

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ALZHEİMER HASTALIĞI MODELİNDE UZUN SÜRELİ
EGZERSİZİN MOLEKÜLER YOLAKLAR VE BİLİŞSEL
DAVRANIŞLAR ÜZERİNE KORUYUCU ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Seda KÖSE

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMANI

Doç. Dr. Kübra AKILLIOĞLU

ADANA-2022

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ALZHEİMER HASTALIĞI MODELİNDE UZUN SÜRELİ
EGZERSİZİN MOLEKÜLER YOLAKLAR VE BİLİŞSEL
DAVRANIŞLAR ÜZERİNE KORUYUCU ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Seda KÖSE

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMANI

Doç. Dr. Kübra AKILLIOĞLU

**Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu tarafından
TYL-2020-13222 no'lu proje olarak desteklenmiştir.**

ADANA-2022

TEŞEKKÜR

Tüm bilgi birikimini ve deneyimlerini benimle paylaşan, her zaman yol gösterici, cesaretlendirici tavrıyla güç ve ilham veren, en önemlisi bana her zaman hata yapma hakkı da tanıyan, bu tezin başından sonuna kadar büyük emekler veren, maddi-manevi tüm desteklerinden ötürü değerli danışman hocam Doç. Dr. Kübra AKILLIOĞLU'na,

Motive edici sözleriyle her zaman destek olan, tecrübelerini ve engin bilgilerini paylaşan değerli hocalarım, Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Şeref ERDOĞAN başta olmak üzere, Prof. Dr. Sanlı Sadi KURDAK, Doç. Dr. Kerem Tuncay ÖZGÜNEN, Doç. Dr. Besim ÖZAYKAN, Doç. Dr. Ayper BOĞA PEKMEZEKMEK, Doç. Dr. Kübra AKILLIOĞLU ve Doç. Dr. Çiğdem ÖZDEMİR'e,

Çalışmalarımı yürütürken laboratuvar imkanlarından faydalanmamı sağlayan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Bertan YILMAZ ile doktora öğrencisi Hale ÖKSÜZ'e, çalışmamızın immünohistokimyasal analizlerinin gerçekleştirilmesine olanak sağlayan, bulguların değerlendirilmesinde özen gösteren Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Sait POLAT ve Arş. Gör. Samet KARA'ya,

Yüksek lisans eğitimine başladığım ilk günlerden itibaren bana cesaret veren, yol gösteren, bilgisini paylaşmaktan sakınmayan, ne zaman ihtiyaç duysam yardımına koşan, beni aileden hissettiren, onları tanıdığım için çok şanslı olduğumu bildiğim sevgili çalışma arkadaşım Arş. Gör. Dr. Meltem DÖNMEZ KUTLU ve Uzm. Dr. İbrahim ÇEVİK'e,

Çalışmalarımda yardımını esirgemeyen tüm Fizyoloji Anabilim Dalı asistanlarına,

Bana güvenen, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme, anlayışı, desteği ve sonsuz sevgisi için yol arkadaşım Ali KORKMAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Seda KÖSE

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
ÖZET	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ.....	4
2.1. Alzheimer Hastalığı Fizyopatolojisi	4
2.1.1. Kolinerjik Hipotez	4
2.1.2. Amiloid Beta Hipotezi.....	8
2.2. Alzheimer Hastalığı Risk Faktörleri	11
2.3. Glikojen Sentaz Kinaz-3 (GSK-3).....	12
2.4. Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF)	14
2.5. Alzheimer Hastalığı ve Egzersiz.....	17
2.6. AH Deneysel Hayvan Modelleri.....	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1. Etik.....	23
3.2. Deney Hayvanlarının Bakımı	23
3.3. Koşu Bandı Egzersizinin Uygulanması	23
3.4. Alzheimer Hastalığı Modeli Oluşturulması.....	24
3.5. Deney Grupları	25
3.6. Davranış Testleri.....	26

3.6.1. Açık Alan Düzeneği	26
3.6.1.1. Açık Alan Testi	27
3.6.1.2. Açık Alan Testinde Değerlendirilen Parametreler.....	27
3.6.2. Morris Su Havuzu	28
3.6.2.1. Morris Su Havuzu Eğitim Denemeleri ve Testi.....	28
3.6.2.1.1. Morris Su Havuzunda Değerlendirilen Parametreler.....	29
3.7. Western Blot Analizi	29
3.7.1. Western Blot Analiz Aşamaları.....	30
3.7.1.1. Total Protein Örneklerinin Elde Edilmesi	30
3.7.1.2. Total Protein Ölçümü.....	31
3.7.1.3. SDS PAGE Jelinin Hazırlanması.....	33
3.7.1.4. Proteinlerin Jel Üzerinde Yürütülmesi	34
3.7.1.5. Jelin Membrana Aktarılması.....	35
3.7.1.6. Bloklama.....	36
3.7.1.7. Primer ve Sekonder Antikorlarla İnkübasyon	36
3.7.1.8. Görüntüleme	37
3.8. İmmünohistokimya Yöntemi	37
3.8.1. İmmünohistokimyasal Skorlama Yöntemi.....	39
3.9. İstatistiksel Analiz.....	39
4. BULGULAR.....	41
4.1. Vücut Ağırlığı	41
4.2. Açık Alan Testi	42
4.3. Morris Su Havuzu Testi	46
4.3.1. Eğitim Denemeleri.....	46
4.3.2. Test.....	49
4.4. Western Blot Analizi	51
4.5. İmmünohistokimya Analizi	56

5. TARTIŞMA	70
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	79
KAYNAKLAR	81
ÖZGEÇMİŞ	92
EKLER.....	93
Ek-1: Tez Adı Değişikliği.....	93
Ek-2: Etik Kurul Onayı.....	94



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No:

Sayfa No:

Şekil 1. Skopolaminin olası moleküler etkileri(48).	7
Şekil 2. Muskarinik reseptör (M1) aktivasyonu ile APP'nin bölünme ilişkisi	8
Şekil 3. APP bölünme mekanizması.	10
Şekil 4. BDNF/TrkB sinyalizasyonu ile aktive olan bazı yolaklar ve etkileri (99).	17
Şekil 5. mAChR aktivasyonu ve BDNF/TrkB sinyalizasyonu ile aktive olan yolaklar.	20
Şekil 6. Skopolaminin muskarinik reseptör ve BDNF/TrkB sinyali üzerindeki etkileri.	20
Şekil 7. Koşu bandı egzersizi sırasında fareler.	24
Şekil 8. Deney zaman çizelgesi.	25
Şekil 9. Deney Akış Şeması.	26
Şekil 10. Açık alan düzeneği.	27
Şekil 11. Morris su havuzu.	28
Şekil 12. Kültür kabına yüklenen protein örnekleri.	32
Şekil 13. BSA standartlarının protein konsantrasyonuna karşılık gelen absorbans yanıt eğrisi.	33
Şekil 14. Proteinlerin kuyucuklara yüklenmesi.	35
Şekil 15. Proteinlerin jel üzerinde yürütülmesi.	35
Şekil 16. Görüntüleme işleminde kullanılan materyaller.	37
Şekil 17. On iki haftalık vücut ağırlığı.	41
Şekil 18. Açık alan testinde merkez alanda geçirilen süre.	42
Şekil 19. Açık alan testinde düzenekte kat edilen mesafe (cm).	43
Şekil 20. Açık alan testinde düzenekte ayağa kalkma sıklığı.	44
Şekil 21. Açık alan düzeneğinde merkez alana geçme sıklığı.	45
Şekil 22. Açık alan düzeneğinde merkez alana ilk kez geçiş süresi.	46
Şekil 23. Morris su havuzu testinde gizli platformu bulma süresi.	48
Şekil 24. Morris su havuzu testinde eğitim denemelerinde yüzme hızı (cm/sn).	49
Şekil 25. Morris su havuzu testinde hedef kadranda geçirilen süre.	50
Şekil 26. Morris su havuzu testinde yüzme hızı (cm/sn).	51
Şekil 27. Western blot analizinde hipokampusu ait görüntü.	52
Şekil 28. Hipokampusta, western blot testinde kat değişimi.	53
Şekil 29. Western blot analizinde prefrontal kortekse ait görüntü.	54

Şekil 30. Prefrontal kortekste, western blot testinde kat değişimi.	55
Şekil 31. Hipokampus negatif kontrol grubu.	56
Şekil 32. Prefrontal korteks negatif kontrol grubu.	57
Şekil 33. Hipokampus S-SF Grubu A β -40 immunoreaktivitesi.	58
Şekil 34. Hipokampus S-SF Grubu APP immunoreaktivitesi.	58
Şekil 35. Prefrontal Korteks S-SF Grubu A β -40 immunoreaktivitesi.	59
Şekil 36. Prefrontal Korteks S-SF Grubu APP immunoreaktivitesi.	59
Şekil 37. Hipokampus E-SF Grubu A β -40 immunoreaktivitesi.	60
Şekil 38. Hipokampus E-SF Grubu APP immunoreaktivitesi.	61
Şekil 39. Prefrontal Korteks E-SF Grubu A β -40 immunoreaktivitesi.	61
Şekil 40. Prefrontal Korteks E-SF Grubu APP immunoreaktivitesi.	62
Şekil 41. Hipokampus S-SCOP Grubu A β -40 immunoreaktivitesi.	63
Şekil 42. Hipokampus S-SCOP Grubu APP immunoreaktivitesi.	63
Şekil 43. Prefrontal Korteks S-SCOP Grubu A β -40 immunoreaktivitesi.	64
Şekil 44. Prefrontal Korteks S-SCOP Grubu APP immunoreaktivitesi.	64
Şekil 45. Hipokampus E-SCOP Grubu A β -40 immunoreaktivitesi.	66
Şekil 46. Hipokampus E-SCOP Grubu APP immunoreaktivitesi.	66
Şekil 47. Prefrontal Korteks E-SCOP Grubu A β -40 immunoreaktivitesi.	67
Şekil 48. Prefrontal Korteks E-SCOP Grubu APP immunoreaktivitesi.	67
Şekil 49. Hipokampusta immünoöhistokimyasal analiz.	68
Şekil 50. Prefrontal kortekste immünohistokimyasal analiz.	69

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No:	Sayfa No:
Tablo 1. Alzheimer hastalığının deneysel hayvan modelleri.....	22
Tablo 2. Deney grupları.	25
Tablo 3. Western Blot Analizinde Kullanılan Solüsyonlar ve Kimyasal Ajanlar.	30
Tablo 4. Seyreltilmiş BSA Standartlarının Hazırlanması.	32
Tablo 5. Ayırıcı jel hazırlama oranı.	34
Tablo 6. Paketleyici jel hazırlama oranları.	34
Tablo 7. İmmünohistokimya Yönteminde Kullanılan Solüsyonlar ve Kimyasal Ajanlar.	39
Tablo 8. Hücrelerin boyanma derecesinin değerlendirilmesi.	39

KISALTMALAR DİZİNİ

Aβ	: Amiloid Beta Peptidi
ACh	: Asetilkolin
AChE	: Asetilkolinesteraz
AH	: Alzheimer Hastalığı
AICD	: Amiloid İntrasellüler Alanı
APOE- ϵ4	: Apolipoprotein- ϵ 4
APP	: Amiloid prekürsor protein
BACE1	: Beta-Bölgesi Amiloid Prekürsör Protein Parçalayan Enzim 1
BDNF	: Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör
CAMK	: Ca ²⁺ kalmodülin bağımlı kinaz
CREB	: Siklik-AMP Yanıt Elemanı Bağlayıcı Protein
CTF	: C Terminal Fragmanları
ERK	: Ekstrasellüler Sinyal Düzenleyen Kinaz
GSK3β	: Glikojen Sentaz Kinaz3 β
JNK	: c-Jun N-Terminal Kinaz
MAPK	: Mitojenle Aktive Edilmiş Protein Kinaz
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
MWM	: Moris su havuzu testi
NBM	: Meynertin bazal çekirdeği
NFY	: Nörofibriler Yumaklar
NGF	: Sinir Büyüme Faktörü
NMDAR	: N-metil D-aspartat Reseptörü
NT3-4-5-6	: Nörotrofik Faktör 3-4-5-6
p75	: Pan-nörotrofik reseptörü
PI3K	: Fosfoinozitol-3-Kinaz
PKA	: Protein Kinaz A
PKB	: Protein Kinaz B
PKC	: Protein Kinaz C
PLC	: Fosfolipaz C

PP1	: Protein Fosfataz 1
PP2A	: Protein Fosfataz 2A
PSEN1	: Presenilin 1
PSEN2	: Presenilin 2
sAPPα	: Çözülebilir Amiloid Prekürsör Protein α
sAPPβ	: Çözülebilir Amiloid Prekürsör Protein β
TrkB	: Tirozin Reseptör Kinaz B



ÖZET

Alzheimer Hastalığı Modelinde Uzun Süreli Egzersizin Moleküler Yolaklar ve Bilişsel Davranışlar Üzerine Koruyucu Etkisinin Araştırılması

Egzersizin nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde ve önlenmesindeki rolü, yapılan çalışmalara rağmen belirsizliğini korumaya devam etmektedir. Çalışmamızda skopolaminle oluşturulan Alzheimer hastalığı modelinde, koşu bandı egzersizinin moleküler yolaklar ve bilişsel davranışlar üzerindeki koruyucu etkisi araştırıldı.

Bu amaçla, 21. günde annelerinden ayrılan erkek Balb/c farelere (n=69) 12 hafta boyunca koşu bandı egzersizi yaptırıldı. Egzersiz uygulamasının son 4 haftasında (28 gün) farelere skopolamin enjeksiyonu (2mg/kg, günde 1 defa) periton içine yapıldı. Enjeksiyonu takiben açık alan testi ve morris su havuzu testi ile duygusal ve bilişsel davranışları değerlendirildi. Farelerin hipokampus ve prefrontal korteksi izole edilerek Western blot ile BDNF, TrkB, p-GSK3 β ^{Ser389}, immünohistokimya yöntemi ile APP ve A β -40 seviyeleri değerlendirildi.

Yaptığımız çalışmada, farelerde skopolamin uygulaması bilişsel ve duygusal işlevlerde bozulmaya neden oldu. Skopolamin hipokampusta p-GSK3 β ^{Ser389}, BDNF (p=0,014) ve TrkB (p=0,01) düzeyinin azalmasına neden oldu. Prefrontal kortekste ise p-GSK3 β ^{Ser389} ve BDNF (p=0,014) düzeyleri azalırken, TrkB (p=0,013) düzeyinde artış görüldü. İmmünohistokimyasal analiz sonucunda skopolamin uygulaması ile hipokampus ve prefrontal kortekste APP ve A β -40'nin nöronal ve perinöronal alanlarda arttığı saptandı. Çalışmamızda uzun süreli egzersiz uygulamasının bilişsel ve duygusal işlevlerde bozulmaya karşı koruyucu etkiler gösterdiği saptandı. Koşu bandı egzersizi yaptırılan grupta hipokampusta p-GSK3 β ^{Ser389}, BDNF (p=0,01) ve TrkB (p=0,02) düzeyinde artış bulundu. Prefrontal kortekste de p-GSK3 β ^{Ser389}, BDNF (p=0,02) ve TrkB (p=0,01) düzeyinde artış saptandı. İmmünohistokimyasal incelemede, A β -40 ve APP'nin egzersiz gruplarında azaldığı görüldü.

Sonuç olarak, skopolamin uygulamasının neden olduğu bilişsel ve duygusal davranışlardaki bozulmaya karşı, uzun süreli koşu bandı egzersizinin koruyucu

etkisi olabilir. Bu koruyucu etkiye artan BDNF düzeyi ve GSK3 β ^{Ser389} fosforilasyonunun aracılık ettiği ileri sürülebilir.

Anahtar sözcükler: Alzheimer hastalığı, Amiloid beta, BDNF, Egzersiz, p-GSK3 β ^{Ser389}, Skopolamin



ABSTRACT

Investigation of the Protective Effect of Long-Term Exercise on Molecular Pathways and Cognitive Behaviors in Alzheimer Disease Model

The role of exercise in the treatment and prevention of neurodegenerative diseases continues to remain unclear despite studies. In our study, the protective effect of treadmill exercise on molecular pathways and cognitive behaviors was investigated in the Alzheimer disease model induced by scopolamine.

For that purpose, male Balb/c mice (n=69) which was separated from their mothers on day 21 were subjected to treadmill exercise for 12 weeks. In the last 4 weeks (28 days) of the exercise, scopolamine injection (2mg/kg, once a day) was administered intraperitoneally to the mice. Following the injection emotional and cognitive behaviors were evaluated with open field test and morris water maze test. The hippocampus and prefrontal cortex of the mice were isolated and BDNF, TrkB, p-GSK3 β ^{Ser389} levels were evaluated by Western blotting, and APP and A β -40 levels were analyzed by immunohistochemistry.

In our study, scopolamine administration in mice caused impairment in cognitive and emotional functions. Scopolamine caused a decrease in p-GSK3 β ^{Ser389}, BDNF (p=0.014) and TrkB (p=0.01) levels in the hippocampus. In the prefrontal cortex, p-GSK3 β ^{Ser389} and BDNF (p=0.014) levels decreased, while TrkB (p=0.013) levels increased. As a result of immunohistochemical analysis, it was found that APP and A β -40 in the hippocampus and prefrontal cortex increased in neuronal and perineuronal areas with scopolamine administration. In our study, it was found that long-term exercise had protective effects against impairment in cognitive and emotional functions. There was an increase in p-GSK3 β ^{Ser389}, BDNF (p=0.01) and TrkB (p=0.02) levels in the hippocampus in the treadmill exercise group. There were also increases in p-GSK3 β ^{Ser389}, BDNF (p=0.02) and TrkB (p=0.01) levels in the prefrontal cortex. In the immunohistochemical analysis it was observed that A β -40 and APP were decreased in the exercise groups.

In conclusion, long-term treadmill exercise may have a protective effect against the impairment in cognitive and emotional behaviors induced by

scopolamine. It can be suggested that this protective effect is mediated by increased BDNF level and GSK3 β ^{Ser389} phosphorylation.

Key Words: Alzheimer's disease, Amyloid beta, BDNF, Exercise, p-GSK3 β ^{Ser389}, Scopolamine



1. GİRİŞ

Alzheimer hastalığı (AH), yaşlılıkta en yaygın görülen ilerleyici nörodejeneratif hastalıklardan biridir ve demans vakalarının %60-70'ini oluşturmaktadır (1, 2). Dünya genelinde, çoğu 60 yaşın üzerinde 40 milyon insanın demansla yaşadığı tahmin edilmektedir (3, 4). Günümüzde sağlık hizmetlerinin yaygınlaşması ve teknolojik ilerlemeler nedeniyle dünya genelinde yaşam süresinin uzamasına bağlı olarak yaşlı nüfus artmaktadır. Yaşlı nüfusun ve demans gelişme riskinin artmasıyla birlikte AH vakalarının 2050 yılına kadar 3 katına çıkacağı tahmin edilmektedir (5, 6).

Alzheimer hastalığı ilk kez 1906 yılında, 51 yaşındaki “Auguste D.” adlı hastayı takip eden Dr. Alois Alzheimer tarafından tanımlanmıştır. Bu hastanın ilerleyici bilişsel bozukluk, halüsinasyonlar, psikososyal yetersizlik, anlama ve hafızada azalmanın yanında afazi gibi klinik özellikleri bulunmaktaydı. Dr. Alzheimer, hastanın klinik özelliklerini tanımlayarak oluşan makroskopik ve mikroskopik değişiklikleri de detaylandırmıştır. Sonrasında bu tablonun klinikopatolojik özellikleri de ayrıntılı olarak Emil Kraepelin tarafından tanımlanmış ve önerisi üzerine bu tabloya Alzheimer’ın adı verilmiştir (7).

Alzheimer, hücre içi nörofibriler yumaklar (NFY), hücre dışı amiloid plaklar, kronik inflamasyon, nöron ve sinaps kaybı ile karakterize bir hastalıktır. (5, 8). AH’de erken dönemde görülen temel klinik belirti bellek bozukluğudur. Hastalığın ilerleyen dönemlerinde ise afazi, muhakeme yeteneğinde bozulma, apraksi, görsel-uzamsal işlevlerde eksiklik ile apati, ajitasyon ve psikoz gibi davranış değişikliklerini de içeren bilişsel bozukluklar meydana gelmektedir (9, 10).

Alzheimer hastalığı erken ve geç başlangıçlı olarak sınıflandırılmaktadır. Yapılan çalışmalar geç başlangıçlı AH’nin çeşitli moleküler yollar arasında anormal etkileşimlerin meydana geldiği bir poligenik hastalık olduğunu göstermektedir. Yaş, apolipoproteinE-ε4 (APOEε4) aleli taşıyıcılığı, kardiyovasküler ve yaşam tarzı gibi risk faktörleri geç başlangıçlı AH’den sorumlu temel faktörlerdir (11). AH’nin erken başlangıçlı otozomal dominant formunun ise amiloid prekürsör protein (APP), presenilin-1 (PSEN1) ve (presenilin-2) (PSEN2) genlerindeki mutasyonlar sonucu gelişen amiloid-beta (Aβ) anormallikleriyle bağlantılı olduğu bilinmektedir (12).

Alzheimer hastalığının en önemli risk faktörünün yaş olduğu kabul edilmektedir (13). AH'de beyinde oluşan fizyolojik ve anatomik değişiklikler, yaşlandıkça beyinde meydana gelen değişikliklerle paralellik gösterse de bunlar normal yaşlanma sürecine dahil değildir. Alzheimer hastalığında beyinde hücre dışında biriken A β plakları ile hücre içinde tau proteininin hiperfosforilasyonu ile oluşan NFY'lerin sebep olduğu nöron ve sinaps kayıpları meydana gelmektedir. Bu durum nörotransmitter seviyelerini de olumsuz etkileyerek farklı beyin bölgeleri arasında sinyal iletiminin bozulmasına yol açmaktadır. Bunların sonucunda beynin duygusal ve bilişsel işlevlerinde eksiklikler oluşmaktadır (14, 15). AH'nin oluşmasında rol oynayan fizyopatolojik süreçleri açıklamaya çalışan birçok hipotez bulunmasına rağmen bu mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır ve hastalığın kesin tedavisi de bulunmamaktadır.

Üzerinde durulan mekanizmalardan biri glikojen sentaz kinaz3- β (GSK-3 β) aktivasyonunu içeren sinyal yollarıdır. GSK-3 β , AH'de beyinde mikrogliya ve astrositlerin yoğun aktivasyonundan kaynaklanan nöroinflamasyonun bir düzenleyicisi olarak kabul edilmektedir (16). GSK-3 β aktivasyonunun inflamatuvar yanıtı arttırdığı gösterilmiştir.

Araştırmalar GSK-3'ün AH'deki nöroinflamasyondan sorumlu olan toksik A β üretimine ve NFY'lerin oluşmasına yol açtığını göstermektedir (17, 18). Ayrıca GSK-3'ün kısa süreli belleğin uzun süreli belleğe dönüştürülmesinde, yeni nöron hücresi oluşmasında görev aldığı gösterilmiştir (19, 20). AH'nin fare modellerinde yapılan çalışmalarda GSK-3'ün anormal aktivasyonunun dendritik diken kaybına yol açtığı rapor edilmiştir. GSK-3'ün bu etkilerinin ortaya çıkmasında beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) ve siklik-AMP yanıt elemanı bağlayıcı protein (CREB) ekspresyonundaki artışın rol oynadığı ileri sürülmektedir. (21). Yapılan çalışmalarla her ne kadar GSK-3'ün geç başlangıçlı AH fizyopatolojisinde rol oynadığına dair kanıtlar bulunmuş olsa da, etki mekanizmaları net bir şekilde ortaya koyulamamıştır (20, 22). Günümüzde mevcut olan tedavi yaklaşımında amaç hastalığın semptomlarını azaltmak, ilerlemesini yavaşlatmak ve hastanın günlük yaşam aktivitelerindeki performansını iyileştirmektir (14, 23). GSK-3'ün beyinde AH'ye yol açan sinyal yolları üzerinden etki mekanizmalarının açığa çıkarılmasının, hem hastalığı ortaya çıkaran sebeplerin daha iyi anlaşılmasına hem de yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkıda bulunacağı düşünülmektedir (22).

Bugün Alzheimer hastalarına uygulanan farmakolojik tedavinin olumlu etkilerinin çok sınırlı olması, araştırmacıları farmakolojik olmayan yöntemleri de araştırmaya yöneltmektedir (24). Buna paralel olarak, farmakolojik olmayan bir yöntem olan egzersizin, yaşa bağlı nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde etkili bir yöntem olabileceği düşünülmekte ve bu alanda araştırmalar devam etmektedir. Örneğin egzersizin, BDNF aracılığıyla nöron hasarına karşı koruyucu olabileceği, beyinde plastisiteyi artırabileceği ve böylece bilişsel bozukluklar üzerinde olumlu etkileri olabileceği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (25, 26). Farelerde skopolamin ile amnezi modeli oluşturulan bir çalışmada, skopolamin uygulanan hayvanların uzamsal öğrenme yeteneğinin bozulduğu ve koşu bandı egzersizi ile bu bozulmanın iyileştiği gösterilmiştir. Aynı çalışmada, koşu bandı egzersizinin sağlıklı farelerde de uzamsal öğrenme yeteneğini artırdığı bildirilmiştir (27). Çalışmamızda kesin ve etkili bir tedavisi bulunmayan, moleküler mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamış AH'de, fiziksel egzersizin koruyucu olabileceği düşünülerek hipotezimiz “skopolamin ile oluşturulmuş AH modelinde uzun süreli egzersizin duygusal-bilişsel davranışlar ve sinyal yolları üzerinde koruyucu etkisi vardır” şeklinde kuruldu. Sunulan çalışmamızda, skopolaminle oluşturulan Alzheimer modelinde, skopolaminin duygusal-bilişsel davranışlar üzerinde ve hücresel düzeyde yaptığı değişikliklere karşı uzun süreli egzersizin koruyucu etkisinin araştırılması amaçlandı.

Bu amaçla, 12 hafta boyunca koşu bandı egzersizi yaptırılan Balb/c farelerde, egzersizin son 28 gününde skopolamin uygulamasının bilişsel davranışlar üzerine etkisi moris su havuzu testi (MWM) ile duygusal davranışlar ve lokomotor aktivite üzerine etkisi açık alan testi ile değerlendirildi. Hücresel düzeyde de, hipokampus ve prefrontal kortekste western blot yöntemiyle BDNF, Tirozin reseptör kinaz-B (TrkB) ve fosforile GSK-3 β (p-GSK3 β ^{Ser389}) düzeyleri, immünohistokimyasal yöntemle APP ve A β -40 seviyeleri araştırıldı.

2. GENEL BİLGİ

2.1.Alzheimer Hastalığı Fizyopatolojisi

AH, çoğunlukla görsel ve uzamsal bozulma, motor becerilerde aksaklık ve belirgin epizodik bellek kaybının görüldüğü ilerleyici bir klinik tablodur. Hastalara çeşitli bellek testleri yapıldığında hipokampal devrenin işlev kaybının göstergesi olan, öğrenme bozukluğu, hızlı unutma, zayıf ve gecikmiş hatırlama görülmektedir (28).

AH'de en yaygın patolojik bulgu A β birikimiyle oluşan senil plaklardır. A β , APP'nin sekretazlar tarafından ardışık iki bölünme geçirmesiyle meydana gelmektedir (12). A β plakları neokorteks, posterior singulat, prekuneus ve limbik korteksin asosiyasyon alanlarında birikim göstermektedir (29, 30). Hücre dışında biriken nörotoksik A β plakları mitokondriyal ve sinaptik hasar oluşturmakta ve tau proteininin hiperfosforilasyonuna yol açarak hücrenin işlevlerini bozmaktadır (9). Bunlara ek olarak inflamasyonla tetiklenen çeşitli hücreler ve moleküler sinyal yolları A β birikimine neden olmaktadır (31, 32). Beyinde dentat girustaki nörogenez süreci sinaptik plastisite ve öğrenme-bellek için çok önemlidir, AH'de nörogenez süreçlerinde de değişiklikler meydana geldiği bildirilmektedir (33). Nörotransmitterler beyinde bilginin depolanması ve iletilmesini sağlayan kimyasal habercilerdir. AH'de, başta asetilkolin (ACh) olmak üzere baskılayıcı veya uyarıcı çeşitli nörotransmitterlerin sentezi ve/veya salınımının değiştiği bildirilmektedir (34). ACh'nin öğrenme-bellek süreçleri ve nöral plastisitede önemli role sahip olduğu bilinmektedir (34, 35). Slotkin et al. (36) yaptıkları çalışmada, AH'de kolin asetiltransferaz (ChAT) enzim aktivitesinde azalma ve ACh sentezinde azalma olduğunu bildirmişlerdir. Özetle AH'ye yol açan etkenler hala tartışma konusu olmakla birlikte kolinerjik işlev bozukluğu, A β birikimi, tau hiperfosforilasyonu, inflamasyon, DNA ve mitokondriyal hasarın hastalığın oluşmasında katkısı bulunmaktadır (2, 13).

2.1.1.Kolinerjik Hipotez

Alzheimer hastalarının beyinde kolinerjik aktivite kaybının yaygın bir şekilde gözlenmesine dayanan kolinerjik hipotez AH'yi açıklamak için öne sürülen ilk teoridir. Bu teori günümüzde hafif ve orta şiddetli Alzheimer tedavisi için kullanılan ilaçların

geliştirilmesine ön ayak olmuştur (37). Asetilkolinin aktiviteye bağlı nöroplastisite ve kortikal duyu alanlarının modülasyonunda yer aldığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (38, 39). Ayrıca kortekse olan kolinerjik girdilerin hasarında, dikkat ve öğrenme davranışının bozulabildiği bildirilmiştir (40, 41).

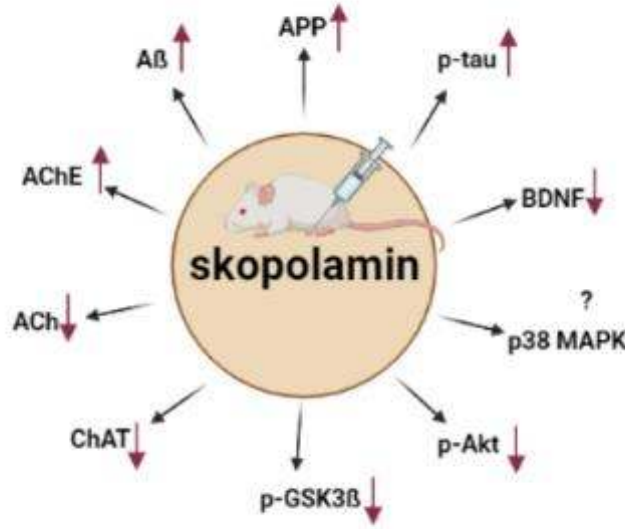
Merkezi sinir sisteminde yaygın olarak bulunan asetilkolin, korteks, bazal gangliyonlar ve bazal ön beyinde aktivite gösteren ana nörotransmitterdir (38, 42). Asetilkolin, öğrenme-bellek, dikkat, stres yanıtı, uyku-uyanıklık gibi birçok önemli fizyolojik süreçte rol oynamaktadır (40). AH'deki kolinerjik kayıp, meynertin bazal çekirdeği (NBM) kolinerjik nöronlarının ve bunların serebral kortekse yansıttığı aksonların dejenerasyonuna dayanmaktadır. Bununla birlikte, serebral korteksin nikotinik ve muskarinik reseptörleri de değişikliğe uğramaktadır (38). Yeni bilgilerin edinilmesi, depolanması ve kullanılması yeterli kolinerjik ilettime bağlıdır (43, 44). Dolayısıyla kolinerjik iletimdeki aksaklıklar bilişsel ve duygusal davranışları büyük ölçüde etkileyebilmektedir.

Merkezi sinir sistemi (MSS)'nde genç deneklerde skopolamin uygulanarak bloke edilen kolinerjik aktivitenin, yaşlı deneklerdeki gibi bellek bozukluğuna neden olabildiği ve bu bozukluğun bir kolinerjik agonist olan fizostigmin uygulaması ile tersine çevrilebileceği bildirilmiştir (45, 46). Bu çalışmalar asetilkolinesteraz (AChE) inhibitörlerinin de tedavi amacıyla kullanılmasına yol açmıştır. Donepezil, rivastigmin ve galantimin günümüzde hafif ve orta şiddetli Alzheimer tedavisinde kullanılan AChE inhibitörleridir ancak uygulanan bu tedavilerin bilişsel aktivite ve genel işlevsellikte gelişmeler göstermesine rağmen bu kazanımların kalıcı olmadığı ve bilişsel bozulmanın devam ettiği bildirilmektedir (46, 47).

Kolinerjik fonksiyonun öğrenme ve bellek üzerindeki önemi 40 yıl kadar önce ilk olarak Deutsch tarafından skopolamin gibi muskarinik reseptör antagonistleri kullanılarak gösterilmiştir (48). Skopolaminin merkezi sinir sistemindeki etkilerini araştıran ilk deneyler 1950'lerde rapor edilmiştir. Seçici olmayan muskarinik reseptör antagonisti skopolamin, deneysel olarak bilişsel eksiklikleri indüklemek için nöropsikofarmakoloji alanında kullanılmaktadır (49). Skopolamin muskarinik reseptörler için yüksek seçiciliğe sahip olmakla birlikte yüksek dozlarda nikotinik reseptörleri de bloke edebilmektedir (49, 50). Muskarinik reseptörlerin M1,M2,M3,M4 ve M5 olarak adlandırılan beş alt grubu bulunmaktadır. Tüm muskarinik reseptörler G

proteini eşleniktir. M1, M3 ve M5 Gq'ye bağlanarak fosfolipaz C (PLC)'yi aktive ederken, M2 ve M4, Gi/o'ya bağlanarak adenilat siklazı veya bazı iyon kanallarını etkilemektedir. M1 ve M5 reseptörleri MSS de daha yaygın bulunduğundan skopolaminin etkilerine bu reseptörlerin aracılık ettiği düşünülmektedir (49). Skopolamin muskarinik reseptörleri seçici olmayan bir şekilde bloke ederek MSS'de ve periferde birçok fizyolojik fonksiyonu etkileyebilmektedir. Periferde M3 reseptörleri aracılığıyla tükürük salgısında azalmaya ve midriyazise neden olmaktadır. M2, M3 reseptörleri aracılığıyla düz kas üzerindeki etkileri sonucunda konstipasyon, serebral kan akımı ve glikoz tüketimi üzerinde değişikliklere neden olmaktadır (49). Kolinerjik iletim duygusal ve bilişsel işlevlerdeki etkilerini çoğunlukla M1 reseptörü üzerinden göstermektedir. Skopolaminin lokomotor aktiviteyi etkilediği, duygusal ve bilişsel işlevleri bozduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada skopolaminin amigdala infüzyonunun lokomotor aktiviteyi artırdığı gösterilmiştir (51). Bir başka çalışmada skopolaminin hipokampusa infüzyonu, lokomotor aktiviteyi etkilememiş ancak anksiyete davranışını artırmıştır (52). Skopolamin uygulanan sıçanların, açık alan testinde hiperaktivite ve MWM testinde bellek bozukluğu gösterdiği bildirilmektedir (53).

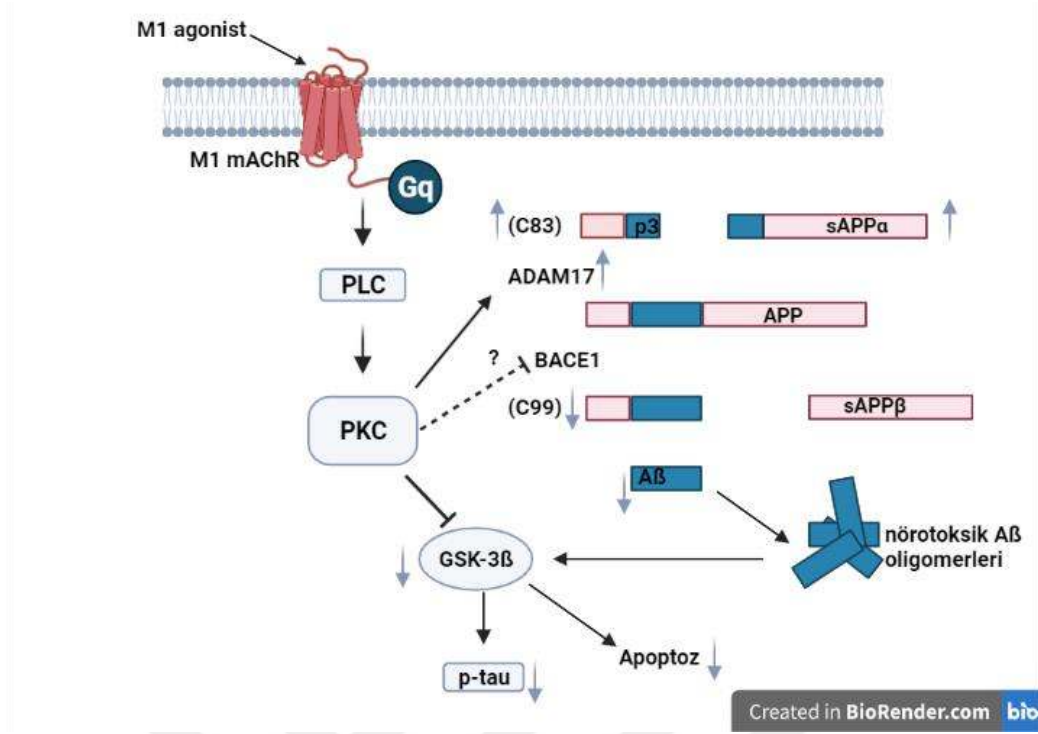
Skopolamin serebral korteksteki ACh bağlanma bölgelerini bloke ederek yüksek konsantrasyonlarda ACh salınımına neden olmaktadır. Yüksek seviyede ACh salınımı hipokampusta sinir hücrelerine zarar vererek öğrenme ve bellek bozukluğuna yol açmaktadır. Bu nedenle skopolamin deneysel çalışmalarda, AH'deki kortikal kolinerjik nöron kaybı ve kolinerjik işlevlerdeki bozulmanın farmakolojik bir modeli olarak kullanılmaktadır (54). ACh, kolin asetiltransferaz tarafından sentezlenmekte ve asetilkolin esterase (AChE) ve butirilkolinesteraz tarafından yıkılarak etkisiz hale getirilmektedir. Skopolamin uygulaması, AChE ve butirilkolinesteraz aktivitelerinde önemli bir artışa neden olurken, ChAT aktivitesini azaltmaktadır (48, 55). Erkek Balb/c farelere 1 mg/kg (i.p.) dozda skopolamin uygulanmasının beyin dokusundaki ACh seviyesini kontrollere kıyasla anlamlı ölçüde düşürdüğü bildirilmektedir (56). Ayrıca skopolamin, kolin asetiltransferazın ekspresyonu ile birlikte aktivitesini de azaltmaktadır (48) (Şekil 1 (57)).



Şekil 1. Skopolaminin olası moleküler etkileri(48).

ACh: Asetilkolin, AChE: Asetilkolinesteraz, ChAT: Kolinasetiltransferaz, Aβ: Amiloid beta, APP: Amiloid prekürsör protein, p-tau: Fosforile tau, BDNF: Beyin kaynaklı nörotrofik faktör, p38MAPK: Mitojenle aktive edilmiş protein kinaz, p-Akt: Fosforile Akt, p-GSK3β: Fosforile glikojen sentaz kinaz3β.

AH'de görülen toksik Aβ birikimi, kolinerjik fonksiyonun bir düzenleyicisi olarak da bilinen, GSK-3β ekspresyonunda artışa neden olmaktadır (58, 59). Aynı zamanda GSK-3β da Aβ birikimine yol açan süreçleri tetikleyebilmektedir. GSK-3β, Aβ üretiminin yukarı regülasyonu ve asetilkolin sentezinin baskılanması yoluyla AH patogenezinde rol oynamaktadır (48). Hipokampus ve prefrontal kortekste bolca bulunan M1 reseptörlerinin APP'nin bölünme sürecini etkilediği gösterilmektedir. M1 reseptör aktivasyonu PKC yolağı üzerinden, sAPPα'nın artmasına ve BACE'yi inhibe ederek Aβ'nın azalmasına neden olurken, GSK-3β'yı inhibisyonunu sağlayarak Aβ'nın neden olduğu apoptozu ve p-tau'yu azaltmaktır (60, 61) (Şekil 2 (57)). Skopolamin apoptoz ve hücre farklılaşmasıyla ilişkili gen ekspresyonlarını etkileyerek kortikal kolinerjik nöronların dejenerasyonuna ve işlev bozukluğuna yol açmaktadır (53).



Şekil 2. Muskarinik reseptör (M1) aktivasyonu ile APP'nin bölünme ilişkisi .

mAChR: Muskarinik asetilkolin reseptörü, PLC: Fosfolipaz C, PKC: Protein kinaz C, GSK3β: Glikojen sentaz kinaz3β, p-tau: Fosforile tau, Aβ: Amiloid beta, ADAM17: tümör nekroz faktörü-α-dönüştürücü enzim.

2.1.2. Amiloid Beta Hipotezi

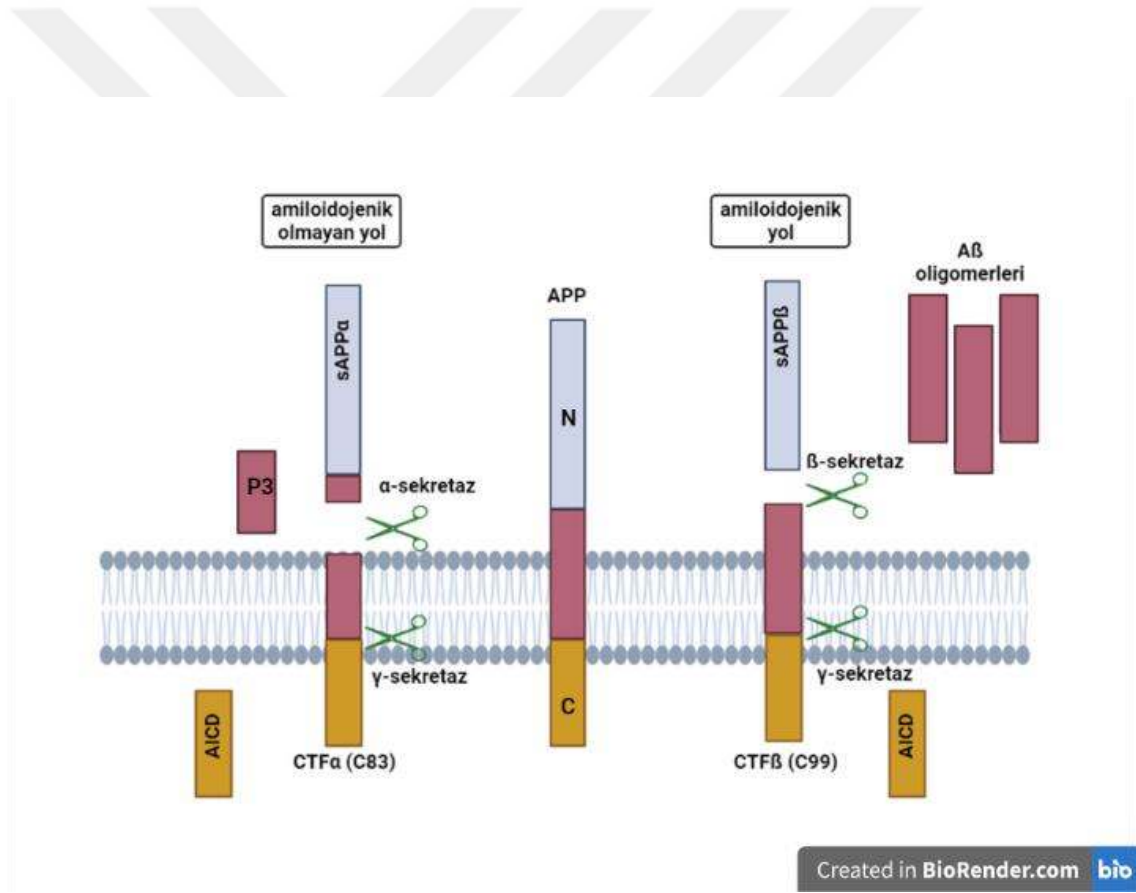
Alzheimer hastalığının patogenezinin dair çok sayıda hipotez bulunmakla birlikte en yaygın kabul edileni amiloid kaskad hipotezidir (12). Bu hipoteze göre hastalığın patogenezinin başlatan Aβ oluşumudur. Aβ'nin oluşumu ise APP'nin çeşitli proteolitik enzimler tarafından bölünmesiyle gerçekleşmektedir (62, 63). APP birçok dokuda eksprese edilen ve beyinde nöronal gelişim, sinyalizasyon, hücre içi taşıma ve nöronal homeostazis gibi çok sayıda önemli fizyolojik aktivitede rol oynayan bir integral zar proteinidir (12). APP, membranı boydan boya geçen bir alandan, büyük bir hücre dışı glikolize edilmiş N-terminalinden ve daha kısa bir sitoplazmik C-terminalinden oluşmaktadır. Farklı aminoasit uzunluklarına (695-770) sahip izoformları bulunmaktadır. Esas olarak nöronlar tarafından üretilen ve beyinde en çok bulunan APP659 formudur (12, 64).

APP, α -, β - ve γ -sekretazlar tarafından proteolize uğrayan bir öncü proteindir (65). İlk aşamada α - veya β -sekretaz tarafından bölünmesine göre süreç amiloidojenik veya amiloidojenik olmayan yolak olarak iki farklı yola ayrılır. APP ilk olarak α -sekretaz tarafından bölündüğünde membrana bağlı α -C terminal fragmanı (CTF'ler) oluşmaktadır. Bu bölünme sonucunda, suda çözünebilen sAPP α hücre yüzeyinden serbest bırakılır ve geriye 83 amino asitli bir C-terminal APP fragmanı (C83) kalır. Amiloidojenik olmayan yolağın sonraki aşamasında, CTF α 'nın γ -sekretaz tarafından bölünmesi ile hücre dışı P3 (3 kDa) ve APP hücre içi alanı (AICD) oluşmaktadır (12). sAPP α üretimi, elektriksel aktiviteye ve muskarinik asetilkolin reseptörlerinin aktivasyonuna yanıt olarak arttığından, nöronal aktivitenin APP'nin α -sekretaz bölünmesini arttırdığı ileri sürülmektedir (12, 66). APP'nin ilk olarak β -sekretaz tarafından bölündüğü amiloidojenik yolakta, bölünme sonucunda oluşan N-terminal (sAPP β) hücre dışından serbest bırakılırken, membrana bağlı β -C terminal fragmanları (CTF β veya C99) γ -sekretaz tarafından bölünerek hücre dışı A β 'yı (4 kDa) ve AICD'yi meydana getirmektedir. Sonrasında 99 aa'li C terminal fragmanı internalize edilerek γ -sekretaz ile daha çok işlemde geçmekte ve farklı aa uzunluklarındaki fragmanlarla birlikte nihai A β formları olan A β -40 ve A β -42'yi oluşturmaktadır (12) (Şekil 3 (57)).

APP'nin sekretazlar tarafından gerçekleşen bu bölünme süreçleri sağlıklı kişilerde de meydana gelmektedir. Ancak Alzheimer hastalarında A β birikimine neden olan amiloidojenik yolak daha aktif olmakta veya A β 'nın temizlenme mekanizması bozulmaktadır (62, 63). Ayrıca APP (21.kromozom), PSEN1 (14.kromozom) ve PSEN2 (1.kromozom) genlerindeki mutasyonların da, öncü proteinin proteolitik süreçlerini A β -42 seviyeleri nispeten daha yüksek olacak şekilde değiştirdiği bilinmektedir (12). Bu genlerdeki mutasyonlar erken başlangıçlı olarak da tanımlanan otozomal dominant geçişli ailevi AH'ye neden olmakta ve hastalığın başlangıç yaşı 20'li yaşlara kadar erken olabilmektedir (62).

Amiloid hipotezine göre; A β 'nın üretiminde artma ve/veya temizlenmesinde azalmayla birlikte, APP, PSEN1 ve PSEN2 genlerindeki mutasyonlar sonucu A β -42/A β -40 oranında artma meydana gelmektedir. A β -40 ve A β -42 A β 'nın iki temel formudur. Her iki formu da nörotoksik olmasına rağmen A β -42 daha güçlü hidrofobik özellikte olduğundan daha çok birikme eğilimi göstermektedir (12). A β -42'de görülen bu nispi artış daha sonra sinaptik fonksiyonda şiddetli ve kalıcı değişikliklere neden

olan oligomer oluşumunu artırmaktadır. İlk başlarda beyin parankiminde diffüz plaklar şeklinde görülen A β -42 formu daha sonra yerini A β fibrillerine bırakmakta, bu durum mikrogliya ve astrosit aktivasyonu ile lokal bir inflamatuvar yanıtı neden olmaktadır. Bunun sonucunda sinaptik yapıda bozukluk, oksidatif stres ve iyonik dengede değişiklikler meydana gelmektedir. Kinaz ve fosfatazların aktivitesinin değişmesiyle oluşan NFY'ler, ve aksonal taşınma gibi önemli hücresel aktivitelerin bozulmasına yol açmaktadır. Birbirini tetikleyerek ilerleyen bu olaylar sonucunda, beyinde hücre ölümüne neden olan yaygın sinaptik ve nöronal fonksiyon bozukluğu gerçekleşmektedir. Sonuçta A β plakları ve NFY'lerin gözlendiği ilerleyici bir demans tablosu ortaya çıkmaktadır (63, 67).



Şekil 3. APP bölünme mekanizması.

sAPP: çözülebilir amiloid prekürsör protein, CTFα: C-terminal fragmanları α, CTFβ: C-terminal fragmanları β, AICD: Amiloid İntrasellüler Alanı

2.2. Alzheimer Hastalığı Risk Faktörleri

AH'nin kişide henüz semptomlar görülmeden uzun bir süre önce gelişmeye başladığı bilinmektedir. Uzun süren klinik öncesi dönemi olduğundan, hastalığın önlenmesi veya geciktirilebilmesi açısından hangi risk faktörlerinin hastalığın patolojisinde rol oynadığının belirlenmesi önemlidir (3). Geç başlangıçlı AH'de genetik ve çeşitli çevresel faktörler yer almaktadır. Bu faktörler AH'deki A β birikimi, inflamasyon ve nörodejenerasyondan sorumludur (12). Yaşlanma, başta AH olmak üzere birçok nörodejeneratif hastalık için temel risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Yaşlanan nöronlarda çoğunlukla mitokondriyal hasar ve işlev bozukluğu ortaya çıkar ki bunlar hem normal yaşlanma hem de nörodejeneratif hastalık süreçleriyle de ilişkilidir (13, 68). Ailede AH öyküsünün varlığı ve APOE geninin ϵ 4 alleleline sahip olmak da AH geliştirme riskini artırmaktadır (11). ApoE, kolesterolün mobilizasyonu ve metabolizmasında rol oynayan bir serum proteindir. ϵ 2, ϵ 3 ve ϵ 4 olarak üç aleli bulunmaktadır. ϵ 4 aleli AH riskinin artmasına neden olurken, ϵ 2 aleli'nin ise hastalığa karşı koruyucu olduğu gösterilmektedir. Amiloid plaklarda yüksek seviyede bulunan ApoE'nin ϵ 4 alelinin diğer alellere göre A β 'nın klirensini azalttığı ve A β plak birikimiyle ilişkili olduğu bildirilmektedir (28, 69). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, geç başlangıçlı demans ve AH ile ilişkili potansiyel olarak değiştirilebilir birkaç risk faktörünün varlığı gösterilmektedir. Aynı zamanda dünya genelinde AH vakalarının %35-40'ının önlenabilir ve değiştirilebilir faktörlere bağlı olduğu bildirilmektedir (1, 2). Bazı çalışmalar kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıkların artan demans ve AH riski ile ilişkili olduğunu göstermektedir (11, 70). Depresyon, yalnızlık, stres, uyku bozuklukları gibi çeşitli psikososyal faktörlerin AH riskini artırdığına dair kanıtlar yeterli düzeyde olmamakla birlikte bu alandaki çalışmalar giderek artmaktadır. Sedanter yaşam, düşük eğitim düzeyi, sosyal ve bilişsel aktivite azlığı, sağlıksız beslenme, sigara ve alkol kullanımının demans ve AH için birer risk faktörü olduğu çalışmalarda gösterilmektedir (11).

Epidemiyolojik çalışmalar AH ölüm oranları ile fiziksel aktivite azlığı arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermektedir (1, 71). Çok sayıda çalışmada düzenli yapılan fiziksel aktivite ile azalmış demans ve AH riski ilişkilendirilmektedir. Fiziksel aktivitenin psikolojik stresi, vasküler ve metabolik risk faktörlerini iyileştirdiği gösterilmektedir (11, 72). Bununla birlikte yapılan egzersizin türü, süresi ve şiddetinin

AH riskini azaltmada nasıl bir farklılık yarattığı konusu belirsizliğini korumaktadır (1, 73).

2.3. Glikojen Sentaz Kinaz-3 (GSK-3)

Glikojen sentaz kinaz-3 (GSK-3) tüm dokularda bulunan, yapısal olarak aktif bir serin-treonin kinazdır. 1980 yılında, glikojen sentazı fosforile edebilen beş enzimden biri olarak ilk defa iskelet kasından izole edilmiştir (20, 74). GSK-3, glikojen sentezinde temel düzenleyici olarak 1984'te tanımlanmıştır (75). GSK-3, glukoz ve protein metabolizmasını benzer mekanizmalarla düzenlemektedir. Glukoz homeostazı insülinin, glukoz alımını ve depolanmasını artırması yoluyla sağlanmaktadır. Glukoz başlıca glikojen olarak depolanır ve glikojen metabolizması glikojen sentaz ve glikojen fosforilaz tarafından düzenlenir (76). Fizyolojik koşullarda GSK-3, glikojen sentazı baskılayarak glikojen sentezini inhibe etmektedir. İnsülin uyarısı, IR/IRSs/PI3K/Akt yolunu aktive ederek, Ser9/Ser21 üzerinden GSK-3'ün fosforilasyonuna yani inhibisyonuna neden olur. Dolayısıyla insülin ile aktive olan bu yolak glikojen sentezinin uyarılmasına yol açar (77).

GSK-3 iki farklı gen tarafından kodlanmakta, GSK3- α ve GSK3- β olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır (19, 78). Bu izoformlar farklı genler tarafından kodlanmakta fakat yapısal olarak %98 oranında benzerlik göstermektedir (19, 79). Yüksek orandaki yapısal benzerliğe rağmen bu iki izoformun farklı işlevsel özelliklere sahip olduğu, GSK-3 β 'nın MSS'de daha yüksek oranda eksprese edildiği bilinmektedir (80). GSK-3 beyinde nörogenez, hücre göçü, akson büyümesi ve sinaptik plastisite gibi önemli gelişimsel süreçleri düzenlemektedir (81, 82). GSK-3 aktivitesi, Serin/Treonin kinazlar, Tirozin kinazlar ve fosfatazlar tarafından düzenlemektedir. Uyarılmamış hücrelerde GSK-3 β yapısal olarak aktiftir, dışardan gelen sinyallere yanıt olarak hızlı ve geçici bir inhibisyona uğramaktadır (80, 83). GSK-3, büyüme faktörleri, nörotransmitterler ve inflamatuvar sitokinler gibi birçok farklı hücre dışı uyarıya yanıt vermektedir. Bu uyarılar farklı sinyal yollarının aktivasyonuna neden olarak belirli fizyolojik sonuçlara yol açmaktadır (77). GSK-3 β 'nin aktivasyonu, üzerindeki inhibitör bölgenin protein fosfataz 1 (PP1) ve protein fosfataz 2A (PP2A) tarafından defosforile edilmesi ve/veya tirozin-216 otofosforilasyonu ile gerçekleşmektedir. GSK-3 β 'nin inhibitör bölgesinin, protein kinaz B (PKB), protein kinaz A (PKA), protein kinaz C

(PKC) ve ribozomal S6 kinaz dahil olmak üzere birçok kinaz tarafından Ser9 üzerinden fosforile edilmesi GSK-3 β 'nın inhibisyonuna neden olmaktadır (19).

Hücrelerin insülin ile uyarılması, fosfoinositid-3 kinaz (PI3K) bağımlı mekanizma yoluyla PKB aktivasyonuna ve sonrasında da GSK-3 β 'nın Ser9, GSK-3 α 'nın Ser21 üzerinden fosforilasyonuna neden olmaktadır. Ser9/21 üzerinden gerçekleşen bu fosforilasyonlar GSK-3'ün inhibisyonuna yol açmaktadır (77). Ser9 fosforilasyonu, çoğu hücrede yapısal olarak bulunmakla birlikte, insülin, büyüme faktörleri ve hücresel stres gibi sinyaller ile artabilmektedir (83). Serin fosforilasyonunun inhibe edildiği *knockout* farelerde *in vitro* ve *in vivo* nöral sağkalımın etkilenmediği bildirilmiştir. Bu durum beyinde GSK-3 β 'yı düzenleyen alternatif bir mekanizmanın varlığını düşündürmektedir (84, 85). p38 mitojenle aktive olan protein kinazın (MAPK), GSK-3 β 'nın Ser389 bölgesinde bir substratı olduğu gösterilmiştir (86). p38 MAP kinaz tarafından Ser389 fosforilasyonunun GSK-3 β 'yı inhibe ettiği bildirilmektedir (19, 87). Bu fosforilasyonun, Ser9'daki Akt aracılı fosforilasyondan farklı olduğu ve beyin dokusunda daha çok bulunduğu gösterilmiştir (86). GSK-3 β 'nın Ser389 fosforilasyonu fizyolojik koşullar altında beyinde fazla miktarda bulunmasına rağmen, bu mekanizmanın beyindeki işlevi tam olarak bilinmemektedir (86). T ve B lenfositlerde ise DNA hasarıyla uyarılan GSK-3 β 'nın Ser389 fosforilasyonunun temel işlevinin hücre sağkalımını gerçekleştirmek olduğu bildirilmiştir (88).

Alzheimer hastalarında ölüm sonrası yapılan incelemelerde beyinde artan GSK-3 β düzeyinin, amiloid plaklar ve NFY'ler ile bir arada görüldüğü bildirilmektedir (87, 89). GSK-3 β 'nın tau hiperfosforilasyonuna neden olarak NFY oluşumuna katkıda bulunduğu bilinmektedir (90, 91). Philip ve et al. (90) yaptıkları çalışmada, GSK-3 β 'nın, BACE1 gen ekspresyonunu yukarı doğru düzenleyerek A β üretimini kolaylaştırdığını göstermiştir. AH'nin hayvan modellerinde ve hücre kültürü çalışmalarında tedavi amaçlı bazı GSK-3 inhibitörleri kullanılmaktadır. Bunlardan biri bipolar bozukluk tedavisinde de yaygın olarak kullanılan, aynı zamanda bir GSK-3 inhibitörü olan lityumdur (92, 93). AH'nin fare modellerinde yapılan çalışmalarda, GSK-3'ün lityum ile inhibe edildiği, A β patolojisini iyileştirdiği ve bilişsel fonksiyonu geliştirdiği bildirilmektedir (93, 94). Lityumun AH'de faydalı etkileri bulunsa da, özellikle yaşlılarda nörotoksosite gibi ciddi yan etkilere yol açtığı ve sınırlı terapötik etkileri

olduğundan insanlarda kullanım için güçlü bir ilaç adayı olmadığı kabul edilmektedir (93, 95).

GSK-3 β 'nın kolinerjik iletim üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, ChAT ve AChE enzim seviyeleri analiz edilmiştir. Bu çalışmada GSK-3 β 'nın Meynert'in bazal çekirdeğinde ve frontal kortekste, ChAT seviyesini düşürdüğü böylece ACh düzeylerinde bir azalmaya neden olduğu bildirilmektedir (96). Aynı çalışmada GSK-3 β 'nın, ChAT'nin hem aksonal taşınmasını hem de ekspresyonunu bozduğu ve böylece ACh seviyelerini azalttığı bildirilmektedir. GSK-3 β yetişkin hipokampal nörogenezin de önemli düzenleyicilerinden biridir. Yapılan bir çalışmada farelerde gönüllü egzersizin, yetişkin hipokampal nörogenezde GSK-3 β aracılığıyla artışa yol açtığı ve GSK-3 β 'nın aktivasyonu ile ilişkili olarak bilişsel işlevleri geliştirdiği gösterilmiştir (97). AH'de sinaptik işlev bozukluğu ve sinaptik kayıplar bilişsel bozukluklara ve bellek kaybına neden olmaktadır. GSK-3 β , hem presinaptik hem de postsinaptik seviyelerde bilişsel işlevlerin modülasyonunda rol oynamaktadır. Presinaptik alanda nörotransmitterlerin salınımını düzenlerken, postsinaptik alanda sinaptik proteinlerin ekspresyonunu modüle etmektedir. GSK-3 β aktivitesinin hem farmakolojik hem de genetik olarak manipüle edildiği bir çalışmada, GSK-3 β 'nın aşırı aktivasyonunun işlevsel ve yapısal değişikliklere (presinaptikte glutamat salınımını azaltarak, postsinaptik alanda protein sentezini azaltarak) yol açarak hipokampusta uzun süreli potansiyalizasyonu (LTP) inhibe ettiği gösterilmiştir (98).

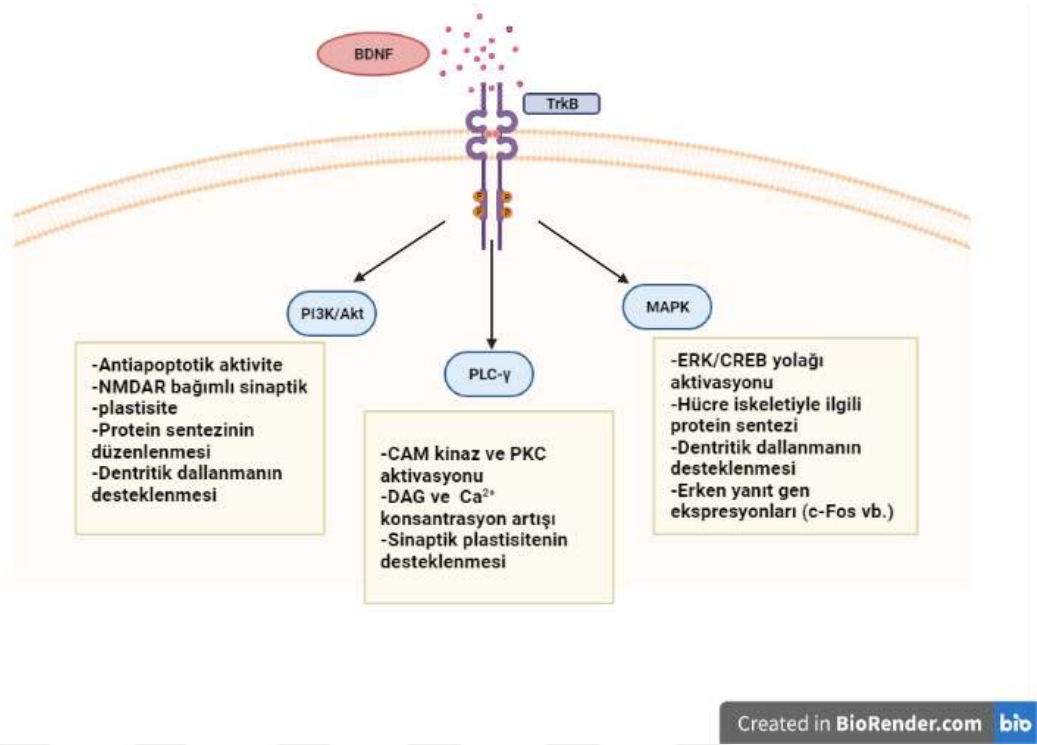
2.4. Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör (BDNF)

Nöral gelişim sırasında NGF (sinir büyüme faktörü), BDNF, NT-3 (nörotrofik faktör-3), NT-4/5 (nörotrofik faktör-4/5) ve NT-6 (nörotrofik faktör-6) gibi çeşitli nörotrofik faktörlerin varlığı gerekmektedir. BDNF, bu büyüme faktörlerini içeren nörotrofin ailesinin bir üyesi olmakla birlikte memeli beyinde en bol bulunan nörotrofindir (99). İlk olarak 1989 yılında Yves-Alain Barde ve Hans Thoenen tarafından domuz beyninden izole edilmiş, kısa zamanda da biyokimyasal yapısı ortaya konulmuştur (99, 100). Nörotrofinler arasında sinaptik plastisite, nöronal sağkalım ve nöral farklılaşmanın ana düzenleyicisi olarak kabul edilen BDNF, nörolojik bozukluklar için geliştirilen tedavilerde hedef molekül haline gelmiştir (101, 102).

Bu nörotrofik faktörler etkilerini tirozin kinaz ve p75 (pan-nörotrofik reseptörü) reseptörleri aracılığıyla göstermektedir. p75 reseptörü tüm nörotrofinler için düşük afiniteli bir reseptör olarak tanımlanırken pro-nörotrofinler için yüksek afiniteli bir reseptör olarak kabul edilmektedir. BDNF öncelikle bir öncü formdan pro-BDNF'ye daha sonra hücre içi/hücre dışı proteazlar tarafından matur BDNF (mBDNF)'ye dönüştürülür. Bu dönüşüm mBDNF/TrkB sinyal yolağı için önemli bir adımdır. Çünkü pro-BDNF ile mBDNF'nin yüksek afiniteli reseptörlerine bağlanması MSS üzerinde zıt etkiler oluşturmaktadır (99). Pro-BDNF'nin p75 reseptörüne bağlanması c-Jun N-terminal kinaz (JNK) ve kaspaz-3'ün aktivasyonuna yol açarak hücre ölümüne neden olan süreçleri tetiklemekte aynı zamanda beyinde sinaptik işlevleri de olumsuz etkilemektedir. Çalışmalar p75 reseptörünün aktive ettiği bazı sinyal yollarının hipokampal plastisitede yaşa bağlı ortaya çıkan bozukluklara neden olduğunu bildirmektedir (103). TrkB hipokampusta büyük ölçüde eksprese edilmektedir. BDNF beyinde nöral sağkalım, nörogenez, yeni sinapsların oluşması ve farklılaşması gibi işlevlerini TrkB reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirmektedir. TrkB, TrkA ve TrkC birlikte nörotrofin reseptörlerinin tirozin kinaz ailesini oluşturmaktadır. TrkB ilk olarak beyinde yüksek oranda eksprese edilen bir protein-tirozin kinaz olarak tanımlanmıştır. Daha sonra BDNF ve NT4/5 nörotrofik faktörleri için bir sinyal reseptörü olduğu keşfedilmiştir. Tam uzunlukta bir izoform (TK+) ve iki kırpılmış izoformu (TK-: T1 ve T2) olmak üzere merkezi sinir sisteminde üç izoformu bulunmaktadır. BDNF'nin tam uzunluktaki TrkB'ye bağlanması reseptörün sitoplazmik kısımda bulunan tirozin kalıntılarının dimerizasyonuna ve fosforilasyonuna neden olmaktadır. Bu aktivasyon daha sonra MAPK, PLC- γ , PKC ve PI3-K dahil olmak üzere sitoplazmik sinyal yollarının aktivasyonuna yol açmaktadır (104). PI3K/Akt yolağı, antiapoptotik süreçleri tetiklemekte, N-metil D-aspartat Reseptörü (NMDAR)'ne bağımlı sinaptik plastisiteyi modüle etmekte, protein sentezi ve dendritik dallanmayı düzenlemektedir (105). MAPK/Ras sinyal yolu, nöronal farklılaşmada protein sentezini düzenlemektedir (106). Ayrıca bu sinyal yolu, ERK $\frac{1}{2}$ ve CREB aktivasyonu, erken yanıt gen ekspresyonları ve dendritik dallanma için de gereklidir (107). PLC yolağının, Ca^{2+} /kalmodülin bağımlı protein kinazın (CaMK) ve PKC'nin aktivasyonu ile hücre içinde diaçilgliserol ve Ca^{2+} konsantrasyonlarını artırdığı ve PKC aktivasyonunun sinaptik plastisiteyi geliştirdiği bildirilmektedir (106) (Şekil 4) (57).

Deneysel çalışmalar, fiziksel egzersiz, zenginleştirilmiş çevre, beslenme ve metabolik müdahaleler gibi çevresel uyarıların BDNF aracılığıyla nörodejeneratif hastalıkların başlangıcının geciktirilmesinde veya hastalığın seyrinin yavaşlamasında rol oynayabileceği bildirilmektedir. Ayrıca BDNF'nin bu faktörler tarafından uyarılabilen yetişkin hipokampal nörogenezden de sorumlu olabileceğini göstermektedir (108, 109). Fiziksel egzersiz ile beynin AH'den korunabilmesi için nörogeneze ihtiyaç duyulduğu ve bu korumada BDNF'nin gerekli olduğu gösterilmiştir (109, 110). CREB, sinaptik plastisite için gerekli olan genlerin transkripsiyonuna aracılık etmektedir. CREB'nin aktivasyonu ile ilişkili olan, MAPK/ERK, PI3K ve PLC γ /PKC gibi birçok hücre içi sinyal yolu BDNF/TrkB tarafından aktive edilmektedir (111, 112).

AH'nin ilerlediği süreçte nükleus bazalindeki kolinerjik nöronlarda TrkA, TrkB ve TrkC ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (113, 114). Ayrıca A β birikiminin BDNF azalmasıyla yakından ilişkili olduğunu ileri süren deneysel çalışmalar da bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada, A β -42 oligomerlerinin intraserebroventriküler enjeksiyonu sonucunda, BDNF mRNA ve protein ekspresyonlarının azaldığı gösterilmektedir (112, 115). BDNF'nin amiloidojenik olmayan yolağı uyararak APP'nin bölünme süreçlerini düzenlediği bilinmektedir (116, 117). BDNF'nin AH'de kolinerjik nöronlarda azalan ACh salınımını artırdığı bildirilmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalarda BDNF'nin bazal ön beyin kolinerjik nöronlarının sağkalımı ve farklılaşmasını desteklediği rapor edilmiştir (118). Fiziksel aktivitenin ardından BDNF dışında, fibroblast büyüme faktörü ve NGF gibi başka büyüme faktörlerinin de arttığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır ancak bu artışların BDNF'de görüldenden daha az miktarda ve daha kısa süreli olduğu bilinmektedir (119). Bu durum BDNF'yi diğer büyüme faktörlerine göre, egzersizin hipokampus üzerindeki kalıcı etkilerine aracılık eden temel aday olarak görülmesine yol açmaktadır.



Şekil 4. BDNF/TrkB sinyalizasyonu ile aktive olan bazı yolaklar ve etkileri (99).

PI3K: Fosfoinozotid-3-kinaz, PLCγ: Fosfolipaz C gama, MAPK: Mitojenle aktive edilmiş kinaz, NMDAR: N-metil D-aspartat reseptörü, CAM kinaz: kalsiyum kalmodülün bağımlı kinaz, DAG: Diaçilgliserol, ERK: Ekstrasellüler düzenleyici kinaz, CREB: Siklik-AMP Yanıt Elemanı Bağlayıcı Protein, PKC: Protein kinaz C.

2.5. Alzheimer Hastalığı ve Egzersiz

Fiziksel aktivitenin insanlarda yaşa bağlı meydana gelen bilişsel azalmayı önlediği ve bilişsel fonksiyonları geliştirdiği birçok defa gösterilmesine rağmen faydalı etkilerinden sorumlu olan mekanizmalar hala belirsizliğini korumaktadır. Son zamanlarda fiziksel egzersiz, iyi bir yaşlanma için etkili ve ucuz bir seçenek olarak görülmeye başlanmıştır. Egzersizin yaşa bağlı nörodejeneratif hastalıklar için hem önleyici hem de hastalığın seyrini yavaşlatan bir tedavi potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir (120, 121). Araştırmalara göre, hastalığın presemptomatik ve predemans dönemlerinde yapılacak yaşam tarzı değişikliklerinin oluşacak demansların üçte birini geciktirme potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir (122, 123). Egzersizin çeşitli nörotrofik faktörlerin (ör. BDNF, Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü, İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1) ekspresyonunu ve sekresyonunu artırıp

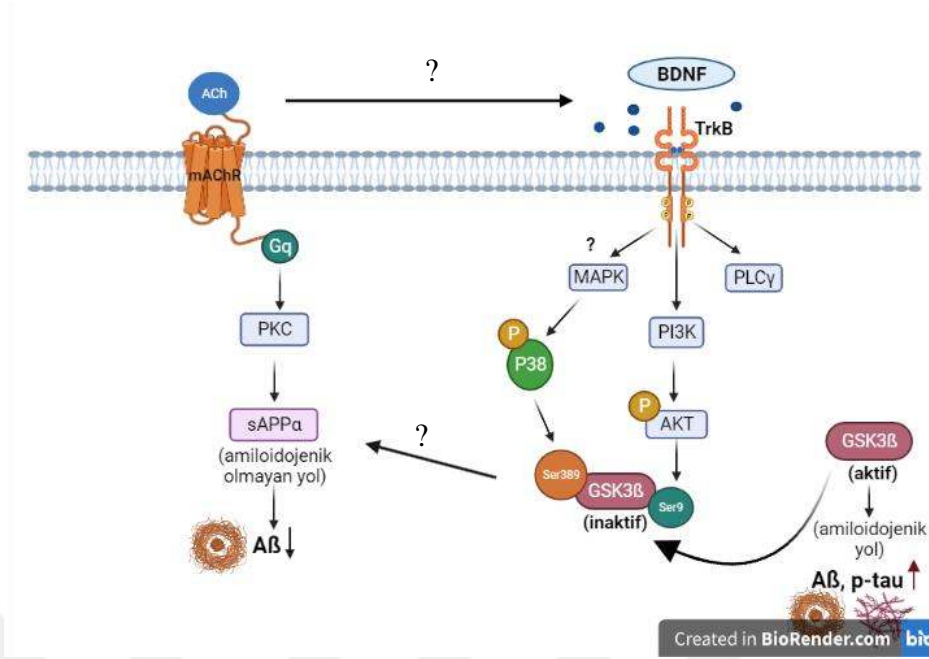
inflamasyonu azaltarak veya kardiyovasküler ve metabolik bazı parametreleri iyileştirerek nöroplastisiteye yol açtığı bildirilmektedir (124).

BDNF, egzersizin beyin üzerindeki faydalı etkilerinin oluşmasında temel rolü oynamaktadır. BDNF/TrkB sinyaliyle aktive olan MAPK, PI3K, PLC- γ , CaMK ve ERK/CREB yolları, sinaptik plastisite ve nöronal sağkalımda önemli rolleri bulunan sinyal yollarıdır (99). BDNF'nin ERK ve PI3K yolları üzerinden nöroprotektif etki gösterdiği bildirilmektedir (125). Ayrıca BDNF Akt'yi fosforilayarak sağkalım ve apoptotik mekanizmalar arasındaki dengede görev almaktadır. Akt, kaspaz-9 inhibisyonu ve GSK-3 β fosforilasyonu ile apoptozu inhibe etmektedir. Böylece GSK-3 β 'nın PI3K, Akt ve PKC tarafından fosforilasyonu hücre sağkalımına neden olurken, GSK-3 β 'nin aktivasyonu apoptotik süreçlere yol açmaktadır (125) (Şekil 5 ve 6 (57)). Hipokampusta azalmış BDNF seviyelerinin nörodejenerasyon, bellek bozukluğu ve AH'de görülen bilişsel işlev bozukluklarıyla, yüksek BDNF seviyelerinin ise bilişsel yıkıma karşı dirençle ilişkili olduğu gösterilmektedir (126). Hayvan modellerinde, gönüllü ve zorunlu koşu egzersizinin ikisinin de hipokampusta yüksek BDNF ekspresyonuna neden olduğu rapor edilmiştir (126, 127).

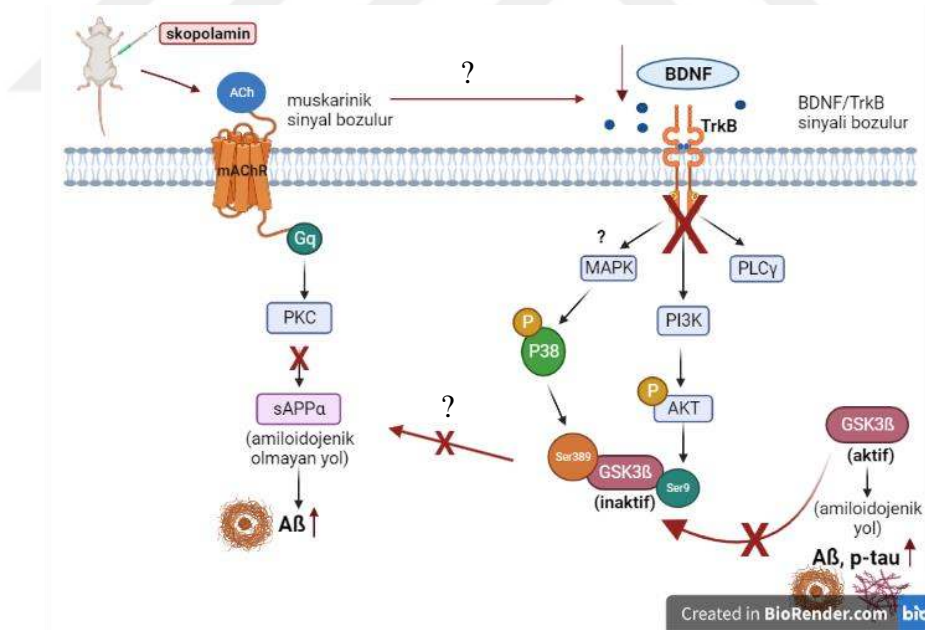
Egzersiz, mRNA ve protein seviyesinde çok sayıda gen ürününü modüle edebilmekte böylece nöronal plastisiteyi destekleyen anatomik, nörokimyasal ve elektrofizyolojik değişikliklere neden olabilmektedir. Bu sebeple egzersizin birden fazla yolun aktivasyonu ile, A β seviyelerini doğrudan veya dolaylı olarak düzenlediği düşünülmektedir (119, 128). Egzersizle aktive olduğu bilinen PKC, MAPK ve PLC sinyal yollarının APP işlenmesini artırabildiği bildirilmektedir (129). Yapılan bir çalışmada egzersizin A β -40 ve A β -42 seviyelerini azalttığı gösterilmiştir. Egzersizin bu etkiyi, BDNF aracılığıyla artan α -sekretaz aktivitesi ile gerçekleştirdiği ileri sürülmektedir. Buna göre artmış α -sekretaz aktivitesi nöroprotektif etkisi olan sAPP α düzeylerinin artmasına ve toksik A β birikiminin azalmasına yol açmaktadır (130). Transgenik farelerde yapılan bir başka çalışmada da artan fiziksel aktivitenin A β düzeyini azalttığı gösterilmiştir. Çalışmada egzersizin bu etkiyi, A β 'nın temizlenmesi için gerekli neprilisin ve IDE (insülin parçalayıcı enzim) gibi enzimlerden bağımsız olarak, APP bölünme süreçlerini A β birikimini azaltacak yönde değiştirerek gösterdiği ileri sürülmektedir (128).

Kısa ve uzun süreli egzersizin hipokampüste BDNF ekspresyonunu artırdığı çeşitli hayvan modellerinde gösterilse de egzersizin bu etkisinin yaşlı hayvanlarda genç hayvanlara göre daha az olduğu vurgulanmaktadır (124, 131). Egzersizin AH'nin süreçlerini nasıl değiştirdiğine dair belirsizliklere rağmen, hastalığın klinik öncesi döneminin uzun sürmesi, egzersiz gibi etkili, sürdürülebilir, hastanın uyum sağlayabileceği ve yan etkisi çok az olan müdahaleler ile semptomların anlamlı ölçüde geciktirilebileceği düşünülmektedir (132). Kemirgenlerde oluşturulan AH modelleriyle yapılan çalışmalarda, egzersizin nörodejenerasyon semptomlarını hafifletebildiği gözlemlenmiştir (126, 133). AH benzeri nöropatolojinin başlangıcından önce yapılan egzersizin hastalığın ilerlemesini yavaşlatabileceğini öne süren çalışmalar bulunmaktadır. Aβ patolojisi geliştikten sonra yapılan egzersiz müdahalelerinin bilişsel ve nöropatolojik parametreler üzerinde olumlu bir etkisinin olmadığını gösteren sonuçlar da rapor edilmektedir (134, 135).

Fiziksel egzersiz AH'yi geciktirmede etkili görünse de tek başına yeterli olmadığı tahmin edilmektedir. AH için birçok risk faktörünün birlikte ele alındığı diyet, fiziksel aktivite ve bilişsel eğitimdeki değişiklikleri içeren bütüncül bir yaklaşımın, tek bir faktöre dayalı müdahalelerden daha başarılı olabileceği varsayılmaktadır (122). Sağlıklı sıçanlarda egzersiz ile zengin çevrenin kombine etkilerinin incelendiği bir çalışmada, zengin çevre uygulaması ile birlikte yapılan egzersizin, BDNF/TrkB sinyal yolunun ekspresyonu ve öğrenme-bellek yeteneğinin geliştirilmesinde önemli etkileri olduğu vurgulanmaktadır. Dolayısıyla kombine etkinin, egzersizin tek başına yapacağı etkiye göre, sıçanların öğrenme ve belleğini iyileştirmede daha etkili olabileceği ileri sürülmektedir (25). Yapılan çalışmalarda, egzersizin kardiyovasküler sistem üzerine faydalı etkilerinin bulunduğu ve ilaç tedavisine göre daha az yan etkisinin olduğu gösterilmesine rağmen mevcut kanıtlara dayanarak AH'nin tedavisi veya hastalığın önlenmesi için spesifik egzersizler önermek hala zordur (136, 137).



Şekil 5. mAChR aktivasyonu ve BDNF/TrkB sinyalizasyonu ile aktive olan yollar.



Şekil 6. Skopolaminin muskarinik reseptör ve BDNF/TrkB sinyali üzerindeki etkileri.

ACh: Asetilkolin, mAChR: Muskarinik asetilkolin reseptörü, PKC: Protein kinaz C, sAPP: Çözülebilir amiloid prekürsör protein, BDNF: Beyin kaynaklı nörotrofik faktör, MAPK: Mitojenle aktive edilmiş kinaz, PLC: Fosfolipaz C, PI3K: Fosfoinozotid-3-kinaz, GSK3β: Glikojen sentaz kinaz, Aβ: Amiloid beta, p-tau: Fosforile tau.

2.6. AH Deneysel Hayvan Modelleri

AH'nin araştırılmasında farmakolojik ve genetik müdahalelerle oluşturulan birçok deneysel hayvan modeli bulunmaktadır. Bu modeller AH'de görülen nörotransmitter eksiklikleri, A β birikimi ve NFY'lerin oluşumuyla meydana gelen patofizyolojik süreçleri taklit etmektedir. Fare ve sıçanlarda oluşturulan deneysel modeller daha çok kullanılmakla beraber daha az kullanılan, zebra balığı, *Drosophila melanogaster* (sirke sineği) ve *Caenorhabditis elegans* (halkalı solucan) ile oluşturulan modeller de bulunmaktadır (138).

Kemirgenlerde AH modeli oluşturmak amacıyla skopolamin, kolşisin, streptozotosin ve ağır metaller gibi çeşitli kimyasallar kullanılmaktadır (54). Bunlardan skopolamin, AH'deki kolinerjik bozukluğu taklit etmek amacıyla sıklıkla kullanılan bir antikolinerjik ajandır. Streptozotosinin sub-diyabetojenik dozda intraserebroventriküler uygulanmasının, AH'dekine çok benzer ilerleyici bellek kaybına neden olduğu bildirilmektedir (139). AH'deki patofizyolojiyi taklit eden kimyasallar dışında, direkt olarak A β enjeksiyonu veya infüzyonu ile oluşturulan modeller de bulunmaktadır. A β 'nın beyne infüzyonunun nörodejenerasyona ve AH'deki gibi öğrenme-bellek bozukluğuna yol açtığı bildirilmiştir (140). Kolşisin, kolinerjik iletimde bozulmaya ve kolinerjik nöron kaybına neden olmaktadır. Sıçanlara intraserebroventriküler olarak uygulandığında bellek bozukluğuna neden olduğu gösterilmiştir (141). Bunlar dışında, oluşturulmak istenen patolojiye uygun mutant geni taşıyan hayvanların kullanıldığı çeşitli transgenik hayvan modelleri bulunmaktadır. Bu amaçla A β , tau üretimini uyaran veya APOE4 mutant geni taşıyan fare ve sıçanlar sıklıkla kullanılmaktadır (54) (Tablo 1). Transgenik modellerde farelerde sıçanlara göre daha çok plak oluşumu gözleendiği ve bu farelerde patolojinin daha şiddetli seyrettiği bildirilmektedir (142).

Sunulan çalışmamızda, Alzheimer hastalığı modeli skopolamin (seçici olmayan muskarinik reseptör antagonisti) kullanılarak oluşturuldu. Bu model, literatürde de belirtildiği gibi öğrenme-bellek bozukluğunu oluşturan iyi bir model olarak sıklıkla kullanılmakta ve beyinde Alzheimer benzeri fizyopatolojik değişiklikleri meydana getirmektedir. Bununla birlikte, skopolaminin kolayca uygulanabilmesi, ciddi yan etkilere neden olmayışı ve diğer yöntemlere göre daha ucuz olması çalışmamızda tercih edilme sebeplerindendir.

Tablo 1. Alzheimer hastalığının deneysel hayvan modelleri.

Transgenik modeller	• Aβ modelleri • Tau Modelleri • APOE4 Modelleri
Kimyasal modeller	• Skopolamin • Kolşisin • Streptozotosin • Aβ infüzyonu • Ağır metaller
Hipoksi ve beyin hasarı modelleri	• Cerrahi veya kimyasal olarak oluşturulan hipoksi • Lezyon oluşturma

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik

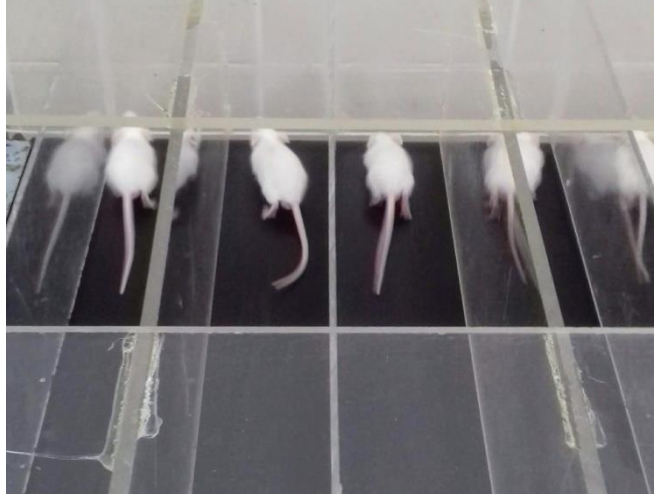
Çalışmanın etik kurul onayı, Çukurova Üniversitesi hayvan deneyleri yerel etik kurulunun 12.08.2020 tarihli 5 No'lu toplantısında alındı.

3.2. Deney Hayvanlarının Bakımı

Çalışmamızda 3 haftalık (15 ± 2 g) erkek Balb/c fareler kullanıldı. Deney hayvanları Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi tarafından temin edildi ve deney süresince bölümümüzdeki hayvan bakım odasında barındırıldı. Hayvan bakım odasının 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık döngüsü, ortam sıcaklığı (22 ± 1 °C) ve nemi (% 40-60) devamlı kontrol altında tutuldu. Deney hayvanlarının yemleri MBD Yem firmasından, su ihtiyaçları ise çeşme suyu ile karşılandı. Tüm hayvanların yiyecek ve su alımları için herhangi bir kısıtlama uygulanmadı.

3.3. Koşu Bandı Egzersizinin Uygulanması

Zhao et., al tarafından daha önce belirtilen egzersiz protokolüne göre farelere gönüllü koşu bandı egzersizi yaptırıldı. Egzersiz grubundaki farelere koşu bandına adapte olmaları amacıyla 12 haftalık egzersiz uygulamasına başlamadan önce, 6 günlük bir alışma periyodu uygulandı. Alışma periyodu süresince koşu bandında günde 15 dk, koşu bandı yürüme hızı ilk iki gün 5 m/dk, 3-4. günler 8 m/dk ve son olarak 5-6. günlerde 12 m/dk olacak şekilde ayarlandı. Alışma periyodundan sonra farelere 12 hafta boyunca haftada 5 gün ve günde 45 dk (8.00-12.00 saatleri arasında) koşu bandı egzersizi uygulandı. Her gün koşu bandı yürüme hızı şu şekilde ayarlandı: 5 dk boyunca 5 m/dk, 5 dk boyunca 8 m/dk, 30 dk boyunca 12 m/dk ve 5 dk boyunca 5 m/dk. Sedanter kontrol grubundaki fareler ise aynı süre boyunca hareketsiz koşu bandına yerleştirildi (143) (Şekil 7).



Şekil 7. Koşu bandı egzersizi sırasında fareler.

3.4. Alzheimer Hastalığı Modeli Oluşturulması

Çalışmamızda Alzheimer modeli oluşturmak için, 12 haftalık egzersiz uygulamasının son 4 haftası boyunca muskarinik asetilkolin reseptör antagonisti skopolamin (scopolamine hydrobromide trihydrate, 99%) uygulandı. Skopolamin uygulama dozu 2 mg/kg olacak şekilde SF ile sulandırılarak stok solüsyon hazırlandı. Hazırlanan stok solüsyon 1 ml'lik ependorflar içinde -20⁰C'de saklandı. Enjeksiyondan önce stok solüsyon serum fizyolojik ile sulandırılarak enjeksiyon günlerinde +4⁰C'de saklandı.

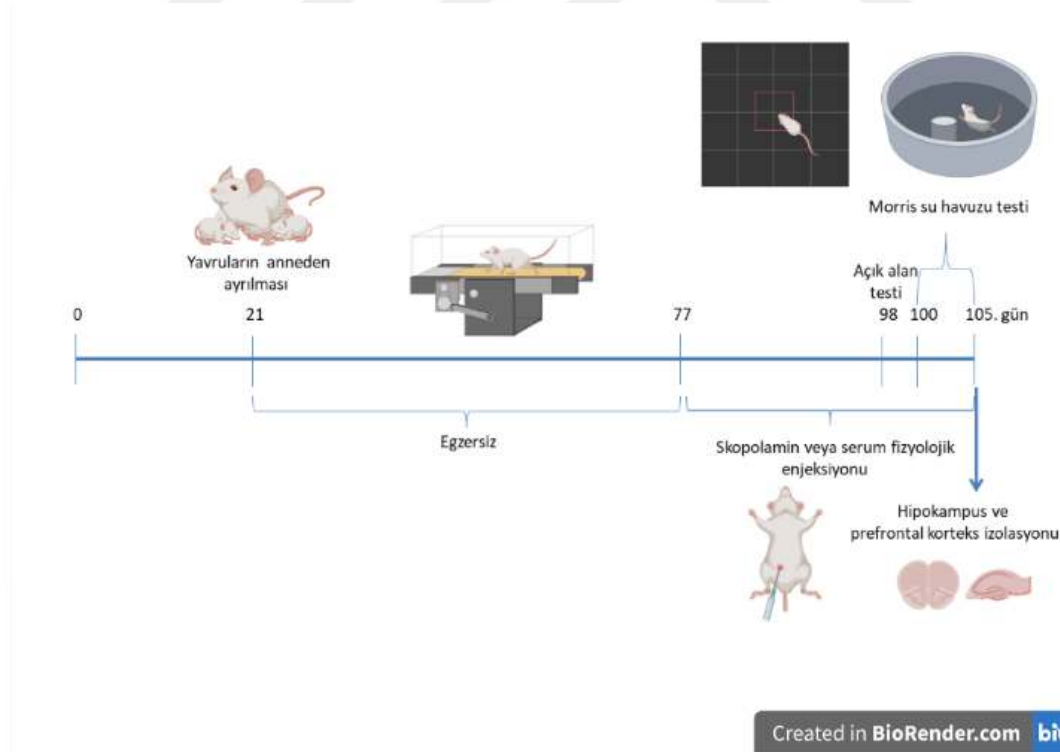
Skopolamin uygulanan gruplarda, günde 1 defa, egzersiz uygulamasından sonra olmak üzere, periton içine 2mg/kg dozunda (0,1ml/10gr vücut ağırlığı hacminde) skopolamin 28 gün boyunca uygulandı (144). Kontrol gruplarında ise aynı hacimde SF, günde 1 defa periton içine uygulandı. Enjeksiyon günlerinde hayvanların vücut ağırlıkları ölçüldü ve somatik büyümelerinin takibi amacıyla haftalık olarak da kilo takibi yapıldı.

3.5. Deney Grupları

Gruplarda N=11-15 deney hayvanı olacak (toplam N=69) şekilde 4 farklı deney grubu oluşturuldu (Tablo 2). Egzersiz ve skopolamin uygulamasından sonra fareler sırasıyla, duygusal ve bilişsel fonksiyonları değerlendirmek amacıyla açık alan testi ve morris su havuzu testine alındı. Her gruptan davranış deneylerine alınmayan 4'er farenin ise enjeksiyonların bitiminde prefrontal korteks ve hipokampusları izole edilerek western blot analizi ile BDNF, TrkB ve p-GSK3 β ^{Ser389}, immünohistokimya analizi ile de APP ve A β -40 düzeyleri değerlendirildi (Şekil 8) (57).

Tablo 2. Deney grupları.

Deney Grubu	Uygulama
S-SF (N= 15)	Sedanter + Serum Fizyolojik
S-SCOP (N= 11)	Sedanter + Skopolamin
E-SF (N= 15)	Egzersiz + Serum Fizyolojik
E-SCOP (N= 12)	Egzersiz + Skopolamin



Şekil 8. Deney zaman çizelgesi.

3.6. Davranış Testleri

Fareler 28 günlük enjeksiyon süresinin son 8 gününde, enjeksiyondan 30 dk sonra deneylere alındılar. Bu süreçte enjeksiyon ve egzersiz uygulaması da devam ettirildi. Davranış testlerine başlamadan önce farelere 3 gün el adaptasyonu yapıldı. Fareler öncelikle açık alan testine ve 1 günlük ara verildikten sonra da morris su havuzu testine alındılar (Şekil 9).



Şekil 9. Deney Akış Şeması.

3.6.1. Açık Alan Düzeneği

Testte kullanılan açık alan düzeneği 60x60x24 ölçülerinde siyah pleksiglastan yapılmış üstü açık ve kenarları 1 cm kalınlığında duvar ile çevrilidir (Şekil 10). Düzeneğin duvara komşu alanı perifer, geriye kalan alanı ise merkez alan olarak adlandırılmaktadır. Açık alan düzeneğindeki hayvanın periferde mi merkezde mi daha çok zaman geçirdiği önemlidir. Alıştığı ortam dışına alınan hayvan alanın merkezine gitmekten kaçınır ve daha az hareket eder.



Şekil 10. Açık alan düzeneği.

3.6.1.1. Açık Alan Testi

Fareler ortama adapte olmaları amacıyla deneyden 3 dk önce odaya getirildi. Ortam sıcaklığı 22 ± 1 °C, ışık şiddeti 100 lux olarak ayarlandı. Fareler herhangi bir köşeden düzeneğin içine bırakıldı ve davranışları 5 dk boyunca video-kamera ile kaydedildi.

3.6.1.2. Açık Alan Testinde Değerlendirilen Parametreler

Açık alan testinde, fare düzeneğe bırakıldıktan sonra düzeneğin periferinden merkez alana ilk geçişine kadar geçen süre (sn), düzeneğin merkez alanında geçirdiği süre (sn), düzeneğin perifer alanında geçirdiği süre (sn) kaydedildi.

Lokomotor aktivite ve davranış ölçütleri olarak, farenin test boyunca merkezde geçme sıklığı, perifer ve merkez alanda kat ettiği toplam mesafe (cm) ve farenin üst ekstremiteleri ile düzeneğin duvarına dayanarak vertikal pozisyonda arka ekstremiteleri üzerinde yükselmesi (rearing) kaydedildi. Açık alan testinde farelerin lokomotor aktiviteleri, araştırmacı ve anksiyete benzeri davranışları değerlendirildi.

3.6.2. Morris Su Havuzu

Testte kullanılan morris su havuzu 95 cm çapında, 45 cm derinliğinde, galvaniz kaplama saçtan yapılmış, iç kısmı siyah, silindirden oluşmaktadır. Havuzun içinde hareket ettirilebilen 27 cm yüksekliğinde, 10 cm çapında bir kaçış platformu bulunmaktadır (şekil 11).

Deneyler sırasında havuzun içi platfom seviyesini 1cm aşacak kadar eřme suyu ile dolduruldu. Suyun sıcaklığı 21 ± 1 °C olacak şekilde ayarlandı. Havuzda yüzen farelere uzaysal ipucu olması için, farelerin görüş alanı içinde laboratuvar duvarlarına, açık renk duvara zıt şekilde, siyah renkli geometrik şekiller asıldı. Havuzdaki ışık 50 lux olacak şekilde ayarlandı.



şekil 11. Morris su havuzu.

3.6.2.1. Morris Su Havuzu Eğitim Denemeleri ve Testi

Fareler morris su havuzunda 5 gün boyunca günde 4 defa arka arkaya eğitim denemelerine tabi tutuldu. Her denemede, hayali olarak bölünmüş dört kadranın herhangi birinden havuza bırakılan fareler kaçış platformunu bulmaları için 60 sn süresince yüzdürüldü. Deney hayvanları platforma çıktıklarında burada 10 sn bekletildikten sonra havuzdan alındı. Fareler, eğitim denemeleri sırasında, platformu 60 sn süresince bulamadıkları durumda, el ile yönlendirilerek platformun yerini uzaysal

olarak öğrenmeleri sağlandı ve 10 sn platformda bekletilerek havuzdan alındı. Platformun yeri eğitim denemelerin hepsinde aynı kadranda sabit şekilde tutuldu. Eğitim denemeleri arasında fareler, uygun ortam sıcaklığı sağlanarak kafeslerinde 30 sn bekletildi.

Deneyin sınav günü olan 6. günde platform havuzdan uzaklaştırıldı ve deney hayvanları, platformun uzaklaştırılmadan önce bulunduğu kadranın karşısındaki kadrandan havuza bırakıldı. Fareler test için 60 sn süresince havuzda yüzdürüldü ve platform uzaklaştırılmadan önce bulunduğu kadranda (hedef kadrana) geçirdikleri süre kamera ile kayıtlıdır. ETHOVISION XT (NOLDUS, sürüm 4.1) ile morris su havuzu eğitim denemeleri ve testinde farelerin uzaysal öğrenmeleri ve bellekleri değerlendirildi (145).

3.6.2.1.1. Morris Su Havuzunda Değerlendirilen Parametreler

Morris su havuzu testinde ilk 5 gün, farelerin eğitim denemelerinde 60 sn içinde kaçış platformunu bulma süresi (sn) ve platformu bulunana kadarki ortalama yüzme hızı (cm/sn) kaydedildi. Deneyin 6. gününde platform kaldırıldıktan sonra 60 sn boyunca, platformun bulunduğu kadranda geçirilen süre (sn) ve ortalama yüzme hızı (cm/sn) kaydedildi.

3.7. Western Blot Analizi

Western blot, hücre veya dokulardan elde edilen protein karışımları kullanılarak spesifik proteinleri tespit etmek amacıyla oldukça yaygın kullanılan bir analiz yöntemidir. Bu yöntemde, çalışılan protein örnekleri elektriksel ortamda, sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel (SDS-PAGE) üzerinde proteinlerin artı kutba doğru göç etmesi sağlanarak molekül ağırlıklarına göre sıralama işlemi gerçekleştirilmektedir. Jel üzerindeki proteinler moleküler ağırlıklarına göre bulundukları alanda bir bant şeklinde yığılma gösterirler. Elektriksel bir kutup oluşturularak proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre bu şekilde sıralanması elektroforez olarak adlandırılır. Elektroforez işlemi sonrası jel üzerinde bulunan protein bantları PVDF membrana aktarılır. Bu işleme blotlama adı verilmektedir. Blotlama işlemi sonrası membran üzerinde özgül proteinlerin bağlanmadığı noktalarda, uygun olmayan reaksiyonların gerçekleşmesini engellemek amacıyla ilgisiz proteinler ile kaplanması sağlanır, bu işlem blokaj olarak adlandırılır. Bu işlemlerin devamında, uygun bir birincil ve ikincil antikor kullanılarak

hedef proteini işaretlenir ve görüntüleme işlemi ile membran üzerindeki bantlar röntgen filmine aktarılır. Antikorlar yalnızca, spesifik proteinlere bağlandığından görüntüleme esnasında membran üzerinde tek bir bant oluşur (Tablo 3).

Tablo 3. Western Blot Analizinde Kullanılan Solüsyonlar ve Kimyasal Ajanlar.

RIPA Lysis Buffer	sc-24948 (Santa Cruz)
Pierce BCA Protein Assay Kit	23227 (Thermo F.)
10xTBS (Tris Buffered Saline)	170-6435 (Bio rad)
10xTGS (Tris/Glycine/SDS)	161-0772 (Bio rad)
APS (Amonyum Persülfat)	161-0700 (Bio rad)
TEMED (Tetrametiletildiamin)	161-0801 (Bio rad)
TGX FastCast Acrylamide Kit	161-0173 (Bio rad)
2-Mercaptoethanol	161-0710 (Bio rad)
4x Laemmli Sample Buffer	161-0747 (Bio rad)
Tween 20, % Nonionic Detergent	9005-64-5 (Bio rad)
Blotting Grade Blocker Non Fat Dry Milk	170-6404 (Bio rad)
Trans-Blot Turbo Transfer Kit RTA	170-4272 (Bio rad)
Beta Actin Polyclonal Antibody	00085842 (Proteintech)
BDNF Rabbit Polyclonal Antibody	00065074 (Proteintech)
Phospho-Gsk3b (Ser389) Rabbit Polyclonal antibody	00076581 (Proteintech)
Anti-TrkB antibody	STJ96109 (St John's Laboratory)
Clarity Max Western ECL Substrate	170-5061 (Bio rad)
WesternC Blotting Standards	161-0376 (Bio rad)
Goat Anti-rabbit IgG(H+L) peroxidase-HRP conjugate	SA00001-2(Proteintech)
Röntgen Banyo Solüsyonu Developer	de1576 (Impact)
Röntgen Banyo Solüsyonu Fixer	de1576 (Impact)

Yükleme tamponu: 100µL 2-merkaptoetanol + 900 µL 4X-Laemmli sample buffer

Yıkama Tamponu: 900 ml saf su + 100 ml 10xTBS + 1 ml Tween 20

Bloklama Solüsyonu: 100 ml yıkama tamponu + 5 g Süt tozu

3.7.1. Western Blot Analiz Aşamaları

3.7.1.1. Total Protein Örneklerinin Elde Edilmesi

Western blot analizi öncesinde, kullanılacak doku örneklerinden proteinlerin elde edilmesi amacıyla, 28 gün boyunca enjeksiyon yapılan farelerin prefrontal korteks ve hipokampus izolasyonları yapıldı. İzole edilen bu dokular homojenizasyonun yapılacağı güne kadar -80 °C'de muhafaza edildi. Elde edilen bu prefrontal korteks ve

hipokampus dokuları öncelikle hassas terazide tartıldı. Tartılan örnekler RIPA karışımıyla birleştirilip homojenizatörde 70-80 RPMI'da en az 5 dk homojenize edildi. Tartılan her bir dokunun 1 gramı için 3 ml RIPA karışımı hazırlandı. Her 1 ml RIPA için ise 10 µl PMSF, 10 µl sodiumorthovanadat ve 10-20 µl proteaz inhibitörü eklenip bir RIPA karışımı oluşturuldu. Protein örneği ve RIPA karışımı krema kıvamı alana kadar homojenize edildi ve 1 ml'lik ependorflara aktarıldı. Ependorflar +4 °C'de 14000 RPMI 'da 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonucu oluşan süpernatant kısım total protein olarak kabul edilip farklı bir ependorfa aktarıldı ve -20 °C'de saklandı.

3.7.1.2. Total Protein Ölçümü

Örneklerden elde edilen total protein düzeyi, protein miktarları bilinen albumin standartları kullanılarak BCA (Bicinchoninic Acid) Protein Assay testi ile saptandı. BCA protein testi, bir numunedeki toplam protein miktarının belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Bu yöntem, proteinlerin alkali bir çözeltide (biüre reaksiyonu) Cu^{+2} 'yi Cu^{+1} 'e indirgemesi ve bisinkoninik asit ile mor bir renk oluşumuna yol açması prensibi ile çalışmaktadır. Bakırın indirgenmesi temel olarak protein moleküllerinde bulunan sistein veya sistin, tirozin ve triptofan dahil olmak üzere dört aminoasit kalıntısından kaynaklanmaktadır (146). Oluşan mor rengin absorbans değerleri spektrofotometrede 562 nm'de alınmaktadır. Daha sonra standart bir protein için elde edilen bir referans eğrisi ile 20-2000 µg/mL aralığındaki protein konsantrasyonları hesaplanabilmektedir (147).

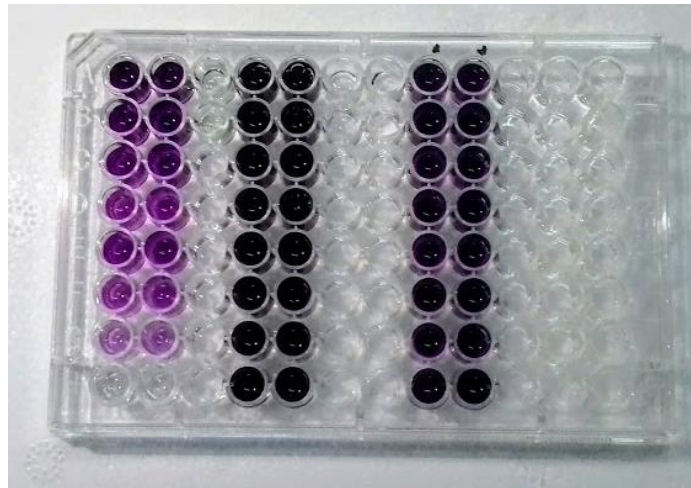
Öncelikle BCA çalışma solüsyonu hazırlandı. Bu amaçla, her örnek için 200 µL olacak şekilde, BCA Protein Assay kit içerisindeki BCA Solüsyon A ve B'den 50:1 oranında alınıp karıştırıldı. Daha sonra protein miktarları bilinen 9 adet standart, Tablo 4'te gösterilen oranlarda, stok sığır serum albumininden (BSA) seyreltme yapılarak hazırlandı.

Hazırlanan 9 adet standart ve protein miktarının tayin edileceği örnekler 96'lık kültür kaplarına sırayla her biri 25 µl olacak şekilde eklendi (Şekil 12). Daha sonra çalışma solüsyonundan hem standart hem de örneklerin üzerine 200 µL eklendi ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 562 nm'de spektrofotometrede absorbanslar ölçüldü.

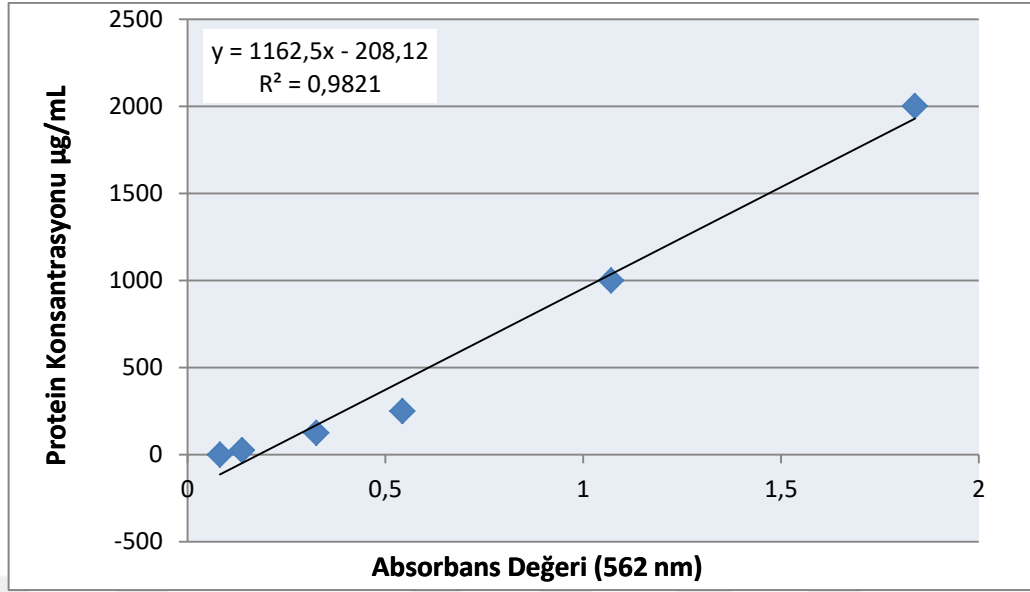
BSA standartları için 562 nm’deki ölçüm değerleri, her standardın $\mu\text{g/mL}$ ’deki protein konsantrasyonuna karşı çizilerek standart bir eğri elde edildi (Şekil 13). Deney gruplarındaki örneklerin protein konsantrasyonunu belirlemek amacıyla bu standart eğri kullanıldı. Böylece örneklerdeki proteinlerin mL’deki μg düzeyleri belirlendi.

Tablo 4. Seyreltilmiş BSA Standartlarının Hazırlanması.

Ependorf	Seyreltme Hacmi (μL)	BSA’nın Hacim ve Kaynağı (μL)	Final BSA Konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$)
A	0	Stoktan 300	2000
B	125	Stoktan 375	1500
C	325	Stoktan 325	1000
D	175	C ependorfundan 175	750
E	325	B ependorfundan 325	500
F	325	E ependorfundan 325	250
G	325	F ependorfundan 325	125
H	400	G ependorfundan 100	25
I	400	0	0



Şekil 12. Kültür kabına yüklenen protein örnekleri.



Şekil 13. BSA standartlarının protein konsantrasyonuna karşılık gelen absorbans yanıt eğrisi.
BSA: Sığır Serum Albumin

3.7.1.3. SDS PAGE Jelinin Hazırlanması

Western blot çalışması için firmadan temin edilen iki cam plak, girintili kısım iç tarafta ve camın üzerindeki “UP” yazılı kısım yukarda olacak şekilde kasetçerçeveleri arasına sıkıştırıldı ve kasetstandına yerleştirildi. Firmadan temin edilen Acrylamide Kit ile SDS PAGE jel’in ayırıcı jeli aşağıda belirtilen Tablo 5’e uygun şekilde hazırlandı. Ayırıcı jelin üst yüzeyinin düzgünlüğünü sağlamak amacıyla üzerine 1 ml isopropanol eklendi ve polimerize olması için 30 dakika beklendi. Süre sonunda jel yüzeyindeki isopropanol kurutma kağıdı kullanılarak uzaklaştırıldı. Sonrasında, Tablo 6’da belirtildiği gibi paketleyici jel hazırlandı ve ayırıcı jelin üzerine, camlar arasında hiç boşluk kalmayacak şekilde eklendi. Polimerize olması beklenmeden jel içerisinde kuyuları oluşturacak olan jel tarağı dikkatli bir şekilde paketleyici jel içerisine yerleştirildi ve +4°C’de bir gece bekletildi.

Tablo 5. Ayırıcı jel hazırlama oranı.

Ayırıcı Jel			
Resolver A	Resolver B	TEMED	APS(%10)
3 mL	3 mL	3 µL	30 µL

Tablo 6. Paketleyici jel hazırlama oranları.

Paketleyici Jel			
Stacker A	Stacker B	TEMED	APS(%10)
1 mL	1 mL	2 µL	10 µL

3.7.1.4. Proteinlerin Jel Üzerinde Yürütülmesi

Daha önce RIPA ile hazırlanan total protein örnekleri -20 °C'den çıkarıldı ve buz içerisine alındı. Kuyucuk yükleme için her örnek 30 µg protein içerecek ve 30 µl hacimde olacak şekilde hesaplama yapıldı. Protein örneklerinin üzerlerine 3:1 oranında yükleme tamponu eklenerek 5 dk boyunca 95°C'de kuru blok ısıtıcıda bekletildi.

Bir gece öncesinden hazırlanan jel kasete oturtularak yürütme tankına yerleştirildi ve tank içerisine TGS (yürütme solüsyonu) eklendi. Jel üzerindeki tarak dikkatli bir şekilde kaldırılarak oluşturulan kuyular kontrol edildi. Sonrasında 10µL'lik otomatik pipet yardımıyla jelin ilk kuyucuğuna jel elektroforezi standardından 3 µl, diğer kuyucuklara ise protein örnekleri 30 µl olacak şekilde sırasıyla yüklendi. Proteinler ilk 20 dakika 80 volt'da daha sonra 100 volt'da proteinler membranın sonuna ulaşmaya kadar yaklaşık 1-1,5 saat yürütüldü (Şekil 14 ve 15).



Şekil 14. Proteinlerin kuyucuklara yüklenmesi.



Şekil 15. Proteinlerin jel üzerinde yürütülmesi.

3.7.1.5. Jelin Membrana Aktarılması

Membrana aktarım aşamasında kullanılacak olan membran ve filtre kağıtları hazırlandı. Membran üstünü tamamen ıslatacak şekilde metanol ile 1 dk bekletildi. Daha sonra üzerine transfer solüsyonu eklendi. Filtre kağıtları da transfer solüsyonu ile ıslatıldı.

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel cam plaklar arasından çıkarılarak TGS solüsyonu içine bırakıldı. Transfer cihazına öncelikle 6 adet filtre kâğıdı, üzerine membran ve membranın üzerine jel, en üste tekrar 6 adet filtre kâğıdı koyuldu. Son olarak arada kabarcık kalmaması amacıyla silindir çubukla filtre kâğıdının üzerinden birkaç kez dikkatlice geçildi. Transfer işlemi 7 dk içerisinde tamamlandı.

3.7.1.6. Bloklama

Jelin membrana aktarılması gerçekleşikten sonra, membran TBS solüsyonu içine alındı ve 5 dakika bekletildi. Daha sonra membran üzerindeki TBS döküldü ve daha önce hazırlanan 20 ml %5'lik bloklama solüsyonu içerisinde +4°C'de 1 saat hafif derecede çalkalandı. Bir saat sonunda, bloklama solüsyonu döküldü ve membran 3 kez 5'er dakika boyunca yıkama solüsyonuyla +4°C'de çalkalayıcıda yıkandı.

3.7.1.7. Primer ve Sekonder Antikorlarla İnkübasyon

Yıkama işlemi bittikten hemen sonra primer antikor uygulandı. Her örnek için β -aktin, BDNF, TrkB 1: 500 ve p-GSK3 β ^{Ser389} olmak üzere 4 adet primer antikor uygulaması ayrı ayrı gerçekleştirildi. Öncelikle primer antikorlar, β -aktin 1:1000, BDNF 1:500, TrkB 1: 500, p-GSK3 β ^{Ser389} 1:500 oranında olmak üzere bloklama solüsyonuyla seyreltildi ve bu işlem yapıldıktan sonra membranlar üzerine uygulandı. Membran uygulanacak primer antikor ile 1 gece +4°C'de çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.

Süre bitiminde membranın üzerindeki primer antikor döküldü ve membran oda sıcaklığında 3 kez 5'er dakika çalkalayıcı üzerinde yıkama solüsyonu ile yıkandı. Yıkama işlemi sonrasında, daha önce bloklama solüsyonuyla 1:5000 oranında hazırlanmış olan sekonder antikor membran üzerine eklendi. Membran sekonder antikorla 1 saat boyunca +4°C'de çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. 1 saat sonunda sekonder antikor döküldü ve membran 3 kez 5'er dakika +4°C'de çalkalayıcıda yıkama solüsyonuyla yıkandı.

3.7.1.8. Görüntüleme

Görüntüleme işlemi karanlık odada gerçekleştirildi. Yıkama sonrası Enhanced Chemi Luminescence (ECL) solüsyonu membran üzerine döküldü ve oda sıcaklığında 15 dakika çalkalanarak karanlıkta bekletildi. ECL solüsyonu ile muamele sonrası membranda oluşan ışıma 18x24 cm'lik X-ray filmine aktarılarak protein bantlarının görünür hale getirilmesi sağlandı. Işımanın filme aktarılmasından sonra X-ray filmi sırasıyla 1 dakika developer solüsyonunda, 1 dakika fixer solüsyonunda bekletildi ve hemen ardından çeşme suyuyla yıkandı (Şekil 16). Bu işlem sonunda spesifik proteinlere ait bantlar, X-ray filmi üzerinde görünür hale getirilerek değerlendirmeleri yapıldı.

X-ray film üzerinde elde edilen protein bantları bilgisayar ortamına aktarılarak, Image Lab Programı ile bant protein yoğunluklarının kantitatif analizleri yapıldı. Yapılan analizde, spesifik protein yoğunluk miktarlarının, β -aktin proteine ait bant yoğunluk miktarına bölünmesiyle normalize edildi. Değerler kontrol grubuna göre bant yoğunluk miktarları % değişimi şu şekilde ifade edildi: $[(\text{Prt yoğunluk} / \text{Prt yoğunluk}_{\beta\text{-aktin}}) / \text{Prt yoğunluk}_{\text{kontrol}}] \times 100$. Kontrol grubunun protein yoğunluk değeri %100 olarak belirlenirken, kontrol grubunun protein kat artışı 1 olarak belirlendi.



Şekil 16. Görüntüleme işleminde kullanılan materyaller.

3.8. İmmünohistokimya Yöntemi

Amiloid Prekürsör Protein (APP) ve Amiloid Beta-40 ($A\beta$ -40) aktivitesinin belirlenmesi amacı ile hipokampus ve prefrontal korteks dokularından elde edilen

histolojik kesitler, polilizin kaplı lam üzerine alındı. Buzdolabında bekletilen kesitler işaretleme işlemine geçilmeden önce kurutularak, tekrar buzdolabına alındı ve 15 dakika bekletildi. Buzdolabından çıkarıldıktan sonra tekrar kurutulan kesitler, 60 °C’de etüvde ksilol içerisinde 15 dakika deparafinize edildi. Daha sonra doku kesitleri, oda sıcaklığında ksilol serilerinden geçirildi. Derecesi giderek azalan alkol serileri içerisinde hidrate edildi ve distile su içerisine alındı. Kesitler daha sonra, sitrat solüsyonu (pH:6) içerisine alınıp 95°C’lik su banyosunda 45 dakika süreyle bekletilerek antijenlerin açığa çıkarılması sağlandı. Oda sıcaklığında 45 dk soğutulan kesitler, distile suda yıkandı ve endojen peroksitleri engellemek amacıyla %3’lük hidrojen peroksit (H₂O₂) içerisine alınarak yaklaşık 10 dk kadar bekletildi. Kesitler, saf su ve fosfat tamponundan (PBS, pH: 7,2-7,4) geçirildi. Her bir kesitin etrafı dikkatlice silinip, kurulandıktan sonra, üzerine nonspesifik bağlanmayı engellemek amacıyla bloklama solüsyonu (ab93705, Abcam, USA.) damlatıldı. Oda sıcaklığında 15 dakika bekletildikten sonra kesitler, distile su ve fosfat tamponundan geçirildikten sonra dokuların etrafı kurulandı. Daha sonra 1/200 oranında dilüe edilen anti-APP (27320-1-AP, Proteintech, USA) ve 1/200 oranında dilüe edilen anti-A β -40 (NBP1-44047, Novus Biologicals, USA) primer antikorları damlatıldı. Primer antikor damlatılan tüm kesitler +4°C’de, nemli ortamda bir gece bekletildi. Negatif kontrol için alınan kesitlere primer antikorlar yerine, dilüsyon solüsyonu damlatıldı. Primer antikorla muamele edilip 1 gece +4°C’de ve ardından 1 saat oda sıcaklığında bekletilen kesitler, daha sonra distile su ve PBS’den geçirildi. Üzerlerine Biotin (ab93705, Abcam, USA.) damlatılarak 15 dk süreyle oda sıcaklığında tutuldu. 15 dk sonra distile su ve PBS’de yıkanan kesitlerin etrafı kurulanıp Avidin (ab93705, Abcam, USA.) damlatılarak, 20 dakika süreyle oda sıcaklığında bekletildi. Distile su ve PBS’den geçirilen kesitler üzerine, aminoetilkarbozol (AEC, ab93705, Abcam, USA) solüsyonu damlatıldı ve 10 dakika bekletildi, çeşme suyu içerisinde yıkandı (Tablo 7). Doku kesitleri, zıt boyama için hematoksilin ile 30 saniye boyandı. Boyama işleminden sonra kesitler, çeşme suyunda yıkanarak kurumaya bırakıldı. Su bazlı kapama maddesi damlatılarak dokular lamel ile kapatıldı. Olympus BX53 ışık mikroskobu (Japonya) ile incelenerek fotoğrafları çekildi.

Tablo 7. İmmünohistokimya Yönteminde Kullanılan Solüsyonlar ve Kimyasal Ajanlar.

Anti-APP	27320-1-AP, Proteintech, USA
Anti-A β -40	NBP1-44047, Novus Biologicals, USA
Biotin	ab93705, Abcam, USA
Avidin	ab93705, Abcam, USA
Aminoetilkorbozol	AEC, ab93705, Abcam, USA
Blocking solüsyonu	ab93705, Abcam, USA

3.8.1. İmmünohistokimyasal Skorlama Yöntemi

APP ve A β -40 ekspresyonlarını araştırmak amacıyla immunohistokimyasal skorlama yöntemi uygulandı. İmmünohistokimyasal skorlama için 40'lık objektifte rastgele seçilen 10 alanda H Skorlama sistemi kullanıldı. H skoru, pozitif hücre yüzdesiyle birlikte 4 farklı boyama yoğunluğunun çarpımı toplanarak hesaplandı (Tablo 8).

Tablo 8. Hücrelerin boyanma derecesinin değerlendirilmesi.

Boyanma Derecesi	
0	Hiç boyanma yok
1	Zayıf derecede boyanma
2	Orta derecede boyanma
3	Güçlü derecede boyanma

H Skor değerini hesaplamak için 'I x PC' formülü kullanıldı.

I: Intensity (Yoğunluk)

PC: Her derecede boyanan hücre yüzdesi

Gruplar arasındaki ekspresyon farklılıkları 'Mann Whitney U' testi kullanılarak değerlendirildi. 0,05'ten küçük p değerleri anlamlı kabul edildi.

3.9. İstatistiksel Analiz

Veriler ortalama $\pm$ standart hata (SH) olarak ifade edildi. İstatistiksel analizde, SPSS 20.0 bilgisayar programı kullanıldı. Normal dağılıma uyan ve parametrik verilerde ANOVA ardından ikili grup karşılaştırmalarında Tukey testi kullanıldı. Normal dağılıma uymayan ve parametrik olmayan veriler Kruskal Wallis testini takiben

ikili grup karşılaştırmalarında Mann Whitney U testi ile analiz edildi. Vücut ağırlığı ve Morris su havuzu testi normal dağılıma uymadığı için Friedman'ın ANOVA takiben grupların kendi içlerinde karşılaştırmasında Wilcoxon testi, gruplar arası karşılaştırmada Mann Whitney U testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık $p<0,05$ olarak kabul edildi.

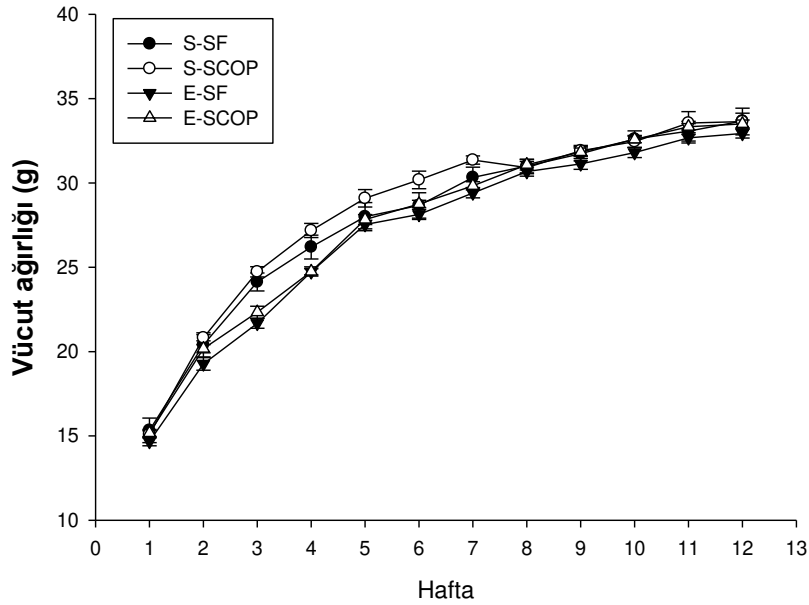


4. BULGULAR

4.1. Vücut Ağırlığı

Vücut ağırlığı ölçümlerinde S-SF [χ^2 (11) =152,3 $p<0,001$], E-SF [χ^2 (11) =162,9 $p<0,001$], S-SCOP [χ^2 (11) =103,4 $p<0,001$] ve E-SCOP [χ^2 (11) =129,6 $p<0,001$] gruplarında ANOVA ile haftalar arasında anlamlı fark bulundu. Tüm gruplarda vücut ağırlığında, birinci hafta ile karşılaştırıldığında tüm haftalarda anlamlı artma saptandı ($p<0,01$).

Vücut ağırlığında gruplar arası karşılaştırmalarda ikinci hafta [H (3,53) =8,32 $p=0,04$], üçüncü hafta [H (3,53) =26,14 $p<0,001$], dördüncü hafta [H (3,53) =19,24 $p<0,001$], altıncı hafta [H (3,53) =9,24 $p=0,02$] ve yedinci hafta [H (3,53) =13,17 $p=0,004$] gruplar arasında anlamlı fark saptandı. E-SF grubunda S-SF grubuna göre üçüncü ($U=30,0$ $p<0,001$ $z=-3,49$) ve dördüncü ($U=59,0$ $p=0,02$ $z=-2,28$) günde anlamlı azalma saptandı. E-SCOP grubunda S-SCOP grubuna göre üçüncü ($U=10,5$ $p<0,001$ $z=-3,49$), dördüncü ($U=9,5$ $p<0,001$ $z=-3,54$), altıncı ($U=28,5$ $p=0,01$ $z=-2,39$) ve yedinci ($U=14,5$ $p=0,001$ $z=-3,27$) günde anlamlı azalma bulundu. Birinci hafta [H (3,53) =1,58 $p=0,66$], beşinci hafta [H (3,53) =6,19 $p=0,10$], sekizinci hafta [H (3,53) =1,03 $p=0,79$], dokuzuncu hafta [H (3,53) =3,43 $p=0,33$], onuncu hafta [H (3,53) =3,94 $p=0,26$], on birinci [H (3,53) =3,09 $p=0,37$], on ikinci hafta [H (3,53) =1,70 $p=0,63$] haftalarda gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı (Şekil 17).

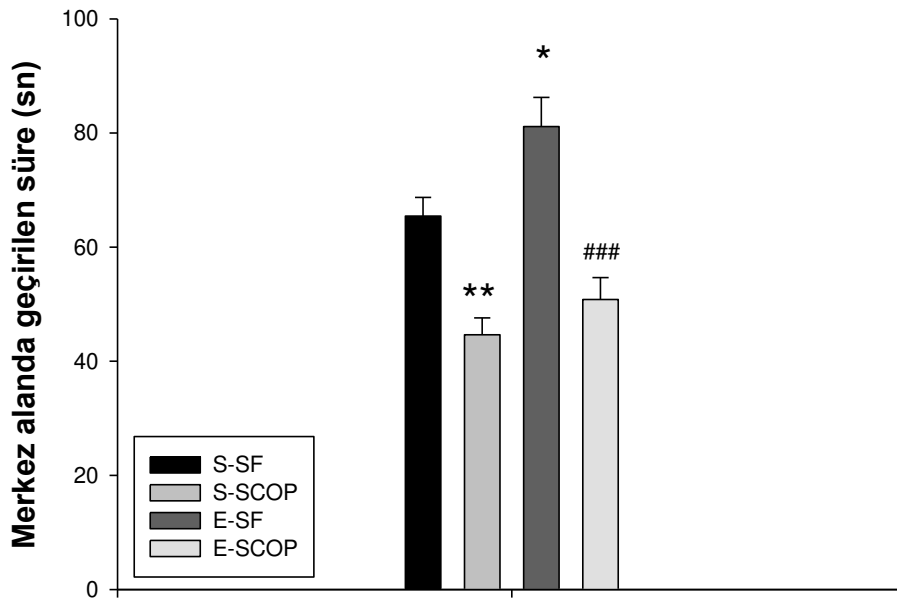


Şekil 17. On iki haftalık vücut ağırlığı.

Veriler ortalama $\pm$ SH olarak ifade edildi Gruplarda N=11-15. İstatistiksel analiz için metin içine bkz.

4.2. Açık Alan Testi

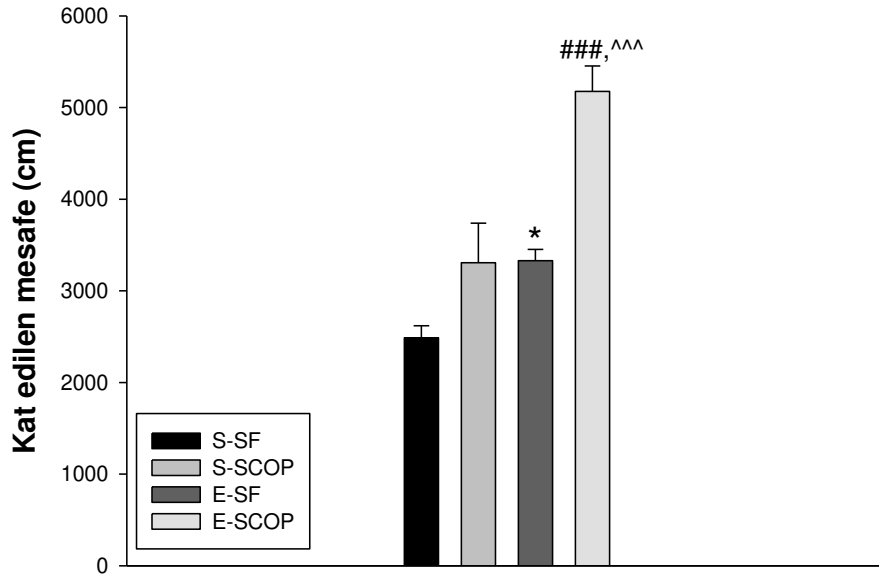
Açık alan testinde merkez alanda geçirilen sürede anlamlı ilaç [F (1,49) =39,17 $p<0,001$] ve egzersiz [F (1,49) =7,18 $p=0,01$] etkisi bulunurken ilaç x egzersiz etkileşimi bulunmadı [F (1,49) =1,35 $p=0,25$]. Merkezde geçirilen süre S-SCOP grubunda S-SF grubuna göre anlamlı azaldı ($p<0,01$). E-SF grubunda, S-SF ($p=0,02$) ve E-SCOP ($p<0,001$) grubuna göre anlamlı arttı. E-SCOP grubu ile S-SCOP grubu arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=0,74$) (Şekil 18).



Şekil 18. Açık alan testinde merkez alanda geçirilen süre.

* $p<0,05$, ** $p<0,01$ S-SF grubuna göre, ### $p<0,001$ E-SF grubuna göre. ANOVA takiben Tukey HSD testi. Veriler ortalama $\pm$ SH olarak ifade edildi. Gruplarda N=11-15.

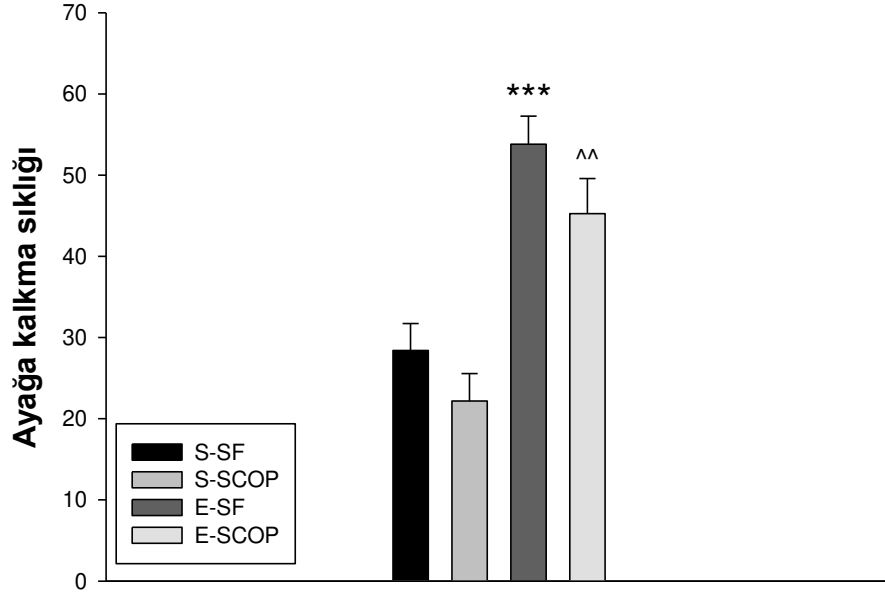
Açık alan testinde kat edilen mesafede anlamlı ilaç etkisi [F (1,49) =30,25 $p<0,001$], egzersiz [F (1,49) =31,26 $p<0,001$] etkisi ve ilaç x egzersiz etkileşimi bulundu [F (1,49) =4,48 $p=0,039$]. E-SF grubunda S-SF grubuna göre kat edilen mesafe anlamlı arttı ($p=0,049$). E-SCOP grubunda E-SF ($p<0,001$) ve S-SCOP ($p<0,001$) grubuna göre anlamlı arttı. Kat edilen mesafede S-SCOP grubunda S-SF grubuna göre artma eğilimi saptandı ($p=0,09$) (Şekil 19).



Şekil 19. Açık alan testinde düzenekte kat edilen mesafe (cm).

* $p < 0,05$ S-SF grubuna göre, ### $p < 0,001$ E-SF grubuna göre, ^^^ $p < 0,001$ S-SCOP grubuna göre. ANOVA takiben Tukey HSD testi. Veriler ortalama $\pm$ SH olarak ifade edildi. Gruplarda N=11-15.

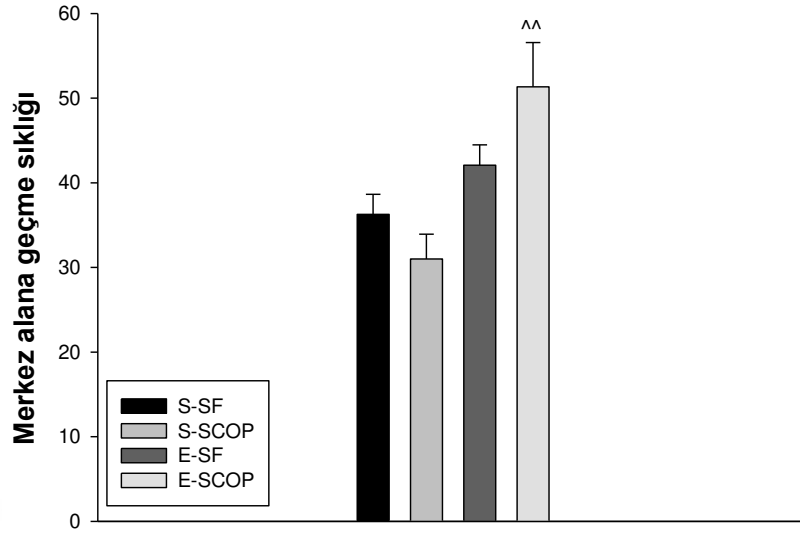
Ayağa kalkma sıklığında anlamlı ilaç [$F(1,49) = 4,06$ $p < 0,05$] ve egzersiz [$F(1,49) = 43,79$ $p < 0,001$] etkisi bulunurken ilaç x egzersiz etkileşimi bulunmadı [$F(1,49) = 0,10$ $p = 0,75$]. E-SF grubunda S-SF grubuna göre ($p < 0,001$), E-SCOP grubunda S-SCOP ($p = 0,001$) grubuna göre ayağa kalkma sıklığında anlamlı artış saptandı. S-SCOP grubunda S-SF ($p = 0,63$) grubuna göre, E-SCOP grubunda E-SF ($p = 0,34$) grubuna göre anlamlı fark bulunmadı (Şekil 20).



Şekil 20. Açık alan testinde düzenekte ayağa kalkma sıklığı.

*** $p < 0,001$ S-SF grubuna göre, ^^ $p < 0,01$ S-SCOP grubuna göre. ANOVA takiben Tukey HSD testi. Veriler ortalama $\pm$ SH olarak ifade edildi. Gruplarda N=11-15.

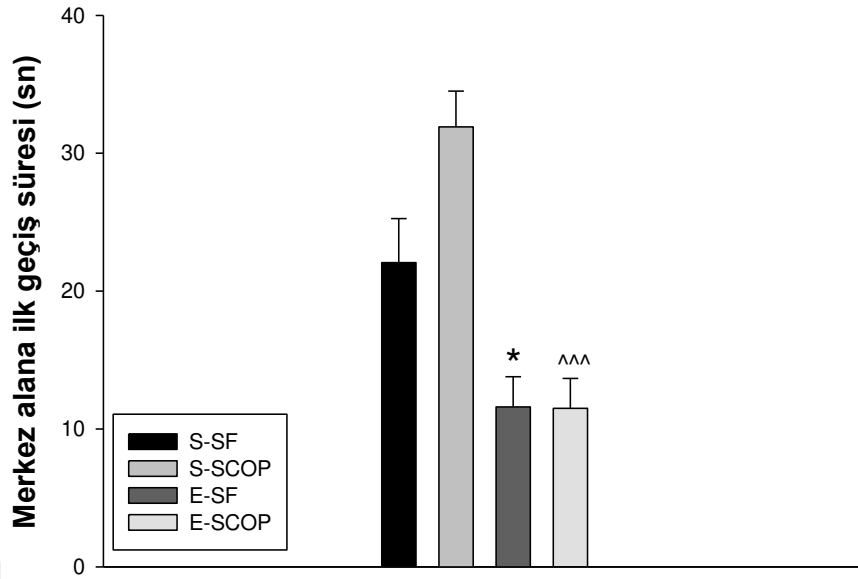
Açık alan düzeneğinin merkezine geçme sıklığında anlamlı egzersiz [$F(1,49) = 15,60$ $p < 0,001$] etkisi ve ilaç x egzersiz [$F(1,49) = 4,85$ $p < 0,05$] etkileşimi bulunurken ilaç etkisi bulunmadı [$F(1,49) = 0,36$ $p = 0,54$]. E-SCOP grubunda S-SCOP grubuna göre merkeze geçme sıklığında anlamlı artış bulundu ($p = 0,001$). E-SF ve S-SCOP grubunda S-SF grubuna göre (sırasıyla $p = 0,54$, $p = 0,68$), E-SCOP grubunda E-SF grubuna ($p = 0,20$) göre anlamlı fark saptanmadı (Şekil 21).



Şekil 21. Açık alan düzeneğinde merkez alana geçme sıklığı.

^^p<0,01S-SCOP grubuna göre. ANOVA takiben Tukey HSD testi. Veriler ortalama $\pm$ SH olarak ifade edildi. Gruplarda N=11-15.

Açık alan testinde ilk kez merkeze geçme süresinde anlamlı egzersiz [F (1,49) =33,70 p<0,001] etkisi bulunurken, ilaç [F (1,49) =3,35 p=0,073] etkisi ve ilaç x egzersiz etkileşimi bulunmadı [F (1,49) =3,49 p=0,68]. E-SF grubunda S-SF grubuna göre, E-SCOP grubunda S-SCOP grubuna göre ilk kez merkez alana geçme süresi azaldı (sırasıyla p<0,05, p<0,001). S-SCOP grubunda S-SF grubuna göre merkeze geçme süresinde artma eğilimi bulundu (p=0,06). E-SCOP grubunda E-SF grubuna göre anlamlı fark saptanmadı (p=1,00) (Şekil 22).



Şekil 22. Açık alan düzeneğinde merkez alana ilk kez geçiş süresi.

* $p < 0,05$ S-SF grubuna göre, ^ $p < 0,01$ S-SCOP grubuna göre. ANOVA takiben Tukey HSD testi. Veriler ortalama $\pm$ SH olarak ifade edildi. Graplarda N=11-15.

4.3. Morris Su Havuzu Testi

4.3.1. Eğitim Denemeleri

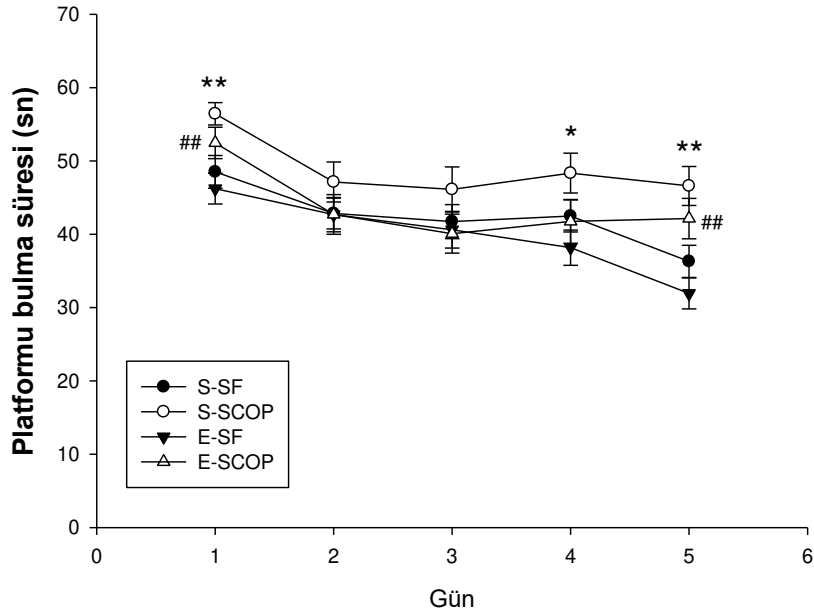
Morris su havuzu testinde eğitim denemelerinde beş gün boyunca gizli platformu bulma süresinde S-SF grubunda ANOVA günler arasında anlamlı fark buldu [$\chi^2 (4) = 26,2$ $p < 0,001$]. Platformu bulma süresinde, birinci gün ile karşılaştırıldığında ikinci ($Z = -2,3$ $p = 0,02$), üçüncü ($Z = -2,02$ $p = 0,04$), dördüncü ($Z = -2,09$ $p = 0,03$) ve beşinci ($Z = -3,58$ $p < 0,001$) günde anlamlı azalma saptandı.

E-SF grubunda platformu bulma süresinde günler arasında ANOVA ile anlamlı fark saptandı [$\chi^2 (4) = 25,7$ $p < 0,001$]. Birinci gün ile karşılaştırıldığında dördüncü ($Z = -2,5$ $p = 0,011$) ve beşinci ($Z = -4,3$ $p < 0,001$) günde anlamlı azalma bulundu.

Eğitim denemelerinde platformu bulma süresinde S-SCOP grubunda günler arasında anlamlı fark saptandı [$\chi^2 (4) = 17,5$ $p = 0,002$]. Platformu bulma süresinde, birinci gün ile karşılaştırıldığında ikinci ($Z = -2,7$ $p = 0,006$), üçüncü, ($Z = -4,0$ $p < 0,001$) dördüncü ($Z = -2,7$ $p = 0,006$) ve beşinci ($Z = -2,7$ $p = 0,007$) günde platformu bulma süresinde anlamlı azalma bulundu.

E-SCOP grubunda platformu süresinde günler arasında ANOVA ile anlamlı fark saptandı [$\chi^2 (4) = 10,8$ $p=0,028$]. Birinci gün ile karşılaştırıldığında ikinci ($Z=-2,6$ $p=0,008$), üçüncü, ($Z=-3,3$ $p=0,001$) dördüncü ($Z=-2,8$ $p=0,004$) ve beşinci ($Z=-2,6$ $p=0,007$) günde platformu bulma süresinde anlamlı azalma bulundu.

Eğitim denemelerinin birinci [$H (3,212) = 17,04$ $p=0,001$], dördüncü [$H (3,212) = 10,04$ $p=0,01$] ve beşinci [$H (3,212) = 19,16$ $p<0,001$] günlerinde platformu bulma süresinde gruplar arasında anlamlı fark saptandı. E-SF grubu S-SF grubu ile karşılaştırıldığında birinci ($U=1618,0$ $p=0,3$ $z=-1,0$), ikinci ($U=1760,5$ $p=0,8$ $z=-0,2$), üçüncü ($U=1701,0$ $p=0,5$ $z=-0,5$), dördüncü ($U=1556,0$ $p=0,1$ $z=-0,1$) ve beşinci ($U=1553,0$ $p=0,1$ $z=-0,1$) günde anlamlı fark bulunmadı. S-SCOP grubu S-SF grubu ile karşılaştırıldığında platformu bulma süresinde birinci ($U=980,0$ $p=0,006$ $z=-2,7$), dördüncü ($U=992,0$ $p=0,02$ $z=-2,2$) ve beşinci ($U=840,0$ $p=0,001$ $z=-3,2$) günde anlamlı artış saptanırken ikinci ($U=1098,0$ $p=0,1$ $z=-1,5$) ve üçüncü ($U=1263,5$ $p=0,6$ $z=-0,3$) günde fark bulunmadı. Platformu bulma süresinde E-SCOP grubu E-SF grubu ile karşılaştırıldığında birinci ($U=1058,5$ $p=0,008$ $z=-2,6$) ve beşinci ($U=1015,5$ $p=0,008$ $z=-2,6$) günde anlamlı artış bulunurken ikinci ($U=1436,5$ $p=0,9$ $z=-0,0$), üçüncü ($U=1434,0$ $p=0,9$ $z=-0,0$) ve dördüncü ($U=1244,0$ $p=0,2$ $z=-1,2$) günde anlamlı fark saptanmadı. E-SCOP grubu S-SCOP grubu ile karşılaştırıldığında birinci ($U=948,0$ $p=0,2$ $z=-1,1$), ikinci ($U=910,5$ $p=0,2$ $z=-1,2$), üçüncü ($U=1042,0$ $p=0,9$ $z=-0,1$), dördüncü ($U=876,5$ $p=0,1$ $z=-1,5$) ve beşinci ($U=941,5$ $p=0,3$ $z=-0,9$) günde platformu bulma süresinde anlamlı fark bulunmadı (Şekil 23).



Şekil 23. Morris su havuzu testinde gizli platformu bulma süresi.

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ S-SF grubuna göre, ## $p < 0,01$ E-SF grubuna göre. Friedman'ın ANOVA testi takiben Mann Whitney U testi. Veriler ortalama $\pm$ SH olarak ifade edildi. Gruplarda N=11-15.

Morris su havuzu testinde eğitim denemelerinde beş gün boyunca yüzme hızında S-SF grubunda ANOVA ile günler arasında anlamlı fark bulundu [χ^2 (4) =17,14 $p < 0,01$]. Yüzme hızı, birinci gün ile karşılaştırıldığında üçüncü ($Z = -2,10$ $p = 0,03$), dördüncü ($Z = -3,22$ $p = 0,001$) ve beşinci ($Z = -3,34$ $p = 0,001$) günde anlamlı azaldı.

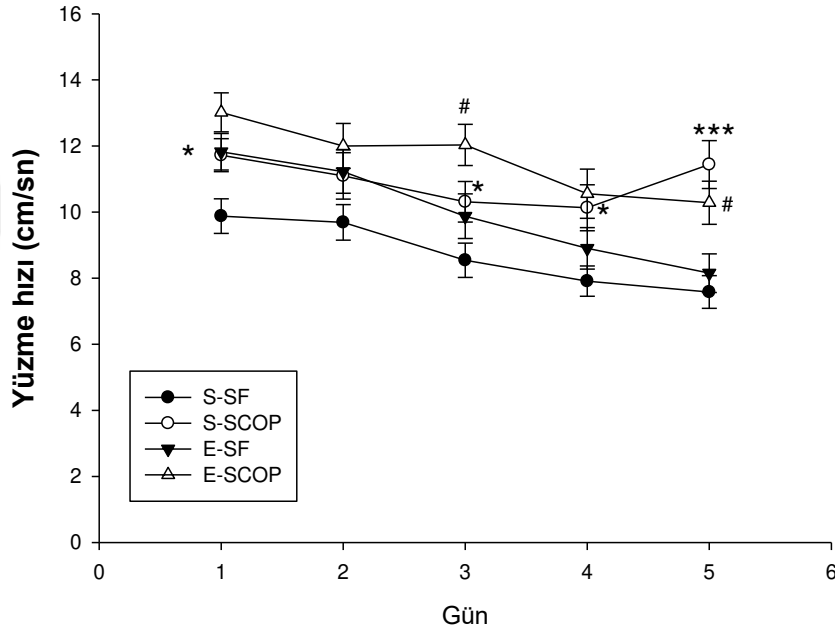
E-SF grubunda yüzme hızında günler arasında ANOVA anlamlı fark saptadı [χ^2 (4) =32,22 $p < 0,001$]. Birinci gün ile karşılaştırıldığında yüzme hızı, üçüncü ($Z = -2,27$ $p = 0,02$), dördüncü ($Z = -3,90$ $p < 0,001$) ve beşinci ($Z = -4,63$ $p < 0,001$) günde anlamlı azaldı.

Eğitim denemelerinde yüzme hızında S-SCOP grubunda günler arasında anlamlı fark saptandı [χ^2 (4) =9,8 $p = 0,043$]. Birinci gün ile karşılaştırıldığında dördüncü günde yüzme hızında azalma saptandı ($Z = -1,9$ $p = 0,04$).

E-SCOP grubunda yüzme hızında günler arasında ANOVA anlamlı fark bulmadı [χ^2 (4) =8,6 $p = 0,071$].

Morris su havuzu testinde eğitim denemelerinde yüzme hızında birinci [H (3, 212) =16,50 $p = 0,001$], üçüncü [H (3,212) =15,20 $p = 0,002$], dördüncü [H (3,212) =9,32 $p = 0,025$] ve beşinci [H (3,212) =21,43 $p < 0,001$] günlerde gruplar arasında anlamlı fark saptandı. E-SF grubu S-SF grubu ile karşılaştırıldığında birinci ($U = 1309,0$ $p = 0,01$ $z = -2,5$) günde yüzme hızında artış saptanırken diğer günlerde anlamlı fark bulunmadı. S-SCOP grubu S-SF grubu ile karşılaştırıldığında yüzme hızında birinci ($U = 935,0$ $p = 0,011$ $z = -2,5$), üçüncü ($U = 975,0$ $p = 0,023$ $z = -2,2$) dördüncü ($U = 946,0$ $p = 0,014$ $z = -$

2,4) ve beşinci ($U=729,0$ $p<0,001$ $z=-3,8$) günde anlamlı artış saptandı. E-SCOP grubunda E-SF grubu ile karşılaştırıldığında yüzme hızında üçüncü ($U=1049,0$ $p=0,016$ $z=-2,4$) ve beşinci ($U=1041,0$ $p=0,014$ $z=-2,4$) günde anlamlı artış bulunurken diğer günlerde anlamlı fark bulunmadı. E-SCOP grubu, S-SCOP grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı (Şekil 24).



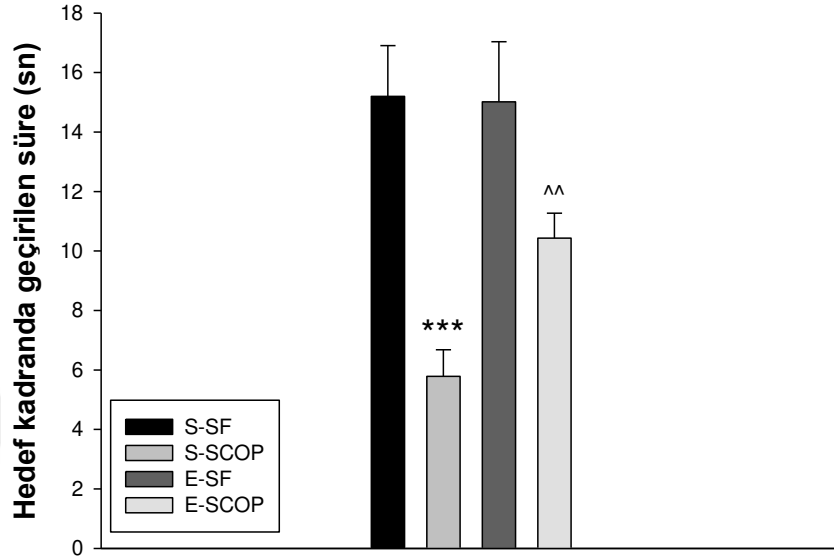
Şekil 24. Morris su havuzu testinde eğitim denemelerinde yüzme hızı (cm/sn).

* $p<0,05$, *** $p<0,01$ S-SF grubuna göre, # $p<0,05$ E-SF grubuna göre. Friedman'ın ANOVA testi takiben Mann Whitney U testi. Veriler ortalama $\pm$ SH olarak ifade edildi. Gruplarda $N=11-15$.

4.3.2. Test

Morris su havuzunda beş gün eğitim denemeleri tamamlanan fareler altıncı günde platform kaldırılarak platformun bulunduğu kadranın karşı kadrından deneye alındılar. Altıncı günde platformun bulunduğu kadranda geçirilen süreler bakıldığında gruplar arasında anlamlı fark bulundu [$H(3, 53) = 21,52$ $p<0,001$]. S-SCOP grubunda S-SF grubuna göre hedef kadranda geçirilen süre anlamlı olarak azaldı ($U=7,0$ $p<0,001$ $z=-3,9$). E-SF grubunda S-SF grubuna göre hedef kadranda geçirilen sürede anlamlı fark saptanmadı ($U=108,0$ $p=0,852$ $z=-0,1$). E-SCOP grubunda E-SF grubuna göre azalma eğilimi bulundu ($U=51,5$ $p=0,06$ $z=-1,8$). E-SCOP grubunda S-SCOP grubuna göre

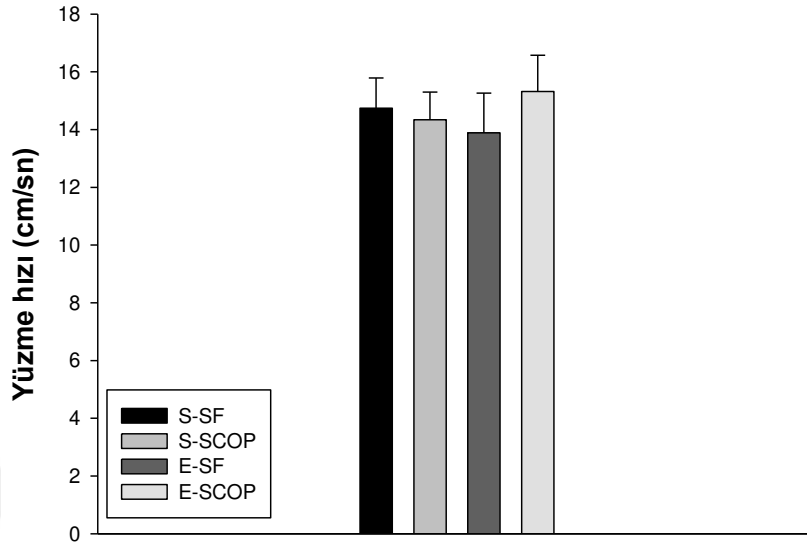
hedef kadranda geçirilen sürede anlamlı artış saptandı ($U=19,5$ $p=0,004$ $z=-2,8$) (Şekil 25).



Şekil 25. Morris su havuzu testinde hedef kadranda geçirilen süre.

*** $p<0,001$ S-SF grubuna göre, ^^ $p<0,01$ S-SCOP grubuna göre. Kruskal Wallis takiben Mann Whitney U testi. Veriler ortalama $\pm$ SH olarak ifade edildi. Gruplarda $N=11-15$.

Morris su havuzu test gününde gruplar arasında yüzme hızında anlamlı fark bulunmadı [$H(3, 53) = 1,038$ $p=0,79$] (Şekil 26).



Şekil 26. Morris su havuzu testinde yüzme hızı (cm/sn).

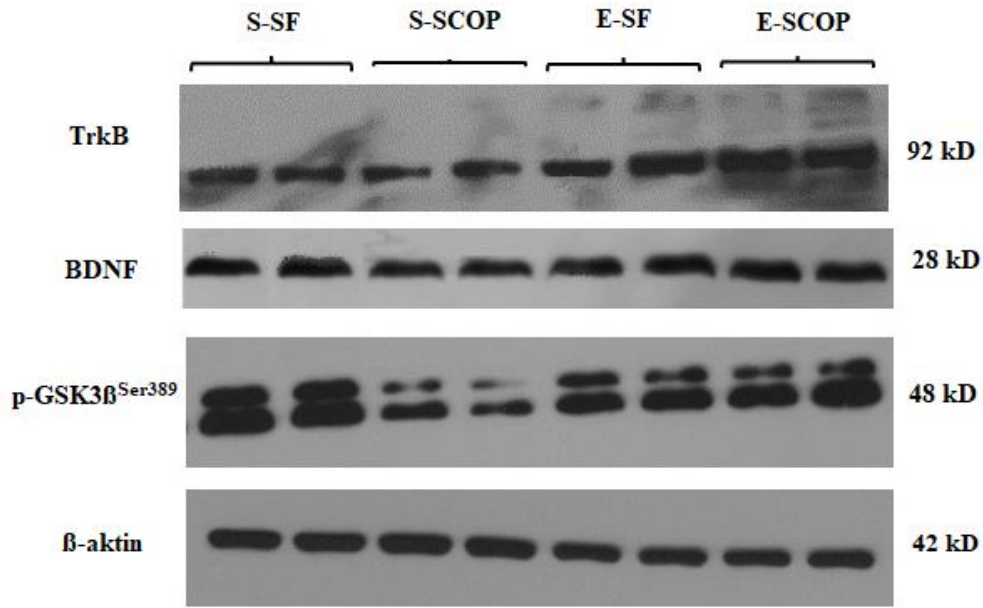
Veriler ortalama $\pm$ SH olarak ifade edildi. Gruplarda N=11-15.

4.4. Western Blot Analizi

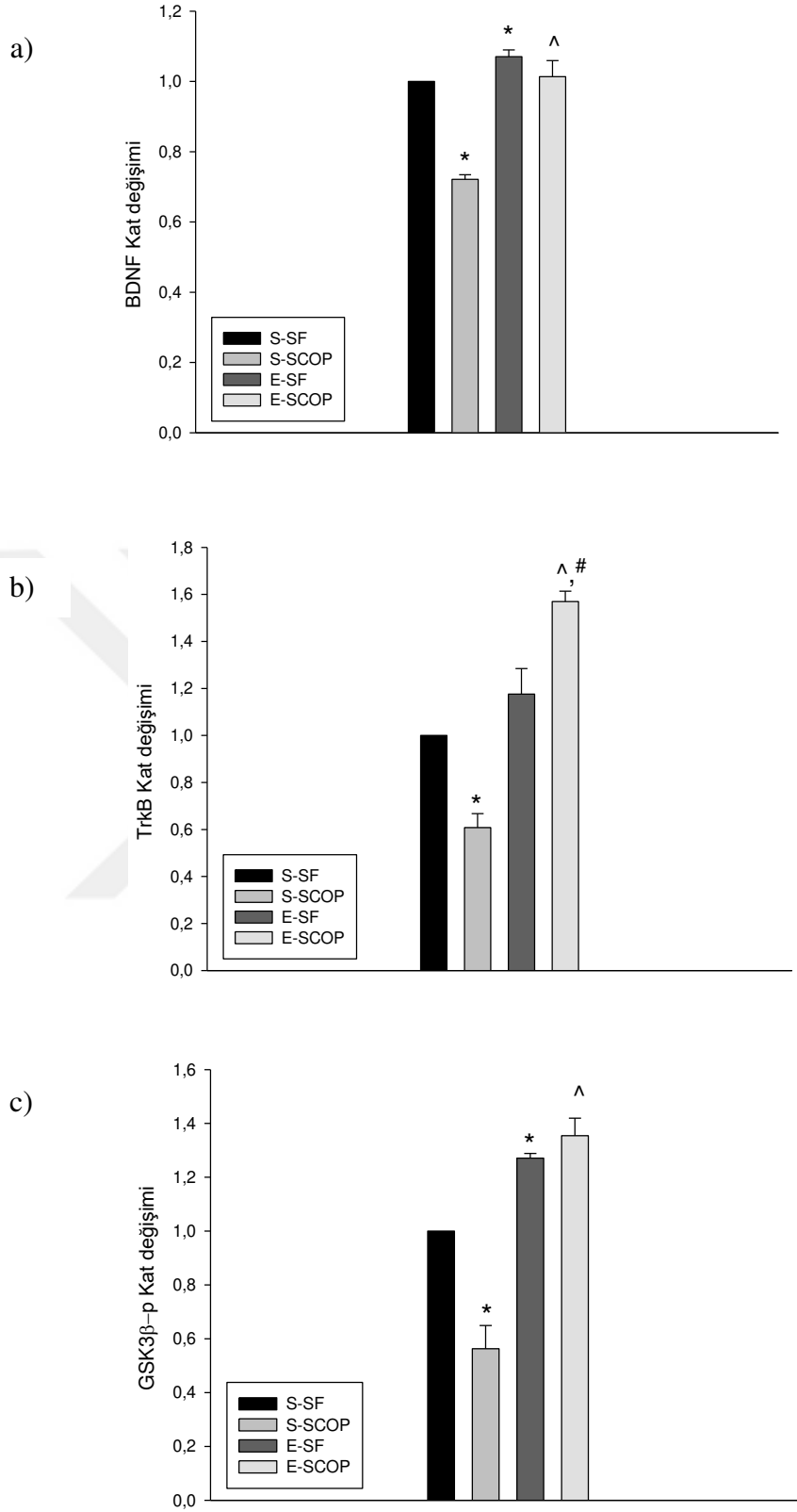
Western Blot ile hipokampus BDNF ekspresyonunda gruplar arasında anlamlı fark saptandı [$H(3, 16) = 11,13$ $p=0,011$] (Şekil 21). E-SF grubunda S-SF grubuna göre BDNF ekspresyonunda anlamlı artış bulundu ($U=0,0$ $p=0,01$ $z=-2,4$). S-SCOP grubunda S-SF grubuna göre BDNF ekspresyonu anlamlı azaldı ($U=0,0$ $p=0,014$ $z=-2,4$). E-SCOP grubunda S-SCOP grubuna göre BDNF ekspresyonu anlamlı arttı ($U=1,0$ $p=0,01$ $z=-2,3$). E-SCOP grubunda E-SF grubuna göre BDNF ekspresyonunda anlamlı fark bulunmadı ($U=4,0$ $p=0,24$ $z=-1,1$) (Şekil 27 ve 28a).

Hipokampus TrkB ekspresyonunda gruplar arasında anlamlı fark bulundu [$H(3, 16) = 13,29$ $p=0,004$]. S-SCOP grubunda S-SF grubuna göre TrkB ekspresyonu anlamlı azaldı ($U=0,0$ $p=0,01$ $z=-2,4$). E-SCOP grubunda S-SCOP grubuna göre TrkB ekspresyonu anlamlı arttı ($U=0,0$ $p=0,02$ $z=-2,3$). E-SCOP grubunda E-SF grubuna göre TrkB ekspresyonu anlamlı arttı ($U=0,0$ $p=0,01$ $z=-2,3$). E-SF grubunda S-SF grubuna göre TrkB ekspresyonu anlamlı fark bulunmadı ($U=4,0$ $p=0,21$ $z=-1,2$) (Şekil 27 ve 28b).

Hipokampus p-GSK3 β ^{Ser389} ekspresyonunda gruplar arasında anlamlı fark bulundu [H (3, 16) =12,98 p=0,005]. E-SF grubunda S-SF grubuna göre p-GSK3 β ^{Ser389} ekspresyonunda anlamlı artış bulundu (U=0,0 p=0,01 z=-2,4). S-SCOP grubunda S-SF grubuna göre p-GSK3 β ^{Ser389} ekspresyonu anlamlı azaldı (U=0,0 p=0,014 z=-2,4). E-SCOP grubunda S-SCOP grubuna göre p-GSK3 β ^{Ser389} ekspresyonu anlamlı arttı (U=0,0 p=0,02 z=-2,3). E-SCOP grubunda E-SF grubuna göre p-GSK3 β ^{Ser389} ekspresyonunda anlamlı fark bulunmadı (U=6,0 p=0,56 z=-0,5) (Şekil27 ve 28c).



Şekil 27. Western blot analizinde hipokampusa ait görüntü.



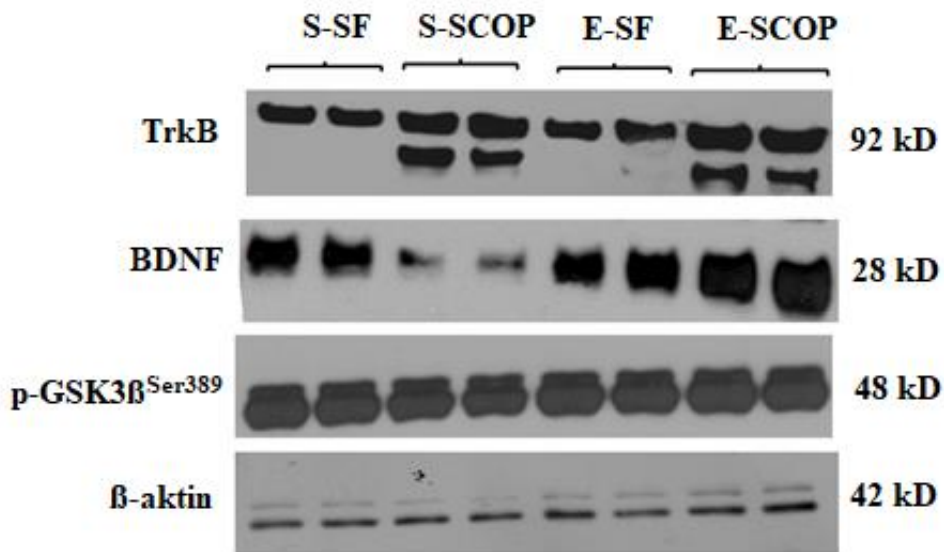
Şekil 28. Hipokampusta, western blot testinde kat değişimi.

a) BDNF kat değişimi, b) TrkB kat değişimi, c) p-GSK3 β ^{Ser389} kat değişimi. *p<0,05 S-SF grubuna göre, ^p<0,05 S-SCOP grubuna göre, #p<0,01 E-SF grubuna göre. Kruskal Wallis takiben Mann Whitney U testi. Gruplarda N=4.

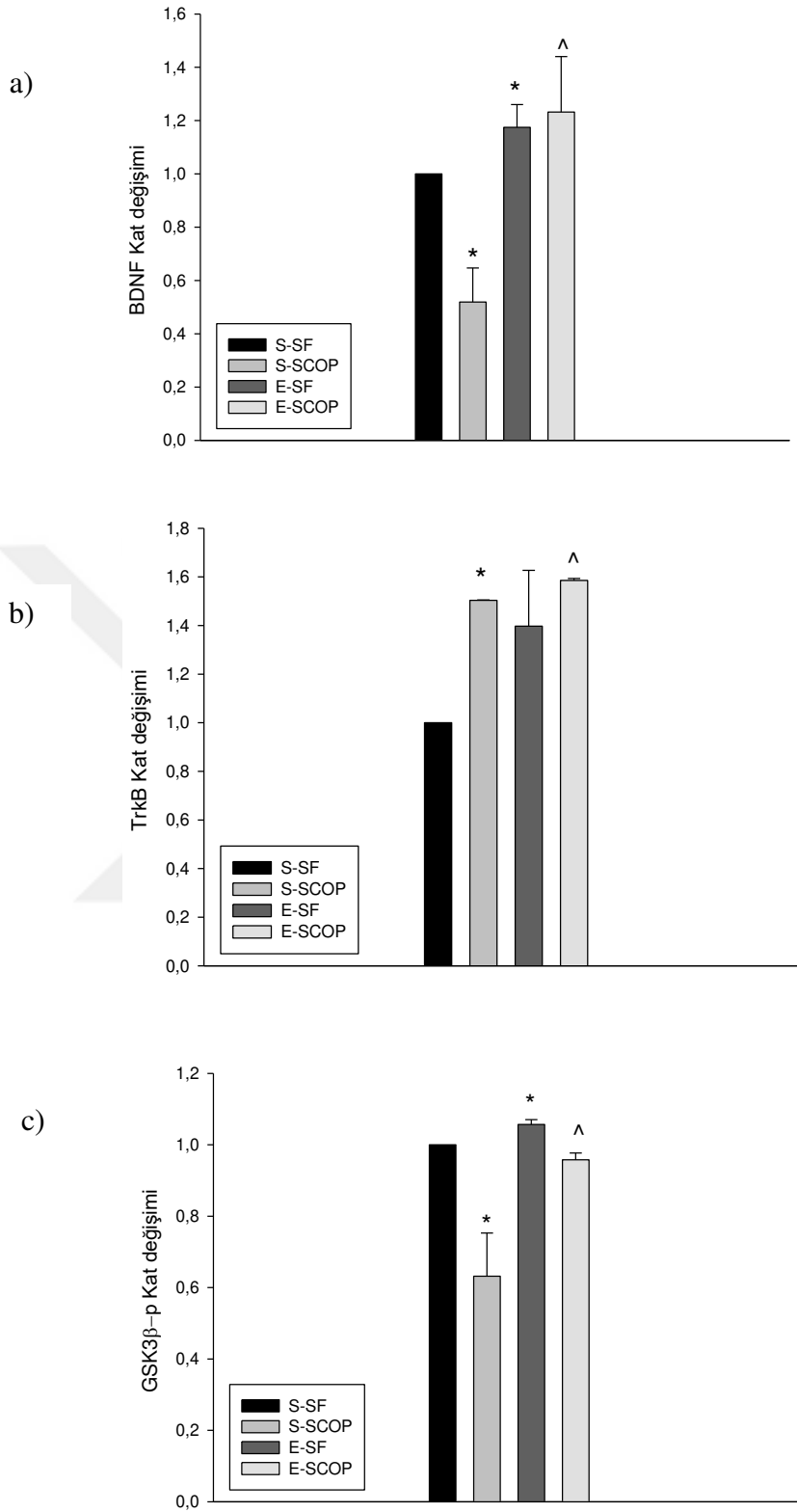
Western Blot ile prefrontal korteks BDNF ekspresyonunun da gruplar arasında anlamlı fark saptandı [H (3, 16) =10,07 p=0,018] (Şekil 30). E-SF grubunda S-SF grubuna göre BDNF ekspresyonunda anlamlı artış bulundu (U=0,0 p=0,01 z=-2,4). S-SCOP grubunda S-SF grubuna göre BDNF ekspresyonu anlamlı azaldı (U=0,0 p=0,014 z=-2,4). E-SCOP grubunda S-SCOP grubuna göre BDNF ekspresyonu anlamlı arttı (U=0,0 p=0,02 z=-2,3). E-SCOP grubunda E-SF grubuna göre BDNF ekspresyonunda anlamlı fark bulunmadı (U=8,0 p=1,00 z=0,0) (Şekil 29 ve 30a).

Prefrontal korteks TrkB ekspresyonunda gruplar arasında anlamlı fark bulundu [H (3, 16) =7,8 p=0,04]. S-SCOP grubunda S-SF grubuna göre TrkB ekspresyonu anlamlı arttı (U=0,0 p=0,013 z=-2,4). E-SCOP grubunda S-SCOP grubuna göre TrkB ekspresyonu anlamlı arttı (U=0,0 p=0,01 z=-2,3). E-SF grubunda S-SF grubuna (U=4,0 p=0,12 z=0,0) ve E-SCOP grubuna (U=8,0 p=1,00 z=0,0) göre TrkB ekspresyonunda anlamlı fark bulunmadı (Şekil 29 ve 30b).

Prefrontal korteks p-GSK3 β ^{Ser389} [H (3, 16) =14,32 p=0,002] ekspresyonunda gruplar arasında anlamlı fark bulundu. E-SF grubunda S-SF grubuna göre p-GSK3 β ^{Ser389} ekspresyonunda anlamlı artış bulundu (U=0,0 p=0,014 z=-2,4). S-SCOP grubunda S-SF grubuna göre p-GSK3 β ^{Ser389} ekspresyonu anlamlı azaldı (U=0,0 p=0,014 z=-2,4). E-SCOP grubunda S-SCOP grubuna göre p-GSK3 β ^{Ser389} ekspresyonu anlamlı arttı (U=0,0 p=0,021 z=-2,3). E-SCOP grubunda E-SF grubuna göre p-GSK3 β ^{Ser389} ekspresyonu anlamlı azaldı (U=0,0 p=0,021 z=-2,3) (Şekil 29 ve 30c).



Şekil 29. Western blot analizinde prefrontal kortekse ait görüntü.

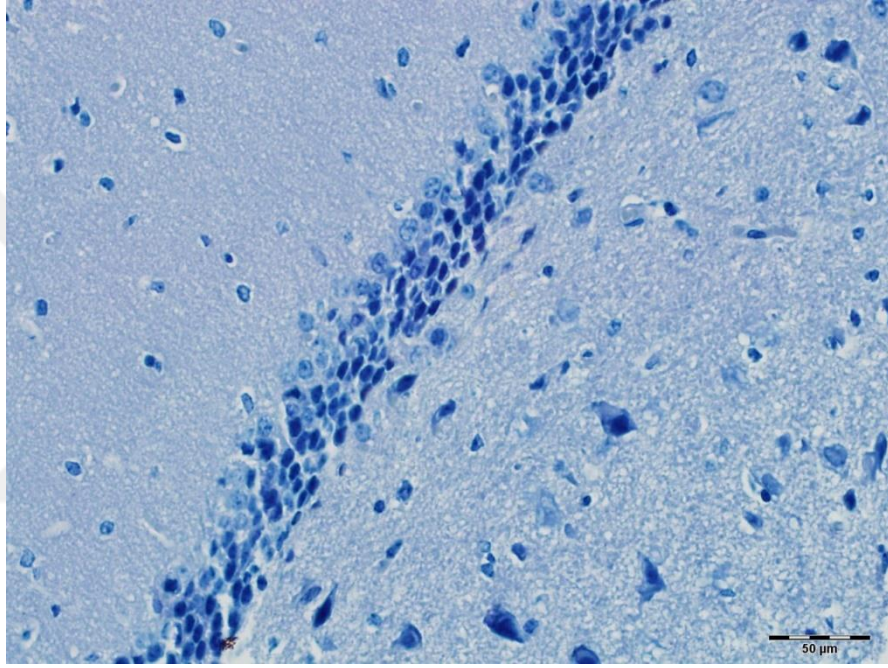


Şekil 30. Prefrontal kortekste, western blot testinde kat değişimi.

a) BDNF kat değişimi, b) TrkB kat değişimi, c) p-GSK3β^{Ser389} kat değişimi. *p<0,05 S-SF grubuna göre, ^p<0,05 S-SCOP grubuna göre. Kruskal Wallis takiben Mann Whitney U testi. Gruplarda N=4.

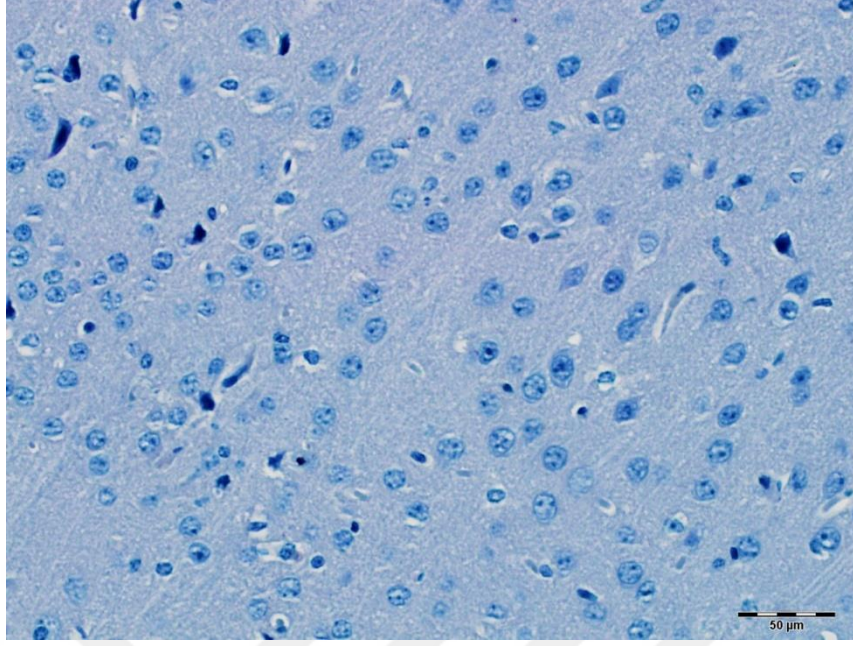
4.5. İmmünohistokimya Analizi

A β -40 ve APP ekspresyonunun belirlenmesi amacıyla alınan hipokampus ve prefrontal korteks dokuları immünohistokimyasal yöntemle incelendi (Şekil 49a,b ve Şekil 50a,b). Negatif kontrol amacıyla primer antikör uygulanmayan hipokampus ve prefrontal korteks kesitlerinde herhangi bir immün işaretleme izlenmedi (Şekil 31 ve Şekil 32).



Şekil 31. Hipokampus negatif kontrol grubu.

Negatif kontrol amacıyla hipokampustan alınan kesitte A β -40 proteinine ait herhangi bir immün işaretlemenin olmadığı görülmektedir. Bar = 50 µm.

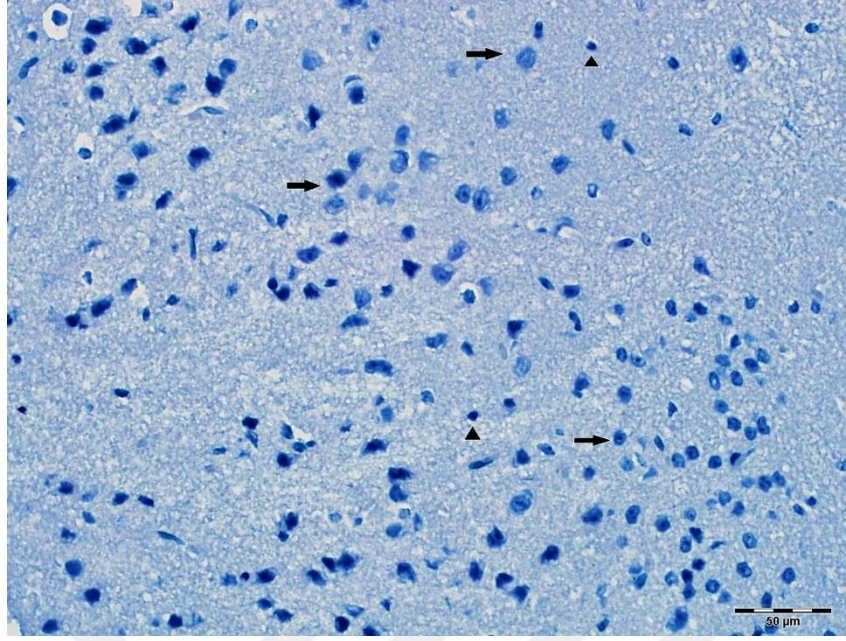


Şekil 32. Prefrontal korteks negatif kontrol grubu.

Negatif kontrol amacıyla prefrontal korteksten alınan kesitte APP'ye ait herhangi bir immün işaretlemenin olmadığı görülmektedir. Bar = 50 µm.

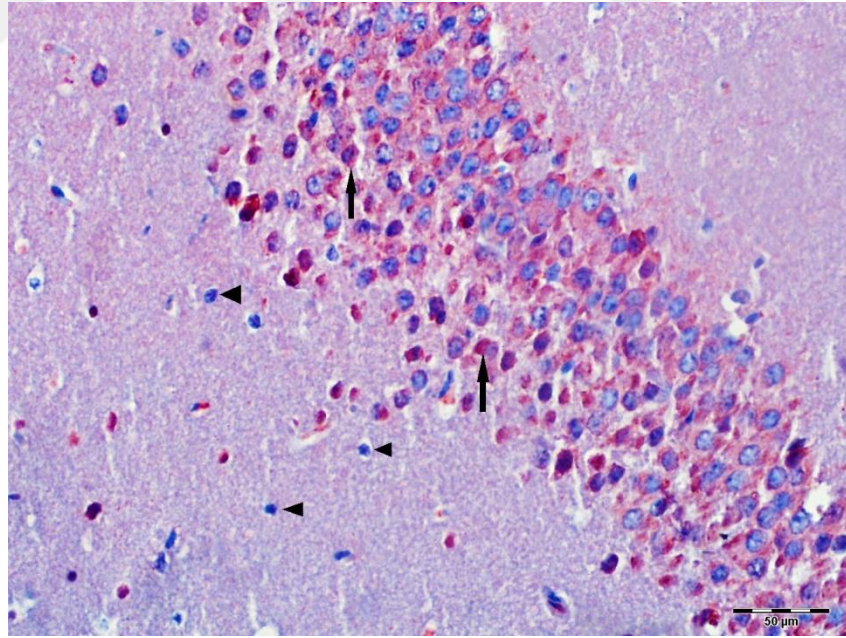
S-SF grubundan elde edilen hipokampus ve prefrontal korteks doku örneklerinde Aβ-40 ve APP ekspresyonları değerlendirildi. Hipokampus doku kesitleri Aβ-40 immünreaktivitesi açısından değerlendirildiğinde, nöronların ve glia hücrelerinin sitoplazmalarında herhangi bir immün boyanma gözlenmedi. Ayrıca sinir liflerinde ve perinöronal alanlarda herhangi bir boyanma izlenmedi (Şekil 33). Hipokampus kesitlerinin APP immünreaktivitesi değerlendirildiğinde nöronların sitoplazmalarında ve perinöronal alanlarda belirgin APP immunreaktivitesi görüldü. Buna karşın, glia hücrelerinde APP immunoreaktivitesi görülmedi (Şekil 34).

S-SF grubundan alınan prefrontal korteks doku kesitleri de Aβ-40 ve APP immunreaktivitesi açısından değerlendirildi. Nöron sitoplazmasında ve perinöronal alanda Aβ-40 ekspresyonu gözlemlenmedi. Ayrıca glia hücrelerinde de herhangi bir Aβ-40 immunreaktivitesi izlenmedi (Şekil 35). APP için yapılan incelemede, nöronların sitoplazmalarında ve perinöronal alanda belirgin APP immunoreaktivitesi görüldü. Bununla birlikte, prefrontal kortekste glia hücrelerinde herhangi bir APP immunoreaktivitesi görülmedi (Şekil 36).



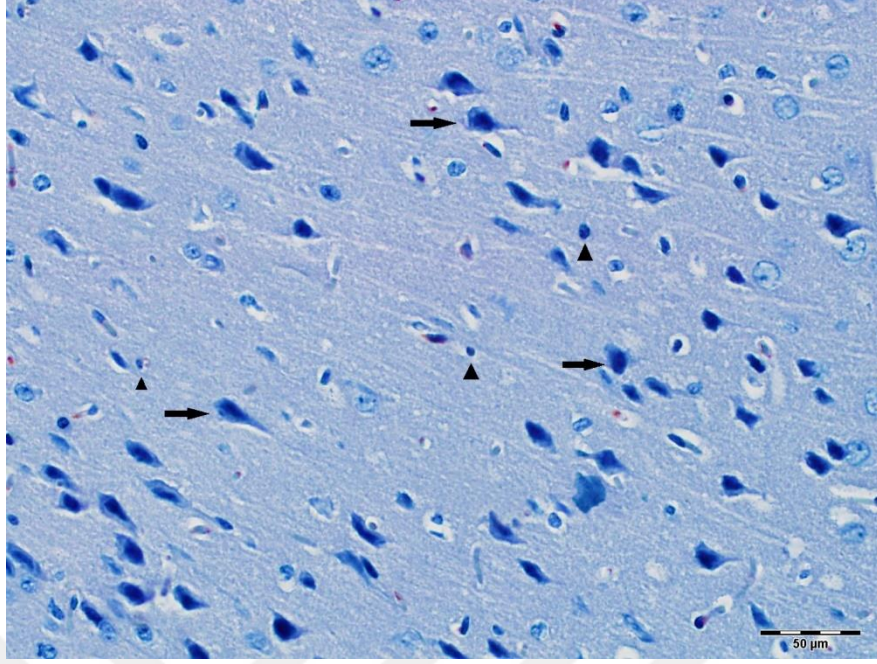
Şekil 33. Hipokampus S-SF Grubu Aβ-40 immunoreaktivitesi.

Hipokampuste, nöronlarda (oklar), gliya hücrelerinde (ok başları) ve perinöronal alanlarda (*) herhangi bir boyanma izlenmemektedir. Bar= 50 μm.



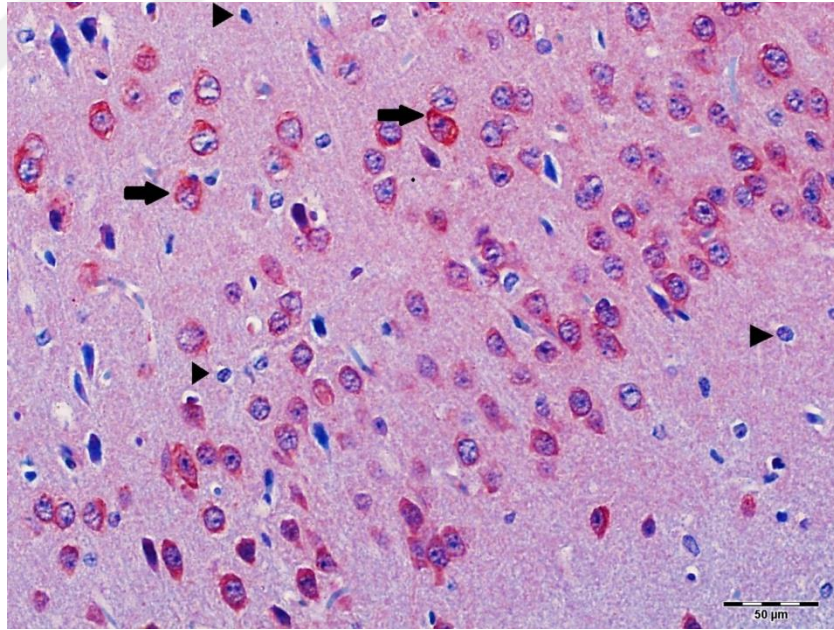
Şekil 34. Hipokampus S-SF Grubu APP immunoreaktivitesi.

Hipokampus dokusunda APP immnoreaktivitesinin nöron sitoplazmasında (ok) güçlü ekspresyonu görülmektedir. Glia hücrelerinde ise APP ekspresyonunun olmadığı (ok başı) izlenmektedir. Bar= 50 μm.



Şekil 35. Prefrontal Korteks S-SF Grubu Aβ-40 immunoreaktivitesi.

Prefrontal Korteks dokusunda Aβ-40 immunoreaktivitesinin nöron sitoplazmalarında (ok) ve glia hücrelerinde (ok başı) eksprese olmadığı görülmektedir. Bar= 50 μm.

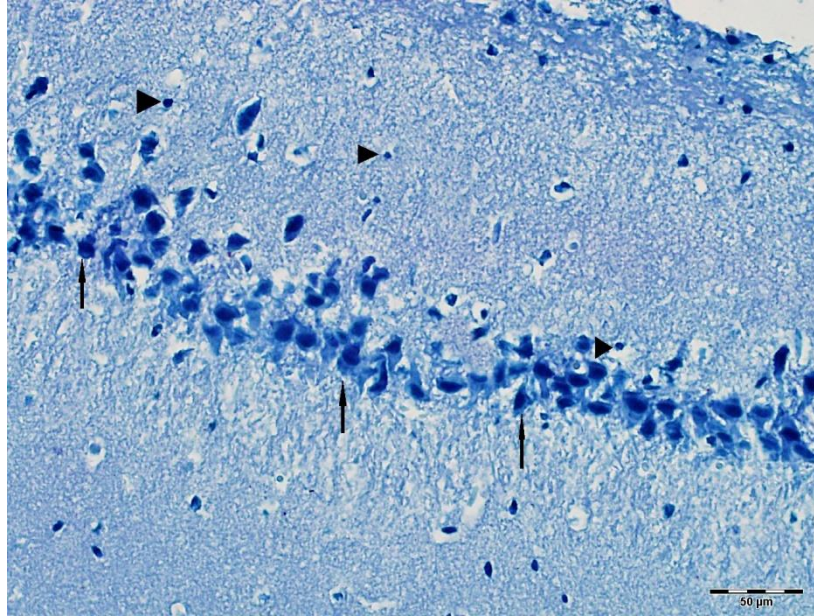


Şekil 36. Prefrontal Korteks S-SF Grubu APP immunoreaktivitesi.

Prefrontal Korteks dokusunda APP immunoreaktivitesinin nöron sitoplazmalarında güçlü ekspresyonu (ok) görülmektedir. Ancak glia hücrelerinde (ok başı) APP'nin eksprese olmadığı görülmektedir. Bar= 50 μm.

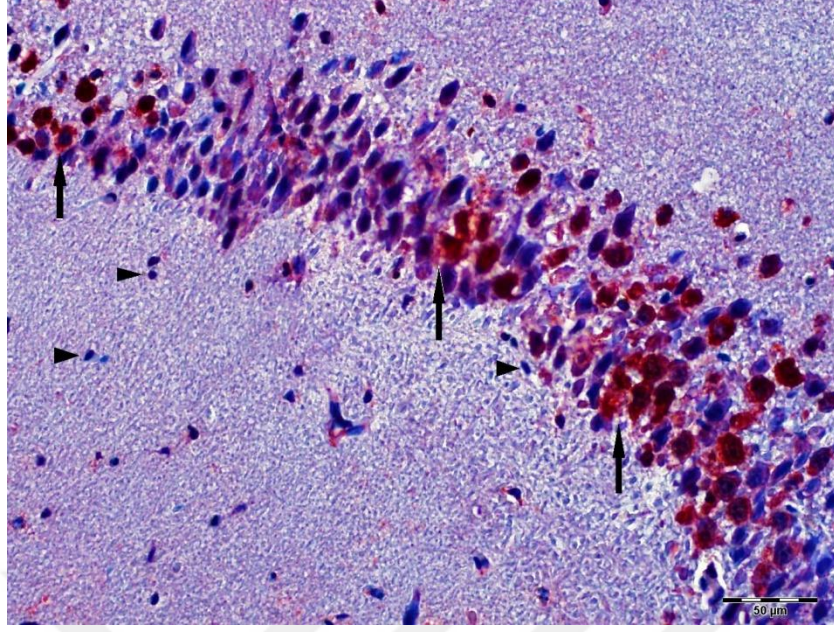
E-SF grubundan elde edilen hipokampus ve prefrontal korteks doku örneklerinde, A β -40 ve APP ekspresyonu değerlendirildi. Hipokampus doku kesitleri A β -40 immunreaktivitesi yönünden incelendiğinde, nöronların ve glia hücrelerinin sitoplazmalarında ekspresyon olmadığı görüldü. Ayrıca perinöronal alanda da herhangi bir immunreaktivite izlenmedi (Şekil 37). Bununla birlikte APP immunoreaktivitesi açısından yapılan değerlendirmede nöronların sitoplazmalarında ve perinöronal alanlarda, ekspresyon varlığı dikkati çekti. Ancak, glia hücrelerinde herhangi bir APP ekspresyonu görülmedi (Şekil 38).

E-SF grubuna ait farelerden alınan prefrontal korteks doku kesitlerinde, A β -40 ve APP immunoreaktivitesi değerlendirildi. A β -40 immunoreaktivitesi açısından yapılan değerlendirmede, nöronların ve glia hücrelerinin sitoplazmalarında ve perinöronal alanlarda herhangi bir immunoreaktivite yoktu (Şekil 39). Buna karşın, APP için yapılan değerlendirmede nöronların sitoplazmalarında ve perinöronal alanda belirgin APP ekspresyonu görüldü. Ancak glia hücrelerinde herhangi bir immunoreaktivite izlenmedi (Şekil 40).



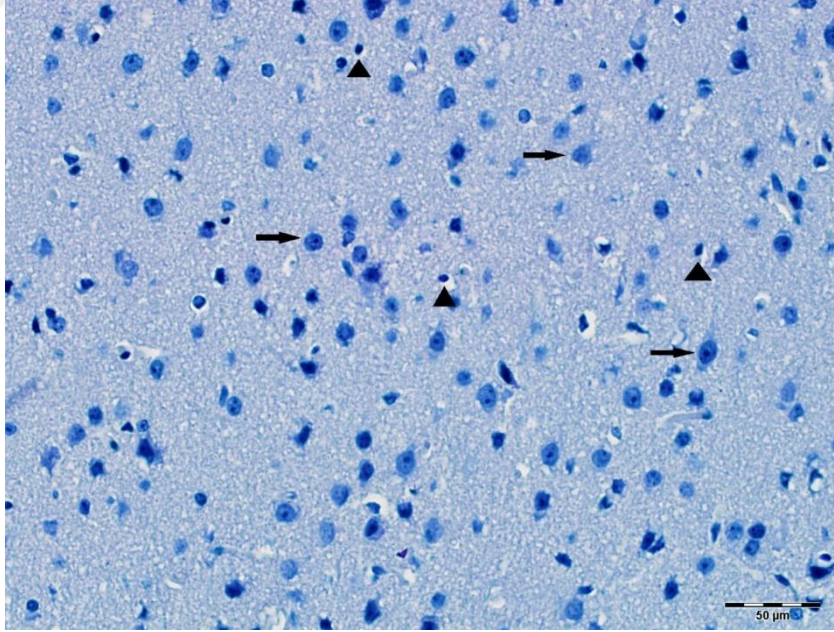
Şekil 37. Hipokampus E-SF Grubu A β -40 immunoreaktivitesi.

Hipokampus dokusunda A β -40 immunoreaktivitesinin nöron sitoplazmalarında (ok) ve glia hücrelerinde (ok başı) eksprese olmadığı görülmektedir. Bar= 50 μ m.



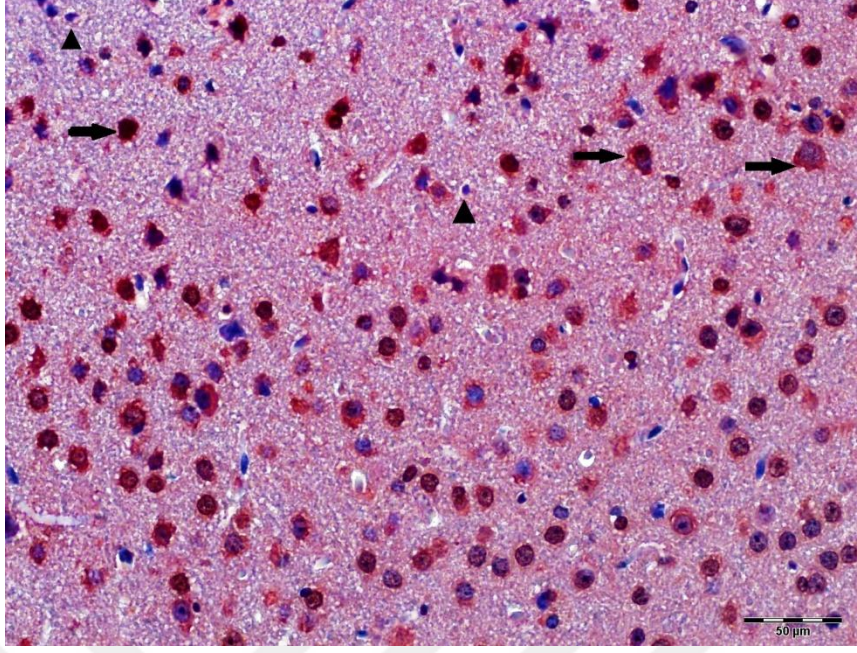
Şekil 38. Hipokampus E-SF Grubu APP immunoreaktivitesi.

Hipokampus dokusunda APP immnoreaktivitesinin nöron sitoplazmasında (ok) güçlü ekspresyonu görülmektedir. Glia hücrelerinde ise APP ekspresyonunun olmadığı ya da bazı glia hücrelerinde zayıf ekspresyonu (ok başı) izlenmektedir. Bar= 50 µm.



Şekil 39. Prefrontal Korteks E-SF Grubu Aβ-40 immunoreaktivitesi.

Prefrontal Korteks dokusunda Aβ-40 immunoreaktivitesinin nöron sitoplazmalarında (ok) ve glia hücrelerinde (ok başı) eksprese olmadığı görülmektedir. Bar= 50 µm.

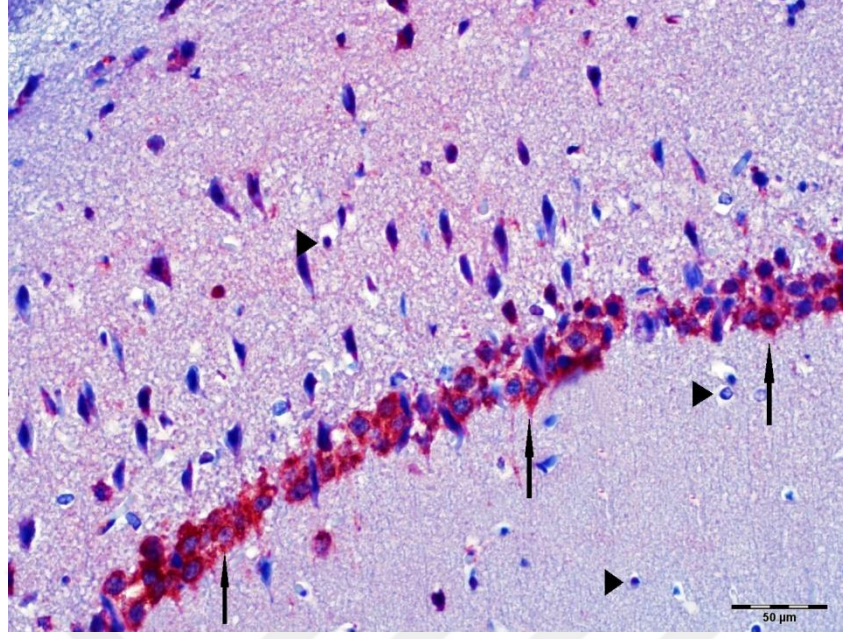


Şekil 40. Prefrontal Korteks E-SF Grubu APP immunoreaktivitesi.

Prefrontal Korteks dokusunda APP immunoreaktivitesinin nöron sitoplazmalarında güçlü ekspresyonu (ok) görülmektedir. Ancak glia hücrelerinde (ok başı) APP'nin eksprese olmadığı ya da bazı glia hücrelerinde zayıf ekspresyonu görülmektedir. Bar= 50 μ m.

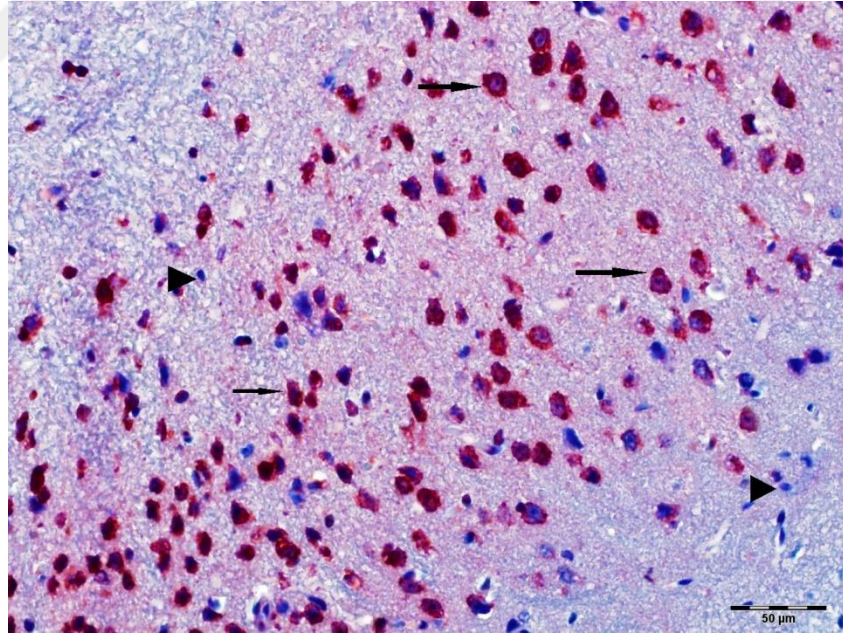
S-SCOP grubundaki farelerden alınan hipokampus ve prefrontal korteks dokuları A β -40 ve APP immunoreaktivitesi açısından değerlendirildi. Hipokampus doku kesitlerinin A β -40 ekspresyonu için yapılan değerlendirmesinde, nöronların sitoplazmalarında ve perinöronal alanlarda belirgin A β -40 ekspresyonunun varlığı dikkati çekti. Bu ekspresyon özellikle nöronların sitoplazmalarında daha çok belirgindi. Ayrıca glia hücrelerinde herhangi bir immunoreaktivitenin olmadığı görüldü (Şekil 41). Hipokampus doku kesitlerinin APP ekspresyonu için yapılan incelemesinde, nöronların sitoplazmalarında ve perinöronal alanlarda belirgin immunoreaktivite izlendi. Ancak glia hücrelerinde herhangi bir APP immunoreaktivitesi gözlemlenmedi (Şekil 42).

Prefrontal korteks doku kesitleri, A β -40 ve APP immunoreaktivitesi açısından değerlendirildi. A β -40 için yapılan değerlendirmede, nöronların sitoplazmalarında ve perinöronal alanlarda A β -40 ekspresyonunun varlığı görüldü. Glia hücrelerin çoğunluğunda ekspresyon gözlemlenmezken, birkaç glia hücresinde minimal immunoreaktivitenin varlığı dikkati çekti (Şekil 43). Bununla birlikte nöronların sitoplazmalarında ve perinöronal alanlarda belirgin APP ekspresyonu izlendi. Ancak glia hücrelerinde herhangi bir APP immunoreaktivitesi görülmedi (Şekil 44).



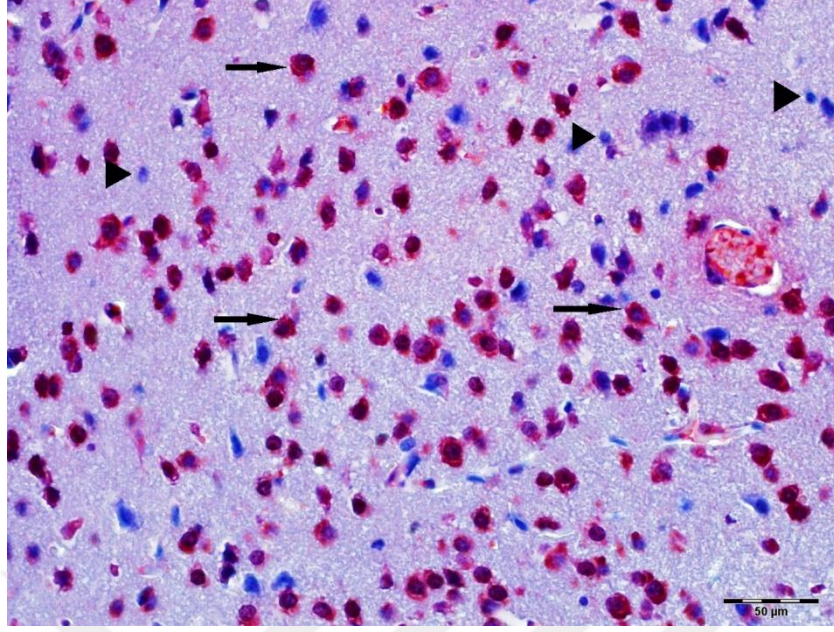
Şekil 41. Hipokampus S-SCOP Grubu Aβ-40 immunoreaktivitesi.

Hipokampus dokusunda Aβ-40 immunoreaktivitesinin nöron sitoplazmalarında (ok) güçlü ekspresyonu görülmektedir. Bununla birlikte Aβ-40 immunoreaktivitesinin glia hücrelerinde (ok başı) eksprese olmadığı görülmektedir. Bar= 50 μm.



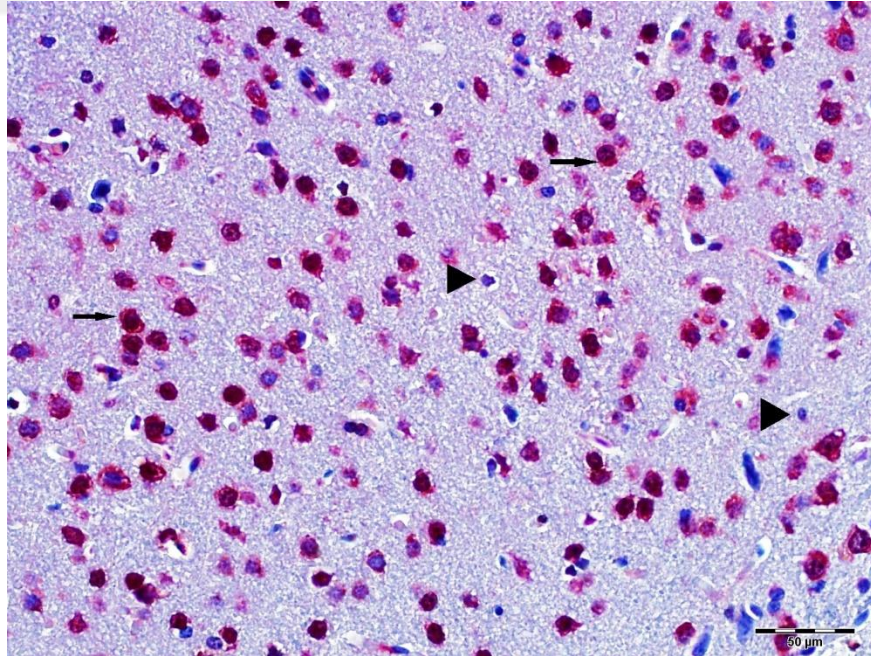
Şekil 42. Hipokampus S-SCOP Grubu APP immunoreaktivitesi.

Hipokampus dokusunda APP immunoreaktivitesinin nöron sitoplazmalarında güçlü ekspresyonu (ok) görülmektedir. Ancak glia hücrelerinde (ok başı) APP'nin eksprese olmadığı ya da bazı glia hücrelerinde zayıf ekspresyonu görülmektedir. Bar= 50 μm.



Şekil 43. Prefrontal Korteks S-SCOP Grubu Aβ-40 immunoreaktivitesi.

Prefrontal korteks dokusuna ait kesitlerde Aβ-40 immunoreaktivitesinin nöron sitoplazmalarında (ok) güçlü ekspresyonu görülmektedir. Bununla birlikte Aβ-40 immunoreaktivitesinin glia hücrelerinde (ok başı) eksprese olmadığı izlenmektedir. Bar= 50 μm.

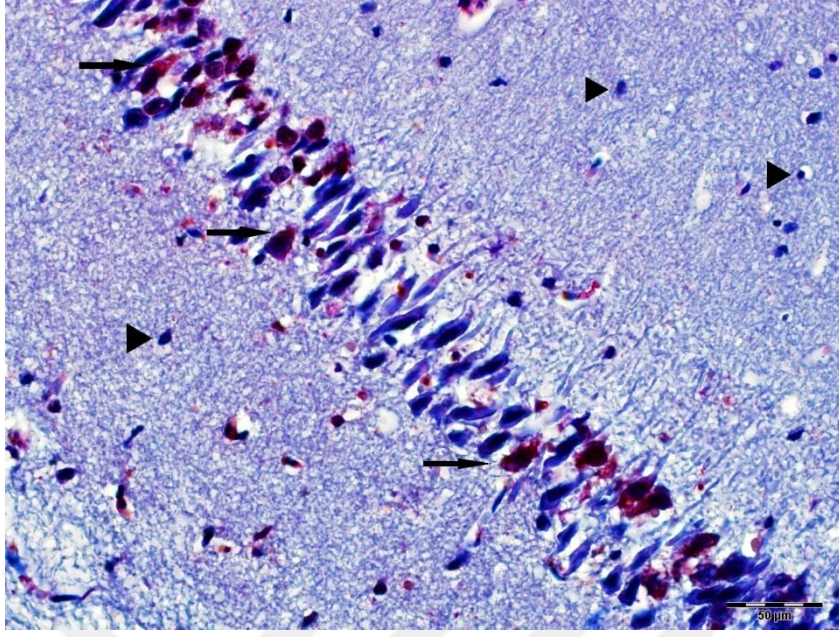


Şekil 44. Prefrontal Korteks S-SCOP Grubu APP immunoreaktivitesi.

Prefrontal korteks dokusunda APP immunoreaktivitesinin nöron sitoplazmalarında güçlü ekspresyonu (ok) görülmektedir. Ancak glia hücrelerinde (ok başı) APP'nin eksprese olmadığı izlenmektedir. Bar= 50 μm.

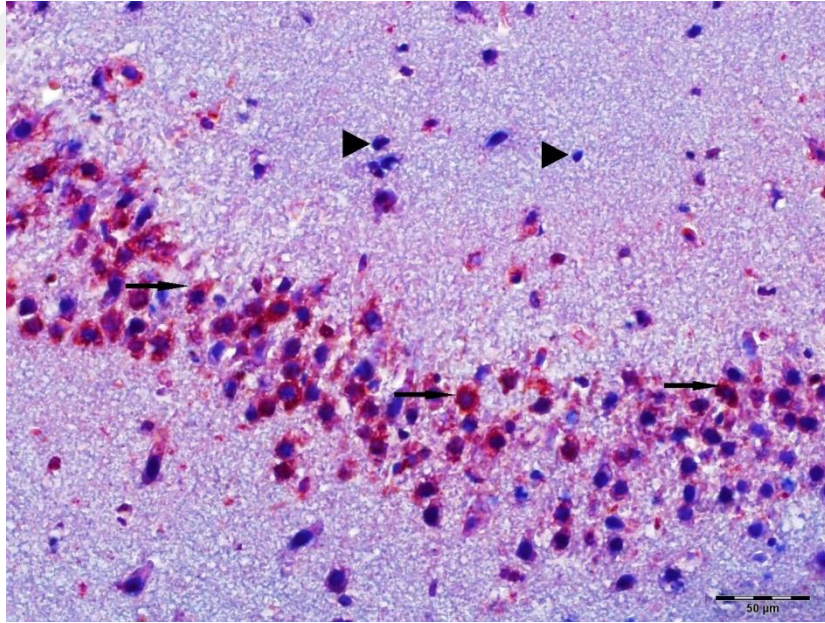
E-SCOP grubuna ait farelerden alınan hipokampus ve prefrontal korteks doku kesitleri de A β -40 ve APP immunoreaktivitesi açısından değerlendirildi. Hipokampus doku kesitlerinin A β -40 ekspresyonu açısından yapılan değerlendirmesinde, CA1 bölgesinde bulunan nöronların sitoplazmasında ve perinöronal alanlarında oldukça minimal A β -40 ekspresyonunun varlığı dikkat çekiciydi. Ayrıca yine bu bölgedeki birçok nöron sitoplazmasında immunoreaktivite görülmezken, az sayıda nöron sitoplazmasında A β -40 ekspresyonu izlendi. Buna karşın glia hücrelerinin sitoplazmalarında, herhangi bir ekspresyon izlenmedi (Şekil 45). Hipokampus doku kesitlerinin APP immunoreaktivitesi açısından yapılan değerlendirmesinde, nöronların sitoplazmalarında ve perinöronal alanlarda belirgin APP ekspresyonu varlığı dikkati çekti. Ancak glia hücrelerinde APP immunoreaktivitesi görülmedi (Şekil 46).

E-SCOP grubuna ait farelerden alınan prefrontal korteks dokularında A β -40 ve APP antikorları için immunohistokimyasal değerlendirme yapıldı. Alınan doku kesitlerinde A β -40 için yapılan incelemede, az sayıda nöronda minimal A β -40 ekspresyonunun varlığı izlendi. Bununla birlikte glia hücrelerinde ekspresyon gözlemlenmedi (Şekil 47). Ancak APP için yapılan değerlendirmede, bu durumun aksine belirgin APP immunoreaktivitesinin varlığı hem nöronların sitoplazmalarında hem de perinöronal alanlarda dikkati çekmekteydi. Glia hücrelerinin sitoplazmalarında herhangi bir immunoreaktivite görülmedi (Şekil 48).



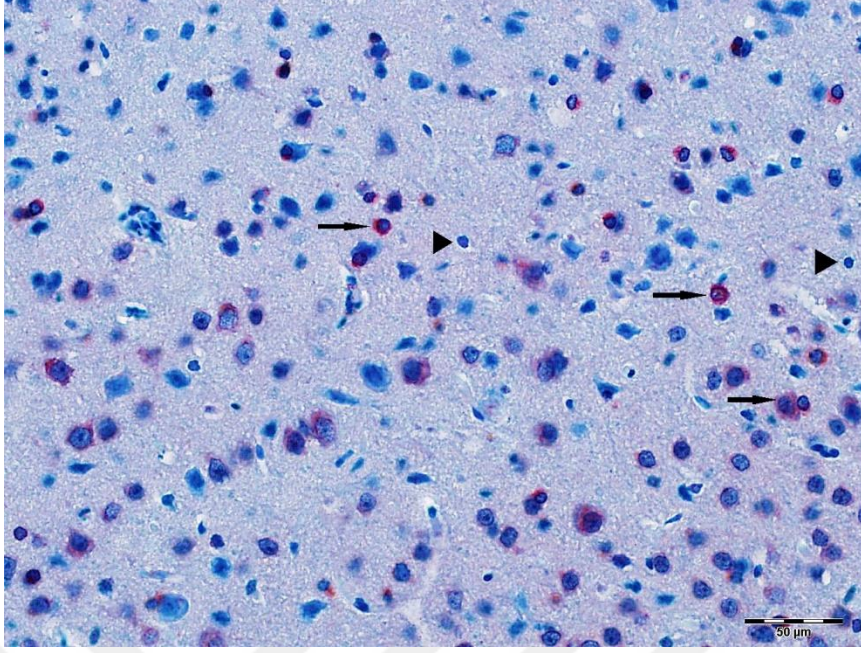
Şekil 45. Hipokampus E-SCOP Grubu Aβ-40 immunoreaktivitesi.

Hipokampus dokusunda Aβ-40 immunoreaktivitesinin eksprese olduğu nöronlarda nöron sitoplazmaları ve perinöronal alanlar izlenmektedir (ok). Glia hücrelerinde (ok başı) Aβ-40'ın eksprese olmadığı görülmektedir. Bar= 50 μm.



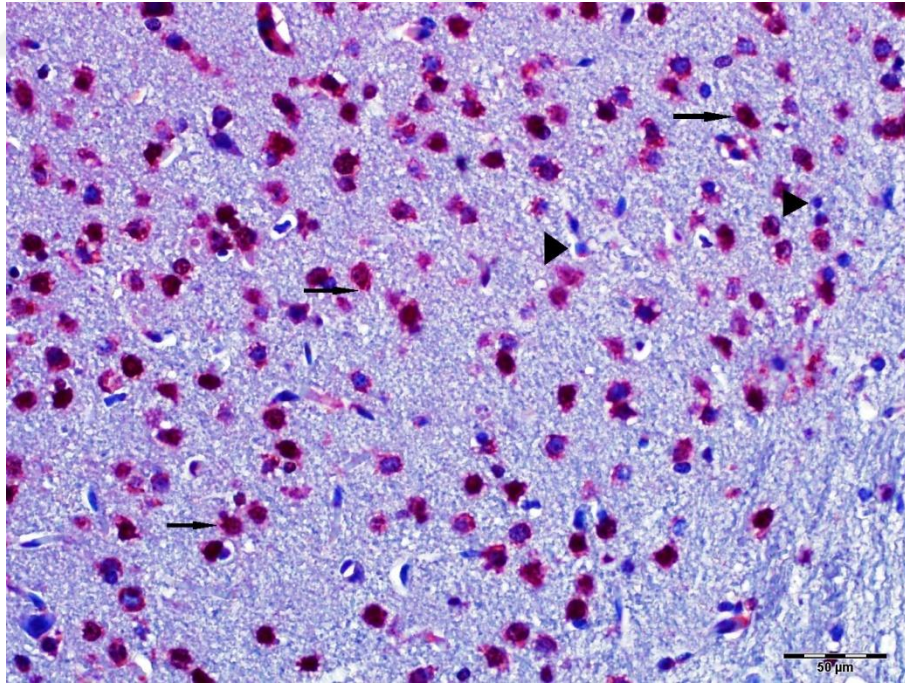
Şekil 46. Hipokampus E-SCOP Grubu APP immunoreaktivitesi.

Hipokampus dokusunda APP immunoreaktivitesinin nöron sitoplazmalarında güçlü ekspresyonu (ok) görülmektedir. Ancak glia hücrelerinde (ok başı) APP'nin eksprese olmadığı ya da bazı glia hücrelerinde zayıf ekspresyonu görülmektedir. Bar= 50 μm.



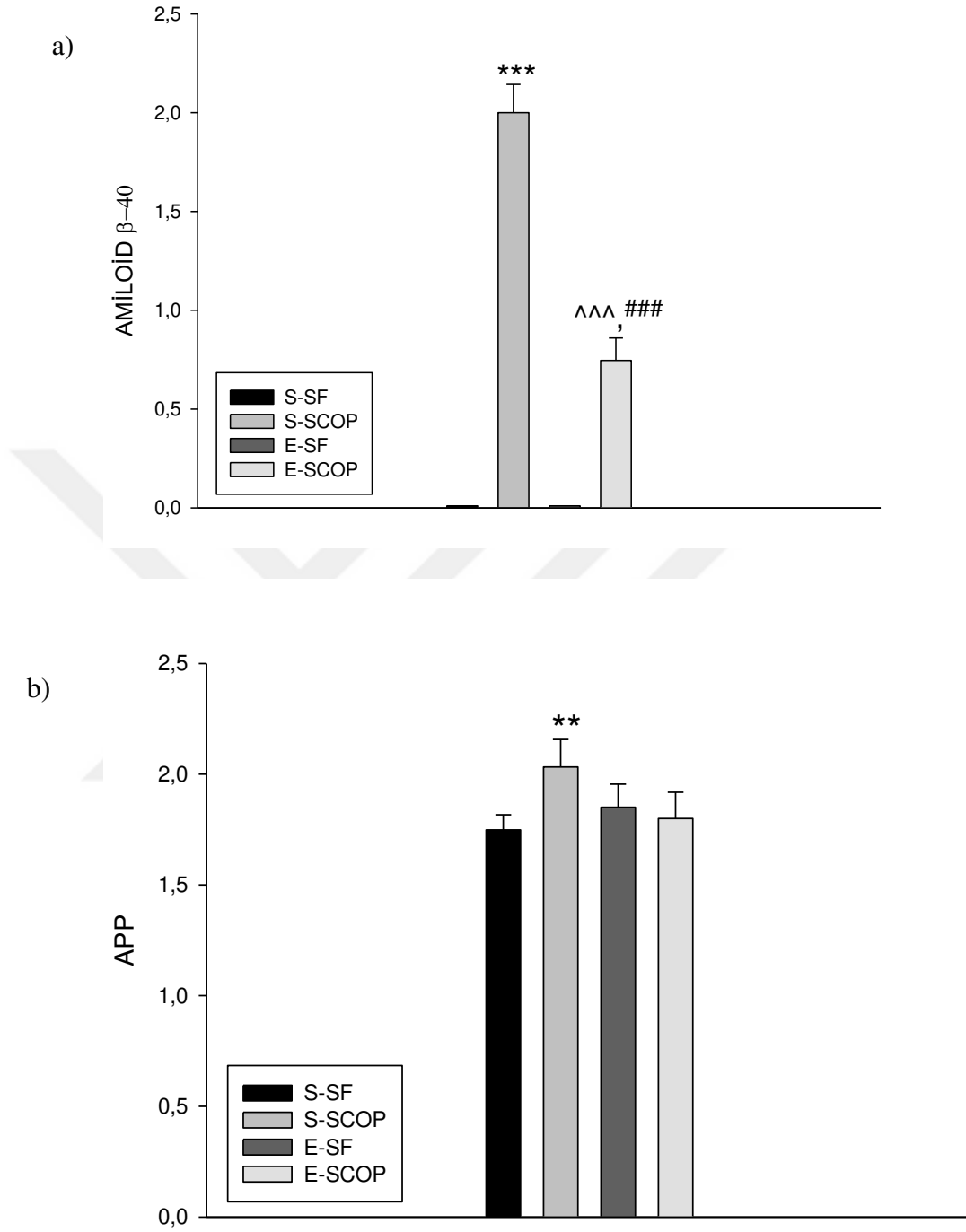
Şekil 47. Prefrontal Korteks E-SCOP Grubu Aβ-40 immunoreaktivitesi.

Prefrontal Korteks dokusunda Aβ-40 immunoreaktivitesinin bazı nöronlara ait sitoplazma ve perinöronal alanda zayıf ekspresyonu görülmektedir (ok). Glia hücrelerinde ise bu antikora ait ekspresyon (ok başı) görülmemektedir. Bar= 50 μm.



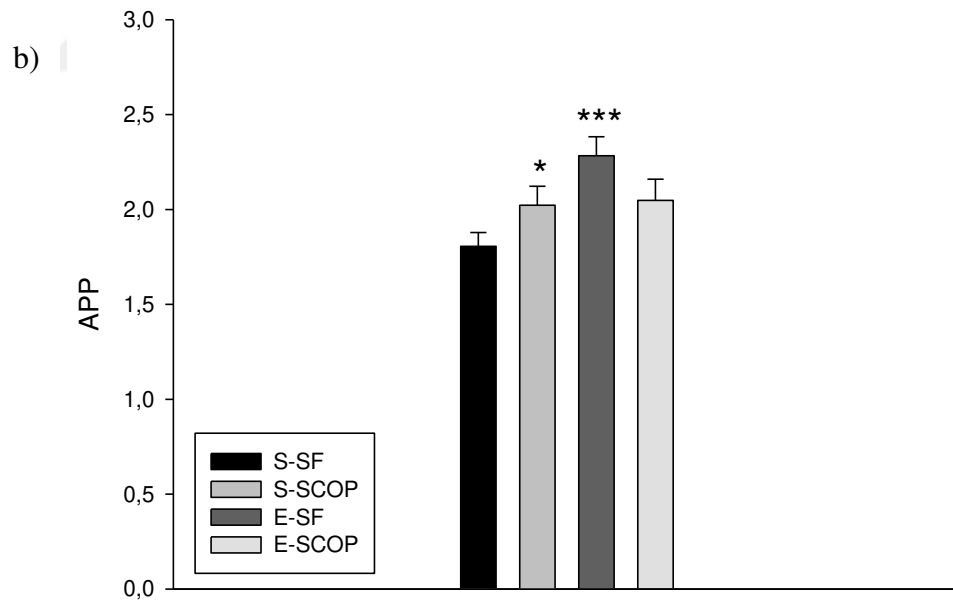
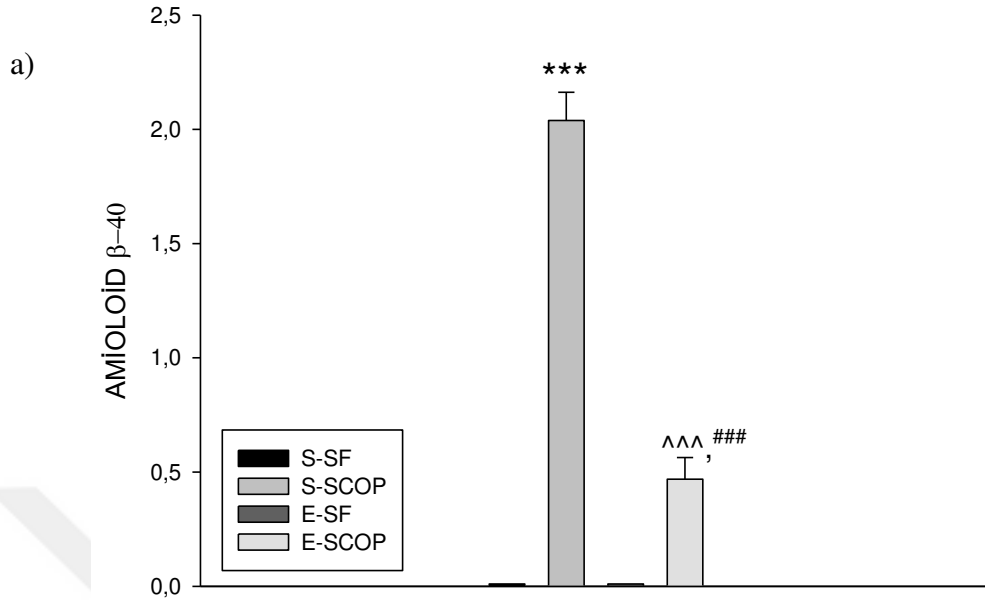
Şekil 48. Prefrontal Korteks E-SCOP Grubu APP immunoreaktivitesi.

Prefrontal korteks dokusunda APP immunoreaktivitesinin nöron sitoplazmalarında güçlü ekspresyonu (ok) görülmektedir. Ancak glia hücrelerinde (ok başı) APP'nin eksprese olmadığı ya da bazı glia hücrelerinde bu antikorun zayıf ekspresyonu izlenmektedir. Bar= 50 μm.



Şekil 49. Hipokampusta immünoünohistokimyasal analiz.

a) Aβ-40, b) APP, **p<0,01, ***p<0,001 S-SF grubuna göre, ^^p<0,001 S-SCOP grubuna göre ###p<0,001 E-SF grubuna göre. Mann Whitney U testi.



Şekil 50. Prefrontal kortekste immünohistokimyasal analiz.

a) A β -40, b) APP, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ S-SF grubuna göre, ^^^ $p < 0,001$ S-SCOP grubuna göre ### $p < 0,001$ E-SF grubuna göre. Mann Whitney U testi.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda skopolamin uygulaması açık alan testinde anksiyete benzeri davranışları artırırken, morris su havuzu testinde skopolamin uygulaması uzaysal öğrenme bellek performansını olumsuz etkiledi. Literatürde skopolamin uygulamasının uzaysal öğrenme-bellek performansını olumsuz etkilediği birçok çalışmada gösterilmiştir (53, 148). Talamus, striatum, limbik sistem ve kortekste yoğun bir şekilde bulunan kolinerjik sistem, öğrenme-bellek, dikkat ve beynin diğer yüksek işlevlerinde rol oynamaktadır. Asetilkolinin muskarinik reseptörlerinin seçici olmayan blokörü skopolamin, sıçan beyninde atrofiye ve nörodejenerasyona neden olabilmektedir. Skopolaminin özellikle hipokampus ve serebral kortekste muskarinik reseptörleri bloke ederek, asetilkolinesteraz aktivitesini artırarak öğrenme-bellek performansında ve motor aktivitede bozulmaya neden olduğu bilinmektedir (149, 150). Özellikle bazal ön beyinde Mynert çekirdeğinden hipokampus ve kortekse yansıyan nöronların dejenerasyonu bilişsel işlevlerde azalmaya neden olmaktadır. Skopolamin uygulamasının anksiyete benzeri davranışlar üzerinde zıt etkilerinin olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Anksiyete benzeri davranışları azalttığını gösteren çalışmalar yanında bizim bulgumuzla uyumlu olarak anksiyete benzeri davranışları arttırdığını ileri süren çalışmalar da bulunmaktadır (53, 151).

Farelerde skopolamin uygulaması bilişsel ve duygusal işlevlerde bozulmayla birlikte, hipokampusta ve prefrontal kortekste BDNF düzeyinde azalmaya neden oldu. Literatürde skopolaminin BDNF düzeylerini azalttığını gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (48, 152). Alzheimer hastalarında ölümden sonra yapılan incelemelerde BDNF mRNA düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir (153). Klinik olarak hafif bilişsel bozukluğu olan Alzheimer hastalarında ölüm sonrası yapılan bir araştırmada pariyetal kortekste BDNF düzeyi ile bilişsel işlevlerde azalma arasında bir korelasyon olduğu rapor edilmiştir (154). BDNF, erken gelişim döneminde ve yetişkinlikte hipokampusta, kolinerjik bazal ön beyin nöronlarında, korteks gibi alanlarda nöronal gelişim, büyüme, farklılaşma ve sinaptik işlevlerde önemli rol oynamaktadır (155, 156). Alzheimer hastalarında ise bu bölgelerin hepsinde şiddetli hasarlanmalar meydana gelmektedir (157, 158). Çalışmalarda normal sinir dokusuna A β proteinlerinin uygulanması durumunda BDNF düzeylerinin azaldığı bildirilmektedir (159). Aktiviteye bağlı sinaptik plastisite, öğrenme ve belleğin hücrel mekanizmasında önemlidir. Öğrenme

ve bellekte, NMDA reseptör aracılı uzun süreli uyarımda (LTP) ve bunun devam ettirilmesinde BDNF'in önemli olduğu bilinmektedir (160, 161). Ayrıca öğrenme ve belleğin oluşumunda bazal ön beyinden hipokampusa yansıyan kolinerjik nöronlar önemli rol oynamaktadır. Asetilkolinin muskarinik ve nikotinik reseptörleri ile hipokampusta NMDA reseptör aracılı iletimi kolaylaştırarak etkisini gösterdiği bilinmektedir. GABA salınımının baskılanması, potasyum geçirgenliğinin blokajı ve hücre içi sinyal yollarının aktifleşmesi gibi süreçler ile LTP'nin oluşumu için membran eşik değerini azalttığı bildirilmektedir (162). Gil-Bea et al. (163) yaptıkları çalışmada hipokampusta bellek oluşumunda muskarinik reseptörler aracılığı ile BDNF ekspresyonunun artışının önemli olduğunu göstermişlerdir. BDNF'nin buradaki nöronlarda otokrin etkisi ile TrkB reseptörleri aracılığıyla yeni sinaps oluşumu gibi sinaptik plastisite için gerekli hücre içi sinyal yollarını aktive ettiğini ileri sürmektedirler. Literatürde skopolamin uygulaması ile BDNF düzeylerinde azalma olduğunu bildiren birçok çalışma olmasına rağmen, muskarinik iletimin azalmasına bağlı olarak BDNF düzeyinin azalmasında görev alan hücre içi sinyal yolları tamamen açıklanamamıştır.

BDNF merkezi sinir sisteminde tirozin kinaz reseptör (TrkB) ve pan-nörotrofin reseptör (p75) üzerinden etkisini göstermektedir. BDNF'nin bilişsel işlev üzerine olan etkisi genellikle TrkB reseptörü aracılığı ile gerçekleşirken, p75 reseptörüne düşük afinite ile bağlanmakta ve bu reseptör aracılığı ile genellikle apoptoz ve nöronal büyümenin inhibisyonu gibi etkileri olduğu ileri sürülmektedir. Ayrıca, bu reseptörün TrkB reseptörleri ile birlikte lokalize olduğu bilinmektedir (164). Çalışmamızda, BDNF'nin etkisini göstermesine aracılık eden TrkB reseptör düzeyleri de değerlendirildi. Hipokampusta BDNF'nin azalmasıyla birlikte TrkB düzeylerinin de azaldığı saptandı. Alzheimer hastalarında TrkB düzeylerinin azaldığı bildirilmektedir (113). Fare ve sıçanlarda skopolamin uygulaması ile hipokampusta BDNF ve TrkB düzeylerinin azaldığı rapor edilmektedir (165, 166). Sıçanlarda A β 25-35 ile oluşturulan Alzheimer modelinde tüm beyinde BDNF ve TrkB düzeyinde azalma olduğu gösterilmiştir (167). TrkB, üç farklı sinyal yolağı ile hücre içi büyüme, farklılaşma ve plastisite gibi işlevlerle ilişkili sinyal yollarını tetiklemektedir. Bunlar, Ras-Mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK, MEK), fosfatidilinozitol 3 kinaz (PI3K) ve fosfolipaz C-gama (PLC- γ) sinyal yollarıdır (168). Akt yani protein kinaz B, hücre

proliferasyonu, apoptoz ve glukoz metabolizması gibi hücresel işlevlerde önemli rol oynamaktadır (169, 170). Çalışmaların birçoğunda Alzheimer'da Akt'nin aktivasyonunun arttığı bildirilirken, azaldığını da bildiren çalışmalar bulunmaktadır (171-173). A β , kaspaz-3 aktivasyonu ile Akt'yi indüklemekte ve GSK-3 β aktive olmaktadır (174). GSK-3 β aktivasyonu ile apoptotik süreçler tetiklenmektedir. Çalışmamızda prefrontal kortekste açıklayamadığımız bir mekanizma ile BDNF azalmasına rağmen TrkB ekspresyonunun arttığı saptandı. Bu durum muhtemelen BDNF'nin azalmasına bağlı TrkB'nin yukarı yönlü düzenlenmesiyle ilgili olabilir.

Serin-treonin kinaz olan GSK-3 β , normal olarak uyarılmamış hücrelerde aktif halde bulunmaktadır. GSK-3 β , spesifik bölgelerinin fosforilasyonu ile inaktif hale gelmektedir. Ser9, Ser21 ve Ser389 fosforilasyonu ile bu enzim inaktif hale dönüşmektedir. GSK-3 β , merkezi sinir sisteminde hücre iskeletini oluşturan proteinlerin (mikrotübül ilişkili proteinler, tau ve kinezin hafif zincir) fosforilasyonu ile hücre morfolojisinin yeniden şekillenmesinde görev alarak sinaptik plastisite, nörofilamentlerin stabilizasyonu ve yeni sinaps oluşumu gibi işlevleri etkilemektedir (175, 176). GSK-3 β 'nın Thr390 (insan)/Ser389 (fare) fosforilasyonu, Ser9 ve Ser21 fosforilasyonuna göre sınırlı sayıda dokuda meydana gelmektedir. Ser9 ve Ser21 fosforilasyonu birçok dokuda bulunurken, Ser389 fosforilasyonu beyin, timüs ve dalakta bulunmaktadır. Ser9 ve Ser21 fosforilasyonu için hedef molekül, sitoplazmik GSK-3 β iken, Ser389 fosforilasyonu için birincil hedef nükleer GSK-3 β 'dır. Ayrıca GSK-3 β 'nın Ser9 fosforilasyonu beyinde tüm bölgelerde yaygın olarak bulunurken, Ser389 fosforilasyonu özellikle hipokampus ve kortekste gösterilmiştir (85). p38 MAPK tarafından GSK-3 β 'nın Thr390(insan)/Ser389 (fare) fosforilasyonu da GSK3 β 'ın inaktivasyonu için alternatif bir yol olarak bildirilmektedir. p38 MAPK aktivitesinin yüksek olduğu beyin ve timositlerde p-GSK3 β ^{Ser389}, un fazla olduğu rapor edilmektedir (86). GSK-3 β 'nın Alzheimer hastalığında görülen tau proteininin aşırı fosforilasyonuna ve A β plakların birikimine neden olduğu bildirilmektedir (177). GSK-3 β , Ser9 fosforilasyonunun Alzheimer hastalığında azaldığı rapor edilirken, Ser389 fosforilasyonu ile ilgili bir çalışma literatürde gösterilmemiştir. Yaptığımız çalışmada skopolamin ile oluşturulan Alzheimer hastalığı modelinde hipokampus ve prefrontal kortekste GSK-3 β Ser389 fosforile halinin azaldığı bulundu. Thornton et al. (85), yaptıkları çalışmada Ser389 gen ifadesi olmayan farelerde öğrenme-bellek, lokomotor

aktivite ve anksiyete-korku davranışlarının etkilenmediği fakat beklenmedik korku davranışının görüldüğü bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise skopolamin uygulaması ile uzaysal öğrenme bellek performansında azalma ile birlikte hipokampusta ve prefrontal kortekste p-GSK3 β ^{Ser389} düzeyinde azalma görüldü.

p38 MAPK sinyal yolağı nöronal plastisite gibi fizyolojik süreçler ve nörodejeneratif hastalıklarda önemli rol oynamaktadır. p38 MAPK, sitokinler, büyüme faktörleri ve hücrel stres durumlarında MKK6 ve MAPK3 (MKK3) tarafından fosforile olarak aktifleşmektedir. p38 MAPK'nın dört farklı gen tarafından kodlanan yüksek homoloji gösteren izoformları eksprese edilmiştir (p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ). Farklı dokularda farklı izoformlarının olması p38 MAPK yolağının çok çeşitli fizyolojik süreçlerde önemli işlevlere sahip olmasını sağlamaktadır. Bu işlevler arasında apoptotik süreçler, proliferasyonun engellenmesi ve hücre farklılaşmasının kontrolü sayılabilir (178). Alzheimer hastalığında MAPK sinyal yolağında değişiklikler olduğu gösterilmiştir (179). MAPK sinyal yolağındaki ERK, JNK ve p38 formlarının fosforillenmesinin Alzheimer hastalığında görülen bilişsel işlevlerde azalma ile ilişkili olduğu rapor edilmektedir (180). Çalışmalarda skopolamin uygulaması ile MAPK sinyal yolağında p38, JNK ve ERK fosforilasyonunun arttığı gösterilmiştir (181, 182). Mevcut çalışmamızda p-p38 MAPK protein düzeyleri değerlendirilmedi, fakat daha önce yapılan çalışmalarda skopolamin uygulaması ile p-p38 MAPK aktivitesinin arttığı, azaldığı veya değişmediği gibi farklı sonuçlar rapor edilmektedir (182-184). Bu farklılıkların skopolaminin uygulanma süresi ve kullanılan hayvan soyuna bağlı olabileceği ileri sürülmektedir. Çalışmamızda da GSK-3 β Ser389 düzeyinin azalmasının p38 MAPK sinyal yolağında azalmış aktivasyon nedeniyle olabileceği düşünülebilir. Wang et al. (185), yaptıkları çalışmada BDNF'in p-p38 ve fosforile AKT düzeylerini arttırdığını göstermişlerdir. BDNF'nin p38 fosforilasyonunu, TrkB reseptörleri aracılığıyla PI3K yolağı üzerinden gerçekleştirdiğini ileri sürmüşlerdir. Çalışmamızda BDNF ve TrkB düzeylerinin azaldığı saptandı. Bu durum p38 MAPK yolağının fosforilasyonunun azalmasına böylece p-GSK3 β ^{Ser389} seviyesinin düşmesine yol açmış olabilir.

Çalışmamızda skopolamin uygulaması ile bilişsel ve duygusal işlevlerdeki değişikliklerde, BDNF-TrkB ve p-GSK3 β ^{Ser389} düzeylerinde azalmanın yanı sıra, muskarinik reseptör blokajına bağlı olarak farklı sinyal yolaklarının da etkisinin olduğu

göz ardı edilemez. Thornton et al. (85), yaptıkları çalışmada ifade ettikleri gibi belki de GSK-3 β Ser389 fosforilasyonu skopolaminin anksiyete ve korku davranışlarındaki etkilerine aracılık ederken, skopolamin ile aktive olan diğer sinyal yolları da bilişsel işlevler üzerindeki etkilerine aracılık edebilir.

Çalışmamızda skopolamin uygulaması ile hipokampus ve prefrontal kortekste APP ve A β -40 ekspresyonunun nöronal ve perinöronal alanlarda arttığı görüldü. APP'nin fizyolojik olarak merkezi sinir sisteminde trofik etkilerinin olduğu bildirilmektedir.(186). APP gen ifadesi olmayan farelerin daha küçük beyne sahip oldukları ve nörojenezi etkilediği rapor edilmiştir (187). Aynı zamanda APP'nin kalsiyum salınımını düzenlemesiyle LTP'de rol oynadığı bildirilmektedir (188). Fizyolojik düzeylerde (pikomolar) A β 'nın potasyum kanallarının aktivitesini ve apoptozu azalttığı rapor edilmiştir (189). Ayrıca asetilkolin salınımını artırdığı, yaşlanma sırasında nöron koruyucu olduğu, sinaptik plastisiteyi artırarak öğrenme-bellek için önemli olduğu bildirilmiştir (190). Alzheimer hastalığında ise kontrolsüz ve aşırı miktarda A β yapımı ve birikimi olduğu bilinmektedir. Sıçanlarda, 6 hafta boyunca günde 1 kez 2 mg/kg skopolamin uygulaması ile hipokampusta A β plakların arttığı, BDNF düzeyinin azaldığı gösterilmiştir (152). Aynı çalışmada skopolaminin hipokampusta GSK-3 β mRNA düzeyini ve protein ekspresyonunu arttırdığı rapor edilmiştir. Asetilkolinin M1, M3 ve M5 reseptörleri PKC aktivasyonu ile hücre içi sinyal yollarını tetiklerken, M1 ve M4 adenil siklaz enzimini aktive etmektedir. Bazı hücrelerde M2 ve M4 reseptörleri fosfolipaz C ile hücre içi sinyal yollarını tetiklemektedir. Asetilkolinin M1 ve M3 reseptör aktivasyonunun PKC yolağı ile sAPP α sekresyonunu arttırdığı, A β plakları da azalttığı gösterilmiştir (191).

APP fizyolojik koşullarda adhezyon molekülü olarak membranda bulunmaktadır. APP sırasıyla β - ve γ -sekretaz enzimleri aracılığı ile kesildiğinde A β plakları oluşmaktadır. APP ayrıca α -sekretaz tarafından kesilerek sAPP α 'ya dönüşmektedir. Bu kesim ile oluşan sAPP α suda çözünebilir formdadır. Suda çözünmeyen A β plakları sinaptik aralıkta birikerek sinyal iletimini engellemektedir. Ayrıca bu plakların polimerizasyonu kinazların aktivasyonuna neden olarak tau hiperfosforilasyonu sonucu nörofibriler yumaklar oluşmaktadır (192).

AH'de beyindeki kolinerjik nöronların dejenerasyonu, ACh sentezinde ve salınımındaki azalma kolinerjik iletimin bozulmasına neden olmaktadır. ACh,

hipokampal bağımlı öğrenme ve bilişsel işlevlerin düzenlenmesinden sorumludur. Beyinde hipokampus ve serebral korteksteki etkilerini özellikle M1 reseptörleri üzerinden göstermektedir (49). Transgenik hayvanlarda yapılan çalışmalarda kolinerjik bozukluğun A β birikiminde ve fosforile tau oluşumunda rol oynadığı ileri sürülmektedir (193). M1 ve M3 reseptörlerinin uyarılmasının sAPP α 'yı artırabildiği böylece A β oluşumunu önleyebileceği ilk defa Nitsch et al. (194) tarafından ileri sürülmüştür. M1 reseptör aktivasyonu PKC yoluyla, ADAM17'yi (tümör nekroz faktörü- α -dönüştürücü enzim) aktive ederek sAPP α 'nın artmasına ve BACE-1'i inhibe ederek A β 'nın azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca GSK-3 β 'yı fosforlayarak A β 'nın neden olduğu apoptozu ve p-tau'yu azaltmaktır (60, 61). Skopolamin gibi mAChR antagonistinin uygulanması ise bu mekanizmayı tersine çevirerek A β artışına ve GSK-3 β 'nın neden olduğu tau hiperfosforilasyonuna yol açabilir. M2 ve M4'ün ise α -sekretazın aktivasyonunda etkisiz olduğu hatta bu reseptörlerin sAPP α salınımı üzerinde inhibitör bir etkiye sahip olabileceği bildirilmiştir (194).

Çalışmalarda, BDNF-TrkB aracılı sinyal iletiminde GSK-3 β 'nın inaktif formunun (fosforile) artması APP'nin A β plaklara dönüşümünü kontrol altında tutmaktadır. BDNF iletiminin azalmasına bağlı olarak GSK-3 β 'nin aktif formunun aşırı artışı ile A β plakların arttığı bildirilmektedir. Ayrıca GSK-3 β 'nin aktif formunun tau kinazları aktifleştirerek tau fosforilasyonunu artırdığı rapor edilmektedir (152, 195). Çalışmamızda da artan A β seviyesi fosforile GSK-3 β 'nin azalması ile açıklanabilir.

Literatürle uyumlu olarak skopolamin uygulaması vücut ağırlığını etkilemedi egzersiz uygulanan farelerde sedanterlere göre üçüncü ve dördüncü haftalarda vücut ağırlığında anlamlı azalma diğer haftalarda ise nispi azalma bulundu (143, 196). Balb/c farelerde 12 hafta süresince egzersiz uygulanması ile açık alan testinde merkeze ilk geçiş süresinin azalması, merkezde geçirilen sürenin, merkeze geçme sıklığının ve ayağa kalkma sıklığının artması ile anksiyete benzeri davranışlarının azaldığı saptandı. Literatürde bizim bulgumuzla uyumlu olarak fiziksel egzersizin duygusal ve bilişsel işlevlerde olumlu etkilerinin gösterildiği birçok çalışma bulunmaktadır (197, 198). Fiziksel egzersizin, nöroenez, LTP artışı, dendritik ve sinaptik dallanma artışı gibi hücresel olaylar ile öğrenme-bellek performansını olumlu etkilediği bilinmektedir (199). Fiziksel egzersizin merkezi sinir sistemindeki olumlu etkilerinin, BDNF'nin hücre içi etkileri ile ilişkili olduğu çalışmalarda bildirilmektedir (127, 200). Çalışmamızda da

koşu bandı egzersizi ile hipokampus ve prefrontal kortekste BDNF düzeyinin arttığı bulundu. Fiziksel aktivite ile artan BDNF düzeylerinin, TrkB reseptörleri üzerinden hücre içi MAPK/ERK ve fosfolipaz C sinyal yollarının aktifleşmesiyle nöronal plastisiteye neden olduğu bildirilmektedir (168, 201). CaMK'nın CREB fosforilasyonu ile gen ekspresyonu sonucu sinaptik plastisitede rol oynadığı rapor edilmektedir (202). Literatürde, fiziksel egzersiz sırasında beyinde BDNF düzeyini arttıran sebepler tam olarak açıklanamamıştır. BDNF'in kan beyin bariyerini geçmesi, beyin dışında T ve B lenfositler, monositler ve iskelet kası gibi beyin dışında da sentezleniyor olması, artan BDNF düzeyinin asıl kaynağını göstermeyi zorlaştırmaktadır. Araştırmacılar periferik dokulardan salınan BDNF'in yanında birtakım miyokinlerin (irisin, katepsin vs.), glikoliz ürünlerinin (laktat), keton cisimlerinin (β -hidroksibütirat) ve sitokinlerin (TNF α , IL-1 β , IL-18) kan beyin bariyerini geçip merkezi sinir sisteminde BDNF salınımını düzenlediğini ileri sürmektedir (203-206). Ayrıca fiziksel egzersizin hipokampusta kolin alımını, muskarinik reseptör yoğunluğunu ve asetilkolin transferaz eksprese eden nöron sayısını arttırdığı gösterilmiştir (207).

Çalışmamızda fiziksel egzersiz yaptırılan grupta p-GSK3 β ^{Ser389} düzeyinde artış bulundu. Bayod et al. (208), 36 hafta boyunca haftada 5 kez (12m/dk hızda 30 dk süreyle) koşu bandında egzersiz yaptırılan sıçanlarda, hipokampusta p-GSK3 β ^{Ser9} düzeyinde artış göstermişlerdir. Fiziksel egzersiz gibi zenginleştirilmiş çevrenin etkilerinin incelendiği bir çalışmada hipokampusta BDNF artışının p-GSK3 β ^{Ser9} düzeyinde artışa neden olduğu bildirilmektedir (209). Çalışmamızda görülen fiziksel egzersiz ile hipokampus ve prefrontal kortekste p-GSK3 β ^{Ser389} düzeyindeki artış, daha önceki çalışmalarda gösterilmemiş olması nedeniyle önemlidir. Ser389 fosforilasyonunun, Ser9 fosforilasyonuna göre nükleer GSK3 β 'yı substrat olarak kullanması, sadece sınırlı dokularda eksprese edilmesi ve Ser9 fosforilasyonuna göre aktivasyon uyarılarının farklı olması nedeniyle bu sinyal yolağının aydınlatılması fiziksel egzersizin moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.

Sunulan çalışmamızda Balb/c farelerde, skopolamin uygulaması ile görülen öğrenme-bellek performansındaki azalma ve anksiyete benzeri davranışlara karşı fiziksel egzersizin koruyucu olabileceği bulundu. Heo Y-M et al. (27, 210) 14 gün boyunca koşu bandı egzersizinden önce 1 mg/kg skopolamin uyguladıkları farelerde azalan bilişsel işlevlere karşı egzersizin koruyucu olduğunu ve hipokampusta BDNF

düzeylerini artırarak nörojenezi tetiklediğini bildirmektedir. Rosa et al. (159), farelerde serebroventriküler A β -40 uygulaması ile görülen aksiyete benzeri davranışların, kısa süreli koşu bandı egzersizi ile azaldığını rapor etmişlerdir.

Alzheimer modeli oluşturulan transgenik farelerde de 12 hafta boyunca (12 m/dk hızında haftada 5 gün) koşu bandı egzersizi yapılmasının kortekste BDNF düzeylerini arttırdığı rapor edilmektedir (211). Çalışmamızda, skopolamin uygulanan gruplarda azalan BDNF, TrkB ve p-GSK3 β ^{Ser389} düzeylerinin, egzersiz yaptırılan gruplarda arttığı bulundu. İmmünohistokimyasal incelemede de skopolamin uygulaması ile prefrontal korteks ve hipokampusta artan A β ve APP ekspresyonunun egzersiz gruplarında azaldığı saptandı. Fiziksel egzersizin Alzheimer hastalığı üzerinde yararlı etkilerinin olduğu uzun yıllardır yapılan çalışmalar ile gösterilmektedir. Egzersizin beyin kan akımını ve hipokampus hacmini arttırdığı, inflamasyonu, oksidatif stresi, A β plakları azalttığı, obezite ve diyabet oluşumunu önleyerek nöroinflamasyonu azalttığı bildirilmektedir. Bunların sonucunda egzersizin, nörojenezi, sinaptik plastisiteyi, yeni damar oluşumunu ve bilişsel performansı artırdığı ileri sürülmektedir. Tüm bu olayların altında yatan hücresel mekanizmalar ve moleküler yollar maalesef tam olarak aydınlatılamamıştır. Çalışmaların genelinde BDNF'nin azalması, oksidatif stres ve inflamasyon gibi durumların A β plaklarının birikimine neden olduğu, fiziksel egzersizin ise BDNF'yi artırarak bu olumsuz etkileri tersine çevirdiği bildirilmektedir. Çalışmamızda fiziksel egzersiz, skopolaminin azalttığı BDNF düzeyini arttırarak, p38 MAPK yolağı üzerinden p-GSK3 β ^{Ser389}'u artırmış ve böylece A β birikimini azaltmış olabilir. Ayrıca literatürde belirtildiği gibi egzersizin nöroinflamasyonu azaltıcı etkisiyle de A β birikimi engellenmiş olabilir.

Sonuçta, skopolamin uygulaması bilişsel ve duygusal davranışlarda bozulmaya neden olurken, uzun süreli fiziksel egzersizin skopolaminin neden olduğu bu olumsuz davranışlara karşı koruyucu etki gösterdiği bulundu. Skopolamin uygulaması bilişsel ve duygusal işlevler üzerindeki etkilerini, hipokampusta BDNF, TrkB, p-GSK3 β ^{Ser389} düzeylerini, prefrontal kortekste BDNF ve p-GSK3 β ^{Ser389}'u azaltıp, A β -40 ve APP düzeyini ise her iki alanda da artırarak ortaya koymuş olabilir. Uzun süreli fiziksel egzersiz ise prefrontal korteks ve hipokampusta BDNF, TrkB, p-GSK3 β ^{Ser389} düzeylerini artırıp, A β -40 ve APP düzeylerini azaltarak koruyucu etkisini göstermiş olabilir.

Literatürde Alzheimer hastalığının fizyopatolojisini aydınlatmaya yönelik birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmaların genelinde BDNF'nin azalması ve beraberinde hücre içi sinyal yollarının bozulmasına bağlı etkilerin araştırılması amaçlanmıştır. GSK-3 β artışının A β plaklarının oluşumuna ve tau proteinlerin aşırı fosforilasyonuna aracılık ettiği, Ser9 fosforilasyonun ise bu olumsuz etkileri azalttığı ağırlıklı olarak bildirilmektedir. Bizim yaptığımız çalışmanın sonuçlarına göre GSK-3 β ^{Ser389} fosforilasyonunun azalmasının Alzheimer fizyopatolojisinde önemli olduğu ve fiziksel egzersizin etkilerine GSK-3 β ^{Ser389} fosforilasyonunun aracılık ettiği ileri sürülebilir. Özellikle beyin ve dalak gibi spesifik dokularda aktif olduğu bilinen p38 MAPK/GSK3 β ^{Ser389} yolağının daha ileri çalışmalar ile araştırılması bu yolağın egzersiz ve Alzheimer'daki rolünün ortaya çıkarılmasında önemli olacaktır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. Farelerde, skopolamin ile oluşturulan Alzheimer hastalığı modelinde bilişsel ve duygusal işlevlerde bozulma meydana gelmektedir.
2. Skopolamin uygulaması, hipokampusta BDNF ve TrkB düzeylerinde azalmaya neden olmaktadır.
3. Skopolamin uygulaması ile prefrontal kortekste BDNF seviyesinin azalmasına rağmen TrkB ekspresyonunun arttığı saptandı. Bu durumun BDNF'in azalmasına bağlı TrkB'nin yukarı yönlü düzenlenmesiyle ilgili olabileceği düşünülmektedir.
4. Skopolamin uygulaması hipokampus ve prefrontal kortekste p-GSK-3 β ^{Ser389} düzeyinde azalmaya neden olmaktadır.
5. Azalmış BDNF ve TrkB düzeyleri, p38 MAPK yolağının fosforilasyonunun azalmasına böylece p-GSK3 β ^{Ser389} seviyesinin düşmesine yol açmış olabilir.
6. Skopolamin uygulaması ile hipokampus ve prefrontal kortekste APP ve A β -40'ın nöronal ve perinöronal alanlarda artmaktadır.
7. Farelerde uzun süreli koşu bandı egzersizi uygulanması ile anksiyete benzeri davranışlar azalmaktadır.
8. Egzersiz gruplarında hipokampus ve prefrontal kortekste BDNF, TrkB ve p-GSK3 β ^{Ser389} düzeyleri artmaktadır.
9. Egzersiz ile seviyesi artan p-GSK3 β ^{Ser389}, daha önceki çalışmalarda gösterilmemiş olması nedeniyle önemlidir. Yapılacak çalışmalarla, egzersiz ile p-GSK3 β ^{Ser389} arasındaki ilişkinin daha detaylı olarak ortaya konmasına ihtiyaç duyulmaktadır.
10. Skopolamin uygulaması ile prefrontal korteks ve hipokampusta artan A β ve APP ekspresyonu egzersiz gruplarında azalmaktadır.
11. Skopolamin uygulamasının neden olduğu anksiyete benzeri davranışlar ve öğrenme-bellek performansındaki azalmaya karşı egzersizin, koruyucu etkisi olabilir.
12. Egzersizin etkilerine p-GSK-3 β ^{Ser389} fosforilasyonunun aracılık ettiği ileri sürülebilir. Ser389 fosforilasyonunun, GSK3 β 'yı substrat olarak kullanması, sınırlı dokularda eksprese edilmesi ve Ser9 fosforilasyonuna göre aktivasyon

uyarılarının farklı olması nedeniyle bu sinyal yolağının aydınlatılması egzersizin moleküler mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

13. Özellikle beyin gibi spesifik dokularda aktif olduğu bilinen p38 MAPK/GSK3 β ^{Ser389} yolağının daha ileri çalışmalar ile araştırılması bu yolağın egzersiz ve Alzheimer'daki rolünün ortaya çıkarılmasında önemli olacaktır.



KAYNAKLAR

1. **Baranowski BJ, Marko DM, Fenech RK, Yang AJT ,MacPherson REK.** Healthy brain, healthy life: A review of diet and exercise interventions to promote brain health and reduce alzheimer's disease risk. *Appl Physiol Nutr Metab*, **2020**; 45 (10): 1055-1065.
2. **Lane CA, Hardy J ,Schott JM.** Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*, **2018**; 25 (1): 59-70.
3. **Scheltens P, Blennow K, Breteler MM, de Strooper B, Frisoni GB, Salloway S, et al.** Alzheimer's disease. *Lancet*, **2016**; 388 (10043): 505-517.
4. **Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W ,Ferri CP.** The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. *Alzheimers Dement*, **2013**; 9 (1): 63-75.e62.
5. **Kent SA, Spires-Jones TL ,Durrant CS.** The physiological roles of tau and a β : Implications for alzheimer's disease pathology and therapeutics. *Acta Neuropathologica*, **2020**; 1-31.
6. **Association As.** 2019 alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, **2019**; 15 (3): 321-387.
7. **Maurer K, Volk S ,Gerbaldo H.** Auguste d and alzheimer's disease. *Lancet*, **1997**; 349 (9064): 1546-1549.
8. **Braak H ,Braak E.** Neuropathological staging of alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*, **1991**; 82 (4): 239-259.
9. **Özkay ÜD, Öztürk Y ,Can Ö.** Yaşlanan dünyanın hastalığı: Alzheimer hastalığı. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, **2011**; 18 (1): 35-42.
10. **Gilman S.** Alzheimer's disease. *Perspect Biol Med*, **1997**; 40 (2): 230-245.
11. **Kivipelto M, Mangialasche F ,Ngandu T.** Lifestyle interventions to prevent cognitive impairment, dementia and alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*, **2018**; 14 (11): 653-666.
12. **Chen GF, Xu TH, Yan Y, Zhou YR, Jiang Y, Melcher K, et al.** Amyloid beta: Structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol Sin*, **2017**; 38 (9): 1205-1235.
13. **Hou Y, Dan X, Babbar M, Wei Y, Hasselbalch SG, Croteau DL, et al.** Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*, **2019**; 15 (10): 565-581.
14. **SOYLU Ö ,KARALI N.** Alzheimer hastalığı ve tedavisinde güncel yaklaşımlar. *Literatür Eczacılık Bilimleri Dergisi*, **2017**; 6 (2): 94-109.
15. **Mucke L.** Alzheimer's disease. *Nature*, **2009**; 461 (7266): 895-897.
16. **Koistinaho J, Malm T ,Goldsteins G.** Glycogen synthase kinase-3 β : A mediator of inflammation in alzheimer's disease? *Int J Alzheimers Dis*, **2011**; 2011 129753.
17. **Jope RS, Cheng Y, Lowell JA, Worthen RJ, Sitbon YH ,Beurel E.** Stressed and inflamed, can gsk3 be blamed? *Trends Biochem Sci*, **2017**; 42 (3): 180-192.
18. **Ghosh S, Wu MD, Shafteel SS, Kyrkanides S, LaFerla FM, Olschowka JA, et al.** Sustained interleukin-1 β overexpression exacerbates tau pathology despite reduced amyloid burden in an alzheimer's mouse model. *Journal of Neuroscience*, **2013**; 33 (11): 5053-5064.
19. **Lauretti E, Dincer O ,Praticò D.** Glycogen synthase kinase-3 signaling in alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, **2020**; 1867 (5): 118664.
20. **Llorens-Marín M, Jurado J, Hernández F ,Ávila J.** Gsk-3 β , a pivotal kinase in alzheimer disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, **2014**; 7 (46):
21. **DaRocha-Souto B, Coma M, Pérez-Nievas BG, Scotton TC, Siao M, Sánchez-Ferrer P, et al.** Activation of glycogen synthase kinase-3 beta mediates β -amyloid induced neuritic damage in alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*, **2012**; 45 (1): 425-437.
22. **Souder DC ,Anderson RM.** An expanding gsk3 network: Implications for aging research. *Geroscience*, **2019**; 41 (4): 369-382.
23. **Cotelo NV, Rodríguez NF, Pérez JA, Iglesias JC ,Lago MR.** Burden and associated pathologies in family caregivers of alzheimer's disease patients in spain. *Pharm Pract (Granada)*, **2015**; 13 (2): 521.

24. **Zucchella C, Sinforiani E, Tamburin S, Federico A, Mantovani E, Bernini S, et al.** The multidisciplinary approach to alzheimer's disease and dementia. A narrative review of non-pharmacological treatment. *Front Neurol*, **2018**; 9 1058.
25. **Xu L, Zhu L, Zhu L, Chen D, Cai K, Liu Z, et al.** Moderate exercise combined with enriched environment enhances learning and memory through bdnf/trkb signaling pathway in rats. *Int J Environ Res Public Health*, **2021**; 18 (16):
26. **Kim YM, Ji ES, Kim SH, Kim TW, Ko IG, Jin JJ, et al.** Treadmill exercise improves short-term memory by enhancing hippocampal cell proliferation in quinolinic acid-induced huntington's disease rats. *J Exerc Rehabil*, **2015**; 11 (1): 5-11.
27. **Heo YM, Shin MS, Kim SH, Kim TW, Baek SB, Baek SS.** Treadmill exercise ameliorates disturbance of spatial learning ability in scopolamine-induced amnesia rats. *J Exerc Rehabil*, **2014**; 10 (3): 155-161.
28. **Rabinovici GD.** Late-onset alzheimer disease. *Continuum (Minneapolis)*, **2019**; 25 (1): 14-33.
29. **Miller-Thomas MM, Sipe AL, Benzinger TL, McConathy J, Connolly S, Schwetye KE.** Multimodality review of amyloid-related diseases of the central nervous system. *Radiographics*, **2016**; 36 (4): 1147-1163.
30. **Braak H, Thal DR, Ghebremedhin E, Del Tredici K.** Stages of the pathologic process in alzheimer disease: Age categories from 1 to 100 years. *J Neuropathol Exp Neurol*, **2011**; 70 (11): 960-969.
31. **Samanta MK, Wilson B, Santhi K, Kumar KP, Suresh B.** Alzheimer disease and its management: A review. *Am J Ther*, **2006**; 13 (6): 516-526.
32. **Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, et al.** Inflammation and alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, **2000**; 21 (3): 383-421.
33. **Li B, Yamamori H, Tatebayashi Y, Shafit-Zagardo B, Tanimukai H, Chen S, et al.** Failure of neuronal maturation in alzheimer disease dentate gyrus. *J Neuropathol Exp Neurol*, **2008**; 67 (1): 78-84.
34. **Kandimalla R, Reddy PH.** Therapeutics of neurotransmitters in alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, **2017**; 57 (4): 1049-1069.
35. **Bruel-Jungerman E, Lucassen PJ, Francis F.** Cholinergic influences on cortical development and adult neurogenesis. *Behav Brain Res*, **2011**; 221 (2): 379-388.
36. **Slotkin TA, Seidler FJ, Crain BJ, Bell JM, Bissette G, Nemeroff CB.** Regulatory changes in presynaptic cholinergic function assessed in rapid autopsy material from patients with alzheimer disease: Implications for etiology and therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1990**; 87 (7): 2452-2455.
37. **Craig LA, Hong NS, McDonald RJ.** Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of alzheimer's disease. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, **2011**; 35 (6): 1397-1409.
38. **Hampel H, Mesulam MM, Cuello AC, Farlow MR, Giacobini E, Grossberg GT, et al.** The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of alzheimer's disease. *Brain*, **2018**; 141 (7): 1917-1933.
39. **Kilgard MP, Merzenich MM.** Plasticity of temporal information processing in the primary auditory cortex. *Nat Neurosci*, **1998**; 1 (8): 727-731.
40. **Ferreira-Vieira TH, Guimaraes IM, Silva FR, Ribeiro FM.** Alzheimer's disease: Targeting the cholinergic system. *Curr Neuropsychopharmacol*, **2016**; 14 (1): 101-115.
41. **Muir JL, Dunnett SB, Robbins TW, Everitt BJ.** Attentional functions of the forebrain cholinergic systems: Effects of intraventricular hemicholinium, physostigmine, basal forebrain lesions and intracortical grafts on a multiple-choice serial reaction time task. *Exp Brain Res*, **1992**; 89 (3): 611-622.
42. **Mesulam MM.** Cholinergic circuitry of the human nucleus basalis and its fate in alzheimer's disease. *J Comp Neurol*, **2013**; 521 (18): 4124-4144.
43. **Lim YY, Maruff P, Schindler R, Ott BR, Salloway S, Yoo DC, et al.** Disruption of cholinergic neurotransmission exacerbates $\alpha\beta$ -related cognitive impairment in preclinical alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, **2015**; 36 (10): 2709-2715.
44. **Corkin S.** Acetylcholine, aging and alzheimer's disease: Implications for treatment. *Trends in neurosciences*, **1981**; 4 287-290.

45. **Bartus RT.** Evidence for a direct cholinergic involvement in the scopolamine-induced amnesia in monkeys: Effects of concurrent administration of physostigmine and methylphenidate with scopolamine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **1978**; 9 (6): 833-836.
46. **Craig LA, Hong NS ,McDonald RJ.** Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of alzheimer's disease. *Neurosci Biobehav Rev*, **2011**; 35 (6): 1397-1409.
47. **Doody RS, Dunn JK, Clark CM, Farlow M, Foster NL, Liao T, et al.** Chronic donepezil treatment is associated with slowed cognitive decline in alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*, **2001**; 12 (4): 295-300.
48. **Tang KS.** The cellular and molecular processes associated with scopolamine-induced memory deficit: A model of alzheimer's biomarkers. *Life Sci*, **2019**; 233 116695.
49. **Klinkenberg I ,Blokland A.** The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: A review of animal behavioral studies. *Neurosci Biobehav Rev*, **2010**; 34 (8): 1307-1350.
50. **Schmeller T, Sporer F, Sauerwein M ,Wink M.** Binding of tropane alkaloids to nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmazie*, **1995**; 50 (7): 493-495.
51. **Nomura Y, Nishiyama N, Saito H ,Matsuki N.** Role of cholinergic neurotransmission in the amygdala on performances of passive avoidance learning in mice. *Biol Pharm Bull*, **1994**; 17 (4): 490-494.
52. **Smythe JW, Murphy D, Bhatnagar S, Timothy C ,Costall B.** Muscarinic antagonists are anxiogenic in rats tested in the black-white box. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **1996**; 54 (1): 57-63.
53. **Jafarian S, Ling KH, Hassan Z, Perimal-Lewis L, Sulaiman MR ,Perimal EK.** Effect of zerumbone on scopolamine-induced memory impairment and anxiety-like behaviours in rats. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, **2019**; 5 (1): 637-643.
54. **Neha, Sodhi RK, Jaggi AS ,Singh N.** Animal models of dementia and cognitive dysfunction. *Life Sci*, **2014**; 109 (2): 73-86.
55. **Xu QQ, Xu YJ, Yang C, Tang Y, Li L, Cai HB, et al.** Sodium tanshinone iia sulfonate attenuates scopolamine-induced cognitive dysfunctions via improving cholinergic system. *Biomed Res Int*, **2016**; 2016 9852536.
56. **Giridharan VV, Thandavarayan RA, Sato S, Ko KM ,Konishi T.** Prevention of scopolamine-induced memory deficits by schisandrin b, an antioxidant lignan from schisandra chinensis in mice. *Free Radic Res*, **2011**; 45 (8): 950-958.
57. **Erişim.** (<https://biorender.Com/>) tarafından oluşturuldu. Erişim tarihi: 20.05.22.
58. **Clevers H ,Nusse R.** Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*, **2012**; 149 (6): 1192-1205.
59. **Purro SA, Dickins EM ,Salinas PC.** The secreted wnt antagonist dickkopf-1 is required for amyloid β -mediated synaptic loss. *J Neurosci*, **2012**; 32 (10): 3492-3498.
60. **Fisher A.** Cholinergic modulation of amyloid precursor protein processing with emphasis on m1 muscarinic receptor: Perspectives and challenges in treatment of alzheimer's disease. *J Neurochem*, **2012**; 120 22-33.
61. **Cisse M, Braun U, Leitges M, Fisher A, Pages G, Checler F, et al.** Erk1-independent α -secretase cut of β -amyloid precursor protein via m1 muscarinic receptors and pkc α/ϵ . *Molecular and Cellular Neuroscience*, **2011**; 47 (3): 223-232.
62. **Saka E.** Alzheimer hastalığı patofizyolojisi: Deneysel ve genetik bulgular. *Turkish Journal of Geriatrics*, **2010**; 3 21-26.
63. **Haass C ,Selkoe DJ.** Soluble protein oligomers in neurodegeneration: Lessons from the alzheimer's amyloid β -peptide. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2007**; 8 (2): 101-112.
64. **Guerreiro RJ, Gustafson DR ,Hardy J.** The genetic architecture of alzheimer's disease: Beyond app, psens and apoe. *Neurobiol Aging*, **2012**; 33 (3): 437-456.
65. **Uddin MS, Kabir MT, Rahman MS, Behl T, Jeandet P, Ashraf GM, et al.** Revisiting the amyloid cascade hypothesis: From anti- $a\beta$ therapeutics to auspicious new ways for alzheimer's disease. *Int J Mol Sci*, **2020**; 21 (16):
66. **Haass C, Lemere CA, Capell A, Citron M, Seubert P, Schenk D, et al.** The swedish mutation causes early-onset alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat Med*, **1995**; 1 (12): 1291-1296.

67. **Hardy J, Selkoe DJ.** The amyloid hypothesis of alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, **2002**; 297 (5580): 353-356.
68. **Kerr JS, Adriaanse BA, Greig NH, Mattson MP, Cader MZ, Bohr VA, et al.** Mitophagy and alzheimer's disease: Cellular and molecular mechanisms. *Trends Neurosci*, **2017**; 40 (3): 151-166.
69. **Saka E.** Alzheimer hastalığı patofizyolojisi: Deneysel ve genetik bulgular. *Turkish Journal of Geriatrics*, **2010**; 13 (3): 21-26.
70. **Solomon A, Mangialasche F, Richard E, Andrieu S, Bennett DA, Breteler M, et al.** Advances in the prevention of alzheimer's disease and dementia. *J Intern Med*, **2014**; 275 (3): 229-250.
71. **Laurin D, Verreault R, Lindsay J, MacPherson K, Rockwood K.** Physical activity and risk of cognitive impairment and dementia in elderly persons. *Arch Neurol*, **2001**; 58 (3): 498-504.
72. **Fratiglioni L, Paillard-Borg S, Winblad B.** An active and socially integrated lifestyle in late life might protect against dementia. *Lancet Neurol*, **2004**; 3 (6): 343-353.
73. **Stephen R, Hongisto K, Solomon A, Lönnroos E.** Physical activity and alzheimer's disease: A systematic review. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, **2017**; 72 (6): 733-739.
74. **Embi N, Rylatt DB, Cohen P.** Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-amp-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem*, **1980**; 107 (2): 519-527.
75. **Woodgett JR, Cohen P.** Multisite phosphorylation of glycogen synthase. Molecular basis for the substrate specificity of glycogen synthase kinase-3 and casein kinase-ii (glycogen synthase kinase-5). *Biochim Biophys Acta*, **1984**; 788 (3): 339-347.
76. **Ferrer JC, Favre C, Gomis RR, Fernández-Novell JM, García-Rocha M, de la Iglesia N, et al.** Control of glycogen deposition. *FEBS Lett*, **2003**; 546 (1): 127-132.
77. **Eldar-Finkelman H.** Glycogen synthase kinase 3: An emerging therapeutic target. *Trends Mol Med*, **2002**; 8 (3): 126-132.
78. **Woodgett JR.** Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor a. *Embo j*, **1990**; 9 (8): 2431-2438.
79. **Shaw P-C, Davies AF, Lau K-F, Garcia-Barcelo M, Waye MM, Lovestone S, et al.** Isolation and chromosomal mapping of human glycogen synthase kinase-3 α and-3 β encoding genes. *Genome*, **1998**; 41 (5): 720-727.
80. **Luo J.** The role of gsk3beta in the development of the central nervous system. *Front Biol (Beijing)*, **2012**; 7 (3): 212-220.
81. **Salcedo-Tello P, Ortiz-Matamoros A, Arias C.** Gsk3 function in the brain during development, neuronal plasticity, and neurodegeneration. *Int J Alzheimers Dis*, **2011**; 2011 189728.
82. **Zhou F-Q, Snider WD.** Gsk-3 β and microtubule assembly in axons. *Science*, **2005**; 308 (5719): 211-214.
83. **Doble BW, Woodgett JR.** Gsk-3: Tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci*, **2003**; 116 (Pt 7): 1175-1186.
84. **Hongisto V, Vainio JC, Thompson R, Courtney MJ, Coffey ET.** The wnt pool of glycogen synthase kinase 3beta is critical for trophic-deprivation-induced neuronal death. *Mol Cell Biol*, **2008**; 28 (5): 1515-1527.
85. **Thornton TM, Hare B, Colie S, Pendlebury WW, Nebreda AR, Falls W, et al.** Failure to inactivate nuclear gsk3beta by ser(389)-phosphorylation leads to focal neuronal death and prolonged fear response. *Neuropsychopharmacology*, **2018**; 43 (2): 393-405.
86. **Thornton TM, Pedraza-Alva G, Deng B, Wood CD, Aronshtam A, Clements JL, et al.** Phosphorylation by p38 mapk as an alternative pathway for gsk3 beta inactivation. *Science*, **2008**; 320 (5876): 667-670.
87. **Giese KP.** Gsk-3: A key player in neurodegeneration and memory. *IUBMB Life*, **2009**; 61 (5): 516-521.
88. **Thornton TM, Delgado P, Chen L, Salas B, Kremmentsov D, Fernandez M, et al.** Inactivation of nuclear gsk3 β by ser389 phosphorylation promotes lymphocyte fitness during DNA double-strand break response. *Nature Communications*, **2016**; 7 (1): 10553.

89. **Ferrer I, Barrachina M ,Puig B.** Glycogen synthase kinase-3 is associated with neuronal and glial hyperphosphorylated tau deposits in alzheimer's disease, pick's disease, progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *Acta Neuropathol*, **2002**; 104 (6): 583-591.
90. **Ly PT, Wu Y, Zou H, Wang R, Zhou W, Kinoshita A, et al.** Inhibition of gsk3 β -mediated bace1 expression reduces alzheimer-associated phenotypes. *J Clin Invest*, **2013**; 123 (1): 224-235.
91. **Takashima A, Honda T, Yasutake K, Michel G, Murayama O, Murayama M, et al.** Activation of tau protein kinase i/glycogen synthase kinase-3 β by amyloid β peptide (25–35) enhances phosphorylation of tau in hippocampal neurons. *Neuroscience research*, **1998**; 31 (4): 317-323.
92. **Malhi GS ,Outhred T.** Therapeutic mechanisms of lithium in bipolar disorder: Recent advances and current understanding. *CNS Drugs*, **2016**; 30 (10): 931-949.
93. **D'Mello SR.** When good kinases go rogue: Gsk3, p38 mapk and cdks as therapeutic targets for alzheimer's and huntington's disease. *Int J Mol Sci*, **2021**; 22 (11):
94. **Nunes MA, Schöwe NM, Monteiro-Silva KC, Baraldi-Tornisiolo T, Souza SI, Balthazar J, et al.** Chronic microdose lithium treatment prevented memory loss and neurohistopathological changes in a transgenic mouse model of alzheimer's disease. *PLoS One*, **2015**; 10 (11): e0142267.
95. **Sun M, Herrmann N ,Shulman KI.** Lithium toxicity in older adults: A systematic review of case reports. *Clin Drug Investig*, **2018**; 38 (3): 201-209.
96. **Wang Y, Tian Q, Liu EJ, Zhao L, Song J, Liu XA, et al.** Activation of gsk-3 disrupts cholinergic homoeostasis in nucleus basalis of meynert and frontal cortex of rats. *J Cell Mol Med*, **2017**; 21 (12): 3515-3528.
97. **Zang J, Liu Y, Li W, Xiao D, Zhang Y, Luo Y, et al.** Voluntary exercise increases adult hippocampal neurogenesis by increasing gsk-3 β activity in mice. *Neuroscience*, **2017**; 354 122-135.
98. **Zhu LQ, Wang SH, Liu D, Yin YY, Tian Q, Wang XC, et al.** Activation of glycogen synthase kinase-3 inhibits long-term potentiation with synapse-associated impairments. *J Neurosci*, **2007**; 27 (45): 12211-12220.
99. **Kowiański P, Lietzau G, Czuba E, Waśkow M, Steliga A ,Moryś J.** Bdnf: A key factor with multipotent impact on brain signaling and synaptic plasticity. *Cellular and molecular neurobiology*, **2018**; 38 (3): 579-593.
100. **Leibrock J, Lottspeich F, Hohn A, Hofer M, Hengeler B, Masiakowski P, et al.** Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature*, **1989**; 341 (6238): 149-152.
101. **Zuccato C ,Cattaneo E.** Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neurology*, **2009**; 5 (6): 311-322.
102. **Binder DK ,Scharfman HE.** Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors*, **2004**; 22 (3): 123-131.
103. **Wong LW, Chong YS, Lin W, Kisiswa L, Sim E, Ibáñez CF, et al.** Age-related changes in hippocampal-dependent synaptic plasticity and memory mediated by p75 neurotrophin receptor. *Aging Cell*, **2021**; 20 (2): e13305.
104. **Huang EJ ,Reichardt LF.** Neurotrophins: Roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*, **2001**; 24 677-736.
105. **Gonzalez A, Moya-Alvarado G, Gonzalez-Billaut C ,Bronfman FC.** Cellular and molecular mechanisms regulating neuronal growth by brain-derived neurotrophic factor. *Cytoskeleton (Hoboken)*, **2016**; 73 (10): 612-628.
106. **Reichardt LF.** Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **2006**; 361 (1473): 1545-1564.
107. **Xing J, Kornhauser JM, Xia Z, Thiele EA ,Greenberg ME.** Nerve growth factor activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways to stimulate creb serine 133 phosphorylation. *Mol Cell Biol*, **1998**; 18 (4): 1946-1955.
108. **Miranda M, Morici JF, Zanoni MB ,Bekinschtein P.** Brain-derived neurotrophic factor: A key molecule for memory in the healthy and the pathological brain. *Front Cell Neurosci*, **2019**; 13 363.

109. **Colucci-D'Amato L, Speranza L ,Volpicelli F.** Neurotrophic factor bdnf, physiological functions and therapeutic potential in depression, neurodegeneration and brain cancer. *Int J Mol Sci*, **2020**; 21 (20):
110. **Choi SH, Bylykbashi E, Chatila ZK, Lee SW, Pulli B, Clemenson GD, et al.** Combined adult neurogenesis and bdnf mimic exercise effects on cognition in an alzheimer's mouse model. *Science*, **2018**; 361 (6406):
111. **Harward SC, Hedrick NG, Hall CE, Parra-Bueno P, Milner TA, Pan E, et al.** Autocrine bdnf-trkb signalling within a single dendritic spine. *Nature*, **2016**; 538 (7623): 99-103.
112. **Gao L, Zhang Y, Sterling K ,Song W.** Brain-derived neurotrophic factor in alzheimer's disease and its pharmaceutical potential. *Transl Neurodegener*, **2022**; 11 (1): 1-34.
113. **Ginsberg SD, Che S, Wu J, Counts SE ,Mufson EJ.** Down regulation of trk but not p75ntr gene expression in single cholinergic basal forebrain neurons mark the progression of alzheimer's disease. *J Neurochem*, **2006**; 97 (2): 475-487.
114. **Zhang F, Kang Z, Li W, Xiao Z ,Zhou X.** Roles of brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase b (bdnf/trkb) signalling in alzheimer's disease. *J Clin Neurosci*, **2012**; 19 (7): 946-949.
115. **Xia DY, Huang X, Bi CF, Mao LL, Peng LJ ,Qian HR.** Pgc-1 α or fndc5 is involved in modulating the effects of $\text{A}\beta$ (1-42) oligomers on suppressing the expression of bdnf, a beneficial factor for inhibiting neuronal apoptosis, $\text{A}\beta$ deposition and cognitive decline of app/ps1 tg mice. *Front Aging Neurosci*, **2017**; 9 65.
116. **Rohe M, Synowitz M, Glass R, Paul SM, Nykjaer A ,Willnow TE.** Brain-derived neurotrophic factor reduces amyloidogenic processing through control of sorla gene expression. *J Neurosci*, **2009**; 29 (49): 15472-15478.
117. **Diniz BS ,Teixeira AL.** Brain-derived neurotrophic factor and alzheimer's disease: Physiopathology and beyond. *NeuroMolecular Medicine*, **2011**; 13 (4): 217-222.
118. **Fahnestock M, Garzon D, Holsinger RM ,Michalski B.** Neurotrophic factors and alzheimer's disease: Are we focusing on the wrong molecule? *J Neural Transm Suppl*, **2002**; (62): 241-252.
119. **Cotman CW ,Berchtold NC.** Exercise: A behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci*, **2002**; 25 (6): 295-301.
120. **Ahlskog JE, Geda YE, Graff-Radford NR ,Petersen RC.** Physical exercise as a preventive or disease-modifying treatment of dementia and brain aging. *Mayo Clin Proc*, **2011**; 86 (9): 876-884.
121. **Yau S-y, Gil-Mohapel J, Christie BR ,So K-f.** Physical exercise-induced adult neurogenesis: A good strategy to prevent cognitive decline in neurodegenerative diseases? *BioMed research international*, **2014**; 2014
122. **De la Rosa A, Olaso-Gonzalez G, Arc-Chagnaud C, Millan F, Salvador-Pascual A, García-Lucerga C, et al.** Physical exercise in the prevention and treatment of alzheimer's disease. *J Sport Health Sci*, **2020**; 9 (5): 394-404.
123. **Viña J ,Sanz-Ros J.** Alzheimer's disease: Only prevention makes sense. *Eur J Clin Invest*, **2018**; 48 (10): e13005.
124. **Müller P, Duderstadt Y, Lessmann V ,Müller NG.** Lactate and bdnf: Key mediators of exercise induced neuroplasticity? *J Clin Med*, **2020**; 9 (4):
125. **Chen MJ ,Russo-Neustadt AA.** Exercise activates the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Molecular brain research*, **2005**; 135 (1-2): 181-193.
126. **Nay K, Smiles WJ, Kaiser J, McAloon LM, Loh K, Galic S, et al.** Molecular mechanisms underlying the beneficial effects of exercise on brain function and neurological disorders. *Int J Mol Sci*, **2021**; 22 (8):
127. **Russo-Neustadt A, Beard RC ,Cotman CW.** Exercise, antidepressant medications, and enhanced brain derived neurotrophic factor expression. *Neuropsychopharmacology*, **1999**; 21 (5): 679-682.
128. **Adlard PA, Perreau VM, Pop V ,Cotman CW.** Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of alzheimer's disease. *J Neurosci*, **2005**; 25 (17): 4217-4221.

129. **Turner PR, O'Connor K, Tate WP, Abraham WC.** Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol*, **2003**; 70 (1): 1-32.
130. **Nigam SM, Xu S, Kritikou JS, Marosi K, Brodin L, Mattson MP.** Exercise and bdnf reduce a β production by enhancing α -secretase processing of app. *J Neurochem*, **2017**; 142 (2): 286-296.
131. **Adlard PA, Perreau VM, Cotman CW.** The exercise-induced expression of bdnf within the hippocampus varies across life-span. *Neurobiol Aging*, **2005**; 26 (4): 511-520.
132. **Ribarič S.** Physical exercise, a potential non-pharmacological intervention for attenuating neuroinflammation and cognitive decline in alzheimer's disease patients. *Int J Mol Sci*, **2022**; 23 (6):
133. **Belarbi K, Burnouf S, Fernandez-Gomez FJ, Laurent C, Lestavel S, Figeac M, et al.** Beneficial effects of exercise in a transgenic mouse model of alzheimer's disease-like tau pathology. *Neurobiology of disease*, **2011**; 43 (2): 486-494.
134. **Zhao G, Liu HL, Zhang H, Tong XJ.** Treadmill exercise enhances synaptic plasticity, but does not alter β -amyloid deposition in hippocampi of aged app/ps1 transgenic mice. *Neuroscience*, **2015**; 298 357-366.
135. **Richter H, Ambrée O, Lewejohann L, Herring A, Keyvani K, Paulus W, et al.** Wheel-running in a transgenic mouse model of alzheimer's disease: Protection or symptom? *Behav Brain Res*, **2008**; 190 (1): 74-84.
136. **Ströhle A, Schmidt DK, Schultz F, Fricke N, Staden T, Hellweg R, et al.** Drug and exercise treatment of alzheimer disease and mild cognitive impairment: A systematic review and meta-analysis of effects on cognition in randomized controlled trials. *Am J Geriatr Psychiatry*, **2015**; 23 (12): 1234-1249.
137. **Meng Q, Lin MS, Tzeng IS.** Relationship between exercise and alzheimer's disease: A narrative literature review. *Front Neurosci*, **2020**; 14 131.
138. **Şahin Ş.** Deneysel alzheimer hastalığı modelleri. *Turkiye Klinikleri Journal of Neurology Special Topics*, **2012**; 5 102-106.
139. **Salkovic-Petrisic M, Osmanovic-Barilar J, Knezovic A, Hoyer S, Mosetter K, Reutter W.** Long-term oral galactose treatment prevents cognitive deficits in male wistar rats treated intracerebroventricularly with streptozotocin. *Neuropharmacology*, **2014**; 77 68-80.
140. **Yamada K, Ren X, Nabeshima T.** Perspectives of pharmacotherapy in alzheimer's disease. *Jpn J Pharmacol*, **1999**; 80 (1): 9-14.
141. **Kumar A, Seghal N, Padi SV, Naidu PS.** Differential effects of cyclooxygenase inhibitors on intracerebroventricular colchicine-induced dysfunction and oxidative stress in rats. *Eur J Pharmacol*, **2006**; 551 (1-3): 58-66.
142. **Do Carmo S, Cuello AC.** Modeling alzheimer's disease in transgenic rats. *Mol Neurodegener*, **2013**; 8 37.
143. **Zhao N, Yan QW, Xia J, Zhang XL, Li BX, Yin LY, et al.** Treadmill exercise attenuates a β -induced mitochondrial dysfunction and enhances mitophagy activity in app/ps1 transgenic mice. *Neurochem Res*, **2020**; 45 (5): 1202-1214.
144. **Bihaqi SW, Singh AP, Tiwari M.** Supplementation of convolvulus pluricaulis attenuates scopolamine-induced increased tau and amyloid precursor protein (a β pp) expression in rat brain. *Indian J Pharmacol*, **2012**; 44 (5): 593-598.
145. **Akılhoğlu K.** Balb/c farelerde sinir sisteminin farklı kritik "gelişim gencerelelerinde" nmda reseptör blokajının yetişkin dönemde, çevresel faktörlere bağlı beynin bilişsel ve duygusal işlevleri üzerine etkisi. Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adana, **2010**.
146. **He F.** Bca (bicinchoninic acid) protein assay. *Bio-protocol*, **2011**; 101 e44.
147. **Erişim.** (https://assets.thermofisher.com/tfs-assets/lsg/manuals/man0011430_pierce_bca_protein_asy_ug.pdf) erişim tarihi: 27.05.22.
148. **He DD, Wu H, Wei Y, Liu W, Huang F, Shi HT, et al.** Effects of harmine, an acetylcholinesterase inhibitor, on spatial learning and memory of app/ps1 transgenic mice and scopolamine-induced memory impairment mice. *Eur J Pharmacol*, **2015**; 768 96-107.

149. **Gutierrez JM, Carvalho FB, Schetinger MRC, Agostinho P, Marisco PC, Vieira JM, et al.** Neuroprotective effect of anthocyanins on acetylcholinesterase activity and attenuation of scopolamine-induced amnesia in rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, **2014**; 33 88-97.
150. **Sudeep HV, Venkatakrishna K, Amritharaj, Gouthamchandra K, Reethi B, Naveen P, et al.** A standardized black pepper seed extract containing beta-caryophyllene improves cognitive function in scopolamine-induced amnesia model mice via regulation of brain-derived neurotrophic factor and mapk proteins. *Journal of Food Biochemistry*, **2021**; 45 (12):
151. **Furey ML ,Drevets WC.** Antidepressant efficacy of the antimuscarinic drug scopolamine - a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Archives of General Psychiatry*, **2006**; 63 (10): 1121-1129.
152. **Safar MM, Arab HH, Rizk SM ,El-Maraghy SA.** Bone marrow-derived endothelial progenitor cells protect against scopolamine-induced alzheimer-like pathological aberrations. *Mol Neurobiol*, **2016**; 53 (3): 1403-1418.
153. **Garzon D, Yu G ,Fahnestock M.** A new brain-derived neurotrophic factor transcript and decrease in brain-derived neurotrophic factor transcripts 1, 2 and 3 in alzheimer's disease parietal cortex. *J Neurochem*, **2002**; 82 (5): 1058-1064.
154. **Peng S, Wu J, Mufson EJ ,Fahnestock M.** Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of alzheimer's disease. *J Neurochem*, **2005**; 93 (6): 1412-1421.
155. **Marini AM, Jiang X, Wu X, Tian F, Zhu D, Okagaki P, et al.** Role of brain-derived neurotrophic factor and nf-kappab in neuronal plasticity and survival: From genes to phenotype. *Restor Neurol Neurosci*, **2004**; 22 (2): 121-130.
156. **Lindholm D, Carroll P, Tzimagiorgis G ,Thoenen H.** Autocrine-paracrine regulation of hippocampal neuron survival by igf-1 and the neurotrophins bdnf, nt-3 and nt-4. *Eur J Neurosci*, **1996**; 8 (7): 1452-1460.
157. **Giannakopoulos P, Gold G, Michel JP ,Bouras C.** Cellular vulnerability in brain aging and alzheimer's disease. Clinical correlates and molecular background. *Ann Med Interne (Paris)*, **1998**; 149 (4): 187-191.
158. **Morrison JH ,Hof PR.** Life and death of neurons in the aging brain. *Science*, **1997**; 278 (5337): 412-419.
159. **Rosa JM, Camargo A, Wolin IAV, Kaster MP ,Rodrigues ALS.** Physical exercise prevents amyloid beta1-40-induced disturbances in nlrp3 inflammasome pathway in the hippocampus of mice. *Metab Brain Dis*, **2021**; 36 (2): 351-359.
160. **Hartmann M, Heumann R ,Lessmann V.** Synaptic secretion of bdnf after high-frequency stimulation of glutamatergic synapses. *Embo Journal*, **2001**; 20 (21): 5887-5897.
161. **Navakkode S ,Korte M.** Cooperation between cholinergic and glutamatergic receptors are essential to induce bdnf-dependent long-lasting memory storage. *Hippocampus*, **2012**; 22 (2): 335-346.
162. **Krnjevic K, Ropert N ,Casullo J.** Septohippocampal disinhibition. *Brain Res*, **1988**; 438 (1-2): 182-192.
163. **Gil-Bea FJ, Solas M, Mateos L, Winblad B, Ramirez MJ ,Cedazo-Minguez A.** Cholinergic hypofunction impairs memory acquisition possibly through hippocampal arc and bdnf downregulation. *Hippocampus*, **2011**; 21 (9): 999-1009.
164. **Bibel M, Hoppe E ,Barde YA.** Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75ntr. *Embo Journal*, **1999**; 18 (3): 616-622.
165. **Saikia B, Barua CC, Sarma J, Haloi P, Tamuli SM, Kalita DJ, et al.** Zanthoxylum alatum ameliorates scopolamine-induced amnesia in rats: Behavioral, biochemical, and molecular evidence. *Indian J Pharmacol*, **2018**; 50 (1): 30-38.
166. **Kim Y, Kim J, He MT, Lee A ,Cho EJ.** Apigenin ameliorates scopolamine-induced cognitive dysfunction and neuronal damage in mice. *Molecules*, **2021**; 26 (17):
167. **Du Q, Zhu XY ,Si JR.** Angelica polysaccharide ameliorates memory impairment in alzheimer's disease rat through activating bdnf/trkb/creb pathway. *Experimental Biology and Medicine*, **2020**; 245 (1): 1-10.

168. **Minichiello L.** Trkb signalling pathways in ltp and learning. *Nat Rev Neurosci*, **2009**; 10 (12): 850-860.
169. **Sakoda H, Gotoh Y, Katagiri H, Kurokawa M, Ono H, Onishi Y, et al.** Differing roles of akt and serum- and glucocorticoid-regulated kinase in glucose metabolism, DNA synthesis, and oncogenic activity. *Journal of Biological Chemistry*, **2003**; 278 (28): 25802-25807.
170. **Song G, Ouyang GL, Bao SD.** The activation of akt/pkb signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med*, **2005**; 9 (1): 59-71.
171. **Griffin RJ, Moloney A, Kelliher M, Johnston JA, Ravid R, Dockery P, et al.** Activation of akt/pkb, increased phosphorylation of akt substrates and loss and altered distribution of akt and pten are features of alzheimer's disease pathology. *J Neurochem*, **2005**; 93 (1): 105-117.
172. **Talbot K, Wang HY, Kazi H, Han LY, Bakshi KP, Stucky A, et al.** Demonstrated brain insulin resistance in alzheimer's disease patients is associated with igf-1 resistance, irs-1 dysregulation, and cognitive decline. *Journal of Clinical Investigation*, **2012**; 122 (4): 1316-1338.
173. **Lee HK, Kumar P, Fu Q, Rosen KM, Querfurth HW.** The insulin/akt signaling pathway is targeted by intracellular beta-amyloid. *Molecular Biology of the Cell*, **2009**; 20 (5): 1533-1544.
174. **Jo J, Whitcomb DJ, Olsen KM, Kerrigan TL, Lo SC, Bru-Mercier G, et al.** A beta(1-42) inhibition of ltp is mediated by a signaling pathway involving caspase-3, akt1 and gsk-3 beta. *Nature Neuroscience*, **2011**; 14 (5): 545-547.
175. **Zhou FQ, Snider WD.** Gsk-3 beta and microtubule assembly in axons. *Science*, **2005**; 308 (5719): 211-+.
176. **Hur EM, Zhou FQ.** Gsk3 signalling in neural development. *Nature Reviews Neuroscience*, **2010**; 11 (8): 539-551.
177. **Wang Y, Zhang JX, Du XX, Zhao L, Tian Q, Zhu LQ, et al.** Temporal correlation of the memory deficit with alzheimer-like lesions induced by activation of glycogen synthase kinase-3. *J Neurochem*, **2008**; 106 (6): 2364-2374.
178. **Zarubin T, Han J.** Activation and signaling of the p38 map kinase pathway. *Cell Res*, **2005**; 15 (1): 11-18.
179. **Zhu XW, Castellani RJ, Takeda A, Nunomura A, Atwood CS, Perry G, et al.** Differential activation of neuronal erk, jnk/sapk and p38 in alzheimer disease: The 'two hit' hypothesis. *Mechanisms of Ageing and Development*, **2001**; 123 (1): 39-46.
180. **Ghasemi R, Zarifkar A, Rastegar K, Maghsoudi N, Moosavi M.** Repeated intra-hippocampal injection of beta-amyloid 25-35 induces a reproducible impairment of learning and memory: Considering caspase-3 and mapks activity. *Eur J Pharmacol*, **2014**; 726 33-40.
181. **Pak ME, Oh YC, Park YJ, Kim JK, Shin MG, Yoon JH, et al.** Banhasasim-tang ameliorates spatial memory by suppressing oxidative stress through regulation of erk/p38 signaling in hippocampus of mice. *Oxid Med Cell Longev*, **2021**; 2021 6970578.
182. **Moosavi M, SoukhakLari R, Moezi L, Pirsalami F.** Scopolamine-induced passive avoidance memory retrieval deficit is accompanied with hippocampal mmp2, mmp-9 and mapks alteration. *Eur J Pharmacol*, **2018**; 819 248-253.
183. **Jahanmahin A, Abbasnejad Z, Haghparast A, Ahmadiani A, Ghasemi R.** The effect of intrahippocampal insulin injection on scopolamine-induced spatial memory impairment and extracellular signal-regulated kinases alteration. *Basic Clin Neurosci*, **2019**; 10 (1): 23-36.
184. **Ban JY, Park HK, Kim SK.** Effect of glycyrrhizic acid on scopolamine-induced cognitive impairment in mice. *Int Neurol J*, **2020**; 24 (Suppl 1): S48-55.
185. **Wang H, Wei Y, Pu Y, Jiang D, Jiang X, Zhang Y, et al.** Brain-derived neurotrophic factor stimulation of t-type ca(2+) channels in sensory neurons contributes to increased peripheral pain sensitivity. *Sci Signal*, **2019**; 12 (600):
186. **Dawkins E, Small DH.** Insights into the physiological function of the beta-amyloid precursor protein: Beyond alzheimer's disease. *J Neurochem*, **2014**; 129 (5): 756-769.
187. **Wang S, Bolos M, Clark R, Cullen CL, Southam KA, Foa L, et al.** Amyloid beta precursor protein regulates neuron survival and maturation in the adult mouse brain. *Mol Cell Neurosci*, **2016**; 77 21-33.

188. **Kim HS, Park CH, Cha SH, Lee JH, Lee S, Kim Y, et al.** Carboxyl-terminal fragment of alzheimer's app destabilizes calcium homeostasis and renders neuronal cells vulnerable to excitotoxicity. *FASEB J*, **2000**; 14 (11): 1508-1517.
189. **Yu HB, Li ZB, Zhang HX ,Wang XL.** Role of potassium channels in abeta(1-40)-activated apoptotic pathway in cultured cortical neurons. *J Neurosci Res*, **2006**; 84 (7): 1475-1484.
190. **Morley JE, Farr SA, Banks WA, Johnson SN, Yamada KA ,Xu L.** A physiological role for amyloid-beta protein:Enhancement of learning and memory. *J Alzheimers Dis*, **2010**; 19 (2): 441-449.
191. **Welt T, Kulic L, Hoey SE, McAfoose J, Spani C, Chadha AS, et al.** Acute effects of muscarinic m1 receptor modulation on abetapp metabolism and amyloid-beta levels in vivo: A microdialysis study. *J Alzheimers Dis*, **2015**; 46 (4): 971-982.
192. **Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, et al.** Beta-secretase cleavage of alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease bace. *Science*, **1999**; 286 (5440): 735-741.
193. **Ramos-Rodriguez JJ, Pacheco-Herrero M, Thyssen D, Murillo-Carretero MI, Berrocoso E, Spires-Jones TL, et al.** Rapid β -amyloid deposition and cognitive impairment after cholinergic denervation in app/ps1 mice. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, **2013**; 72 (4): 272-285.
194. **Nitsch RM, Slack BE, Wurtman RJ ,Growdon JH.** Release of alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science*, **1992**; 258 (5080): 304-307.
195. **Llorens-Martin M, Jurado J, Hernandez F ,Avila J.** Gsk-3beta, a pivotal kinase in alzheimer disease. *Front Mol Neurosci*, **2014**; 7 46.
196. **Baek SY, Li FY, Kim DH, Kim SJ ,Kim MR.** Enteromorpha prolifera extract improves memory in scopolamine-treated mice via downregulating amyloid-beta expression and upregulating bdnf/trkb pathway. *Antioxidants (Basel)*, **2020**; 9 (7):
197. **Pietrelli A, Lopez-Costa J, Goni R, Brusco A ,Basso N.** Aerobic exercise prevents age-dependent cognitive decline and reduces anxiety-related behaviors in middle-aged and old rats. *Neuroscience*, **2012**; 202 252-266.
198. **Berchtold NC, Castello N ,Cotman CW.** Exercise and time-dependent benefits to learning and memory. *Neuroscience*, **2010**; 167 (3): 588-597.
199. **van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ ,Gage FH.** Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1999**; 96 (23): 13427-13431.
200. **Kim SE, Ko IG, Kim BK, Shin MS, Cho S, Kim CJ, et al.** Treadmill exercise prevents aging-induced failure of memory through an increase in neurogenesis and suppression of apoptosis in rat hippocampus. *Experimental Gerontology*, **2010**; 45 (5): 357-365.
201. **Ying SW, Futter M, Rosenblum K, Webber MJ, Hunt SP, Bliss TVP, et al.** Brain-derived neurotrophic factor induces long-term potentiation in intact adult hippocampus: Requirement for erk activation coupled to creb and upregulation of arc synthesis. *Journal of Neuroscience*, **2002**; 22 (5): 1532-1540.
202. **Vaynman S, Ying Z ,Gomez-Pinilla F.** Hippocampal bdnf mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *European Journal of Neuroscience*, **2004**; 20 (10): 2580-2590.
203. **Morland C, Andersson KA, Haugen OP, Hadzic A, Kleppa L, Gille A, et al.** Exercise induces cerebral vegf and angiogenesis via the lactate receptor hcar1. *Nature Communications*, **2017**; 8
204. **Tong LQ, Prieto GA, Kramar EA, Smith ED, Cribbs DH, Lynch G, et al.** Brain-derived neurotrophic factor-dependent synaptic plasticity is suppressed by interleukin-1 beta via p38 mitogen-activated protein kinase. *Journal of Neuroscience*, **2012**; 32 (49): 17714-17724.
205. **Sleiman SF, Henry J, Al-Haddad R, El Hayek L, Abou Haidar E, Stringer T, et al.** Exercise promotes the expression of brain derived neurotrophic factor (bdnf) through the action of the ketone body beta-hydroxybutyrate. *Elife*, **2016**; 5
206. **Delezie J ,Handschin C.** Endocrine crosstalk between skeletal muscle and the brain. *Front Neurol*, **2018**; 9

207. **Fordyce DE ,Farrar RP.** Effect of physical-activity on hippocampal high-affinity choline uptake and muscarinic binding - a comparison between young and old f344 rats. *Brain Res*, **1991**; 541 (1): 57-62.
208. **Bayod S, del Valle J, Canudas AM, Lalanza JF, Sanchez-Roige S, Camins A, et al.** Long-term treadmill exercise induces neuroprotective molecular changes in rat brain. *Journal of Applied Physiology*, **2011**; 111 (5): 1380-1390.
209. **Hu YS, Long N, Pigino G, Brady ST ,Lazarov O.** Molecular mechanisms of environmental enrichment: Impairments in akt/gsk3 beta, neurotrophin-3 and creb signaling. *PLoS One*, **2013**; 8 (5):
210. **Heo YM, Shin MS, Lee JM, Kim CJ, Baek SB, Kim KH, et al.** Treadmill exercise ameliorates short-term memory disturbance in scopolamine-induced amnesia rats. *Int Neurourol J*, **2014**; 18 (1): 16-22.
211. **Koo JH, Kwon IS, Kang EB, Lee CK, Lee NH, Kwon MG, et al.** Neuroprotective effects of treadmill exercise on bdnf and pi3-k/akt signaling pathway in the cortex of transgenic mice model of alzheimer's disease. *J Exerc Nutrition Biochem*, **2013**; 17 (4): 151-160.

