

Alteration in the Expression of Alzheimer's-Related Genes in Rat Hippocampus by Exercise and Morphine Treatments

Hosseinali Sasan^{1*}, Azadeh Samareh Gholami¹, Mohammad Hashemabadi^{1,2}

¹Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

²Department of Genetic, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Article Info:

Received: 6 May 2019

Revised: 13 Jul 2019

Accepted: 22 Aug 2019

ABSTRACT

Introduction: Alzheimer's disease is a progressive brain disorder, which slowly eliminates memory and intellectual ability and eventually destroys the ability to carry out the simple tasks. β amyloid plaque and neurofibrillary tangles are two important signatures of this disease, which caused by mutant in Tau, BACE1, and APP genes. They could be important targets for treatment of Alzheimer's disease. **Materials and Methods:** Twenty-eight adult male Wistar rats weighing 180-240 g were classified into four groups, including control, morphine treatment, exercise treatment, and both morphine and exercise groups. After RNA extraction from hippocampal tissues and cDNA synthesis, Real time PCR for evaluation of different expressions of BACE1 and APP genes were performed. **Results:** Data revealed that the expressions of BACE1 and APP significantly decreased during morphine and exercise treatment. **Conclusion:** The present study suggests the possible role of morphine and exercise in treatment of Alzheimer's disease, possibly due to down-regulation of BACE1 and APP.

Key words:

1. Alzheimer Disease
2. Therapeutics
3. Gene Expression
4. Exercise
5. Morphine

*Corresponding Author: Hosseinali Sasan

E-mail: hsasa@uk.ac.ir

تغییر در بیان ژن‌های مرتبط با آلزایمر در هیپوکامپ موش‌های صحرایی توسط درمان با مورفین و تمرین ورزشی

حسینعلی ساسان^{۱*}، آزاده ثمره غلامی^۱، محمد هاشم‌آبادی^{۱،۲}

^۱گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

^۲گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

اطلاعات مقاله:

پذیرش: ۳۱ مرداد ۱۳۹۸

اصلاحیه: ۲۲ تیر ۱۳۹۸

دریافت: ۱۶ اردیبهشت ۱۳۹۸

چکیده

مقدمه: بیماری آلزایمر یک اختلال مغزی پیش‌رونده است که به آرامی حافظه و قدرت تفکر را از بین برده و سرانجام توانایی انجام کارهای ساده را از فرد می‌گیرد. پلاک‌های آمیلوئیدی بتا و کلاف‌های رشته‌ای داخل نورونی دو نشانه مهم این بیماری هستند که توسط جهش در ژن‌های BACE1, Tau و APP ایجاد می‌شوند. آن‌ها می‌توانند اهداف مهمی برای درمان بیماری آلزایمر باشند. **مواد و روش‌ها:** ۲۸ موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با وزن ۱۸۰-۲۴۰ گرم به چهار گروه شامل کنترل، درمان با مورفین، درمان با ورزش و گروهی با هر دوی مورفین و ورزش تقسیم شدند. پس از استخراج بافت‌های هیپوکامپ و خالص‌سازی RNA از آن و ساخت cDNA، Real Time PCR جهت بررسی تغییرات بیان ژن‌های BACE-1 و APP انجام گرفت. **یافته‌ها:** داده‌ها نشان داد که بیان BACE1 و APP طی درمان با مورفین و ورزش کاهش معنی‌داری داشت. **نتیجه‌گیری:** مطالعه حاضر نقش احتمالی مورفین و ورزش در درمان بیماری آلزایمر احتمالاً به دلیل کاهش تنظیم BACE1 و APP را نشان می‌دهد.

کلید واژه‌ها:

۱. بیماری آلزایمر
۲. درمان
۳. بیان ژن
۴. ورزش
۵. مورفین

* نویسنده مسئول: حسینعلی ساسان

آدرس الکترونیکی: hsasa@uk.ac.ir

مقدمه

در این ژن‌ها منجر به تولید بیش از حد پلاک‌های آمیلوئید بتا می‌گردد که رسوب آن‌ها مهم‌ترین علت از بین رفتن سلول‌های عصبی است. ژن APP بر روی کروموزوم ۲۱ قرار دارد، در نتیجه افراد مبتلا به سندروم داون نیز علاوه بر مشابه با آلزایمر را در سنین ۲۰ تا ۳۰ سالگی نشان می‌دهند (۱۱). عملکرد فیزیولوژیکی ژن APP به طور دقیق مشخص نشده است و به‌عنوان موضوعی اصلی در زمینه فیزیولوژی عصبی مطرح است. با وجود اینکه در چندین مطالعه، عملکردهایی برای APP مانند نقش در اتصالات سلولی، مهاجرت نورونی (۱۲)، تولید سیناپس، بقای سلول و توزیع طبیعی نورون‌ها در مغز گزارش شده است، اما عملکرد کامل این پروتئین ناشناخته است. ژن BACE1 در انسان بر روی کروموزوم ۱۱ قرار دارد. این ژن دارای ۱۵ اگزون است، به دلیل پیرایش متناوب در این ژن انواع آسپارتیک پروتئازها ایجاد می‌شود. از پروتئازهای کد شده توسط این ژن می‌توان به آنزیم‌های بتا-سکرتاز و گاما-سکرتاز اشاره کرد. این آنزیم‌ها، آنزیم‌های کلیدی در شروع شکل‌گیری پپتیدهای بتا آمیلوئید هستند. مشخص شده است که افزایش بیان این پروتئین‌ها یکی از اصلی‌ترین عوامل در ایجاد رسوب‌های بتا آمیلوئید و در نتیجه افزایش خطر برای ایجاد بیماری آلزایمر است (۱۳، ۱۴). بنابراین برخی داروها برای هدف قرار دادن این دو پروتئین طراحی شده‌اند. همانطور که در تصویر ۱ مشخص می‌شود، میزان بیان ژن‌های APP، BACE1 طی تیمار با انجام ورزش که عامل مهم در بهبود سلامتی است و تزریق مورفین که یکی از پیش‌سازهای اصلی دوپامین به‌عنوان یکی از انتقال‌دهنده‌های عصبی است، در ناحیه هیپوکامپ موش‌های صحرایی توسط روش Real time PCR سنجیده شد.

مواد و روش‌ها

در مطالعه حاضر از ۲۸ موش نر از نژاد Wistar که ۲۴۰-۱۸۰ گرم وزن داشتند از مرکز حیوانات دانشگاه باهنر تهیه شد. این موش‌ها در دمای کنترل ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) و در چرخه نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی محصور شدند و غذا و آب در دسترس آن‌ها قرار داشت. موش‌ها به صورت تصادفی بر اساس نوع تیمار به ۴ گروه ورزش، مورفین، ورزش-مورفین و کنترل تقسیم شدند (هر گروه شامل ۷ موش). گروه کنترل تحت تأثیر هیچ یک از دو تیمار مورفین و ورزش قرار نگرفت و در گروه ورزش-مورفین، ابتدا موش‌ها ۶ هفته تحت ورزش (هوازی) بودند سپس تحت تیمار مورفین قرار گرفتند. همه آزمایش‌ها و روش کارها توسط کمیته علوم اعصاب حیوانات دانشگاه باهنر کرمان تأیید شد.

بیماری آلزایمر^۱ یکی از اصلی‌ترین و شایع‌ترین بیماری‌های سیستم عصبی است که باعث از بین رفتن حافظه و دیگر عملکردهای فکری می‌شود. اختلال در تکلم، از دست دادن حافظه و انگیزه و همچنین عدم مدیریت مراقبت از خود، از جمله نشانه‌های پیشروی این بیماری است که نهایتاً باعث عدم عملکرد اعضای حرکتی و مرگ می‌شود (۳-۱). نزدیک به ۶۰ تا ۷۰ درصد عامل زوال عقل، بیماری آلزایمر است که با افزایش سن رابطه‌ای مستقیم دارد. در حدود ۲۹/۸ میلیون نفر از مردم جهان با اختلالات مربوط به این بیماری رو به رو هستند و پیش‌بینی شده است که این تعداد در سال ۲۰۵۰ به چهار برابر افزایش پیدا می‌کند (۴). اصلی‌ترین عامل خطر^۲ برای این بیماری، سن است. عواملی همانند ژنتیک فردی، آسیب‌های وارد شده به ناحیه سر، افسردگی، فشارخون بالا، دیابت و چاقی نیز می‌توانند به پیشرفت و بروز نشانه‌های این بیماری کمک کنند (۵).

بیماری آلزایمر با از دست رفتن سلول‌های عصبی و ارتباطات بین آن‌ها در ناحیه قشر مغزی و همچنین نواحی خاصی از زیر قشر مغز آغاز می‌شود (۶). از لحاظ پاتولوژی، اصلی‌ترین نشانه‌های این بیماری، رسوب خارج سلولی پلاک‌های بتا آمیلوئید^۳، تظاهر تجمعات پروتئین فسفریله Tau به نام NFTs^۴ و در نهایت از بین رفتن نورون‌های ناحیه هیپوکامپ^۵ مغز است (۷). در این بین پلاک‌های بتا آمیلوئید حاصل پروتئولیز داخلی پروتئین APP است که این واکنش توسط پروتئین بتا سکرتاز ایجاد شده از ژن BACE1 انجام می‌گیرد (۸). بسیاری از دانشمندان برای یافتن علت این بیماری فرضیه‌های متفاوتی ارائه کرده‌اند. اولین فرضیه‌ای که علت ایجاد این بیماری را توضیح می‌دهد، فرضیه فقدان استیل کولین است که مشکلات ناشی از این بیماری را به نبود استیل کولین به‌عنوان یکی از اصلی‌ترین انتقال‌دهنده‌های عصبی^۶ ربط می‌دهد. به طور کلی فرضیه‌ای که بیشتر مورد پذیرش دانشمندان است، تجمعات پلاک‌های بتا آمیلوئید و NFTs می‌باشد. با وجود تلاش‌های مهمی که در راستای درمان هدفمند این بیماری انجام شده است، اما تاکنون هیچ درمان مؤثری برای متوقف کردن پیشرفت این بیماری توسعه پیدا نکرده است (۹).

آلزایمر به دو نوع خانوادگی و تک‌گیر تقسیم‌بندی می‌شود که جهش در ژن‌های APP، BACE1 و Tau بیشتر نوع خانوادگی را باعث می‌شود (۱۰). جهش

¹ Alzheimer disease

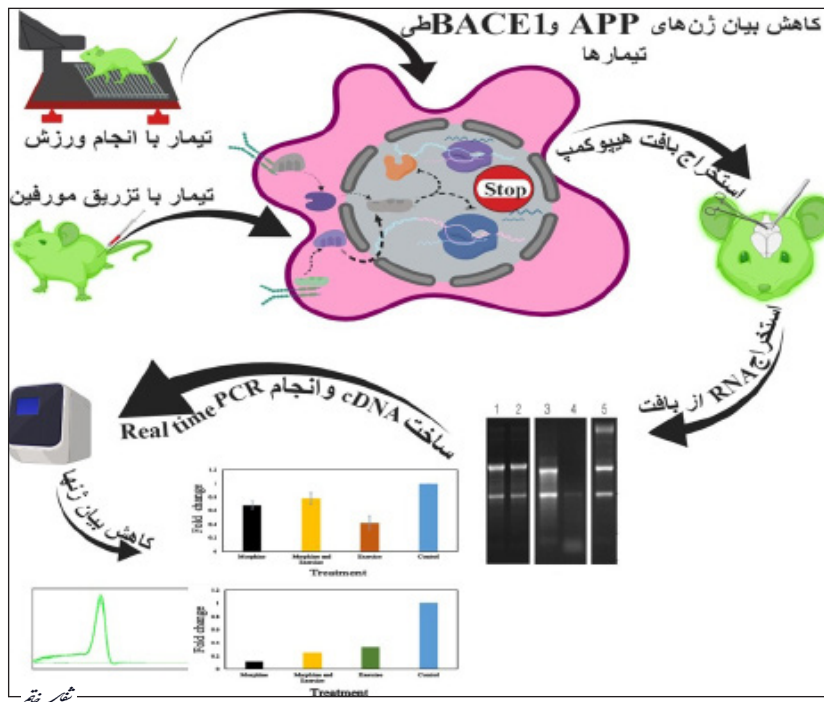
² Risk factor

³ β amyloid plaques

⁴ Neurofibrillary tangles

⁵ Hippocampus

⁶ Neurotransmitter



تصویر ۱- نمای کلی از مطالعه حاضر که در آن پس از انجام تیمارهای ورزش و مورفین، بیان ژن‌های BACE1 و APP با روش Real time PCR در هیپوکامپ موش‌های صحرایی سنجیده شد.

دستورالعمل انجام ورزش هوایی

دستورالعمل انجام این تیمار بر روی موش‌ها به سه بخش تقسیم می‌شود. در هفته اول برای سازگار شدن موش‌ها با دستگاه تردمیل دویدن را هر روز یکبار و با سرعت کم که برابر با ۱۰ متر در هر دقیقه برای مدت ۱۵ دقیقه بود شروع شد. طی هفته‌های ۲ تا هفته چهارم برای مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۸ متر در هر دقیقه، موش‌ها را تیمار می‌کنیم. از هفته چهارم تا هفته هفتم هر روز ابتدا موش‌ها را با سرعت ۲۵ متر در هر دقیقه به مدت ۵ دقیقه گرم کرده و سپس با سرعت ۲۱ متر بر دقیقه تیمار ورزش ادامه داده شد.

دستورالعمل تزریق مورفین

ترکیب مورفین-سولفات را در بافر فسفات با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر حل کرده و برای تزریق از نسبت وزن موش استفاده شد و به ازای هر کیلوگرم از وزن موش‌ها مقدار ۱ سی سی از محلول ساخته شده درون صفاق موش تزریق شد که در مجموع دوز ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم موش طی مدت ۸ روز به موش‌ها تزریق درون صفاقی شد.

استخراج RNA و واکنش رونویسی معکوس

۴۸ ساعت پس از انجام آخرین تیمار، بافت هیپوکامپ را از مغز موش‌ها جدا کرده و مستقیماً در نیتروژن مایع نگه داشته شد. برای استخراج RNA، ۵۰ میلی‌گرم از بافت جدا شده را وزن کرده و با یک میلی‌لیتر از محلول (TriPure Isolation Reagent شرکت Roche) آن را همگن کرده و با دستورالعمل کیت، RNA بافت

استخراج گردید. برای بررسی کیفیت و کمیت RNA استخراج شده، به ترتیب درون ژل آگارز یک درصد ران شد و باندهای مربوط به RNA های ریبوزومی مشاهده شد. سپس کمیت و خلوص RNA با روش کمی طیف سنجی جذبی با دستگاه نانودراپ انجام شد. میزان یک میکروگرم از RNA استخراج شده را توسط کیت Thermo RevertAid First Strand cDNA Synthesis شرکت fisher تحت واکنش رونویسی معکوس قرار داده و به cDNA تبدیل گردید.

واکنش Real time PCR

سطح بیان ژن‌های APP و BACE1 با در نظر گرفتن ژن GAPDH به‌عنوان کنترل داخلی با استفاده از واکنش Real time PCR سنجیده شد. لیست پرایمرهای اختصاصی برای این ژن‌ها طراحی شد (جدول ۱). واکنش سنجش بیان، با مقدار یک میکرولیتر cDNA، یک میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت و ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین (SMOBIO) که با آب مقطر حجم‌ها را در ۲۰ میکرولیتر تنظیم می‌کنیم. دستگاه Analytical gena برای انجام این واکنش مورد استفاده قرار گرفت. برنامه دمایی این واکنش در جدول ۲ بیان شده است.

آنالیزهای آماری

تمامی آنالیزها از لحاظ آماری با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۴ انجام شد. برای مقایسه بین گروه‌ها از روش ANOVA استفاده شد. داده‌ها بر روی نمودار بر اساس (میانگین \pm خطای استاندارد) و با $P < 0.05$ به‌عنوان حداقل سطح

جدول ۱- توالی پرایمرهای اختصاصی برای انجام آزمایش Real time PCR

نام پرایمر	توالی پرایمرهای اختصاصی برای ژن ها	طول محصول (bp)	دمای اتصال پرایمرها (°C)
APRF	5- GCAGAATGGA AAAATGGGAGTCAG	۱۹۹	۵۶
APRR	5- AATCACGATGTGGGTGTGCGTC		
BACRF	5- AATCAGTCCTTCCGCATCAC	۱۷۰	۵۹/۵
BACRR	5- ATGTGGICTTTGATCGAGCC		
GAPRF	5- GCGAGATCCCGCTAACATCA	۱۷۸	۵۷
GAPRR	5- CTCGTGGTTCACACCCATCA		

شماره ۳

جدول ۲- برنامه دمایی برای انجام واکنش Real Time PCR

مرحله	دما	زمان (دقیقه)	تعداد سیکل
واسرشتگی اولیه	۹۵ (°C)	۱۰ دقیقه	۱
واسرشتگی	۹۵ (°C)	۶ ثانیه	۳۵
اتصال	۵۶-۶۰ (°C)	۳۰ ثانیه	
طویل شدن	۷۲ (°C)	۳۰ ثانیه	
طویل شدن نهایی	۷۲ (°C)	۵ دقیقه	۱

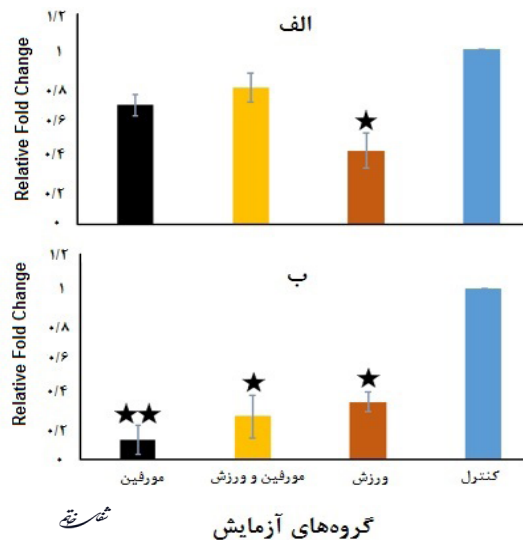
شماره ۳

موش‌های تحت تیمار ورزش و مورفین و موش‌های تحت تیمار این دو با هم، کاهش معنی‌داری در بیان نسخه‌هایی از ژن‌های APP و BACE1 نشان دادند. میانگین بیان نسبی ژن APP برای تیمار مورفین برابر با ۰/۶۸، برای تیمار انجام ورزش ۰/۴۲ و برای موش‌های تحت هر دو تیمار مورفین و ورزش برابر با ۰/۷۸ با $P=0/036$ محاسبه شدند. همچنین این مقادارها برای ژن BACE1 به ترتیب برابر با ۰/۱۲، ۰/۳۳ و ۰/۲۵ با $P=0/044$ محاسبه شد (جدول ۳).

معنی‌داری نمایش داده شد.

یافته‌ها

بیان نسبی ژن‌های BACE1 و APP در ناحیه هیپوکامپ موش‌های صحرایی با استفاده از روش Real time PCR سنجیده شد. موش‌های بدون هیچ کدام از تیمارهای ورزش و مورفین، به‌عنوان کنترل و میانگین هر یک از ژن‌های آن‌ها مقدار ۱ در نظر گرفته شد (نموار ۱).



نموار ۱- بیان متفاوت ژن‌های APP (الف) و BACE1 (ب) طی تیمارهای تزریق مورفین و انجام ورزش در موش صحرایی.

جدول ۳- بیان ژن‌های BACE1 و APP به صورت میانگین و انحراف استاندارد در گروه‌های متفاوت موش‌های صحرایی.

تیمار	میانگین بیان ژن BACE1	میانگین بیان ژن APP
مورفین	۰/۰۹ ± ۰/۱۲	۰/۰۵۹ ± ۰/۰۶۸
ورزش	۰/۰۶۱ ± ۰/۰۳۳	۰/۰۹ ± ۰/۰۴۲
مورفین-ورزش	۰/۱۲ ± ۰/۰۲۵	۰/۰۸۲ ± ۰/۰۷۸

شماره ۳

انجام شده است، به ترتیب با ۰/۷۸ و ۰/۲۵ نسبت به کنترل کاهش پیدا کرده‌اند. به تازگی مشخص شده است که فعالیت بدنی منظم به‌عنوان یک ضرورت برای سبک زندگی سالم با تعدیل سازگاری‌های CNS^۷ و به‌خصوص هیپوکامپ که در یادگیری و حافظه نقش بسزایی دارد تأثیر می‌گذارد (۱۹). ورزش موجب بهبود عملکرد عضلانی و نیز به‌طور چشمگیری موجب افزایش یادگیری و حافظه می‌گردد (۲۰) و به‌شدت با افزایش بیان فاکتورهای محافظت‌کننده نوروئی (BDNFs)^۸ چون BDNFs در ارتباط است. همچنین تنظیم منفی بیان ژن BACE1 توسط BDNFs طی مطالعات قبل ثابت شده است (۲۱). از طرفی کاهش بیان BACE1 با کاهش رسوبات پلاک‌های آمیلوئیدی در ارتباط است. بنابراین احتمال کاهش این ژن طی تیمار ورزش توسط واکنش فاکتورهای محافظت‌کننده نوروئی با این ژن، وجود دارد. با توجه به موارد ذکر شده و این موضوع که عامل اصلی بیماری آلزایمر و پلاک‌های آمیلوئیدی، افزایش وجود پروتئین APP است و همچنین نشان داده شده که بیان پروتئین بتا سكرتاز در بافت مغز بسیار بیشتر از دیگر بافت‌ها است و اینکه بیان این پروتئین با افزایش سن بالا می‌رود (۲۲)، می‌توان اظهار داشت که تیمارهای ماده مورفین و ورزش تأثیر مثبتی در بهبود و سلامتی افراد در جلوگیری از ابتلا به بیماری آلزایمر دارند بنابراین می‌توان از این موارد در پیشگیری و شاید در آینده در درمان این بیماری استفاده کرد.

بحث و نتیجه‌گیری

بیماری آلزایمر با درگیر شدن تعداد ۵ میلیون و ۴۰۰ هزار نفر در آمریکا به‌عنوان یکی از مهم‌ترین اختلالات سیستم عصبی است که نیاز به توجه برای پیدا کردن مسیری برای درمان دارد (۱۵). تحقیقات گسترده برای علت این بیماری باعث شد تا علت را در دو عامل مهم جستجو کرد، یکی از آن‌ها پلاک‌های خارج سلولی آمیلوئیدهای بتا است (۱۶) و کم شدن این رسوبات نشان‌دهنده بهبود بیماری است و دیگری کلاف‌های رشته‌های درهم تابیده داخل نوروئی که علت آن پروتئین Tau است (NFTs). با توجه به افزایش تعداد بیماران آلزایمری در جهان، به‌شدت نیاز برای یک درمان مؤثر احساس می‌شود، اگرچه تلاش‌های بی‌ظنیری در سطح سیستم ایمنی برای درمان این بیماری انجام شده، اما اکثر آن‌ها با شکست رو به رو شده‌اند (۱۷). البته هدف قرار دادن پلاک‌های آمیلوئیدی ایجاد شده توسط APP و BACE1 توسط سیستم ایمنی ممکن است موفقیت‌آمیزتر باشد (۱۸). کاهش این دو پروتئین منجر به کاهش پلاک‌های بتا آمیلوئید شده و در نتیجه احتمال بهبود این بیماری زیاد می‌شود.

مطالعه حاضر نشان داد که بیان ژن‌های APP و BACE1 طی انجام تیمار مورفین به ترتیب ۰/۶۷ و ۰/۱۲ و برای ورزش دوییدن، در طول مدت انجام این تیمار برابر با ۰/۴۲ و ۰/۳۳ و همچنین بیان این دو ژن برای گروه دیگر از موش‌های صحرایی که هر دو تیمار بر روی آن‌ها

منابع

1. Peric A, Annaert W. Early etiology of Alzheimer's disease: tipping the balance toward autophagy or endosomal dysfunction? *Acta Neuropathol.* 2015; 129(3): 363-81.
2. Dal Forno G, Palermo MT, Donohue JE, Karagiozis H, Zonderman AB, Kawas CH. Depressive symptoms, sex, and risk for Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 2005; 57(3): 381-7.
3. Risacher SL, Saykin AJ. Neuroimaging and other biomarkers for Alzheimer's disease: the changing landscape of early detection. *Annu Rev Clin Psychol.* 2013; 9: 621-48.
4. Reitz C, Mayeux R. Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol.* 2014; 88(4): 640-51.
5. Vinters HV. Emerging concepts in Alzheimer's disease. *Annual Review of Pathology. Mechanisms of Disease.* 2015; 10: 291-319.
6. Khachaturian ZS. Diagnosis of Alzheimer's disease. *Archives of Neurology.* 1985; 42(11): 1097-105.
7. Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* 2001; 81(2): 741-66.
8. Sun X, He G, Qing H, Zhou W, Dobie F, Cai F, et al. Hypoxia facilitates Alzheimer's disease pathogenesis by up-regulating BACE1 gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(49): 18727-32.
9. Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science.* 2002; 298(5594): 789-91.
10. Rossor M, Fox N, Freeborough P, Harvey R. Clinical features of sporadic and familial Alzheimer's disease. *Neurodegeneration.* 1996; 5(4): 393-7.

⁷ Central nervous system

⁸ Brain-derived neurotrophic factors

11. Dorostkar MM, Zou C, Blazquez-Llorca L, Herms J. Analyzing dendritic spine pathology in Alzheimer's disease: problems and opportunities. *Acta Neuropathol.* 2015; 130(1): 1-19.
12. Manocha GD, Floden AM, Rausch K, Kulas JA, McGregor BA, Rojanathammanee L, et al. APP regulates microglial phenotype in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2016; 36(32): 8471-86.
13. Niwa K, Kazama K, Younkin SG, Carlson GA, Iadecola C. Alterations in cerebral blood flow and glucose utilization in mice overexpressing the amyloid precursor protein. *Neurobiol Dis.* 2002; 9(1): 61-8.
14. Cheon M, Dierssen M, Kim S, Lubec G. Protein expression of BACE1, BACE2 and APP in Down syndrome brains. *Amino Acids.* 2008; 35(2): 339-43.
15. Association As. 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 2016; 12(4): 459-509.
16. Duce JA, Bush AI. Biological metals and Alzheimer's disease: implications for therapeutics and diagnostics. *Prog Neurobiol.* 2010; 92(1): 1-18.
17. Salloway S, Sperling R, Fox NC, Blennow K, Klunk W, Raskind M, et al. Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2014; 370(4): 322-33.
18. Sevigny J, Chiao P, Bussière T, Weinreb PH, Williams L, Maier M, et al. The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature.* 2016; 537(7618): 50-6.
19. Kosten TR, George TP. The neurobiology of opioid dependence: implications for treatment. *Sci Pract Perspect.* 2002; 1(1): 13-20.
20. Sutoo De, Akiyama K. Regulation of brain function by exercise. *Neurobiol Dis.* 2003; 13(1): 1-14.
21. Devi L, Ohno M. 7, 8-dihydroxyflavone, a small-molecule TrkB agonist, reverses memory deficits and BACE1 elevation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology.* 2012; 37(2): 434-44.
22. Vassar R, Kandalepas PC. The β -secretase enzyme BACE1 as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther.* 2011; 3(3): 20. doi: 10.1186/alzrt82.