

Orta Yaşlı Sıçanlarda Rivastigminin Melatonin Reseptörleri Üzerindeki Cinsiyete Bağlı Etkileri

Sex-Dependent Effects of Rivastigmine on Melatonin Receptors in Middle-Aged Rats

¹Nilüfer AKGÜN ÜNAL¹, ²Elif TÜRKDÖNMEZ AK², ³Ömer ÜNAL³, ⁴Erdal AĞAR⁴, ⁵Mustafa AYYILDIZ⁴

¹Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye

²Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Ordu, Türkiye

³Samsun Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye

⁴Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye

ÖZ

Giriş ve Amaç: Melatonin (5-metoksi-N-asetiltryptamin), vücudun doğal sirkadiyen ritmiyle yakından bağlantılıdır. Demans, yaşlı bireylerde önemli ölçüde daha yaygındır. Rivastigmin (RIVA), demans semptomlarını hafifletmek için reçete edilen asetilkolinesteraz ve bütirikolinesterazın geri dönüşümlü bir inhibitörü olarak işlev görür. Belirli semptomları tedavi etmedeki etkinliğine rağmen, RIVA'nın nöroendokrin etkileşimlerinin ardındaki mekanizma henüz netlik kazanmamıştır. Araştırmamız, orta yaşlı, 13 aylık erkek ve dişi sıçanlarda RIVA'nın hafıza, anksiyete ve melatonin reseptör genleri MT1 ve MT2'nin ekspresyonu üzerindeki etkilerini araştırmayı amaçlamıştır.

Yöntem: Sıçanlara, on gün boyunca günde bir kez 2 mg/kg RIVA veya tuzlu su intraperitoneal enjeksiyon olarak uygulandı. Son enjeksiyondan yirmi dört saat sonra, sıçanlara Y-labirent ve yükseltilmiş artı labirent testleri uygulandı ve ardından qPCR analizi için doku örnekleri toplandı.

Bulgular: Davranış testleri cinsiyete özgü yanıtlar ortaya koydu; RIVA, dişi sıçanlarda keşif davranışlarını değiştirmede ve kontrollerle karşılaştırıldığında erkek sıçanlarda azalışa neden oldu. Aynı zamanda, RIVA tedavisi her iki cinsiyetin hipokampusunda MT1 ve MT2 gen ekspresyonunda önemli azalmalara neden oldu, ancak kortikal ekspresyon erkeklerde ve dişilerde farklı sonuçlar gösterdi.

Sonuç: Orta yaşlı sıçanlarda RIVA tedavisi, davranışsal değişikliklerle birlikte MT1 ve MT2 gen ekspresyonunda değişikliklere neden olabilir. Melatonin reseptör ekspresyonundaki cinsiyetler arası farklılık, yaşanan popülasyonlarda cinsiyete bağlı bir etki potansiyeline işaret ederek kolinerjik ve melatonerjik sistemler arasında bir etkileşim olduğunu düşündürmektedir.

Anahtar Sözcükler: Anksiyete, bellek, cinsiyet, kolinerjik sistem, melatonin, rivastigmin, yaşlanma

ABSTRACT

Introduction: Melatonin (5-methoxy-N-acetyltryptamine) is closely linked to the body's natural circadian rhythm. Dementia is significantly more common among older individuals. Rivastigmine (RIVA) functions as a reversible inhibitor of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, prescribed to help alleviate the symptoms of dementia. The mechanism behind RIVA's neuroendocrine interactions remains unclear despite its efficacy in treating specific symptoms. Our research aimed to investigate the effects of RIVA on memory, anxiety, and the expression of melatonin receptor genes MT1 and MT2 in middle-aged, 13-month-old male and female rats.

Methods: Rats were administered intraperitoneal injections of 2 mg/kg RIVA or saline once a day for ten days in succession. Twenty-four hours after the final injection, rats underwent the Y-maze and elevated plus maze tests, after which tissue samples were collected for qPCR analysis.

Results: Behavioral tests revealed sex-specific responses; elevated plus maze test results indicated that RIVA did not alter exploratory behavior in female rats but decreased it in male rats compared to controls. At the same time, RIVA treatment resulted in significant decreases of MT1 and MT2 gene expression in the hippocampus of both sexes, but cortical expression showed different patterns in males and females.

Conclusion: RIVA treatment in middle-aged rats may cause changes in MT1 and MT2 gene expression concomitant with behavioral alterations. The variation in melatonin receptor expression across sexes indicates a potential sex-dependent impact in aging populations, suggesting an interaction between cholinergic and melatonergic systems.

Keywords: Aging, anxiety, cholinergic system, melatonin, memory, rivastigmine, sex

Cite this article as: Akgün Ünal N, Türkdönmez Ak E, Ünal Ö, Agar E, Ayyıldız M. Sex-Dependent Effects of Rivastigmine on Melatonin Receptors in Middle-Aged Rats. Arch Neuropsychiatry 2026;63:354–360. doi: 10.29399/npa.29283

GİRİŞ

Melatonin, amfipatik özelliklere sahip bir indolamindir ve güçlü bir antioksidan ve sirkadiyen ritimlerin düzenleyicisi olarak görev yapar (1,2). Yaşlanma süreci, fiziksel uyum yeteneğinde kademeli bir azalma ve vücudun doğal uyku-uyanıklık döngüsünde bozulmalarla belirlenir ve bu da melatonin salgılanmasında önemli bir azalmaya neden olur

(1). Melatonin seviyelerindeki yaşa bağlı düşüş, Alzheimer hastalığı (AH) gibi nörodejeneratif bozukluklarda sıklıkla kötüleşir (3). G-protein bağlı reseptörler olan MT1 ve MT2 melatonin reseptörleri, bilişsel işlev için kritik bölgeler olan hipokampus ve prefrontal korteks de dâhil olmak üzere merkezi sinir sisteminde yaygın olarak bulunur (4).

Öne Çıkan Noktalar

- Rivastigmin, MT1/MT2 ekspresyonunu cinsiyete özgü farklılıklarla düzenler.
- Reseptör değişimleri, cinsiyete bağlı davranış farklılıklarıyla uyumludur.
- Melatonerjik yanıt farkları, cinsiyete özgü farmakoterapi gerektirmektedir.
- MT1/MT2 plastisitesi, kolinerjik tedavinin bilişsel etkilerinde rol oynar.

Hafıza, öğrenme ve nöronal gelişimden sorumlu merkezi kolinerjik sistem, bireyler yaşlandıkça önemli ölçüde dejenerasyona uğrar. Demans için standart tedaviler arasında, kolinerjik iletimi artırmayı amaçlayan rivastigmin (RIVA) gibi asetilkolinesteraz inhibitörleri (AChEI'ler) bulunur (6). Geri dönüşümlü bir kolinesteraz inhibitörü olan RIVA, Asetilkolin (ACh) ve bütirikolinesteraz (BuChE) metabolizmasını yavaşlatır. RIVA'nın temel etkisi kolinerjik potansiasyondur, ancak diğer nöroendokrin sistemlerle, özellikle de melatonerjik sistemle etkileşimleri daha fazla araştırmaya ihtiyaç duymaktadır.

Son çalışmalar, kolinerjik sinyalleme ve melatonin reseptörleri arasında işlevsel bir etkileşim olduğunu öne sürmektedir (7). Örneğin, bilişsel bozukluk genellikle her iki sistemdeki anormalliklerle ilişkilendirilir ve melatoninin kolinerjik işlevi düzenlediği gösterilmiştir (8,9). Ancak, kronik kolinesteraz inhibisyonunun orta yaşlı organizmalarda melatonin reseptör ekspresyonunu nasıl etkilediği ve bu etkinin cinsiyete bağlı olup olmadığı konusunda literatürde bir boşluk bulunmaktadır. Cinsiyet farklılıklarının nörodejeneratif hastalıkların yaygınlığı ve patolojisinde önemli bir rol oynadığı düşünüldüğünde, bu etkileşimlerin anlaşılması hayati önem taşımaktadır.

Özetle, bu çalışma, 10 günlük bir RIVA tedavisinin orta yaşlı erkek ve dişi sıçanların hipokampusu ve korteksindeki anksiyete, hafıza ve MT1 ve MT2 reseptörlerinin gen ekspresyonu üzerindeki etkilerini araştırmayı amaçlamaktadır. Kronik kolinerjik stimülasyonun melatonin reseptör ekspresyonunu ve davranışsal sonuçları cinsiyete bağlı olarak farklı şekilde değiştireceği hipotezini öne sürdük.

YÖNTEM

Deney Hayvanları ve Gruplar

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (2024/14) onay alındıktan sonra, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nden (OMÜ DEHAM) 13 aylık erkek (n=20) ve dişi (n=20) Wistar sıçanları temin edildi. Wistar sıçanlarının yaşam süreleri göz önünde bulundurularak, 13 aylık hayvanlar yaşlanmaya geçiş dönemini temsil eden orta yaşlı olarak sınıflandırıldı (10). Sıçanlar, standart koşullar altında (22±1°C, 12 saat aydınlık/karanlık döngüsü) ve istedikleri zaman yiyecek ve suya erişimleri sağlanarak barındırıldı. Hayvanlara ARRIVE yönergeleri ve kurumsal düzenlemelere uygun olarak muamele edildi.

Kırk sıçan rastgele dört gruba ayrıldı (grup başına 10 sıçan):

1. Erkek Kontrol Grubu (MC): Tuzlu su uygulandı.
2. Erkek RIVA Grubu (MR): RIVA uygulandı (2 mg/kg).
3. Dişi Kontrol Grubu (FC): Tuzlu su ile tedavi edildi.
4. Dişi RIVA Grubu (FR): RIVA ile tedavi edildi (2 mg/kg).

Tablo 1. Hedef genlerin primer dizileri

MT1 F	CCTCTACATCAGCCTCATCTGGCT
MT1 R	AGCCAGATGAGGCTGATGTAGAGG
MT2 F	GCCACAGTCTCAAGTATGATAGC
MT2 R	CCTATCATACTTGAGACTGTGGC
GAPDH F	ACCACCATGGAGAAGGCTGG
GAPDH R	CTCAGTGTAGCCAGGATGC

İşlemler

Rivastigmin tartrat steril salin içinde çözüldü. Sıçanlara, 10 gün boyunca günde bir kez intraperitoneal (i. p.) RIVA (2 mg/kg) veya salin enjeksiyonları uygulandı. Davranış testleri, son enjeksiyondan 24 saat sonra, saat 10:00 ile 14:00 arasında gerçekleştirildi.

Davranış Testleri

Uzamsal çalışma belleği ve keşifsel davranışı değerlendirmek için Y-labirent testi kullanıldı (11). Cihaz üç koldan (A, B ve C) oluşuyordu. Analiz edilen parametreler arasında dönüşüm sayısı, A, B ve yeni kollara (C) giriş sayısı ve bu kollarda geçirilen süre yer alıyordu. Anksiyete benzeri davranışları değerlendirmek için Yükseltmiş Artı Labirent (EPM) kullanıldı. Açık ve kapalı kollarda geçirilen süre ve giriş sayısı 5 dakikalık bir seans boyunca kaydedildi.

Gen Ekspresyon Analizi (qPCR)

Davranış testlerinden yirmi dört saat sonra, sıçanlar Ketamin (90 mg/kg, i. p.; Alfasan, Woerden, Hollanda) ve Ksilazin (10 mg/kg, i. p.; Alfasan, Woerden, Hollanda) ile anestezi altına alındı ve dekapitasyon yoluyla öldürüldü. Sağ somatosensoriyel korteks ve hipokampus hızla diseke edildi. Üreticinin talimatlarına göre TRIzol reaktifi (Invitrogen, Carlsbad, CA, ABD) kullanılarak toplam RNA izole edildi. RNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonu bir NanoDrop 2000 spektrofotometresi (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak belirlendi. cDNA sentezi, Yüksek Kapasiteli cDNA Ters Transkripsiyon Kiti (Applied Biosystems, Foster City, CA, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Kantitatif PCR, StepOnePlus™ Real-Time PCR Sistemi (Applied Biosystems, ABD) cihazında Power SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Döngü koşulları şu şekildeydi: 10 dakika boyunca 95 °C'de, ardından 15 saniye boyunca 95 °C'de ve 1 dakika boyunca 60 °C'de olmak üzere 40 döngü. Ürünlerin özgüllüğünü doğrulamak için erime eğrisi analizi yapıldı. Tüm örnekler üç tekrarlı olarak çalışıldı. Göreceli gen ekspresyonu, GAPDH'nin iç kontrol olarak kullanıldığı 2^{-ΔΔCt} yöntemi (12) kullanılarak hesaplandı. Kalibratör grubu, aynı cinsiyetten ilgili tuzlu su ile tedavi edilen kontrol grubuydu. Kullanılan hedef genlerin primer dizileri Tablo 1'de gösterilmiştir.

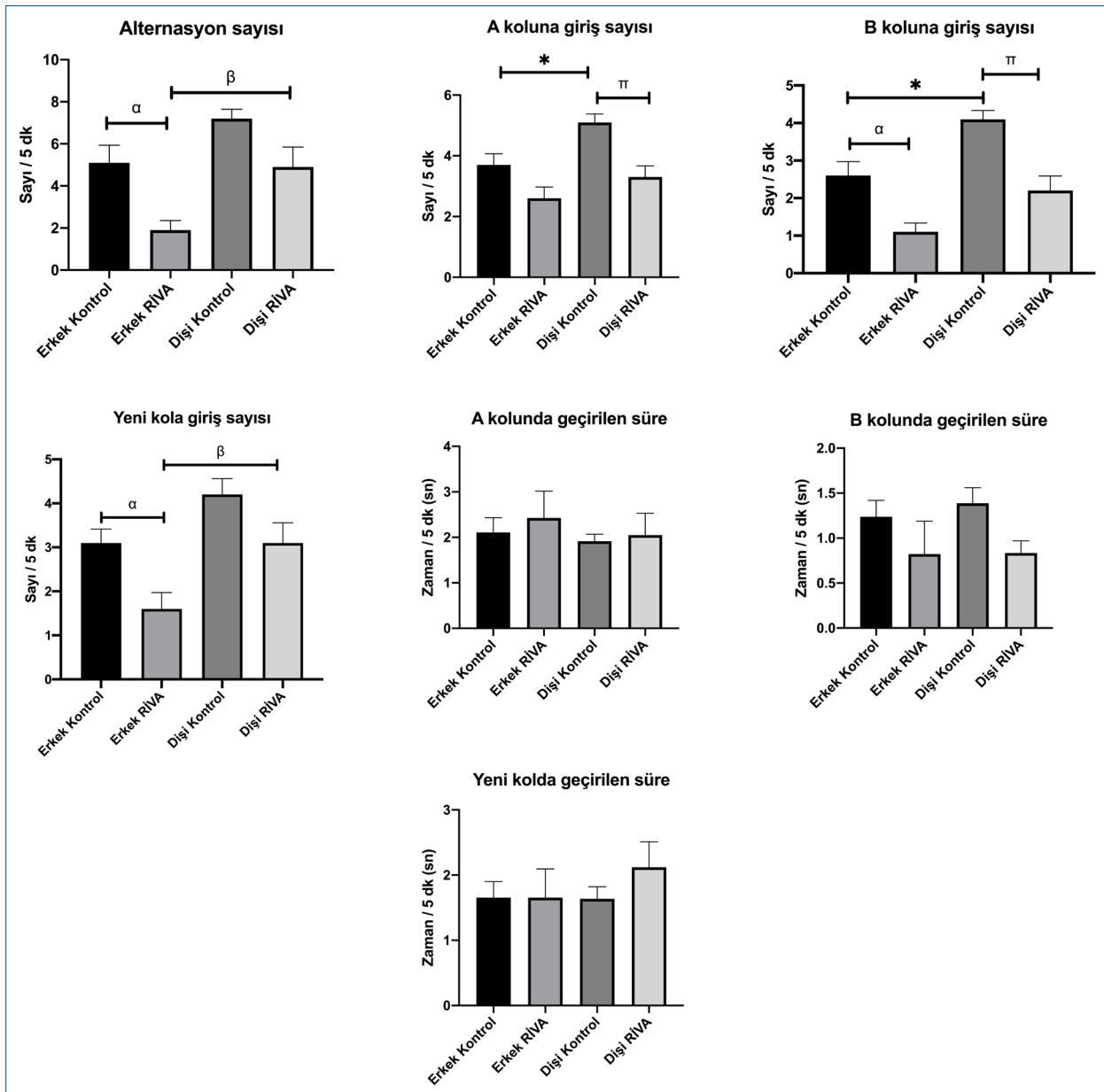
İstatistiksel Yöntemler

Veriler GraphPad Prism (Sürüm 10) kullanılarak analiz edildi. Normallik, Shapiro-Wilk testi kullanılarak değerlendirildi. Çalışma tasarımı iki faktör (Cinsiyet ve Tedavi) içerdiğinden, veriler İki Yönlü ANOVA ve ardından çoklu karşılaştırmalar için Tukey post-hoc testi kullanılarak yapıldı. Sonuçlar ortalama ± ortalamanın standart hatası (SEM) olarak sunuldu. p değeri <0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Davranışsal Bulgular

Y-labirent testinde, RIVA tedavisi keşifsel davranış ve hareket aktivitesinde cinsiyete özgü değişikliklere neden olmuştur. İki yönlü ANOVA, gruplar arasında önemli farklılıklar ortaya koymuştur. Erkek sıçanlarda, RIVA tedavisi, kontrollere kıyasla toplam kol giriş sayısını (MC: 9,4±0,96/ya



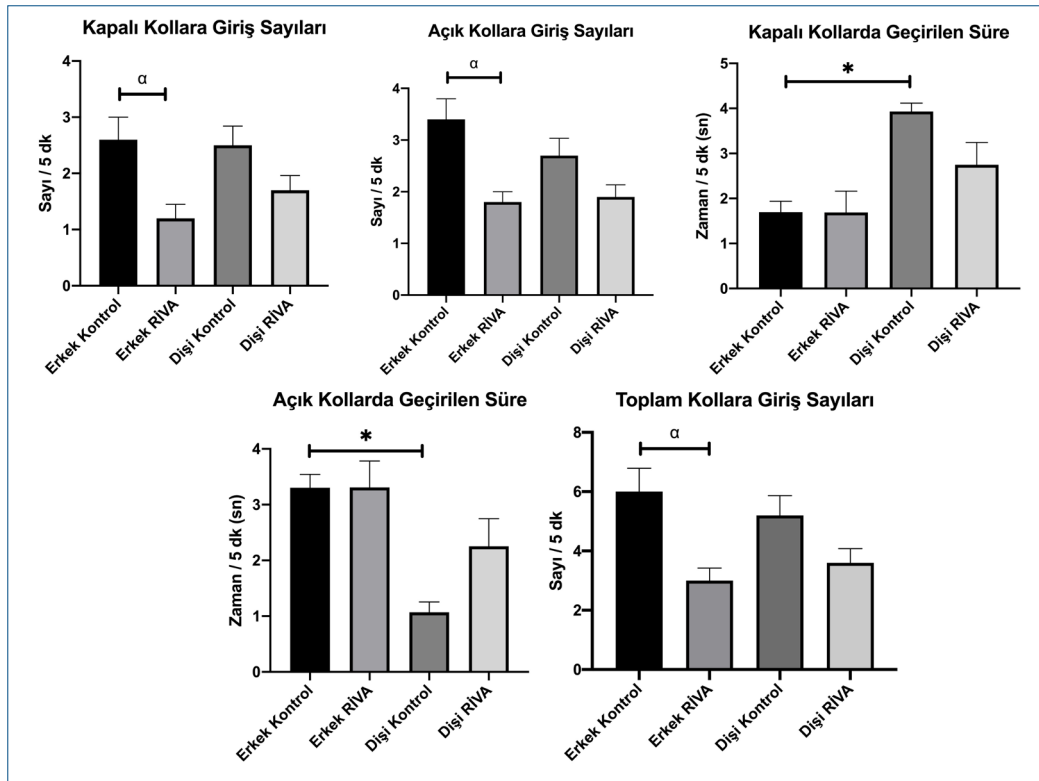
Şekil 1. Tüm gruplar için Y labirent testi sonuçları. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak gösterilmiştir. Erkek RIVA (MR) (n=10); erkek kontrol (MC) (n=10); dişi RIVA (FR) (n=10) ve dişi kontrol (FC) (n=10) Wistar sıçan gruplarında on gün boyunca 2 mg/kg RIVA tedavisinin Y labirent testi parametreleri üzerindeki etkileri (α : MC ve MR grupları; β : MR ve FR grupları; *: MC ve FC grupları; π : FC ve FR grupları $p < 0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlıdır).

kıyasla MR: $4,9 \pm 0,85$; $p < 0,0001$) ve değişim sayısını (MC: $5,1 \pm 0,84$ 'e kıyasla MR: $1,9 \pm 0,46$; $p < 0,0001$) önemli ölçüde azaltmıştır; bu da hareket aktivitesinin ve uzamsal çalışma belleğinin azaldığını göstermektedir (Şekil 1). Ayrıca, RIVA ile tedavi edilen erkeklerde yeni kola (Kol C) (MC: $3,1 \pm 0,31$ 'e karşı MR: $1,6 \pm 0,37$; $p = 0,0003$) ve Kol B'ye (MC: $2,6 \pm 0,37$ 'ye karşı MR: $1,1 \pm 0,23$; $p < 0,0001$) girişlerde önemli bir azalma görüldü (Şekil 1). Buna karşılık, dişi sıçanlar farklı başlangıç ve tedaviyle ilişkili örüntüler sergiledi. Dişi kontroller, erkek kontrollerine kıyasla daha yüksek lokomotor aktivite gösterdi (FC: $13,4 \pm 0,75$ 'e karşı MC: $9,4 \pm 0,96$). Rivastigmin tedavisinin ardından dişiler, kontrollerine kıyasla toplam kol girişlerinde de bir azalma gösterdi (FC: $13,4 \pm 0,75$ 'e karşı FR: $8,6 \pm 1,14$). Yükseltilmiş Artı Labirent testinin sonuçları Şekil 2'de sunulmuştur. Rivastigmin tedavisi erkeklerde kollara giriş sayısını önemli ölçüde azalttı (MC: $6,0 \pm 0,79$ 'a kıyasla MR: $3,0 \pm 0,42$; $p = 0,0041$), Y labirentinde gözlemlenen lokomotor aktivitedeki azalmayı daha da doğruladı. Özellikle, RIVA ile tedavi edilen erkek sıçanlar açık kola önemli ölçüde daha az giriş gösterdi (MC: $3,4 \pm 0,40$ 'a kıyasla MR: $1,8 \pm 0,20$; $p = 0,0017$) (Şekil 2). Kaygı benzeri

davranışlardaki cinsiyet farklılıklarına gelince, dişi kontroller erkek kontrollerine kıyasla açık kollarda önemli ölçüde daha az, kapalı kollarda ise önemli ölçüde daha fazla zaman geçirdi (FC: $3,93 \pm 0,19$ sn'ye kıyasla MC: $1,7 \pm 0,24$ sn) ($p = 0,0003$). Bu model, dişilerde erkeklerle kıyasla önemli ölçüde daha yüksek bir temel kaygı benzeri davranışı yansıtmaktadır (Şekil 2). Rivastigmin tedavisi, erkeklerde kontrol grubuna kıyasla açık veya kapalı kollarda geçirilen süreyi önemli ölçüde değiştirmemiştir (MR Açık: $3,31 \pm 0,47$ sn; MR Kapalı: $1,69 \pm 0,47$ sn).

Gen Ekspresyonu Bulguları

qPCR analizi, RIVA'nın melatonin reseptörü ekspresyon seviyelerini bölgeye ve cinsiyete bağlı olarak önemli ölçüde değiştirdiğini göstermiştir (Şekil 3). Hipokampüste, MT1 reseptör ekspresyonu erkek RIVA grubunda kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azalmıştır (MC: $1,007 \pm 0,127$ 'ye kıyasla MR: $0,110 \pm 0,003$; $p < 0,001$). Hipokampüste MT2 reseptörlerine gelince, RIVA tedavisi erkeklerde bir azalmaya yol açmıştır (MC: $1,022 \pm 0,229$ 'a kıyasla MR: $0,617 \pm 0,029$; $p < 0,05$). Dişilerde,



Şekil 2. Tüm gruplar için yükselmiş artı testi sonuçları. Değerler ortalama ± SEM olarak gösterilmiştir. On günlük 2 mg/kg RIVA enjeksiyonunun erkek RIVA (MR) (n=10); erkek kontrol (MC) (n=10); dişi RIVA (FR) (n=10) ve dişi kontrol (FC) (n=10) gruplarında yükselmiş artı testi parametreleri üzerindeki etkisi (α: MC ve MR grupları; *: MC ve FC, p<0,05 düzeyinde istatistiksel anlamlılığı gösterir).

MT2 ekspresyon düzeyleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tedavi grubunda azaldı (FC: $0,309 \pm 0,056$ 'ya kıyasla FR: $0,021 \pm 0,006$). Kortekste belirgin bir cinsiyete bağlı desen gözlemlendi. MT1 ekspresyonu RIVA ile tedavi edilen erkeklerde önemli ölçüde azaldı (MC: $1,003 \pm 0,087$ 'ye kıyasla MR: $0,091 \pm 0,023$; $p < 0,001$), buna karşın RIVA ile tedavi edilen dişilerde arttı (FC: $1,023 \pm 0,252$ 'ye kıyasla FR: $1,372 \pm 0,114$; $p < 0,05$). Korteksteki MT2 reseptörleri için RIVA tedavisi hem erkeklerde (MC: $1,001 \pm 0,050$ vs. MR: $0,065 \pm 0,011$; $p < 0,001$) hem de dişilerde (FC: $1,014 \pm 0,184$ vs. FR: $0,287 \pm 0,031$; $p < 0,05$) kendi tuzlu su ile tedavi edilen kontrollerine kıyasla önemli bir aşağı regülasyona neden oldu (Şekil 3).

TARTIŞMA

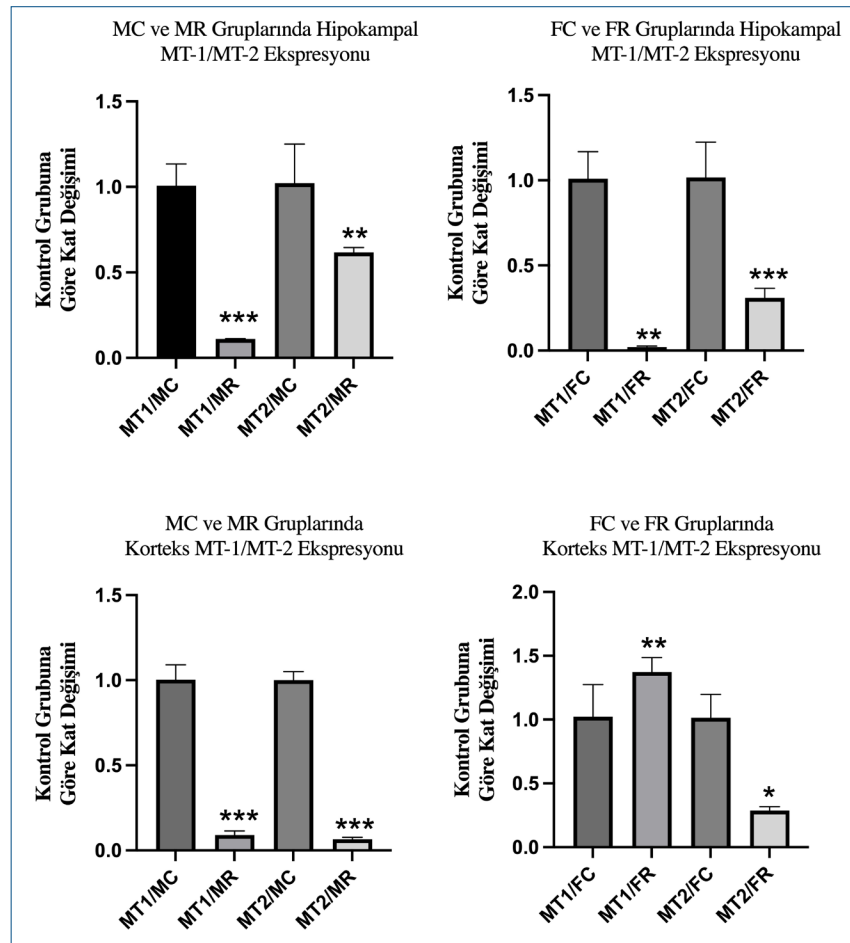
Bu çalışma, orta yaşlı sıçanlarda RIVA'nın davranışsal özellikler ve melatonin reseptör ekspresyonu üzerindeki etkisini incelemiştir. Bir asetilkolinesteraz inhibitörü olan RIVA'nın 10 günlük intraperitoneal rejimi, Y labirentinde keşifsel ve bilişsel davranışlar üzerinde farklı etkilere yol açmış ve bu etkiler, Şekil 1'de gösterildiği gibi erkek ve dişi sıçanlar arasında farklılık göstermiştir.

Araştırmalar, dişi kemirgenlerin yeni veya hafif zorlu ortamlarda daha keşifçi olma eğiliminde olduğunu göstermektedir. Bu düşünce, kontrol grubundaki dişi sıçanların erkek sıçanlara göre A ve B kollarına önemli ölçüde daha fazla girdiği gözlemleriyle de desteklenmektedir ($p < 0,05$). Kanıtlar, östrojenin hem hipokampal hem de kolinerjik fonksiyon üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu ve bunun da gelişmiş bilişsel esneklik ve keşif yetenekleriyle sonuçlanabileceğini göstermektedir (13). Çalışmalar, östrojenin keşifsel davranışı ve uzamsal öğrenmeyi iyileştirebileceğini ve potansiyel olarak dişilerin bir labirentte birden fazla yolu araştırma olasılığını artırabileceğini göstermiştir (14). Dişilerde A kolunda ve her iki cinsiyette de B kolunda görülen girişlerdeki düşüşün olası açıklamalarından biri, Şekil 1'de gösterildiği gibi, dişilerde RIVA uygulamasını takiben östrojen tarafından zaten uyarılan kolinerjik

iletimdeki artıştır. Temelde, dişilerin zaten yüksek kolinerjik iletim seviyelerine sahip olduğu göz önüne alındığında, bu ek artış keşif davranışının değişkenliğini veya kendiliğindenliğini azaltır (15).

Erkeklerde, B kolundaki giriş sayısı kontrollere kıyasla azalmıştı; bu da bu yeteneklerin erkeklerde dişilere kıyasla doğası gereği daha zayıf olduğunu gösteriyor. Araştırmalar, kolinerjik inhibitörlerinin davranış üzerinde geniş kapsamlı etkileri olabileceğini, bazen kolinerjik sistem optimum kapasitesinin ötesinde zorlandığında aktivitenin azalmasına yol açabileceğini gösteriyor. Erkek deneklerde, RIVA'yı takiben yeni kol girişlerinde, C kolu performansında ve genel dönüşüm puanlarında -ki bunlar uzamsal çalışma belleğini gösterir- bir düşüş (Şekil 1), kolinerjik nörotransmisyonun aşırı modülasyonundan kaynaklanıyor gibi görünüyor ve bu da zirve keşif ve bilişsel işlev için gerekli dengeyi bozuyor. Y-labirent dönüşüm davranışı, çalışma belleğini ve bilişsel esnekliği değerlendirmek için yaygın olarak kullanılır ve erkeklerin genellikle yeterli kolinerjik nörotransmisyondan yoksun olduğunu ve bu durumun performanslarını, bazal kolinerjik modülasyonu doğal olarak farklı olan dişilerde görülen performansla sınırladığını ortaya koyar. Araştırmalar, kolinerjik maddelere cinsiyete özgü reaksiyonları gösteren çalışmalara dayanarak, farklı duyarlılıklar olduğunu göstermiştir. Okada ve ark. kolinerjik sistemin aşırı uyarılmasının, (16)'da belirtildiği gibi, erkeklerde zaman zaman hafıza performansında bozulmaya yol açtığını bulmuştur. Kol giriş süreleri, tedavinin ne araştırma motivasyonunu ne de sıçanların genel motor becerilerini etkilemediğini göstermektedir. Kol giriş ve dönüşümlü davranışlarındaki değişiklik, genel bir sakinleştirici veya motor etkiden ziyade, esas olarak bilişsel veya kolinerjik modülasyondan kaynaklanmaktadır (17).

Dişi sıçanlar, östrojenin hem kolinerjik sistem hem de uzamsal bellek yolları üzerindeki artan etkisinden dolayı Y labirentini keşfetmeye daha fazla eğilim gösterir. Dişi deneklerde, RIVA'nın neden olduğu kolinerjik fonksiyon artışı, optimum olarak kabul edilenin ötesine geçer ve gözlenen



Şekil 3. Her iki cinsiyetten sıçanın sağ hipokampus ve korteks dokularında mRNA ekspresyonu üzerine RIVA veya tuzlu su tedavisi. MT1 ve MT2'nin mRNA seviyeleri, bağli Ct (Δ Ct) yöntemi ile ölçüldü ve GAPDH geni Δ Ct'ye göre normalize edilerek, tuzlu su ile tedavi edilen kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında bağli ifadeler olarak sunuldu. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$. Değerler, ortalama $\pm$ SEM olarak gösterilmiştir.

farkın olasılığının 0,05'ten az olduğu A kolunda görüldüğü gibi keşifsel girişlerde bir azalmaya yol açar (Şekil 1). Buna karşılık, dişilerden daha düşük bazal kolinerjik iletime sahip olan erkekler, anormal kolinerjik sinyal modülasyonu nedeniyle keşifsel davranışta ve çalışma belleği performansında, özellikle B kolu girişlerinde ve yeni alanlara geçişte bir düşüş gösterir. Çalışmalar, östrojen ve asetilkolinin keşifsel davranış ve hafızanın düzenlenmesinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir (18–20). Joue ve ark. (2024), östrojenin uzamsal davranış üzerindeki etkilerini araştırdı (21) ve Mesulam (2004), kolinerjizasyonun inhibisyonunun etkisine ve bilişsel işlev için optimum kolinerjik seviyelerin önemine dair bilgiler sağladı (22). Birleştirilen bulgular, doğal cinsiyet farklılıklarının ve kolinerjik sistemi değiştirmek için ilaç kullanımının, mekansal hafızayı ve keşifsel davranış değerlendiren görevlerde farklı sonuçlar elde etmek üzere etkileşime girebileceğini göstermektedir.

Yükseltilmiş artı labirent testinin sonuçları, anksiyete benzeri davranışlarda cinsiyet farklılıkları olduğunu ve RIVA'nın bu davranışları kolinerjik sistemi düzenleyerek etkilediğini göstermektedir. Rivastigmin ile tedavi edilen erkek sıçanlarda, Şekil 2'de görüldüğü gibi, toplam kol girişi sayısında önemli bir azalma olmuştur ($p < 0,05$). İlacın, kolinerjik sistemin aşırı uyarılması sonucu erkek hareketi veya keşif dürtüsü üzerinde yatıştırıcı veya engelleyici bir etkisi olduğu görülmektedir; bu, aşırı uyarımdan kaynaklanıyor olabilir. Rivastigmin, asetilkolinin parçalanmasını önleyerek kullanılabilirliğini artırır. Normal keşif davranışı için optimum kolinerjik aktivite gereklidir, ancak aşırı uyarım davranışsal inhibisyona veya anksiyete benzeri durumlara yol açabilir. Kolinerjik aşırı uyarımı

gösteren çalışmalar, genel aktivite seviyelerini düşürebileceği konusunda hemfikirlerdir (23). Çalışmalar, kolinerjizasyonun inhibisyonunun genel uyanıklığı azaltabileceğini veya kolinerjik sistemi etkileyen diğer maddelerde gözlenen bir semptom olan motor yavaşlamasına neden olabileceğini göstermektedir (24). Genel aktivitedeki düşüş, labirente girenlerin toplam sayısının daha düşük olmasından sorumlu olabilir (Şekil 2).

Dişi sıçanlar erkeklerden daha az zamanı açık kolları, daha çok zamanı ise kapalı kolları geçirdiler ($p < 0,05$). Bu, standart koşullar altında dişilerde daha yüksek anksiyete benzeri seviyelere işaret ediyor. Çalışmalar, östrojen seviyelerindeki değişikliklerin anksiyete benzeri davranışları etkileyebileceğini göstermiştir. Araştırmalar östrojenin kaygı giderici etkileri olduğunu göstermiştir, ancak diğer çalışmalar dişilerin belirli koşullar altında veya östrus döngüsünün farklı aşamalarında yükseltilmiş artı labirentinde anksiyete benzeri davranışlarda artış sergilediğini ileri sürmektedir (25). Tür değişiklikleri ve test koşulları, erkeklerde ve dişilerde farklı anksiyete benzeri tepkilere yol açabilir. Çok sayıda çalışma, dişilerin kapalı kolları seçme eğiliminde olduğu ve stresle başa çıkmada daha temkinli veya riskten kaçınan bir yaklaşım gösterdiği bir örüntüyü belgelemiştir. RIVA'nın etkisi, özellikle kol girişlerinin azalması açısından erkeklerde daha belirgindir ($p < 0,05$), ancak etkileri her cinsiyetteki bireysel anksiyete seviyelerine bağli olarak farklılık gösterebilir. Erkek sıçanlarda hem açık hem de kapalı kolları girişleri içeren genel aktivite azalması, kolinerjik sistemin aşırı uyarılmasından kaynaklanan keşifsel davranışlar üzerinde doğrudan bir baskılayıcı etki olduğunu düşündürmektedir. Dişi deneklerde, bir anksiyete görevinin kapalı kolunda geçirilen sürenin

artması ve açık kolunda geçirilen sürenin azalmasıyla gösterilen daha yüksek temel anksiyete seviyeleri görülmüştür (Şekil 2). Bu durumun kolinerjik aktivitedeki değişikliklerden etkilendiği bulunmuştur. RIVA'da, bir dişinin birincil davranışı öncelikle doğal olarak endişeli durumundan kaynaklanmaktadır ve bu durum potansiyel olarak hormonal etkiler ve farklı reseptör duyarlılıklarıyla bağlantılıdır (26).

Yaşlanma ve demansta kolinerjik sistemler üzerine yapılan bu çalışma, kolinerjik nörotransmisyon süreçlerinde gerekli olan hassas dengeyi vurgulamaktadır. Kolinesteraz inhibitörlerinin belirli durumlarda kullanımında görülen aşırı aktivasyon, keşifsel eylemlerin azalmasına ve anksiyete seviyelerinde değişikliğe neden olmaktadır (22). Walf ve Frye (2007) tarafından özetlendiği gibi, östrojenin kemirgen anksiyete modellerindeki etkisi üzerine yapılan araştırmalar, hormonal etkilerin anksiyete benzeri davranışlarda değişimlere yol açabileceğini göstermektedir (25). Bu düşünce, mevcut çalışmada erkek ve dişi sıçanlar arasında bulunan farklılıklarla da desteklenmektedir. Kolinesteraz inhibitörlerine verilen yanıtta cinsiyet farklılıkları üzerine yapılan araştırmalar, dişi sıçanların muhtemelen reseptör yoğunluğu veya duyarlılığındaki farklılıklar nedeniyle farklı davranışsal tepkiler gösterebileceğini bulmuştur (26). Yükseltilmiş artı labirent testini kullanan bir çalışmaya göre, kemirgenlerde yükselmiş anksiyete benzeri davranış genellikle daha az açık kol girişi ve kapalı kollarda geçirilen daha uzun sürelerle ilişkilidir (27). Gözlemlenen spesifik etkilere gelince, RIVA erkeklerde keşif davranışını azaltır; bu da genel olarak daha düşük sayıda girişle gösterilir. Bu, genel aktivitede azalmaya neden olan kolinerjik aşırı uyarılmanın göstergesi olabilir. Veriler, dişilerin kapalı alanlarda daha fazla, açık alanlarda ise daha az zaman geçirdiğini ve bunun da artan anksiyete benzeri davranışlara işaret ettiğini göstermiştir. Östrojen ve kolinerjik reseptörlere karşı değişen hassasiyet seviyeleri bu etkide önemli faktörler olabilir. Önceki çalışmalar, dişilerin kolinerjik modülasyona erkeklere kıyasla farklı tepkiler gösterdiğini öne sürse de, RIVA'nın yükseltilmiş artı labirentindeki dişiler üzerindeki kesin etkisi, başlangıç varyasyonlarının ötesinde belirsizliğini korumaktadır (28). Bu bulgular bütünüyle ele alındığında, hem RIVA aracılığıyla farmakolojik manipülasyonun hem de hormonal faktörlerden etkilenen doğal cinsiyet eşitsizliklerinin, yükseltilmiş artı labirentinde gözlemlenen davranışlara önemli ölçüde katkıda bulunduğu sonucuna varılabilir.

Rivastigmin tedavisini takiben melatonin reseptör ekspresyonundaki değişiklikler üzerine yapılan araştırmalar, kolinerjik sistem ve melatonin yolları arasında karmaşık ilişkiler ve cinsiyete özgü sonuçlar olduğunu göstermektedir (Şekil 3). MT-1 ve MT-2 reseptörlerinin ekspresyonu her iki cinsiyette de hipokampüste azalmıştır. Rivastigmin ile artan kolinerjik aktivite, hipokampüste melatonin reseptör ekspresyonunda azalmaya yol açarak erkekler ve dişiler arasında önemli farklılıklar bulunmuştur. Araştırmalar, asetilkolin ve melatonin sinyal yolları arasındaki etkileşimin hem hafıza oluşumuna hem de hipokampal plastisiteye katkıda bulunduğunu göstermiştir (7). İlgili diğer beyin sistemleriyle yakın etkileşim içinde olan bir beyin yapısı olan hipokampus, hem uzamsal hafıza hem de bilişsel işlev için çok önemlidir. Erkeklerde kortikal dokuda hem MT-1 ($p<0,001$) hem de MT-2 ($p<0,001$) reseptörlerinin ekspresyonunun azalması, hipokampüste görülen örüntüyü yansıtmakta ve erkeklerin beyin bölgelerinde tutarlı bir kolinerjik etki olduğunu düşündürmektedir. Dişilerde korteks dokusunda görülen, MT-1 düzeylerinde artış ($p<0,01$) ve MT-2 düzeylerinde azalma ($p<0,05$) ile belirginleşen yanıt, cinsiyete özgü farklılıklar, hormonların reseptör ekspresyonu, özellikle östrojen üzerindeki etkisi, erkeklerde ve dişilerde bazal kolinerjik iletimdeki değişkenlik ile ilişkili olabilir.

Cinsiyetler arasındaki melatonin reseptörü regülasyonundaki farklılıklar, melatoninin kolinerjik işlevi artırabileceğini ve bunun tersinin de olabileceğini düşündürmektedir (29). Gözlemlenen farklı düzenleme, muhtemelen optimal sinyal dengesinin korunmasını garanti altına alan

bir telafi mekanizması görevi görmektedir. Artmış MT-1 seviyeleriyle belirginleşen benzersiz dişi korteks örüntüsü, östrojenin kolinerjik artışın melatonin reseptör ekspresyonunu nasıl etkilediğini ya da etkileyebileceğini düşündürmektedir. Çalışmalar, östrojenin hem kolinerjik hem de melatonergic yolları etkileyebileceğini göstermiştir (8). Hipokampüste melatonin reseptörlerinin aşağı regülasyonu tutarlıdır, ancak bu tutarlılık korteks için geçerli değildir ve bu, bu reseptörlerin muhtemelen farklı işlevsel rollerinden kaynaklanan çeşitli beyin bölgelerinde farklı şekilde düzenlendiğini düşündürmektedir (30). Bu sonuçlardan elde edilen bulgular, kolinesteraz inhibitörlerinin etkinliğinin gerçek klinik ortamlarda erkekler ve kadınlar arasında neden farklılık gösterdiğini açıklamaya yardımcı olabilir. Alzheimer hastalığında, özellikle hem kolinerjik hem de melatonergic sistemler etkilendiğinde, söz konusu etkileşimlerin anlaşılması, tedavilerin optimize edilmesi için de gereklidir. Dişi korteksinde MT-1 ve MT-2 ekspresyonunun farklı düzenlenmesi, bu reseptör alt tiplerini farklı mekanizmaların kontrol ettiğini ve bunların kolinerjik uyarıma farklı yanıt veren farklı transkripsiyon faktörleri veya elementleri tarafından düzenlenebileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmanın sonuçları, RIVA tedavisinden kaynaklanan kolinerjik artışın, cinsiyete ve anatomik bölgeye göre farklılık gösteren bir örüntüde melatonin reseptör ekspresyonunu nasıl etkilediğine dair anlayışımızı geliştirmektedir. Araştırmalar, kolinerjik ve melatonergic sistemler arasında karmaşık bir bağlantı olduğunu ve bu bağlantının, bilişsel kapasite ve tedavi sonuçlarındaki cinsiyete bağlı farklılıkların anlaşılmasında önemli etkileri olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmanın bazı sınırlamaları vardır. İlk olarak, dişi sıçanların östrus döngüsü izlenmedi. Östrojen seviyelerinin döngü boyunca dalgalandığı ve kolinerjik duyarlılığı etkileyebileceği göz önüne alındığında, bu faktör gelecekteki çalışmalarda kontrol edilmelidir. İkinci olarak, 13 aylık sıçanlar orta yaşlı bir popülasyonu temsil etse de, geriatrik demansı tam olarak modellemek için yaşlı sıçanlarla daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Dişi korteksinde görülen değişken tepkiler, araştırma ve klinik ortamlarda cinsiyetin biyolojik bir faktör olarak dikkate alınmasının önemini vurgulamaktadır. Gelecekteki çalışmalar, bu cinsiyete özgü varyasyonların altında yatan moleküler süreçleri ve bunların bilişsel ve davranışsal sonuçlar üzerindeki etkilerini anlamaya odaklanabilir.

Sonuç olarak, bu çalışma, subkronik rivastigmin (RIVA) tedavisinin orta yaşlı sıçanlarda davranışsal parametreleri ve melatonin reseptör ekspresyonunu cinsiyete bağlı olarak düzenlediğini göstermektedir. Bulgularımız, RIVA tedavisinin özellikle erkeklerde keşifsel aktiviteyi ve lokomotor davranışı önemli ölçüde azalttığını ve cinsiyetler arasında belirgin anksiyete benzeri davranış örüntülerini vurguladığını göstermektedir. Moleküler düzeyde, RIVA uygulaması her iki cinsiyetin hipokampusunda MT1 ve MT2 reseptörlerinde tutarlı bir aşağı regülasyona yol açmıştır. Bununla birlikte, dişilerde MT1 reseptörlerinde yukarı regülasyonun erkeklerde görülen aşağı regülasyonun aksine olduğu kortekste çarpıcı bir cinsiyete özgü farklılık gözlenmiştir.

Çalışmamız kolinesteraz inhibitörü tedavisini takiben kolinerjik sistem ve melatonergic reseptörler arasında bölgeye ve cinsiyete özgü bir etkileşimin klinik öncesi kanıtını sunan çalışmalardan biridir. Bu sonuçlar, kolinomimetik ilaçların terapötik etkilerinin ve olası yan etkilerinin, nöroendokrin yolların farklı düzenlenmesi nedeniyle erkekler ve kadınlar arasında önemli ölçüde değişebileceğini göstermektedir. Sonuç olarak, cinsiyet, nörodejeneratif hastalıklar için farmakolojik stratejilerin geliştirilmesinde kritik bir biyolojik değişken olarak değerlendirilmelidir. Bu karmaşık nöroendokrin etkileşimlerin altında yatan mekanizmaları daha iyi açıklamak için, yaşlanma modelleri ve östrus döngüsü takibini içeren gelecekteki çalışmalara ihtiyaç vardır.

Etik Komite Onayı: Çalışma protokolü, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (2024-14) tarafından onaylanmıştır. Bu araştırma hayvanlar (sıçanlar) üzerinde yürütülmüştür.

Hakem Değerlendirmesi: Dış Bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir- NAÜ, ETA, ÖÜ; Tasarım- NAÜ, MA, ÖÜ; Denetleme- MA, EA, NAÜ; Kaynaklar- MA, EA, ETA; Malzemeler- NAÜ, ÖÜ, MA; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi- NAÜ, ETA, ÖÜ; Analiz ve/veya Yorum- NAÜ, ETA, ÖÜ; Literatür Taraması- NAÜ, ÖÜ, MA; Yazıyı Yazan- NAÜ, MA, ÖÜ; Eleştirel İnceleme- MA, EA, NAÜ.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP04-A-2024-5418) tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Pandi-Perumal S, Seils L, Kayumov L, Ralph M, Lowe A, Moller H, et al. Senescence, sleep, and circadian rhythms. *Ageing Res Rev.* 2002;1:559–604. [\[Crossref\]](#)
- Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Lopez-Burillo S. Melatonin, longevity and health in the aged: an assessment. *Free Radic Res.* 2002;36:1323–1329. [\[Crossref\]](#)
- Wu YH, Swaab DF. The human pineal gland and melatonin in aging and Alzheimer's disease. *J Pineal Res.* 2005;38:145–152. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2004.00196.x> [\[Crossref\]](#)
- Ng KY, Leong MK, Liang H, Paxinos G. Melatonin receptors: distribution in mammalian brain and their respective putative functions. *Brain Struct Funct.* 2017;222:2921–2939. [\[Crossref\]](#)
- Mesulam MM, Guillozet A, Shaw P, Levey A, Duysen EG, Lockridge O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience.* 2002;110:627–639. [\[Crossref\]](#)
- Ha J, Son N-H, Park YH, Lee E, Kim E, Jung Kim W. Association of cognitive enhancers and incident seizure risk in dementia: a population-based study. *BMC Geriatr.* 2022;22:480. [\[Crossref\]](#)
- Shukla M, Sotthibundhu A, Govitrapong P. Role of melatonin in regulating neurogenesis: Implications for the neurodegenerative pathology and analogous therapeutics for Alzheimer's disease. *Melatonin Res.* 2020;3:216–242. [\[Crossref\]](#)
- Luine VN. Estradiol and cognitive function: past, present and future. *Horm Behav.* 2014;66:602–618. [\[Crossref\]](#)
- Anderson G, Maes M. Pharmaceutical and nutritional benefits in Alzheimer's disease via convergence on the melatonergic pathways. *FCDR-Alzheimer Disorder.* 2015;4:3–81. [\[Crossref\]](#)
- Sengupta P. The laboratory rat: relating its age with human's. *Int J Prev Med.* 2013;4:624–630.
- Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. The Y-maze for assessment of spatial working and reference memory in mice. *Methods Mol Biol.* 2019;1916:105–111. [\[Crossref\]](#)
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods.* 2001;25:402–408. [\[Crossref\]](#)
- Hara Y, Waters EM, McEwen BS, Morrison JH. Estrogen effects on cognitive and synaptic health over the lifecourse. *Physiol Rev.* 2015;95:785–807. [\[Crossref\]](#)
- Luine V, Rodriguez M. Effects of estradiol on radial arm maze performance of young and aged rats. *Behav Neural Biol.* 1994;62:230–236. [\[Crossref\]](#)
- Saré RM, Lemons A, Smith CB. Behavior testing in rodents: highlighting potential confounds affecting variability and reproducibility. *Brain Sci.* 2021;11:522. [\[Crossref\]](#)
- Okada K, Hashimoto K, Kobayashi K. Cholinergic regulation of object recognition memory. *Front Behav Neurosci.* 2022;16:996089. [\[Crossref\]](#)
- Zanettini C, Panlilio LV, Alicki M, Goldberg SR, Haller J, Yasar S. Effects of endocannabinoid system modulation on cognitive and emotional behavior. *Front Behav Neurosci.* 2011;5:57. [\[Crossref\]](#)
- Vaucher E, Reymond I, Najaffe R, Kar S, Quirion R, Miller MM, et al. Estrogen effects on object memory and cholinergic receptors in young and old female mice. *Neurobiol Aging.* 2002;23:87–95. [\[Crossref\]](#)
- Cardoso CC, Ricardo VP, Frussa-Filho R, Porto CS, Abdalla FM. Effects of 17 β -estradiol on expression of muscarinic acetylcholine receptor subtypes and estrogen receptor alpha in rat hippocampus. *Eur J Pharmacol.* 2010;634:192–200. [\[Crossref\]](#)
- Uzum G, Bahçekapili N, Baltacı AK, Mogulkoc R, Ziyilan YZ. Chronic (3-weeks) treatment of estrogen (17 β -estradiol) enhances working and reference memory in ovariectomized rats: role of acetylcholine. *Neurochem Res.* 2016;41:1468–1474. [\[Crossref\]](#)
- Joue G, Navarro-Schröder T, Achtzehn J, Moffat S, Hennies N, Fuß J, et al. Effects of estrogen on spatial navigation and memory. *Psychopharmacology (Berl).* 2024;241:1037–1063. [\[Crossref\]](#)
- Mesulam M. The cholinergic lesion of Alzheimer's disease: pivotal factor or side show? *Learn Mem.* 2004;11:43–49. [\[Crossref\]](#)
- Major AJ, Vijayraghavan S, Everling S. Cholinergic overstimulation attenuates rule selectivity in macaque prefrontal cortex. *J Neurosci.* 2018;38:1137–1150. [\[Crossref\]](#)
- Pepeu G, Giovannini MG. Cholinesterase inhibitors and memory. *Chem Biol Interact.* 2010;187:403–408. [\[Crossref\]](#)
- Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc.* 2007;2:322–328. [\[Crossref\]](#)
- Inagaki T, Frankfurt M, Luine V. Estrogen-induced memory enhancements are blocked by acute bisphenol A in adult female rats: role of dendritic spines. *Endocrinology.* 2012;153:3357–3367. [\[Crossref\]](#)
- Biedermann SV, Biedermann DG, Wenzlaff F, Kurjak T, Nouri S, Auer MK, et al. An elevated plus-maze in mixed reality for studying human anxiety-related behavior. *BMC Biol.* 2017;15:125. [\[Crossref\]](#)
- Johnson CR, Kangas BD, Jutkiewicz EM, Bergman J, Coop A. Drug design targeting the muscarinic receptors and the implications in central nervous system disorders. *Biomedicines.* 2022;10. [\[Crossref\]](#)
- Prodhan A, Cavestro C, Kamal MA, Islam MA. Melatonin and sleep disturbances in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2021;20:736–754. [\[Crossref\]](#)
- Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, Spence DW, Maestroni GJ, Zisapel N, et al. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol.* 2008;85:335–353. [\[Crossref\]](#)