، ۱/۷ میلی مول ADP، ۰/۱ میلی مول β-NADPH، ۰/۱ میلی مول کلرید آهن سه ظرفیتی در PH=۷/۴ انکوبه شد. فلورسانس میتوکندری و پراکندگی نور برای حداقل ۱۲۰۰۰ دور برای هر نمونه با استفاده از فلوسیتومتر ساخت شرکت شیماتزو ژاپن (صحافی و دیگران، ۲۰۱۸؛ گائو<sup>۹</sup> و دیگران، ۲۰۰۹) به دست آمد. غلظت سیتوکروم c با استفاده از کیت ایمونوسیتی Q سیتوکروم c مخصوص رت‌ها با سیستم‌های D & R (ساخت شرکت مینئوپولیس<sup>۱۰</sup> آمریکا) به روش اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری گردید.

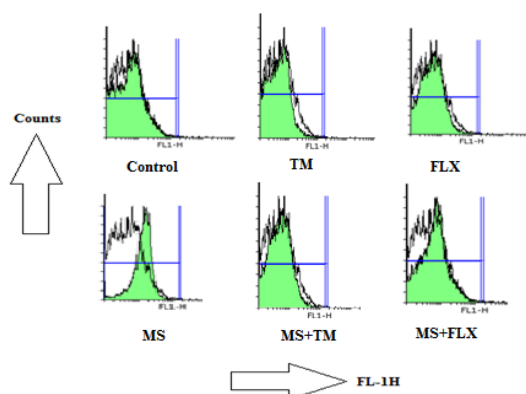
از آزمون t مستقل و روش تحلیل واریانس (ANOVA) یک طرفه برای مقایسه‌های بین گروهی و از آزمون تعقیبی توکی<sup>۱۱</sup> برای بررسی آماری تکمیلی با نرم‌افزار Graph-pad prism (نسخه ۶) استفاده شد. سطح معنی‌داری تمامی محاسبات p < 0/05 در نظر گرفته شد.

#### یافته‌ها

روش تحلیل واریانس یک طرفه آزمون‌های رفتاری بیانگر

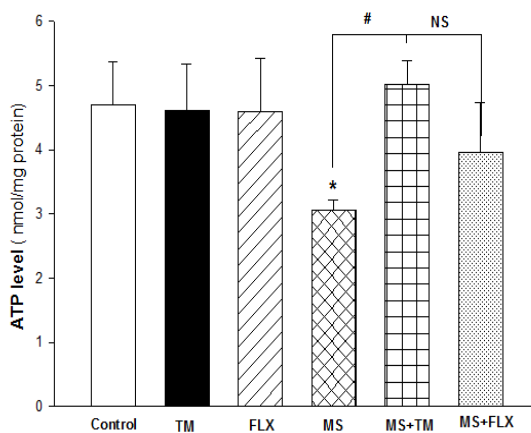
1. Succinate dehydrogenase
2. Bioluminescence method
3. Luciferase enzyme
4. Sirius tube luminometer
5. Berthold detection system, Germany
6. Glutathione

7. Shimadzu, Japan
8. -2,7 .Dichlorofluorescein diacetate
9. Gao
10. Minneapolis
11. Tukey test



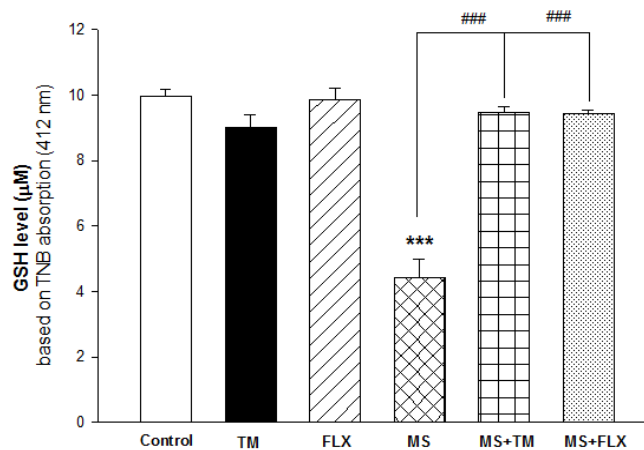
شکل ۱. اثر تمرین اجباری روی نوارگردان و FLX بر تشکیل ROS  
شیفت پیکها به سمت راست و افزایش سطح زیر منحنی AUC<sup>۱</sup> نشان دهنده افزایش تولید ROS در هر کدام از نمونه‌ها است.

تغییرات معنی‌داری در سطوح ATP ما بین گروه‌های تحقیق مشاهده شد [F(۵,۱۲)= ۳/۷۶، (p≤۰/۰۲)]، به گونه ای که کاهش معنی‌داری در تشکیل ATP در گروه MS در مقایسه با گروه کنترل بدست آمد (p≤۰/۰۳). رت‌های MS + TM و نه FLX + MS، افزایشی (p≤۰/۰۲) را در اشکال ATP در مقایسه با گروه MS نشان دادند (شکل ۲).



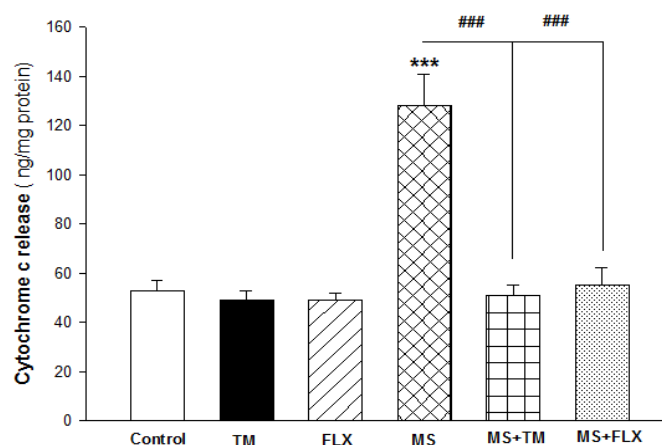
شکل ۲. اثر تمرین اجباری روی نوارگردان و FLX بر ATP. ارزش‌ها به صورت میانگین ± انحراف استاندارد بیان شده اند.  
\*نشانه تفاوت معنی در سطح p< ۰/۰۳ در مقایسه با گروه کنترل؛ # نشانه تفاوت معنی در سطح p< ۰/۰۲ در مقایسه با گروه MS.

تغییرات سطوح GSH ما بین گروه‌های تحقیق معنی‌داری بود [F(۱۲، ۵) = ۱۲۰ / ۲۷، (p < ۰/۰۰۱)]، کاهش قابل توجهی در تشکیل GSH در گروه MS در مقایسه با گروه کنترل دیده شد (p < ۰/۰۰۱) و رت‌های MS درمان با TM (p < ۰/۰۰۱) و رت‌های FLX (p < ۰/۰۰۱) افزایشی را در اشکال GSH در مقایسه با گروه MS نشان دادند (شکل ۳).



شکل ۳. اثر تمرین اجباری روی نوارگردان و FLX بر گلو تاتیون. ارزش‌ها به صورت میانگین ± انحراف استاندارد بیان شده‌اند. \*\*\* نشانه تفاوت معنی در سطح p < ۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه کنترل؛ ### نشانه تفاوت معنی در سطح p < ۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه MS.

تغییرات معنی‌داری در انتشار سیتوکروم c ما بین گروه‌های تحقیق مشاهده شد [F(۱۲، ۵) = ۶۴ / ۳۶، (p < ۰/۰۰۱)]، افزایش قابل توجهی در انتشار سیتوکروم c در گروه MS در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد (p < ۰/۰۰۱) و رت‌های MS + TM و رت‌های FLX+MS کاهش سیتوکروم c را در مقایسه با گروه MS (p < ۰/۰۰۱) نشان دادند (شکل ۴).



شکل ۴. اثر تمرین اجباری روی نوارگردان و FLX بر سیتوکروم c. ارزش‌ها به صورت میانگین ± انحراف استاندارد بیان شده‌اند. \*\*\* نشانه تفاوت معنی در سطح p < ۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه کنترل؛ ### نشانه تفاوت معنی در سطح p < ۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه MS.

## بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تجربهٔ ELS، به شکل MS موجب رفتارهای افسردگی در رت‌های صحرایی نر بالغ می‌شود؛ تغییراتی که با عملکرد غیر نرمال میتوکندری‌های بافت قلبی همراه است. علاوه بر این، نتایج این پژوهش شواهدی ارائه دادند که درمان با FLX و نه بکارگیری ورزش مزمن TM، بر رفتارهای ناشی از اثرات طولانی مدت استرس‌زای ELS در دوران نوجوانی اثرات محافظتی دارد. همچنین هر کدام از این درمان‌ها در این دوران، اثرات محافظتی بر عملکرد میتوکندری قلبی در رت‌های صحرایی نر داشتند.

بدیهی است که تجربه حوادث استرس‌زا در طول مراحل اولیهٔ زندگی، قادر به ایجاد اثرات مضر و طولانی مدت بر مغز و رفتار است و با ناراحتی روانی و جسمی در بزرگسالی ارتباط دارد (امیری و دیگران، ۲۰۱۶؛ صحافی و دیگران، ۲۰۱۸). با توجه به مطالعات محققان دیگر (امیری و دیگران، ۲۰۱۶؛ صحافی و دیگران، ۲۰۱۸)، نتایج ما نشان داد که MS قادر به تحریک رفتارهای مربوط به افسردگی در رت‌های صحرایی نر است. در FST، افزایش زمان بی‌حرکتی دیده شده در گروه MS تحت تأثیر استرس در مقایسه با گروه کنترل به عنوان یک شاخص افسردگی در جوندگان مشابه رفتارهای ناخوشایند انسان می‌باشد (کریان<sup>۱</sup> و دیگران، ۲۰۰۲). به علاوه، کاهش اولویت مصرف ساکارز در فعالیت SPT و کاهش مدت فعالیت در آزمون اسپلاش شاخص افسردگی جوندگان است که رفتارهای بی‌لذتی و خود مراقبتی در انسان را منعکس می‌کند (حاج میرزاییان و دیگران، ۲۰۱۶). بنابراین، نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که MS منجر به بروز رفتارهای افسردگی مشابهی در رت‌های صحرایی نر می‌شود. چندین تحقیق نشان داده اند که عوامل استرس‌زای روان شناختی، عواملی خطرزا برای توسعه بیماری‌های قلبی-عروقی<sup>۲</sup> (CVD) به شمار می‌روند (استیو و کیمی و اکی، ۲۰۱۳؛ میس و دیگران، ۲۰۱۱). همچنین، بیماری‌های قلبی-عروقی به عنوان یک وضعیت مرتبط با بیماری در افراد مبتلا به افسردگی شناخته

شده‌اند (گلاسمن<sup>۳</sup>، ۲۰۰۷). نتایج ما نشان داد که ELS تأثیر منفی بر متابولیسم انرژی و حالت ردوکس در میوکارد دارد. تولید بیش از حد ROS، افزایش انتشار سیتوکروم c و کاهش سطح GSH و ATP نشان می‌دهد که ELS قادر به ایجاد عملکرد غیر نرمال میتوکندریایی در میوکارد از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو و اختلال متابولیسم انرژی است. تحقیقات قبلی نشان داده‌اند که تولید بیش از حد ROS مرتبط با آسیب سلولی، عمدتاً تحت تأثیر کاهش GSH است (گآری لوک<sup>۴</sup> و دیگران، ۲۰۱۱؛ حسینی و دیگران، ۲۰۱۴؛ صحافی و دیگران، ۲۰۱۸). به علاوه، انتشار سیتوکروم c به معنی پاسخ اولیهٔ آبشار آپوپتوتیک به فعالیت کاسپاز ۹ می‌باشد (لی<sup>۵</sup> و دیگران، ۱۹۹۷). در این راستا، تحقیقات قبلی بیانگر اثر استرس روانی-اجتماعی در تغییر هموستاز کلسیم درونی است که منجر به آسیب اکسیداتیو و کاردیومیوپاتی در رت‌های صحرایی بالغ می‌شود (گریپو<sup>۷</sup>، ۲۰۰۹؛ توردی<sup>۸</sup> و دیگران، ۲۰۱۲). اخیراً در مقاله‌ای بیان شده که بکارگیری استرس انزوای اجتماعی در رت‌های صحرایی نوجوان، با بیماری‌های قلبی-عروقی و افسردگی در بزرگسالی همراه است و موجب اختلال در عملکرد میتوکندری‌های قلب می‌شود (صحافی و دیگران، ۲۰۱۸). همچنین شواهد فراوانی بیانگر نقش اختلال عملکرد میتوکندریایی در پاتوفیزیولوژی بیماری‌های قلبی-عروقی است (لنفسکی<sup>۹</sup> و دیگران، ۲۰۰۱؛ سوماتسو<sup>۱۰</sup> و دیگران، ۲۰۰۳). در مجموع، این یافته‌ها نشان داد که ELS نه تنها قادر به ایجاد رفتارهای افسردگی بزرگسالان است، بلکه بر عملکرد میتوکندریایی در میوکارد حیوانات تحت استرس تأثیر می‌گذارد. در مطالعات چندی که به بررسی اثر فعالیت ورزشی بر رفتارهای ناشی از افسردگی پرداخته اند، دیده شده که تمرین ورزشی اختیاری بر روی چرخ دوار در نوجوانان قادر به بهبود علائم افسردگی در رت‌های بالغی می‌شود که در معرض ELS قرار داشته اند (صادقی و دیگران، ۲۰۱۶). به نظر می‌رسد ماهیت اختیاری ورزش RW، نقش ارزنده‌ای در بهبود رفتارهای ناشی از افسردگی دارد؛ موضوعی که در مورد تمرین اجباری به دلیل

- |                            |              |
|----------------------------|--------------|
| 1. Cryan                   | 6. Li        |
| 2. Cardiovascular diseases | 7. Grippo    |
| 3. Glassman                | 8. Turdi     |
| 4. Gawryluk                | 9. Lesnefsky |
| 5. Caspase 9               | 10. Suematsu |



افزایش سطح GSH، ظرفیت آنتی‌اکسیدان بهبود یافت. از همه مهم تر، TM موفق به کاهش میزان انتشار سیتوکروم c شد که خود بیانگر اثرات ضد آپوپتوزی TM در نوجوانی است.

همراهی افسردگی و بیماری‌های قلبی - عروقی، با مرگ و میر بالا در بیماران همراه است (گلاسمن، ۲۰۰۷؛ میس و دیگران، ۲۰۱۱). شواهد نشان از آن دارند که درمان بیماران افسرده با مهار کننده‌های بازجذب سروتونین انتخابی، به عنوان داروهای مقدم برای درمان افسردگی، دارای اثربخشی ۴۰ تا ۵۰ درصدی است و ۱۵ سال پس از درمان در ۸۰ درصد بیماران مبتلا عود بیماری رخ می‌دهد (تریودی<sup>۵</sup> و دیگران، ۲۰۰۶). نتایج یکی از مطالعات نشان داد که اثرات محافظتی FLX قادر به کاهش اختلال عملکرد میتوکندریایی قلبی در رت‌ها پس از استرس انزوای اجتماعی نیست (صانعی و دیگران، ۲۰۱۷). با این حال، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که درمان مزمن FLX در دوران نوجوانی دارای برخی اثرات محافظتی بر اختلال عملکرد میتوکندریایی ناشی از ELS در بافت قلبی است. در مجموع، نتایج تحقیق حاضر نشان داد که ELS عامل خطر برای رشد قلب و عروق در دوره بزرگسالی می‌باشد و ورزش TM علی‌رغم اثرات ضعیف ضد افسردگی بر رفتار، اثرات قابل توجه تعدیل‌کنندگی بر اختلال عملکرد میتوکندریایی میوکارد قلبی دارد. درمان با FLX نیز علاوه بر اثرات محافظتی، بر اختلالات عملکرد میتوکندریایی قلبی ناشی از ELS بر رفتار نیز مؤثر است.

**نتیجه گیری:** در کل، این یافته‌ها به اهمیت غنی‌سازی دوران نوجوانی در قالب تمرین TM و توان بالقوه آن برای کاهش اثرات ELS بر عملکرد میتوکندری قلبی تاکید دارد. پیشنهاد می‌گردد با توجه به مطالعاتی که همزمان با این تحقیق، دخالت عوامل التهابی و بیان ژن‌های درگیر در گیرنده‌های گلوتامات مغزی را مطرح کرده‌اند، محققین ضمن ارزیابی ژن‌های التهابی و مطالعه اندازه اثر عوامل التهابی در افسردگی، به مطالعه داروهای مکملی بپردازند که تا حد امکان عوارض دارویی را کاهش دهند. همچنین به نظر می‌رسد محققین با بررسی پروتئین‌های مؤثر در

ماهیت غیر داوطلبانه آن، مورد تردید است. مطالعات نشان داده‌اند که اگر چه پروتکل تمرین شدید یا ورزش اجباری، تأثیرات مثبت یا منفی بر سلامتی دارند؛ اما ورزش اجباری روی نوارگردان نتوانسته اثرات ELS در رفتار حیوانات بزرگسال را معکوس کند (لیشور و جونز<sup>۱</sup>، ۲۰۰۸؛ اوکیفی<sup>۲</sup> و دیگران، ۲۰۱۲؛ سان<sup>۳</sup> و دیگران، ۲۰۱۷). به علاوه، مطالعات اندکی وجود دارد که تأثیر تمرین در نوجوانی بر اثرات منفی ناراحتی‌های زودرس در زندگی بعد از آن را ارزیابی کرده باشد (دانیلز<sup>۴</sup> و دیگران، ۲۰۱۲؛ احمدعلی پور و رشیدی‌پور، ۲۰۱۵). نتایج تحقیق حاضر اگرچه بیانگر تأثیرات مثبت فعالیت ورزشی بر اثرات مضر ELS بر رفتارهای افسردگی حیوانات بالغ است؛ اما این تغییرات معنی دار نبودند و احتمالاً این مورد را می‌توان ناشی از نوع و ماهیت اجباری تمرین نسبت به تحقیقات مشابه دانست (صادقی و دیگران، ۲۰۱۶). آنچه مهم است اهمیت دوره نوجوانی به عنوان دوره حیاتی عمر است که مغز هنوز در حال توسعه و تکامل است و احتمالاً فعالیت ورزشی می‌تواند در این دوران اثرات محافظتی در مقابل اثرات مضر و غیر طبیعی ELS بر رفتار، مغز و قلب داشته باشد (صادقی و دیگران، ۲۰۱۶؛ صانعی و دیگران، ۲۰۱۷؛ صحافی و دیگران، ۲۰۱۸). درمان حیوانات با FLX منجر به بهبود معنی‌دار رفتار رت‌های MS در آزمون FST و آزمون اسپلاش شد؛ اگرچه بهبود رفتارها در آزمون‌های SPT و OFT معنی‌دار نبود. تمرین TM اگرچه منجر به بهبود رفتارها در آزمون‌های رفتاری شد، اما این بهبود در هیچ یک از آزمون‌های رفتاری معنی‌دار نبود.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که درمان مزمن با FLX اثرات محافظتی بر اختلال عملکرد میتوکندریایی ناشی از ELS در میوکارد با کاهش انتشار سیتوکروم c و بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی میتوکندری‌های قلبی با کاهش تولید ROS و افزایش سطح گلوکاتایون دارد. همچنین ورزش TM توانست تولید ROS میتوکندریایی قلبی را در مقایسه با گروه‌های MS کاهش دهد، به گونه‌ای که با افزایش متابولیسم انرژی (افزایش سطح ATP) و

1. Leasure & Jones  
2. O'keefe  
3. Sun  
4. Daniels  
5. Trivedi

### قدردانی و تشکر

مقاله حاضر مستخرج از رساله دکتری بیوشیمی و متابولیسم ورزشی، بخش فیزیولوژی ورزش دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکز می باشد که با کد ۱۰۱۲۱۴۰۴۹۵۲ مورد تصویب قرار گرفته است. نویسندگان در پایان از تمامی افرادی که در انجام تحقیق همکاری داشته اند، صمیمانه تشکر و سپاسگزاری می نمایند.

مسیر آپتوزیس میتوکندریایی<sup>۱</sup> و ژن های مداخله کننده درگیر در مسیر اختلال عملکرد میتوکندریایی قلب، بتوانند ابعاد وسیع تری از اثرات منفی ناشی از استرس جدایی از مادر را روشن سازند. افسردگی یک بیماری مزمن است و از آنجا که طول عمر رت ها بسیار کوتاه می باشد، عدم استفاده از دوره های طولانی افسردگی در حیوان و تکرار دوره های افسردگی مشابه نمونه های انسانی، از محدودیت های تحقیق حاضر بود.

### منابع

- Ahmadalipour, A., & Rashidy-Pour, A. (2015). Effects of treadmill running exercise during the adolescent period of life on behavioral deficits in juvenile rats induced by prenatal morphine exposure. *Physiology & Behavior*, 139, 26-33.
- Amiri, S., Amini-Khoei, H., Mohammadi-Asl, A., Alijanpour, S., Haj-Mirzaian, A., Rahimi-Balaei, M., ... & Zarrindast, M. R. (2016). Involvement of D1 and D2 dopamine receptors in the antidepressant-like effects of selegiline in maternal separation model of mouse. *Physiology & Behavior*, 163, 107-114.
- Ballinger, S. W. (2005). Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 38 (10), 1278-1295.
- Cryan, J. F., Markou, A., & Lucki, I. (2002). Assessing antidepressant activity in rodents: Recent developments and future needs. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23(5), 238-245.
- Daniels, W. M., Marais, L., Stein, D. J., & Russell, V. A. (2012). Exercise normalizes altered expression of proteins in the ventral hippocampus of rats subjected to maternal separation. *Experimental Physiology*, 97(2), 239-247.
- Gao, P., Qian, D. H., Li, W., & Huang, L. (2009). Npra-mediated suppression of angii-induced ros production contribute to the antiproliferative effects of b-type natriuretic peptide in vsmc. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 324(1-2), 165.
- Gawryluk, J. W., Wang, J. F., Andrezza, A. C., Shao, L., & Young, L. T. (2011). Decreased levels of glutathione, the major brain antioxidant, in post-mortem prefrontal cortex from patients with psychiatric disorders. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 14(1), 123-130.
- Glassman, A. H. (2007). Depression and cardiovascular comorbidity. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 9(1), 9.
- Green, D. R., & Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, 305(5684), 626-629.
- Grippo, A. J. (2009). Mechanisms underlying altered mood and cardiovascular dysfunction: The value of neurobiological and behavioral research with animal models. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 33(2), 171-180.
- Haj-Mirzaian, A., Amiri, S., Kordjazy, N., Momeny, M., Razmi, A., Rahimi-Balaei, M., ... & Dehpour, A. R. (2016). Lithium attenuated the depressant and anxiogenic effect of juvenile social stress through mitigating the negative impact of interleukin-1 $\beta$  and nitric oxide on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *Neuroscience*, 315, 271-285.

- Hosseini, M. J., Shaki, F., Ghazi-Khansari, M., & Pourahmad, J. (2014). Toxicity of copper on isolated liver mitochondria: impairment at complexes I, II, and IV leads to increased ROS production. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 70(1), 367-381.
- Janssen, I., & LeBlanc, A. G. (2010). Systematic review of the health benefits of physical activity and fitness in school-aged children and youth. *International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity*, 7(1), 40.
- Klinedinst, N. J., & Regenold, W. T. (2015). A mitochondrial bioenergetic basis of depression. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 47(1-2), 155-171.
- Leasure, J., & Jones, M. (2008). Forced and voluntary exercise differentially effect brain and behavior. *Neuroscience*, 156(3), 456-465.
- Lesnefsky, E. J., Moghaddas, S., Tandler, B., Kerner, J., & Hoppel, C. L. (2001). Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: Ischemia-reperfusion, aging, and heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 33(6), 1065-1089.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., & Wang, X. (1997). Cytochrome c and datp-dependent formation of apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91(4), 479-489.
- Lichtman, J. H., Bigger Jr, J. T., Blumenthal, J. A., Frasure-Smith, N., Kaufmann, P. G., Lespérance, F., ... & Froelicher, E. S. (2008). Depression and coronary heart disease: recommendations for screening, referral, and treatment: a science advisory from the American heart association prevention committee of the council on cardiovascular Nursing, council on clinical cardiology, council on epidemiology and prevention, and Interdisciplinary council on quality of care and outcomes research: endorsed by the American Psychiatric Association. *Circulation*, 118(17), 1768-1775.
- Liesa, M., & Shirihai, O. S. (2013). Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metabolism*, 17(4), 491-506.
- Maes, M., Ruckoanich, P., Chang, Y. S., Mahanonda, N., & Berk, M. (2011). Multiple aberrations in shared inflammatory and oxidative & nitrosative stress (IO&NS) pathways explain the co-association of depression and cardiovascular disorder (CVD), and the increased risk for CVD and due mortality in depressed patients. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35(3), 769-783.
- O'keefe, J. H., Patil, H. R., Lavie, C. J., Magalski, A., Vogel, R. A., & McCullough, P. A. (2012). Potential adverse cardiovascular effects from excessive endurance exercise. *Paper presented at the Mayo Clinic Proceedings*, 87(6), 587-595.
- Peeri, M., & Amiri, S. (2015). Protective effects of exercise in metabolic disorders are mediated by inhibition of mitochondrial-derived sterile inflammation. *Medical Hypotheses*, 85(6), 707-709.
- Powers, S., Sollanek, K., Wiggs, M., Demirel, H., & Smuder, A. (2014). Exercise-induced improvements in myocardial antioxidant capacity: The antioxidant players and cardioprotection. *Free Radical Research*, 48(1), 43-51.
- Saadati, H., Esmaeili-Mahani, S., Esmaeilpour, K., Nazeri, M., Mazhari, S., & Sheibani, V. (2015). Exercise improves learning and memory impairments in sleep deprived female rats. *Physiology & Behavior*, 138, 285-291.

- Sadeghi, M., Peeri, M., & Hosseini, M. J. (2016). Adolescent voluntary exercise attenuated hippocampal innate immunity responses and depressive-like behaviors following maternal separation stress in male rats. *Physiology & Behavior*, 163, 177-183.
- Sahafi, E., Peeri, M., Hosseini, M. J., & Azarbyjani, M. A. (2018). Cardiac oxidative stress following maternal separation stress was mitigated following adolescent voluntary exercise in adult male rat. *Physiology & Behavior*, 183, 39-45.
- Shaki, F., Hosseini, M. J., Ghazi-Khansari, M., & Pourahmad, J. (2012). Toxicity of depleted uranium on isolated rat kidney mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1820(12), 1940-1950.
- Sonei, N., Amiri, S., Jafarian, I., Anoush, M., Rahimi-Balaei, M., Bergen, H., ... & Hosseini, M. J. (2017). Mitochondrial dysfunction bridges negative affective disorders and cardiomyopathy in socially isolated rats: pros and cons of fluoxetine. *The World Journal of Biological Psychiatry*, 18(1), 39-53.
- Steptoe, A., & Kivimäki, M. (2013). Stress and cardiovascular disease: An update on current knowledge. *Annual Review of Public Health*, 34, 337-354.
- Suematsu, N., Tsutsui, H., Wen, J., Kang, D., Ikeuchi, M., Ide, T., ... & Takeshita, A. (2003). Oxidative stress mediates tumor necrosis factor- $\alpha$  induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in cardiac myocytes. *Circulation*, 107(10), 1418-1423.
- Sun, L. N., Li, X. L., Wang, F., Zhang, J., Wang, D. D., Yuan, L., ... & Qi, J. S. (2017). High-intensity treadmill running impairs cognitive behavior and hippocampal synaptic plasticity of rats via activation of inflammatory response. *Journal of Neuroscience Research*, 95(8), 1611-1620.
- Taylor, R. S., Sagar, V. A., Davies, E. J., Briscoe, S., Coats, A. J., Dalal, H., ... & Singh, S. (2019). Exercise-based rehabilitation for heart failure: cochrane systematic review, meta-analysis, and trial sequential analysis. *JACC: Heart Failure*, 7(8), 691-705.
- Trivedi, M. H., Rush, A. J., Wisniewski, S. R., Nierenberg, A. A., Warden, D., Ritz, L., ... & Shores-Wilson, K. (2006). Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR\* D: implications for clinical practice. *American Journal of Psychiatry*, 163(1), 28-40.
- Turdi, S., Yuan, M., Leedy, G. M., Wu, Z., & Ren, J. (2012). Chronic social stress induces cardiomyocyte contractile dysfunction and intracellular  $ca^{2+}$  derangement in rats. *Physiology & Behavior*, 105(2), 498-509.