

## YAŞLI SIÇANLARDA AGMATİN TAKVİYESİ VE AEROBİK EGZERSİZİN UZAYSAL ÖĞRENME ÜZERİNE ETKİSİ

### EFFECTS OF AGMATINE SUPPLEMENTATION AND AEROBIC EXERCISE ON SPATIAL LEARNING IN AGED RATS

Mustafa Savaş TORLAK<sup>1</sup>, Nilşel OKUDAN<sup>2</sup>, Muaz BELVİRANLI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>KTO Karatay Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu

<sup>2</sup>Konya Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı

#### ÖZ

**AMAÇ:** Çalışmanın amacı, yaşlı sıçanlarda agmatin takviyesi ve egzersizin kognitif fonksiyonlar üzerine etkilerinin incelenmesidir.

**GEREÇ VE YÖNTEM:** Çalışmada, 300-350 gr ağırlığında, 36 adet sağlıklı yaşlı erkek Sprague-Dawley sıçan kullanıldı. Sıçanlar rastgele olarak kontrol (n=6), egzersiz (n=10), agmatin (n=10), agmatin+egzersiz (n=10) gruplarına ayrıldı. Kontrol grubunda ve Egzersiz grubunda yer alan sıçanlara 8 hafta 1 mg/kg (i.p) serum fizyolojik uygulandı. Agmatin gruplarında bulunan sıçanlara 8 hafta 40 mg/kg (i.p) agmatin takviyesi uygulandı. Egzersiz ve agmatin+egzersiz gruplarına 8 hafta boyunca yüzme egzersizi uygulandı. 8. haftanın sonunda Morris su labirent testi gerçekleştirildi. Tüm hayvanlar dekapite edildi ve beyin kaynaklı nörotrofik faktör (plazmada), hipokampusta agmatin ve nitrit+nitrat seviyelerinin ölçümü için kan ve doku (hipokampus) örnekleri alındı. Protein konsantrasyonu Lowry metoduyla tayin edildi.

**BULGULAR:** Agmatin seviyesi agmatin ve agmatin+egzersiz gruplarında kontrol grubu ve egzersiz grubuna göre belirgin şekilde yüksekti (p<0.05). Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) seviyesi ve nitrit+nitrat seviyeleri bakımından gruplar arasında belirgin bir fark yoktu (p<0.05). Morris su labirent testi deneme fazında 1. gün ve 4. gün gruplar arasında toplam kat edilen mesafe ve platformu bulma süreleri açısından fark yoktu (p<0.05). 2. gün ve 3. gün toplam kat edilen mesafe ve platformu bulma süreleri kontrol grubuna göre agmatin+egzersiz grubunda daha düşüktü (p<0.05).

**SONUÇ:** Agmatin takviyesinin yaşlı sıçanlarda uzaysal öğrenme üzerine olumlu etkileri olabileceği gözlemlendi.

**ANAHTAR KELİMELER:** Agmatin, Beyin kaynaklı nörotrofik faktör, Egzersiz, Öğrenme

#### ABSTRACT

**OBJECTIVE:** The aim of the study is to examine the effects of agmatine supplementation and exercise on cognitive functions of aged rats.

**MATERIAL AND METHODS:** In the study, 36 healthy, old male Sprague-Dawley rats with a weight of 300-350 gr were used. The rats were randomly divided into as control (n=6), exercise (n=10), agmatine (n=10), agmatine+exercise (n=10) groups. The rats in the control group and the exercise group were administered 1 mg / kg (i.p) saline for 8 weeks. 40 mg/kg (i.p) Agmatine supplementation was given to the rats at the agmatine groups. Swimming exercise was applied for 8 weeks to the exercise and agmatine+exercise groups. At the end of the 8th week, Morris maze test was concluded. All the animals were decapitated and the blood and tissue samples (hippocampus) were taken for measuring brain derived neurotrophic factor (in plasma), the agmatine and nitrite+nitrate levels in hippocampus. Protein concentration was determined by the Lowry method.

**RESULTS:** Agmatine level was significantly higher in the agmatine and agmatine+exercise groups compared to the control group and exercise group (p<0.05). In terms of the brain derived neurotrophic factor (BDNF) and nitrite+nitrate levels there was no significant difference between the groups (p<0.05). On the first day and fourth day, there was no difference between the groups in terms of total logged distance and durations of finding the platform at the phase of Morris water maze test (p<0.05). On the second day and third day, the total logged distance and durations of finding the platform was lower in the agmatine+exercise group compared to the control group (p<0.05).

**CONCLUSIONS:** It was observed that agmatine supplementation might have positive effects on spatial learning in aged rats.

**KEYWORDS:** Agmatine, Brain derived neurotrophic factor, Exercise; Learning

**Geliş Tarihi / Received:** 16.09.2019

**Kabul Tarihi / Accepted:** 27.04.2020

**Yazışma Adresi / Correspondence:** Dr.Öğr.Üyesi Mustafa Savaş TORLAK  
KTO Karatay Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu

**E-mail:** mustafa.savas.torlak@karatay.edu.tr

**Orcid No (Sirasıyla):** 0000-0002-8084-6203, 0000-0001-9879-503X, 0000-0002-2454-8818

## GİRİŞ

Öğrenme ve belleğin temelini nöronlar ve sinapsların plastisite yeteneği oluşturmaktadır (1). Nöronların senkronize bir biçimde uyarılması, iki nöron arasındaki sinaptik aktivitenin artmasına, sinaptik bağlantının güçlenmesine, dolayısıyla nöroplastisiteye sebep olur (2).

Öğrenmede önemli bir diğer mekanizma nörojenezdir. Yetişkin beyninde iki ana nörojenez bölgesi tanımlanmıştır. Bunlar supraventriküler bölge (SVZ) ve dentat girusun (DG) subgranüler bölgesidir (3). Yetişkin memeli beyni, olfaktor bulbus ve hipokampusun dentat girusunda devamlı yeni nöronlar üretir. Yetişkin insan hipokampusunda her gün ortalama 700 yeni nöronun oluştuğu gösterilmiştir (4). Yeni hipokampal nöronların hipokampusun fonksiyonlarına katkıda bulunduğu, bu nöronların uzaysal öğrenme süreçlerine katıldığı ve aynı zamanda sinaptik plastisiteye bağlı davranışlardan da sorumlu oldukları düşünülmektedir (5).

Bu hipotezi destekleyen birçok çalışmada, hipokampal nörojenezin öğrenme ve bellek süreçlerini modüle ettiği ve nörojenezin azalmasıyla hipokampal nörojenik fonksiyonların ve bellek süreçlerinin bozulduğu gösterilmiştir (6, 7).

Öğrenme ve bellek süreçlerine periferal nörotrofinler katkıda bulunurlar. Nörotrofik faktörler santral sinir sisteminde nörotransmitter olarak görev yapmazlar; esas olarak nöronların gelişmelerine, kendilerini yenilemelerine ve korunmalarına yardımcı olurlar, nörotransmitterlerin görev yaptıkları fonksiyonel sinir yollarının yapısının sağlıklı olmasına ve görevlerini sürdürmelerine katkıda bulunurlar. Önemli nörotrofik faktörler arasında, beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), sinir büyüme faktörü (NGF) ve insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) sayılabilir (8).

Fiziksel egzersiz, sağlıklı yaşam ve yaşlanma için teknoloji gerektirmeyen, düşük maliyetli ve etkili bir yöntemdir. Yaşa bağlı fizyolojik kayıpların önlenmesinde ve nörodejeneratif hastalıklarda hastalığın ilerlemesini yavaşlatmak veya durdurmak için de etkili bir strateji olabilir (9). Egzersiz, güçlü bir nörojenik uyarıcıdır. Nörojenez hızı yaşla azalmasına rağmen, fiziksel egzersiz

hücrel profilersasyonu artırmaktadır (10). Hayvan çalışmalarında fiziksel egzersizin, uzun süreli güçlendirme (LTP), NGF ve BDNF seviyelerini yükselttiği, aynı zamanda hipokampusa bağlı öğrenmeyi geliştirdiği de gösterilmiştir (11).

Agmatin ilk kez 1910 yılında Alman bilim adamı Albrecht Kossel tarafından ringa balığı sperminde keşfedilen endojen bir amindir (12).

Agmatin birçok özelliğiyle nörotransmittere benzetilmektedir, presinaptik akson terminalinde sinaptik veziküller içerisinde bulunur, hücre membranının depolarize olmasıyla salınır (13).

Agmatin birçok postsinaptik membran reseptörüne bağlanır. Bu membran reseptörleri imidazolin reseptörleri,  $\alpha$ -2 adranerjik, glutamat NMDAR, serotonin 5HT<sub>2A</sub> ve 5HT<sub>3</sub> reseptörleridir (14, 15). Agmatin çeşitli membran transport kanallarıyla bağlantı kurar. Bu kanallar, organik katyon kanalları, ekstrasöronal monoamin kanalları, poliamin kanalları, agmatin seçici kanalları ve ayrıca mitokondiri üzerinde agmatin seçici kanalları olarak sayılabilir (15). Agmatin NO üretiminin endojen bir düzenleyicisidir ve NOS'ın iki izoformu olan indüklenebilir NOS (iNOS) ve nöronal NOS'u (nNOS) inhibe etmektedir (16). Agmatin çeşitli reseptörlerle etkileşime girerek ve NO sentezini düzenleyerek bellek bozukluklarında, depresyonda, nörodejeneratif hastalıklarda, ağrılı durumlarda kullanılmaktadır.

Agmatin takviyesinin öğrenme ve belleği pozitif yönde etkilediğini gösteren birçok çalışma literatürde mevcuttur (17 - 20). Sıçanlarda uzaysal öğrenme sırasında hipokampusun CA1 ve dentat girus bölgesinde, entorinal korteks ve vestibular nukleusta endojen agmatin seviyelerinin yükseldiği tespit edilmiş ve öğrenme sırasındaki süreçlerde agmatinin görev alabileceği sonucuna varılmıştır (17). Bu çalışmayı destekleyen başka bir çalışmada öğrenme ve bellek süreçlerinde L-arjinin metaboliti olan L-sitrülin ve agmatinin entorinal korteks, prefrontal korteks, dentat girusta arttığı tespit edilmiştir (21). Başka bir çalışmada uzaysal öğrenme sürecinde hipokampal CA1 stratum radiatum bölgesindeki sinaptik terminallerde endojen agmatin seviyelerinde artış tespit edilmiş ve öğrenme sürecine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (22).

Bu çalışmanın amacı, sıçanlarda agmatin takviyesinin, egzersizin ve her iki faktörün birlikte kullanılmasının kognitif fonksiyonlar üzerine etkilerini araştırmaktır.

#### GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada, 300 - 350 gr ağırlığında, 36 adet, 20 aylık yaşlı erkek Sprague-Dawley sıçan kullanıldı. Sıçanlar Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edildi. Çalışmada kullanılan hayvanlar kontrol (K) (n=6), Agmatin (A) (n=10), Egzersiz (E) (n=10) ve Agmatin+egzersiz (AE) (n=10) olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Çalışmada 2 hayvan kaybedildi, diğer 34 sıçana aşağıdaki uygulamalar yapıldı.

Kontrol grubuna, sekiz hafta boyunca standart sıçan yemi ve içme suyu *ad libitum* olarak verildi. Agmatin grubuna, sekiz hafta her gün aynı saatte (11.00) serum fizyolojik içerisinde çözdürülen 40 mg/kg agmatin (catno: 2482-00-0, Sigma, St Louis, MO, USA) intraperitoneal (i.p) olarak verildi (19). Egzersiz grubuna, deney süresince her gün aynı saatte (12.00) yüzme egzersizi yaptırıldı. Su sıcaklığı 24°C'ye ayarlandı.

Egzersiz sonrası hayvanlar kurulandı. Kontrol ve egzersiz grubundaki sıçanlara Agmatin ve Agmatin+Egzersiz grubundaki sıçanlarla aynı stresi yaşamaları için serum fizyolojik 1 mg/kg (i.p) verildi. Agmatin+Egzersiz grubundaki, sıçanlara intraperitoneal olarak agmatin 40 mg/kg verildi ve ardından egzersiz grubundaki sıçanlara uygulanan egzersiz protokolü uygulandı. Egzersiz protokolünde sıçanlar ilk gün 5 dakika yüzmeye başlayıp 1. haftanın sonunda 30 dk' ya kadar yüzmeye alıştırdılar. İkinci hafta, sıçanların kuyruk kısmına vücut ağırlığının %2'sine denk gelen ağırlık bağlanarak hafta boyunca 10 dk yüzdürüldüler. Üçüncü hafta %2 ağırlıkla 15 dk, dördüncü hafta %2 ağırlıkla 20 dk, beşinci hafta %4 ağırlıkla 10 dk, altıncı hafta %4 ağırlıkla 15 dk, yedinci hafta %4 ağırlıkla 20 dk, sekizinci hafta %6 ağırlıkla 10 dk yüzdürüldüler. Campos-ferraz ve ark. çalışmasındaki egzersiz protokolü referans alındı (23). Ancak çalışmamızda kullandığımız hayvanlar yaşlı olduklarından dolayı ilk denemelerde hayvan kayıpları yaşandı. Bu sebepten dolayı egzersiz programı modifiye edildi.

Sekiz haftalık çalışma periyodunun sonunda tüm hayvanlara Morris su labirent testi (MWM) uygulandı. Deney 4 gün deneme, 5. gün öğrenme fazı olacak şekilde yapıldı. Her deneme gününde sıçanlar dört ayrı kadrandan rastgele yüzü tank duvarına bakacak şekilde tank içine bırakıldı. Her bir denemede sıçanın platformu bulması için maksimum 60 sn süre verildi. 60 sn içerisinde platformu bulamayan sıçan platform üzerine konuldu ve 30 sn çevreyi gözlemesi ve platformun yerini öğrenmesi hedeflendi. Sıçanların yüzme performansları sırasında platformu bulmak için geçirdiği süre (s), toplam kat edilen mesafe (cm), yüzme hızı (cm/s) kaydedildi.

Dört günlük uygulamanın ardından beşinci gün öğrenme fazında kaçış platformu kaldırıldı ve 90 sn içerisinde hayvanın toplam kat ettiği mesafe (cm), yüzme hızları (cm/s), her bir kadranda geçirilen süre (s), platform üzerinden geçiş sayısı, platform bölgesinde geçirilen süre (s) ve platform bölgesine uğrama sıklığı kaydedildi. Tüm veriler su tankı üzerindeki kamerayla kaydedildi ve bilgisayar yazılımıyla (Ethovision XT 10.0, Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands) değerlendirildi (24).

Sıçanlar öğrenme testinin ardından eter anestezi altında intrakardiyak kan alımını takiben dekapite edildi, hipokampus dokusu çıkarıldı ve hassas terazi (Sartorius, m-power, Almanya) ile net ağırlığı hesaplandı. Kan örnekleri EDTA'lı tüplere eşit şekilde dağıtıldı ve 3200 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Örnekler sıvı azot içerisinde donduruldu ve analiz zamanına kadar -80 °C'de saklandı. Örneklerde BDNF, Agmatin, Nitrit+nitrat seviyelerinin ölçümü yapıldı.

#### Hipokampus BDNF Ölçümü

Hipokampus dokusunda BDNF seviyelerinin ölçümü BDNF ELISA Kiti (Cloud-Clone Corp, Houston, ABD) kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre ELISA okuyucusuyla (Powerwave XS, Biotek, ABD) gerçekleştirildi. Her bir kuyucuğa 100 µl standart veya örnek eklendi sonra 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. Ardından kuyucuklara 100 µl tanımlayıcı ajan A eklendi. 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Daha sonra 3 kez 350 µl yıkama solüsyonuyla yıkandı. Kuyucuklara 100 µl tanımlayıcı ajan B eklendi ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Ardından 5 kez yıkama işlemi ya-

pıldı. Kuyucukların her birine 90 µl substrat solüsyonu eklendi. 37°C'de 15 - 20 dk inkübe edildi. İşlemden sonra kuyucuklara 50 µl durdurma solüsyonu eklendi. 450 nm dalga boyunda optik yoğunluk (OD) ölçüldü.

#### **Hipokampüs Nitrit-Nitrat Ölçümleri**

Hipokampüs dokusunda Nitrit-Nitrat ölçümü, Nitrit-Nitrat kolorimetrik kit (Cayman Chem, Ann Arbor MI, USA) kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre ELISA okuyucusuyla (Powerwave XS, Biotek, ABD) gerçekleştirildi. Kuyucuklara 200 µl deney tamponu ve 80 µl örnek eklendi.

Tüm kuyucukların üzerine 10 µl kofaktör enzim karışımı eklendi. Ardından 10 µl nitrat redüktaz karışımı eklendi. Oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon zamanından sonra 50 µl Griess reaktif R1 eklendi. Hemen ardından 50 µl Griess reaktif R2 eklendi. 10 dakika oda ısısında beklendikten sonra 550 nm dalga boyu altında OD ölçüldü.

#### **Plazma Agmatin Ölçümü**

Plazma örneklerine proteinleri ayırtırmak için metanol içerisinde 175 µl perklorik asit ve 75 µl hidroklorik asit eklendi. Buz içerisinde 1 saat bekletildikten sonra 4°C'de 10 dk 6000 rpm'de santrifüj edildi. Hazırlanan 250 µl süpernatant 15 µl NaOH ile nötralize edildi. Ardından nötralize edilen örnekler 20 µl türevlendirme solüsyonu ve 100 µl potasyum borat tamponu eklendi. 10 µl örnek, HPLC (Shimadzu Corp, Kyoto, Japonya) sisteminde floresan detektörle (emiyon 455 nm dalga boyunda), Inertsil ODS-3 (4.6x250 mm; 5µm) kolonda 40°C fırın sıcaklığında 30 dakika boyunca analiz edildi.

#### **ETİK KURUL ONAYI**

Çalışma Selçuk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'dan 27.10.2014 tarih ve 2014/2 sayılı onay alındıktan sonra gerçekleştirildi.

#### **İSTATİSTİKSEL ANALİZ**

Çalışmamızda morris yüzme testi değerleri ve biyokimyasal analizler sonucu elde edilen veriler ortalama±standart sapma (SD) olarak ifade edildi. Grupların dağılımının normal dağılıma uygunluğu Shapiro- Wilk testi ile değerlendirildi. Normal dağılıma uyan veriler tek yönlü

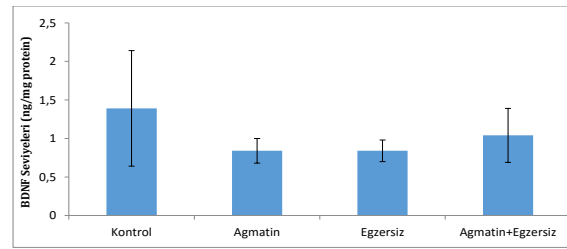
varyans analizi (ANOVA) ile hesaplandı. Gruplar arası farklılıkları belirlemek için post hocTukey's HSD testi yapıldı. Normal dağılıma uymayan veriler ise Non-parametrik testlerden Kruskal-Wallis ile test edildi. Testlerden elde edilen sonuçlarda p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İstatistiksel analizler için IBM SPSS 22.0 paket programı kullanıldı.

#### **BULGULAR**

##### **BDNF Seviyeleri**

Grupların BDNF seviyeleri aşağıda gösterilmiştir (**Şekil 1**). Gruplar arasında BDNF seviyeleri bakımından anlamlı bir fark yoktu (p < 0.05). (Kontrol: 1.39 ± 0.75, Agmatin: 0.84 ± 0.16, Egzersiz: 0.84 ± 0.14, Agmatin+Egzersiz: 1.04 ± 0.35).

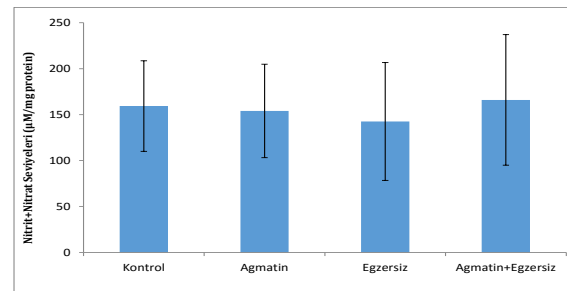
Protein konsantrasyonu Lowry metoduyla (25) tayin edildi. Veriler ng/mg protein olarak ifade edildi.



**Şekil 1:** BDNF Seviyeleri (ng/mg protein) (ort ± SS)

##### **Nitrit+Nitrat Seviyeleri**

Grupların nitrit+nitrat seviyeleri aşağıda gösterilmiştir (**Şekil 2**). Gruplar arasında nitrit+nitrat seviyeleri bakımından bir fark yoktu (p<0.05). (Kontrol: 159.3 ± 49.3, Agmatin: 154.0 ± 50.8, Egzersiz: 142.5 ± 64.1, Agmatin+Egzersiz: 166.0 ± 71). Protein konsantrasyonu Lowry metoduyla tayin edildi. Veriler µM/mg protein olarak ifade edildi.



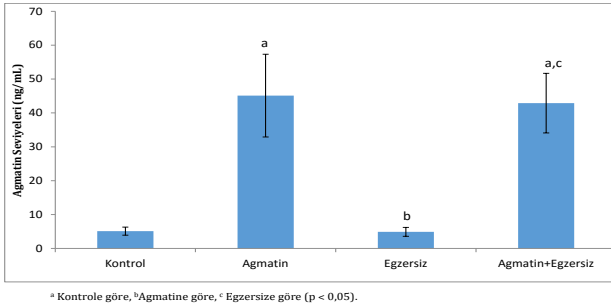
**Şekil 2:** Nitrit+Nitrat Seviyeleri (µM/mg protein) (ort ± SS)

##### **Agmatin Seviyeleri**

Grupların plazma agmatin seviyeleri aşağıda gösterilmiştir (**Şekil 3**). Agmatin ve Agma-



tin+Egzersiz gruplarında agmatin seviyesi kontrol ve egzersiz gruplarına göre yüksekti ( $p < 0.05$ ). (Kontrol:  $5.1 \pm 1.2$ , Agmatin:  $45.1 \pm 10.2$ , Egzersiz:  $4.9 \pm 1.4$ , Agmatin+Egzersiz:  $42.8 \pm 8.4$ ). Veriler ng/mL olarak ifade edildi.



Şekil 3: Agmatin Seviyeleri (ng/mL) (ort ± SS)

### Morris Yüzme Testi Deneme Fazı Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Morris yüzme testinde deneme fazında tekrarlayan günlerde toplam kat edilen mesafeler aşağıda verilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1: Morris Yüzme Testinde Deneme Fazında Toplam Kat Edilen Mesafe (cm) (ort ± SS)

	Kontrol	Agmatin	Egzersiz	Agmatin+Egzersiz
1.gün	$927,0 \pm 281,9$	$930,7 \pm 208,5$	$1041,8 \pm 158,9$	$905,6 \pm 219,7$
2.gün	$919,0 \pm 256,0^*$	$590,9 \pm 264,2^*$	$736,6 \pm 291,0^*$	$513,7 \pm 242,7^{**}$
3.gün	$689,3 \pm 143,2^{**}$	$356,0 \pm 190,1^{**}$	$613,1 \pm 298,1^{**}$	$385,1 \pm 139,8^{**}$
4.gün	$402,2 \pm 242,3^{**}$	$337,3 \pm 198,6^{**}$	$570,2 \pm 245,2^{**}$	$325,1 \pm 148,5^{**}$

\*Kontrol grubuna göre, \*1.güne göre, \* 2. güne göre ( $p < 0.05$ ).

Toplam kat edilen mesafede zamana bağlı azalma vardı ( $p < 0.05$ ). 1. gün ile tüm günler arasında fark vardı ( $p < 0.05$ ). 2. gün ile 3. ve 4. günler arasında fark vardı ( $p < 0.05$ ). 3. gün ile 4. gün arasında fark yoktu ( $p < 0.05$ ). Morris yüzme testinde tekrarlanan günlerde sıçanların platformu bulma süreleri aşağıda verilmiştir (Tablo 2).

Tablo 2: Morris Yüzme Testinde Deneme Fazında Platformu Bulma Süresi (s) (ort ± SS)

	Kontrol	Agmatin	Egzersiz	Agmatin+Egzersiz
1.gün	$55,4 \pm 5,3$	$43,5 \pm 11,7$	$53,8 \pm 7,8$	$45,4 \pm 11,7$
2.gün	$48,4 \pm 11,9^*$	$32,1 \pm 11,1^*$	$36,3 \pm 14,0^*$	$27,7 \pm 10,2^{**}$
3.gün	$38,5 \pm 5,7^{**}$	$20,8 \pm 10,7^{**}$	$32,8 \pm 12,5^{**}$	$23,5 \pm 8,2^{**}$
4.gün	$23,7 \pm 10,4^{**}$	$19,6 \pm 9,3^{**}$	$32,9 \pm 13,9^{**}$	$20,1 \pm 8,7^{**}$

\*Kontrol grubuna göre, \*1.güne göre, \* 2. güne göre ( $p < 0.05$ ).

Platformu bulma sürelerinde, grup içinde zamana bağlı değişimde anlamlı azalma vardı ( $p < 0.05$ ). Tüm gruplarda 1. gün ile diğer günler arasında fark vardı ( $p < 0.05$ ). 2. gün ile 3. ve 4. günler arasında anlamlı fark vardı ( $p < 0.05$ ). 3. gün ile 4. gün arasında anlamlı fark yoktu ( $p < 0.05$ ).

Morris yüzme testinde platformun kaldırıldığı gün öğrenme fazında toplam kat edilen mesafe, platforma ulaşma süresi, ortalama hız, platform bölgesinde geçirilen süre, platform üzerinden geçme sayısı ve platform bölgesine uğrama sıklığı açısından gruplar arasında anlamlı fark yoktu ( $p < 0.05$ ).

### TARTIŞMA

Hayvan ve insan çalışmalarında düzenli egzersizin kognitif fonksiyonları pozitif yönde etkilediği gösterilmiştir. Wang ve ark., yaşlı sıçanlara 14 ay boyunca koşu bandı egzersizi uygulamışlar ve uzun süreli aerobik egzersizin öğrenme ve hafıza üzerine olumlu etkisi olduğunu bildirmişlerdir (26). Voss ve ark., yaşlı bireylere bir yıl aerobik egzersiz ve germe egzersizi uygulamaları sonucunda aerobik egzersizin germe egzersizine göre kognitif fonksiyonlarda daha fazla iyileşme sağladığını ortaya koymuşlardır (27).

Bu sonuçlar aerobik egzersizin farklı egzersiz tiplerine göre kognitif fonksiyonları daha olumlu etkilediğini göstermektedir. Benzer şekilde çalışmamızda da aerobik egzersiz modeli seçilmiştir.

Çalışmamızda Morris yüzme testinde deneme fazında tekrarlayan günlerde toplam kat edilen mesafe ve platformu bulma süreleri açısından egzersiz grubu ve kontrol grubu arasında fark yoktu. Bunun sebebi çalışmamızda kullanılan hayvanların 20 aylık olması ve uyguladığımız egzersiz modelinin yoğun gelmesi olabilir.

Çetinkaya ve ark.'nın çalışmasında 25 günlük hayvanlar kullanılmış ve çalışmada pozitif sonuç elde edilmiştir (28). Egzersizin yaşlı hayvanlarda öğrenme ve belleği pozitif olarak etkilediğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Creer ve ark., koşu egzersizinin genç farelerde nörojenez ve öğrenmeyi arttırdığını ancak yaşlı farelerde nörojenez ve öğrenmeye herhangi bir etkisinin

bulunmadığını belirtmişlerdir (29). Başka bir çalışmada genç sıçanlar kontrol (n=30) ve egzersiz (n=30) gruplarına ayrılmıştır.

Sıçanlara uzun süreli egzersiz yaptırılmış ardından yarısı 6 aylıkken diğer yarısı ise 9 aylıkken değerlendirilmiştir. Sonuçta uzun süreli egzersizin genç hayvanlarda (6 aylık) uzaysal öğrenmeyi arttırdığı ancak daha yaşlı hayvanlarda (9 aylık) herhangi bir etkisinin bulunmadığı belirtilmiştir (30).

Benzer şekilde çalışmamızda 8 haftalık yüzme egzersizinin kognitif fonksiyonlar üzerine herhangi bir etkisini bulamadık. Çalışmamızda egzersiz sonrası gruplar arası BDNF seviyeleri arasında anlamlı bir fark yoktu. Bazı çalışmalar egzersizin BDNF seviyelerini yükselttiğini belirlerken bazıları egzersizin BDNF seviyelerini etkilemediğini belirtmektedir. Bunun sebebi uygulanan egzersiz modelleri (akut, kronik, direnç) ve BDNF seviyeleri arasındaki ilişkiden dolayı olabilir. Brunelli ve ark., 10 sağlıklı genç erkeğe bisiklet egzersizi yaptırmışlar ve BDNF'nin immün hücrelerde yükseldiğini tespit etmişlerdir (31). Bir çalışmada 12 sedanter erkek kontrol ve egzersiz grubuna ayrılmış ve egzersiz grubuna 3 ay boyunca dayanıklılık egzersizi yaptırılmıştır. Sonuçta BDNF seviyesi egzersiz grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur (32). Buna karşılık bir çalışmada 16 sağlıklı erkek bireye akut olarak konsantrik diz ve bilek fleksiyon ve ekstansiyon hareketi yaptırılmış ancak plazma BDNF seviyesinde belirgin bir yükselme gözlenmemiştir (33). Silhol ve ark., yaşlı (24 aylık) ve genç (3 aylık) sıçanlara Morris su labirent testi uygulamışlar ve sonuçta genç sıçanlarda BDNF seviyesi yükselirken yaşlı sıçanlarda BDNF seviyesi değişmemiştir (34). Adlard ve ark., genç (2 aylık) orta yaş (15 aylık) ve yaşlı (24 aylık) sıçanlara 4 hafta boyunca gönüllü egzersiz yaptırmışlar sonuçta BDNF seviyelerinin genç hayvanlarda başlangıç seviyesine göre arttığı ancak orta yaşlı ve yaşlı hayvanlarda değişmediğini tespit etmişlerdir (35). Benzer şekilde çalışmamızda 8 haftalık yüzme egzersizi sonrası BDNF seviyesinde gruplar arasında fark bulamadık.

Agmatinin bellek ve hafızayla ilgili reseptörlerle ve öğrenmede önemli bir yeri olan NO olan ilişkisinden dolayı agmatin takviyesinin öğrenme

ve bellek üzerine etkilerini inceleyen birçok çalışma mevcuttur (19, 36, 37) Sıçanlarda uzaysal öğrenme sırasında hipokampusun CA1 ve dentat girus bölgesinde, entorinal korteks ve vestibular nukleusta endojen agmatin seviyelerinin yükseldiği tespit edilmiş ve bu artışın öğrenme süreçlerine katkıda bulunduğu belirtilmiştir (17). Benzer şekilde çalışmamızda agmatin takviyesi alan gruplarda diğer gruplara göre hipokampustaki agmatin seviyeleri belirgin olarak yüksekti. Çalışmamızda Morris su labirent testinde, 2. gün toplam kat edilen mesafe kontrol grubuna göre Agmatin+Egzersiz grubunda belirgin olarak daha düşüktü ve 3. gün toplam kat edilen mesafe kontrol grubuna göre hem Agmatin hem de Agmatin+Egzersiz gruplarında belirgin olarak daha düşüktü. Ayrıca, 2. gün platformu bulma süreleri açısından kontrol grubuna göre Agmatin+Egzersiz grubunda anlamlı bir fark vardı ve 3 gün platformu bulma süreleri açısından kontrol grubuna göre hem Agmatin hem de Agmatin+Egzersiz grubunda anlamlı bir fark vardı. Bu bulgular, çalışmamızda agmatin takviyesinin öğrenme sürecine katkıda bulunduğunu göstermektedir.

Agmatin takviyesinin NOS izoenzimlerinden nNOS ve iNOS'u inhibe ettiği ve eNOS'u aktive ettiğine dair birçok çalışma bulunmaktadır (38, 39). Ancak çalışmamızda gruplar arası nitrit+nitrat seviyeleri arasında anlamlı bir fark yoktu.

Bunun sebebi agmatinin NOS izoenzimleri için zayıf bir inhibitör olarak tanımlanmasından dolayı olabilir (40). Agmatin takviyesinin yüksek konsantrasyonlarda NOS izoenzimlerini inhibe edebileceği belirtilmiştir (41). Rushaidhi ve ark., yaşlı sıçanlarda agmatinin öğrenme üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada gruplar arasında nNOS aktivitesi bakımından bir fark bulamamışlardır (19). Benzer bir çalışmada kontrol grubu ve agmatin grubunda gruplar arasında nNOS ve eNOS seviyeleri incelenmiş ve herhangi bir fark bulunamamıştır (20). Çalışmamızda NOS izoformları ayrı ayrı incelenmemiş Nitrit+nitrat seviyesine bakılmıştır.

Çalışmanın başlıca bulgusu, agmatin takviyesinin yaşlı sıçanlarda kognitif fonksiyonlar üzerine pozitif etkisinin olduğudur. Ancak, çalışmamızda egzersizin kognitif fonksiyonlar üzerine herhangi bir etkisini bulamadık. Bunun sebebi

grubun yaşı düşünülduğünde bu zamana kadar egzersize aşına olmamaları ve egzersiz yoğunluğunun oksidatif stresi artırarak kognitif fonksiyonlardaki olumlu gelişimi engellemesi olabilir.

## SONUÇ

Bu çalışmanın sonucunda elde ettiğimiz bulgulara göre, 8 haftalık 40 mg/kg agmatin takviyesi yaşlı sıçanlarda kognitif fonksiyonları kısmen olumlu yönde etkilemektedir.

## TEŞEKKÜR

Hizmetlerinden dolayı Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi çalışanlarına ve biyokimyasal analiz süreçlerine yardımcı olan Prof. Dr. Muaz Belviranlı'ya ve değerli katkılarından dolayı danışmanım Prof. Dr. Nilsel OKUDAN'a teşekkür ederim.

## KAYNAKLAR

1. Cooke SF, Bliss TV. Plasticity in the human central nervous system. *Brain* 2006; 129(7):1659-73.
2. Maren S, Baudry M. Properties and mechanisms of long-term synaptic plasticity in the mammalian brain: relationships to learning and memory. *Neurobiol Learn Mem* 1995; 63(1):1-18.
3. Ehniger D, Kempermann G. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cell Tissue Res* 2008; 331(1):243-50.
4. Spalding KL, Bergmann O, Alkass K, et al. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* 2013;153(6):1219-27.
5. Bruel-Jungerman E, Rampon C, Laroche S. Adult hippocampal neurogenesis, synaptic plasticity and memory: facts and hypotheses. *Rev Neurosci* 2007;18(2):93-114.
6. Winocur G, Wojtowicz JM, Sekeres M, Snyder JS, Wang S. Inhibition of neurogenesis interferes with hippocampus-dependent memory function. *Hippocampus* 2006; 16(3):296-304.
7. Jessberger S, Clark RE, Broadbent NJ, et al. Dentate gyrus-specific knockdown of adult neurogenesis impairs spatial and object recognition memory in adult rats. *Learn Mem* 2009;16(2):147-54.
8. Lewin G, Carter BD. *Neurotrophic factors*. Newyork, Springer 2014:3-13.
9. Ahlskog JE, Geda YE, Graff-Radford NR, Petersen RC. Physical exercise as a preventive or disease-modifying treatment of dementia and brain aging. *Mayo Clin Proc* 2011; 86(9):876-84.
10. Kronenberg G, Bick-Sander A, Bunk E, Wolf C, Ehniger D, Kempermann G. Physical exercise prevents age-related decline in precursor cell activity in the mouse dentate gyrus. *Neurobiol Aging* 2006; 27(10):1505-13.
11. O'Callaghan RM, Griffin EW, Kelly AM. Long-term treadmill exposure protects against age-related neurodegenerative change in the rat hippocampus. *Hippocampus* 2009; 19(10):1019-29.
12. Uzbay TI. The pharmacological importance of agmatine in the brain. *Neurosci Biobehav Rev* 2012; 36(1):502-19.
13. Moinard C, Cynober L, de Bandt JP. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. *Clin Nutr* 2005; 24(2):184-97.
14. Taksande BG, Kotagale NR, Patel MR, Shelkar GP, Ugale RR, Chopde CT. Agmatine, an endogenous imidazoline receptor ligand modulates ethanol anxiolysis and withdrawal anxiety in rats. *Eur J Pharmacol* 2010; 637(1-3):89-101.
15. Molderings GJ, Haenisch B. Agmatine (decarboxylated L-arginine): physiological role and therapeutic potential. *Pharmacol Ther* 2012;133(3):351-65.
16. Mun CH, Lee WT, Park KA, Lee JE. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by agmatine after transient global cerebral ischemia in rat brain. *Anat Cell Biol* 2010; 43(3):230-40.
17. Liu P, Collie ND, Chary S, Jing Y, Zhang H. Spatial learning results in elevated agmatine levels in the rat brain. *Hippocampus* 2008; 18(11):1094-8.
18. Leitch B, Shevtsova O, Reusch K, Bergin DH, Liu P. Spatial learning-induced increase in agmatine levels at hippocampal CA1 synapses. *Synapse* 2011; 65(2):146-53.
19. Rushaidhi M, Collie ND, Zhang H, Liu P. Agmatine selectively improves behavioural function in aged male Sprague-Dawley rats. *Neuroscience* 2012; 218: 206-15.
20. Rushaidhi M, Jing Y, Zhang H, Liu P. Participation of hippocampal agmatine in spatial learning: an in vivo microdialysis study. *Neuropharmacology* 2013; 65: 200-5.
21. Liu P, Jing Y, Collie ND, Chary S, Zhang H. Memory-related changes in L-citrulline and agmatine in the rat brain. *Hippocampus* 2009; 19(7):597-602.
22. Seo S, Liu P, Leitch B. Spatial learning-induced accumulation of agmatine and glutamate at hippocampal CA1 synaptic terminals. *Neuroscience* 2011;192: 28-36.
23. Campos-Ferraz PL, Bozza T, Nicastro H, Lancha AH. Distinct effects of leucine or a mixture of the branched chain amino acids (leucine, isoleucine and valine) supplementation on resistance to fatigue and muscle and liver glycogen degradation in trained rats. *Nutrition* 2013; 29: 1388-1394.

- 24.** Okudan N, Belviranli M. Long-term voluntary exercise prevents post-weaning social isolation-induced cognitive impairment in rats. *Neuroscience* 2017; 360: 1-8.
- 25.** Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
- 26.** Wang S, Chen L, Zhang L, Huang C, Xiu Y, Wang F. Effects of long term exercise on spatial learning, memory ability and cortical capillaries in aged rats. *Med Sci Monit* 2015; 21:945-54.
- 27.** Voss MW, Prakash RS, Erickson KI, et al. Plasticity of brain networks in a randomized intervention trial of exercise training in older adults. *Front Aging Neurosci* 2010; 26(32):1-17.
- 28.** Cetinkaya C, Sisman AR, Kiray M, et al. Positive effects of aerobic exercise on learning and memory functioning, which correlate with hippocampal IGF-1 increase in adolescent rats. *Neurosci Lett* 2013; 549: 177-81.
- 29.** Creer DJ, Romberg C, Saksida LM, van Praag H, Bussey TJ. Running enhances spatial pattern separation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(5):2367-72.
- 30.** Asl NA, Sheikhzade F, Torchi M, Roshangar L, Khamnei S. Long-term regular exercise promotes memory and learning in young but not in older rats. *Pathophysiology* 2008; 15(1):9-12.
- 31.** Brunelli A, Dimauro I, Sgro P, et al. Acute exercise modulates BDNF and pro-BDNF protein content in immune cells. *Med Sci Sports Exerc* 2012; 44(10):1871-80.
- 32.** Seifert T, Brassard P, Wissenberg M, et al. Endurance training enhances BDNF release from the human brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010; 298(2):372-7.
- 33.** Correia PR, Pansani A, Machado F, et al. Acute strength exercise and the involvement of small or large muscle mass on plasma brain-derived neurotrophic factor levels. *Clinics* 2010; 65(11):1123-6.
- 34.** Silhol M, Arancibia S, Maurice T, Tapia-Arancibia L. Spatial memory training modifies the expression of brain derived neurotrophic factor tyrosine kinase receptors in young and aged rats. *Neuroscience* 2007;146: 962-73.
- 35.** Adlard PA, Perreau VM, Cotman CW. The exercise-induced expression of BDNF within the hippocampus varies across life-span. *Neurobiol Aging* 2005; 26: 511-20.
- 36.** Liu P, Bergin DH. Differential effects of i.c.v. microinjection of agmatine on spatial working and reference memory in the rat. *Neuroscience* 2009; 159(3):951-61.
- 37.** Liu P, Collie ND. Behavioral effects of agmatine in naive rats are task- and delay-dependent. *Neuroscience* 2009; 163(1):82-96.
- 38.** Ahn SK, Hong S, Park YM, Lee WT, Park KA, Lee JE. Effects of agmatine on hypoxic microglia and activity of nitric oxide synthase. *Brain Res* 2011;1373: 48-54.
- 39.** Cui H, Lee JH, Kim JY, Koo BN, Lee JE. The neuroprotective effect of agmatine after focal cerebral ischemia in diabetic rats. *J Neurosurg Anesthesiol* 2012; 24(1):39-50.
- 40.** Demady DR, Jianmongkol S, Vuletich JL, Bender AT, Osawa Y. Agmatine enhances the NADPH oxidase activity of neuronal NO synthase and leads to oxidative inactivation of the enzyme. *Mol Pharmacol* 2001;59(1):24-9.
- 41.** Raghavan SA, Dikshit M. Vascular regulation by the L-arginine metabolites, nitric oxide and agmatine. *Pharmacol Res* 2004;49(5):397-414.