

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**YAŞLI SIÇANLARDA UZUN SÜRELİ DÜZENLİ EGZERSİZİN
ÖĞRENME VE İLİŞKİLİ NMDA RESEPTÖRLERİNE
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Özlem YÜKSEL

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Duygu KUMBUL DOĞUÇ

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından 3458-TU2-13 proje numarası ile
desteklenmiştir.**

ISPARTA - 2013

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleriyle örnek olan değerli hocam Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Fatih GÜLTEKİN'e, gerek uzmanlık tezimin hazırlanmasında gerekse eğitimim süresince, bilgisi, önerileri ve hoşgörüsüyle her zaman katkıda bulunan tez danışmanım değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Duygu KUMBUL DOĞUÇ'a, bilgileri ve insani değerleriyle her zaman örnek ve destek olan değerli hocalarım Prof. Dr. Hüseyin VURAL, Prof. Dr. İrfan ALTUNTAŞ, Prof. Dr. Recep SÜTÇÜ, Doç. Dr. Efkan UZ, Doç. Dr. Mehmet AKDOĞAN'a, istatistiksel analizlerde tecrübesini benimle paylaşan Yrd. Doç. Dr. Hikmet ORHAN'a, laboratuarda beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli araştırma görevlisi ve teknisyen arkadaşlarıma, projemi yürütmemde katkılarından dolayı Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı çalışanlarına ve Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Danışma Kurulu'na, her zaman sevgi ve destekleriyle yanımda olan eşime, çocuklarıma ve aileme teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR	v
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
GRAFİKLER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Yaşlanma ve Bilişsel Fonksiyonlar	4
2.2. Egzersizin Bilişsel Fonksiyonlara Etkisi.....	6
2.3. Egzersizin Beyinde Etki Mekanizmaları.....	8
2.3.1. Nörogenesis	8
2.3.2. Sinaptik Plastisite	9
2.3.3. Spine Yoğunluğu.....	10
2.3.4. Anjiyogenez ve Vasküler Büyüme Faktörleri.....	10
2.3.5. Nörotransmitterler ve Büyüme Faktörleri.....	10
2.4. Hipokampusün Yapısı ve Fonksiyonları	11
2.5. Glutamat Reseptörleri	12
2.5.1. N-Metil-D-Aspartat (NMDA) Reseptörleri	13
2.5.2. NMDA Reseptör Tipleri	17
2.5.3. NMDA Reseptörünün Yapısı.....	18
3. MATERYAL ve METOT	20
3.1. Materyal	20
3.1.1. Deney Hayvanları	20
3.1.2. Egzersiz Programı	21
3.1.3. Kullanılan Malzemeler ve Aletler.....	21
3.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler	22
3.1.5. Kullanılan Çözeltiler	23
3.2. Metot	25
3.2.1. Morris Su Labirenti (Morris Water Maze).....	25
3.2.2. Hipokampus Örneklerinin Homojenizasyonu.....	26
3.2.3. SDS-PAGE Yöntemi.....	27

3.2.4. Western Blot Yöntemi	27
4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	28
5. BULGULAR	29
5.1. Morris Su Labirenti Verileri.....	29
5.1.1. Hedef Platformu Bulma Süresi	29
5.1.2. Probe Test	31
5.1.3. Görünür Platform Testi (Visible Platform Test)	32
5.2. NMDA NR2A, NR2B, NR1 Reseptör Ekspresyon Düzeyleri.....	32
6. TARTIŞMA	35
ÖZET.....	41
ABSTRACT	42
KAYNAKLAR	43

KISALTMALAR

ACPD	: Trans-(1S, 3R) -1-amino-1,3-cyclopentanedicarboxylic asit
AMPA	: Alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazolpropionat
AH	: Alzheimer Hastalığı
BDNF	: Brain Drivated Nörotrofic Factör- Beyin kaynaklı sinir büyüme faktörü
CaMKII	: Kalsiyum/kalmodülin bağımlı protein kinaz
EPSP	: Eksitatör Postsinaptik Potansiyel
IGF	: Insulin like growth factör-İnsülin benzeri büyüme faktörü
iGlur	: İyonotropik Glutamat Reseptörü
LTD	: Long term deprection-Uzun süreli depresyon
LTP	: Long term potantiation- Uzun süreli potansiyalizasyon
NMDAR	: N-metil-D-aspartat reseptör
PKA	: Protein kinaz A
PKC	: Protein kinaz C
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforez
SSS	: Santral Sinir Sistemi
VEGF	: Vasculer-endotelial growth factor-damar büyüme faktörü

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Morris su labirentinde, eğitim dönemi, hedef platformu bulma süreleri	29
Tablo 2. Morris su labirentinde probe test verileri	32
Tablo 3. Tüm grupların görünür platform testi verilerinin karşılaştırılması	32
Tablo 4. Western Blot analizi ile NR2A, NR2B, NR1 reseptörlerinin optik dansiteleri	33

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. NR2A, NR2B ve NR1'e ait Western Blot örnekleri.....	34
---	----

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. Morris su labirentinde, eğitim döneminde, hedef platformu bulma sürelerinin (sn) grup içi değerlendirmesi	30
Grafik 2. Morris su labirentinde, eğitim döneminde, grupların hedef platformu bulma sürelerinin karşılaştırılması	31
Grafik 3. Tüm grupların NR2A, NR2B ve NR1'e ait optik dansite sonuçları.....	33

1. GİRİŞ ve AMAÇ

İnsan yaşamının kaçınılmaz bir sonucu olan yaşlanma süreci birtakım fizyolojik değişiklikleri de beraberinde getirmektedir. Yaşlanmanın en iyi bilinen etkilerinden biri öğrenme ve hafıza gibi bilişsel fonksiyonlarda bozulmadır. Birçok kişi bilişsel yıkım gelişmeden yaşlanırken, normal işlevsellik gösteren kişilerde bile bir takım bilişsel değişiklikler tanımlanabilir. İleri yaşlarda hem insanlarda hem de kemirgenler de yaygın olarak gözlenen bilişsel fonksiyonlardaki bu bozulma özellikle Alzheimer Hastalığı'nda (AH) zarar gören beyin yapısı olan hipokampus hasarına bağlıdır (1).

Öğrenme, hafıza ve yeni edinilen bilgilerin depolanmasında hipokampal formasyonun önemli rolü olduğu bilinmektedir. Hipokampusu etkileyen lezyonu olan hastalarda, kısa süreli hafızanın uzun süreli hafızaya dönüştürülemediği gözlemlenmiştir. Hipokampüste büyük bir hasar meydana geldiğinde, yeni hafıza komponentleri oluşturulamadığı ve oluşmuş olanı korumayı imkansızlaştırdığı ve amnezi oluşturduğu gözlenmiştir (2).

İnsan sinir sisteminin biyolojik çalışmaları zordur ve hayvan çalışmaları da bazı sınırlamalara sahiptir. Bununla birlikte mekansal hafıza alanı türler arasında ortak bir zemin sağlamıştır, insanlar ve sıçanlar gibi türler için yaş ile ilişkili değişikliklerin tutarlı olarak tanımlandığı bir alanı oluşturur (3). Mekansal hafıza, canlının çevresel konum ve mekansal oryantasyon ile ilgili bilgi ve gözlemlerinin kaydedilmesini ifade eder. Memeliler, mekansal/uzamsal özellikleri ve verileri oluşturabilmek için özellikle CA1 bölgesi fonksiyon gören hipokampüse ihtiyaç duyarlar (4).

Sıçanlarda Morris su labirenti mekansal hafıza testi olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Yapılan birçok çalışmada yaşlı sıçanlar bu deneyi öğrenmekte genç kontrollere göre yetersizdir (5,6). Bu durum yaşlanma ile oluşan mekansal hafıza bozukluğuna atfedilmektedir.

Glutamat, memeli santral sinir sisteminde (SSS) önde gelen uyarıcı nörotransmitterdir. Glutamat reseptörleri hafıza ve öğrenme fonksiyonlarına katkıda bulunan sinaptik iletide rol alır (7). Glutamat reseptörleri temelde postsinaptik

membranda lokalizedir. İyonotropik glutamat reseptörlerinden olan N-Metil-D-Aspartat reseptörleri (NMDAR) beynin tümünde yaygın olarak bulunmaktadır ancak baskın olarak ön beyine lokalize olmuşlardır. En yüksek düzeyde bulundukları yer ise hipokampusun CA1 bölgesidir (7). Yapılan deneyler, CA1 hipokampal NMDAR'nin hipokampusa bağımlı mekansal hafıza ve mekansal olmayan hafızanın oluşması için gerekli olduğunu ortaya koymuştur (8). Yaşlı sıçanlarda yapılan bazı çalışmalarda NMDAR NR1 ve özellikle NR2B subtipi ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (9). Bu durum NR1 ve özellikle de NR2B subtipindeki azalmanın öğrenme ve bellekteki yaşa bağlı bozuklukların altta yatan mekanizmalarından biri olabileceğini düşündürmektedir.

Yaşlanma ile ilişkili nörodejeneratif hastalıkların riskini azaltmak ve yaşlı yetişkinlerin bilişsel kapasitelerini iyileştirmek için yaşam tarzı ve diğer etkileşimlerle ilgili faktörlere ilgi artmıştır. Egzersiz, demans ve genel olarak yaş ile ilişkili bilişsel azalmanın önlenmesinde önemli ve uygulanabilir bir yaşam şekli olarak ortaya çıkmıştır. İnsan ve hayvan çalışmalarından elde edilen kanıtlar, egzersizin davranışın bilişsel ve emosyonel yönleri üzerine olumlu bir etkiye sahip olduğunu düşündürmüştür (10-12).

Erickson ve Kramer 6 ay süresince kronik aerobik egzersiz yapan yaşlı yetişkinlerde dikkat sistemi, prefrontal ve parietal bölgelerin aktivitesinde belirgin iyileşme göstermiştir (13). Daha yaşlı yetişkinlerde yapılan bir çalışmada yazarlar yaşlı beynin aerobik egzersiz ile oluşturulan değişikliklere cevap verebilir ve esnek olduğunu ve bu etkinin egzersizin yoğunluğu ile değiştirilebildiğini göstermiştir(14,15).

Genç ve yaşlı hayvan modellerinde gönüllü veya zorunlu egzersiz hipokampus bağımlı hafıza sistemi ve öğrenme ile diğer hipokampusden bağımsız hafıza sistemlerinde iyileşme göstermiş, egzersizin, fiziksel inaktivitenin olumsuz etkilerini tersine çevirebildiği ve biliş üzerine yaşlanmanın olumsuz etkilerini azaltabildiği ve /veya geciktirebildiği bildirilmiştir (11).

Hayvan modellerinin kullanıldığı çoğu çalışma fiziksel aktivitenin nöronal plastisiteyi iyileştirme ve genç hayvanlardaki toksisitenin neden olduğu öğrenme bozukluklarını azaltmada da etkili olduğunu göstermiştir (16,17-20).

Bununla beraber yaşı sıçanlarda bilişsel iyileşme üzerine egzersizin etkisi ile ilgili literatürde çelişkili raporlar da vardır (21,22).

Beyin fonksiyonları üzerine egzersizin bu etkilerinin altta yatan mekanizmaları ile ilgili araştırmalar nörotransmitter değişiklikleri, nörotrofinler, vaskülarite ve hipokampuse özgü olarak ise egzersizin, yeni nöronlarda ciddi düzeyde artışa neden olması üzerine odaklanmıştır (18,23).

Yakın zamanlarda, egzersizin sinaptik plastisite ile ilişkili genleri upregüle ettiği bulunmuştur ve bu durumdan özellikle glutamaterjik sistem etkilenmektedir (24). Yapılan az sayıda çalışmada egzersizin hipokampusteki NMDA reseptörlerinin hem NR2A hem de NR2B alt tiplerini artırdığı gösterilmiştir (17,25). Buna ek olarak, NMDA reseptör alt birimi $\epsilon 1$ (NR2A) eksik farelerde egzersiz ile Beyin Kaynaklı Sinir Büyüme Faktörü (BDNF) seviyeleri ve nörogeneziste artış olmadığı belirlenmiştir (25). Fiziksel aktivitenin baskın etkisinin NMDA-reseptör-aracılı glutamaterjik iletim üzerine olduğu düşünülmektedir (25). Bununla beraber NMDA reseptörleri ile ilgili çalışmalar genç erişkin kemirgenlerde ve kısa süreli egzersiz uygulamaları şeklinde yapılmıştır.

Yaşlanmayla birlikte öğrenme ve bellek fonksiyonlarında kayıp ve hipokampüste NMDAR gözlenen değişiklikler dikkat çekicidir. Biz bu çalışmada sedanter bir yaşamın sonunda yaşlılık döneminde başlayan uzun süreli düzenli egzersizin öğrenme, bellek ve NMDAR subtiplerinden NR1, NR2A ve NR2B konsantrasyonu üzerine etkisinin araştırılmasını amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yaşlanma ve Bilişsel Fonksiyonlar

Tüm dünyada yaşlı nüfus oranlarının arttığı bilinmektedir. Türkiye’de 2012 yılında 65 yaş ve üstü nüfusun oranı %7,5’tir. Nüfus projeksiyonlarına göre bu oranın 2075 yılına kadar %27,7’ye yükseleceği tahmin edilmektedir. Türkiye’nin yaşlı nüfus oranının 2023 yılında %10,2’ye yükselerek yaşlı nüfus yapısına sahip ülkeler arasında yer alacağı tahmin edilmektedir (26).

Yaşlanma insanoğlunun normal yaşam serüveninin kaçınılmaz bir bölümünü oluşturmakta ve tüm vücutta ve beyinde birtakım fizyolojik değişiklikleri de beraberinde getirmektedir. Beynin yapısal büyüklüğü, kortikal kalınlık, beyaz madde bütünlüğü, dopaminerjik aktivite, hipokampus ve oksipital beyin bölgelerinin fonksiyonlarında yaş ile birlikte azalmalar görülür (27). Yaşın en kesin etkileri öğrenme ve hafıza gibi bilişsel fonksiyonlarda bozulmadır. Birçok kişi bilişsel yıkım gelişmeden yaşlanırken, normal işlevsellik gösteren kişilerde bile bir takım bilişsel değişiklikler tanımlanabilir. Her bilişsel faaliyette ve her koşulda olmasa bile, yaşlanma ile bazı bilişsel faaliyetlerde performans düşüşü gözlenir (28). Hatırlama, yeni bilgiyi alma ve saklama, isim hatırlama gibi bilişsel aktiviteler özellikle 70 yaşından sonra azalır. Karakteristik olarak, bir deneyimin kendisinin hatırlanması veya bir kişinin özelliklerinin bilinmesine rağmen isminin veya deneyimin spesifik tarihinin hatırlanması zorluğu vardır. Normal hafıza fonksiyonundaki bu yaş ile ilişkili azalma AH’nin yıkıcı etkileri kadar güçlü değildir fakat yine de rahatsız edicidir (3).

Pek çok nörodejeneratif hastalığın altında nöral hücre kaybının yattığını düşünürsek nöron kaybının öğrenme ve hafıza fonksiyonunda yaş ile ilişkili bozukluklara yol açabilme olasılığı açıktır (29). Yapılan beyin hacim çalışmalarında yaşamın üçüncü dekadından dokuzuncu dekadına kadar, beynin ağırlığında ortalama 233 gram kayıp olduğu gösterilmiştir. Bu değişiklik 6. ve 7. dekadlar boyunca hızlanır. Lateral ventriküllerin ve sulkusların genişlemesi ile orantılı olarak beynin ağırlık kaybı muhtemelen nöronal dejenerasyonun sonucudur (27).

İleri yaşlarda hem insanlarda hem de kemirgenler de yaygın olarak gözlenen bilişsel fonksiyonlardaki bu bozulma, özellikle AH'de de zarar gören hipokampus hasarına bağlıdır (1). Hipokampus hareket, yürüme ve diğer motor işlerde esas rol oynamaktadır. Öğrenme, hafıza ve yeni edinilen bilgilerin depolanmasında hipokampal formasyonun önemli rolü olduğu bilinmektedir. Hipokampusu etkileyen lezyonu olan hastalarda kısa süreli hafızanın, uzun süreli hafızaya dönüştürülemediği gözlemlenmiştir. Hipokampüste meydana gelen büyük hasarların yeni hafıza komponentleri oluşturmayı ve oluşmuş olanı korumayı imkansızlaştırdığı ve amneziye neden olduğu gözlenmiştir (2). 45-95 yaşları arasında Hipokampus hücrelerinde % 27'lik lineer bir düşme olduğunu kaydedilmiştir (27).

Mekansal hafıza, canlının çevresel konum ve mekansal oryantasyon ile ilgili bilgisinin kaydedilmesini ifade eder. Memeliler, mekansal/uzamsal özellikleri ve verileri oluşturabilmek için özellikle CA1 bölgesi fonksiyon gören hipokampüse ihtiyaç duyarlar (4). Genel olarak bellekteki özellikle de mekansal bellekteki kritik rolünden dolayı hipokampus normal yaşlanmanın mekanizmalarının araştırılmasında odak nokta olmuştur. Hipokampal formasyonu hasarlı hastalar mekansal ve epizodik hafızada yetersizlikler gösterir. Bu bulgu çeşitli türlerde yapılan hedeflenmiş lezyon çalışmaları ile doğrulanmıştır (30).

Sıçanlarda Morris su labirenti mekansal hafıza testi olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Yapılan birçok çalışmada yaşlı sıçanlar bu deneyi öğrenmekte genç kontrollere göre yetersizdir. Bu durum yaşlanma ile oluşan mekansal hafıza bozukluğuna atfedilmektedir. Yaşlı sıçanlar mekansal hafızanın diğer bir testi olan Barnes sirkiler platform deneyinde de yetersizdirler (5,6).

Glutamat reseptörleri hafıza ve öğrenme fonksiyonlarına katkıda bulunan sinaptik iletide rol alır (7). Hafıza ve öğrenmede önemli bir rolü olan glutamat reseptörü olan NMDAR'leri beynin tümünde yaygın olarak bulunmakta ancak baskın olarak ön beyine lokalize olmuşlardır. En yüksek düzeyde bulundukları yer ise hipokampusün CA1 bölgesidir (7). Yapılan deneyler, CA1 hipokampal NMDAR'nün hipokampusa bağımlı mekansal hafıza ve mekansal olmayan hafızanın oluşması için gerekli olduğunu ortaya koymuştur (8). Yaşlı sıçanlarda yapılan bazı çalışmalarda NR1 ve özellikle NR2B subtipi ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı görülmüştür.

Bunun sonucunda öğrenme ve bellekteki yaşa bağlı bozuklukların altında yatan mekanizmalardan birinin NR1 ve özellikle de NR2B subtipindeki azalma olabileceği düşünülmüştür (9).

2.2. Egzersizin Bilişsel Fonksiyonlara Etkisi

Egzersizin genel sağlık için yararlı olduğunun kanıtları açık olmakla beraber bu durum batı toplumlarında ancak önceki yüzyılın sonlarına doğru ciddiye alınmaya başlamıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalar düzenli egzersizin kardiyovasküler, metabolik ve metastatik hastalıklara yakalanma riskini azalttığını göstermiştir (31).

Fiziksel aktivite ile bilişsel fonksiyonların iyileştiği, yaşa bağlı bellek azalmasını geciktirdiği, insan ve hayvanlarda öğrenmeyi iyileştirdiği gösterilmiştir. Ayrıca egzersizin, inmenin neden olduğu beyin hasarına karşı koruyucu olduğu (32), yaralanma sonrası iyileşmeyi hızlandırdığı (33) ve antidepresan etki gösterdiği de bildirilmiştir (34). Aktif bir yaşam tarzı yaşlanma veya nörodejeneratif hastalıklarla bilişsel fonksiyonların kaybını azaltır veya koruyabilir. Fiziksel aktivite vücut ve zihin sağlığını korumak için bilinen en etkili yollardan biridir.

Çocuklarda ve genç erişkinlerde egzersiz ve bilişsel fonksiyonlar ile ilgili az sayıda çalışma yapılmıştır. Bununla birlikte, okul çağındaki çocukların bir meta-analizinde fiziksel aktivite ile öğrenme ve zeka puanları arasında pozitif bir ilişki olduğu bildirilmiştir (35). Buna ek olarak, üniversite öğrencilerinde tepki süresi ve kelime öğrenmenin yoğun egzersizden hemen sonra daha hızlı olduğu bulunmuştur (36). Benzer sonuçlar 12 haftalık aerobik egzersizden sonra yaş ortalaması 33 olan genç erişkinlerde de elde edilmiştir (37). Ayrıca, çocukluk çağında yapılan aerobik egzersizin ilerleyen yaşlarda bilişsel rezerv olarak adlandırılan beyin direncini artırdığı bildirilmiştir. Gerçekten de, 62-85 yaş arası yaşlı erkeklerde, 15-25 yaşlarında fiziksel aktivite yapmış olmaları ile bilgi işleme hızları arasında pozitif bir korelasyon bulunmuştur (38).

Fiziksel olarak aktif yaşlı bireylerin sedanter eşdeğerlerine göre akıl yürütme, çalışan hafıza, kelime hazinesi ve tepki zamanı ölçümlerinde daha iyi olduğu gözlenmiştir (39). Yapılan çalışmalarda 60-85 yaş arası sağlıklı sedanter yetişkinler birkaç yıl için birkaç ay boyunca haftada birkaç kez farklı egzersiz rejimlerine

alınmış, bilişsel fonksiyonlar egzersiz öncesi ve sonrası değerlendirilmiştir (40,41). Çalışmalarda uygulanan egzersizin tipi, süresi ve yoğunluğunda farklılıklar olduğu halde tüm egzersiz gruplarında, bilişsel fonksiyonların iyileştiği gösterilmiştir (41). Bu olumlu sonuç fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ve elektroensefalogram (EEG) gibi elektrofizyolojik ölçümlerde de gösterilmiştir. Dahası MRI çalışmaları prefrontal ve temporal gri madde hacminin sedanter kontrollerle karşılaştırıldığı zaman aktif yaşlı bireylerde arttığını göstermiştir.

AH ile ilgili genlerin belirlenmesi ile, araştırmalar belirli hastalık gruplarına odaklanmaya başlamıştır. Örneğin; Apolipoprotein (ApoE)-ε4 alel taşıyıcıları AH için riskli olarak kabul edilir. Son yıllarda Apo-ε4 pozitif kişilerde egzersizin yararları bildirilmiştir. Epidemiyolojik çalışmalar bu özel alt nüfusun taşıyıcı olmayanlardan daha aktif bir yaşam tarzı sürdürmelerinin nispeten daha faydalı olacağını göstermiştir (42). İnsanlardaki yaşlanma sürecine benzer şekilde kemirgenlerde de yeni görevleri öğrenme yeteneği yaşla birlikte zayıflar. Hücresel düzeyde hipokampus ve kortekste sinapsların sayısı, sinaptik güç ve plastisite azalır (43). Son yıllarda yetişkin kemirgenlerde pek çok egzersiz ve bilişsel fonksiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmalar, beyin fonksiyonları için egzersizin yararlı olduğunu güçlü bir şekilde desteklemiş ve altta yatan hücresel mekanizmalar hakkında bilgi sağlamıştır.

Hem gönüllü hem de zorunlu egzersiz uygulamalarının Morris su labirenti, Y-labirent, T-labirent ve ışınal kollu labirent testlerinde mekansal belleği geliştirdiği gösterilmiştir. Egzersiz ile pasif kaçınma, öğrenme ve yeni nesne tanıma gibi sınırlı hareket gerektiren hipokampus bağımlı testlerde de daha iyi bir performans sağlanmıştır (18). Dahası yükseltilmiş labirent testinde hipokampüse bağımlı olmayan anksiyete ilişkili davranışlar da gönüllü veya zorunlu egzersizden yarar görmektedir (44).

Son zamanlarda yapılan araştırmalar göstermiştir ki yaşlı kemirgenlerde fiziksel aktivite yaşamın geç dönemlerinde başlansa bile mekansal bellek üzerine faydalıdır. Yapılan bir çalışmada yaşlı erkek farelerin bir ay boyunca egzersiz çarkı ile birlikte tutulması su labirentindeki performanslarını iyileştirmiştir (45). Ayrıca,

yürüme bandı eğitimi (7 hafta boyunca günde 15 dakika) yaşlı sıçanlarda Morris su labirentinde öğrenmeyi geliştirmiştir (46).

Benzer sonuçlar, AH için transgenik fare modelleri kullanılan çalışmalardan da elde edilmiştir. Özellikle, hastalığın başlangıcından 5 ay önce başlayan uzun süreli egzersizin su labirenti testinde öğrenmeyi geliştirdiği bildirilmiştir. Buna ek olarak, egzersiz hipokampus ve kortekste β -amiloid plak yükünü azaltmaktadır (47). Dahası hastalık başlangıcından sonra başlayan kısa süreli egzersiz (3 hafta) bile yaşlı AH mutant farelerde çalışan ve referans hafızanın her ikisini de iyileştirmiştir (48).

Böylece egzersizin hastalık semptomları başladıktan sonra veya hayatın geç döneminde başlansa bile normal kemirgenlerde ve demansın transgenik fare modellerinde bilişsel fonksiyonlar için yararlı olduğu söylenebilir.

Bununla beraber yaşlı sıçanlarda bilişsel iyileşme üzerine egzersizin etkisi ile ilgili literatürde çelişkili raporlar da vardır (21,22).

2.3. Egzersizin Beyinde Etki Mekanizmaları

Egzersizin beyin fonksiyonları üzerine etkileri ile altta yatan mekanizmalar araştırılmış ve nörotransmitter değişiklikleri, nörotrofinler, vaskülarite ve hipokampüse özgü bazı değişiklikler saptanmış ve yeni nöronlarda ciddi düzeyde artışa neden olduğu (nörogenesis) üzerine odaklanılmıştır. Bilişsel fonksiyonlar üzerine egzersizin yararlı etkilerine kısmen de olsa zenginleşmiş hipokampal nörogenesis aracılık edebilir (18,23).

2.3.1. Nörogenesis

Yetişkin memeli beyni olfaktor bulbus ve hipokampusun dentat girusunda yaşam boyunca yeni nöronlar üretir. Birçok dış veya iç, genetik veya epigenetik faktörler yeni nöron üretimini düzenler (49). Artan kanıtlar öğrenme ve bellekte bu sürecin bir rolü olduğunu gösterir. Yeni oluşan hücrelerin ablasyonu mekansal bellek kusuru ile sonuçlanmakta, (50) buna ek olarak, erken gen ifadesi için işaretler kullanılarak yeni hücrelerin tercihen öğrenme testleri sırasında aktive olduğu gösterilmiştir (51).

Egzersiz, güçlü nörojenik bir uyarıcıdır. Kemirgenlerde egzersiz çarkı ile yapılan fizik aktivite hipokampus dentat girusunda yeni nöronların üretimi ve hayatta kalmalarında 3-4 kat artış ile sonuçlanmıştır (18). Hücre oluşumu üzerinde egzersizin etkisinin başlangıcı hızlıdır. Egzersiz ile yeni hücre oluşumu üç günde pik yapar. Egzersizin 32. gününden sonra pro-proliferatif etki referans hattına geri döner. Ancak ilginç bir şekilde, olgunlaşmamış nöronların sayısı artmaya devam etmektedir (52). Nörogenesis üzerine egzersizin bu güçlü etkisi kemirgenlerde ömür boyunca korunur.

Genç yaştan orta yaşa kadar sürekli olarak egzersiz yaptırılan farelerde, hücre oluşumunun normal yaşa bağlı düşüşü sedanter kontrollere göre önemli ölçüde azalmıştır (52). Ayrıca, orta yaş (53) veya yaşlılıkta (45) egzersiz çarkı ile çalıştırılmaya başlatılan farelerde, yeni nöron sayısının arttığı gösterilmiştir. Son çalışmalar göstermiştir ki; fiziksel aktivite, gebelik (54) ve radyasyon tedavisi sonucu (55) hipokampal nöroeneziste meydana gelen azalmayı geriye döndürebilmektedir.

Bununla beraber belirli nörolojik hastalıklar için transgenik fare modellerinde fiziksel aktivitenin nörogenesis üzerine olumlu etkisinin şüpheli olduğu dikkate alınmalıdır. Erken başlangıçlı ailesel AH ile bağlantılı presenilin-1 varyantları ifade eden transgenik farelerde (56) ve Huntington Hastalığı için kullanılan bir fare modelinde (57), egzersiz nöroeneziste artış sağlamamıştır.

2.3.2. Sinaptik Plastisite

Egzersiz ile ilişkili yapısal değişiklikler egzersiz yaptırılan kemirgenlerde sinaptik plastisitedeki iyileşmeler ile yansıtılır. Uzun süreli potansiyalizasyon (LTP)'un, egzersiz yapan farelerde hipokampusun dentat girus doku kesitlerinde in vitro olarak arttığı gösterilmiştir (58). Ayrıca egzersiz çarkı ile gönüllü egzersiz (17) ve koşubandı ile zorunlu egzersiz yaptırılan sıçanlarda da (18) in vivo olarak artmıştır. Sinaptik plastisitedeki bu değişiklikler dentat girusa spesifik gibi görünmektedir (18). Gerçekten de yeni oluşan hücreler granül hücre tabakasının küçük bir oranını oluşturduğu halde bireysel olarak yeni nöronlar LTP amplitudünde geçici artış ve indüksiyon eşliğinde bir azalmaya sahiptir (59).

Önerilen diğ er bir mekanizma ise yeni nöronlarda NMDAR NR2B subtipi ekspresyonunun artmasıdır (59). Böylece, dentat girustaki nöronlarda plastisite, egzersize bağı lı 3-4 kat artış göstermekte bu da hafıza fonksiyonu üzerine fiziksel aktivitenin derin etkisini kısmen açıklayabilmektedir.

2.3.3. Spine Yoğ unluğ u

Fiziksel aktivitenin olumlu etkileri ince hücre morfolojisine kadar uzanmaktadır. Egzersiz özellikle uyarıcı sinapsları içeren dendritler üzerindeki aktinden zengin çıkıntılar olan dendritik spinelerin özelliklerini olumlu yönde etkiler. Spine büyüklüğü ve miktarındaki artış, LTP indüksiyonu ile ilişkilidir ve sinaptik güçteki değı şiklikleri desteklediğı kabul edilmektedir. Başka bir çalışmada da egzersizin, hipokampüste spine dansitesini artırdığı gösterilmiştir (60). Ayrıca fiziksel aktivitenin yeni doğ an nöronlardaki dendritik spinelerin olgunlaşmasını da hızlandırdığı gösterilmiştir (60).

2.3.4. Anjiyogenez ve Vasküler Büyüme Faktörleri

Fiziksel aktivite özellikle beyin endotelyal hücrelerinin proliferasyonunu ve tüm beyinde anjiyogenezisi arttırmaktadır (23). Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), egzersizin beyindeki anjiyogenik ve nörojenik etkilerinde önemli bir role sahip olduğı ortaya konmuştur. Egzersiz, hipokampal IGF gen ifadesini (61) ve beraberinde IGF ve VEGF serum düzeylerini arttırmıştır (61,62). Bu faktörler hipokampal nöroeneziste de kısmen önem taşır.

2.3.5. Nörotransmitterler ve Büyüme Faktörleri

Fiziksel aktivitenin beyinde nörotransmitter sistemlerinin işlevini değı ştirebildiğini gösteren çok sayıda çalışma vardır. Yakın zamanlarda, egzersizin sinaptik plastisite ile ilişkili genleri upregüle ettiğı bulunmuş ve özellikle glutamaterjik sistem nöronlarının (24) etkilendiğı ortaya konmuştur.

Yapılan az sayıda çalışmada egzersizin hipokampusteki NMDARlerinin hem NR2A hem de NR2B alt tiplerini arttırdığı gösterilmiştir (17,24). Buna ek olarak, NMDAR alt birimi $\epsilon 1$ (NR2A) eksik farelerde egzersiz ile BDNF protein seviyeleri

ve nörogeneziste artış olmadığı belirlenmiştir (25). Bu çalışmalar sonucunda fiziksel aktivitenin baskın etkisinin NMDAR-aracılı glutamaterjik iletim üzerine olduğu ileri sürülmüştür.

Fiziksel aktivitenin monoamin sistemini de aktive ettiği (63) ve depresyonun iyileşmesini hızlandırdığı ortaya konmuştur (34). Gerçekten de, insanlarda egzersizin antidepresan etkisinin serotonerjik ilaçlar kadar etkili olduğu gösterilmiştir (64). Egzersiz beyin sapı rafe nöronlarında serotonin biyosentezinin hız sınırlayıcı enzimi olan triptofan hidroksilazı arttırdığı ortaya konmuştur (63). Dentat girus 5-hidroksitriptamin 5-HT_{1A} reseptörleri içerir ve rafe çekirdeğinden serotonerjik giriş alır. Egzersize benzer şekilde, fluoksetin gibi serotonerjik antidepresanlar (65) hücre oluşumunu artırabilir. Bu nörogenezis artışı, egzersiz ve antidepresanların ortak bir yolak üzerinden etki gösterebileceği öne sürülmüştür.

Nörotropin gen ekspresyonu ve protein düzeyleri üzerinde egzersizin etkileri de yoğun bir şekilde araştırılmıştır (23,66). Bir nörotrofin olan BDNF fiziksel aktivite ile upregüle edilen en önemli faktör olarak kabul edilmektedir. BDNF, hücre oluşumu, büyümesi, hayatta kalması ve sinaptik plastisitede önemli bir role sahiptir (23). Egzersiz ile hipokampüste BDNF mRNA ve protein düzeylerinin hızla arttığı ve haftalar boyunca yüksek kaldığı ortaya konmuştur. (23). Ayrıca, BDNF'nin intraserebral infüzyonu ile dentat girusta hücre oluşumu artarken (67), subventriküler bölgede artmamaktadır (68). Bu bulgu, egzersizin nörojenik etkisinin hipokampuse sınırlı olduğunu göstermektedir.

2.4. Hipokampüsün Yapısı ve Fonksiyonları

Hipokampüs, temporal korteksin lateral ventrikülünün alt boynuzunun tabanı boyunca uzanan, kıvrılmış bir gri cevher kabartısıdır (69).

Hipokampüs, limbik sistem içerisinde önemli fonksiyonlarıyla odak noktasını oluşturmaktadır. Hipokampüs ve ona bağlı temporal lop yapıları; serebral korteks, amigdala, hipotalamus, septum, mamiller cisimler gibi temel limbik sistem bölgeleriyle sayısız indirekt bağlantılar gösterir ve "hipokampal formasyon" adını alır. Öğrenme ve hafıza, limbik sistem de dahil olmak üzere, SSS'nin birçok bölgeleri ile ilgili kompleks fonksiyonlardır. Yeni edinilen bilgilerin depolanmasında

hipokampal formasyonun önemli rolü olduğu bilinmektedir. Hipokampüsü etkileyen lezyonu olan hastalarda kısa süreli hafızanın uzun süreli hafızaya dönüştürülemediği gözlemlenmiştir. Lezyonun sol hipokampüste olduğu zamanda daha çok sözel hafıza etkilenirken, sağda olduğu durumlarda görsel hafıza etkilenmektedir. Hipokampüsün değişik alanlarının uyarılması durumunda hiddet, edilgenlik, hiperseksüalite gibi davranış biçimleri görülür. Hipokampüs, hipereksitabilite özelliğine sahiptir. Hafif elektriksel uyarılmasında, uyarı bittikten sonra saniyelerce süren bir epileptik nöbet gözlenir. Bu da hipokampüsün normal koşullarda bile uzun süren sinyaller yaydığını gösterir (2).

2.5. Glutamat Reseptörleri

Glutamat, memeli SSS'inde önde gelen eksitator nörotransmitterdir. Kortikospinal motor nöronların spinal motor nöronlara yaptığı sinapslarda major nörotransmitterdir. Normalde üst motor nöron eksitasyonu ile glutamat molekülleri sinaptik aralığa düşmekte ve spinal motor nöronlardaki (postsinaptik) reseptör yerlerine giderek spinal motor nöronları depolarize etmektedirler. Glutamat reseptörleri memelilerin SSS'deki çoğu uyarıcı sinir iletimini düzenlemektedir. Glutamat reseptörleri hafıza ve öğrenme fonksiyonlarına katkıda bulunan sinaptik iletimde rol alırken, bir yandan da sinir sisteminin gelişimi esnasındaki nöronlar arası bağlantının da oluşturulmasına katkıda bulunmaktadır (7).

Glutamat reseptörleri, temelde postsinaptik membranda lokalizedir. Başlıca 2 tipi vardır.

I- İyonotropik glutamat reseptörleri (iGluR): Doğrudan iyon kanallarını kontrol eder.

II- Metabotropik glutamat reseptörleri: İkincil haberciler üzerinden dolaylı olarak iyon kanallarını kontrol eder (70-72).

Bugüne kadar memeli SSS'inde 16 adet iGluR cDNA'sı ve 8 adet metabotropik glutamat reseptör komplementer DNA (cDNA)'sı tanımlanmıştır. Şimdiye kadar izole edilen 16 adet iGluR cDNA'sının; 4 tanesi Alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoksazol propionat (AMPA) reseptör alt birimi (GluR1, GluR2, GluR3, GluR4), 5 tanesi kainat reseptör alt birimi (GluR5, GluR6, GluR7, KA1,

KA2) ve 7 tanesi NMDA reseptör alt birimidir (NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D, NR3A, NR3B). Günümüzde glutamat reseptör genlerinin ekspresyonunu manipüle edici birçok farklı teknik kullanılarak, glutamat reseptörlerinin tüm fizyolojisi ve patolojisi geniş bir şekilde araştırılmaktadır. Birçok olguda iGluR alt birimleri değişik laboratuvarlar tarafından ayrı ayrı ve de eş zamanlı olarak klonlandığı için benzer alt birimlere her biri farklı isimler vermişlerdir (7).

I. İyonotropik Glutamat Reseptörleri:

Presinaptik sinir terminallerinden salınan glutamat molekülleri iGluR'e bağlandığında bir elektriksel olaya döndürülen kısa bir kimyasal sinyal meydana getirmektedir. Postsinaptik depolarizasyonla sonuçlanan net bir iç akıma izin veren bir integral katyon seçici kanal içeren iyonotropik glutamat reseptörleri 3 geniş gruba ayrılır:

1. α -amino-3-hidroksi-5-metil izoksozol propionat tercih eden (AMPA) reseptörler
2. Kainat tercih eden reseptörler
3. N-metil D-aspartat tercih eden (NMDA) reseptörler (70-72).

II- Metabotropik glutamat reseptörleri

Metabotropik reseptörler GTP-bağlayıcı proteinlerle (G proteinleri) bağlantılıdır ve intraselüler mesajcılarının üretimini kontrol etmektedirler (73-75). *Trans*-(1S,3R)-1-amino-1,3-cyclopentanedicarboxylic asit (ACPD) ile selektif olarak aktive olurlar. Glutamat, iyonotropik reseptörler üzerinden eksitasyon yaparken, metabotropik reseptörler üzerinden eksitasyon veya inhibisyon oluşturabilmektir (70-72).

2.5.1. N-Metil-D-Aspartat (NMDA) Reseptörleri

İyonotropik glutamat reseptörleri sentetik agonistlere göre isimlendirilmişlerdir. NMDA glutamat reseptörleri, 2-amino-5-phaphono valerik asit ile selektif olarak bloke olurken, AMPA ve kainat reseptörleri bu ajanla bloke olmazlar. Her iki reseptör de 6-cyano-7-nitroquinoxalin-2,3 dione ile bloke olurlar.

Bu nedenlerde AMPA reseptörleri ve kainat reseptörleri non-NMDA reseptörü olarak da isimlendirilmektedir (76).

NMDA reseptör agonistleri olan glutamat ve aspartat tipik olarak kısa zincirli dikarboksilik aminoasitlerdir ve kuvvetli exitatör nörotransmitterlerdir. Aspartat da glutamat gibi NMDA reseptörlerine bağlanır ve aktivite gösterir. Ancak AMPA reseptörleri ve kainat reseptörlerine bağlandığında oluşturduğu etkiden daha az bir etki gösterir. NMDA reseptörleri ile AMPA reseptörleri ve kainat reseptörleri arasında benzerlik az iken AMPA reseptörleri ve kainat reseptörlerinin kendi aralarındaki benzerlikleri daha çoktur. Tüm NMDA reseptör alt birimleri nötral aminoasit içermektedir. Bir tek M2 bölgesinde polar asparajin rezidüsü bulunmaktadır (72,77).

Genelde postsinaptik bölgeler hem AMPA reseptörü hem de NMDA reseptörü içerirken; bazı bölgelerde sadece NMDA reseptörleri bulunur. Gelişimin erken evresinde sinapslar sadece NMDA tipi reseptörler içermektedir (8,78). Non-NMDA iyonotropik reseptörler motor nöronlarda ve beyinde eksitatör postsinaptik potansiyel'in (EPSP) büyük erken komponentini oluşturmaktadır. Yani birçok sinapta AMPA reseptörleri eksitatör aşırım sırasında ana başlangıç; şarj edici gibi etki etmektedir. Bu reseptörler göreceli olarak düşük bir katyon iletkenliğine sahiptirler (< 20 pS). Na^+ ve K^+ 'a geçirgen iken Ca^{+2} 'a geçirgen değildirler. Bu sırada NMDA reseptörleri, intrasellüler enzimler ve ikincil mesajcıların aktivelerini modüle edebilen katı bir Ca^{+2} komponenti ile birlikte daha yavaş bir akım sağlamaktadır (72,77).

EPSP'nin geç komponentini oluşturan NMDA reseptör kanallarının üç özelliği vardır:

1- Yüksek iletkenliğe sahip iyon kanallarını kontrol ederler (50 pS) ve Na^+ ile K^+ 'un yanı sıra Ca^{+2} 'a da geçirgendirler.

2- Kanalin açılması bir ko-faktör olarak glisinin ekstrasellüler olarak bulunmasına bağlıdır. Kanal sadece glisinin varlığında çalışır. Normal koşullarda ekstrasellüler glisin yoğunluğu NMDA reseptör kanalının çalışabileceği miktarlarda bulunmaktadır. Kinürenik asit ve aminoksalinedikarboksilik asit'in her ikisinin çoğu türevleri glisin bölgesinin kompetatif antagonistleridir.

3- Açılması kimyasal haberciye bağlı olduğu kadar membran potansiyeline de bağlıdır. Bu, NMDA reseptörlerini diğer voltaj kontrollü kanallardan ayıran bir özelliktir (7,72).

Voltaja bağımlılık diğer kanallarda olmayan farklı bir mekanizmadan kaynaklanmaktadır. Diğer kanallarda, membran potansiyelindeki değişiklikler, intrinsek voltaj sensörünün sayesinde kanalda konformasyonel değişikliklere neden olurken NMDA ile aktive olan kanalda ekstresek bloker olan Mg^{+2} (ekstrasellüler Mg^{+2}) açık olan kanalı kapayan bir tıkaç gibi davranır ve iyon akışına engel olur. İstirahat membran potansiyelinde (-65 mV'da) Mg^{+2} kanala sıkıca bağlanır. Ancak membran depolarize olduğunda (örneğin, non-NMDA reseptörleri glutamat ile aktive olduğunda), Mg^{+2} elektrostatik etkiyle kanaldan uzaklaştırılır ve Na^+ ile Ca^{+2} 'un geçişine izin verir. Bu nedenle NMDA reseptörlerinde en yüksek iyon akımı her iki koşulun da gerçekleşmesiyle ortaya çıkmaktadır. Bu özellikleri nedeniyle NMDAR'ü sinaptaki presinaptik aktivite ve postsinaptik depolarizasyonu eş zamanlı olarak saptayan bir araç gibi davranmakta ve postsinaptik hücreye yeterli miktarda ikincil haberci iyon olan Ca^{+2} 'un girişine imkân vermektedir. Bu da sinaptik bağlantının kuvvetindeki plastik (plastisite) değişiklikleri başlatmaktadır (7,72,77).

Birçok hücrede hem non-NMDA reseptörler hem de NMDA reseptörler bulunmaktadır. Mg^{+2} , istirahat membran potansiyelinde NMDA reseptör kanalını bloke ettiği için, NMDA reseptörlerinin EPSP'lerin oluşmasında önemli bir katkısı yoktur. Bu nedenle istirahat durumunda oluşan EPSP'lerde büyük oranlarda non-NMDA reseptörlerinin katkısı bulunmaktadır. Depolarizasyon arttıkça Mg^{+2} NMDA reseptör kanalından uzaklaşmakta ve NMDA reseptör açılarak bu kanallardan iyon akışı gerçekleşmektedir (70-73).

NMDA reseptör kanalının diğer bir farkı göreceli olarak daha yavaş açılıp yavaş kapanması ve bu özelliği nedeniyle EPSP'lerin geç fazına katkıda bulunmasıdır. EPSP'nin geç fazı, Mg^{+2} 'un kanalı bloke etmesi nedeniyle, tek bir presinaptik sinyalden sonra zayıf bir yanıt olarak karşımıza çıkmaktadır. Oysa presinaptik nöron ard arda sinyaller gönderirse postsinaptik hücrede EPSP'ler toplanarak 20 mV veya daha fazla bir depolarizasyon oluşturmaktadır. Bu durumda NMDA reseptörü büyük ölçüde Ca^{+2} 'un katkısı ile daha büyük akımlara yol

açmaktadır. NMDA reseptör aktivasyonu sonucu, post-sinaptik hücrelerde, Ca^{+2} 'a bağımlı enzimler ve bazı ikincil haberciler devreye girmektedir. Bu biyokimyasal reaksiyonlar, sinapsta bazı uzun vadeli modifikasyonlara katkıda bulunan sinyal yollarını tetiklemektedir. Öğrenme ve bellek oluşumunda, sinapsta gerçekleşen değişikliklerin önemli olduğu düşünülmektedir. NMDA reseptörlerinin aktivasyonu presinaptik aktiviteye bağlı olduğu ve uzun süreli sinaptik modifikasyonlar ile ortaya çıktığı için çoğu kez bu duruma aktiviteye bağımlı sinaptik modifikasyonlar denmektedir (70,72).

Gen knockout teknikleri kullanılarak öğrenme ve hafızada rolü olan NMDA reseptörüne bağlı sinaptik plastisite keşfedilmiştir. Yapılan bu deneyler, CA1 hipokampal NMDA reseptörünün hipokampusa bağımlı mekânsal hafıza ve mekânsal olmayan hafızanın oluşması için gerekli olduğunu ortaya koymuştur (8). Öğrenmenin değişik formlarının meydana gelmesinde rolü olan hipokampusta sinaptik plastisitenin bir türü olan “uzun süreli potansiyalizasyon-long term potentiation (LTP)” öğrenme ve hafızanın nöronal mekanizmalarını araştırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır (72,76). LTP, sinaptik kuvvetteki aktiviteye bağımlı uzamış potansiyel olarak tanımlanabilir (77). Daha önceki çalışmalar hipokampal sinaptik plastisitenin LTP benzeri formlarının mekânsal öğrenme ve hafıza ile ilişkili olabileceğini göstermiştir (72). Hipokampusun CA1 bölgesindeki LTP’nin indüksiyonu bir dizi olayı içermektedir. İlk olarak NMDA reseptör kanalının presinaptik glutamat salınımına cevap olarak açılması için postsinaptik membranın yeterince depolarize olması gerekmektedir. Kanalin açılması postsinaptik hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun önemli derecede yükselmesine olanak vermektedir. Ca^{+2} ’daki bu artış metabotropik glutamat reseptörünün aktivasyonuna bağlı fosfoinozidit düzeylerindeki yükselmeye birlikte proteinkinaz C (PKC) ve CaMKII’nin de dâhil olduğu proteinkinazların aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu proteinkinazlar daha sonra sinaptik kuvvette uzun süreli modifikasyonlara yol açacak proteinleri düzenlemektedirler (77).

Homosinaptik “uzun süreli depresyon-long term depression-(LTD)” ise sinaptik kuvvetin aktiviteye bağımlı uzamış zayıflaması olarak tanımlanır ve bir anlamda LTP’nin fonksiyonel karşıtıdır. CA1 alanındaki LTP gibi LTD’nin indüksiyonu da NMDA reseptörlerinin aktivasyonuna ihtiyaç duymaktadır (8,77).

Sinaptik aktivitenin regülasyonunda protein fosforilasyonu ve defosforilasyonunun önemli mekanizmalar olduğu düşünülmektedir. NMDA reseptör kanalının alt birimleri farklı proteinkinazlar ve protein fosfatazlar tarafından doğrudan fosforile ve defosforile edilmektedir. NR1, NR2A ve NR2B alt birimleri hem cAMP bağımlı protein kinaz A (PKA) hem de PKC tarafından farklı bölgelerden fosforile edilebilmektedir. CaMKII, NR2B alt biriminin karboksi terminal ucundaki spesifik bir kalıntıyı ve/veya onun NR2A alt birimindeki karşılığını fosforile etmektedir. Protein tirozin kinaz da NR2A ve NR2B alt birimlerini fosforile etmektedir (79).

2.5.2. NMDA Reseptör Tipleri

NMDA reseptörlerinin şu ana kadar tanımlanan yedi tane alt birimi vardır. Bunlar; NR1, NR2A-B-C-D ve NR3A-B. NMDA reseptörleri beynin tümünde yaygın olarak bulunmaktadır ancak baskın olarak ön beyine lokalize olmuşlardır. En yüksek düzeyde bulundukları yer ise hipokampusun CA1 bölgesidir (7).

NR1: Glisin bağlayıcı bölgeyi içerir. 938 aminoasitten meydana gelmiştir. 105,5 kDA ağırlığındadır. NR1 reseptör alt birim ekspresyonu SSS’de hemen hemen her yerde bulunmaktadır.

NR2: Glutamat bağlayıcı bölgeyi içerir. 4 alt birimi bulunur:

NR2A: Beyinde postnatal eksprese edilir. 1464 aminoasitten meydana gelir ve 165,5 kDA ağırlığındadır. Ekspresyonu için yüzeyde NR1 N-terminalinin bulunması gereklidir. NR2A mRNA’sı tüm beyinde yaygın olarak bulunur; fakat serebral korteks, hipokampus ve serebellumda daha yoğun olarak bulunmaktadır.

NR2B: Tüm embriyonik beyinde eksprese edilir. Ayrıca embriyonik ve neonatal kardiyak myositlerde eksprese edilir. Postnatal olarak yalnız ön beyinde eksprese edilir. 1482 aminoasitten oluşur ve 165,9 kDA ağırlığındadır. NR2B’nin ekspresyonu önbeyinde, serebral korteks, hipokampus, septum, kaudat ve putamende seçici olarak yüksek düzeyde bulunmaktadır.

NR2C: Postnatal olarak serebellumda eksprese edilir. 1239 aminoasitten oluşur ve 135,4 kDA ağırlığındadır. NR2C’nin ekspresyonu ise serebellumda

dominant olarak bulunurken, talamusda ve olfaktör bulbusda daha az olarak bulunmaktadır.

NR2D: Diencephalon ve beyin sapında embriyonal ve neonatal olarak eksprese edilir. 1323 aminoasitten oluşur ve 142,9 kDA ağırlığındadır. NR2D'nin ekspresyonu ortabeyin ve arkabeyinde yüksek iken; düşük düzeyleri talamusda, olfaktör bulbusda ve beyin sapında bulunmaktadır. NR2A ekspresyonunun tamamlayıcıdır.

NR3: Silik fonksiyon gösterir. NR3A ve NR3B olarak iki tiptir. Ca^{+2} permeabilitesi yavaş ve uzun sürer. NR3A; Serebellum hariç korteks, hipokampus (CA1), ortabeyin, arkabeyin ve spinal kordda eksprese edilir. Neonatal ekspresyonları çok güçlüdür, sonra azalmaya başlamaktadır (71,72).

2.5.3. NMDA Reseptörünün Yapısı

Şu anda genellikle hemfikir olunan nokta; NMDA reseptörlerinin NR1 alt birimleri ve beraberinde NR2 alt birimlerinin en azından bir tipinden oluşan heteromerik yapılar olduğu şeklindedir. NR2 alt birimlerinden gelen domainler glisin bağlanma bölgesini oluşturmaktadır. Membrana doğru dizilmiş her glutamat reseptör alt birimi, farklı yaklaşımların bir bileşkesinden ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmalar kaçınılmaz bir kanıt ortaya koymuştur: NMDA reseptör, AMPA reseptör ve kainat reseptör alt birimleri 3 adet membrana uzanan domain içermektedir (M1, M3 ve M4). M2 domaini membrana sitoplazmik kenardan daldırılmış şekilde bir büküm oluşturmaktadır. Her NMDA reseptör alt birimi geniş bir ekstrasellüler N-terminal domaini ve intrasellüler C- terminali içermektedir (71,72,77).

NMDA reseptör poru Ca^{+2} 'a yüksek derecede geçirgenlik sağlar ve Mg^{+2} ile bloke olur. NMDA reseptör, voltaja bağımlı tek iyonotropik reseptördür. Normal miktarlarda Ca^{+2} bazı bellek tiplerinin oluşmasında gerekli sinyal yollarını tetiklemektedir. NMDA reseptörlerinin aktivitesi, Mg^{+2} ile voltaja hassas blokajı ve Ca^{+2} 'a geçirgenliği, pora uzanmış olan M2 segmentindeki aminoasit kalıntılarına dayanmaktadır. Katyon seçiciliği, M2 segmentinin kritik bir alanına (N alanı) dayanmakta, bu alan NR1 ve NR2 alt birimlerinde bulunan bir asparajin kalıntısı tarafından oluşturulmaktadır. NR2 alt birimi, membranın ekstrasellüler yüzünden

gelen Mg^{+2} iyonları için temel bağlanma bölgesini içermektedir. Yani Mg^{+2} blokları M2'deki kritik asparajin kalıntıları veya onlara çok yakın olan aminoasit kalıntılarının etkileşimine dayanmaktadır. Bu bağlanma bölgesi; N bölgesi, yüksek Ca^{+2} geçirgenliği için kritiktir. NR1 kalıntıları, kanalın dış vestibülünü oluşturmaktadır. Bu vestibül M3 (C-terminal ucunda) ve M4 (N-terminal ucunda) segmentlerinin M1'den önce gelen parçaları tarafından oluşturulmuştur (70-72,77).

3. MATERYAL ve METOT

Çalışmamız, Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 3458-TU2-13 proje numarası ile desteklenmiş ve SDÜ Tıp Fakültesi Hayvan Üretimi ve Deneysel Araştırma Merkezi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı ve Nörodavranışsal Testler Laboratuvar'ında gerçekleştirilmiştir. Deney hayvanlarının bilimsel amaçla kullanılabilmesi için SDÜ Tıp Fakültesi Hayvan Etik Kurulundan 22.01.2013 tarih ve 03 sayılı kararı ile onay alınarak etik kurallarına uygun bir şekilde yapılmıştır.

3.1. Materyal

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada 16-20 aylık, toplam 25 adet erkek Wistar Albino cinsi sıçan kullanılmıştır. Tüm sıçanlar standart ışık (12 saat aydınlık /12 saat karanlık) ve ısı (23⁰C) koşullarında, her kafeste 4 ya da 5 hayvan olacak şekilde, standart pellet yemlerine ve suya serbestçe erişebilecekleri ortamda yaşatılmıştır.

Sıçanlar deney grubu (DG, n:11), koşu bandı kontrol grubu (KG, n:8) ve kafes kontrol grubu (KKG, n:6) olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır.

Hayvanlar uyanık oldukları periyotta düzenli egzersize tabi tutulacakları için uyku-uyanıklık döngülerini değiştirmek amacıyla laboratuvarda bir hafta öncesinden adaptasyona alınmıştır. Bu adaptasyondan sonra egzersiz programı 08:00-18:00 saatleri arası yaptırılmıştır.

Sıçanlar, egzersiz programı bitiminden 24 saat sonra su labirentinde hipokampüse dayalı mekansal hafıza eğitime tabi tutulmuşlardır. Beş günlük test prosedürü sonunda intraperitoneal olarak uygulanan % 10'luk ketamin (Alfamin, Alfasan IBV.) - % 2'lik ksilazin (Alfazin, Alfasan IBV.) anestezisi altında dekapite edilerek deney sonlandırılmıştır. Sıçanlar dekapite edildikten sonra beyin dokuları alınmıştır. Soğuk fosfat tamponuyla ıslatılmış filtre kağıtları buz paketleri üzerine konarak hipokampus çıkartma düzeneği oluşturulmuştur. Dekapitasyondan hemen sonra bu düzeneğin üzerinde hipokampuslar çıkarılarak önceden hazırlanmış 50 mM

fosfat tamponu içeren ependorf tüplere konulmuş ve analizin yapılacağı tarihe kadar -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.1.2. Egzersiz Programı

Çalışmada Ankara Üniversitesi Elektrik ve Elektronik Mühendisliği tarafından üretilen dört kulvarlı küçük deney hayvanı koşu bandı (RT 03, Ankara, Türkiye) kullanıldı. Koşu bandı, 1 m/dk aralıklarla ayarlanabilir hız göstergesine, devamlı ya da istenildiğinde kullanılabilen elektrik şoku anahtarına (160 Volt DC, 1mA akım limitli) ve -30 ile +30 derece açılabilirme sağlayabilen bir mekanizmaya sahipti. Sıçanların 19 tanesine küçük hayvan koşu bandında 5 gün süreyle günde 3 dk ve cihazın en düşük hızı olan 10 m/dk’dan başlayarak alıştırmaya egzersizi yaptırıldı. Bu egzersizlerin hız ve süresi tedricen artırıldı. Alıştırma egzersizleri sırasında koşmaya gönüllü olmayanlar koşu bandı kontrol grubu (KG, n:8) diğer hayvanlar deney grubu (DG, n:11) olacak şekilde gruplara ayrıldı. Alıştırma haftasında ayrıca deney grubu için koşabilecekleri ortalama bir hız (15 m/dk) ve süre (30 dk.) belirlendi. Hayvanlar çabuk yoruldukları için egzersizin iki oturuma bölünerek yaptırılmasına karar verildi. Alıştırma periyodunun sonunda deney programına geçildi. Deney grubuna alınan 11 sıçana 8 hafta boyunca haftada 5 gün 10 m/dk hızdan başlayıp 15 m/dk hıza 3 dakikada ulaşacak şekilde her biri 15’er dakika süreyle iki oturumda toplam 30 dk. egzersiz yaptırıldı. Egzersizler arasında 30 dk. dinlenme süresi tanındı. Koşu bandı kontrol grubu (n:8) aynı günlerde ve aynı sürelerde çalışmayan koşu bandında elektrik şoku açık olacak şekilde tutuldu. Altı adet hayvan kafes kontrol grubu olarak aynı şartlarda ancak koşu bandına hiç konulmayarak kafeslerinde barındırıldı. Bu gruba sadece kafes temizliği sırasında dokunuldu. Sıçanlara egzersiz her gün aynı sıra ile ve aynı saatlerde yaptırıldı. Egzersiz sırasında sıçanlar sürekli olarak gözlendi. Bazı ufak kuyruk yaralanmaları dışında ciddi bir yaralanma olmadı.

3.1.3. Kullanılan Malzemeler ve Aletler

1- Küçük hayvanlar için koşu bandı (RT 03 Rat Treadmill): Ankara Üniversitesi Elektrik-Elektronik Mühendisliği (Ankara, Türkiye)

1- Soğutmalı santrifüj: Eppendorf MR5415 (Almanya)

- 2- Santrifüj: Jouan B4İ (Fransa)
- 3- Derin dondurucu: Uğur (Türkiye)
- 4- Hassas terazi: Scaltec SPB 33 (İsviçre)
- 5- Vorteks: Nüve NM 100 (Türkiye)
- 6- Otomatik pipetler: Eppendorf (Almanya), Gilson (Fransa)
- 7- pH metre: Hanna Instruments (Portekiz)
- 8- Manyetik karıştırıcı: Nüve (Türkiye)
- 9- Elektroforez cihazı: EC Apparatus Corporation 250-90 (ABD)
- 10- Biyokimya analizörü: Beckman Coulter AU5800 (Japonya)
- 11- Kodak Image Station 2000 MM (ABD)
- 12- Cam-Teflon homojenizatör

3.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler

SDS-PAGE ve Western Blot İçin Kullanılanlar:

1. Akrilamid: bisakrilamid % 30 T, % 2,6 C; Sigma (Almanya)
2. Tris, Merck (Almanya)
3. Glisin, Merck (Almanya)
4. SDS, Merck (Almanya)
5. APS, Merck (Almanya)
6. TEMED, Merck (Almanya)
7. 2-Merkaptoetanol, Merck (Almanya)
8. Brom Fenol Blue, Merck (Almanya)
9. Sodyum Klorür, Merck (Almanya)
10. Tween 20, Merck (Almanya)
11. Bovin Serum Albumin, Merck (Almanya)
12. EDTA, Merck (Almanya)

13. EGTA, Merck (Almanya)
14. Leupeptin, Sigma (Almanya)
15. Aprotinin, Sigma (Almanya)
16. Benzamidin, Sigma (Almanya)
17. Triton X-100, Sigma (Almanya)
18. Immobilon-P, Sigma (Almanya)
19. Kromotografi filtre kağıdı, Whatman (İngiltere)
20. Metanol, Merck (Almanya)
21. Hidroklorik Asit, Merck (Almanya)
22. Anti NR2A, Sigma (ABD)
23. Anti NR2B, Sigma (ABD)
24. Anti NR1, Sigma (ABD)
25. Monoklonal anti-rabbit IgG, Sigma (ABD)
26. BCIP/NBT Phosphatase Substrate, Sigma (ABD)
27. Prestained Molecular Weight Marker, Sigma (ABD)

3.1.5. Kullanılan Çözeltiler

SDS-PAGE ve Western-Blot İçin Kullanılanlar:

1- 4 x Çözücü Tampon: 1,5 M Tris HCl, pH: 8,8

36,3 g Tris 170 ml'ye distile su ile tamamlanıp pH: 8,8'e ayarlanır. Soğutulup pH tekrar 8,8'e ayarlanır. 200 ml'ye distile suyla tamamlanır.

2- 4 x Paketleyici Tampon: 0,5 M Tris HCl, pH: 6,8

12,1 g Tris, 170 ml'ye distile su ile tamamlanıp pH: 6,8'e ayarlanır. Soğutulup pH yeniden 6,8'e ayarlanır. 200 ml'ye distile suyla tamamlanır.

3- Çözücü jel: (% 7,5'luk)

Distile su	4450 µl
Acril : bisacril % 30 T, % 2,6 C	2500 µl
4 × çözücü tampon (tris HCl, pH: 8,8)	2500 µl
% 10 SDS	100 µl
% 10 APS	450 µl
TEMED	10 µl

4- Paketleyici jel: (% 4'lük)

Distile su	3050 µl
Acril : bisacril % 30 T, % 2,6 C	650 µl
4 × paketleyici tampon (tris-HCl, pH: 6,8)	1250 µl
% 10 SDS	50 µl
% 10 APS	50 µl
TEMED	5 µl

5- Homojenizasyon Tamponu: pH: 7,5 50 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA, 25 µg/ml Leupeptin, 25 µg/ml Aprotinin, 10 µM benzamidin ve % 1'lik Triton X-100 bulunacak şekilde total hacim 30 ml'ye tamamlandı.

6- Numune Tamponu:

Paketleyici tampon (0,5 M Tris-HCl, Ph: 6,8)	2,0 ml
Gliserol	1,6 ml
% 10 SDS	3,2 ml
2-Merkaptoetanol	0,8 ml
% 0,1(w/v) Brom fenol blue	0,4 ml

7- Yürütücü Tampon: 15 gr Tris, 72 gr Glisin, 5 gr SDS, pH: 8,3'e ayarlanıp distile su ile 1 litreye tamamlanır. 5 kat sulandırılarak kullanılır.

8- Transfer Tamponu: 0,606 gr Tris, 2,882 gr Glisin ve 1 ml % 10 SDS, distile su ile 160 ml'ye pH: 8,2-8,4 olacak şekilde tamamlanır. 40 ml metanol eklenir.

9- TTBS (Tris-Tween-Buffer Saline): 18,15 gr Tris, 26,25 gr NaCl, 3 ml Tween 20 (yoğun bir madde olduğu için pipetle yavaşça çekilir) pH: 7,5 olarak ayarlanıp 3 litreye distile suyla tamamlanır.

10- Primer antikorlar: NR2A 1/4000, NR2B 1/3000, NR1 1/2000 oranında, taze % 1 BSA-TTBS ile dilüe edilerek hazırlandı.

11- Sekonder antikor: Antirabbit IgG (Alkalen fosfataz konjuge) 1:10000 oranında, taze % 1 BSA-TTBS ile dilüe edilerek hazırlandı.

3.2. Metot

3.2.1. Morris Su Labirenti (Morris Water Maze)

Kognitif (bilişsel, kavramsal) fonksiyonun ölçütü olarak kullanılır ve hipokampusu bağımlı mekansal hafızayı değerlendiren bir düzendir. Morris su labirenti 150 cm çapında, 80 cm yüksekliğinde, iç yüzeyi beyaza boyanmış, galvanik metalden yapılmış, dairesel bir havuzdur. Deney mekanı, güneş ışığı almayan bir odadır ve su labirentini çevreleyen, ışığı duvara yansıtan dört adet halojen lamba ile aydınlatılmıştır. Labirentin çevresinde çeşitli görsel ipuçları (tablo, sandalye, masa) sabit tutulmaktadır. Havuzdaki suyun sıcaklığı $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlanır ve deney süresince hergün ölçülür. Su, toksik olmayan koyu sarı boya ilave edilmesiyle opaklaştırılmıştır. Bu düzende, su seviyesinin 2 cm altında kalacak şekilde gizli bir platform yerleştirilmiştir. Sıçan labirente konulduğunda görevi saklı platformu bulmaktır.

Her deney, su labirentindeki tüm egzersizler boyunca zamanı ve izlenen yolu kaydeden bir bilgisayarla bağlantılı olan havuzun üzerine yerleştirilmiş bir kamera ile kaydedilmiştir. Çalışmamızda Smart Versiyon 2.5 programı kullanılmıştır (Smart Video-Tracking, Panlab, Barcelona, İspanya). Bu program yardımıyla labirent zon 1, 2, 3 ve 4 olarak adlandırılmış dört eşit büyüklükteki sanal kadrana bölünmüştür. Hedef kadrana 4. kadrana olarak belirlenmiş ve tüm egzersizlerde platform 4. kadranda sabit tutulmuştur. Deneyin ilk günü sıçanlar tüm kadrarlardan birer kere bırakılmış, 2.-5. günlerde hedef kadrana dışındaki kadrarlardan yüzü labirentin duvarına dönmüş şekilde havuza bırakılmışlardır. Günlük eğitimler 4 rastgele başlangıç pozisyonundan

(zon1, 2, 3 ve 4) sıçanların suya bırakıldıkları 4 egzersizden oluşmuş ve platforma erişme süreleri kaydedilmiştir. Bu uygulamaya 5 ardışık gün devam edilmiştir. Morris'in protokolü ile mekansal ipuçlarını ve yönsel stratejileri kullanarak platformun yerini öğrenme egzersizi 1-5. günlerde yapılmıştır (80). Sonra 6. günde mekansal hafıza ölçümü için 'Probe Trial' adı verilen test yapılmıştır. Testin ilk gününde sıçanlara yüzmeleri için 60 sn'lik bir süre tanınmıştır. Eğer bir sıçan saklı platformu 60 sn'de bulamazsa hedef platforma yönlendirilmiş, platformu tanınması ve platformun sudan kurtuluş anlamına geldiğini anlaması için platformda 30 sn bekletilmiştir. İlk gün saklı platformu bulma süresi 60 sn'de gerçekleşememiş ise 70 sn olarak kaydedilmiştir. Deneyin 2-5. günlerinde bir sıçan 60 sn'de platformu bulamaz ise araştırmacı tarafından platforma yönlendirilmiştir ancak bu kez platformda 15 sn kalmalarına izin verildikten sonra araştırmacı tarafından kafesine geri konulmuştur. Her sıçan için egzersizler arasında en az 20 dk'lık aralar olmasına dikkat edilerek, her gün 4 egzersiz yaptırılmıştır. Egzersizlerden sonra sıçanlar kafeslerine geri bırakılmadan önce bir havlu ve 40-W beyaz ampul (OSRAM) altında tutularak kurutulmuşlardır. Beşinci günün sonunda her sıçan toplamda 20 kez öğrenim egzersizi yapmış ve eğitim dönemini tamamlamıştır.

'Probe trial' adı verilen test 6. günde saklı platform kaldırılarak, sıçanlar saklı platformu içermeyen diğer 3 kadrandan bırakılmış ve daha önceden saklı platformun olduğu hedef kadranda geçirdikleri süre kaydedilmiştir. Bu süre mekansal hafızanın ölçütü olarak kaydedilmiştir.

Sıçanlara 7. günde bu deneyin ipucu içeren versiyonu 'Visible (görünür) Platform' prosedürü uygulanmıştır. Bu versiyon kullandığımız boyaların, görme üzerine negatif etkileri, motivasyonu azaltıcı etkileri, artmış anksiyete gibi etkileri olup olmadığını değerlendirmek amacıyla kullanılmıştır. Her deneyde görünür platform farklı kadrana taşınarak (4. kadrana hariç) sıçanlar 4. (hedef) kadrandan bırakılmıştır. Görünür platformu bulma süreleri kaydedilmiştir (80).

3.2.2. Hipokampus Örneklerinin Homojenizasyonu

Aynı gruptaki farklı sıçanlara ait hipokampus örnekleri tartılıp yeterli protein konsantrasyonunu sağlamak amacıyla 2-3 hipokampus 1 örnek oluşturacak şekilde

birleştirilmiş ve ardından 1/5 oranında homojenizasyon tamponu ile karıştırılarak homojenize edilmiştir. İlk adımda buz üzerinde teflon-cam homojenizatör ile 18-20 darbede homojenizasyon yapılmış ardından 1 dk sonikasyon (Bandenus sonicapuls, Almanya) işlemi ile homojenizasyon tamamlanmıştır. Homojenize edilen örnekler 10000 g'de +4 °C'de 10 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Süpernatantlarında Beckman Coulter AU5800 (Japonya) cihazına uyumlu ticari kit kullanılarak spektrofotometrik yöntem ile protein ölçümü yapılmıştır. Son olarak süpernatantları yedeklenerek çalışılncaya kadar -20 °C'ye kaldırılmıştır.

3.2.3. SDS-PAGE Yöntemi

Laemmli'nin yöntemi esas alınarak çalışılmıştır (81). % 7,5'lik çözücü jel ve % 4'lük paketleyici jel hazırlandı. Kuyucuk başına son konsantrasyonu 50 µgr protein olacak şekilde protein konsantrasyonu ölçülen numunelerden ekilmesi gereken hacim hesaplandı. Doku homojenatı numune tamponu ile 1/1 oranında karıştırılarak jele ekim yapılmıştır.

3.2.4. Western Blot Yöntemi

SDS-PAGE prosedürü ile örneklerle elektroforez uygulanarak protein bantları elde edildi. Daha sonra polyvinylidene difluorid (PVDF) membrana (immobilon-P) transfer edilmek üzere transfer tankına alındı. Transfer prosedürü sonrası ayrı ayrı anti NR2A, anti NR2B, anti NR1 içeren solüsyonlarda bir gece boyunca bekletildi. Daha sonra sekonder antikorla 1 saat süre ile inkübe edilen membranlar, taze hazırlanan BCIP/NBT solüsyonunda yeterli boyanma sağlanana kadar bekletildi. Oluşan bantlar Kodak Image Station 2000MM (ABD) cihazı kullanılarak tarandı. Elde edilen bant yoğunlukları her bir reseptör alt birimi için gruplar arasında karşılaştırıldı (82).

4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analiz SPSS 15 programı ile yapılmıştır. Tüm veriler öncelikle Levene homojenite testi ile değerlendirilmiştir. Morris Su Labirenti verilerinin homojen dağılmadığı saptandıktan sonra su labirenti verilerinden ilk 4 günlük öğrenme periyodu her grup kendi içinde 1.-4. günler arası değişim Friedman ve Wilcoxon Signed Ranks Testleri ile, ayrıca tüm günlerde gruplar arasında fark olup olmadığı ise Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney testleri ile değerlendirilmiştir. Probe test ve görünür platform testi verilerinde gruplar arası fark olup olmadığı homojen dağılıma uyduğu için Tek Yönlü Varyans Analizi ile değerlendirilmiştir.

Reseptör yoğunluklarının Levene Homojenite testi ile homojen dağılmadığı saptanmıştır. Reseptörlerin herbirinin yoğunluğu açısından da gruplar Kruskal-Wallis ve ardından Mann-Whitney testi ile değerlendirilmiştir.

5. BULGULAR

5.1. Morris Su Labirenti Verileri

5.1.1. Hedef Platformu Bulma Süresi

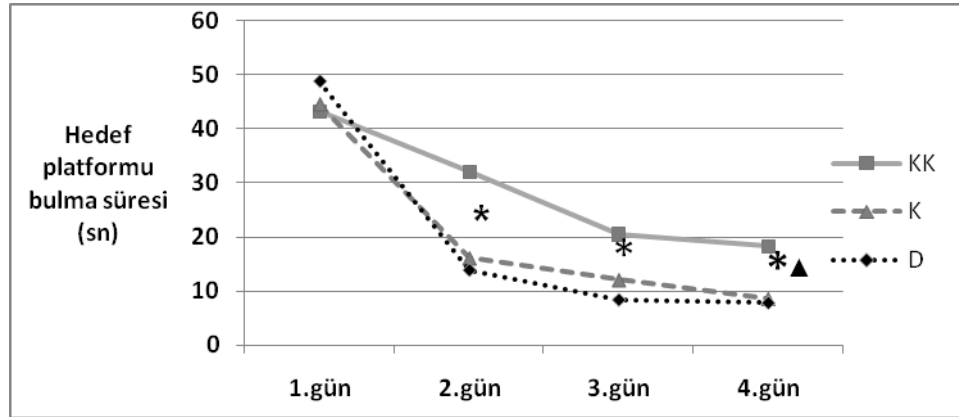
Grupların günden güne su labirentinde öğrenme durumunun değerlendirilmesi Friedmann testi ile yapılmıştır. Her üç grubun da kendi içinde günler arasında anlamlılık saptanmıştır. D, K ve KK gruplarının istatistiksel anlamlılığı sırasıyla $p < 0.0001$, $p = 0.001$, $p = 0.035$, olarak saptanmıştır. Ardından anlamlılığın hangi günden itibaren başladığını değerlendirmek amacıyla Wilcoxon Signed Ranks Test ile günlerin ikili karşılaştırmaları yapılmıştır; Deney grubunda 2. günden itibaren anlamlılık saptanmış, 1-2. ($p = 0,005$), 1-3. ($p = 0,005$), 1-4. ($p = 0,005$) ve 2-4. ($p = 0,007$) günler arasında anlamlı fark saptanırken, kontrol ve kafes kontrol gruplarında günler arasında anlamlı fark saptanmamıştır.

Bu veriler tüm grupların egzersiz sonunda sistemi öğrendiğini göstermektedir. Ancak kafes kontrol ve kontrol gruplarının günler arası gelişmeleri açısından bu anlamlılığı taşımadığı saptanmıştır. Tüm gruplarda platformu bulma süreleri açısından sürelerin kısaldığı ancak en kısa süreyi deney grubunun sağladığı gözlenmiştir. En kötü performans ise kafes kontrol grubuna aittir. Tüm grupların hedef platformu bulma süreleri Tablo 1 ve Grafik 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Morris su labirentinde, eğitim dönemi, hedef platformu bulma süreleri (sn)

Grup	1.gün	2.gün	3.gün	4.gün	p
KK	43,21±7,14	32,15±7,69	20,57±4,64	18,39±6,12	0,035
K	44,58±4,87	16,11±1,77	12,08±2,86	8,59±2,07	0,001
D	48,79±3,99	13,96±1,70 *	8,47±0,94 *	7,92±1,12 *▲	<0,0001

*: 1. gün ile, ▲: 2. gün ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir ($p < 0,01$). İstatistiksel değerlendirme Friedmann testi ile yapılmış, ardından Wilcoxon Signed Ranks Test uygulanmıştır. Değerler ortalama±standart hataolarak verilmiştir. (KK: Kafes Kontrol, K: Kontrol, D: Deney)

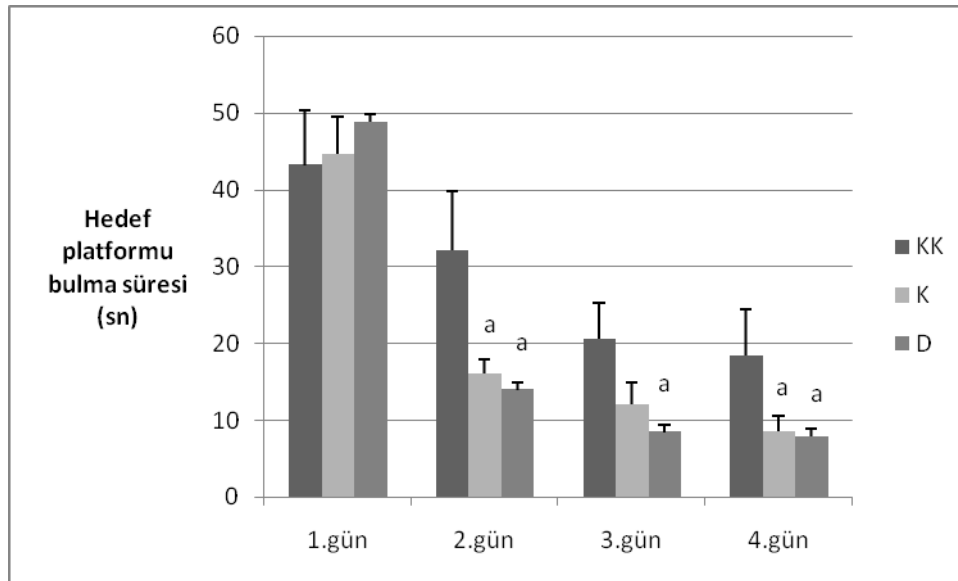


Grafik 1. Morris su labirentinde, eğitim döneminde, hedef platformu bulma sürelerinin (sn) grup içi değerlendirmesi

*: Deney grubunda 1. gün ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir ($p < 0,01$). ▲: Deney grubunda 2. gün ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir ($p < 0,01$). İstatistiksel değerlendirme Friedmann testi ile yapılmış, ardından Wilcoxon Signed Ranks Test uygulanmıştır. Değerler ortalama±Standart hata olarak verilmiştir. (KK: Kafes Kontrol, K: Kontrol, D: Deney)

Hedef platformu bulma sürelerinin gruplar arasında karşılaştırılması için öncelikle verilerin homojen dağılıp dağılmadığına Levene Homojenite testi ile bakılmıştır. Dağılım homojen olmadığı için nonparametrik Kruskal-Wallis testi ile gruplar arası karşılaştırmalar yapılmış ve ardından anlamlılığın hangi gruptan kaynaklandığını değerlendirmek için Mann-Whitney testi yapılmış ve $p < 0,01$ anlamlı kabul edilmiştir.

Birinci gün verilerinde gruplar arasında anlamlı fark yoktur ($p=0,720$). İkinci günde KK ile hem K ($p=0,015$) hem D ($p=0,007$) grupları arasında, üçüncü günde KK ile D ($p=0,011$) grubu arasında, dördüncü günde KK ile hem K ($p=0,026$) hem D ($p=0,022$) grupları arasında anlamlı fark saptanmıştır. K ve D gruplarının hedef platformu bulma süreleri KK grubuna göre anlamlı düzeyde kısadır. Bu veriler hedef platformu bulma amacı ve süresi açısından K ve D gruplarının KK grubuna göre daha erken öğrenmeye başladığını ve başarılı olduğunu göstermektedir (Grafik 2).



Grafik 2. Morris su labirentinde, eğitim döneminde, grupların hedef platformu bulma sürelerinin karşılaştırılması (Gruplar arası değerlendirme)

‘a’ : 2, 3 ve 4. günlerde KK grubu ile karşılaştırıldığında K ve D grupları ile KK grubu arasındaki istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir ($p < 0,05$). İstatistiksel değerlendirme Kruskal-Wallis testi ve ardından Mann-Whitney testi ile yapılmıştır. Değerler ortalama±standart hata olarak verilmiştir. (KK: Kafes Kontrol, K: Kontrol, D: Deney)

5.1.2. Probe Test

Probe test verilerinin Levene homojenite testiyle homojen olup olmadığı değerlendirilmiş, ardından veriler homojen olduğu için Tek Yönlü Varyans Analizi ile gruplar arası fark olup olmadığı değerlendirilmiştir.

Hedef kadranda geçirilen ortalama süre açısından gruplar arasında istatistiksel olarak fark saptanmamıştır ($p=0,619$) (Tablo 2). Ortalama hızları ($p=0,013$) ve katettikleri ortalama yol ($p=0,013$) açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (Tablo 2). K ve D gruplarına göre KK grubunda ortalama hız ve katedilen ortalama yol daha azdır.

Tablo 2. Morris su labirentinde probe test verileri

Gruplar	KK	K	D
Hedef kadranda geçirilen ortalama süre (sn)	22,66±4,66	22,28±4,40	24,12±3,15
Ortalama hız (cm/sn)	18,92±2,39	22,65±3,33*	23,72±2,74*
Katedilen ortalama yol (cm)	1133,69±143,48	1357,13±199,90*	1419,41±163,78*

*: KK ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğunu göstermektedir. İstatistiksel değerlendirme Tek Yönlü Varyans Analizi ile posthoc testi LSD ile yapılmıştır. Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. KK: Kafes Kontrol, K: Kontrol, D: Deney

5.1.3. Görünür Platform Testi (Visible Platform Test)

Görünür platform protokolü için ‘görünür platformu bulma süresi’, ‘ortalama hız’ ve ‘katedilen yol’ verileri esas alınmıştır. Önce verilerin homojen dağılımını değerlendirmek için Levene homojenite testi yapılmış ve ardından verilerin gruplar arası karşılaştırılması için yine Tek Yönlü Varyans Analizi ile değerlendirme yapılmıştır. Platformu bulma süresi ($p=0,301$), ortalama hız ($p=0,053$) ve katedilen yol ($p=0,356$) açısından gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır (Tablo 3)

Tablo 3. Tüm grupların görünür platform testi verilerinin karşılaştırılması

Gruplar	KK	K	D
Görünür platformu bulma süresi ort. (sn)	13,23±5,31	13,93±4,36	12,77±5,88
ortalama hız (cm/sn)	19,11±4,12	22,98±4,66	24,11±2,82
ortalama katedilen mesafe (cm)	227,93±60,57	317,67±149,02	315,24±210,21

İstatistiksel değerlendirme Tek Yönlü Varyans Analizi ile yapılmıştır. Değerler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. KK: Kafes Kontrol, K: Kontrol, D: Deney

5.2. NMDA NR2A, NR2B, NR1 Reseptör Ekspresyon Düzeyleri

Reseptör konsantrasyonları değerlendirilirken tüm grupların ilgili reseptör bantlarından membran background verileri çıkarılmıştır. KK grubunun herbir reseptör için optik dansite verilerinin ortalaması alınmış ve bu veri 100 kabul edilmiştir. K ve D grubu optik dansiteleri KK verisi (100) ile oranlanarak hesaplanmıştır.

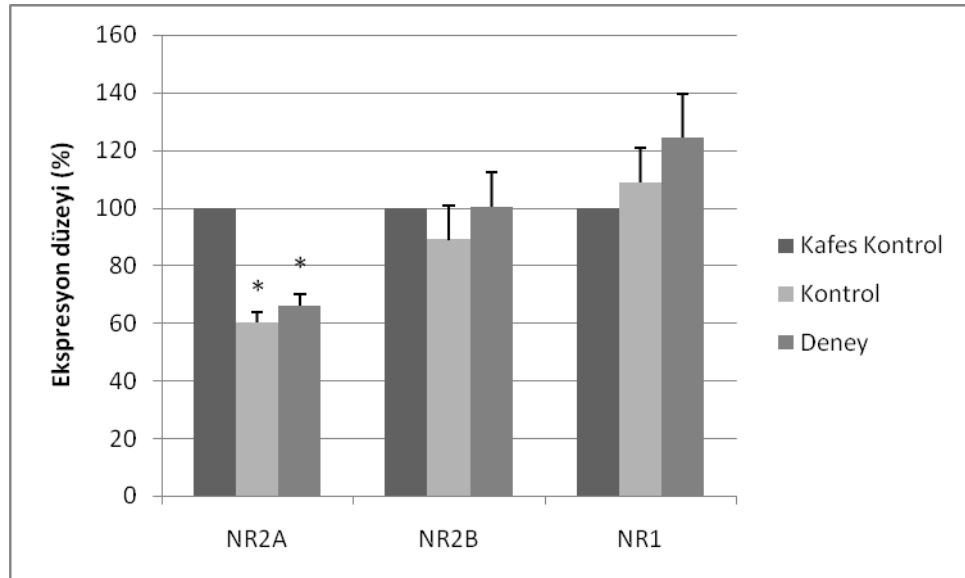
Tablo 4’te tüm grupların herbir reseptörler için optik dansiteleri toplu olarak verilmiştir. Şekil 1’de her reseptörün western blot görüntü örnekleri, grafik 3’te ise reseptörlerin optik dansitelerinin karşılaştırması yapılmıştır.

Tablo 4. Western Blot analizi ile NR2A, NR2B, NR1 reseptörlerinin optik dansiteleri

Grup	NR2A	NR2B	NR1
Kafes Kontrol	100±0	100±0	100±0
Kontrol	60,28±3,62*	88,94±11,67	108,77±12,14
Deney	65,91±4,01*	100,48±12,07	124,44±14,98

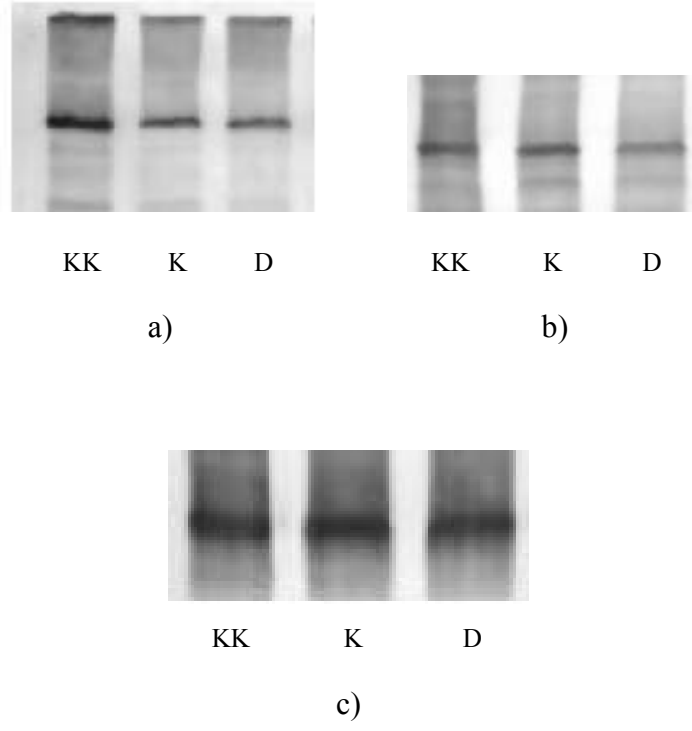
*: Kafes kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılığı göstermektedir ($p<0,01$) İstatistiksel değerlendirme Kruskall Wallis testi, Mann-Whitney U testi ile yapılmış ve veriler ortalama $\pm$ standart hata şeklinde verilmiştir.

Tablo 4’te görüldüğü gibi, K ve D gruplarında NR2A reseptör konsantrasyonları KK grubuna göre sırasıyla %39,72 ($p=0,0001$) ve %34,09’lik ($p=0,0001$) bir azalma gösterirken NR2B ve NR1 reseptör konsantrasyonlarında gruplar arası karşılaştırmada anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (sırasıyla $p=0,610$; $p=0,346$).



Grafik 3. Tüm grupların NR2A, NR2B ve NR1’e ait optik dansite sonuçları

*: KK grubu ile karşılaştırıldığında K ve D gruplarında NR2A düzeyinde istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir ($p<0,01$). İstatistiksel değerlendirme Kruskall Wallis ve Mann Whitney U testi ile yapılmış, veriler ortalama $\pm$ standart hata şeklinde verilmiştir.



Şekil 1. NR2A, NR2B ve NR1'e ait Western Blot örnekleri. (KK: Kafes Kontrol, K: Kontrol, D: Deney).

6. TARTIŞMA

Çalışmamızda sedanter bir yaşamın sonunda yaşlılık döneminde başlanan uzun süreli, düzenli egzersizin Morris su labirentinde hipokampüse dayalı mekansal öğrenme ve hipokampal NMDA reseptör alt birimlerinden NR2A, NR2B ve NR1 konsantrasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır.

Çalışmamızın bulgularına göre Morris su labirentinde eğitim döneminde, tamamen sedanter olan kafes kontrol grubu ve kontrol grubu, deney grubuna göre sistemi daha geç öğrenmiştir. Deney grubu, özellikle kafes kontrol grubuna göre Morris su labirentini hem anlamlı düzeyde daha erken, hem de platformu en kısa sürede bulmayı öğrenmiştir. Ancak öğrenilenin test edildiği dolayısıyla hafızanın değerlendirildiği ‘Probe test’te gruplar arasında bir fark saptanmamıştır. Kronik egzersiz özellikle yüzme hızı, katettiği mesafe ve öğrenme hızı açısından anlamlı bir fark oluşturmuştur.

Van Praag ve ark. (45) 18 aya kadar sedanter olup sonra gönüllü egzersiz yapan yaşlı fareler ve gönüllü egzersiz yaptırılan genç farelerin yaş uyumlu kontrollerine göre daha iyi bilişsel performansa sahip olduklarını göstermiştir. Bu çalışmada kontrol grupları bizim kafes kontrolümüze benzer şekilde sedanterdir. Albeck ve ark. (46) yaşlı sıçanlarda, yaşlı sedanter kontrol grubuna göre düşük yoğunlukta (15 dk/gün, 8 m/dk hız) koşubandı egzersizinin olumlu etkisini bulmuşlardır. Bu çalışma ile sedanter yaşam tarzı üzerine küçük bir fiziksel egzersiz artışının bile bilişsel yarar sağlayabildiğini göstermişlerdir.

Radak ve ark. (83) 9 hafta yüzme egzersizi yaptırdıkları genç ve orta yaşlı sıçanlarda bilişsel fonksiyonlarda yaş ile ilişkili bir azalma olduğunu ancak egzersizin bu azalmayı düzeltebildiğini göstermişlerdir. Bizim çalışmamıza benzer şekilde, bu çalışmalardaki kontrol grupları koşubandına konulmayan sedanter hayvanlardan oluşmaktaydı. Kim ve ark (84) da 6 hafta koşubandı egzersizi yaptırdıkları yaşlı sıçanlarda egzersizin yaşlanmanın neden olduğu hafıza zayıflığını iyileştirdiğini ortaya koymuşlardır. Bu çalışmanın kontrol grubu bizim çalışmamızdaki koşubandı kontrol grubumuza benzer idi ve sedanter bir kontrol

grubu dahil edilmemişti. Çalışmamızdan farklı olarak onlar egzersiz grubunun performansını kontrol grubunun performansından daha iyi bulmuşlardır.

Sonuçlarımız literatür ile büyük oranda uyumludur ve düzenli egzersizin yaşlılık döneminde başlansa bile öğrenme üzerine olumlu etkileri olduğunu göstermektedir. Farklı yanlarımız öğrenme ve hafıza testinin farklı düzeneklerle yapılması, egzersiz süresi ve şiddetinden kaynaklanabilir.

O'Callghan ve ark. (85)'nin çalışması, deney gruplarının organizasyonu açısından bizim çalışmamız ile benzerlik göstermektedir ve orta yaşlı sıçanlara uzun süreli koşubandı egzersizi yaptırmıştır. Yaşlı egzersiz grubu genç ve yaşlı kontrollerle karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada bizim çalışmamızda olduğu gibi yaşlı koşubandı kontrol ve yaşlı sedanter kafes kontrol grupları bulunmaktadır. Yaşlı sıçanlarda Morris su labirentinde mekansal öğrenmenin gençlere göre anlamlı olarak bozuk olduğu görülmüştür. O'Callghan ve ark, yaşlı egzersiz grubunun yaşlı kafes kontrole göre su labirentinde daha iyi olduklarını göstermişlerdir. Sürpriz olarak yaşlı koşubandı kontrol grubunun su labirenti öğrenmede yaşlı egzersiz ve genç kontrol grupları ile karşılaştırıldığında eşit oranda iyi ve kafes kontrole göre anlamlı olarak daha iyi olduklarını saptamışlardır. Bizim bulgularımız, bu çalışmanın bulguları ile uyumlu idi. Koşubandı kontrol grubunun su labirentinde egzersiz grubu kadar başarılı olması bu bilişsel iyileşmede egzersizin etkinliğinin doğruluğunu sorgulatabilir. Bu durum hayvanların ek duyuşsal stimölasyon ve kafesten düzenli çıkarılmalarının yaşlı kafes kontrole göre çevresel zenginleştirmenin bir formunu oluşturduğunu düşündürmektedir. Diğer bir bakış açısından bu durum kafes kontrol için sosyal izolasyonun bir örneğı olabilir. Zenginleştirilmiş çevrenin sıçanlarda öğrenmeyi iyileştirebildiğinin artan kanıtları vardır (85,86). Kontrol grubunun, kafes kontrol grubuna göre öğrenme hızının daha iyi olması, egzersiz ve çevresel zenginleştirmenin birlikte sinerji sağlayarak olumlu sonuçlar yarattığını düşündürmektedir.

Bununla beraber yaşlı sıçanlarda bilişsel iyileşme üzerine egzersizin etkisi ile ilgili literatürde çelişkili raporlar da vardır.

Barnes ve ark. (21) egzersizin yaşlı sıçanlarda uzamsal hafızayı etkilemediğini göstermişlerdir. Hansalik ve ark (22) 5,10,18 aylık sıçanlarda farklı

durumların su labirentinde uzamsal öğrenmeye etkisini çalışmışlardır. Onuncu ve 18. ayda kısa süreli hafıza ve uzamsal öğrenmede gönüllü egzersizin olumlu etkisi olmadığını, koşubandı grubunda ise sınırda bir fark olduğunu bildirmişlerdir. Her ne kadar çalışmaların büyük çoğunluğunda egzersizin olumlu etkisi bildirilmekte ise de kullanılan egzersiz programlarında belli bir standardın olmadığı da açıktır. Farklı çalışmalarda kullanılan egzersiz programlarının çeşitliliği, egzersizin yoğunluk farkları, yaşam şartlarındaki farklılıklar ve egzersizin süresi yayınlanan sonuçlardaki farklılıklardan sorumlu olabilir.

Çalışmamızda ayrıca öğrenme ile ilişkisi bilinen NMDA reseptör alt tiplerinden NR2A, NR2B ve NR1 düzeyleri değerlendirilmiştir. Kontrol ve deney gruplarında NR2A reseptör konsantrasyonları kafes kontrol grubuna göre sırasıyla %39,72 ve %34,09'lik bir azalma gösterirken, NR2B ve NR1 reseptör konsantrasyonlarında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

Literatürü araştırdığımızda egzersizin NMDAR'ne etkisi konusunda kısıtlı sayıda çalışma olduğunu, ayrıca uzamsal öğrenme ve NMDAR düzeylerini birlikte değerlendiren bir çalışmanın ise hiç yapılmadığını gördük. Farmer ve ark. (17) yetişkin sıçanlarda, 10 günlük egzersiz sonunda, dentat girusta (DG), sinaptik plastisite ve gen ekspresyonuna on günlük gönüllü egzersizin etkisini araştırdığı çalışmalarında RT-PCR ile NR2B mRNA ekspresyonunun arttığını, NR2A ve NR1 mRNA'da farklılık olmadığını bulmuşlardır. NR2B mRNA düzeyleri DG'de artarken, hipokampusün CA1 bölgesinde değişmemiştir. Çalışmamızın NR1 verileri bu çalışma ile uyumlu ancak NR2A ve NR2B açısından farklılık göstermektedir. Egzersiz süresi ve deneyde kullanılan sıçanların yaşlarındaki farklılıklara ek olarak reseptörün çalışıldığı alan bizim çalışmamızdan ayrılan yönleridir ve farklı bulgular bu faktörlerden kaynaklanabilir. Molteni ve ark. (24) 3 aylık erkek sıçanlarda 3, 7, 28 günlük gönüllü egzersiz gruplarında plastisite ilişkili genlerin ekspresyonlarını microarray yöntemi ile incelemişlerdir. Çalışmalarında NMDAR'nin ekspresyonunun egzersiz ile bazı değişiklikler gösterdiğini bulmuşlardır. Buna göre hipokampüste NR2A ve NR2B ekspresyonu 3.gün artmıştır. Yedinci günde NR2B bazal seviyeye gelirken, NR2A'daki artış devam etmektedir. Yirmisekizinci günde ise her iki reseptör de bazal seviyeye gerilemiştir. NR1 de ise herhangi bir değişiklik olmamıştır. Molteni ve ark'nın çalışmasında, NR2A ve NR2B konsantrasyonunda

saptanan artışın zaman ilişkili olduğunu ve egzersiz süresince değişiklik gösterdiğini, akut dönemde artma eğiliminde olan reseptör konsantrasyonunun kronik uygulama sonunda bazale düştüğü görülmüştür. Biz 8 haftalık egzersiz süreci ve öğrenme deneyi sonrasında reseptörlerin konsantrasyonunu değerlendirdik. İlginç olarak tamamen sedanter gruba göre, egzersiz grubu ve kontrol grubunun her ikisinde de NR2A konsantrasyonunda anlamlı bir azalma olduğunu gözlemledik. Bahsi geçen iki çalışmadan ayrılan diğer bir yanımız, çalışmaların kısa süreli oluşu, genç sıçanlarda yapılmış olması ve gönüllü egzersiz yapılmış olmasıdır. Bu konuda az sayıda çalışma olması ve kullanılan materyal-metoddaki farklılıklar öngörülerini sınırlamaktadır. Bizim egzersiz programımız ise uzun sürelidir (8 hafta) ve biz 8 hafta sonunda NR2B ve NR1 düzeyleri değişmezken NR2A düzeylerinde belirgin azalma saptadık.

Kitamura ve ark. (25) NR2A geni eksik (knockout) 21 günlük farelerde 3 haftalık gönüllü egzersizin nörogenezis ve BDNF üzerine etkilerini ‘wild-type’ farelerle karşılaştırmışlardır. Bulgularına göre NR2A eksik farelerde eksik olmayanlarda gözlenen nörogenezis ve BDNF artışı olmamıştır. Bu çalışma sonucunda egzersizin nörogenezisi ve BDNF düzeyini artırıcı etkisine NR2A’nın aracılık ettiği ileri sürülmüştür. Biz çalışmamızda BDNF’yi değerlendirmedik ancak egzersizin NR2A aracılı nörogenezis tezi bizim çalışmamızdan ayrılan temel veridir. Ancak yine dizayn ve kullanılan sıçanların yaşı açısından bizim çalışmamızdan önemli farklılıklar göstermektedir. Kitamura ve ark, yavru sıçanlarda çalışmıştır, oysa ki yaşlılık ile ilişkili beyin nörokimyasının özellikleri tamamen farklıdır. Ayrıca egzersiz süresi ve tipi açısından farklılıklar göstermektedir. Bizim tüm değerlendirmelerimiz 8 haftanın sonunda oluşan olası değişiklikler üzerindedir.

Öğrenme ve belleğin bozulduğu yaşlı sıçanlarda, NR2B alt birimi ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı fakat NR2A alt birim ekspresyonunun değişmediği ifade edilmiştir (87). Yaşlanma sürecinde NR2B düzeyindeki azalma, bellek ile ilişkili olumsuz gidişattan sorumlu tutulmasına rağmen, diğer taraftan demans ve AH’da NMDAR antagonistleri tedavide kullanılmakta ve olumlu sonuçlar elde edilmektedir (88). NMDAR’leri, sinaptik plastisiteyi artırma açısından önemli rol oynamakta, diğer taraftan eksitotoksosite yaratması nedeni ile de olumsuz sonuçlara neden olmaktadır (89).

Egzersiz, süresi ve yoğunluğuna göre farklı etkilere de neden olabilmektedir. Egzersiz sempatik aktivasyonla epinefrin, hipotalamopitüiter aksın (HPA) aktivasyonu ile glukokortikoid salınımını artıran bir stres faktörü gibi düşünülebilir. Stres, beyin ve davranışlara stresörün yoğunluğu ve profiline bağlı olarak kompleks etkiler ortaya çıkarabilir. Kemirgenlerde yaşlanma artmış bazal glukokortikoid ve uzamış stres ilişkili glukokortikoid salınımı ile ilişkilidir. Kronik egzersiz (tekrarlayan stresör) belirli davranış ve bilişsel parametreleri etkileyen beyin hücrelerinin proliferatif kapasitesi, yapısı ve fonksiyonlarına çelişkili etkiler gösterebilir. Stresin düzeyine göre ‘dual’ bir etkiye sahip olduğu düşünülmektedir (90). Çalışmamızda kullandığımız egzersiz programımız yaşlı sıçanlar için yoğun bir program olarak kabul edilebilir. Dolayısı ile yoğun egzersiz bir stres faktörü gibi işleyerek BDNF ve NMDAR düzeyini azaltmış olabilir. Kronik egzersize bağlı aşırı stresin beyinde BDNF’yi ve buna bağlı olarak NMDAR düzeyini azaltması olasılıklardan biridir. Ancak biz BDNF düzeyini çalışmadık ve bu hipotez olarak ileri çalışmalarda ele alınabilir. Bununla beraber biz western blotting yöntemi ile NMDAR’nin miktarındaki değişiklikleri ölçmüş olduk. Aktivitesindeki değişiklikler mRNA düzeyi ile değerlendirilecek olursa daha net veriler elde edilecektir.

Morris su labirenti hipokampüse dayalı mekânsal hafızanın bir ölçüsü olarak kullanılmaktadır ve direk NMDAR’leri ile ilişkili olduğu söylenemez. Çalışmamızda kronik, yoğun egzersiz özellikle lokomotor aktivitede (yüzme hızı, katettiği yol) ve öğrenme hızı açısından olumlu sonuçlar yaratmıştır. Öğrenmenin test edildiği bellek testinde bir fark yaratmamıştır. Reseptör düzeylerinde NR2B ve NR1’de de anlamlı bir değişikliğe sebep olmamış ancak NR2A düzeyi deney ve kontrol grubunda anlamlı düzeyde azalmıştır. Kontrol grubunda da aynı sonucun elde edilmesi bize bu sonucun egzersizden bağımsız olarak sosyalleşme ve disiplinize yaşam tarzı sonucu NR2A reseptör düzeyinde değişiklikler olabileceğini düşündürmüştür.

Günümüzde yaşlı popülasyonun artışı ile yaşlanma ile ilişkili özgün değişiklikler ve ilişkili yolların aydınlatılması ve olumlu sonuçlar yaratacak çeşitli ilaçlar, besin öğeleri ve yaşam tarzı değişiklikleri önem kazanmıştır. Çalışmamızın bu bağlamda literatüre katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Sonuç olarak yaşıllık döneminde başlanan düzenli egzersizin öğrenme hızı üzerine literatürle uyumlu olarak olumlu etkisi olduğunu gözlemledik. Öğrenme hızındaki bu olumlu sonuç, NMDAR'leri ile ilişkili gibi görünmemektedir. Kronik egzersiz sonucu bu reseptörlerin düzeylerinde anlamlı bir değişiklik ve kavrama fonksiyonları üzerine etki gözlenmemiştir.

ÖZET

Yaşlı Sıçanlarda Uzun Süreli Düzenli Egzersizin Öğrenme ve İlişkili Nmda Reseptörlerine Etkisinin Araştırılması

Yaşlanmanın en iyi bilinen etkilerinden biri bilişsel fonksiyonlarda bozulmadır. Egzersiz bilişsel azalmanın önlenmesinde önemli bir yaşam şekli olarak tartışılmaktadır. Çalışmalardan elde edilen kanıtlar, egzersizin öğrenme gibi bilişsel fonksiyonlar üzerine olumlu bir etkiye sahip olduğunu düşündürmüştür. Egzersizin bu olumlu etkilerinin altta yatan mekanizmaları açık değildir. Biz bu çalışmada yaşlılık döneminde başlayan uzun süreli düzenli egzersizin öğrenme, bellek ve NMDAR subtiplerinden NR1, NR2A ve NR2B konsantrasyonları üzerine etkisinin araştırılmasını amaçladık.

Bu çalışmada orta yaş ve yaşlı (16-20 aylık) toplam 25 adet erkek Wistar Albino cinsi sıçan kullanılmıştır. Gruplar deney, kontrol ve kafes kontrol (DG n=11, KG, n=8, KKG, n=6) grubu olarak oluşturuldu. DG'na, 8 hafta boyunca haftada 5 gün 15 m/dk hızda 30 dk. egzersiz yaptırıldı. KG aynı günlerde, aynı sürelerde çalışmayan koşu bandında tutuldu. KK grubu, aynı şartlarda ancak koşu bandına hiç konulmayarak kafeslerinde barındırıldı. Sıçanlar, egzersiz programı bitiminden 24 saat sonra su labirentinde hipokampüse dayalı mekansal hafıza eğitimi ve testine (7 gün) tabi tutulmuşlardır. Daha sonra dekapitasyonla deney sonlandırıldı. Sıçanların hipokampusleri çıkarılıp ve homojenatları hazırlanarak öğrenme ile ilişkili NMDAR alttiplerinden NR2A, NR2B ve NR1 düzeyleri Western Blotting yöntemi ile belirlenmiştir.

Tüm gruplar Morris Su Labirentini öğrenmiş ($p<0,05$), ancak öğrenme hızı açısından deney grubu fark yaratmıştır ve 2. günden itibaren sistemi öğrenerek en iyi performansı göstermiştir. Bellek testinde gruplar arasında fark saptanmamıştır ($p>0,05$). KG ve DG grubu NR2A reseptör konsantrasyonları KKG'a göre sırasıyla %39,72 ve %34,09'lik bir azalma gösterirken NR2B ve NR1 reseptör konsantrasyonlarında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

Yaşlılık döneminde başlanan düzenli egzersizin öğrenme üzerine olumlu etkisi olduğunu ve bu olumlu etkide çevresel zenginleşmenin de katkısı olduğunu düşünmekteyiz. Öğrenmedeki bu iyileşme ile NMDAR'leri arasında bir ilişki kurmak bu veriler ile mümkün değildir. NR2A düzeyindeki değişiklik egzersizden bağımsız olarak düzenli, disiplinli yaşam tarzından kaynaklanıyor gibi görünmektedir.

Anahtar Sözcükler: Kronik egzersiz, Mekansal Öğrenme, NMDA reseptörleri.

ABSTRACT

The Research on Effects of Long-Term Regular Exercise on Learning and Related NMDA Receptors in Aged Rats

One of the most prominent effects of aging is cognitive decline. The exercise has emerged as an important way of life in the prevention of cognitive decline. Evidence from studies raises the idea that exercise has a beneficial effect on cognitive functions such as learning. The mechanisms underlying the beneficial effects of exercise have been investigated. In this study, our aim is to investigate the effect of long-term regular exercise started during old age on learning, memory and NMDAR subtypes NR1, NR2A and NR2B concentration.

In this study, a total of 25 male Wistar Albino rats which are middle-aged and aged (16-20 months old) were used. 11 rats allocated to experimental group (EG) have exercised 5 days a week for 8 weeks, 15 m / min speed for 30 min. The treadmill control group (CG, n = 8) was kept on the treadmill which was not running for the same days and at the same times. Cage control group (CCG, n = 6) was kept in cages under the same conditions but without taking on the treadmill. The rats were subjected to the water maze based hippocampus spatial memory training 24 hours after the completion of exercise program. Then, the experiment was terminated with decapitation. Hippocampus of rats were removed and the resulting homogenate related to learning NMDAR subtypes NR2A, NR2B, and NR1 levels were determined by Western Blotting.

In our study, at the water maze test measuring learning and memory, while the CCG group failed ($p > 0.05$), CG and EG groups has learned the test at an equal rate ($p < 0.05$). Whereas NR2A receptor concentrations in the CG and EG indicate a respective reduction of 39,72 % and 34.09% in comparison with the CCG, no significant difference could be detected in NR1 and NR2B receptor concentrations.

We have observed than regular exercise begun during old age has positive effects on learning. Besides, we are in the opinion that peripheral enrichment has important contributions to this positive effect. In this aforementioned improvement in learning, the role of related NMDAR is still unclear. It seems the levels of these receptors to be influenced by the subjects' age and the stress as well as exercise. Additionally, the effect of exercise span on the receptors is another issue to be investigated.

Keywords: Exercise, Spatial Learning, NMDA receptors.

KAYNAKLAR

1. Driscoll I, Sutherland RJ. The aging hippocampus: Navigating between rat and human experiments. *Rev Neurosci* 2005; (16) 87–121.
2. Dere F. Nöroanatomi ve Fonksiyonel Nöroloji, Okullar Pazarı Kitabevi, Glutamat Res, 1990.
3. Lister JP, Barnes CA. Neurobiological Changes in the Hippocampus During Normative Aging. *Arch Neurol* 2009; 66 (7): 829-833.
4. Nunn JA, Graydon FJ, Polkey CE, Morris RG. Differential spatial memory impairment after right temporal lobectomy demonstrated using temporal titration. *Brain: a Journal of Neurology* 1999; 122: 47-59.
5. Rapp PR, Rosenberg RA, Gallagher M. An evaluation of spatial information processing in aged rats. *Behav Neurosci.* 1987; 101(1):3-12.
6. Barnes CA. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol.* 1979; 93(1):74-104.
7. Ozawa S, Haruyuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology* 1987; 54: 581-618.
8. Yakamura T, Shimoji K. Subunit and site spesific pharmacology of the NMDA receptor channel. *Progress in Neurobiology* 1999; 59:279-298.
9. Potier B, Poindessous-Jazat F, Dutar P, Billard J.M. NMDA receptor activation in the aged rat hippocampus. *Experimental Gerontology* 2000; 35:1185-1199.
10. Cotman CW, Berchtold NC. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci* 2002; 25:295–301.
11. Cotman CW, Engesser-Cesar C. Exercise enhances and protects brain function. *Exerc Sport Sci Rev* 2002; 30:75–79.
12. Markham JA, Greenough WT. Experience-driven brain plasticity: beyond the synapse. *Neuron Glia Biol* 2004; 1:351–363.
13. Erickson KI, Kramer AF. Aerobic exercise effects on cognitive and neural plasticity in older adults. *Br J Sports Med* 2009; 43:22–24.
14. Voss MW, Prakash RS, Erickson KI, Basak CH, Chaddock L, Kim JS et al. Plasticity of brain networks in a randomized intervention trial of exercise training in older adults. *Fron Aging Neuroscience* 2010; 2:1–17.
15. Szabo AN, McAuley E, Erickson KI, Voss M, Prakash RS, Mailey EL et al. Cardiorespiratory fitness, hippocampal volume, and frequency of forgetting in older adults. *Neuropsychology* 2011; 25:545–553.
16. Van Praag H, Kempermann G, Gage FH. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 1999; 2:266–270.

17. Farmer J, Zhao X, van Praag H, Wodtke K, Gage FH, Christie BR. Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male Sprague-Dawley rats in vivo. *Neuroscience* 2004; 124:71–79.
18. O’Callaghan R, Ohle R, Kelly AM. The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: A comparison of LTP, spatial- and non-spatial learning. *Behav Brain Res* 2007; 176:362–366.
19. Christie BR, Swann SE, Fox CJ, Froc D, Lieblisch SE, Redila V, Webber A. Voluntary exercise rescues deficits in spatial memory and long-term potentiation in prenatal ethanol-exposed male rats. *Eur J Neurosci* 2005; 21:1719–1726.
20. Gobbo OL, O’Mara SM. Exercise, but not environmental enrichment, improves learning after kainic acid-induced hippocampal neurodegeneration in association with an increase in brain-derived neurotrophic factor. *Behav Brain Res* 2005; 159:21–26.
21. Barnes CA, Forster MJ, Fleshner M, Ahanotu EN, Laudenslager ML, Mazzeo RS et al. Exercise does not modify spatial memory, brain autoimmunity, or antibody response in aged F-344 rats. *Neurobiol Aging* 1991; 12:47–53 (abstract).
22. Hansalik M, Skalicky M, Viidik A. Impairment of water maze behaviour with ageing is counteracted by maze learning earlier in life but not by physical exercise, food restriction or housing conditions. *Exp Gerontol* 2006; 41:169–174.
23. Cotman CW, Berchtold NC, Christie LA. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci* 2007; 30:464–472.
24. Molteni R, Ying Z, Gómez-Pinilla F. Differential effects of acute and chronic exercise on plasticity-related genes in the rat hippocampus revealed by microarray. *Eur. J. Neurosci* 2002; 16(6):1107–1116.
25. Kitamura T, Mishina M, Sugiyama H. Enhancement of neurogenesis by running wheel exercises is suppressed in mice lacking NMDA receptor ϵ 1 subunit. *Neurosci Res.* 2003; 47(1):55–63
26. Türkiye İstatistik Kurumu, İstatistiklerle Yaşlılar, 2012.
27. Polat F, Kumral E. Normal ve patolojik beyin yaşlanması Ege Tıp Dergisi. 2010; 49(3) Ek: 3-10.
28. Balota D, A. Dolan. 2000. Memory changes in healthy older adults. In E. Tulving and F. I. M. Craik (Eds.), *The Oxford handbook of memory* (pp. 395-409). London: Oxford University Press.
29. West MJ. Regionally specific loss of neurons in the aging human hippocampus. *Neurobiol Aging.* 1993; 14(4):287-293.
30. O’Keefe J, Dostrovsky J. The hippocampus as a spatial map: preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res.* 1971; 34(1):171-175.

31. Powell KE, Blair SN. The public health burdens of sedentary living habits: theoretical but realistic estimates. *Med. Sci. Sports Exerc* 1994; 26:851–856.
32. Guo M, Lin V, Davis W, Huang T, Carranza A, Sprague S, Reyes R, Jimenez D, Ding Y. Preischemic induction of TNF- α by physical exercise reduces blood–brain barrier dysfunction in stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 2008; 28:1422–1430.
33. Griesbach GS, Hovda DA, Gomez-Pinilla F, Sutton RL. Voluntary exercise or amphetamine treatment, but not the combination, increases hippocampal brain-derived neurotrophic factor and synapsin I following cortical contusion injury in rats. *Neuroscience* 2008; 154:530–540.
34. Lawlor DA, Hopker SW. The effectiveness of exercise as an intervention in the management of depression: systematic review and meta-regression analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 2001; 322:763–767.
35. Sibley BA, Etnier JL. The relationship between physical activity and cognition in children: a metaanalysis. *Pediatric Exercise Science* 2003; 15:243–256.
36. Winter B, Breitenstein C, Mooren FC, Voelker K, Fobker M, Lechtermann A, Krueger K, Fromme A, Korsukewitz C, Floel A, Knecht S. High impact running improves learning. *Neurobiol Learn Mem.* 2007; 87:597–609.
37. Pereira AC, Huddleston DE, Brickman AM, Sosunov AA, Hen R, McKhann GM, Sloan R, Gage FH, Brown TR, Small SA. An in vivo correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104:5638–5643.
38. Dik M, Deeg DJ, Visser M, Jonker C. Early life physical activity and cognition at old age. *J Clin Exp Neuropsychol.* 2003; 25:643–653.
39. Yaffe K, Barnes D, Nevitt M, Lui LY, Covinsky K. A prospective study of physical activity and cognitive decline in elderly women: women who walk. *Arch Intern Med.* 2001; 161:1703–1708.
40. Hillman CH, Erickson KI, Kramer AF. Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition. *Nat Rev Neurosci.* 2008; 9:58–65.
41. Kramer AF, Hahn S, Cohen NJ, Banich MT, McAuley E, Harrison CR, Chason J, Vakil E, Bardell L, Boileau RA, Colcombe A. Ageing, fitness and neurocognitive function. *Nature* 1999; 400:418–419.
42. Schuit AJ, Feskens EJ, Launer LJ, Kromhout D. Physical activity and cognitive decline, the role of the apolipoprotein e4 allele. *Med Sci Sports Exerc.* 2001; 33:772–777.
43. Barnes CA. Normal aging: regionally specific changes in hippocampal synaptic transmission. *Trends Neurosci* 1994; 17:13–18.
44. Greenwood BN, Foley TE, Day HE, Campisi J, Hammack SH, Campeau S, Maier SF, Fleshner M. Freewheel running prevents learned helplessness/behavioral depression: role of dorsal raphe serotonergic neurons. *J Neurosci.* 2003; 23:2889–2898.

45. Van Praag H, Schubert T, Zhao Ch, Gage FH. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *J Neurosci* 2005; 25:8680–8685.
46. Albeck DS, Sano K, Prewitt GE, Dalton L. Mild forced treadmill exercise enhances spatial learning in the aged rat. *Behavioural Brain Research* 2006; 168:345–348
47. Adlard PA, Perreau VM, Pop V, Cotman CW. Voluntary exercise decreases amyloid load in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2005; 25:4217–4221
48. Nichol KE, Parachikova AI, Cotman CW. Three weeks of running wheel exposure improves cognitive performance in the aged Tg2576 mouse. *Behav Brain Res* 2007; 184:124–132.
49. Taupin P. Neurogenesis in the adult central nervous system. *C. R. Biol* 2006; 329:465–475.
50. Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T, Takao K, Miyakawa T, Yamaguchi M, Mori K, Ikeda T, Itohara S, Kageyama R. Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat Neurosci.* 2008; 11:1153–1161.
51. Kee N. Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus. *Nat. Neurosci* 2007; 10:355–362.
52. Kronenberg G, Bick-Sander A, Bunk E, Wolf C, Ehninger D, Kempermann G. Physical exercise prevents age-related decline in precursor cell activity in the mouse dentate gyrus. *Neurobiol Aging.* 2006; 27:1505–1513
53. Wu CW, Chang YT, Yu L, Chen HI, Jen CJ, Wu SY, Lo CP, Kuo YM. Exercise enhances the proliferation of neural stem cells and neurite growth and survival of neuronal progenitor cells in dentate gyrus of middle-aged mice. *J Appl Physiol.* 2008; 105:1585–1594
54. Rolls A, Schori H, London A, Schwartz M. Decrease in hippocampal neurogenesis during pregnancy: a link to immunity. *Mol Psychiatry.* 2008; 13:468–469
55. Naylor AS, Bull C, Nilsson MK, Zhu C, Björk-Eriksson T, Eriksson PS, Blomgren K, Kuhn HG. Voluntary running rescues adult hippocampal neurogenesis after irradiation of the young mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105:14632–14637.
56. Choi SH, Veeraraghavalu K, Lazarov O, Marler S, Ransohoff RM, Ramirez JM, Sisodia SS. Non-cell-autonomous effects of presenilin 1 variants on enrichment-mediated hippocampal progenitor cell proliferation and differentiation. *Neuron.* 2008; 59:568–580
57. Kohl Z, Kandasamy M, Winner B, Aigner R, Gross C, Couillard-Despres S, Bogdahn U, Aigner L, Winkler J. Physical activity fails to rescue hippocampal neurogenesis deficits in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Brain Res.* 2007; 1155:24–33

58. van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96:13427–13431.
59. Ge S, Yang CH, Hsu KS, Ming GL, Song H. A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron*. 2007; 54:559–566
60. Stranahan AM, Khalil D, Gould E. Running induces widespread structural alterations in the hippocampus and entorhinal cortex. *Hippocampus*. 2007; 17:1017–1022.
61. Carro E, Nuñez A, Busiguina S, Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *J Neurosci*. 2000; 20:2926–2933
62. Fabel K, Tam B, Kaufer D, Baiker A, Simmons N, Kuo CJ, Palmer TD. VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *Eur. J Neurosci*. 2003; 18:2803–2812
63. Chaouloff F. Physical exercise and brain monoamines: a review. *Acta Physiol. Scand* 1989; 137:1–13.
64. Babyak M, Blumenthal JA, Herman S, Khatiri P, Doraiswamy M, Moore K, Craighead WE, Baldewicz TT, Krishnan KR. Exercise treatment for major depression: Maintenance of therapeutic benefit at 10 months. *Psychosom Med*. 2000; 62:633–638
65. Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci*. 2000; 20:9104–9110
66. Neeper SA, Gómez-Pinilla F, Choi J, Cotman C. Exercise and brain neurotrophins. *Nature*. 1995; 373:109
67. Scharfman H, Goodman J, Macleod A, Phani S, Antonelli C, Croll S. Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats. *Exp Neurol*. 2005; 192:348–356
68. Galvão RP, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Brain-derived neurotrophic factor signaling does not stimulate subventricular zone neurogenesis in adult mice and rats. *J Neurosci*. 2008; 28:13368–13383.
69. Yıldırım M. Tıp Öğrencileri İçin Klinik Nöroanatomî, 4. Baskı (çeviri), İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Ltd Şti, 2000.
70. Goebel DJ, Poosch MS. NMDA receptor subunit gene expression in the rat brain: a quantitative analysis of endogenous mRNA levels of NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D and NR3A. *Molecular Brain Research*. 1999; 69: 164-170.
71. Cull-Candy S, Brickley SG. NMDA receptors. *Encyclopedia of Life Sciences*. 2001.
72. Carroll RC, Zukin RS. NMDA-receptor trafficking and targeting: Implications for synaptic transmission and plasticity. *Trends in Neuroscience*. 2002; 25: 571-577.

73. Meldrum BS, Akbar MT, Chapman AG. Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy. *Epilepsy Research* 1999; 36(2-3): 189-204.
74. Anwyl R. Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Research Reviews* 1999; 29(1): 83-120.
75. Smith Y, Charara A, Paquet M, Kieval JZ, Paré JF, Jesse E. Ionotropic and metabotropic GABA and glutamate receptors in primate basal ganglia. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 2001; 22(1-2): 13-42.
76. Petrie RJA, Reid IC, Stewart CA. The N-methyl-D-aspartate receptor, synaptic plasticity and depressive disorder. *Pharmacology and therapeutics* 2000; 7:11-25.
77. Wittenberg GM, Tsien JZ. An emerging molecular and cellular framework for memory processing by the hippocampus. *Trends in Neurosciences*. 2002; 25:571-577.
78. Candelario-Jalile E, González-Falcón E. Wide therapeutic time window for nimesulide neuroprotection in a model of transient focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Research* 2004; 1007:98-108.
79. Khanduja KL, Sohi KK. Nimesulide inhibits lipopolysaccharide-induced production of superoxide anions and nitric oxide and iNOS expression in alveolar macrophages. *Life Sciences* 2006; 78: 1662-1669.
80. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 1984; 11: 47-60.
81. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-689.
82. Delibas N, Doguc DK, Sutcu R, Eroglu E, Gökalp O. Effect of Nicotine on hippocampal nicotinic acetylcholine $\alpha 7$ receptor and NMDA receptor subunits 2A and 2B expression in young and old rats. *International Journal of Neuroscience* 2005; 115 (8):1151-1163.
83. Radak Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Pucsek J, Sasvari M, Nyakas C, Goto S. Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochemistry International* 2001; 38:17-23
84. Kim SU, Ko G, Kim BK, Shin MS, Cho S, Kim CJ, Kim SH, Baek SS, Lee EK, Jee YS. Treadmill exercise prevents aging-induced failure of memory through an increase in neurogenesis and suppression of apoptosis in rat hippocampus. *Experimental Gerontology* 2010; 45:357-365.
85. O'Callaghan RM, Griffin EW, Kelly AM. Long-Term Treadmill Exposure Protects Against Age-Related Neurodegenerative Change in the Rat Hippocampus. *Hippocampus*.2009; 19:1019-1029.
86. Harburger LL, Lambert TJ, Frick KM. Age-dependent effects of environmental enrichment on spatial reference memory in male mice. *Behav Brain Res*. 2007; 185:43-48.

87. Mishizen-Eberz AJ, Rissman RA. Biochemical and molecular studies of NMDA receptor subunits NR1/2A/2B in hippocampal subregions throughout progression of Alzheimer's disease pathology. *Neurobiology of disease* 2004; 15:80-92.
88. Ülger Z, Yavuz BB, Halil M, Cankurtaran M, Arıoğlu S. Alzheimer Hastalığı Tedavisinde Kullanılan ilaçlar. *Akad Geriatri* 2009; 1:3-12.
89. Rothman SM, Olney JW. Excitotoxicity and the NMDA receptor--still lethal after eight years. *Trends Neurosci* 1995; 18(2):57-8.
90. 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.