T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

OVARİEKTOMİ YAPILMIŞ VE YÜKSEK YAĞLI DİYETLE BESLENEN SIÇANLARDA DUYGUDURUM DEĞİŞİKLİĞİ VE BİLİŞSEL FONKSİYONLAR ÜZERİNE 2,4-DİNİTROFENOLÜN ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ
DR. GÖKÇEN PAYKAL

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. CANAN ULUOĞLU

ANKARA
KASIM 2025

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

OVARİEKTOMİ YAPILMIŞ VE YÜKSEK YAĞLI DİYETLE BESLENEN SIÇANLARDA DUYGUDURUM DEĞİŞİKLİĞİ VE BİLİŞSEL FONKSİYONLAR ÜZERİNE 2,4-DİNİTROFENOLÜN ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ
DR. GÖKÇEN PAYKAL

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. CANAN ULUOĞLU

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TTU-2025-10038 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
KASIM 2025

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam süresince bilimsel rehberliği, maddi ve manevi desteği, daima cesaretlendiren tutumuyla yanımda olan; her şartta koruduğu nazik ve etik yaklaşımıyla örnek almaya gayret ettiğim, araştırmacı kimliğimin olgunlaşmasında temel pay sahibi değerli danışmanım Prof. Dr. Canan Uluoğlu'na,

Bu çatı altında uzmanlık eğitimi almış olmanın gururunu özellikle ifade ederek, akademik rehberlikleri ve paylaştıkları birikimle bir farmakolog olarak mesleki kimliğimin şekillenmesine yön veren bütün anabilim dalı hocalarıma,

Deneysel süreçte büyük emeği ve sabırlı yaklaşımıyla tüm cerrahi uygulamaları titizlikle üstlenen değerli hocam Prof. Dr. Elvan Anadol'a,

Çalışmamızın laboratuvar ve analiz süreçlerindeki katkıları için Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan kıymetli hocalarım Prof. Dr. Neslihan Bukan, Prof. Dr. Canan Yılmaz ve akademik desteğini içtenliği ve dostluğuyla zenginleştiren Dr. Sena Türkmen'e,

TTU-2025-10038 numaralı projenin hayata geçirilmesinde sağladığı finansman desteği ve bilimsel katkıları için Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi'ne,

Bu çalışmanın yürütülmesinde yüksek nitelikli altyapı desteğiyle katkı sağlayan NÖROM'a,

Deneysel çalışmalarımızın başından sonuna birlikte taşıdığımız maceranın yükünü hafifleten dayanışmaları, bana karşı her daim sürdürdükleri sabırlı destek ile paylaştığımız dostluğun verdiği mutluluk için Dr. Muhammed Cihan Güvel, Dr. Utku Aykan ve Dr. Pınar Kızılay Çankaya'ya,

Bilimsel paylaşımları ve yerinde destekleriyle eğitim sürecimde yanımda olan tüm asistan arkadaşlarıma,

Araştırma boyunca ekipman desteği ve sunduğu düşünceli geri bildirimler dahil görünür olmayan tüm katkıları için Güray'a,

Uzmanlık eğitimim esnasında kaybettiğim, prensipli duruşu ve sonsuz sevgisiyle değerlerimi ve yolumu şekillendiren dedeme,

Bugünleri görmesini yürekten dilediğim fakat çok daha önce ebediyete uğurladığım, neşesi ve bitmeyen çalışkanlığı ile hafızamda yaşayan babama,

Sıcacık yüreği ve sevgisiyle, her günü emekle örüp bizi düşünen, tüm başarılarımın mimarı anneme,

Yolculuğumun vazgeçilmez eşlikçisi, beni gülümsetmeyi her şartta başaran biricik kardeşime,

Teşekkür ederim.

Dr. Gökçen PAYKAL

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ..... **ii**
İÇİNDEKİLER ..... **iii**
TABLOLAR DİZİNİ ..... **vi**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **vii**
GRAFİKLER DİZİNİ ..... **viii**
RESİMLER DİZİNİ ..... **xi**
SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **xii**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL BİLGİLER **6**
2.1. Menopoz ve Östrojen Yoksunluğu **6**
2.1.1. Kemirgenlerde Menopoz Modelleri 11
2.1.1.1. Doğal Üreme Yaşlanması Modeli *11*
2.1.1.2. Hızlandırılmış Over Yetmezliği *12*
2.1.1.3. Ovariektomi: Cerrahi menopoz modeli *13*
2.2. Yüksek Yağlı Diyet ile Beslenme **14**
2.3. Nörodavranışsal Test Düzenekleri **18**
2.4. 2,4-Dinitrofenol (DNP) **22**
2.5. Ovariektomi ve Yüksek Yağlı Diyet Ekseninde Nörotrofik ve Metabolik Moleküller **28**
2.5.1. BDNF 28
2.5.2. NGF 29
2.5.3. LEPTİN 31
2.5.4. İnsülin ve İnsülin Direnci 32
3. GEREÇ VE YÖNTEM **37**
3.1. Deney Hayvanları ve Barındırma Koşulları **37**
3.2. Deney Grupları **38**
3.3. Deney Tasarımı **39**
3.4. Ovariektomi Operasyonu **41**

3.5. Diyet Uygulamaları **43**
3.6. Farmakolojik Ajan ve Uygulama Protokolü **45**
3.7. Davranışsal Testler **46**
3.7.1. Açık Alan Testi 46
3.7.2. Yeni Nesne Tanıma Testi 48
3.7.3. Yükseltilmiş Artı Labirenti 49
3.7.4. Sükroz Tercih Testi 50
3.7.5. Zorunlu Yüzdürme Testi 52
3.8. Davranış Testlerinin Analizi **53**
3.9. Sakrifikasyon ve Örneklerin Toplanması **53**
3.10. Vücut Kompozisyonu ve Kümülatif Tüketimlere İlişkin Hesaplamalar **54**
3.11. Biyokimyasal Analizler **54**
3.12. İstatistiksel Analiz **56**
4. BULGULAR **57**
4.1. Deney Akışı **57**
4.2. Ovariektomi Operasyonunun Doğrulanması: Uterus Ağırlıkları **57**
4.3. Ovariektomi ve Yüksek Yağlı Diyet Etkilerinin Araştırılması **59**
4.3.1. Davranış Testleri 59
4.3.1.1. Açık Alan Testi *59*
4.3.1.2. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi *62*
4.3.1.3. Sükroz Tercih Testi *64*
4.3.1.4. Zorunlu Yüzdürme Testi *65*
4.3.1.5. Yeni Nesne Tanıma Testi *66*
4.3.2. Vücut Ağırlığı, Adipoz Doku ve Enerji Alımı 66
4.3.2.1. Vücut Ağırlığı Artışı *66*
4.3.2.2. Adipoz Doku Ağırlıkları *69*
4.3.2.3. Kümülatif Yem ve Enerji Tüketimi *71*
4.3.3. Metabolik Göstergeler: Glukoz İnsulin HOMA-IR Kolesterol HDL, non HDL, Leptin 72
4.3.4. Nörotrofik Faktörler 79

4.4. Yüksek Yağlı Diyet ile Beslenen Ovariektomize Sıçanlarda DNP'nin Etkisi 81
4.4.1. Davranış Testleri 81
4.4.1.1. Açık Alan Testi 81
4.4.1.2. Yükseltilmiş Artı Labirenti Testi 84
4.4.1.3. Sükroz Tercih Testi 86
4.4.1.4. Zorunlu Yüzdürme Testi 86
4.4.1.5. Yeni Nesne Tanıma Testi 87
4.4.2. Vücut Ağırlığı, Adipoz Doku ve Enerji Alımı 88
4.4.2.1. Vücut Ağırlığı Artışı 88
4.4.2.2. Adipoz Doku Ağırlıkları 90
4.4.2.3. Kümülatif Yem ve Enerji Tüketimi 92
4.4.3. Metabolik Göstergeler: Glukoz İnsulin HOMA-IR Kolesterol HDL, non HDL, Leptin 93
4.4.4. Nörotrofik Faktörler 100
5. TARTIŞMA 102
6. SONUÇLAR 134
KISITLILIKLAR 136
KAYNAKLAR 138
ÖZET 166
ABSTRACT 168
ÖZGEÇMİŞ 170

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Östrojen eksikliğinin farklı sistemlerde oluşturduğu etkiler 8
Tablo 2. Deney grupları 38
Tablo 3. Standart sıçan yemi besin ögeleri 44
Tablo 4. Yüksek yağlı yem besin ögeleri 44
Tablo 5. Standart ve YYD enerji dağılımları 45
Tablo 6. Deney gruplarının 8 haftalık deney süresi boyunca kümülatif toplam tükettikleri yem ağırlığı (g), toplam enerji alımı (MJ) ve yem verimliliğine (g/MJ) ait tanımlayıcı veriler. 72
Tablo 7. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulanan gruplarda **8 haftalık deney süresi** boyunca tüketilen kümülatif toplam yem ağırlığı (g), toplam enerji alımı (MJ) ve yem verimliliğine (g/MJ) ait tanımlayıcı veriler. 93

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Menopoz evrelemesinin STRAW+10 zamanlamasından yola çıkarak oluşturulan şeması 8
Şekil 2. Deney iş akış şeması 40
Şekil 3. Vücut ağırlığı haftalık takibi 67
Şekil 4. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulanan grupların haftalık ortalama vücut ağırlığı takibi 89

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. Tüm deney gruplarının uterus ıslak ağırlıkları 59
Grafik 2. Açık alan testinde katedilen toplam mesafeler 60
Grafik 3. Açık alan testinde grupların ortalama hızları..... 60
Grafik 4. Açık alan testinde grupların dış alanda geçirdikleri süre..... 61
Grafik 5. Yükseltilmiş artı labirent testinde grupların açık kolda geçirdikleri ortalama süre. 62
Grafik 6. Yükseltilmiş artı labirentte grupların kapalı kolda geçirdikleri ortalama süre. 63
Grafik 7. Sükroz tercih testinde grupların sükroz solüsyonunu tercih etme yüzdeleri 64
Grafik 8. Zorunlu yüzdürme testinde grupların toplam hareketsiz geçirdikleri ortalama süre. 65
Grafik 9. Yeni nesne tanıma testinde grupların tanıma indeksleri. 66
Grafik 10. Gruplar arasında kümülatif vücut ağırlığı değişimleri.. 68
Grafik 11. Gruplar arasında toplam adipoz doku ortalama ağırlığı. 69
Grafik 12. Gruplar arasında inguinal adipoz doku ağırlıkları. 70
Grafik 13. Gruplar arasında retroperitoneal adipoz doku ağırlıkları. 71
Grafik 14. Gruplar arasında açlık glukoz düzeyleri 73
Grafik 15. Gruplar arasında serum insülin düzeyleri 74
Grafik 16. Gruplar arasında HOMA-IR düzeyleri 75
Grafik 17. Gruplar arasında serum total kolesterol düzeyleri. 76
Grafik 18. Gruplar arasında serum HDL kolesterol seviyeleri. 77
Grafik 19. Gruplara arasında serum non-HDL kolesterol düzeyleri. 78
Grafik 20. Gruplar arasında serum leptin düzeyleri. 79
Grafik 21. Gruplar arasında serum BDNF düzeyleri 80
Grafik 22. Gruplar arasında serum NGF düzeyleri 80
Grafik 23. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının açık alan testinde toplam katedilen mesafe üzerine etkisi 82

Grafik 24. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının açık alan testinde ortalama hız üzerine etkileri 82
Grafik 25. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının açık alan testinde dış alanda geçirilen süre üzerine etkileri 83
Grafik 26. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının yükseltilmiş artı labirentte açık kolda geçirilen süre üzerine etkisi..... 84
Grafik 27. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının yükseltilmiş artı labirentte kapalı kolda geçirilen süre üzerine etkileri. 85
Grafik 28. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının sükroz tercih testinde değerlendirilen sükroz tercih yüzdeleri üzerine etkisi..... 86
Grafik 29. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının zorunlu yüzdürme testinde toplam hareketsiz kalma süresi üzerine etkisi 87
Grafik 30. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının yeni nesne tanıma testinde değerlendirilen tanıma indeksi üzerine etkisi 88
Grafik 31. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının kümülatif vücut ağırlığı değişimleri üzerine etkisi ... 90
Grafik 32. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının toplam adipoz doku ağırlığı üzerine etkisi. 91
Grafik 33. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının inguinal adipoz doku ağırlığı üzerine etkisi. 91
Grafik 34. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının retroperitoneal adipoz doku ağırlığı üzerine etkisi.... 92
Grafik 35. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının açlık glukoz düzeyi üzerine etkisi 94

Grafik 36. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının serum insülin düzeyi üzerine etkisi 95
Grafik 37. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının Homa-IR değeri üzerine etkisi 96
Grafik 38. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının serum total kolesterol düzeyi üzerine etkisi 97
Grafik 39. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının serum HDL kolesterol düzeyleri üzerine etkisi**.**..... 98
Grafik 40. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının serum non-HDL kolesterol düzeyi üzerine etkisi**.**..... 99
Grafik 41. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının serum leptin düzeyi üzerine etkisi 100
Grafik 42. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının serum BDNF düzeyi üzerine etkisi 101
Grafik 43. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının serum NGF düzeyi üzerine etkisi. 101

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Ovariektomi operasyonu esnasında overlerin kavitede bulunması 41
Resim 2. Ovariektomi operasyonunda eksizyon öncesi sütür ile ligasyon 42
Resim 3. Ovariektomi operasyonunda overin eksize edilmesi. (A. Sağda eksize over ile birlikte; B. Overler eksize edildikten sonra) 42
Resim 4. Any Maze yazılımı ile açık alan testinde merkez alan ve dış alanın görüntülenmesi 47
Resim 5. Yeni nesne tanıma testi görüntüsü (öğrenme oturumu) 49
Resim 6. Yükseltilmiş artı labirentte Any Maze ile işaretlenen açık kol 50
Resim 7. Sükroz tercih testi görüntüsü 51
Resim 8. Zorunlu yüzdürme testi görüntüsü 52
Resim 9. Sakrifikasyon sonrasında çıkarılan uterus dokuları 58
Resim 10. Yükseltilmiş artı labirentte grupların açık kolda ve kapalı kolda bulunma tercihinin ısı haritası şeklinde gösterimi 63
Resim 11. Yükseltilmiş artı labirentinde YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının açık kolda ve kapalı kolda bulunma tercihine etkisinin ısı haritası ile gösterimi 85

SİMGELER VE KISALTMALAR

BDNF	*Brain Derived Neurotrophic Factor* (Beyin kaynaklı nörotrofik faktör)
DNP	2,4-Dinitrofenol
ER	Östrojen reseptörü
ERE	*Estrogen Response Elements* (Östrojen yanıt elemanları)
ERα / ERβ	Östrojen reseptörü alfa / beta alt tipleri.
ESR1	ERα'yı kodlayan gen
FDA	*U.S. Food and Drug Administration* (ABD Gıda ve İlaç İdaresi)
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
GLUT4	Glukoz Taşıyıcısı 4
GÜDAM	Gazi Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi
HD	Huntington Hastalığı
HDL	*High Density Lipoprotein* (Yüksek yoğunluklu lipoprotein)
HOMA-IR	*Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance* (İnsülin direncinin homeostatik model değerlendirmesi)
LH	Luteinize Edici Hormon
MJ	Megajul (enerji birimi)
mtDNA	Mitokondriyal DNA
NGF	*Nerve Growth Factor* (Sinir büyüme faktörü)

NÖROM	Nörobilim ve Nöroteknoloji Mükemmeliyet Ortak Uygulama ve Araştırma Merkezi
OVX/OVx	Ovariektomi (Grup adı; cerrahi işlem)
PBS / ÇÖZ	*Phosphate Buffered Saline* (Fosfat tamponlu salin); çözücü olarak "ÇÖZ"
POMC	Proopiomelanokortin nöronları
ROS	*Reactive Oxygen Species* (Reaktif oksijen türleri)
SHAM	Sahte operasyon (kontrol cerrahisi; grup adı)
SSS	Santral Sinir Sistemi
STRAW+10	*Stages of Reproductive Aging Workshop +10* (Üreme Yaşlanması Evreleri Çalıştayı +10)
UCP / UCP2 / UCP3	*Uncoupling Protein* (Mitokondriyal eşleşme bozucu proteinler)
YYD	Yüksek Yağlı Diyet

1. GİRİŞ

İçinde yaşadığımız yüzyıl, hayatın doğal akışı içinde, birçok yönüyle bir değişim-dönüşüm çağıdır. Yaşanan bu dönüşümle beraber toplumların demografik yapısı değişime uğramakta, doğum ve ölüm oranları azalırken beklenen yaşam süresi uzamaktadır (1). Yaşam beklentisindeki artış, kadınların yaşamlarının önemli bir bölümünü menopoz sonrası evrede geçirmelerine neden olmaktadır (2). Ortalama olarak, kadınlar artık yaşamlarının en az üçte birini menopozda geçirmektedir (3). Menopoz, kadınlardaki doğum yaşının biraz ileriye kaymasının da etkisiyle, kadının aktif olarak çocukları ve/veya ailesi ile ilgilendiği, tam zamanlı bir işte çalıştığı ve belki de yaşlanan ebeveynine bakma sorumluluğunu da üstlenebileceği bir dönemde ortaya çıkmaktadır (4). Günümüzde, dünyada ve ülkemizde yaşam beklentisinin artması, nüfusun yaşlanması ve kadınların çalışma hayatında her geçen gün daha aktif bir şekilde yer alması gibi sosyodemografik değişiklikler, orta yaşlı kadınların sağlığını korumanın önemini, sosyal, ekonomik ve politik yönden ön plana çıkarmaktadır.

Menopoz öncesi dönemdeki yüksek östrojen düzeyleri, dengeli redoks homeostazı, yüksek beyin enerji metabolizması ile normal bir mitokondriyal aktivite paraleldir. Menopoz sürecinin başlaması ile beraber, östrojen düzeylerindeki düşüş ile oksidatif stres artışı ve buna paralel “hipometabolizma” meydana gelir. Nispeten kısa bir zaman diliminde östrojen seviyelerinde hızlı bir düşüş görülür ve mitokondriyal fonksiyonlar azalır (5). Östrojen seviyelerinde düşüş, vazomotor semptomlar, ürogenital atrofi, osteoporoz, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, enerji homeostazı ve duygudurum değişiklikleri gibi birçok

hastalık ve/veya patolojik süreçler ile sonuçlanabilir (6,7). Menopozda östrojen eksikliği, enerji harcamasının azalması ve visseral/abdominal yağlanmanın artması ve iştah/enerji dengesinde bozulmaya yol açabilir (8).

Östrojenin nöroprotektif etkilerinin, nörodejeneratif hastalıklar olan Alzheimer ve Parkinson hastalığına karşı koruyucu olabileceği gösterilmiştir (9,10). Menopoz sırasında, östrojenik nöroprotektif etkilerinin azalmasının, bazı kadınlar üzerinde olumsuz psikolojik etkilere yol açabileceği, bu dönemde kadınların depresif bozukluk veya semptomlara karşı savunmasız olabileceği düşünülmektedir (9).

Bu süreçte, metabolik dengeyi bozan çevresel faktörler, özellikle yüksek yağ içeriğine sahip Batı tipi diyetlerin yaygınlaşması, kadınların hem sistemik metabolik sağlıkları hem de nörodavranışsal fonksiyonları üzerinde ek bir yük oluşturmaktadır. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü, 1990–2010 döneminde kişi başına günlük diyetsel enerji arzında yaklaşık 879 kJ'lik bir artış bildirmiştir. Amerika Birleşik Devletleri, Avrupa ve Meksika; özellikleri farklı üç bölge olmalarına rağmen, toplam yağ alımının yüksek olduğu benzer beslenme davranışı yönünde eşzamanlı değişimler geçirmiştir (11). Yaşam tarzı değişiklikleri ile birlikte yüksek yağlı diyet (YYD) tüketiminin artması, östrojen düşüşü ile koruyucu etkilerin azaldığı menopozdaki kadınlar için kümülatif bir risk artışına yol açmaktadır **(**12). Östrojen hem periferik enerji dengesinin hem de santral sinir sisteminde (SSS) sinaptik plastisite ve nöroprotektif yolların kritik düzenleyicisi olduğundan, bu tampon mekanizmanın menopozda azalmış olması YYD ile birleştiğinde, mitokondriyal membran potansiyeli, reaktif oksijen türleri (*Reactive*

oxygen species, ROS) üretimi, sinaptik protein sentezi ve nörotrofin sinyallemesi gibi önemli işlevlerde bozulmaları tetikleyebilir (13). Bir çalışmada, östrojenin sıçanlarda ovariektominin neden olduğu ruh hali ve vücut ağırlığı değişikliklerini hafiflettiği ileri sürülmüştür (14). Buradan yola çıkarak, **menopoz, obezite ve depresyonun**, karmaşık ve henüz kesinlik kazanmamış bir şekilde bağlantılı olabileceği düşünülmektedir. Menopozda görülen metabolik ve nöropsikiyatrik yakınmaların hormon replasman tedavisi ile önlenebileceğini düşündüren çalışmalar vardır (15,16). Ancak menopozda kullanılan kombine hormon replasman tedavisinin, tek başına östrojen preparatları kullanıldığında görülen nöroprotektif etkiyi oluşturmaması ve östrojen tek başına kullanıldığında meme kanseri ve endometrial kanser riskinin artması, yeni tedavi yaklaşımlarının gerekliliğini ortaya koymaktadır (17).

Araştırma sonuçları, diyet ile kalori kısıtlaması ve egzersizin, metabolik ve oksidatif strese karşı koyan hücresel sinyal yollarını aktive ederek, nöronal sağlığı ve dayanıklılığı desteklediğini göstermektedir (18). Diğer yandan, mitokondri iç zarında yer alan ve termogenezde rol oynayan küçük proteinler olan "**mitokondriyal eşleşme bozucu proteinler" (*Uncoupler protein*-UCP),** nöronal plastisitede, metabolik ve oksidatif strese karşı direnç oluşturmada önemli roller üstlenmektedir (19). Araştırma sonuçları, UCP'lerin, kalori kısıtlaması ve egzersiz gibi biyoenerjetik zorluklarla indüklendiğini ve nöronları işlev bozukluğuna ve dejenerasyona karşı koruyabildiğini ortaya koymaktadır (20). İkinci olarak, mitokondriyal eşleşmenin bozulmasını artıran koşullar aynı zamanda mitokondriyal biyogenezi uyararak hücredeki mitokondri sayısında artışa neden

olmaktadır (20). Nöronlarda artan mitokondriyal biyogenez, egzersiz ve oruç tutma gibi biyoenerjetik zorluklara yanıt olarak, yeni sinapsların oluşumunu ve korunmasını sağlayabilir (21). Böylece UCP'ler, mitokondriyal elektron taşıma zincirinin aktivitesini azaltarak ve alternatif yollarla ATP üretimini artırarak, mitokondriyal serbest radikal üretimini azaltabilir ve hücresel biyoenerjetiği sürdürebilir (22). Bu endojen proteinlerin etkisini taklit edebilecek bir mitokondriyal eşleşme bozucu ajan olan **2,4-dinitrofenol** (DNP/2,4-DNP), mitokondriyal zar potansiyelindeki değişiklikler ile enerjinin ATP sentez aşamasını atlayarak ısı şeklinde dağılmasına neden olmaktadır (23). Düşük doz DNP, oksidatif fosforilasyon eşleşmesini kontrollü biçimde bozarak/ayırarak (*mild uncoupling*) mitokondriyal biyoenerjetik düzeni yeniden ayarlar. DNP'nin bu etkisinden yola çıkarak nörodejeneratif hastalıklarda olası terapötik kullanımı üzerine araştırmalar devam etmektedir (22, 24).

Birleşmiş Milletler'in verilerine ve tahminlerine göre, dünya genelinde 2020 yılında 50 yaş ve üzerindeki kadın sayısı 985 milyondur ve bu sayının 2050'de 1,65 milyara yükselmesi beklenmektedir (25). Menopoz dönemini de kapsayan orta yaştaki ruhsal sağlık sorunlarının küresel çapta artması, ücretli ve ücretsiz çalışma hayatının zorunlukları, çocuk yetiştirme sorumluluğu, hasta veya yaşlı aile üyelerine bakım verme, sosyal ağları koruma çabası ve gençlik odaklı bir toplumda yaşlanmanın getirdiği stres gibi sosyal teoriler ile açıklanarak, kadın yaşamının karmaşıklığının bir ürünü olarak kabul edilmiştir (26). Ancak geldiğimiz noktada sağlık sisteminin her basamağında kadınların menopoz geçişi ve sonrasında yaşam

kalitesini iyileştirmek için çalışmaların sürdürülmesine dair çağrılar ve yeni stratejiler geliştirilmesine yönelik farkındalık artmaktadır (4).

Bu özel grubun ihtiyaçları dolayısıyla, bu tez çalışmasında, öncelikle yüksek yağlı diyet ile beslenen ovariektomili sıçanlardaki duygudurum ve nörobilişsel fonksiyonların değerlendirilmesi ve DNP'nin duygudurum ve nörobilişsel fonksiyonlar üzerindeki potansiyel düzenleyici/koruyucu etkilerinin araştırılması planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Menopoz ve Östrojen Yoksunluğu

Menopoz, herhangi bir patolojik sürece bağlı olmaksızın gelişen östrojen eksikliği sonucunda menstrüasyonun doğal ve kalıcı olarak sona ermesi ile karakterizedir. Terim, kökenini Yunanca'da "durmak" anlamına gelen *pausis* ve "ay" anlamına gelen *men* sözcüklerinden almaktadır (27). Bu durum kendiliğinden (doğal menopoz) veya iatrojenik (sekonder menopoz) olabilir. İkinci durum, her iki overin de cerrahi olarak çıkarılması (cerrahi menopoz) ve kemoterapi veya radyoterapiye bağlı over yetmezliğini içermektedir (28). Birçok kadın, menopoz geçişi başladığında, örneğin hormonal kontrasepsiyon, endometriyal ablasyon veya histerektomi geçirmiş olmaları veya önceden var olan oligo-amenore nedeniyle doğal olarak menstrüel kanama yaşamıyor olabileceğinden, menopozun pragmatik tanımı over fonksiyonunun kalıcı olarak sona ermesidir (29).

Menopoz evreleri ilk olarak *Stages of Reproductive Ageing Workshop* (STRAW) tarafından tanımlanmış, ardından STRAW+10 mutabakatı ile güncellenmiştir. STRAW+10 sınıflaması, kadınların üreme yaşlanmasının evrelendirilmesinde menstrüel döngü karakteristiklerine dayanmaktadır (30). **Reproprodüktif dönem**, menstrüel döngülerin düzenli olduğu ve hormonal fonksiyonların sürdüğü, menarştan menopoza kadar olan dönemdir (31). Östrojen ile inhibin A ve B'nin gonadotropinler üzerindeki baskısının azalmasıyla, folikül uyarıcı hormon (FSH) ve luteinize edici hormon (LH) üretimi artar. Bu süreç geç reproprodüktif dönem olarak tanımlanır.

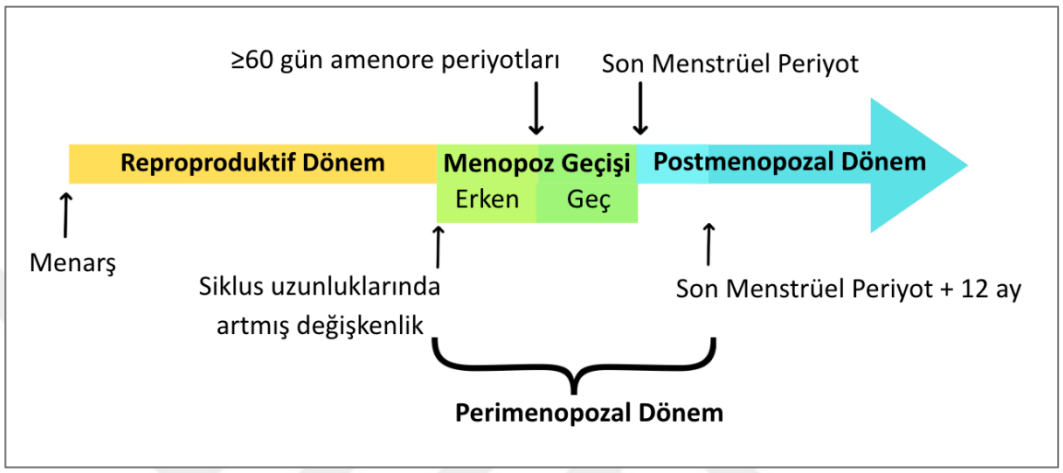
Erken menopozal geçiş, menstrüel siklus uzunluğunda artmış değişkenlik ile karakterizedir. Ardışık siklusların uzunlukları arasında 7 gün veya daha fazla bir farkın ortaya çıkması ve bu farklılığın kalıcı olması erken menopozal geçiş olarak tanımlanırken, geç menopozal geçiş 60 gün veya daha uzun süren amenore epizotları ile tanımlanmaktadır (30).

Son menstrüel periyot, bir kadının yaşamındaki son menstrüel kanamasını ifade eder. Ancak bu durum geriye dönük (retroaktif) olarak tanımlanır; çünkü son menstrüel periyodunun gerçekleştiği, yalnızca 12 ay boyunca menstrüel kanamanın olmaması ile doğrulanabilmektedir. STRAW+10 kriterlerine göre son menstrüel periyot, menopozun resmi tanı noktasıdır ve evreleme sisteminde perimenopoz ile postmenopoz arasındaki sınırı oluşturmaktadır (30).

Perimenopoz, menopoz çevresindeki dönem olarak tanımlanır. STRAW+10'a göre erken menopozal geçiş ile başlar ve son menstrüel periyottan sonraki 12. ayda sona erer. Perimenopoz genellikle ‘‘değişim’’ olarak adlandırılır; bu yerinde bir tanımlamadır çünkü üreme organlarının yaşlanmasıyla birlikte fizyolojik ve nörolojik semptomlardaki değişkenlik artmaktadır (32).

Postmenopoz, son menstrüel periyotun gerçekleştiğini doğrulayan 12 aylık amenore süresi tamamlandıktan sonra başlamaktadır. Erken ve geç postmenopoz olarak ikiye ayrılır. Erken postmenopoz, menopoz sonrası dönemin ilk 5-8 yılını kapsar. Bu dönemde FSH düzeyleri giderek yükselir ve yüksek seviyelerde sabitlenir, östradiol düzeyleri azalır ve düşük seviyelerde stabil hale gelir**.** Geç postmenopoz evresi ise, erken postmenopozun ardından başlayarak yaşam boyu

devam eder (30). Bu dönemler, STRAW+10 zamanlamasından yola çıkarak basitçe görselleştirilmiştir (**Şekil 1**).



Şekil 1. Menopoz evrelemesinin STRAW+10 zamanlamasından yola çıkarak oluşturulan şeması

Östrojen eksikliğinin kronik etkileri çok yönlü ve oldukça yaygındır. Bu etkilerden başlıcaları **Tablo 1**'de özetlenmiştir.

Tablo 1. Östrojen eksikliğinin farklı sistemlerde oluşturduğu etkiler

İskelet Sistemi	Osteoporoz, kırık riski artışı (33)
Kardiyovasküler Sistem	Endotel disfonksiyonu, artmış kardiyovasküler risk (34)
Kas Sistemi	Kas kütlesinde azalma, kas gücünde düşüş (35)
Ürogenital Sistem	Vajinal kuruluk, disparoni, yanma ve idrar yolları enfeksiyonlarına yatkınlığında artış, inkontinans (36)
Dermatolojik Sistem	Ciltte elastikiyet kaybı ve cilt yaşlanması (36)
Sinir Sistemi ve Bilişsel Fonksiyonlar	Bellek ve dikkat bozuklukları, artmış nörodejeneratif risk (37)
Metabolik Etkiler	Yağlanma, insülin direnci, non alkolik karaciğer hastalığı riskinde artış (38)
Ruh Sağlığı	Uyku bozuklukları, duygu durum değişiklikleri, düşük libido, anksiyete (39, 40)

Menopoz sonrası kadınlar, lipit metabolizmasını değiştiren hormonal dalgalanmalara bağlı olarak merkezi obeziteye karşı özellikle savunmasızdır (41).

Nitekim östradiol açil-CoA oksidaz ve eşleşme bozucu UCP2-UCP3 proteinlerinin (*uncoupling protein 2 ve uncoupling protein 3*) düzenlenmesi yoluyla kas oksidatif kapasitesini artırır, bu da lipid birikimi olmadan yağ asidi alımını artırmaktadır (42).

Östrojen ayrıca, kadın beyninin metabolik sisteminin temel düzenleyicilerinden biridir ve glukoz metabolizması, glukoz taşınması ve ATP üretimi ile mitokondriyal solunum dahil olmak üzere biyoenerjetik sistemdeki tüm süreçlere katkıda bulunur (43). Mitokondriler, diğer hücresel yapılara ek olarak, enerji dengesinde hassas düzenlemeler ve hücrede ROS üretimi ile apoptozu da içeren mitokondriyal süreçleri modüle etmek için östrojen etkisine mükemmel bir hedef oluşturmaktadır. SSS'de, frontal lob ve hipokampusta mitokondrilere özgü östrojen reseptörlerinin (ER) lokalize olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, östrojen yanıt elemanları (*estrogen response elements,* ERE) mitokondriyal DNA'da (mtDNA) bulunur ve steroid reseptörlerinin bağlanmasına olanak tanır. Aslında, ER, mtDNA'da bulunan ERE'ye bağlanabilir. Böylelikle doğrudan mitokondriyal DNA tarafından kodlanan elektron taşıma zinciri komplekslerinin alt birim transkripsiyonlarını artırabilir (5).

Östrojenin SSS'de metabolik, gelişimsel ve işlevsel bir düzenleyici olmasının yanı sıra nöroprotektif bir molekül olarak da aktif rol oynadığı bilinmektedir (44). SSS üzerindeki etkisini gösterme şekli, özellikle nörotrofik ve nöroprotektif etkileri içerir; sinaptik plastisiteyi, nörit büyümesini ve hipokampal nörogenezi artırır, nöronal hasara ve apoptoza karşı koruma sağlar (45).

Menopoz geçişi ve postmenopoz dönemlerinde görülen depresif belirtilere ilişkin literatür halen tartışmalıdır; bazı yazarlar, hormonal çevredeki premenstrüel

değişimlere duyarlılık nedeniyle menopozal geçişin kadınlar için bir "kırılganlık penceresi" olabileceğini öne sürmüştür (46). Menopoz sonrası östrojen seviyesinin düşmesiyle birlikte kadınlarda görülen depresyon, erkeklerdekine benzer yaygınlıkta olan yaşlılık depresyonuna benzeyebilir (47, 48). Ancak perimenopoz döneminde ortaya çıkan depresif belirtiler postmenopozda da devam etmekte ve özellikle erken postmenopozal evrede depresyon prevalansı artmaktadır (49, 50). Ülkemizde postmenopozal dönemdeki depresyon prevalansı çalışmalarda %28,1-46,2 olarak bildirilmiştir (51, 52).

Menopozdaki ruh hali değişikliklerinin patofizyolojisi tam olarak anlaşılamamakla birlikte, değişen östrojen seviyelerinin serotonerjik nörotransmiter sistem üzerindeki modülasyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (53). Dolayısıyla menopozal depresyonun geleneksel birinci basamak tedavisi, orta düzeyde veya zayıf sonuçlar veren antidepresanları içerir (54). Majör depresif bozukluğu olan postmenopozal kadınlar, yaygın olarak kullanılan seçici serotonin geri alım inhibitörü essitaloprama yanıt vermeyebilir ve ayrıca kadınların bu sınıftaki ilaçlara karşı taşifilaksi geliştirmesi de mümkündür (55). Menopozla ilişkili depresyon tedavilerini inceleyen araştırmalar literatürde halen kısıtlıdır (54). Soares ve ark. tarafından yapılan çalışmada, hormon replasman tedavisinin perimenopozal depresyonu tedavi etmede plasebodan üstün olduğu bulunmuştur (56, 57). Ancak hormon replasman tedavisi ile yapılan koruyucu yaklaşımda, östrojenin tek başına kullanılması meme kanseri ve endometrial kanser riskini artırmaktadır (54). Oluşabilecek riskten kaçınmak adına progestin ile kombine uygulama yaklaşımı düşünülmüştür. Ancak bir çalışmada bir progesteron türevi

olan medroksiprogesteronun, hipokampal nöronal ve glial hücrelerde östrojen ile indüklenen mitokondriyal respiratuar rezerv kapasitesini azalttığı bulunmuştur (17). Bu durum, kombine hormon replasman tedavisinin, tek başına östrojen preparatları kullanıldığında görülen nöroprotektif etkiyi oluşturamayacağı ve yeni tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç olduğu gerçeğini ortaya koymaktadır.

2.1.1. Kemirgenlerde Menopoz Modelleri

Kemirgen modelleri, gonadal hormonların gelişimsel ve bilişsel süreçler de dahil olmak üzere çeşitli vücut sistemleri üzerindeki etkilerini değerlendirmek için kullanılmaktadır (58). Doğal menopoz (*intact aging*), cerrahi menopoz veya overlerin alınması ve hızlandırılmış over yetmezliği olmak üzere üç tip menopoz modeli bulunmaktadır.

2.1.1.1. Doğal Üreme Yaşlanması Modeli

Kemirgenlerin menstrüel döngü yerine östrus döngüsü vardır. Kemirgenlerin östrus döngüsü, endometriumun fonksiyonel tabakasının menstrüel kanama yoluyla atılmak yerine yeniden rezorpsiyonu gibi çeşitli yönlerden farklılık gösterir. Östrus döngüsü her dört ila beş günde bir gerçekleşir ve insan menstrüel döngüsüne benzer over kaynaklı hormonal dalgalanmaları içeren dört aşamadan oluşur: proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus (59).

İnsanlar ve sıçanlarda üreme yaşlanması benzer aşamaları takip eder; düzenli döngüden düzensiz döngüye ve döngüsüzlüğe geçiş yaparlar. Sıçanlar ve

fareler genellikle 9–12 aylık yaşlarda düzensiz östrus döngüleri yaşarlar; bu durum **"*estro-pause*"** olarak adlandırılmaktadır (58).

Bu modelin zayıf yönü, kemirgenlerin insanlarda görülen gerçek menopozu sergilememesidir. Zira gerçek menopoz düşük ya da saptanamaz düzeyde östrojen ile karakterizedir. Bunun yerine, kemirgenlerde '*estro-pause'* olarak adlandırılan reprodüktif senesens (yaşlanma) düşük ancak kalıcı östrojen düzeyleriyle tanımlanır. Yaşlanan kemirgenlerin çoğu (%60–70), 10 ila 100 gün sürebilen, sürekli yüksek östrojen düzeyleri ve düşük progesteron düzeyleriyle karakterize edilen spontan bir 'sabit östrus' dönemine geçiş göstermektedir (60). Kemirgenler, reprodüktif senesensin başlangıcında, kadınlarda olduğu gibi folikül rezervi tükenmiş overlere sahip olmadıklarından, yaşlı ve overleri intakt kemirgenlerde dolaşımdaki gonadal hormon düzeyleri menopozdaki kadınlardakine yakın değildir. Her ne kadar tüm kemirgenler sonunda anöstrus durumuna girseler de, sürekli östrus ve anöstrus dönemi sıçan beyninde önemli farklılıklara neden olabilir. (61). Ek olarak, yaşlanan kemirgenlerde, bu hayvanların overlerinde geçici veya kemirgenin yaşam süresinin geri kalanında devam edebilen korpus luteum geliştiğinden, psödo gebelik durumu (kalıcı diöstrus) da tanımlanmıştır (60).

2.1.1.2. Hızlandırılmış Over Yetmezliği

Hızlandırılmış over yetmezliği oluşturmak amacıyla kullanılan iki tip ovotoksin vardır. Bunlar sigara dumanında da bulunan polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve 4-vinilsiklohekzenin diepoksit (VCD) formudur (62). Mesleki kimyasal VCD, over küçük foliküllerinin (*primary and primordial*) kaybına neden

olur ve atrezinin doğal sürecini hızlandırarak kemirgen modellerinde insan menopozunu taklit etmek için kullanılır (63).

VCD günde 160 $mg \cdot kg^{-1}$, intraperitoneal, tekrarlayan günlük enjeksiyonlar ile 15 gün içinde tüm primordiyal folikülleri tüketir (63). Bu etki, oosit plazma membranında yer alan ve folikül sağkalımı için kritik öneme sahip c-kit'in ototirozin fosforilasyonunun doğrudan inhibisyonu yoluyla gerçekleşir (64).

VCD özellikle lipid kompartmanlarda birikir. Menopozda VCD hayvan modelinin zayıf yönü, bu bileşiğin akciğer ve karaciğer gibi diğer organ sistemleri üzerinde toksik ve/veya kanserojen etki oluşturmasıdır. Ayrıca bileşiğin 108,18 g/mol'lük düşük molekül kütlesi, siklohekzen yapısı ve lipofilik olması gibi fizikokimyasal özellikleri maruziyet süresince beyinde birikim potansiyeline işaret etmektedir (62).

2.1.1.3. Ovariektomi: Cerrahi menopoz modeli

Doğal menopoz, kadınlarda üreme döneminin sonlandığını ifade eden klinik bir terimdir; ancak benzer bir fizyolojik durum, yaygın olarak cerrahi menopoz olarak adlandırılan bilateral ovariektomi/ooferektomi ile de oluşturulabilir (60). Dişi hayvan modellerinde gonadal hormon etkilerinin değerlendirilmesinde klinik öncesi alanda en sık kullanılan yöntem, ovariektomi (Ovx) yani overlerin cerrahi olarak çıkarılmasıdır.

Ovx, gonadal hormon yoksunluğunun spesifik etkilerini değerlendirmek için hızlı ve kolaylıkla tekrarlanabilen bir yöntemdir (58). Kemirgenlerde ‘‘uterin horn’’ olarak adlandırılan çift boynuzlu uterus *(bifurcated uterus*) bulunur ve

overler böbreklerin posterolateral kutuplarında yer alır, her biri bir mezovaryum aracılığıyla abdominal kavitenin dorsal duvarına tutunur (65). Ovx için overler ve over kanalları (*oviducts*, fallop tüplerinin bir benzeri) çıkarılırken, uterus yapısı korunur (66). Ovariektomi ile oluşturulan menopoz modelinin zayıf yönü, doğal menopozda overlerin intakt kalması ve fizyolojik menopozdaki kademeli ilerleyen sürecin taklit edilememesidir. Bununla birlikte hızlı ve net östrojen eksikliği modeli gerektiğinde özellikle tercih edilmektedir. Cerrahi menopoz modelleri beyin ve davranışsal sonuçlar hakkında değerli bilgiler sağlamaktadır. Birçok araştırma grubu, ekzojen over hormonu uygulamasının beyin üzerindeki nöroprotektif etki potansiyelini değerlendirmek için Ovx modelini kullanmıştır.

2.2. Yüksek Yağlı Diyet ile Beslenme

Evrimsel açıdan aşırı yeme güdüsü, kalori kıtlığının egemen olduğu ortamlarda, üreme başarısı ve hayatta kalımda kritik rol oynayan bir biyolojik içgüdüdür (67). Öte yandan Sanayi Devrimiyle birlikte son 200 yıl, eşi görülmemiş hızdaki tıbbi, tarımsal ve teknolojik ilerlemelerle şekillenmiş; bu ilerlemeler insan ömrünü belirgin ölçüde uzatmış, gıda arzının maliyetini düşürüp erişilebilirliğini artırmıştır (68). Literatürde, Batı toplumlarındaki çok boyutlu yaşam tarzı değişimlerinin, insan genomunun evrimsel adaptasyon temposuna kıyasla oldukça hızlı olduğu ve bu nedenle tam uyumun gerçekleşmediği yönünde güçlü bir mutabakat bulunmaktadır (68). Hızlı yaşam değişiklikleri ile insanın genetik olarak belirlenmiş biyolojisi arasındaki bu uyumsuzluk, kalori alımının enerji harcamasını aştığı, insanlık tarihinde pek sık rastlanmamış bir olguyu yansıtmaktadır. Temiz

suya erişim, aşı ve antibiyotiklerin keşfi bulaşıcı hastalık yükünü azaltırken; obezite, metabolik sendrom, tip 2 Diyabetes Mellitus, alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığı, alkole bağlı olmayan steatohepatit, kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve bazı kanserler**,** medeniyetin getirdiği hastalıklar olarak bilinmekte*,* Batı toplumundaki ölümlerin %80'inden sorumlu görülmekte ve giderek artan sosyoekonomik bir yük oluşturmaktadır (69).

Batı tipi beslenme; enerjiden yoğun, işlenmiş/ultra-işlenmiş gıdaların, doymuş yağların, ilave şeker ve tuzun yüksek, lif ve mikro besinlerin düşük olduğu bir örüntüdür. Bu örüntüyle uyumlu olarak, makro besin dağılımında yıllar içinde yağ tüketimi ~%45'e yükselmiştir; dolayısıyla YYD Batı tipi beslenmede giderek daha baskın hale gelmiş bulunmaktadır (70).

YYD tüketimi; obezite ve Tip II diyabet, hiperlipidemi, hiperkolesterolemi ve hipertansiyon gibi durumları kapsayan metabolik sendrom dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda risk artışı ile ilişkilendirilmiştir (71). Nitekim YYD preklinik çalışmalarda obezite, ateroskleroz, hepatik steatoz, düşük doz streptozotosin veya fruktoz kombinasyonu ile tip 2 Diyabetes Mellitus, NaCl eklenmesi ile hipertansiyon gibi hastalıkların modellenmesinde kullanılmaktadır (72, 73).

YYD, obezite ve metabolik sendrom ekseninin ötesinde nörodejeneratif ve nöropsikiyatrik hastalıkların preklinik modellemesinde de giderek daha yaygın kullanılmaktadır. YYD maruziyeti; hipokampusa bağlı öğrenme-bellek performansında bozulma, mikrogliyal/astrositik aktivasyon, sinaptik bütünlük göstergelerinde azalma ve kan beyin bariyeri bütünlüğünde bozulma ile ilişkilendirilmiştir (74). Bu etkiler çalışmadan çalışmaya, tür/soy hattı ve diyet

kompozisyonu (yağ yüzdesi, doymuş yağ türü, şeker/fruktoz eşliği) gibi değişkenlere bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir (75,76).

YYD, vücut ağırlığının artışından veya obeziteden bağımsız biçimde SSS üzerinde davranışsal ve moleküler değişiklikler tetikleyebilir. Klinik kanıtlar, Batı tarzı bir diyetin yalnızca dört gün tüketilmesinin insanlarda hipokampusa bağlı öğrenme ve hafızayı etkilediğini göstermektedir (77). Kemirgenlerde yapılan bir çalışmada kısa süreli YYD maruziyetinin, kilo artışı olmaksızın bellek bozulmalarını ve depresyon benzeri davranış artışını tetiklediği; bu değişikliklerin sinaptik yoğunlukta azalma, astrosit aktivasyonu ve uzun süreli YYD maruziyetinde mitokondriyal işlev bozukluğu ile birlikteliği bildirilmiştir (74).

YYD modellemelerinde yağdan sağlanan enerjinin yüzdesi, kullanılan yağın içeriği ve diyetin uygulanma süresi çalışmalar arasında değişiklik göstermektedir. Enerjinin %20 ila %60 oranlarında yağdan sağlandığı, çeşitli yağ fraksiyonlarına sahip çok sayıda farklı yüksek yağlı diyet kullanılmaktadır ve temel yağ bileşeni hayvansal yağlar (örneğin domuz yağı veya sığır yağı) ile bitkisel yağlar (örneğin mısır veya aspir yağı) olabilmektedir (78). YYD, kemirgenlerde tipik günlük kalori alımının aşılmasına neden olur. Sıçanlarda hayvansal yağlar, bitkisel yağlara göre diyet kaynaklı obezite ve insülin direnci gelişmesine daha çok neden olduğundan öncelikle tercih edilmektedir (79). Buna karşın balık yağı ile beslenen sıçanlarda, standart yemle beslenen sıçanlarla kıyaslandığında, daha az vücut ağırlığı değişimi ile birlikte lipid ve glukoz metabolizması üzerine olumlu etkiler izlenmiştir (80, 81). Özellikle farklı içeriklerdeki bitkisel yağlar ile geliştirilen modeller halen literatürde daha az yer almaktadır.

Yüksek yağlı diyetin nöronal fonksiyonlara olan etkisinin başlangıçta ateroskleroz gibi kardiyovasküler işlev bozukluklarından kaynaklandığı varsayılmış ve diyetin beyin üzerindeki doğrudan etkisi göz ardı edilmiştir (82). Yüksek yağlı diyet, nöronal işlevlerde bozulmaya zemin hazırlayarak nörolojik hastalıklara ve yaşlanmaya bağlı işlev kayıplarına yatkınlığı artırabilir (82). Menopozdaki üreme yaşlanması ve buna eşlik eden östrojen eksikliği, nöronal enerji homeostazı ile sinaptik bütünlükteki kırılganlığı artırarak söz konusu riskin şiddetlenmesine katkıda bulunabilir.

YYD'nin aşırı uygulanması, mitokondrilerin yağ asitleriyle aşırı yüklenmesine yol açarak asetil-KoA üretimini artırır. Bunu takiben Krebs döngüsü üzerinden NADH üretimi yükselir; bu da mitokondride elektron taşıma zincirindeki elektron akışının artmasına ve sonuçta ROS üretiminin çoğalmasına neden olur (83,84). Bununla birlikte YYD mitokondrilerin füzyon–fisyon dengesini bozarak kalite kontrolünü zayıflatabilir. Füzyon proteinleri Mitofusin-1/2 ve Optik Atrofi 1 (Mfn1/2, OPA1) mitokondri içeriğinin karışması ve onarımını desteklerken, Dynamin ile ilişkili protein 1 (*Dynamin-Related Protein,* DRP1) aracılı fisyon hasarlı fragmanların ayrıştırılıp mitofajiye yönlendirilmesini sağlamaktadır. YYD ile indüklenen obezitede, iskelet kasında mitokondri alanının azaldığı (≈%35) ve solunum kapasitesiyle uyumlu biçimde mitokondriyal fragmantasyonun arttığı bildirilmiştir. YYD'nin bir gün tüketimi MFN2'de (mitofusin-2) geçici bir azalmaya yol açarken, bu diyetin yedi gün tüketilmesini takiben MFN2 ifadesinin arttığı bulunmuştur (85). YYD'nin mitokondri dinamiklerini hedef alan çok yönlü değişikliklerle nöronal bütünlüğü zayıflatabileceği çalışmalarda gösterilmiştir.

Yüksek yağlı diyet, serebral kortekste proton kaçağını (*mild uncoupling*) azaltıp eşleşme verimliliğini patolojik olarak artırarak mitokondriyal membran potansiyelini ROS üretimi için kritik eşik üzerine taşımaktadır; buna eşlik eden oksidatif stres ve nöroenflamasyon artışı ile BDNF yolak aktivitesi düşmektedir (86).

Bu nedenle, hafif düzeyde eşleşme bozulmasının farmakolojik veya biyolojik yollarla yeniden sağlanması, mitokondriyal membran potansiyelini güvenli aralıkta tutup ROS emisyonunu sınırlayarak, YYD ile ortaya çıkan sinaptik disfonksiyona karşı hedefe yönelik bir müdahale noktası olabilir.

2.3. Nörodavranışsal Test Düzenekleri

Davranışsal değerlendirme, travmatik beyin hasarı gibi yaralanmalar, nörodejeneratif hastalıklar ve duygudurum bozuklukları gibi hastalıkların hayvan modellerinin, hastalığın klinik özelliklerini başarılı bir şekilde taklit edip edemeyeceğini değerlendiren yaklaşımdır (87). Hastalıkları anlamanın yanı sıra, herhangi bir yeni ilaç grubunun veya kombinasyonunun etkisini değerlendirmek için de son derece faydalıdır. Kemirgenlerde sıklıkla kullanılan davranışsal testler, Morris su labirenti (*Morris water maze*, MWM) testi, yeni nesne tanıma testi (*Novel object recognition*, NOR), Barnes labirenti, bilye gömme testi, açık alan testi (*Open field test*, OFT), yükseltilmiş artı labirent (*Elevated plus maze*, EPM) testi, kuyruktan ası testi (*Tail suspension test*, TST), zorunlu yüzdürme testi (*Forced swim test*, FST), sükroz tercih testi (*Sucrose preference test*, SPT), aydınlık-karanlık kutu testi, pasif kaçınma testi olarak sıralanabilir. Bu çalışmada, uygulanan

modelin ve farmakolojik tedavi yaklaşımına yönelik araştırılan ajanın etkileri, aşağıda bahsedilen bir dizi davranışsal yöntem ile değerlendirilmiştir.

Açık Alan Testi, ilk olarak 1934 yılında Hall tarafından geliştirilmiş olup, başlangıçta kemirgenlerde duygusal davranışları ölçmek için kullanılmıştır (88). Günümüzde, keşifsel davranışı, lokomotor aktiviteyi ve kaygıyla ilgili davranışı değerlendirmek için sıklıkla kullanılmaktadır. Test aparatı, deney hayvanının türüne göre labirentin merkezi açıklık hissi verecek kadar büyük; dairesel, kare veya dikdörtgen şeklinde ve kaçmayı önleyecek kadar yüksek duvarlarla çevrili bir alandan oluşur (89). Deney hayvanı, test düzeneğinin merkezine yerleştirilir ve belirli bir süre boyunca yatay lokomotor aktivitesi, şahlanma (*rearing*) sayısı, tımarlanma (*grooming*) süresi, merkezde ve periferde geçirilen süreler kaydedilir (89). Kemirgenler, açık alanın merkezinde dolaşmak yerine periferde kalmayı tercih ederler (90). Nitekim fareler ve sıçanlar, duvarlara yakın yürür; bu davranış "thigmotaksis" olarak adlandırılır (90). Kemirgenlerin merkez alandan kaçınması ve aparatın periferinde daha çok zaman geçirmesi artan anksiyete (kaygı) olarak yorumlanır. Merkezde geçirilen sürenin artması, anksiyete benzeri davranışın azalması ile ilişkilendirilir (91). Bununla birlikte, çalışmalar genellikle anksiyete benzeri davranışın yanı sıra hareket aktivitesini ve/veya mekânsal keşfi incelemek amacıyla açık alan testini kullanmaktadır (92).

Yükseltilmiş Artı Labirent Testi, ilk olarak Pellow ve arkadaşları tarafından tanımlanan, kemirgenlerde anksiyete (kaygı) benzeri davranışları değerlendirmek için uygulanan güvenilir bir yöntemdir (93). Testte, iki açık ve iki kapalı koldan oluşan yükseltilmiş artı biçimindeki labirentin merkezine deney

hayvanı yerleştirilir ve belirlenen süre boyunca alanı serbestçe keşfetmesine izin verilir. Test, kemirgenlerin keşifsel doğasına dayanmaktadır. Diğer yandan kemirgenlerin yüksek açık alanlara karşı doğuştan bir korkusu olduğundan, labirenti serbestçe keşfetmelerine izin verildiğinde, kapalı kollara kıyasla açık kollara daha az girerler ve açık kollarda daha kısa süre kalırlar. Tipik olarak, benzodiazepin gibi anksiyolitikler açık kollara giriş sayısını ve açık kollarda geçirilen süreyi artırmaktadır (94). Yükseltilmiş artı labirenti testinin avantajı, yürütülmesinin ve kaydedilmesinin kolay olması ve ön eğitim gerektirmemesidir (95).

Sükroz Tercih Testi, anhedoni ve depresyonu değerlendirmek için kullanılır (96). Kemirgenler doğal olarak tatlı besinleri/çözeltileri severler ve biri tatlandırılmış bir çözelti, diğeri su içeren iki şişe sunulduğunda, tatlandırılmış çözeltiyi tercih etme eğilimindedirler (97). Dolayısıyla sükroz tercih testi, deney grubunun sakkaroz alımındaki azalmanın kontrol gruplarına göre anhedoniyi gösterdiği varsayımına dayalı olarak geliştirilmiştir (98).

Sükroz tercih testinin uygulanma protokolleri araştırma grupları arasında önemli farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıklar; test öncesi uygulanan yiyecek ve/veya su kısıtlamasının süresi, test süresinin uzunluğu, kullanılan sükroz solüsyonunun konsantrasyonu ve testin aydınlık ya da karanlık fazda gerçekleştirilmesi gibi değişkenlerden kaynaklanmaktadır (99). Literatürde standartlaştırılmış, evrensel olarak kabul edilmiş tek bir protokol bulunmaması nedeniyle farklı laboratuvarlarda elde edilen sonuçlar arasında belirgin varyasyonlar gözlenebilmektedir (99).

Zorunlu Yüzdürme Testi, 1978'de Porsolt ve arkadaşları tarafından antidepresan ilaçların klinik etkililiğini öngörmek amacıyla geliştirilen, kemirgenlerde davranışsal umutsuzluk testi olarak da bilinen bir modeldir (100). Hayvan modellerinde depresyon benzeri davranışları değerlendirmek için en sık kullanılan testlerden biridir (101). Zorunlu yüzdürme testi sırasında deney hayvanı, içinden kaçamayacağı su dolu silindir bir kabın içine yerleştirilir. Hayvan ilk başta kaçmaya çalışacak ancak sonunda hareketsizlik gösterecektir. Test sırasında hareketsiz geçirilen süre depresyon benzeri davranış göstergesi olarak ele alınır (102). Fareler, sıçanlarla karşılaştırıldığında bu testte daha fazla değişkenlik gösterir, bu nedenle istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde etmek için genellikle daha fazla hayvan kullanılmaktadır (103).

Yeni Nesne Tanıma Testi, ilk kez 1988 yılında Ennaceur ve Delacour tarafından incelenmiştir (104). Yeni nesne tanıma testinde temel olarak olumlu veya olumsuz pekiştiriciler yoktur ve bu test kemirgenlerin yeni nesnelere karşı gösterdikleri doğal tercihi değerlendirmektedir (105). En yaygın kullanılan protokollerde, her test oturumu iki aşamalı bir denemeden oluşmaktadır. İlk aşamada (eğitim, *training*), hayvanlar açık alan aparatında iki özdeş nesneye belirli bir süre maruz bırakılır. İkinci aşamada (hatırlama/test), hayvanlar biri önceki oturumdan tanıdık, diğeri yeni olmak üzere iki farklı nesneye yeniden maruz bırakılırlar (106). Kemirgenlerin yeni ve tanıdık nesnelere yönelik ilgileri değerlendirilerek hafıza hakkında çıkarım yapılır. Yeni nesne tercihi oranı, yeni nesne ile ilgilenme süresinin, her iki nesne ile toplam ilgilenme süresine

bölünmesiyle belirlenir (107). Yeni bir nesneye yönelik tercih, tanıdık nesnenin hayvanların hafızasında var olduğu anlamına gelir.

2.4. 2,4-Dinitrofenol (DNP)

2,4-Dinitrofenol (DNP), sarı, kristal toz formunda bir bileşiktir. Çeşitli sanayi alanlarında, özellikle boya, patlayıcı, böcek ilacı, ahşap koruma maddeleri ve fotoğraf kimyasalları üretiminde rol alan bir ara madde olarak kullanılmıştır (108). DNP'nin 100 yılı aşkın tarihsel keşfi, 1. Dünya Savaşı sırasında Fransızların mühimmat üretiminde kullanması ile başlamıştır (109). Oral yolla absorpsiyonunun yanı sıra, cilt yoluyla ve inhalasyonla da absorbe edilebilen bir bileşik olduğundan işçilerde maruziyet sonucu kendine özgü toksik etkilerin görülmesiyle dikkat çekmiştir (110). Belirgin kilo kaybı, terleme, ciltte ve ter renginde sararma bu etkiler arasında yer alır (111). Tıpkı Fransa'da mühimmat üretiminde çalışan işçilerde olduğu gibi hem trinitrotoluen (TNT) hem de DNP'ye maruz kalan Gallerli kadın işçilerin ciltleri ve saçları sarıya dönmüş ve bu nedenle dönemin kaynaklarında bu kadın işçiler "kanaryalar" (*canary girls*) olarak anılmıştır (112).

1933 yılında Stanford Üniversitesi'nde Maurice Tainter'ın DNP'nin insanlarda önemli kilo kaybına yol açtığını keşfetmesiyle kısa süre sonra kilo verme ilacı olarak popüler hale gelmiştir (113). DNP, 1934 yılına gelindiğinde tahmini 100.000 kişi tarafından kilo kontrolü için kullanmıştır (114). Büyük ölçekli tüketim, DNP'nin reçetesiz satılan çeşitli diyet ilaçlarında bulunması nedeniyle mümkün olmuştur. Çok sayıda ciddi advers etki ve ölümcül zehirlenme olgusu nedeniyle, ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) 1938 yılında 2,4-DNP içeren ilaçların satış

ruhsatlarını geri çekmiştir (108). İnsan kullanımına uygun olmayan bir ajan olarak etiketlenmesine rağmen DNP'nin, II. Dünya Savaşı sırasında Rus askerlerine sıcak kalmaları için reçete edildiği de kaynaklarda anekdot olarak bildirilmiştir (115).

Fizyolojik olarak, mitokondri iç zarında yerleşmiş olan elektron taşıma sistemi, ATP üretimi sağlayan sistemin adıdır. Elektronlar, son elektron alıcısı oksijene varana kadar, elektron taşıma sistemi tarafından taşınırlar. Kompleks I, III ve IV, elektronların O_2'ye aktarımı sırasında açığa çıkan enerjiyi, matriksten iç zar ve dış zar arasında kalan membranlar arası boşluğa, protonların (H^+) aktif taşınmasında kullanır (116). Böylece, elektron taşıma sistemi elemanlarının üzerinde bulunduğu çift katlı fosfolipid zarının iki tarafında potansiyel fark oluşturulur. Sonuçta iç zar boyunca matriks tarafı daha negatif ve daha alkali, intermembraner aralık ise daha pozitif ve asidik hale gelir. Ortaya çıkan elektrokimyasal gradyan (H^+ iyonlarının derişim farkı), ATP sentaz tarafından ADP'nin ATP'ye fosforilasyonu yani ATP sentezi için kullanılır. Oksidatif fosforilasyonun gerçekleşmesi için mitokondrinin iç zarının iki tarafında bir potansiyel fark oluşturulması gerekir. Dolayısıyla substrat oksidasyonu ile ATP sentezi, iç mitokondriyal membran boyunca oluşturulan elektrokimyasal proton gradyanı ya da proton itici kuvvet (Δp) aracılığıyla, dolaylı olarak eşleşmiştir (117). Bununla birlikte, intermembran aralığına taşınan protonlar, ATP sentazdan bağımsız olarak mitokondri matriksine geri dönebilmektedir, proton sızıntısı olarak bilinen bu süreç ATP yerine ısı üretimine yol açar (118).

Mitokondriyal eşleşme bozucu proteinler, proton sızıntısını indükleyebilen mitokondri iç zar taşıyıcı proteinleridir (118). İç mitokondriyal zardan proton

sızıntısı ile oksidatif fosforilasyon eşleşmesini bozar ve proton gradyanının enerjisini ısı olarak dağıtırlar. Özellikle kahverengi yağ dokusunda bulunan UCP1, bu mekanizma ile soğuğa uyum ve termogenezde rol alır **(**119). Farmakolojik bir ajan olan DNP, fizyolojik eşleşme bozulmasının yanı sıra, mitokondriyal membranın lipid kısmından protonları transfer edebilme yeteneğiyle oksidasyon ile fosforilasyonun eşleşmesini bozabilir (120). Bu bağlamda, DNP, bir hidrojen katyonunu hidrofobik bir fazdan elektrojenik olarak transfer edebilme özelliğine sahip olmasıyla bir protonofordur.

2,4-DNP lipofilik zayıf bir aromatik asittir; nötral ve anyonik formları pH'a bağlı olarak bir denge halindedir. Mitokondride membranlar arası boşluk asidik, matriksten alkali olduğundan DNP membranlar arası boşlukta protonlanır ve nötral fraksiyonu DNP-H belirginleşir. Hidrofobik çift katlı zardan matrikse pasif difüzyon ile geçer (121). Daha alkali olan matrikste proton bırakılır, DNP ise hem negatif membran potansiyelinin itici etkisi hem de adenin nükleotid transporter gibi taşıyıcılarla etkileşimi sayesinde membranlar arası boşluğa geri döner **(**121,122). Burada tekrar protonlanarak döngüye devam eder. Sonuç olarak, zar potansiyelinde düşüşe ve hücrede enerji üretimimin azalmasına yol açar. Bu durumda oluşan mitokondriyal eşleşme bozulması, hücrenin alternatif yollardan ATP üretimine yönelmesine olanak sağlar ve mitokondriyal biyogenezi uyarır (20). Ayrıca, proton sızıntısı ile mitokondriyal solunum zincirinin ROS üretimi arasında yakın bir ilişki bulunmaktadır. İzole mitokondrilerde mitokondriyal süperoksit üretimi, elektrokimyasal proton gradyanına yüksek derecede bağımlılık gösterir (118, 123).

Mitokondriyal eşleşme bozucular solunum hızını artırır, elektrokimyasal proton gradyanını düşürür ve izole mitokondrilerde ROS üretimini azaltır (118, 123).

Tarihsel olarak toksisite nedeniyle kullanım dışı bırakılan DNP (1938), günümüzde farklı bir çerçevede yeniden değerlendirilmektedir. DNP'nin kan-beyin bariyerini geçebildiği ve beyin dokusuna ulaşabildiği gösterilmiştir (124). DNP'nin mitokondriyal eşleşme bozucu olarak kullanılmasında bir avantajı, karbonil siyanür p-trifluorometoksifenilhidrazon (FCCP), karbonil siyanür m-klorofenilhidrazon (CCCP) gibi diğer eşleşme ayırıcılara kıyasla zayıf bir eşleşme ayırıcı olmasıdır, bu nedenle terapötik penceresi bu moleküllere kıyasla daha geniştir (125).

Son yıllarda, **çok düşük dozlarla "hafif mitokondriyal eşleşme bozulması *(mild uncoupling*)" yaratmanın oksidatif stresin azaltılması, mitokondriyal biyogenez ve sinyallemenin uyarılması ve nöronal sağkalımın desteklenmesi** yoluyla nörodejeneratif hastalıklarda terapötik potansiyele sahip olabileceğine ilişkin güçlü preklinik kanıtlar birikmektedir (126). DNP'nin BDNF'yi artırarak, hücresel stresi azaltarak ve mitokondriyal biyoenerjetikte hafif artışlarla hücresel dayanıklılığı destekleyerek egzersiz ve orucun nöroprotektif etkilerini kısmen taklit ettiği düşünülmektedir (127). DNP'nin ilgili literatürde bildirilen doz penceresi farelerde ~0,5–5 mg/kg arasındadır; bu da ~2–22 mg/gün arasındaki bir insan eşdeğeri doz (*human equivalent dose*) aralığına karşılık gelmektedir (127). Bu aralık, obezite için kullanılan yaklaşık 300 mg/günlük dozdan oldukça düşüktür. Huntington Hastalığı (HD) fare modelinde yapılan bir çalışmada, DNP 0,5, 1 ve 5 mg/kg/gün dozlarda kronik olarak uygulanmış ve 1 mg/kg/gün dozunda motor fonksiyonu anlamlı düzeyde iyileştirerek striatumda orta

dikenli nöron kimliğinin temel göstergesi DARPP-32 ile postsinaptik yoğunluk proteini PSD-95'in düzeylerini koruduğu gösterilmiştir (128). Bu çalışmada kullanılan 1 mg/kg DNP fare dozu, Huntington Hastalığı'na sahip bireyler için ~5 mg/gün'e eşdeğerdir ve insanlardaki obezite için 1930'larda kullanılan ~300 mg/gün'lük doza kıyasla ~60 kat daha düşüktür (127). DNP'nin düşük dozlarda uygulandığında çeşitli model organizmalarda yaşam süresini uzatabildiği bildirilse de bazı çalışmalarda kronik DNP tüketiminin yaşam süresini kısalttığı da rapor edilmiştir (129-131). Ayrıca yüksek dozda toksik olması, yaşlanma önleyici (*anti-aging*) etkiler ile ilgili çalışmaları sınırlamaktadır (132). Bu çelişkili bulguların, büyük olasılıkla doz-bağımlı etkilerden kaynaklandığı düşünülmektedir (132). Bununla birlikte, mevcut veriler değerlendirildiğinde, ömür uzatıcı özellik gösteren birçok preparatın da yüksek konsantrasyonlarda toksik etki oluşturduğu görülmektedir. Nitekim *Rhodiola rosea rizom* tozu ve *Capsicum frutescens* meyve tozu gibi diğer ömür uzatıcı preparatlar da düşük konsantrasyonlarda fayda sağlarken yüksek konsantrasyonlarda toksik etki göstermektedir (133,134).

İntraperitoneal olarak DNP uygulanan sıçanlarda, N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör agonisti olan kinolinik asidin striatal enjeksiyonunun neden olduğu beyin hasarına karşı anlamlı koruma sağladığı gösterilmiştir (135). İlginç bir şekilde, kinolinik asit infüzyonundan 1 saat önce veya 3 saat sonra DNP uygulanan sıçanlarda, lezyonların kontrol hayvanlarına kıyasla %25 daha küçük olduğu tespit edilmiştir (135). DNP'nin nöroprotektif etki mekanizmasının, mitokondriyal Ca^{2+} düzeylerinde ve ROS oluşumunda azalma ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (136). Ayrıca C57/BL6 soyundan farelerde travmatik beyin hasarı

modeli ile yapılan bir çalışmada, DNP'nin ön ilacı olan MP201 yaralanmadan 2 saat sonra başlanarak sonrasında günlük olarak oral gavaj yoluyla uygulanmıştır. Yaralanmadan 2 hafta sonra, çözücü (*vehicle*) grubundaki yaralı farelerin yeni nesne tanıma testindeki tanıma skorları, sham grubundaki ve MP201 ile tedavi edilen yaralı farelere kıyasla anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur (24).

Yukarıdaki çalışmalardan yola çıkarak DNP'nin, mitokondriyal biyoenerjetik dengenin bozulduğu ve mitokondriyal disfonksiyonun belirgin rol oynadığı birçok patolojik durumda (örneğin nörodejeneratif hastalıklar, metabolik sendrom, iskemik beyin hasarı) koruyucu ve iyileştirici etkiler gösterebileceği düşünülmektedir. Araştırmalar, bu etkinin oksidatif stresin azaltılması, mitokondriyal biyogenezin uyarılması ve enerji metabolizmasının yeniden düzenlenmesi yoluyla gerçekleştiğini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, bilindiği kadarıyla **menopoz modellerinde ve duygudurum bozukluğu modellerinde DNP'nin etkisini sistematik olarak inceleyen bir çalışma literatürde bulunmamaktadır**. Oysa menopoz ve beslenme ile ilişkili duygudurum bozukluklarında da mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, artmış oksidatif stres ve enerji metabolizması dengesizliği patofizyolojinin merkezinde yer almaktadır. Bu nedenle, DNP'nin bu modellerde araştırılması, hem temel bilim açısından yeni bir perspektif sunabilir hem de mitokondriyal hedefli terapötik yaklaşımlar için umut verici bir strateji oluşturabilir.

2.5. Ovariektomi ve Yüksek Yağlı Diyet Ekseninde Nörotrofik ve Metabolik Moleküller

2.5.1. BDNF

Nörotrofinler, SSS'nin işlevini destekleyen bir protein ailesidir. Esas olarak SSS'de sentezlenirler, ancak T ve B lenfositleri, monositler, vasküler endotel, düz kas ve iskelet kası hücreleri gibi nöronal olmayan periferik hücrelerde de üretilmektedirler (137). BDNF, nörotrofin ailesinin tanımlanan ikinci üyesidir; bu ailenin diğer üyeleri arasında nörotrofin 3, nörotrofin 4 ve sinir büyüme faktörü (*Nerve Growth Factor*, NGF) de bulunmaktadır (138).

BDNF beynin hemen hemen tüm bölgelerinde bulunur. Özellikle astrositler olmak üzere beyindeki nöronlar ve glial hücreler tarafından ifade edilir (139). BDNF'nin kan-beyin bariyerini serbestçe geçtiği ve geçiş yönünün konsantrasyon gradyanına bağlı olduğu gösterilmiştir (140). Araştırmalar, kanda dolaşan BDNF düzeyinin beyindeki düzeyini yansıtıyor olabileceğini göstermiştir (141). Tropomiyozin reseptör kinaz (Trk) reseptör ailesinin bir üyesi olan TrkB'ye bağlanarak ve onu aktive ederek normal beyin fonksiyonunun gelişimi ve sürdürülmesinde yer alan birçok farklı hücresel süreci düzenlemektedir (142). BDNF'nin en önemli işlevleri arasında gelişimsel süreçler, sinaptogenezin düzenlenmesi, nöroproteksiyon, hafıza ve biliş mekanizmalarını etkileyen kısa ve uzun süreli sinaptik etkileşimlerin kontrolü yer almaktadır (143). BDNF'nin SSS ve periferik plazma düzeylerinin değişmesi, çok sayıda beyin patolojisiyle önemli ölçüde ilişkilidir ve bu nedenle çok çeşitli nöropsikiyatrik bozukluklar için

biyobelirteç olarak da tanımlanmaktadır (144,145). BDNF sinyalizasyonundaki bozuklukların Huntington Hastalığı, Alzheimer Hastalığı, depresyon, şizofreni, bipolar bozukluk ve anksiyete bozuklukları gibi birçok önemli hastalığın patogenezine katkıda bulunduğu bildirilmektedir (142). Bunun yanı sıra BDNF, obeziteyle yakından ilişkilidir ve metabolik düzenlemelerde de rol oynamaktadır (146). BDNF'nin duygudurum bozuklukları, kognitif fonksiyonlar ve metabolizma üzerine etkileri göz önüne alındığında, menopoz ve sonraki dönemde sık görülen değişiklerle bağlantılı bir biyobelirteç olabileceği de düşünülmektedir. Konishi ve arkadaşlarının (2020) çalışmasında, premenopozal kadınlarda BDNF düzeylerinin bellek performansı üzerinde anlamlı bir etkisinin bulunmadığı gösterilmiştir (147). Buna karşılık, Florent ve arkadaşlarının (2022) bildirdiği üzere postmenopozal kadınlarda plazma BDNF düzeylerinin düşük olması, belirgin şekilde daha zayıf bellek performansı ile anlamlı biçimde ilişkili bulunmuştur (148). Ayrıca çalışmalar, östrojen ve BDNF'nin benzer sinyal yollarını aktive ettiğini ve östrojenin BDNF ekspresyonunu doğrudan artırdığını göstermiştir (149,150).

2.5.2. NGF

SSS içinde NGF en fazla korteks, hipokampus ve hipofiz bezinde üretilmekte; bazal gangliyonlar, talamus, omurilik ve retina dahil olmak üzere diğer bölgelerde de anlamlı düzeylerde sentezlenmektedir (151). NGF başlangıçta yalnızca sempatik periferik nöronlar üzerinde etkili bir protein olarak tanımlanmış, çok daha sonra SSS nöronları ile çeşitli immün hücre tipleri üzerinde de etkin olduğu gösterilmiştir (152). Nörogenez, nöronal plastisite ve sağkalım

düzenlenmesinde rol almaktadır (153). NGF için TrkA ve p75 reseptörleri tanımlanmıştır. NGF'nin nörotropik aktivitesi TrkA aracılığıyla gerçekleşir ve reseptör hem NGF'ye özgüldür hem de yüksek afiniteye sahiptir (154,155).

Genel olarak NGF, duygudurum ve bilişle ilişkili, nöroendokrin yanıtların ve sirkadiyen etkinliklerin koordinasyonunda rol alan SSS'nin limbik bölgelerinde hakim olan bir faktördür. NGF düzeylerindeki değişimlerin majör depresif bozukluk (MDB), bipolar bozukluk, şizofreni ve anksiyete dahil birçok ruhsal durumun klinik bulguları ve patogenezleriyle ilişkili olduğu bildirilmiş olup, buna paralel olarak preklinik depresyon modelleri ve klinik çalışmalar, antidepresanların etkilerini kısmen NGF üzerinden göstererek depresyonu düzenleyebileceğini ortaya koymaktadır (156,157). Bağışıklık ve endokrin sistem hücrelerinde de bulunması, bu nörotrofinin daha önce öne sürülenden çok daha geniş bir role sahip olduğunu ve stres karşısında endokrin yanıtların düzenlenmesine katkı sağlayan hücreler arası bir haberci ya da humoral bir faktör olarak işlev görebileceğini düşündürmüştür. (158). Bununla birlikte MDB'de NGF düzeyleri ile ilgili çelişkili bulgular vardır. Bir çalışmada MDB'de serum NGF düzeyinin kontrollere göre daha yüksek olduğu bildirilmişken (153), bir diğer çalışmada NGF'nin daha düşük olduğu ve depresyon-anksiyete-özkıyım bileşik şiddet puanıyla ters ilişkili seyrettiği saptanmıştır (159). Bu heterojen tablo, NGF düzeylerini belirleyen düzenleyici mekanizmaların çok değişkenli etkiler altında şekillendiğini düşündürmektedir; nitekim östrojen yoksunluğu bu mekanizmalardan biri olarak özellikle dikkat çekmektedir. Ovariektomi sonrasında korteks ve hipokampusta NGF ve BDNF mRNA düzeylerinin azalması ve bu azalmanın östrojen tedavisi ile tersine

çevrilebilmesi, östrojenin nörotrofinlerin hem transkripsiyonunu hem de hedef reseptör sinyalini düzenlediğine işaret etmektedir (160).

2.5.3. LEPTİN

Leptin, beyaz adipoz doku tarafından üretilip salgılanan 167 amino asitlik bir adipokindir (161). Kan beyin bariyerini geçebilir ve hipotalamus ile talamusun çeşitli bölgeleri ve serebellum dahil olmak üzere belirli beyin bölgelerinde dağılım gösteren leptin reseptörüne (LepRb) bağlanır (162).

Leptin yağ dokusundan kan dolaşımına salıverildikten sonra kan beyin bariyerini geçer ve hipotalamik leptin reseptörlerine bağlanarak vücut enerji depolarının durumu hakkında bilgi verir (163). Preklinik deneylere dayanan kanıtlara göre leptin, başlıca hipotalamusun arkuat çekirdeğinde etkili olarak, anoreksijenik moleküller (örneğin αMSH; α-melanosit uyarıcı hormon) üreten proopiomelanokortin (POMC) nöronlarını aktive eder ve oreksijenik nöropeptid Y ile agouti-ilişkili peptit içeren nöronların aktivitesini inhibe eder (164). Dolayısıyla enerji depoları düşük olduğunda, örneğin vücut yağ seviyeleri düşük olduğunda veya açlık durumunda leptin seviyeleri düşer; bu da POMC nöronlarının aktivitesinin düşmesine ve Nöropeptid Y ile agouti-ilişkili peptit nöronlarının aktivitesinin artmasına; dolayısıyla iştahın ve gıda alımının artmasına neden olur (165). Leptin sinyalizasyonu iştah ve gıda alımını baskılarken**,** şaşırtıcı bir şekilde, obez bireylerde dolaşımdaki leptin seviyeleri yüksek, oreksijenik hormon seviyeleri ise düşük olarak bulunur. Bu durum, obez bireylerin leptin direncine sahip olduğunu düşündürmüştür (163).

Bununla birlikte artan kanıtlar leptinin SSS'de duygudurum ile ilgili fizyolojik ve patolojik süreçlerde de rol aldığını vurgulamaktadır (166). Leptin sinaptik nöroplastisitede ve nörogenezde rol oynamaktadır (167). Nöronal morfolojiyi ve hipokampus sinaptik aşırımını etkileyebilir ve doğrudan olmasa bile BDNF veya diğer faktörler aracılığıyla dolaylı olarak nörotrofik faktör olarak etki edebilir (168). Leptin bu yönüyle incelendiğinde, çağımızdaki beslenme ortamları (çağdaş yaşamdaki *fast food*/yüksek kalorili fakat besinden yetersiz ürünler -*trash food*) ile prevalansı artan metabolizma hastalıkları ve psikiyatrik hastalıkların etkileşimini inceleyen araştırmalarda kritik bir adipokin olarak sıklıkla ele alınmaktadır. Öte yandan bazı çalışmalar, leptin ile depresyon arasındaki ilişkide tutarsız sonuçlar ortaya koymaktadır (169). Kraus ve arkadaşları (2001), MDB hastalarında sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında daha düşük leptin konsantrasyonları bildirirken, Milaneschi ve arkadaşları (2017) ise MDB hastalarında kontrollerden daha yüksek leptin konsantrasyonları bildirmiştir (170-171).

Özetle leptin, periferik enerji depoları ile SSS arasındaki bilgi akışının kilit bileşenlerinden biridir; sinaptik plastisite ve duygudurum düzenlenmesindeki rolüne ilişkin bulgular, psikiyatrik hastalıklarda biyoenerjetik süreçler ve nöral devre işlevselliği arasındaki ilişkinin önemini desteklemektedir.

2.5.4. İnsülin ve İnsülin Direnci

İnsülin, hedef hücrelerde plazma membranında yer alan reseptörlerine bağlanarak, dolaşımdaki besin maddelerinin varlığı ile ilişkili şekilde anabolik

yanıtları düzenleyen bir peptit hormondur (172). Plazma glukozundaki artış, pankreas β-hücre tarafından glukoz alımını ve metabolizmasını artırır; bunun sonucunda metabolik olarak üretilen ATP düzeyleri yükselir. Adenin nükleotit derişimlerindeki bu değişimler, ATP-duyarlı K^+ kanallarını kapatarak elektriksel aktivitenin başlatılmasına, hücre içine Ca^{2+} girişine ve insülin sekresyonuna yol açar (173). İnsülinin, insülin reseptörüne bağlanması, reseptörün ardışık konformasyonel değişikliklerini ve otofosforilasyonunu tetikler. Tirozin kinaz reseptör otofosforilasyonunu, çok çeşitli biyolojik süreçlerde önemli roller oynayan bir kinaz sinyalleme kaskadı aktivasyonu izler (174,175). Glukoz alımı ve lipid sentezi de dahil olmak üzere metabolik etkiler, öncelikle fosfoinozitid 3-kinaz (PI3K) /AKT yolu tarafından düzenlenir. Kas ve yağ dokularında insülin reseptör sinyalizasyonu, GLUT4 translokasyonuna yol açarak bu dokulara kan glukoz alımını artırır (176).

İnsülin direnci, günlük fiziksel aktivitenin azalması ve enerjiden yoğun gıda tüketimindeki artış gibi güçlü çevresel etmenlerle yakından ilişkilidir (177). Bununla birlikte insülin direncinde rol oynayan diğer faktörler arasında fizyolojik stres faktörleri, sistemik inflamasyon ve oksidatif stres de yer almaktadır (177).

Östrojenin hem kadınlarda hem de erkeklerde vücut kompozisyonunun, enerji dengesinin ve insülin duyarlılığının düzenleyicisi olduğu bilinmektedir (178). Östrojen, insüline duyarlı dokular üzerindeki etkileriyle doğrudan veya insülin direncine katkıda bulunan oksidatif stres gibi faktörleri düzenleyerek dolaylı yoldan insülin etkisini düzenleyebilir (179). *ESR1*'in (ERα'yı kodlayan gen) kaslarda ifadelenmesinin erkeklerde mitokondriyal fonksiyonun ve metabolik

sağlığın sürdürülmesi için kritik öneme sahip olduğu bildirilmektedir. Çalışmalarda, ERα'nın her iki cinsiyette de insülin duyarlılığının ve glukoz homeostazının korunması için gerekli olduğu vurgulanmaktadır (180). Dolayısıyla menopozun başlamasıyla birlikte insülin direnci gibi metabolik bozukluklar artma eğilimindedir ve östrojen tedavisinin bu riski önemli ölçüde azalttığı görülmüştür (181,182).

Menopoz ile vücut ağırlığı ve kompozisyonundaki değişimler arasındaki ilişkiye rağmen, koroner kalp hastalığı bulunan kadınlarda yürütülen randomize, çift kör, plasebo kontrollü bir östradiol + progestin hormon replasman tedavisi denemesi; vücut ağırlığı ve bel çevresinde herhangi bir değişiklik olmaksızın, açlık glukoz düzeylerinin stabilize olduğunu ve diyabet insidansında %35'lik bir azalma görüldüğünü bildirmiştir (183).

Literatürde östradiol sinyallemesinin bozulduğu koşullarda mitokondriyal fonksiyonun bozulmasının, kısmen de olsa insülin direncinden sorumlu olabileceği belirtilmiştir (179). Mitokondriyal biyogenezin artması, ATP sentezini artırır ve insülinin GLUT4 translokasyonu aracılığıyla hücre içi glukoz alımını kolaylaştırır (184). Mitokondriyal dinamiklerde rol alan proteinler, insülin sinyal iletimini doğrudan düzenlemektedir. Mitofusin-2, insülin sinyalizasyonunun merkezi adaptörü olan insülin reseptör substratı-1'i (*Insulin Receptor Substrate-1; IRS-1*) stabilize eder ve böylece PI3K/AKT yolağı ile glukoz alımı, glikojen/protein sentezi ve karaciğerde glukoneogenezin baskılanmasını sürdürür (185). Buna karşılık, mitokondriyal bölünme faktörünün (*Mitochondrial fission factor*-MFF) fosforilasyonu (MFF S131), akut ve geri dönüşlü mitokondriyal fizyon oluşturarak

hepatik insülin duyarlılığını artırır. Subselüler yeniden dağılım mekanizmasıyla mitokondriler, glikojen sentezi ve glukoz metabolizmasının yoğun olduğu bölgelerde geçici olarak konumlanır (186).

Yüksek yağlı diyet, adiponektin seviyelerini düşürebilir ve dolayısıyla glukoz metabolizmasını etkileyebilir (187). Enerji ve doymuş yağdan zengin beslenme, periferik ve hepatik insülin duyarlılığını azaltarak açlık glukoz/insülin düzeylerini yükseltir ve insülin direncinin homeostatik model değerlendirmesi (*Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*, HOMA-IR) olarak belirtilen insülin direnci testini kötüleştirir. YYD ile indüklenen obezite modellerinde glukoz toleransının bozulduğu, leptin-adiponektin dengesinin değiştiği ve insülin direncinin geliştiği gösterilmiştir (188). Bununla birlikte, yüksek kalori tüketiminin yağ asidi metabolitleri oluşturması ve iskelet kası mitokondriyal fonksiyonunda azalmanın, insülin direncine ve tip 2 diyabet gelişimine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (189).

Östrojen eksikliği, kas ve yağ dokusunda insülin sinyalizasyonunu ve mitokondriyal fonksiyonları destekleyen *ESR1* aracılı yolların azalmasıyla insülin direncine yatkınlığı artırırken, YYD ile bu olumsuz etkiler belirginleşmektedir (190). HOMA-IR, kanıtlanmış ve sıklıkla kullanılan dolaylı bir insülin direnci belirtecidir (191). Bu belirteçte insülin direnci seviyesini belirlemek için tek bir kan şekeri değeri ve buna karşılık gelen insülin ölçümü kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında, azalmış östrojen seviyelerinin, mitokondriyal disfonksiyon yoluyla biyoenerjetik mekanizmaya olan etkilerinden yola çıkarak, 2,4- dinitrofenolün, yüksek yağlı diyet ile beslenen ovariektomili

sıçanlarda duygudurum, nörobilişsel fonksiyonlar ve nörotrofik faktörler üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmanın Etik Kurul onayı, "Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu''nun 28.11.2024 tarihli ve **G.Ü.ET-24.123** kod numaralı kararıyla alınmıştır. Çalışma "Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi" kapsamında TTU-2025-10038 proje koduyla onaylanmış ve maddi destek sağlanmıştır. Proje, Gazi Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Nörobilim ve Nöroteknoloji Mükemmeliyet Ortak Uygulama ve Araştırma Merkezi (NÖROM), Gazi Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (GÜDAM) ve Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı iş birliğinde yürütülmüştür.

3.1. Deney Hayvanları ve Barındırma Koşulları

Çalışmada GÜDAM'dan temin edilen yaklaşık 200± 25 gram ağırlığında 8-10 haftalık dişi Wistar Albino sıçanlar kullanıldı. Toplamda 7 gruba ayrılan 70 adet sıçan, her bir kafeste 5 sıçan bulunacak şekilde, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık periyodunda, 25 ± 2°C sıcaklıkta, deney süresince su ve yem gereksinimleri *ad libitum* karşılanarak veteriner gözetiminde barındırıldı. Sadece sükroz tercih testinden 1 gün önce 20 saat su kısıtlaması uygulandı. Deneyler gündüz vakti 08.30-16.30 saatleri arasında gerçekleştirildi. Çalışma sürecinde deney hayvanlarının refahı gözetilerek, gereksiz acı ve strese yol açabilecek uygulamalardan kaçınıldı.

3.2. Deney Grupları

Araştırma kapsamında cerrahi işlemler, diyet müdahaleleri ve farmakolojik ajan uygulamaları dikkate alınarak, deney hayvanları her biri n=10 olacak şekilde 7 gruba ayrıldı. Araştırma gruplarına ilişkin bilgiler **Tablo 2**'de özetlenmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. Deney grupları

Grup No	Grup Adı	Grup Adı Kısaltması	Ovariektomi	Diyet Tipi	Uygulanan Farmakolojik Ajan (intraperitoneal)	Doz	n Sayısı
1	Sham operasyonu+ Standart Diyet	SHAM	-	Standart	-	-	10
2	Sham operasyonu + YYD	YYD	-	YYD	-	-	10
3	Ovariektomi +Standart Diyet	OVX	+	Standart	-	-	10
4	OVX + YYD	OVX+YYD	+	YYD	-	-	10
5	OVX + YYD+PBS (çözücü)	ÇÖZ	+	YYD	PBS 0,3 ml	-	10
6	OVX + YYD+ 2,4-dinitrofenol (1mg/kg)	DNP1	+	YYD	2,4-dinitrofenol	1mg/kg	10
7	OVX + YYD + 2,4-dinitrofenol (5mg/kg)	DNP5	+	YYD	2,4-dinitrofenol	5mg/kg	10

PBS: Fosfat bufer solüsyonu (çözücü) **DNP:** 2,4-Dinitrofenol, **OVX:** Ovariektomi **YYD:** Yüksek yağlı diyet **n:** Grup başına hayvan sayısı

Paive ve arkadaşları tarafından yayınlanan verilere dayanarak, örneklem büyüklüğü tahmini için G*Power sürüm 3.1.9.7 kullanılarak güç analizi yapıldı (192,193).

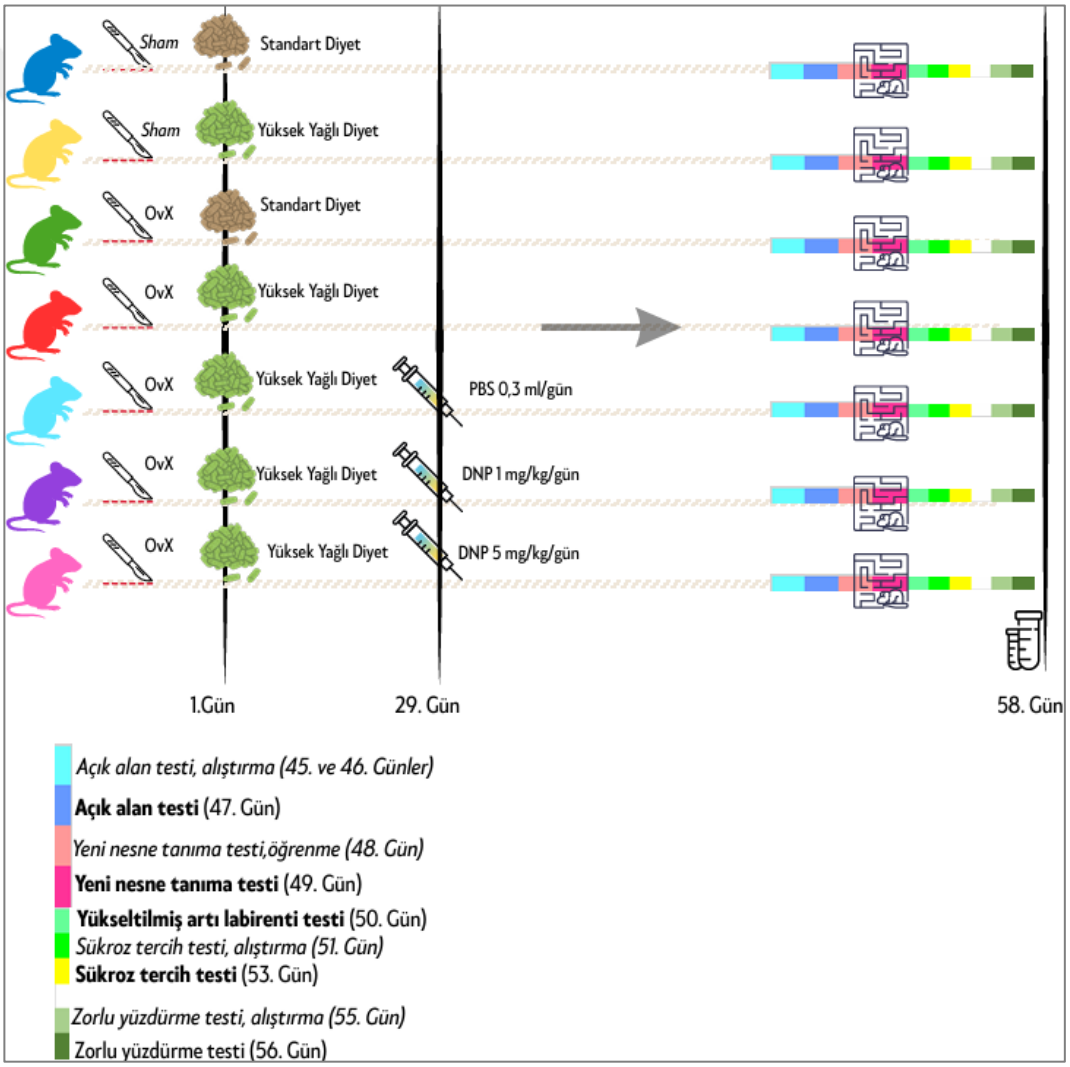
Anlamlılık kriteri α = 0,05 ve güç = 0,80 ile, Kruskal-Wallis testi için etki büyüklüğü 0,47 olan durumda gereken minimum örneklem büyüklüğü, yedi grup için toplam n = 70 olarak bulundu.

3.3. Deney Tasarımı

Çalışma kapsamında öncelikle, menopoz modelinde yüksek yağlı diyet ile beslenmenin, duygudurum, bilişsel fonksiyonlar ve nörotrofik faktörler üzerine etkilerinin araştırılması, ardından 2,4-DNP'nin olası terapötik potansiyelinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, Tablo 2'den de izlenebileceği gibi, Grup 1 ve Grup 2'ye benzer cerrahi stres oluşturulması açısından sahte operasyon (*Sham* operasyonu) uygulanırken kalan gruplara ovariektomi yapılarak menopoz modeli oluşturuldu. YYD uygulamasında, 8 hafta boyunca kalorinin %60 oranında yağdan sağlandığı yemler kullanıldı (194). Deney hayvanlarının vücut ağırlıkları ve yem tüketim miktarları her hafta tartılarak kaydedildi. Yüksek yağlı diyet uygulamasının 4. haftasından itibaren Grup 5, 6 ve 7'ye sırasıyla fosfat tamponlu salin (Pho*sphate Buffered Salin*e, PBS), 1 mg/kg DNP (PBS'de çözünmüş) ve 5 mg/kg DNP (PBS'de çözünmüş) intraperitoneal olarak her gün uygulandı. Ardından deney hayvanları aşağıda belirtilen bir dizi davranışsal teste tabi tutuldu:

1. Açık Alan Testi
2. Yeni Obje Tanıma Testi
3. Yükseltilmiş Artı Labirenti
4. Sükroz Tercih Testi
5. Zorunlu Yüzdürme Testi

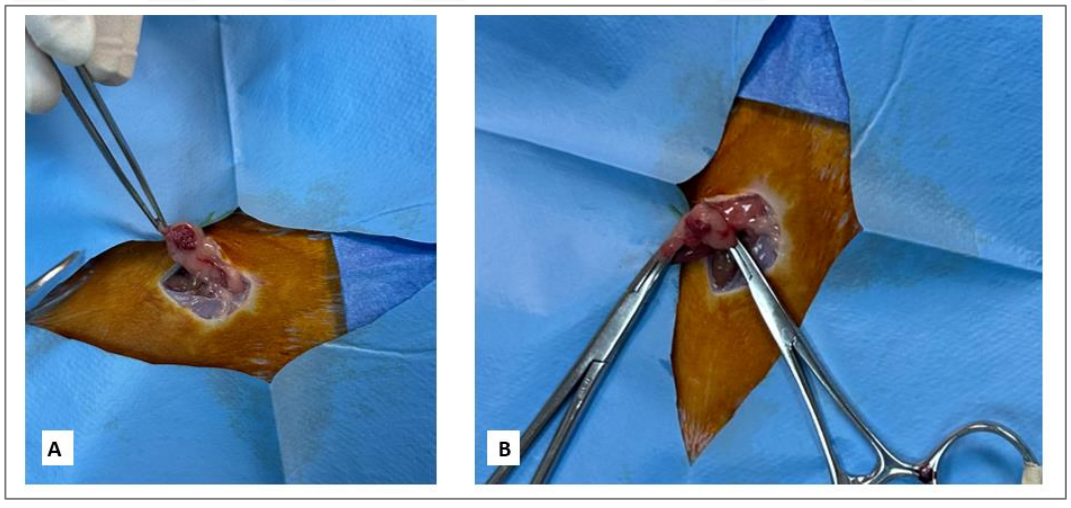
Deney hayvanları kardiyak kan alımı yöntemi ile veteriner hekim gözetiminde sakrifiye edildi. Kan örnekleri santrifüj edildikten sonra biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere -80 santrigrat derecede saklandı. İç organ yağları ve uterus çıkarıldıktan sonra ıslak ağırlıkları hassas terazide tartılarak kaydedildi. Deney akışı **Şekil 2**'de gösterilmiştir.



Şekil 2. Deney iş akış şeması

3.4. Ovariektomi Operasyonu

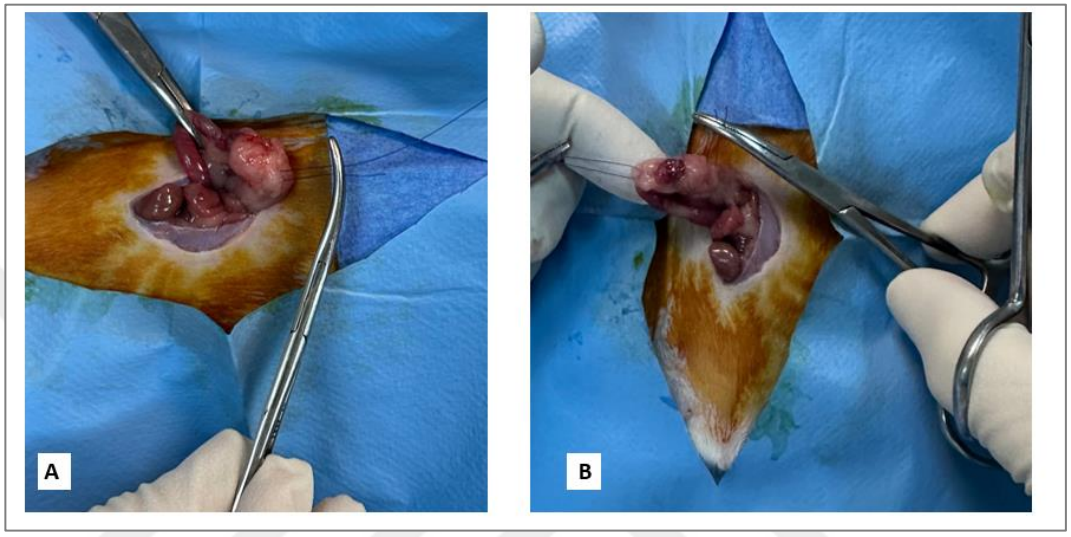
Deney hayvanlarının endojen over hormon üretimini ortadan kaldırmak ve menopoz modeli oluşturabilmek amacıyla ovariektomi yapıldı (58). Ketamin (45 mg/kg, i.m.) ve ksilazin (5 mg/kg, i.m.) karışımı ile oluşturulan anestezi sonrasında operasyon planlanan bölgedeki tüyler temizlendi ve dişi sıçanlar supin pozisyonda sabitlendi. İnsizyon bölgesinin %10 povidon iyot solüsyonu ile temizlenmesinin ardından yaklaşık 2 cm uzunluğunda (overlerin çıkarılmasına olanak sağlayacak boyutta) abdomen orta hat insizyonu yapıldı (Medial laparotomi yöntemi). Ardından abdominal kavite eksplorasyonu ile her iki uterin boynuz (*cornu uteri*) takip edilerek overlere ulaşıldı (195). (**Resim 1A ve 1B**).



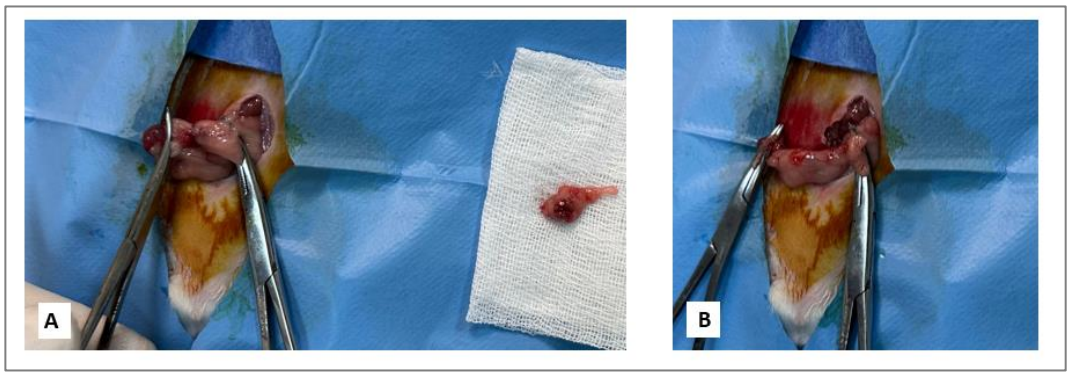
Resim 1. Ovariektomi operasyonu esnasında overlerin kavitede bulunması (A ve B)

Uterus boynuzu eksternalize edilip ovaryan pedikül ve distal uç çift ligatüre edildi; aradan kesilerek ovaryum eksize edildi (**Resim 2 ve Resim 3**). Aynı işlem kontralateral taraf için tekrarlandı. Overler eksize edildikten sonra uterus karın

boşluğunda bırakılarak, abdomen ve deri emilebilir bir sütür (4/0 Vicryil) materyali ile kapatıldı (196).



Resim 2. Ovariektomi operasyonunda eksizyon öncesi sütür ile ligasyon (A ve B)



Resim 3. Ovariektomi operasyonunda overin eksize edilmesi. (A. Sağda eksize over ile birlikte; B. Overler eksize edildikten sonra)

Grup 1 ve Grup 2 ameliyat stresinin taklit edilmesi için *sham* operasyona alındı. Ketamin (45 mg/kg intramüsküler) ve ksilazin (5 mg/kg intramüsküler) karışımı ile anestezi oluşturulduktan sonra abdomen bölgesindeki tüyler

temizlenerek %10 povidon iyot solüsyonu ile dezenfekte edildi. Medial laparotomi uygulanan sıçanların ovaryumları bulunduktan sonra çıkarılmadan karın boşluğuna bırakılarak abdomen ve deri emilebilir sütür ile kapatıldı (197).

Tüm cerrahi işlemler aseptik koşullarda gerçekleştirildi. Cerrahi operasyon sonrasında deney hayvanları vücut sıcaklıklarının korunması amacıyla ısıtıcı yüzey üzerine alınarak 24 saat boyunca gözlemlendi.

3.5. Diyet Uygulamaları

Grup 1 ve Grup 3 standart yem ile beslenirken; 2, 4, 5, 6 ve 7 numaralı gruplar 8 hafta boyunca kalorinin %60 oranında yağ içeren yemden (referans kodu: D12492) sağlandığı yüksek yağlı diyet ile beslendi. Diyetler *ad libitum* olarak uygulandı.

Yüksek yağlı yem Arden Araştıma & Deney (Arden Yem Sanayi Araştırma Deney Ticaret Limited Şirketi, Ankara, Türkiye) firmasından temin edildi. Standart sıçan yemi (*chow* diyet) Korkutelim Yem Gıda'dan (Korkutelim Yem Gıda Sanayi Ticaret Anonim Şirketi, Antalya, Türkiye) temin edildi. Diyetlerin enerji ve besin ögeleri içerikleri üreticilerden sağlanmış olup **Tablo 3** ve **Tablo 4**'te gösterilmiştir. Ayrıca **Tablo 5**'te diyet enerji dağılımları kJ/g cinsinden karşılaştırmalı olarak sunulmuştur.

Yüksek yağlı yem diyetine geçiş sürecinde, hayvanların adaptasyonunu sağlamak amacıyla 1 haftalık bir alıştırma protokolü uygulandı. Bu süreçte ilk olarak yemlerin %25'i yüksek yağlı, %75'i standart yem olacak şekilde başlanarak, ardından oran kademeli olarak artırıldı ve %100 yüksek yağlı diyete ulaşıldı. Vücut

ağırlıkları ve deney gruplarının tükettikleri yem miktarları haftalık olarak kaydedildi.

Tablo 3. Standart sıçan yemi besin ögeleri

Standart Yem Temel Besin Maddeleri	**(%)**	
Ham Yağ	%3,00	
Ham Kül	%6,50	
Ham Protein	%23,50	
Ham Selüloz	%5,85	
Methionin	%0,42	
Kalsiyum	%0,88	
Sodyum	%0,04	
Fosfor	%0,94	
L-lizin	%1,24	
Hammadeler	Soya fasülyesi küspesi, mısır, arpa, buğday kepeği, pelet bağlayıcı, dcp, bypass yağ, toksin bağlayıcı, L-Sistin, DL-Metiyonin, kolin klorid	

Tablo 4. Yüksek yağlı yem besin ögeleri

Yüksek Yağlı Yem Besin Yapı Taşları	**Makro besinlerin kütlece dağılımı (%)**	
Protein	%24	
Karbonhidrat	%30	
Yağ	%35	
Yem İçeriği	**Gram**	**Kcal/kg**
Kazein, 90 mesh	182,72	730,88
L-Sistin, DL-Metiyonin	3	12
Mısır nişastası	61,08	244,32
Maltodekstrin	100	400
Sakkaroz	50	200
Selüloz (BW200)	50	0
Mısır Yağı	25	225
Bitkisel yağ	245	2205
Mineral karışımı (S10026)	10	0
Dikalsiyum fosfat (DCP)	13	0
Kalsiyum karbonat ($CaCO_3$)	5,5	0
Potasyum sitrat monohidrat ($K_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$)	16,5	0
Vitamin karışımı (V10001)	10	40
Kolin bitartrat	2	0
Gıda boyası (renklendirici)	0,05	0
Toplam	773,85	4057,2

Tablo 5. Standart ve YYD enerji dağılımları

Diyet Rejimi	Metabolik Enerji (kJ/gram)	Enerji Dağılımı(E%)		
		Karbonhidrat	Protein	Yağ
Standart Diyet	15,9	74,4	18,2	7,4
Yüksek Yağlı Diyet	22	22	18	60

E% = Enerji yüzdesi

3.6. Farmakolojik Ajan ve Uygulama Protokolü

Deneyde kullanılan 2,4-dinitrofenol Sigma-Aldrich (MilliporeSigma, Burlington, Massachussets, Amerika Birleşik Devletleri) firmasından, çözücü olarak kullanılan fosfat tamponlu salin solüsyonu için PBS tabletler Loba Chemie (Loba Chemie Pvt Ltd, Mumbai, Maharashtra, Hindistan) şirketinden temin edildi.

Bir adet PBS tablet 200 mL distile su içinde çözündürülerek PBS solüsyonu (pH 7,40) hazırlandı. Her bir enjeksiyon için 2,4-dinitrofenol sıçanlar için kilogram başına 1 mg ve 5 mg dozlarında intraperitoneal uygulanmak üzere 0,3 ml PBS solüsyonunda çözündürüldü. Hazırlanan çözelti alüminyum folyo ile sarılarak ışıktan korunmuş şekilde muhafaza edildi. DNP'nin 1 mg/kg ve 5 mg/kg dozları, daha önce gerçekleştirilen çalışma bulguları doğrultusunda belirlendi.

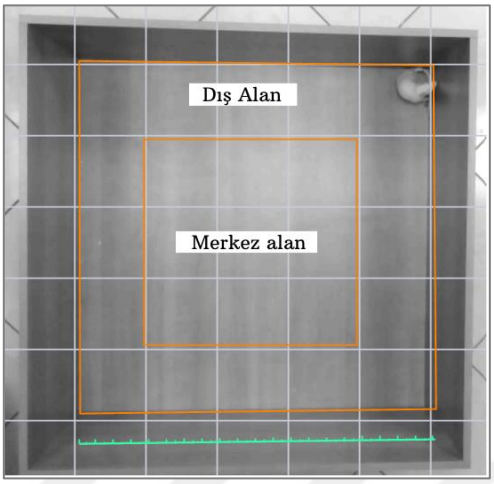
Çözücü grubuna (Grup 5) 0,3 ml PBS intraperitoneal olarak uygulandı (**Tablo 1**). Yüksek yağlı diyet uygulamasının dördüncü haftası tamamlandıktan sonra, 29. günden başlanarak 58. güne kadar (deney sonuna kadar) ilaç ve çözücü uygulaması sürdürüldü (198).

3.7. Davranışsal Testler

Deneyler boyunca hayvanlar deneysel uygulamaların yapılacağı odada izole şekilde bulunduruldu. Ses ve ışık kontrolüne dikkat edildi ve ağır kokulardan uzak durulmasına özen gösterildi. Her hayvan değişiminde deney aparatları %60 etil alkol ile silindi ve kuruması beklendi.

3.7.1. Açık Alan Testi

Sıçanların lokomotor aktivite ve anksiyete benzeri davranışlarının değerlendirilmesi için açık alan testi uygulandı. Deney düzeneği olarak, 100 × 100 cm boyutlarında kare tabandan oluşan, yüksekliği 50 cm olan ahşap malzemeden özel olarak hazırlanan açık alan kutusu kullanıldı (199). Deney hayvanları test aparatına 2 gün boyunca günde 2 kez 5'er dakika bırakılarak serbestçe dolaşmaları sağlandı. Üçüncü gün deney hayvanları açık alan aparatının ortasına bırakılarak davranışları 90 derece tepeden video kamera ile 15 dakika boyunca kaydedildi. Ardından deney hayvanları kendi kafeslerine alındı (200). Analiz programı aracılığıyla açık alan test zemini sanal karelere bölünerek merkez alan ve dış alan tanımlandı. Merkez alan zeminin ortasındaki karelerden, dış alan ise kenarlara yakın karelerden oluşmaktadır (**Resim 4**).



Resim 4. Any Maze yazılımı ile açık alan testinde merkez alan ve dış alanın görüntülenmesi

Her bir deney hayvanının toplam kat ettiği mesafe, ortalama hızı, dış alanda toplam kalma süresi, dış alanda toplam katettiği mesafe, merkez alanda toplam kalma süresi, merkez alanda toplam kat ettiği mesafe, merkez alana toplam giriş sayısı, şahlanma (*rearing*) sayısı ve tımarlanma/öz bakım (*grooming*) süresi yazılım aracılığıyla kaydedildi.

Dış alanda katedilen mesafe, merkez alanda katedilen mesafe ve merkez alana giriş sayısı, "**keşfetme davranışı''** olarak değerlendirildi (199-202). Toplam mesafe ve ortalama hız "**lokomotor aktivite göstergesi"** olarak değerlendirildi (201). Merkez alanda geçirilen sürenin azalması **"anksiyete benzeri davranış''** olarak ele alındı (202).

3.7.2. Yeni Nesne Tanıma Testi

Yeni nesne tanıma testinde ortam olarak açık alan düzeneği kullanıldı. Deney hayvanlarına öncesinde açık alan testi yapıldığından habitüasyon oturumu yapılmadı.

Öğrenme oturumunda 100x100 cm boyutlarında 50 cm yüksekliğindeki kutunun karşılıklı iki köşesine aynı renk, şekil ve boyuttaki iki özdeş nesne yerleştirildi. Deney hayvanlarının 10 dakika boyunca nesneleri serbestçe incelemelerine izin verildi (**Resim 5**). Aradan 24 saat geçtikten sonra nesnelerden biri farklı şekilde ve farklı renkteki bir nesne ile değiştirildi. Hayvanlar yeniden test aparatına konuldu ve 90 derece tepeden bir kamera ile 10 dakika boyunca davranışları video kaydına alındı. Hayvanların yeni nesneye ne kadar süre boyunca ilgi gösterdikleri ve yeni nesneye ne kadar yaklaştıkları yazılım programı aracılığıyla analiz edildi.

Sıçanların burunlarını nesneye 2 cm ve daha fazla yaklaştırması, nesneyi inceleme davranışı olarak kabul edildi. Yeni nesneye yaklaşma sayıları, eski nesneye yaklaşma sayıları, eski nesne ile ilgilenme süreleri, yeni nesne ile ilgilenme süreleri ve nesnelerle toplam ilgilenme süreleri kaydedildi. Elde edilen veriler ile tanıma indeksi **hesaplanarak yeni nesneye ilgi duyma süresinin artışı hafıza ve öğrenme artışı** olarak değerlendirildi (203-205). Tanıma indeksi; aşağıda yer alan formül ile hesaplandı.

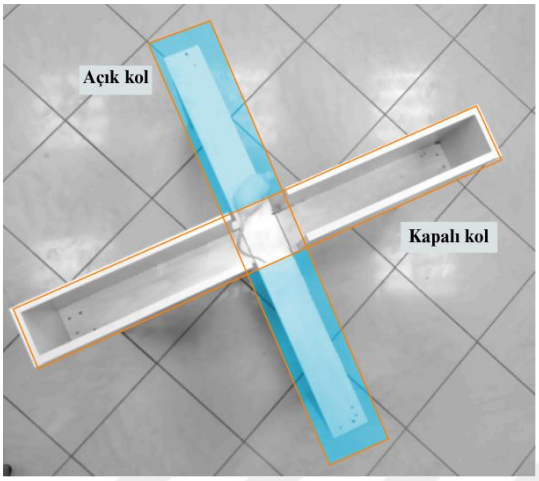
Tanıma indeksi: (Yeni nesne ile ilgilenme süresi) / (Nesnelerle toplam ilgilenme süresi)



Resim 5. Yeni nesne tanıma testi görüntüsü (öğrenme oturumu)

3.7.3. Yükseltilmiş Artı Labirenti

Deney hayvanları 50 cm uzunluğunda, 10 cm genişliğinde karşılıklı iki kapalı kol ve iki açık koldan oluşan yükseltilmiş artı labirentine, kolların kesiştiği orta alandan bırakıldı. Labirentte dolaşmalarına 5 dakika boyunca izin verilen hayvanların davranışları 90 derece tepeden bir kamera ile kaydedildi (**Resim 6**). Deney hayvanları sürenin sonunda labirentten alınarak kafeslerine geri konuldu.



Resim 6. Yükseltilmiş artı labirentte Any Maze ile işaretlenen açık kol

Video analiz programı ile deney hayvanlarının açık kolda geçirdikleri toplam süre, kapalı kolda geçirdikleri toplam süre ve her iki kola giriş sayıları, toplam katedilen mesafe kaydedildi. Deney hayvanlarının kapalı kolda geçirdikleri sürenin artışı "**anksiyete benzeri davranış''**ta artış olarak değerlendirilirken, açık kolda geçirdikleri süredeki artış anksiyete benzeri davranışta azalma olarak ele alındı (206,207).

3.7.4. Sükroz Tercih Testi

Sıçanlarda anhedoni benzeri davranışı incelemek için içme suyu ile sükroz çözeltisi arasındaki tüketim tercihi değerlendirildi.

Alıştırma fazında, deney hayvanlarının her biri ayrı kafese alındı. Kafeslere biri su, diğeri %2 sükroz çözeltisi (*w:v*) içeren iki şişe yerleştirildi. Sıçanların 24 saat boyunca her iki şişeden de serbestçe sıvı içmesine izin verildi. Alıştırma prosedürünün ardında deney gruplarına 20 saatlik su yoksunluğu uygulandı.

Test günü deney hayvanları tekrardan kafeslere alınarak izole edildi ve kafeslerinin her birine 400 mL su ve 400 mL %2'lik sükroz çözeltisi içeren şişeler yerleştirildi. Sıçanların 24 saat boyunca her iki şişeden de su içmesine izin verildi (**Resim 7**). Şişeler, hayvanlara verilmeden önce ve 24 saat sonra tekrardan tartılarak tüketim miktarları kaydedildi.

Su ve sükroz çözeltisi tüketimi total tüketim olarak değerlendirildi ve sükroz tercih oranı yüzde olarak hesaplandı. Bu amaçla kullanılan formül aşağıda yer almaktadır.

Sükroz tüketim yüzdesi = [Sükroz çözeltisi tüketimi / (Sükroz çözeltisi tüketimi + Su tüketimi)]× 100.

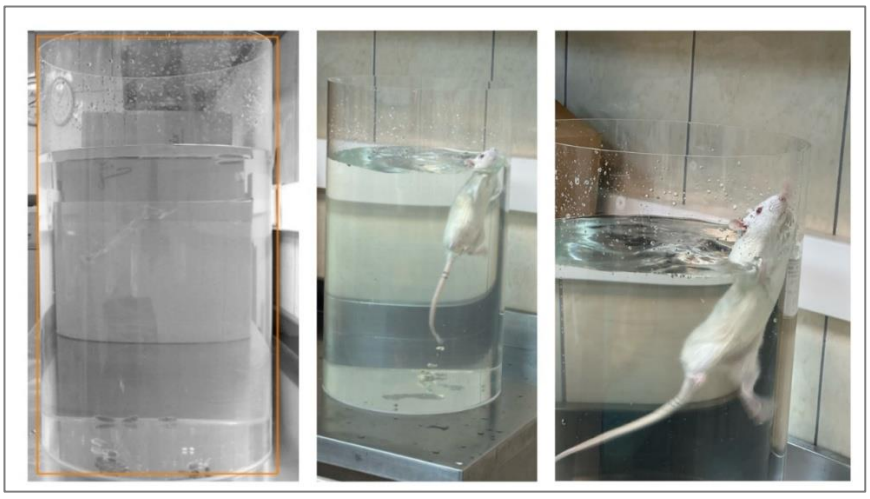
Deney hayvanlarının sükroz tüketim yüzdesinin azalması, "**anhedoni**", "**depresyon benzeri davranış**" olarak değerlendirildi (99).



Resim 7. Sükroz tercih testi görüntüsü

3.7.5. Zorunlu Yüzdürme Testi

Zorunlu yüzdürme testinde 50 cm yüksekliğinde 20 cm çapında pleksiglas malzemeden yapılmış silindirik bir tank kullanıldı. Tank 39 cm yüksekliğine kadar 25±0,5 °C su ile doldurulduu. Alıştırma döneminde deney hayvanları tanka alınarak 15 dakika yüzmelerine izin verildi. Ertesi gün aynı koşullarda 5 dakika süreyle test oturumu gerçekleştirildi (**Resim 8**). Test oturumunda deney hayvanlarının davranışları yatay düzlemde kamera ile kaydedildi. Deney hayvanları havlu ile nazikçe kurulanarak kafeslerine alındı. Video analiz programı aracılığıyla deney hayvanlarının nefes alma dışında su yüzeyinde hareketsiz bulunmaları ve sadece dengeyi korumak için minimum hareket etmeleri hareketsizlik, immobilite olarak kabul edildi. Tankın duvarına yönelik dikey tırmanma ve çırpınma davranışlarını içeren durumlar hareketli, mobil zaman olarak ele alındı (101). Hareketsiz geçirilen sürenin artması, "**depresyon benzeri davranış**" olarak değerlendirildi (101).



Resim 8. Zorunlu yüzdürme testi görüntüsü

3.8. Davranış Testlerinin Analizi

Davranış testleri sırasında elde edilen video kayıtları, bilgisayara entegre bir kamera sistemi ile kaydedildi. Kayıtlar, hayvan davranışlarının objektif olarak değerlendirilmesi için NÖROM altyapısı kullanılarak AnyMaze video izleme ve analiz yazılımı (Stoelting Co., ABD) aracılığıyla analiz edildi. Yatay düzlemdeki parametreler (örneğin, hayvanların toplam katettiği mesafe, belirlenen alanlarda geçirilen süre, giriş sayıları) yazılım tarafından otomatik olarak hesaplandı. Bununla birlikte, AnyMaze yazılımı tarafından otomatik olarak değerlendirilemeyen davranışlar olan tımarlanma ve şahlanma video kayıtları üzerinden yarı-manuel olarak incelendi ve yazılım aracılığıyla kaydedildi. Böylece hem otomatik hem de yarı-manuel skorlanan parametreler istatistiksel analiz için kullanıldı.

3.9. Sakrifikasyon ve Örneklerin Toplanması

Deney sonunda tüm hayvanlar bir gece önceden aç bırakılarak ketamin-ksilazin anestezisi altında intrakardiyak kan alınarak sakrifiye edildi. Sakrifikasyon sonrası uterus, retroperitoneal adipoz doku ve inguinal yağ yastıkçıkları dikkatlice çıkarıldı. Çıkarılan organ ve dokular ıslak ağırlıkları *(wet weight*) belirlenmek üzere tartıldı.

3.10. Vücut Kompozisyonu ve Kümülatif Tüketimlere İlişkin Hesaplamalar

Deney hayvanlarının vücut ağırlıkları ve grupların tükettikleri yem miktarı her hafta (deneyin ilk haftasından başlayarak sekizinci haftaya kadar) düzenli olarak kaydedildi. Vücut ağırlığı artışı aşağıdaki formül ile hesaplandı.

Vücut Ağırlığı Artışı: Sekizinci hafta vücut ağırlığı- ilk hafta vücut ağırlığı

Vücut ağırlığı artışının deney hayvanlarının başlangıçtaki vücut ağırlıklarına olan oranı aşağıda verilen formül ile hesaplandı.

Vücut Ağırlığı Artış Yüzdesi % = (Vücut Ağırlığı Değişimi /
İlk hafta vücut ağırlığı) x 100

Kalori verimliliği (beslenme verimliliği, *feed efficiency*) deney gruplarının kümülatif ağırlık artışının, kümülatif kalori tüketimine bölünmesiyle hesaplanarak; her bir deney hayvanının tükettiği yem miktarı bilinmediğinden tanımlayıcı veri olarak sunuldu.

3.11. Biyokimyasal Analizler

Hayvanlar sakrifiye edildikten sonra kalpten alınan kanlar pıhtılaşma için oda sıcaklığında 20–30 dakika bekletildi ve sonrasında santrifüj edilerek serum örnekleri elde edildi. Örnekler tek donma-çözünme döngüsü ilkesine uyularak −80 °C'de analiz zamanına kadar saklandı.

Serum BDNF, NGF, leptin ve insülin düzeylerinin ölçümü için sıçan ELISA kitleri Elabscience'den (Elabscience, Wuhan, Çin) temin edildi.

Serum BDNF, NGF, leptin ve insülin düzeyleri, üretici firmanın (Elabscience, Wuhan, Çin; rat BDNF ELISA kit katalog no: E-EL-R1235; rat NGF ELISA kit katalog no: E-EL-R0652; rat Leptin ELISA kit katalog no: E-EL-R0582; rat Insülin ELISA kit katalog no: E-EL-R3034) sağladığı kit protokolleri doğrultusunda, sandviç ELISA yöntemi ile GÜTF Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında çalışıldı. Prosedür özetle aşağıdaki şekilde uygulandı (**208-211**):

1. Kuyucuklara 100 µl standart veya numune eklendi. 37°C'de 90 dakika boyunca inkübe edildi.
2. Sıvı boşaltıldı ve her kuyucuğa hemen 100 µl biyotinlenmiş tespit antikoru eklendi. 37°C'de 60 dakika boyunca inkübe edildi.
3. Plaka 3 kez aspire edildi ve yıkandı.
4. 100 µl Horseradish Peroxidase (HRP) konjugat çalışma solüsyonu eklendi. 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Plak 5 kez aspire edildi ve yıkandı.
5. 90 µl substrat reaktifi eklendi. 37°C'de 15 dakika inkübe edildi.
6. 50 µl durdurma solüsyonu eklendi.
7. Plaka 450 nm'de analiz edildi.

Serum glukoz, HDL ve total kolesterol düzeyleri, biyokimya laboratuvarında enzimatik kolorimetrik yöntemler kullanılarak ölçüldü. HOMA-IR hesaplanmasında kullanılan formül, aşağıda yer almaktadır.

HOMA-IR= (Serum İnsülin (mIU/mL) × Serum Glukoz (mg/dL)) / 405

3.12. İstatistiksel Analiz

Tanımlayıcı istatistikler ortalama ± ortalamanın standart hatası (SEM) olarak sunuldu. Grup 1, 2, 3 ve 4 arasındaki karşılaştırmalar Kruskal Wallis ile yapıldı, ardından *post hoc* analizler için Dunn's Testi kullanıldı. Enjeksiyon prosedürünün ve çözücü uygulamasının olası etkilerini değerlendirmek amacıyla Grup 4 ile Grup 5 arasındaki karşılaştırmalar Mann- Whitney U testi ile kullanılarak yapıldı. Grup 5, 6 ve Grup 7'nin karşılaştırılması Kruskal Wallis testi ile yapıldı. Ardından *post hoc* analizler için Dunn's Testi kullanıldı.

Çalışmadaki istatistiksel analizler SPSS (IBM Corp. Version 28.0. Armonk, NY, ABD) paket programı kullanılarak yapıldı ve $p<0,05$ istatistiksel anlamlı düzey olarak kabul edildi.

Örneklem büyüklüğünün her bir grupta n=10 olduğu çalışmamızda, Shapiro–Wilk dahil normallik testlerinin küçük örneklemlerde düşük güce sahip olması nedeniyle (Tip II hata riski) normallik ön-testine dayalı karar verilmedi. Bunun yerine doğrudan nonparametrik testler uygulandı (212-214).

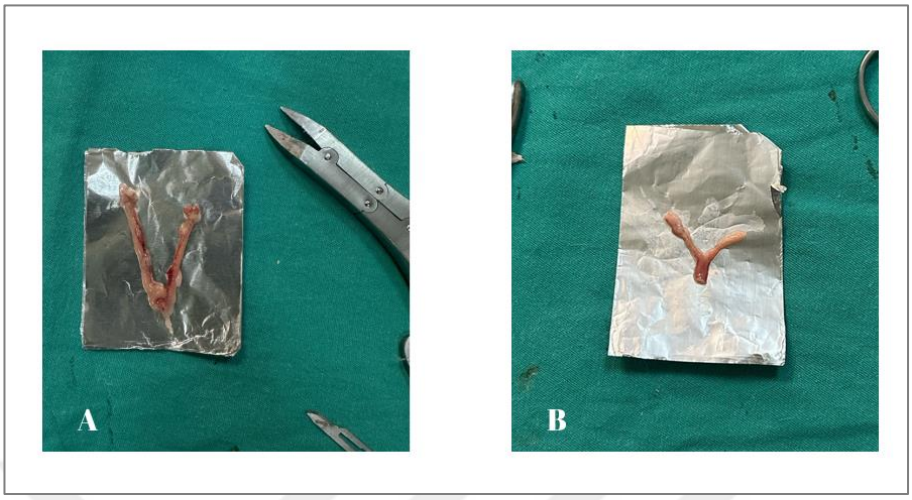
4. BULGULAR

4.1. Deney Akışı

Deney süresince deney hayvanı kaybı yaşanmadı. Tüm gruplarda n=10 olacak şekilde 70 deney hayvanı ile deney tamamlandı. Sükroz tercih testinde, 3 suluğun tıkanması nedeni ile DNP1 grubundan 2; DNP5 grubundan 1 deney hayvanının sonucu araştırmadan çıkarıldı. SHAM grubunda, bir deney hayvanının serum miktarı yetersiz kaldığından BDNF analizi n=9 olarak tamamlandı. Zorunlu yüzdürme testinde, DNP5 grubunda bir sıçanın deney video kaydı, video formatı ve Any-maze programı arasındaki uyumsuzluk nedeni ile analiz edilemedi. Bu nedenle zorunlu yüzdürme testi için DNP5 grubu n=9 olarak değerlendirildi. Yeni nesne tanıma testi verileri ile hesaplanan tanıma indeksi formülünde, 0 sayısının matematiksel olarak ortaya çıkardığı hesaplanamazlık dolayısıyla istatistiksel analize dahil edilen n sayıları azaldı.

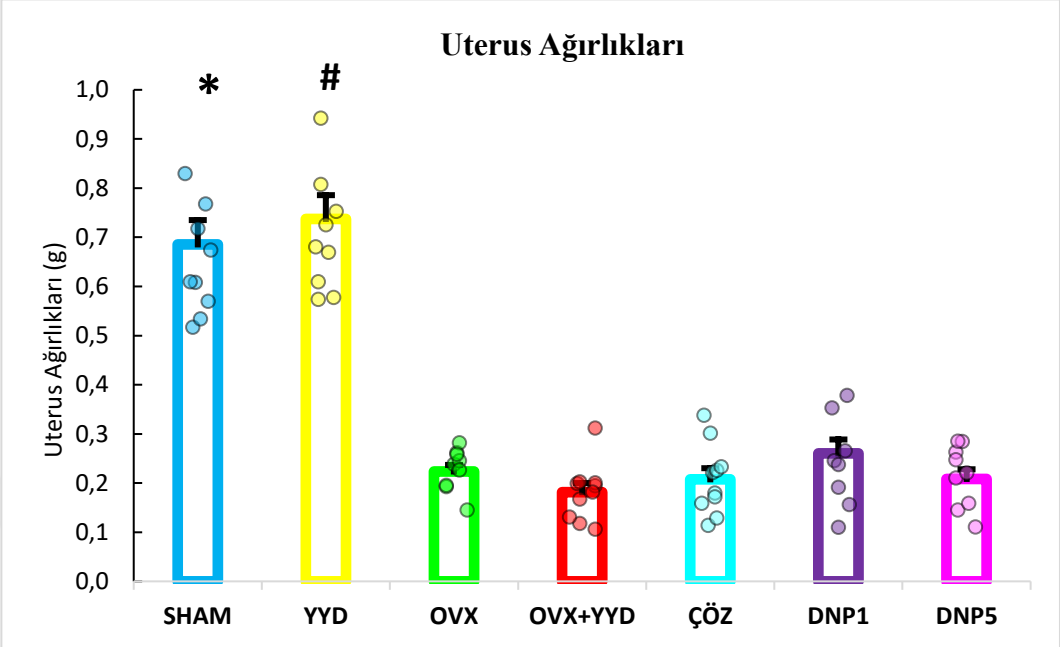
4.2. Ovariektomi Operasyonunun Doğrulanması: Uterus Ağırlıkları

Ovariektomi operasyonun doğrulanması amacıyla sakrifikasyon sonrası deney hayvanlarının uterus dokuları çıkarıldı ve ıslak ağırlıkları tartıldı (**Resim 9A ve Resim 9B**).



Resim 9. Sakrifikasyon sonrasında çıkarılan uterus dokuları. (A) Sham operasyonu uygulanan deney hayvanının uterus dokusu. (B) Ovariektomi operasyonu uygulanan deney hayvanının uterus dokusu.

SHAM grubunun uterus ağırlığı ovariektomi uygulanan tüm gruplardan anlamlı olarak daha yüksek bulundu (SHAM: 0,685±0,049 g vs. OVX: 0,223±0,013 g; OVX+YYD: 0,181±0,018 g; ÇÖZ: 0,207±0,022 g; DNP1: 0,260±0,028 g; DNP5:0,208±0,019 g; $p<0,05$; **Grafik 1**). Sham operasyonu uygulanıp yüksek yağlı diyetle beslenen YYD grubunun uterus ıslak ağırlığı OVX, OVX+YYD, ÇÖZ, DNP5 gruplarından anlamlı olarak daha yüksekti (YYD: 0,737±0,048 g vs. OVX: 0,223±0,013 g; OVX+YYD: 0,181±0,018 g; ÇÖZ: 0,207±0,022 g; DNP5: 0,208±0,019 g; $p<0,05$; **Grafik 1**).



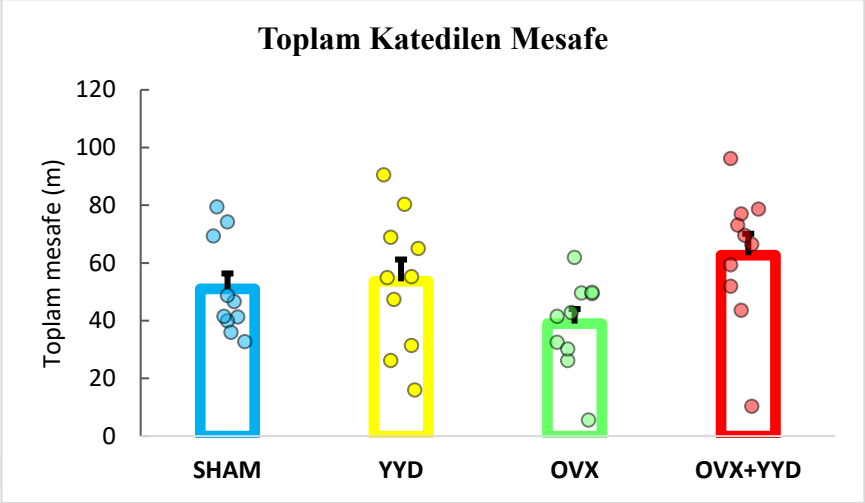
Grafik 1. Tüm deney gruplarının uterus ıslak ağırlıkları. Gruplar arasında anlamlı fark mevcuttur. (Kruskal Wallis H(6)=45,285, p<0,001; *Post-hoc* Dunn's Test: *p<0,05 SHAM vs. OVX, OVX+YYD, ÇÖZ, DNP5; #p<0,05 YYD vs. OVX, OVX+YYD, ÇÖZ, DNP1, DNP5). SHAM: Sham operasyonu+ Standart Diyet, YYD: Sham operasyonu+ Yüksek Yağlı Diyet, OVX: Ovariektomi+ Standart Diyet, OVX+YYD: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet, ÇÖZ: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+PBS, DNP1: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 1 mg/kg, DNP5: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 5 mg/kg. g: Gram. Tüm gruplar için n=10.

4.3. Ovariektomi ve Yüksek Yağlı Diyet Etkilerinin Araştırılması

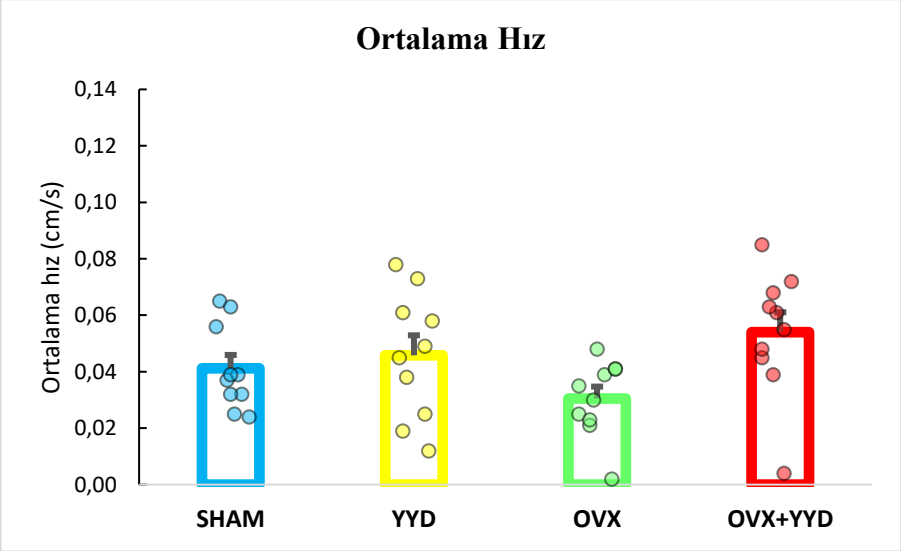
4.3.1. Davranış Testleri

4.3.1.1. Açık Alan Testi

Açık alan testinde grupların toplam katettikleri mesafede anlamlı fark yoktu (H(3)=6,862; p=0,76; Kruskal Wallis, **Grafik 2**). Ortalama hız karşılaştırıldığında da anlamlı fark izlenmedi (H(3)=7,786; p=0,051; Kruskal Wallis, **Grafik 3**).



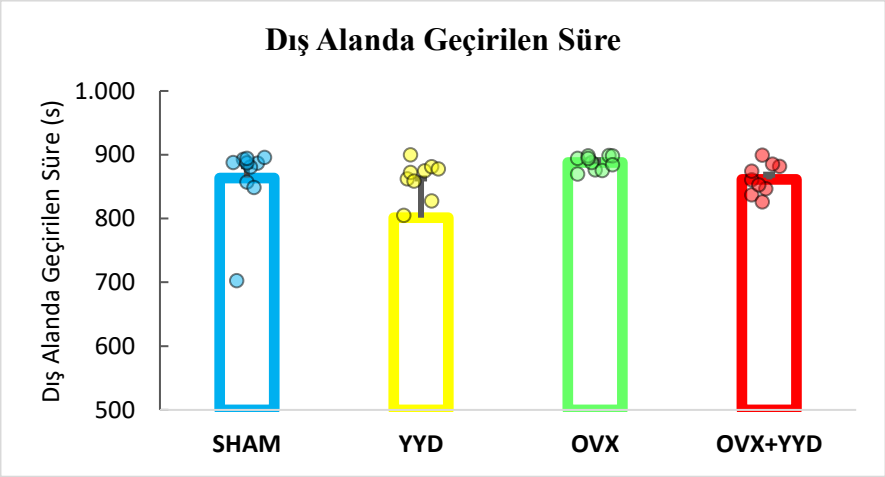
Grafik 2. Açık alan testinde katedilen toplam mesafeler (p=0,076; Kruskal Wallis). SHAM: Sham operasyonu+ Standart Diyet, YYD: Sham operasyonu+ Yüksek Yağlı Diyet, OVX: Ovariektomi+ Standart Diyet, OVX+YYD: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet. m; Metre. Tüm gruplar için n=10.



Grafik 3. Açık alan testinde grupların ortalama hızları (p=0,051; Kruskal Wallis) SHAM: Sham operasyonu+ Standart Diyet, YYD: Sham operasyonu+ Yüksek Yağlı Diyet, OVX: Ovariektomi+ Standart Diyet, OVX+YYD: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet. cm/s: Santimetre/Saniye. Tüm gruplar için n=10.

Açık alan testinde merkez alanda geçirilen süre ölçütü değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı (H(3)=3,066; p=0,381; Kruskal Wallis).

Açık alan testinde dış alanda geçirilen sürede gruplar arasında anlamlı fark mevcuttu ancak *post-hoc* analizlerde anlamlı fark bulunamadı (SHAM: 863±18 s; YYD: 801±62 s; OVX: 887±3 s; OVX+YYD: 861±7 s; **Grafik 4**).

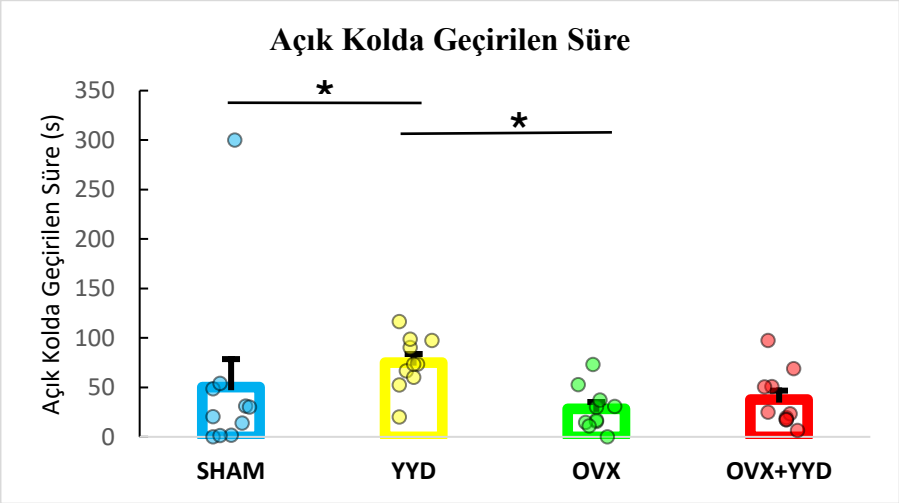


Grafik 4. Açık alan testinde grupların dış alanda geçirdikleri süre (H(3)=9,038; p=0,029; Kruskal Wallis). SHAM: Sham operasyonu+ Standart Diyet, YYD: Sham operasyonu+ Yüksek Yağlı Diyet, OVX: Ovariektomi+ Standart Diyet, OVX+YYD: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet. s: Saniye. Tüm gruplar için n=10.

Açık alan testinde grupların şahlanma sayılarında (H(3)=5,541; p=0,136; Kruskal Wallis) ve tımarlanma sürelerinde (H(3)=4,857; p=0,183; Kruskal Wallis) anlamlı fark yoktu. Keşfetme davranışının göstergesi olarak değerlendirdiğimiz dış alanda katedilen mesafe (H(3)=6,1116; p=0,106; Kruskal Wallis), merkez alanda katedilen mesafe ((H(3)=1,960; p=0,581; Kruskal Wallis), merkez alana giriş sayısı (H(3)=4,141; p=0,247; Kruskal Wallis) değişkenlerinde gruplar arasında anlamlı fark yoktu.

4.3.1.2. Yükseltilmiş Artı Labirent Testi

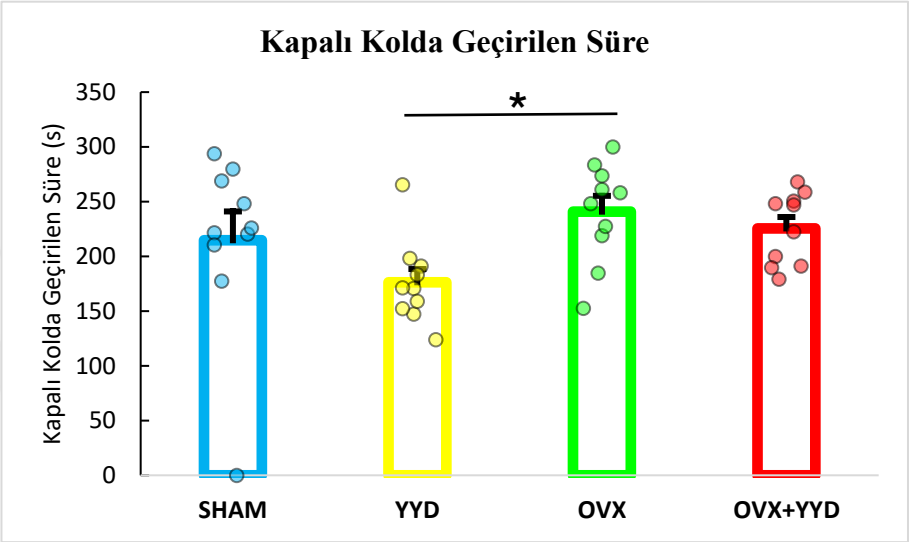
Yükseltilmiş artı labirentte, açık kolda geçirilen süre değişkeni gruplar arasında farklı bulundu (Kruskal Wallis, p=0,006). *Post-hoc* analizde, YYD grubunda açık kolda geçirilen süre SHAM ve OVX gruplarına kıyasla anlamlı olarak daha yüksek bulundu (SHAM: 50,2±28,4 s vs. YYD: 75,0±8,7 s; OVX:28,3±8,9 s; p<0,05 **Grafik 5, Resim 10**).



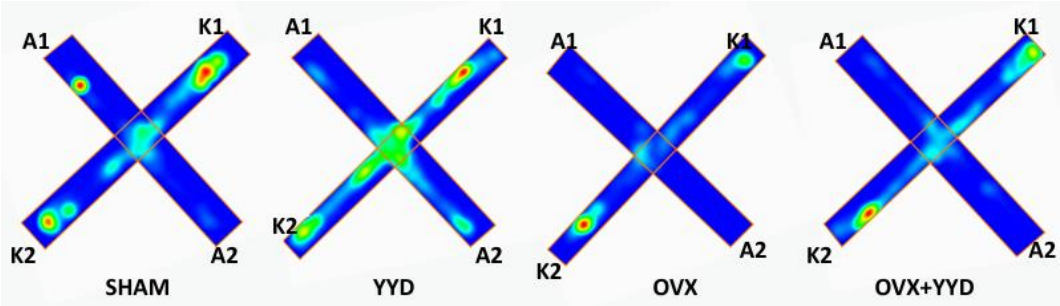
Grafik 5. Yükseltilmiş artı labirent testinde grupların açık kolda geçirdikleri ortalama süre. H(3)=12,340, p=0,006; *Post-hoc* Dunn's Test: *p<0,05 YYD grubu, SHAM ve OVX grubundan farklı. SHAM: Sham operasyonu+ Standart Diyet, YYD: Sham operasyonu+ Yüksek Yağlı Diyet, OVX: Ovariektomi+ Standart Diyet, OVX+YYD: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet. s: Saniye. Tüm gruplar için n=10.

Yükseltilmiş artı labirentte, kapalı kolda geçirilen süre değişkeni gruplar arasında farklı bulundu (Kruskal Wallis, p=0,014). *Post-hoc* analizde, OVX grubunda, YYD grubuna kıyasla kapalı kolda geçirilen süre anlamlı olarak daha

yüksekti (OVX: 240,8±14,4 s vs. YYD: 176,2±12,1 s; p<0,05; **Grafik 6, Resim 10**).



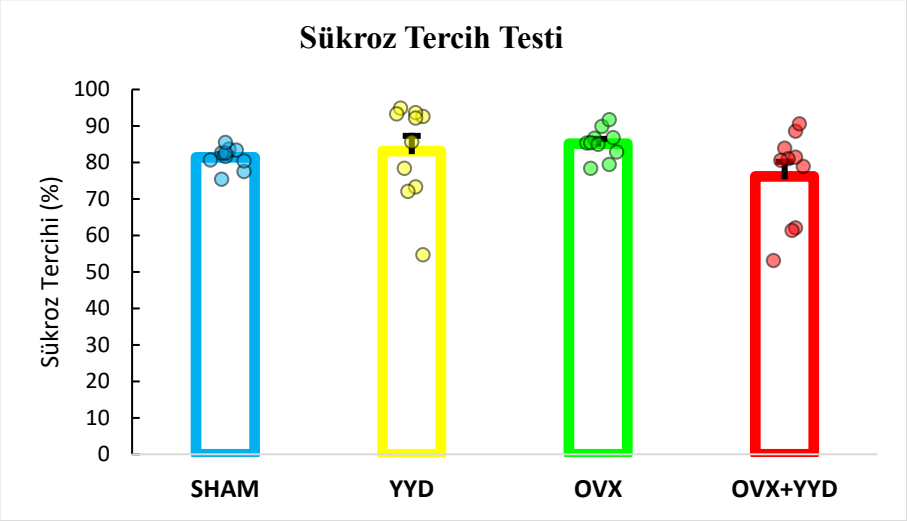
Grafik 6. Yükseltilmiş artı labirentte grupların kapalı kolda geçirdikleri ortalama süre. H(3)=10,547, p=0,014; *Post-hoc* Dunn's Test: *p<0,05 OVX vs. YYD. SHAM: Sham operasyonu+ Standart Diyet, YYD: Sham operasyonu+ Yüksek Yağlı Diyet, OVX: Ovariektomi+ Standart Diyet, OVX+YYD: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet. s: Saniye. Tüm gruplar için n=10.



Resim 10. Yükseltilmiş artı labirentte grupların açık kolda ve kapalı kolda bulunma tercihinin ısı haritası şeklinde gösterimi (A1 ve A2: Açık kol, K1 ve K2: Kapalı kol. Daha uzun süre geçirilen bölgeler Any-Maze aracılığıyla kırmızı sarı ve yeşil renklerle belirtilmiştir)

4.3.1.3. Sükroz Tercih Testi

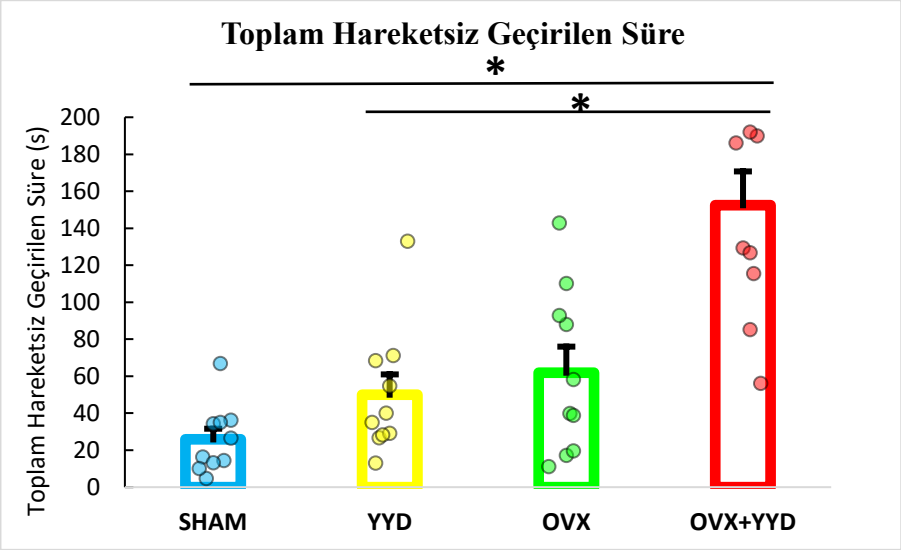
Sükroz tercih testinde grupların sükroz tercih yüzdeleri arasında anlamlı fark yoktu (H(3)=4,924; p=0,17; Kruskal Wallis, **Grafik 7**).



Grafik 7. Sükroz tercih testinde grupların sükroz solüsyonunu tercih etme yüzdeleri (H(3)=4,924; p=0,17; Kruskal Wallis). SHAM: Sham operasyonu+ Standart Diyet, YYD: Sham operasyonu+ Yüksek Yağlı Diyet, OVX: Ovariektomi+ Standart Diyet, OVX+YYD: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet. Tüm gruplar için n=10.

4.3.1.4. Zorunlu Yüzdürme Testi

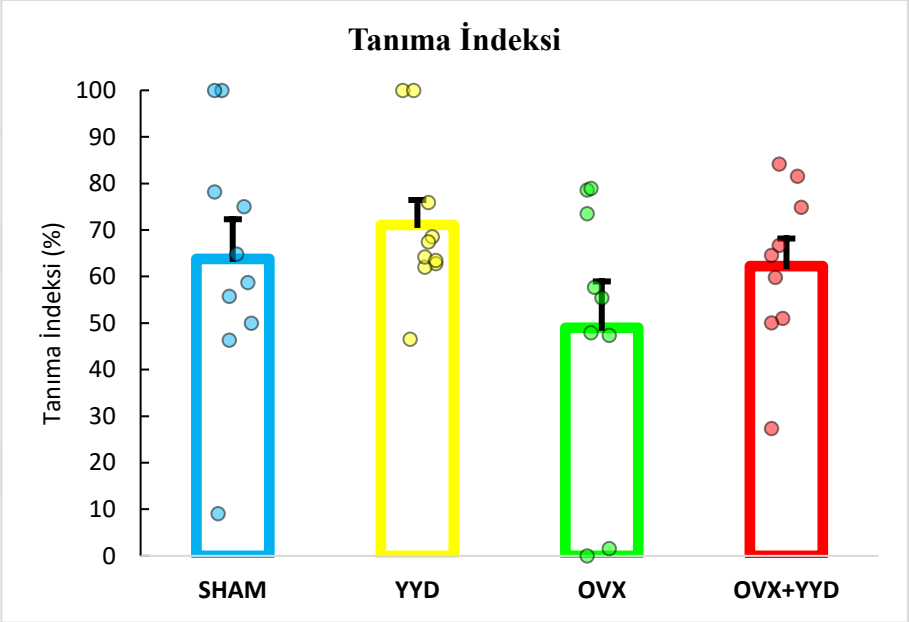
Zorunlu yüzdürme testinde toplam hareketsiz geçirilen süre değişkeni gruplar arasında farklı bulunmuştur (Kruskal Wallis, p=0,001). *Post-hoc* analizde, OVX+YYD grubunda SHAM ve YYD grubuna kıyasla toplam hareketsiz geçirilen süre anlamlı olarak daha yüksek bulundu (OVX+YYD:152,4±18,2 s vs SHAM: 25,8±5,7 s; YYD: 49,9±10,9s; p<0,05; **Grafik 8**).



Grafik 8. Zorunlu yüzdürme testinde grupların toplam hareketsiz geçirdikleri ortalama süre. H(3)=20,617, p<0,001; *Post-hoc* Dunn's Test: *p<0,05 OVX+YYD grubu, SHAM ve YYD gruplarından farklı. SHAM: Sham operasyonu+ Standart Diyet, YYD: Sham operasyonu+ Yüksek Yağlı Diyet, OVX: Ovariektomi+ Standart Diyet, OVX+YYD: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet. s: Saniye. Tüm gruplar için n=10.

4.3.1.5. Yeni Nesne Tanıma Testi

Yeni nesne tanıma testinde, gruplar arasında tanıma indeksi karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmadı (H(3)=2,696; p=0,441; Kruskal Wallis, **Grafik 9**).



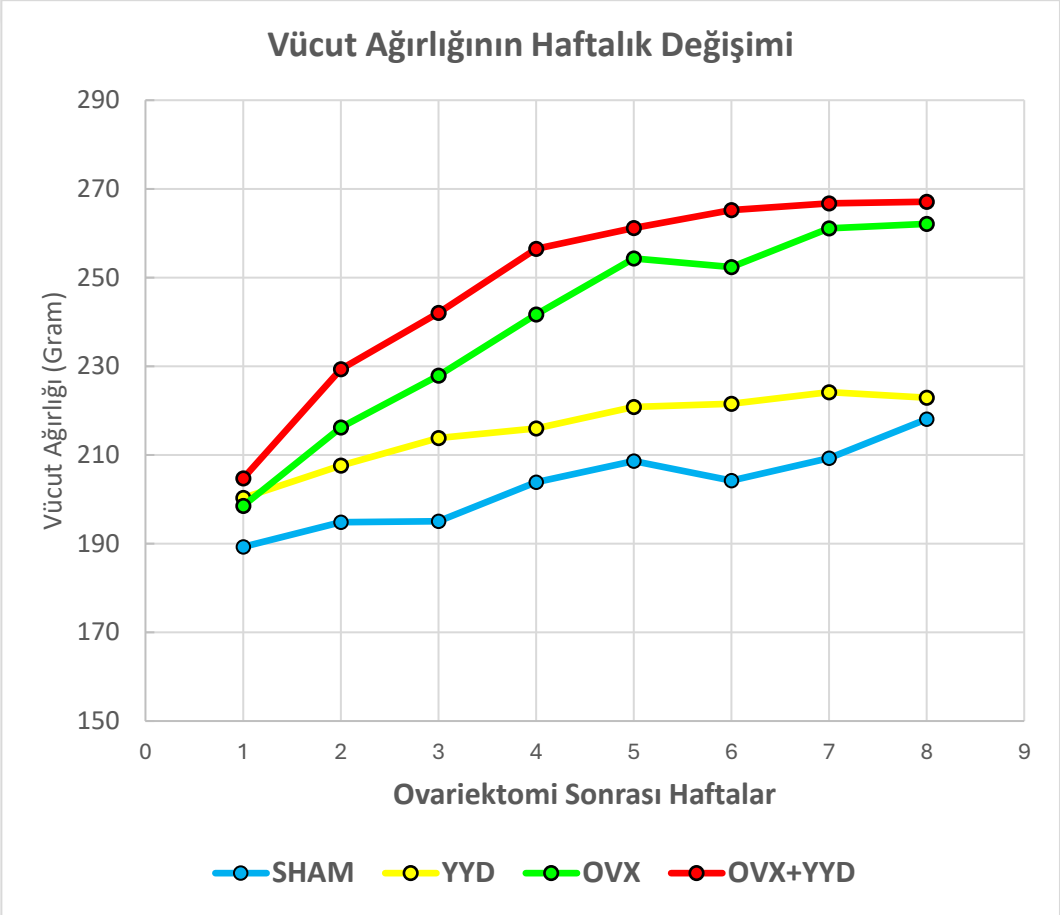
Grafik 9. Yeni nesne tanıma testinde grupların tanıma indeksleri. (Tanıma indeksi: Yeni nesne ile ilgilenme süresinin her iki nesneyle ilgilenme süresine oranı (H(3)=2,696; p=0,441; Kruskal Wallis). SHAM: Sham operasyonu+ Standart Diyet, n=10; YYD: Sham operasyonu+ Yüksek Yağlı Diyet, n=10; OVX: Ovariektomi+ Standart Diyet, n=9; OVX+YYD: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet, n=9.

4.3.2. Vücut Ağırlığı, Adipoz Doku ve Enerji Alımı

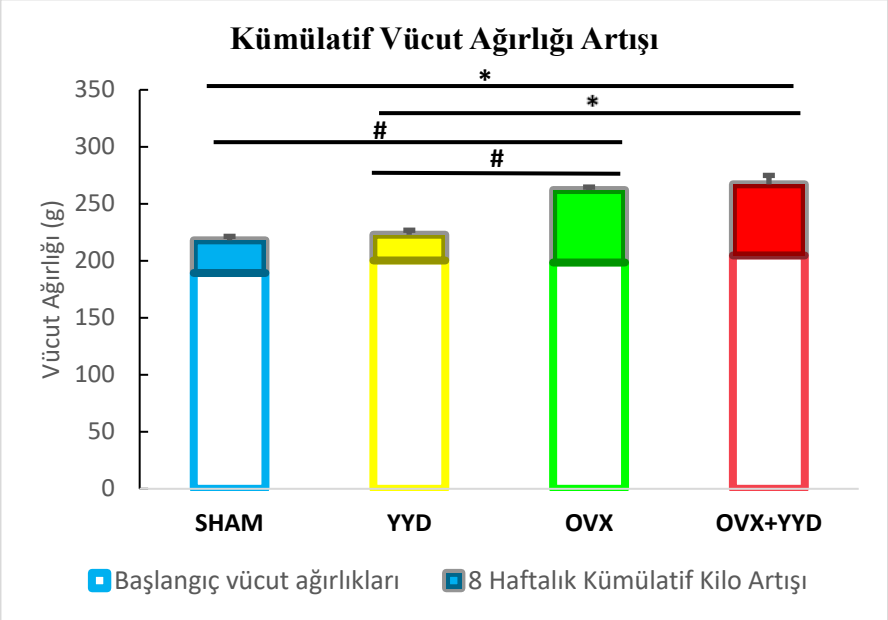
4.3.2.1. Vücut Ağırlığı Artışı

Kümülatif olarak vücut ağırlıkları artışı karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark olduğu bulundu (Kruskal Wallis, p<0,001). *Post-hoc* analizde, OVX grubunda vücut ağırlığındaki artış SHAM ve YYD grubundan anlamlı olarak daha

yüksek bulundu (OVX: 63,5±2,5 g vs. SHAM: 28,7±3,3 g; YYD: 22,6±3,9 g; p<0,05; **Grafik 10**). Benzer şekilde OVX+YYD grubunun vücut ağırlığındaki artış, SHAM ve YYD grubundan anlamlı olarak daha yüksekti (OVX+YYD: 62,3±7,8 g vs. SHAM: 28,7±3,3 g; YYD: 22,6±3,9 g; p<0,05; **Grafik 10**). Ayrıca grupların 8 hafta boyunca vücut ağırlıkları ortalamalarının takip çizelgesi, **Şekil 3'**te sunulmuştur.



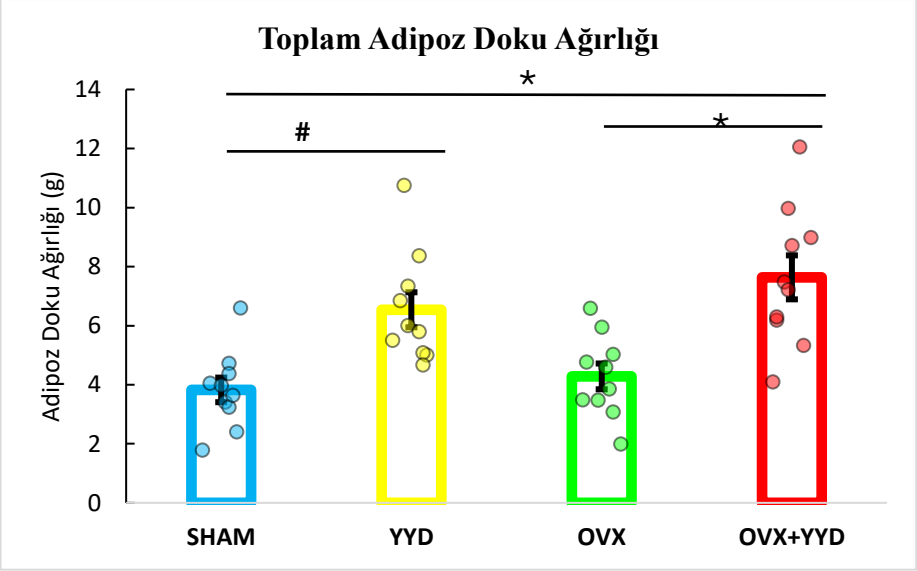
Şekil 3. Vücut ağırlığı haftalık takibi



Grafik 10. Gruplar arasında kümülatif vücut ağırlığı değişimleri. Boş barlar, grupların başlangıç ağırlıklarını temsil etmektedir. H(3)=23,630; p<0,001; *Post-hoc* Dunn's Test: $^{\#}$p<0,05 OVX grubu SHAM ve YYD gruplarından farklı; *p<0,05 OVX+YYD grubu SHAM ve YYD gruplarından farklı. SHAM: Sham operasyonu+ Standart Diyet, YYD: Sham operasyonu+ Yüksek Yağlı Diyet, OVX: Ovariektomi+ Standart Diyet, OVX+YYD: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet. g: Gram. Tüm gruplar için n=10.

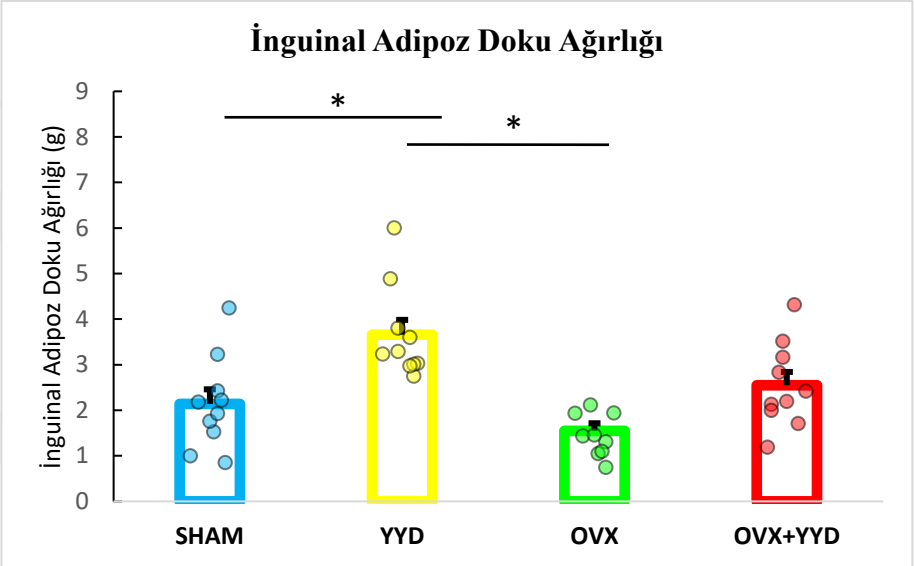
4.3.2.2. Adipoz Doku Ağırlıkları

Retroperitoneal ve inguinal adipoz dokular izole edildikten sonra toplam ıslak ağırlıkları tartılarak gruplar arasında karşılaştırıldı. Toplam adipoz doku ağırlığı gruplar arasında farklı bulundu (Kruskal Wallis, p<0,001). *Post-hoc* analizde, YYD grubunun toplam adipoz doku ağırlığı SHAM grubundan anlamlı olarak daha yüksekti (YYD: 6,5±0,5 g vs SHAM:3,8±0,4 g; p<0,05; **Grafik 11**). OVX+YYD grubunun toplam adipoz doku ağırlığı SHAM ve OVX gruplarından anlamlı olarak daha yüksekti (OVX+YYD: 7,6±0,7 g vs. SHAM:3,8±0,4 g; OVX:4,2±0,4 g; p<0.05; **Grafik 11**).



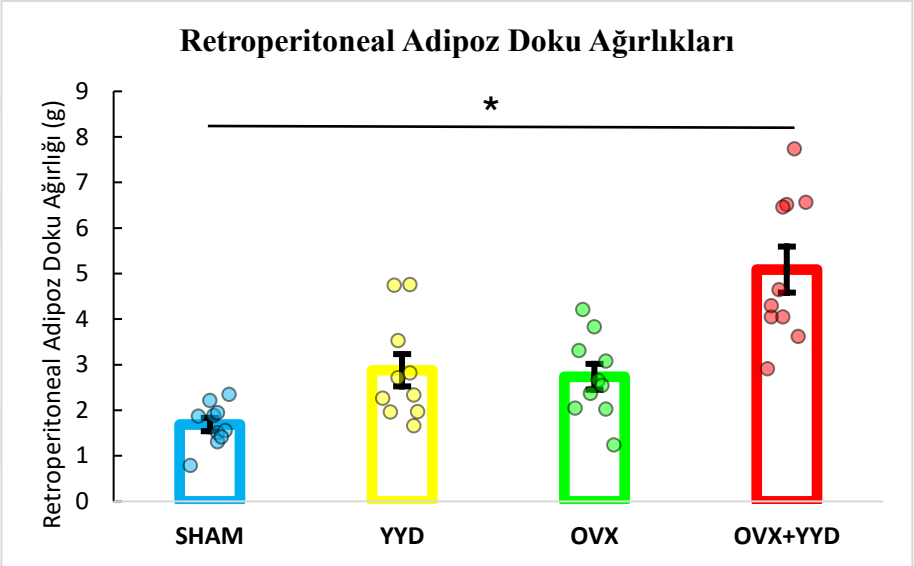
Grafik 11. Gruplar arasında toplam adipoz doku ortalama ağırlığı. H(3)=20,595; p<0,001; *Post-hoc* Dunn's Test: *p<0,05 OVX+YYD grubu SHAM ve OVX gruplarından farklı; #p<0,05: YYD grubu SHAM YYD gruplarından farklı. SHAM: Sham operasyonu+ Standart Diyet, YYD: Sham operasyonu+ Yüksek Yağlı Diyet, OVX: Ovariektomi+ Standart Diyet, OVX+YYD: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet. g: Gram. Tüm gruplar için n=10.

İnguinal adipoz doku ağırlıkları gruplar arasında farklı bulundu (Kruskal Wallis, p<0,001). *Post-hoc* analizde, YYD grubunda SHAM ve OVX gruplarına göre inguinal adipoz doku ağırlığı değişkeni anlamlı olarak daha yüksekti (YYD: 3,6±0,3 g vs SHAM: 2,1±0,3 g; OVX:1,5±0,1g; p<0,05; **Grafik 12**).



Grafik 12. Gruplar arasında inguinal adipoz doku ağırlıkları. H(3)=19,133; p<0,001; *Post-hoc* Dunn's Test: *p<0,05 YYD grubu SHAM ve OVX gruplarından farklı; #p<0,05. SHAM: Sham operasyonu+ Standart Diyet, YYD: Sham operasyonu+ Yüksek Yağlı Diyet, OVX: Ovariektomi+ Standart Diyet, OVX+YYD: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet. g: Gram. Tüm gruplar için n=10.

Retroperitoneal adipoz doku ıslak ağırlıkları da gruplar arasında farklı bulundu (Kruskal Wallis, p<0,001). *Post-hoc* analizde, OVX+YYD grubu ağırlığı, SHAM grubuna kıyasla anlamlı olarak daha yüksekti (OVX+YYD:5,0±0,5 G vs. SHAM: 1,6±0,1 g; p<0,001; **Grafik 13**).



Grafik 13. Gruplar arasında retroperitoneal adipoz doku ağırlıkları. H(3)=23,805; p<0,001; *Post-hoc* Dunn's Test: *p<0,001 OVX+ YYD grubu SHAM grubundan farklı. SHAM: Sham operasyonu+ Standart Diyet, YYD: Sham operasyonu+ Yüksek Yağlı Diyet, OVX: Ovariektomi+ Standart Diyet, OVX+YYD: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet. g: Gram. Tüm gruplar için n=10.

4.3.2.3. Kümülatif Yem ve Enerji Tüketimi

Sekiz hafta sonunda tanımlayıcı veriler üzerinden grupların toplam yem tüketimi ele alındığında, SHAM'a göre YYD'de %21,4 daha düşük, OVX'te %17,8 daha yüksek ve OVX+YYD'de %5,9 daha düşük olduğu görüldü (**Tablo 6**). Aynı dönemde toplam enerji alımının, SHAM'a kıyasla YYD'de %8,8, OVX'te %17,8 ve OVX+YYD'de %30,1 daha yüksek olduğu saptandı (**Tablo 6**). Yem

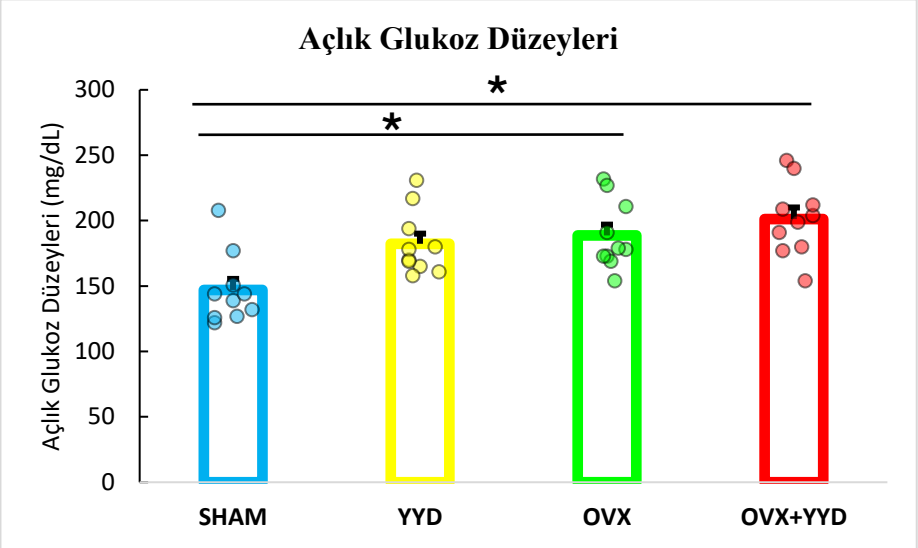
verimliliğinin, SHAM'a kıyasla YYD'de %27,8 daha düşük, OVX'te %87,5 daha yüksek ve OVX+YYD'de %66,7 daha yüksek olduğu gözlendi (**Tablo 6**).

Tablo 6. Deney gruplarının 8 haftalık deney süresi boyunca kümülatif toplam tükettikleri yem ağırlığı (g), toplam enerji alımı (MJ) ve yem verimliliğine (g/MJ) ait tanımlayıcı veriler. g:Gram; MJ:megajul. Veriler grup toplamı olarak raporlanmıştır.

Deney Grupları	Total Tüketilen Yem Ağırlığı (Gram)	Total Tüketilen Yem Enerjisi (Mjul)	Yem Verimliliği (g/Mj)
SHAM	6633,5	105,472	2,73
YYD	5216,2	114,756	1,97
OVX	7815,5	124,266	5,12
OVX+YYD	6239,5	137,269	4,55

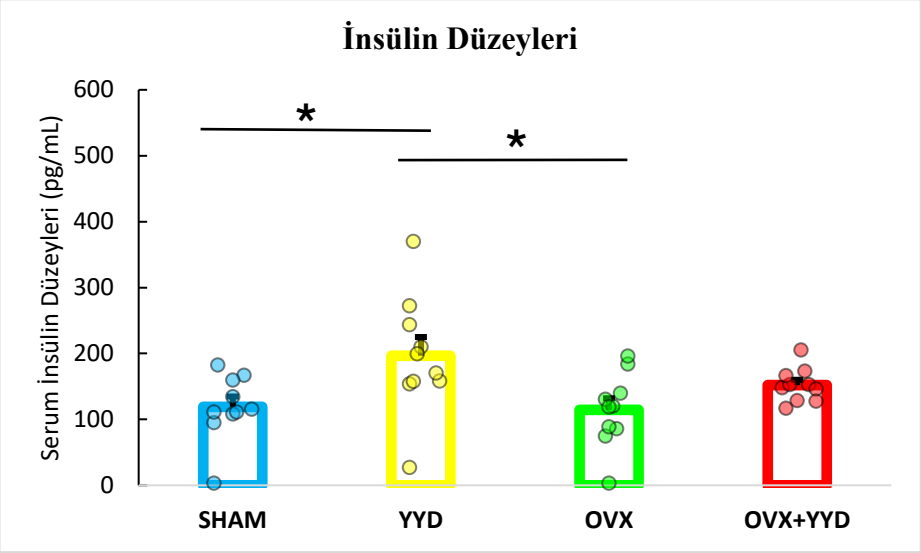
4.3.3. Metabolik Göstergeler: Glukoz İnsulin HOMA-IR Kolesterol HDL, non HDL, Leptin

Açlık glukoz düzeylerinin gruplar arasında farklı olduğu bulundu (Kruskal Wallis, $p<0,001$). *Post-hoc* analizde, SHAM grubunda açlık glukoz seviyesi OVX ve OVX+YYD gruplarına kıyasla anlamlı olarak daha düşüktü (SHAM:147,0±8,4 mg/dL vs OVX:188,7±8,2 mg/dL; OVX+YYD:201,2±8,8 mg/dL; $p<0,05$; **Grafik 14**).



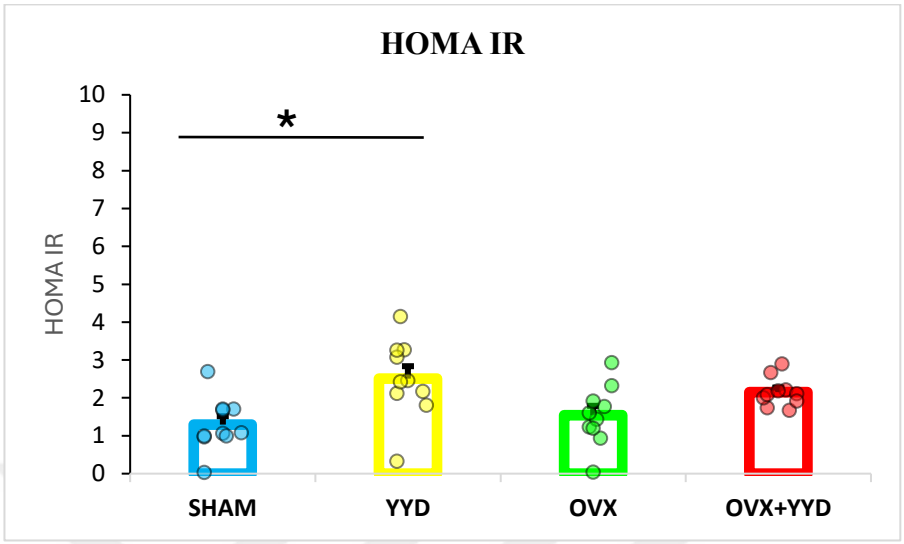
Grafik 14. Gruplar arasında açlık glukoz düzeyleri. H(3)=15,644; p=0,001; *Post-hoc* Dunn's Test: *p<0,001. SHAM grubu OVX ve OVX+ YYD gruplarından farklı. SHAM: Sham operasyonu+ Standart Diyet, YYD: Sham operasyonu+ Yüksek Yağlı Diyet, OVX: Ovariektomi+ Standart Diyet, OVX+YYD: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet. Tüm gruplar için n=10.

Serum insülin düzeylerinin gruplar arasında farklı olduğu bulundu (Kruskal Wallis, p<0,05). *Post-hoc* analizde, YYD grubunda serum insülini, SHAM ve OVX gruplarına kıyasla anlamlı olarak daha yüksek bulundu (YYD:196,6±28,3 pg/mL vs SHAM: 119,0±15,7 pg/mL; OVX:114,4±17,5 pg/mL; p<0,05; **Grafik 15**).



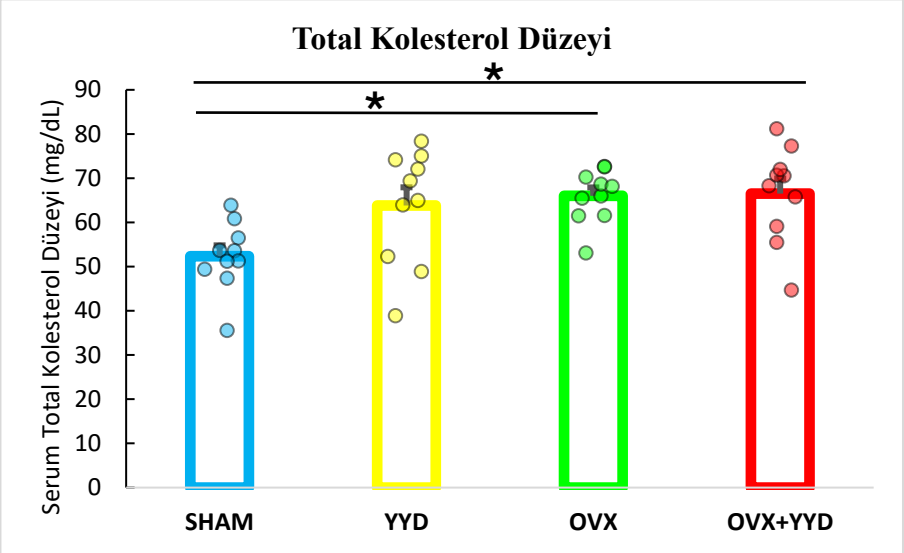
Grafik 15. Gruplar arasında serum insülin düzeyleri. H(3)=10,980; p<0,05; *Post-hoc* Dunn's Test: *p<0,05 YYD grubu SHAM ve OVX gruplarından farklı. SHAM: Sham operasyonu+ Standart Diyet, YYD: Sham operasyonu+ Yüksek Yağlı Diyet, OVX: Ovariektomi+ Standart Diyet, OVX+YYD: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet. Tüm gruplar için n=10.

HOMA-IR değerlerinin gruplar arasında farklı olduğu görüldü (Kruskal Wallis, p=0,002). *Post-hoc* analizde, YYD grubu SHAM grubundan anlamlı olarak daha yüksekti (YYD:2,5±0,3 vs SHAM:1,2±0,2; P<0,05; **Grafik 16**).



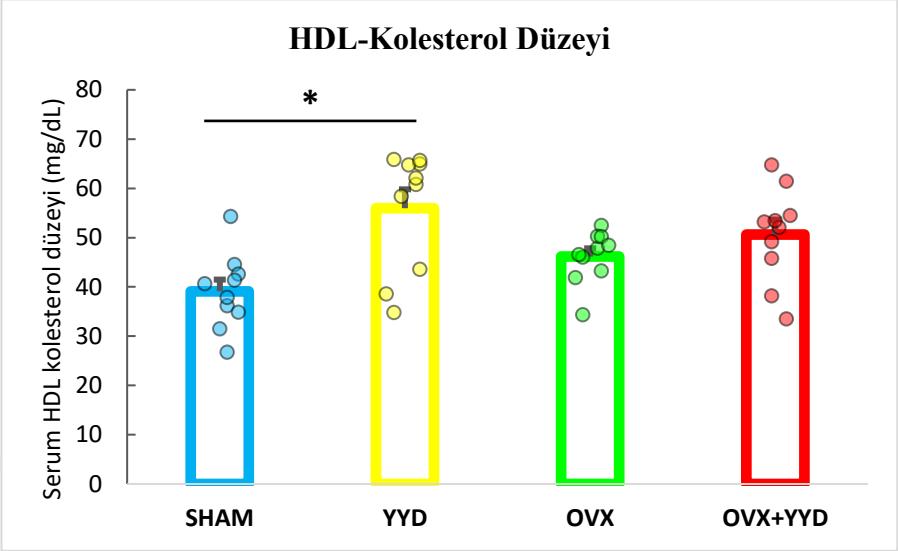
Grafik 16. Gruplar arasında HOMA-IR düzeyleri. H(3)=14,369; p=0,002; *Post-hoc* Dunn's Test: *p<0,05 YYD grubu SHAM grubundan farklı. SHAM: Sham operasyonu+ Standart Diyet, YYD: Sham operasyonu+ Yüksek Yağlı Diyet, OVX: Ovariektomi+ Standart Diyet, OVX+YYD: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet. Tüm gruplar için n=10.

Total kolesterol seviyelerinin gruplar arasında fark gösterdiği bulundu (Kruskal Wallis, p=0,01). *Post-hoc* analizde, SHAM grubunda, OVX ve OVX+YYD gruplarına kıyasla total kolesterol düzeyi anlamlı olarak daha düşüktü (SHAM:52,3±2,3 mg/dL vs. YYD:63,8±4,1 mg/dL; OVX+YYD: 66,5±3,4 mg/dL; p<0,05; **Grafik 17**).



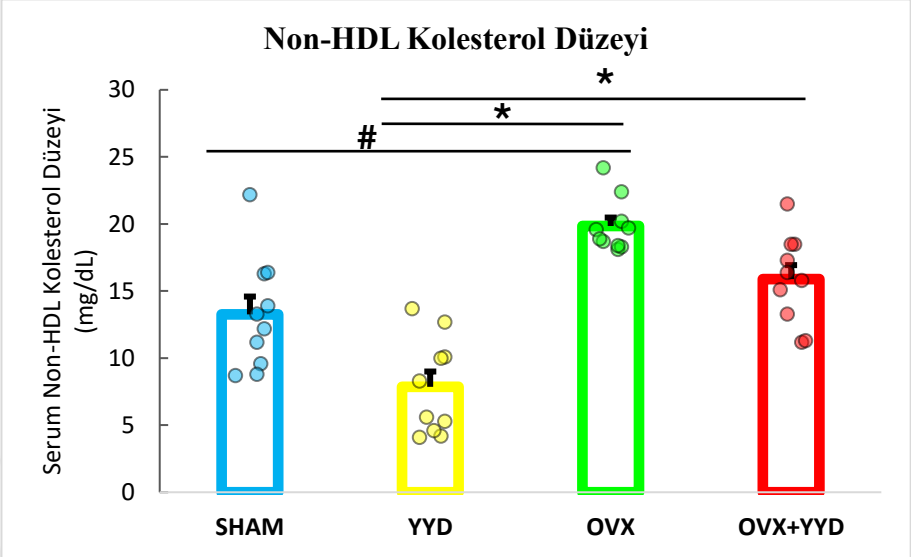
Grafik 17. Gruplar arasında serum total kolesterol düzeyleri. H(3)=11,331; p=0,01; *Post-hoc* Dunn's Test: *p<0,05 SHAM grubu OVX ve OVX+ YYD gruplarından farklı. SHAM: Sham operasyonu+ Standart Diyet, YYD: Sham operasyonu+ Yüksek Yağlı Diyet, OVX: Ovariektomi+ Standart Diyet, OVX+YYD: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet. Tüm gruplar için n=10.

HDL kolesterol seviyeleri incelendiğinde gruplar arasında fark bulunduğu saptandı (Kruskal Wallis, p=0,006). *Post-hoc* analizde, YYD grubunda, SHAM grubuna kıyasla HDL kolesterol düzeyi daha yüksek bulundu. (YYD: 55,9±3,8 mg/dL vs SHAM:39,0±2,3 mg/dL; p<0,05, **Grafik 18**).



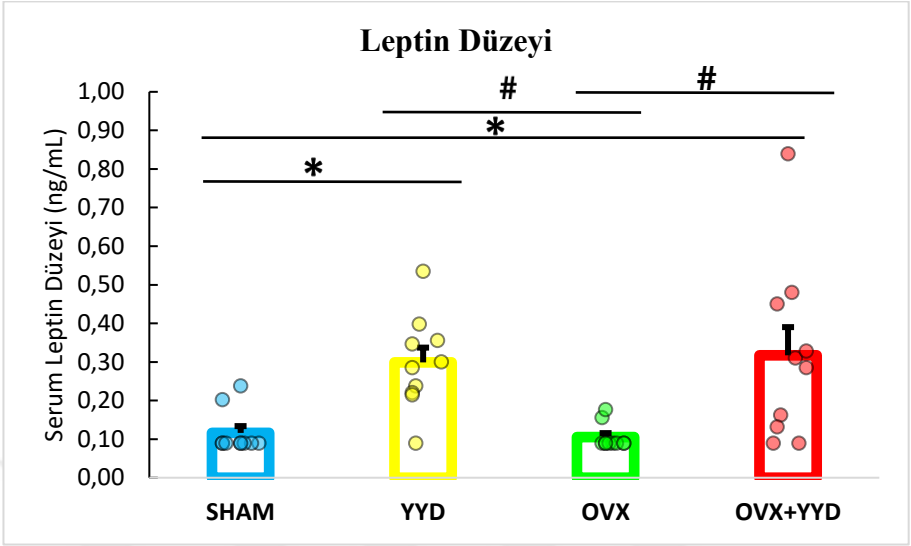
Grafik 18. Gruplar arasında serum HDL kolesterol seviyeleri. H(3)=12,448; p=0,006; *Post-hoc* Dunn's Test: *p<0,01 SHAM grubu YYD grubundan farklı. SHAM: Sham operasyonu+ Standart Diyet, YYD: Sham operasyonu+ Yüksek Yağlı Diyet, OVX: Ovariektomi+ Standart Diyet, OVX+YYD: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet. Tüm gruplar için n=10.

Kolesterol düzeylerinden HDL düzeylerinin çıkarılmasıyla elde edilen non-HDL seviyeleri gruplar arasında farklı bulunmuştur (Kruskal Wallis, p<0,001). *Post-hoc* analizde, SHAM grubunda non-HDL düzeyi, OVX grubundan daha düşük bulundu (SHAM:13,2±1,3 mg/dL vs. OVX: 19,8±0,6 mg/dL; p<0,05; **Grafik 19**). Aynı zamanda YYD grubunda non-HDL düzeyleri OVX ve OVX+YYD gruplarına kıyasla daha düşüktü (YYD: 7,8±1,1 mg/dL vs. OVX: 19,8±0,6 mg/dL; OVX+YYD: 15,8±1,0 mg/dL; p<0,05; **Grafik 19**).



Grafik 19. Gruplara arasında serum non-HDL kolesterol düzeyleri. H(3)=25,347; p<0,001; *Post-hoc* Dunn's Test: #p<0,05 SHAM grubu OVX grubundan farklı; *p<0,05 YYD grubu OVX ve OVX+YYD gruplarından farklı. SHAM: Sham operasyonu+ Standart Diyet, YYD: Sham operasyonu+ Yüksek Yağlı Diyet, OVX: Ovariektomi+ Standart Diyet, OVX+YYD: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet. Tüm gruplar için n=10.

Leptin düzeylerinin gruplar arasında fark gösterdiği bulundu (Kruskal Wallis, p<0,001). *Post-hoc* analizde, SHAM grubunda leptin düzeyi YYD ve OVX+YYD gruplarına kıyasla anlamlı olarak daha düşük bulundu (SHAM:0,11±0,01 ng/mL vs YYD:0,29±0,03 ng/mmL; OVX+YYD:0,31±0,07 ng/mL; p<0,05; **Grafik 20**). Benzer şekilde OVX grubunda da YYD ve OVX+YYD gruplarına kıyasla anlamlı olarak daha düşüktü (OVX:0,10±0,01 ng/mL vs YYD:0,29±0,03 ng/mL; OVX+YYD:0,31±0,07 ng/mL; p<0,05; **Grafik 20**).

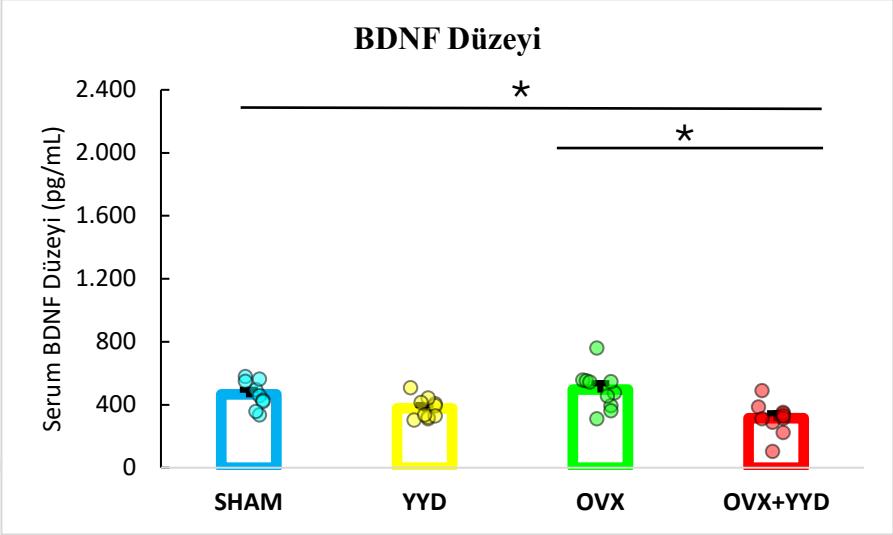


Grafik 20. Gruplar arasında serum leptin düzeyleri. H(3)=19,774; p<0,001; *Post-hoc* Dunn's Test: *p<0,05 SHAM grubu YYD ve OVX+ YYD gruplarından farklı; #p<0,05 OVX grubu YYD ve OVX+ YYD gruplarından farklı. SHAM: Sham operasyonu+ Standart Diyet, YYD: Sham operasyonu+ Yüksek Yağlı Diyet, OVX: Ovariektomi+ Standart Diyet, OVX+YYD: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet. Tüm gruplar için n=10.

4.3.4. Nörotrofik Faktörler

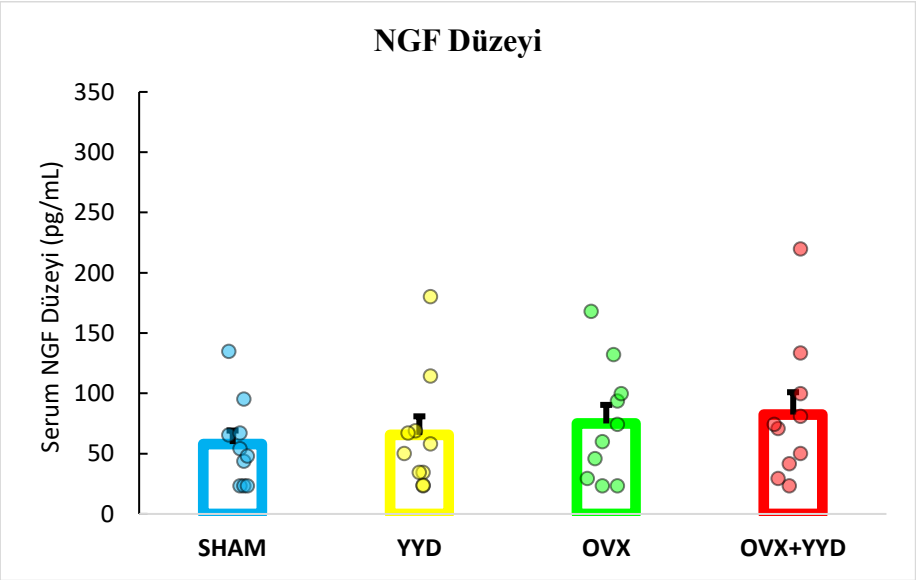
4.3.4.1 BDNF seviyeleri

Gruplar arasında serum BDNF düzeyleri arasında fark bulundu (Kruskal Wallis, p=0,01). *Post-hoc* analizde, BDNF düzeyleri OVX+YYD grubunda, SHAM ve OVX gruplarına kıyasla anlamlı olarak daha düşük bulundu (OVX+YYD: 314,4±31,9 pg/mL vs. SHAM: 465,8±29,3 pg/mL; OVX: 496,3±40,3 pg/mL; p<0,05; **Grafik 21**).



Grafik 21. Gruplar arasında serum BDNF düzeyleri. H(3)=14,928; p=0,01; *Post-hoc* Dunn's Test: *p=0,002 OVX+ YYD grubu SHAM ve OVX gruplarından farklı. SHAM: Sham operasyonu+ Standart Diyet n=9, YYD: Sham operasyonu+ Yüksek Yağlı Diyet n=10, OVX: Ovariektomi+ Standart Diyet n=10, OVX+YYD: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet n=10.

NGF düzeyleri gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farka rastlanmadı (H(3)=1,533; p=0,675; Kruskal Wallis, **Grafik 22**).



Grafik 22. Gruplar arasında serum NGF düzeyleri. H(3)=1,533; p=0,675; Kruskal Wallis. SHAM: Sham operasyonu+ Standart Diyet, YYD: Sham operasyonu+ Yüksek Yağlı Diyet, OVX:

Ovariektomi+ Standart Diyet, OVX+YYD: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet. Tüm gruplar için n=10.

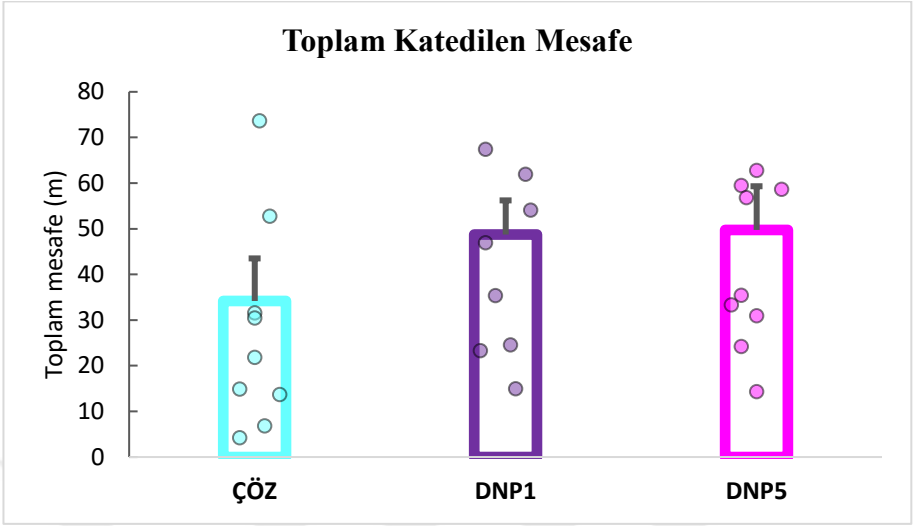
Ovariektomili yüksek yağlı diyet grubu (OVX+HFD) ile aynı koşullarda beslenen ve yalnızca PBS enjeksiyonu yapılan ovariektomili yüksek yağlı diyet grubu (ÇÖZ), PBS uygulamasının etkilerinin araştırılması amacıyla ikili olarak karşılaştırıldı. OVX+HFD grubu ile ÇÖZ grubu arasında yapılan ikili non-parametrik analizlerde, davranış testlerinde araştırılan değişkenler, vücut ağırlığı ve adipoz doku ağırlıkları, metabolik değişkenler ve nörotrofik faktörler açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (tüm karşılaştırmalar için $p > 0,05$; Mann–Whitney U testi).

4.4. Yüksek Yağlı Diyet ile Beslenen Ovariektomize Sıçanlarda DNP'nin Etkisi

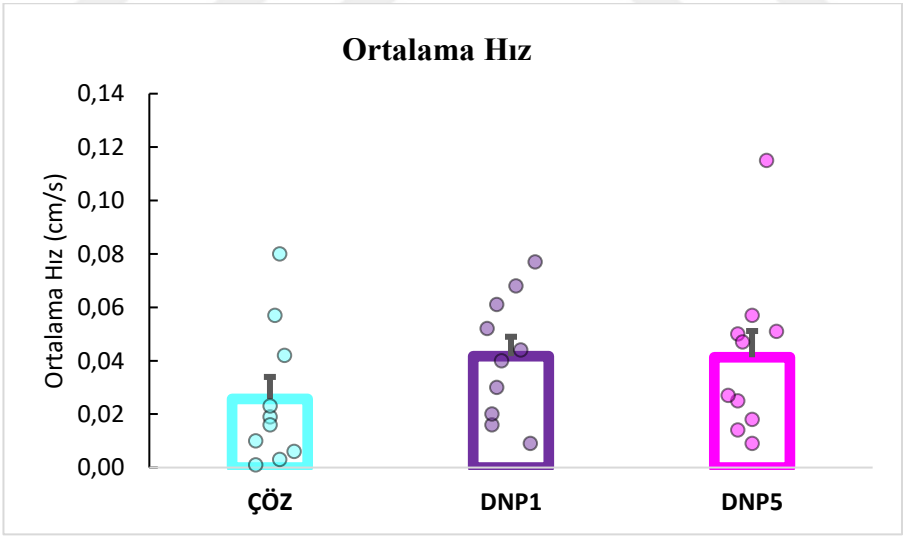
4.4.1. Davranış Testleri

4.4.1.1. Açık Alan Testi

Açık alan testinde, YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının gruplar arasında toplam katedilen mesafe bakımından anlamlı fark göstermediği saptandı ($H(2):3,120$ $p=0,21$, Kruskal Wallis, **Grafik 23**). Gruplar arasında ortalama hızları bağlamında da fark bulunmadı ($H(2)=3,055$ $p=0,217$; Kruskal Wallis, **Grafik 24**).

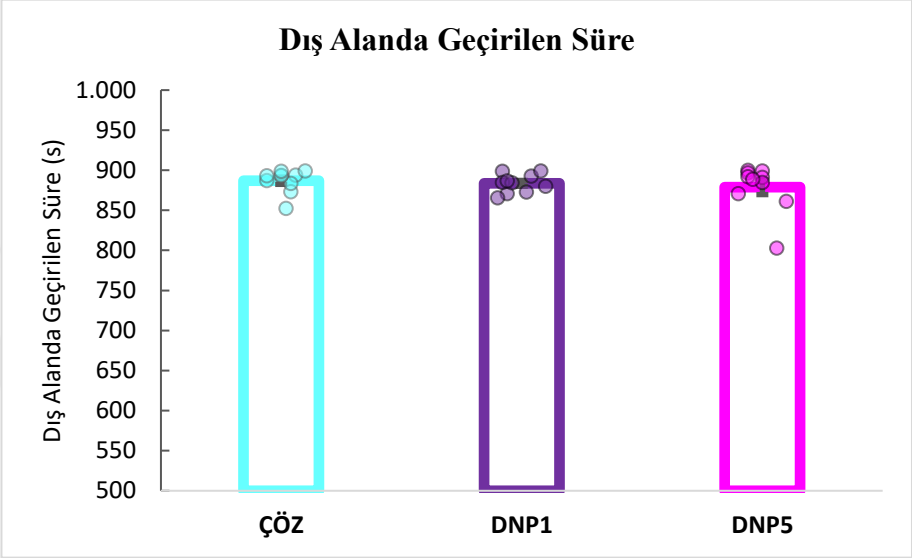


Grafik 23. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının açık alan testinde toplam katedilen mesafe üzerine etkisi. H(2)=3,055 p=0,217. ÇÖZ: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+PBS, DNP1: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 1 mg/kg, DNP5: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 5 mg/kg. Tüm gruplar için n=10. m=metre.



Grafik 24. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının açık alan testinde ortalama hız üzerine etkileri. H(2)=3,055 p=0,217. ÇÖZ: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+PBS, DNP1: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 1 mg/kg, DNP5: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 5 mg/kg. Tüm gruplar için n=10. cm/s=santimetre/saniye.

Açık alan testinde dış alanda geçirilen süre bakımından gruplar arasında anlamlı farka rastlanmadı (H(2)=0,957 p=0,620, Kruskal Wallis, **Grafik 25**).

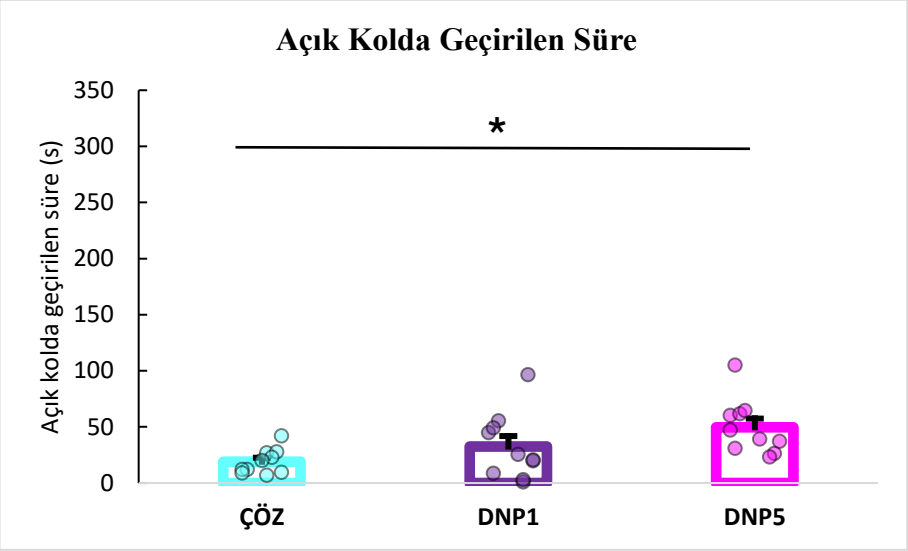


Grafik 25. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının açık alan testinde dış alanda geçirilen süre üzerine etkileri. H(2)=0,957 p=0,620. ÇÖZ: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+PBS, DNP1: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 1 mg/kg, DNP5: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 5 mg/kg. Tüm gruplar için n=10. s=saniye.

Açık alan testinde YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulanan grupların şahlanma sayılarında (H(2)=4,796; p=0,091; Kruskal Wallis) ve tımarlanma sürelerinde (H(2)=4,307; p=0,116; Kruskal Wallis) anlamlı fark yoktu. Keşfetme davranışının göstergesi olarak değerlendirilen dış alanda katedilen mesafe (H(2)=2,818; p=0,244; Kruskal Wallis), merkez alanda katedilen mesafe (H(2)=3,292; p=0,193; Kruskal Wallis) ve merkez alana giriş sayısı (H(2)=4,624; p=0,099; Kruskal Wallis) değişkenlerinde farklı dozlarda uygulanan DNP, gruplar arasında anlamlı fark oluşturmadı.

4.4.1.2. Yükseltilmiş Artı Labirenti Testi

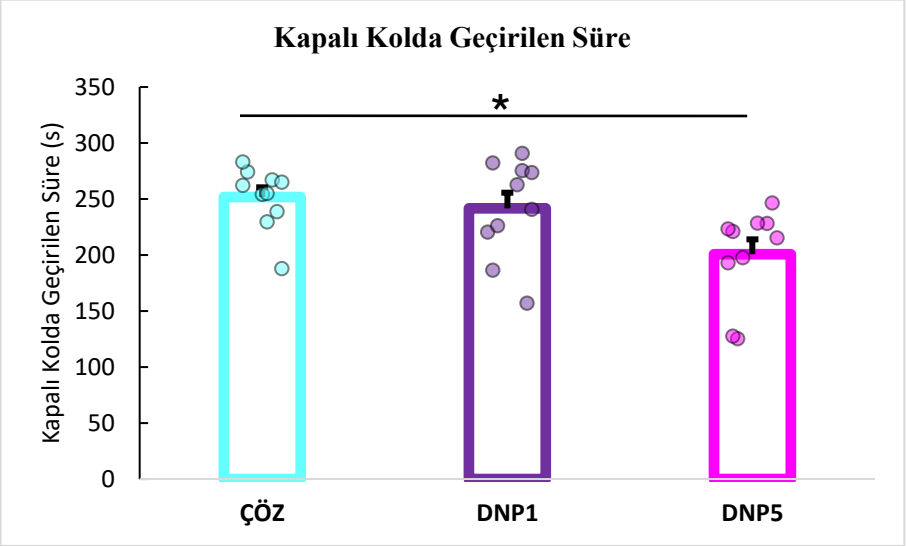
Yükseltilmiş artı labirentte YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulanan grupların açık kolda geçirdikleri süre karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark saptandı (Kruskal Wallis, p=0,013, **Grafik 26**). Nitekim *post-hoc* analizde, DNP5 grubunda açık kolda geçirilen süre ÇÖZ grubundan daha uzundu (DNP5: 49,6±7,7 s vs. ÇÖZ:19,0±3,5 s ; p<0,05 **Grafik 26, Resim 11**).



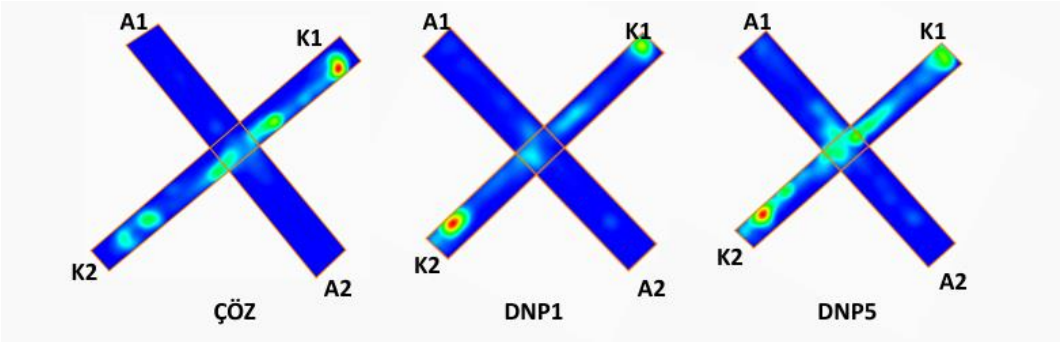
Grafik 26. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının yükseltilmiş artı labirentte açık kolda geçirilen süre üzerine etkisi. H(2)=8,764, p=0,013; *Post-hoc* Dunn's Test *p<0,05 DNP grubu ÇÖZ grubundan farklı. ÇÖZ: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+PBS, DNP1: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 1 mg/kg, DNP5: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 5 mg/kg. Tüm gruplar için n=10. s=saniye.

Yükseltilmiş artı labirentte kapalı kolda geçirilen süre bakımından gruplar arasında fark olduğu görüldü (Kruskal Wallis, p=0,015, **Grafik 27**). *Post-hoc* analizde, DNP5 grubunda kapalı kolda geçirilen sürenin ÇÖZ grubundan daha kısa

olduğu bulundu (DNP5: 200,7±13,2 s vs. ÇÖZ:251,7±8,6 s; p<0,05 **Grafik 27, Resim 11**).



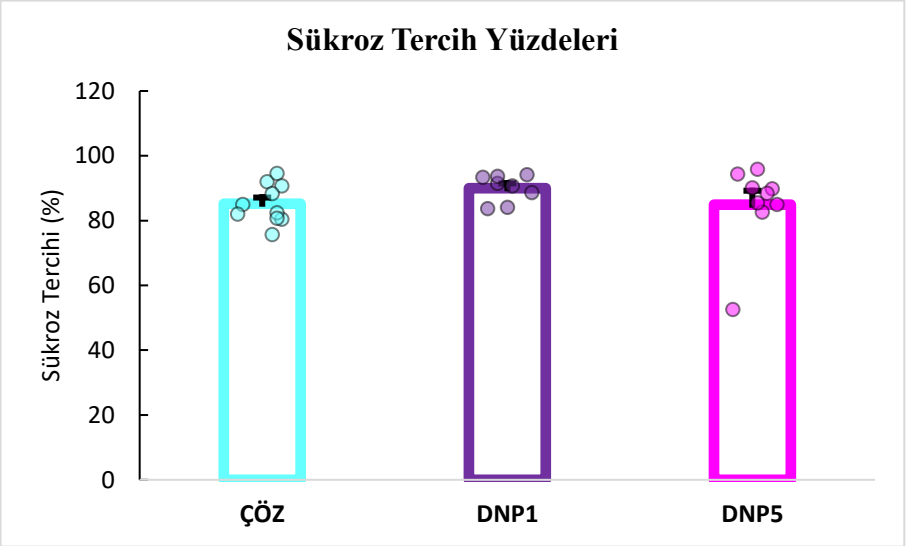
Grafik 27. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının yükseltilmiş artı labirentte kapalı kolda geçirilen süre üzerine etkileri. H(2)=8,462, p=0,015; *Post-hoc* Dunn's Test: *p<0,05 DNP5 grubu ÇÖZ grubundan farklı. ÇÖZ: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+PBS, DNP1: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 1 mg/kg, DNP5: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 5 mg/kg. Tüm gruplar için n=10. s=saniye.



Resim 11. Yükseltilmiş artı labirentinde YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının açık kolda ve kapalı kolda bulunma tercihine etkisinin ısı haritası ile gösterimi (A1 ve A2: Açık kol, K1 ve K2: Kapalı kol. Daha uzun süre geçirilen bölgeler Any-Maze aracılığıyla kırmızı sarı ve yeşil renklerle belirtilmiştir.)

4.4.1.3. Sükroz Tercih Testi

Sükroz tercih testinde YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulanmasının sükroz tercih yüzdeleri üzerine etkileri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark izlenmedi (H(2)=3,00, p=0,223, Kruskal Wallis, **Grafik 28**).

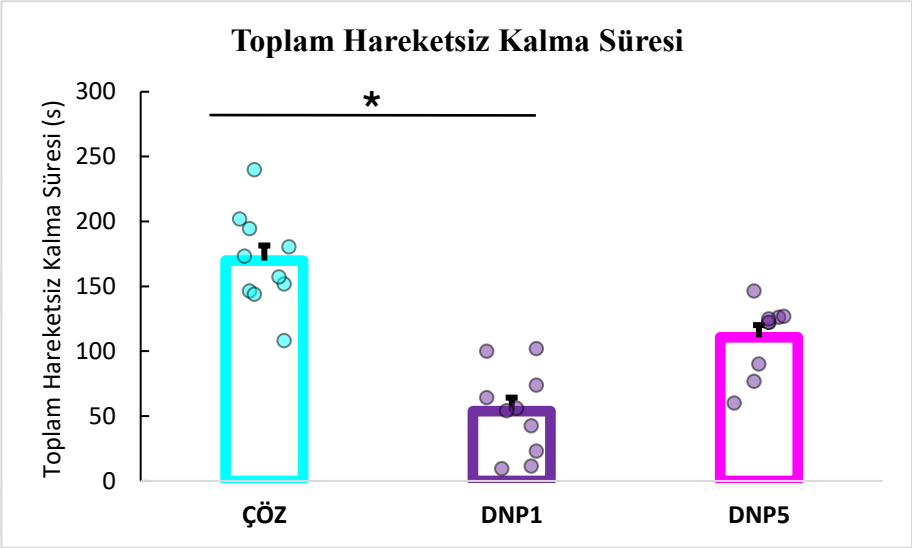


Grafik 28. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının sükroz tercih testinde değerlendirilen sükroz tercih yüzdeleri üzerine etkisi. H(2)=3,00, p=0,223. ÇÖZ: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+PBS n=10, DNP1: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 1 mg/kg n=8, DNP5: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 5 mg/kg n=9.

4.4.1.4. Zorunlu Yüzdürme Testi

Zorunlu yüzdürme testinde YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının toplam hareketsiz kalma süresi açısından gruplar arasında fark oluşturduğu bulundu (Kruskal Wallis, p<0,001,

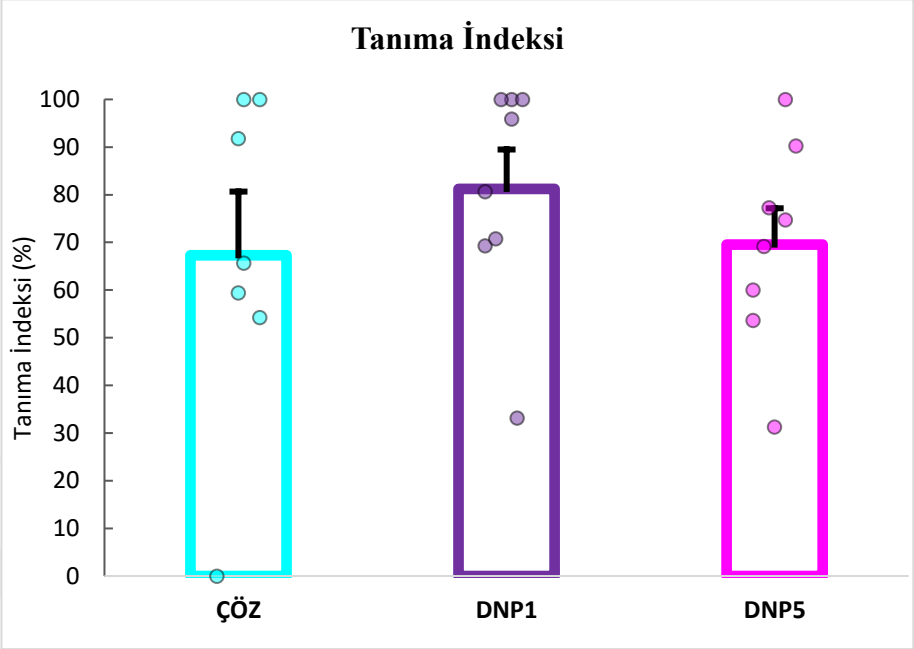
Grafik 29). *Post-hoc* analizde, DNP1 grubunun toplam hareketsiz kaldığı süre ÇÖZ grubundan anlamlı olarak daha düşük bulundu (DNP1:53,7±10,4 s vs. ÇÖZ: 169,8±11,6 s; p<0,001; **Grafik 29**)



Grafik 29. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının zorunlu yüzdürme testinde toplam hareketsiz kalma süresi üzerine etkisi. H(2)=21,123, p<0,001; *Post-hoc* Dunn's Test: *p<0,001 DNP1 grubu ÇÖZ grubundan farklı. ÇÖZ: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+PBS n=10, DNP1: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 1 mg/kg n=10, DNP5: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 5 mg/kg n=9. s=saniye.

4.4.1.5. Yeni Nesne Tanıma Testi

YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulaması, yeni nesne tanıma testinde değerlendirilen tanıma indeksleri bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark oluşturmadı (H(2)=1,821, p=0,402, Kruskal Wallis, **Grafik 30**).

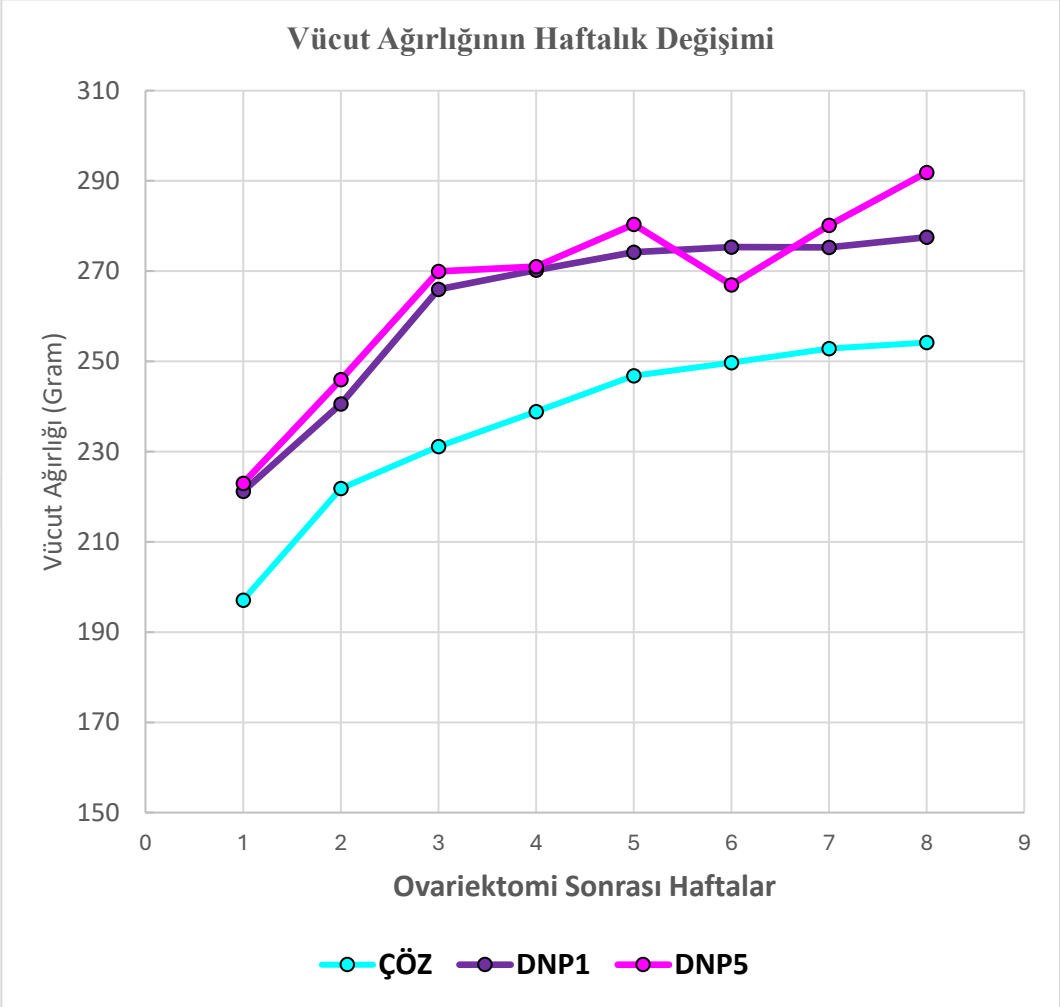


Grafik 30. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının yeni nesne tanıma testinde değerlendirilen tanıma indeksi üzerine etkisi. H(2)=1,821, p=0,402. ÇÖZ: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+PBS n=7, DNP1: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 1 mg/kg n=8, DNP5: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 5 mg/kg n=8.

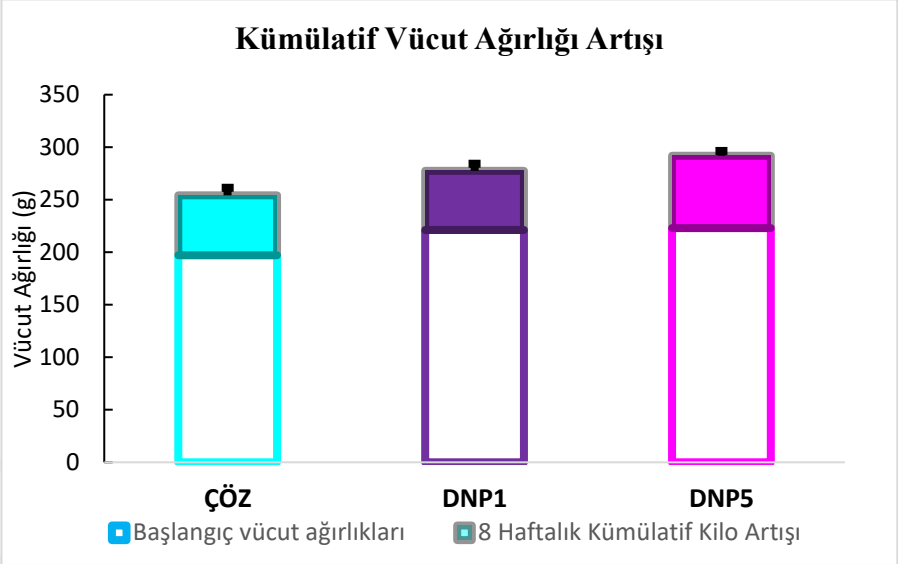
4.4.2. Vücut Ağırlığı, Adipoz Doku ve Enerji Alımı

4.4.2.1. Vücut Ağırlığı Artışı

YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulanan gruplar vücut ağırlığı değişimleri bakımından incelendiğinde vücut ağırlığı mutlak artışında anlamlı bir fark izlenmedi (Kruskal Wallis, p>0,05, **Grafik 31**). YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulanan grupların 8 hafta boyunca vücut ağırlığı ortalamalarının takip çizelgesi, **Şekil 4'**te sunulmaktadır.



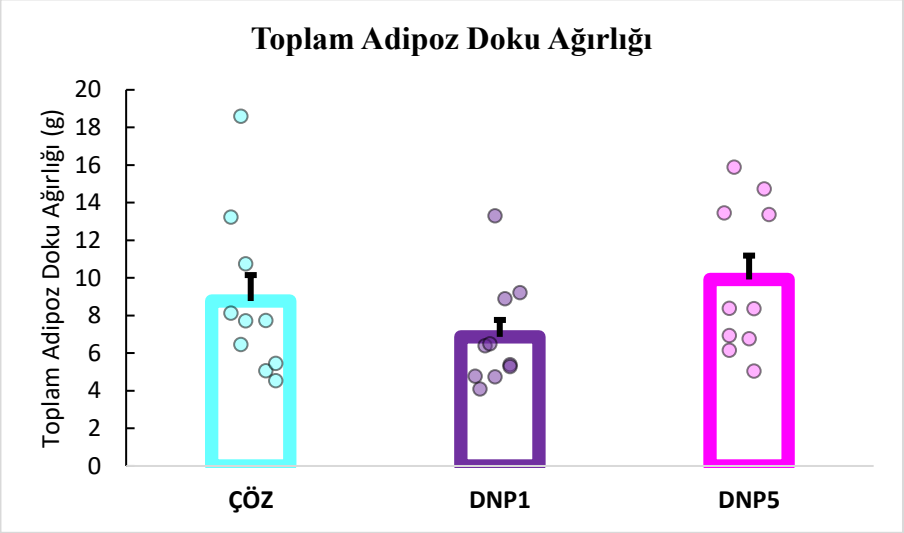
Şekil 4. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulanan grupların haftalık ortalama vücut ağırlığı takibi



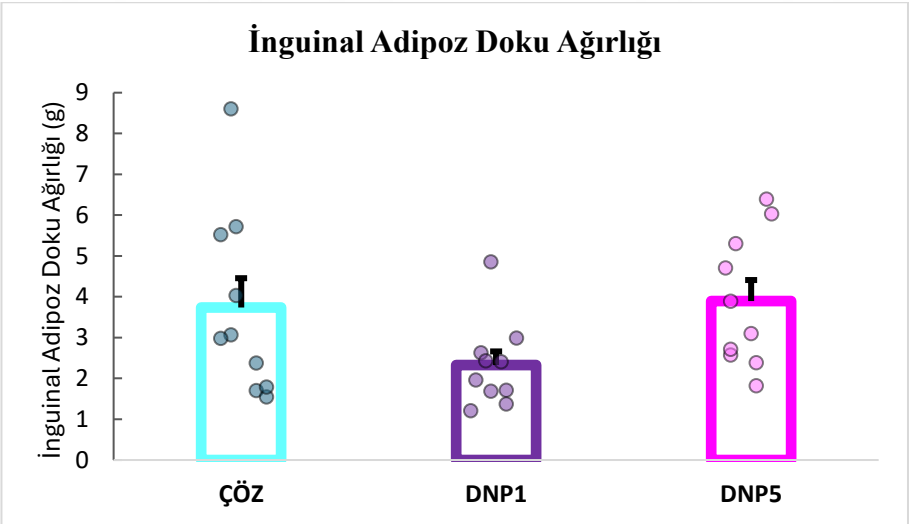
Grafik 31. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının kümülatif vücut ağırlığı değişimleri üzerine etkisi. Boş barlar, grupların başlangıç ağırlıklarını temsil etmektedir. H(2)=2,387, p=0,303. ÇÖZ: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+PBS, DNP1: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 1 mg/kg, DNP5: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 5 mg/kg. g: Gram. Tüm gruplar için n=10.

4.4.2.2. Adipoz Doku Ağırlıkları

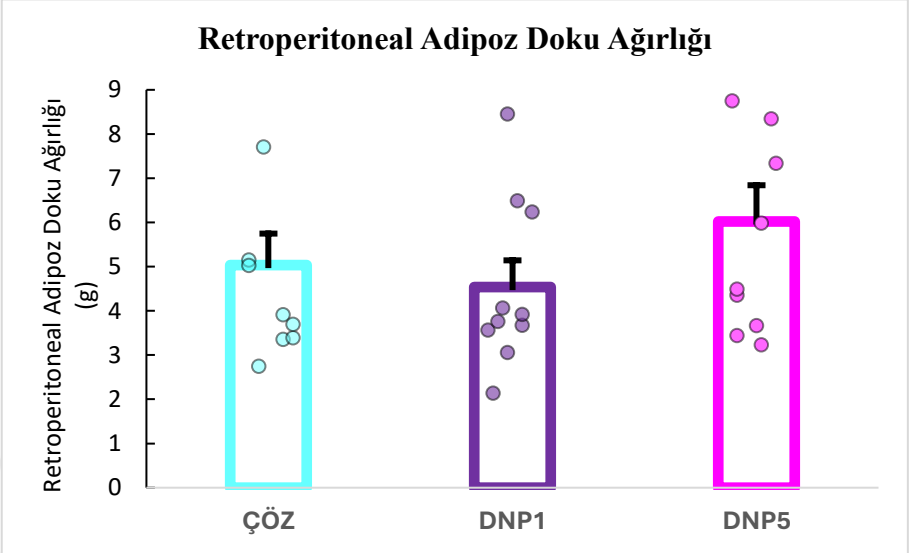
YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulanan gruplarda adipoz dokular karşılaştırıldığında, toplam adipoz doku ağırlığında, retroperitoneal adipoz doku ağırlığında ve inguinal adipoz dokularının ıslak ağırlıklarında gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı (Kruskal Wallis, p>0,05, **Grafik 32, Grafik 33 ve Grafik 34**).



Grafik 32. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının toplam adipoz doku ağırlığı üzerine etkisi. H(2)=3,933 p=0,140. ÇÖZ: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+PBS, DNP1: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 1 mg/kg, DNP5: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 5 mg/kg. g: Gram. Tüm gruplar için n=10.



Grafik 33. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının inguinal adipoz doku ağırlığı üzerine etkisi. H(2)=5,577, p=0,062 . ÇÖZ: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+PBS, DNP1: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 1 mg/kg, DNP5: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 5 mg/kg. g: Gram. Tüm gruplar için n=10.



Grafik 34. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının retroperitoneal adipoz doku ağırlığı üzerine etkisi. H(2)=1,520, p =0,468. ÇÖZ: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+PBS, DNP1: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 1 mg/kg, DNP5: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 5 mg/kg. g: Gram. Tüm gruplar için n=10.

4.4.2.3. Kümülatif Yem ve Enerji Tüketimi

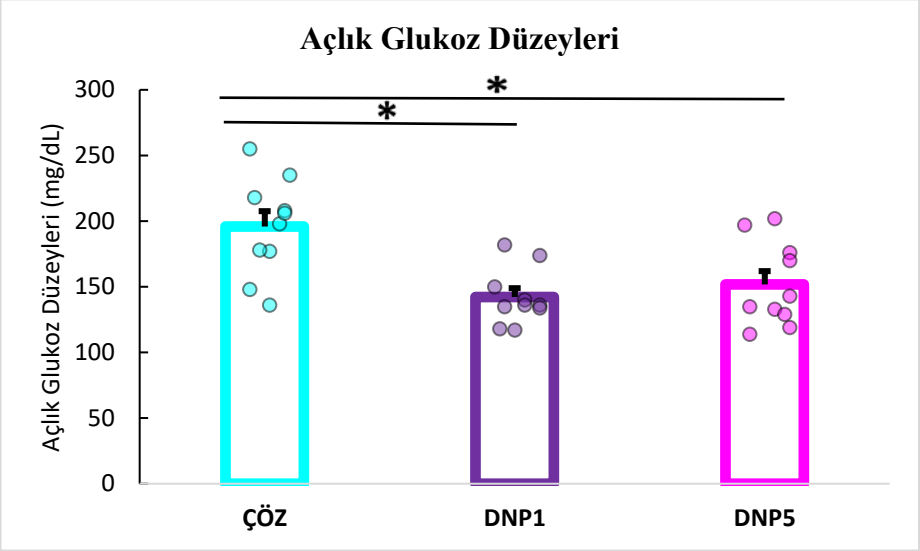
Sekiz hafta sonunda toplam yem tüketimi, ÇÖZ'e kıyasla DNP1'de %5,8, DNP5'te %11,5 daha yüksek bulundu (**Tablo 7**). Aynı dönemde toplam enerji alımı (MJ), ÇÖZ'e kıyasla DNP1'de %5,8, DNP5'te %11,5 daha yüksek olarak saptandı (**Tablo 7**). Yem verimliliği, ÇÖZ'e kıyasla DNP1'de %6,8 daha düşük, DNP5'te %8,3 daha yüksek olarak gözlendi (**Tablo 7**).

Tablo 7. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulanan gruplarda 8 haftalık deney süresi boyunca tüketilen kümülatif toplam yem ağırlığı (g), toplam enerji alımı (MJ) ve yem verimliliğine (g/MJ) ait tanımlayıcı veriler. g: Gram; MJ: Megajul. Veriler grup toplamı olarak raporlanmıştır.

Deney Grupları	Total Tüketilen Yem Ağırlığı (Gram)	Total Tüketilen Yem Enerjisi (Mjul)	Yem Verimliliği (g/Mj)
ÇÖZ	5647,5	124,245	4,59
DNP1	5974,9	131,447	4,28
DNP5	6296,8	138,529	4,97

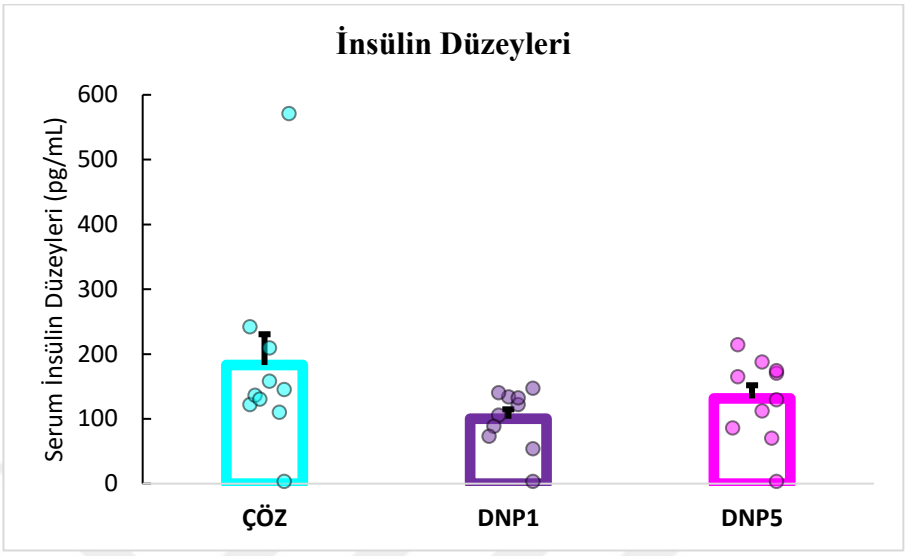
4.4.3. Metabolik Göstergeler: Glukoz İnsulin HOMA-IR Kolesterol HDL, non HDL, Leptin

YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulanan gruplarda açlık glukoz düzeyleri arasında anlamlı fark bulundu (Kruskal Wallis, p=0,004, **Grafik 35**). *Post-hoc* analizde, ÇÖZ grubunun açlık glukoz düzeyleri DNP1 ve DNP5 gruplarından anlamlı olarak daha yüksekti (ÇÖZ:195,9±11,7 mg/dL vs DNP1:142,2±6,7 mg/dL; DNP5:151,8±10,1 mg/dL p<0,05, **Grafik 35**).



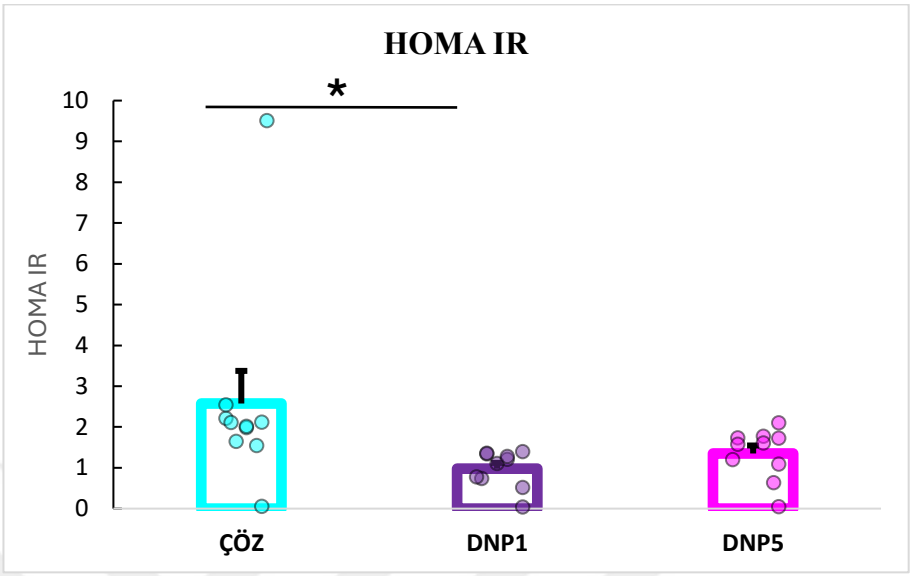
Grafik 35. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının açlık glukoz düzeyi üzerine etkisi. H(2)=11,270, p=0,004; *Post-hoc* Dunn's Test: *p<0,05 ÇÖZ grubu DNP1 ve DNP5 gruplarından farklı. ÇÖZ: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+PBS, DNP1: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 1 mg/kg, DNP5: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 5 mg/kg. Tüm gruplar için n=10.

YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulanan gruplarda insülin düzeyleri karşılaştırıldığında anlamlı fark görülmedi (H(2)=3,541, p =0,170, Kruskal Wallis, **Grafik 36**).



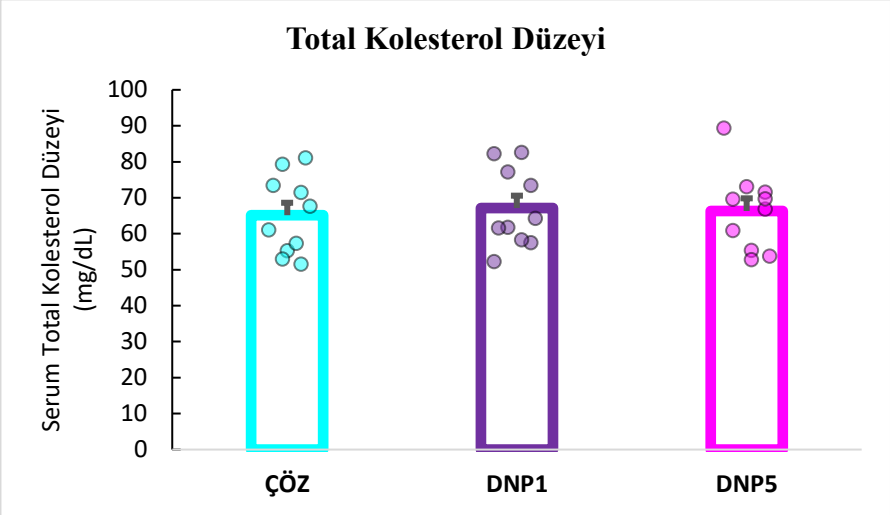
Grafik 36. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının serum insülin düzeyi üzerine etkisi. H(2)=3,541, p =0,170. ÇÖZ: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+PBS, DNP1: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 1 mg/kg, DNP5: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 5 mg/kg. Tüm gruplar için n=10.

YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulanan gruplarda HOMA-IR ölçümleri arasında anlamlı fark olduğu saptandı (Kruskal Wallis, p=0,003, **Grafik 37**). *Post-hoc* analizde, DNP1 grubunda ÇÖZ grubuna kıyasla HOMA-IR daha düşük olarak gözlendi. (ÇÖZ:2,5±0,7 vs DNP1:0,9±0,1 p<0,05, **Grafik 37**).



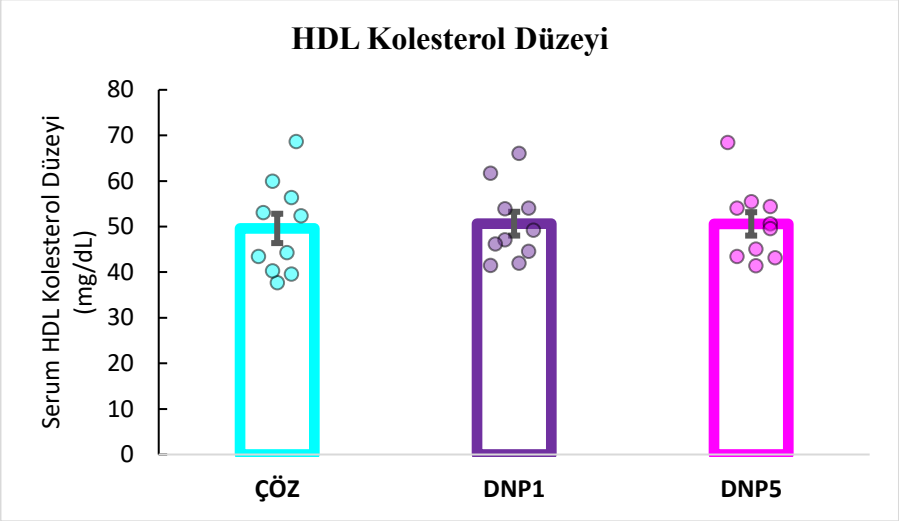
Grafik 37. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının Homa-IR değeri üzerine etkisi. H(2)=11,507, p=0,003; *Post-hoc* Dunn's Test: *p<0,05 ÇÖZ grubu DNP1 grubundan farklı. ÇÖZ: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+PBS, DNP1: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 1 mg/kg, DNP5: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 5 mg/kg. Tüm gruplar için n=10.

YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulanan gruplarda total kolesterol seviyeleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark görülmedi (H(2)=0,389, p =0,823, Kruskal Wallis; **Grafik 38**).



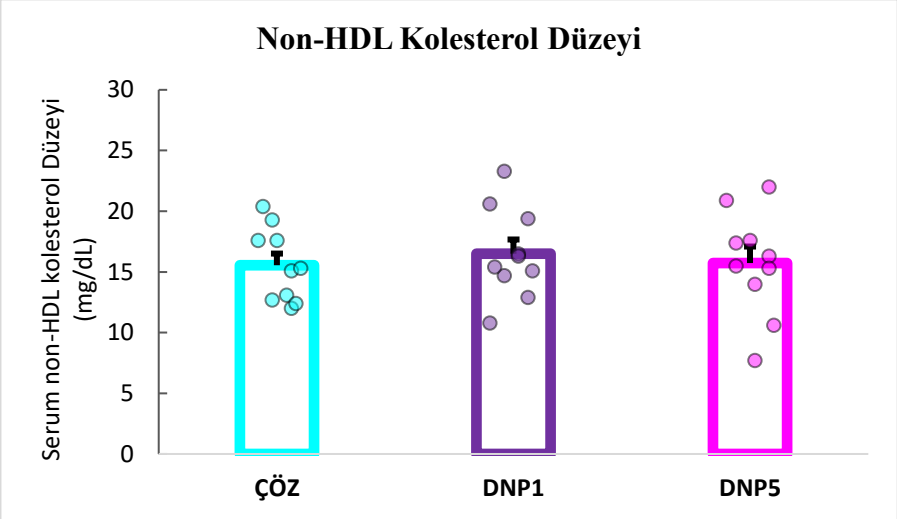
Grafik 38. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının serum total kolesterol düzeyi üzerine etkisi**.** H(2)=0,389, p =0,823. ÇÖZ: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+PBS, DNP1: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 1 mg/kg, DNP5: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 5 mg/kg. Tüm gruplar için n=10.

YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının HDL kolesterol seviyesi üzerine etkileri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu (H(2)= H(2)=0,304, p =0,859, Kruskal Wallis; **Grafik 39**).



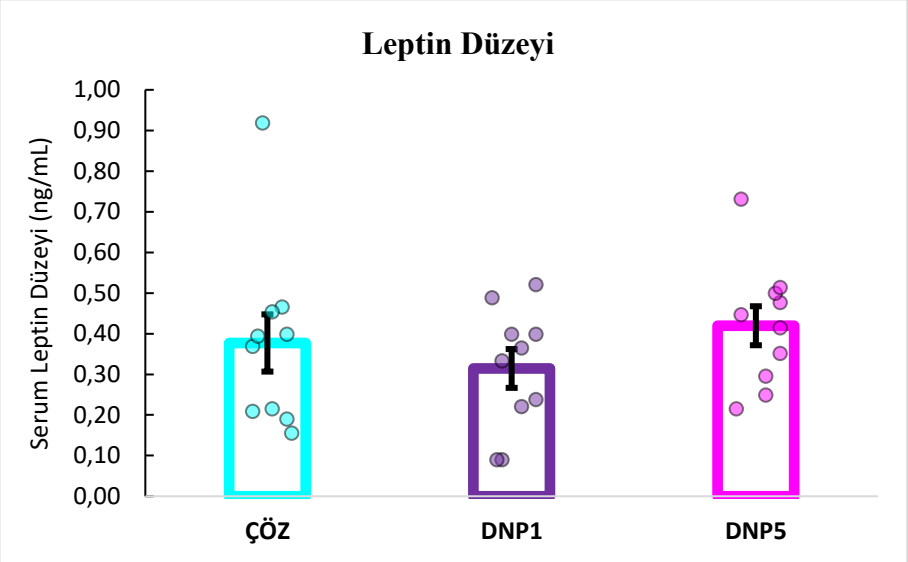
Grafik 39. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının serum HDL kolesterol düzeyleri üzerine etkisi**.** H(2)=0,304, p =0,859). ÇÖZ: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+PBS, DNP1: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 1 mg/kg, DNP5: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 5 mg/kg. Tüm gruplar için n=10.

YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulanan grupların Non-HDL kolesterol düzeyleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı (H(2)=0,359, p =0,836, Kruskal Wallis; **Grafik 40**).



Grafik 40. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının serum non-HDL kolesterol düzeyi üzerine etkisi**.** H(2)=0,359, p =0,836. ÇÖZ: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+PBS, DNP1: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 1 mg/kg, DNP5: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 5 mg/kg. Tüm gruplar için n=10.

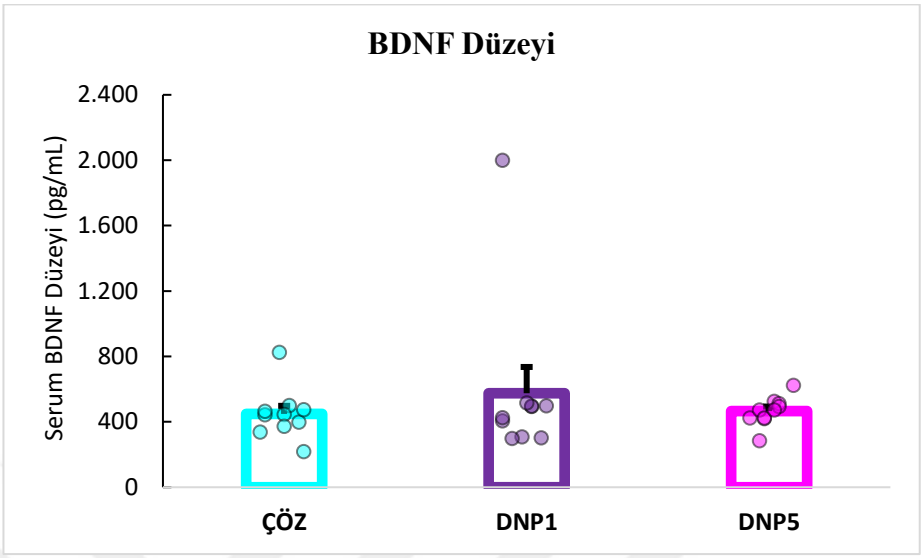
YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulanan gruplarda leptin düzeyleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı (H(2)=2,083, p =0,353, **Grafik 41**).



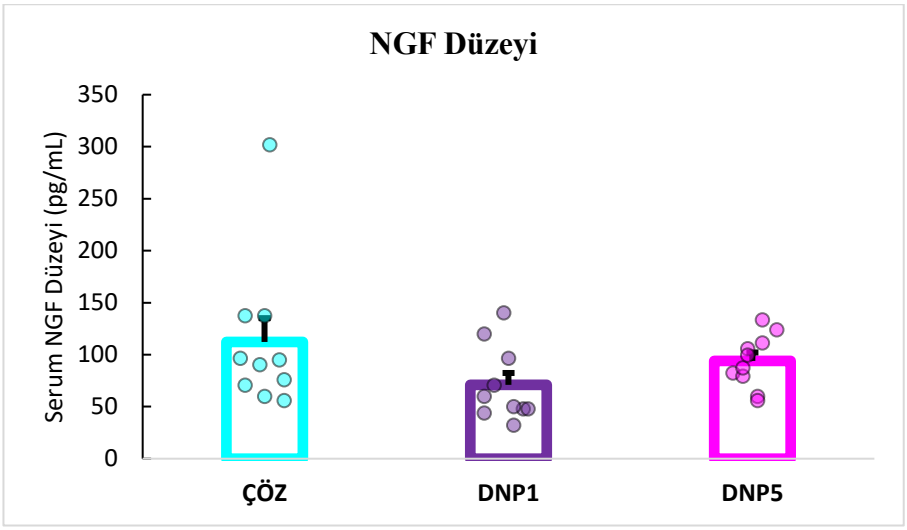
Grafik 41. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının serum leptin düzeyi üzerine etkisi . H(2)=2,083, p =0,353. ÇÖZ: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+PBS, DNP1: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 1 mg/kg, DNP5: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 5 mg/kg. Tüm gruplar için n=10.

4.4.4. Nörotrofik Faktörler

YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının serum BDNF ve NGF düzeyleri üzerine etkileri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı (**Grafik 42** ve **Grafik 43**).



Grafik 42. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının serum BDNF düzeyi üzerine etkisi**.** H(2)=0,661, p =0,719. ÇÖZ: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+PBS, DNP1: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 1 mg/kg, DNP5: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 5 mg/kg. Tüm gruplar için n=10.



Grafik 43. YYD ile beslenen ovariektomili sıçanlarda çözücü veya iki farklı dozda DNP uygulamasının serum NGF düzeyi üzerine etkisi. H(2)=4,287, p =0,117. ÇÖZ: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+PBS, DNP1: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 1 mg/kg, DNP5: Ovariektomi+ Yüksek Yağlı Diyet+DNP 5 mg/kg. Tüm gruplar için n=10.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında ovariektominin doğrulanması amacıyla uterus ıslak ağırlıkları ölçülmüştür. Uterus ıslak ağırlığı ovariektomi uygulanan gruplarda SHAM grubuna kıyasla belirgin şekilde azalmıştır**.** Ovariektomi ile uterus ıslak ağırlığının azalması, dolaşımdaki östrojen yoksunluğunun hızlı ve duyarlı bir biyobelirteci olarak uzun süredir kabul görmektedir (215). Kitajima ve arkadaşları (2015), ovariektominin uterus ağırlığını anlamlı biçimde azalttığını ve 17β-östradiol replasmanının bu düşüşü kısmen geri çevirdiğini göstermiştir (216). Östrojen varlığında uterus epitel hücreleri ESR1 aracılığıyla, İnsülin-benzeri Büyüme Faktörü-1 **(***Insulin-like Growth Factor-1,*IGF-1**)** gibi faktörleri indükleyerek uterus proliferasyonunu gerçekleştirmektedir (217,218). Bu tez çalışmasında OVX uygulanan gruplarda uterus ıslak ağırlıklarının SHAM grubuna kıyasla anlamlı düzeyde düşmesi, cerrahinin başarıyla uygulandığını doğrulamakta ve **modelin beklenen hipoöstrojenik fenotipi oluşturduğunu** desteklemektedir.

Lokomotor aktivite ve anksiyete benzeri davranışlar

Araştırmamızda lokomotor aktivite ve anksiyete benzeri davranışlar, açık alan testi ve yükseltilmiş artı labirent testi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen açık alan testi bulgularına göre, ovariektomi ve/veya yüksek yağlı diyetin etkilerinin araştırıldığı gruplar arasında lokomotor aktivite ve keşfetme davranışında anlamlı bir fark görülmemiştir. Literatürde ovariektominin lokomotor aktiviteyi karanlık fazda azalttığı, aydınlık fazda lokomotor aktivite değişikliği olmadığı bildirilmiştir (219). Bir diğer çalışmada ovariektomi sonrası hem genç hem orta yaşlı farelerde sham grubuna kıyasla gönüllü tekerlek koşusunda (*Wheel running*) anlamlı azalma

bulunmuştur (220). Bununla birlikte, östradiol tedavisinin ovariektomili sıçanlarda açık alan testinde lokomotor aktiviteyi değiştirmediğini gösteren bir çalışma da vardır (221). Farelerde yapılan diğer deneysel egzersiz modellerinden farklı olarak tekerlek koşusunun, ek bir dış uyaran veya zorlama gerektirmeyen gönüllü bir aktivite olduğu göz önünde bulundurulmalıdır (220). Buradan yola çıkarak, motive edilmiş ve motive edilmemiş davranışlar arasında da farklılıklar bulunabileceği, östrojeninin lokomotor aktiviteler üzerine değişkenlik gösteren etkilerinin bu gibi faktörlere bağlı olabileceği belirtilmiştir (221). Araştırmamızda, lokomotor aktivite değişikliği olmaması, ovariektomi etkilerinin, ölçülen lokomotor aktivite türüne özgü (ev kafesinde koşu tekerleği aktivitesi veya açık alanda koşu aktivitesi gibi) olmasıyla açıklanabilir (222). Ayrıca, lokomotor aktivitedeki artış ve/veya azalışın diğer davranış testlerinin sonuçlarını değiştirebileceği de akılda tutulmalıdır.

Çalışmamızda yüksek yağlı diyetin tek başına uygulandığı "YYD" grubunda, açık alan testinde, istatistiksel anlamlılık olmasa da dış alanda geçirilen sürenin azalma eğiliminde olduğu görülmektedir. Ayrıca yükseltilmiş artı labirentte de yüksek yağlı diyetin tek başına, kapalı kolda geçirilen süreyi azalttığı görülmüştür. Bu veriler birbirini destekler nitelikte olup, araştırmamızda yüksek yağlı diyetin anksiyete azaltıcı bir etki gösterme potansiyelinin bulunduğu söylenebilir. Literatürde yüksek yağlı diyetin anksiyete üzerine etkilerine ilişkin çelişkili bulgular yer almaktadır. Örneğin, yüksek yağlı diyet uygulamalarının anksiyete benzeri davranışları artırdığı yönünde çalışmalar da mevcuttur (223,224). Bununla birlikte 4 hafta boyunca yüksek yağlı diyet uygulanmasının anksiyolitik etki gösterdiği, bu etkinin 12 haftalık uygulama ile kaybolduğu, uygulama süresine

bağlı olarak etkisinin değişebileceği de gösterilmiştir (225). Fareler üzerinde yapılan bir başka çalışmada da kalorinin %60 oranında yağdan sağlandığı 4 haftalık bir diyet rejiminin anksiyolitik etkide bulunduğu ve bu durumun medial prefrontal kortekste BDNF artışıyla ilgili olduğu öne sürülmüştür (226). Bir başka çalışmada ise, farelerde 7 haftalık yüksek yağlı diyet rejiminin anksiyeteyi anlamlı ölçüde değiştirmediği belirtilmiştir (227). Araştırmalar yüksek yağlı diyetin anksiyete benzeri davranış üzerine heterojen etkilerini bildirmektedir. Bu tez çalışması 8 haftalık yüksek yağlı diyet uygulamasının, anksiyete benzeri davranışı azaltabileceği ihtimalini göstermektedir. Bulgularımıza benzer şekilde Dornellas ve arkadaşları (2018), ovariektomili sıçanlarda kalorinin %45 oranında yüksek yağlı diyetle sağlandığı 8 haftalık bir yüksek yağlı diyet çalışmasında, ovariektominin anksiyeteyi artırdığını, ancak hem domuz yağı hem de balık yağı ile beslenen gruplarda anksiyete artışının tersine döndüğünü göstermiştir (228). Ayrıca yüksek yağlı diyetin anksiyolitik etkisinin ovariektomi varlığında kaybolması da önemli bir bulgudur. Benzer şekilde bizim araştırmamızda da OVX+YYD varlığında yükseltilmiş artı labirent testinde anksiyetede görülen fark ortadan kalkmıştır. Bu durumda yüksek yağlı diyet ve ovariektominin, anksiyete yönünden birbirini dengelediği/nötr hale getirdiği düşünülebilir. Diğer bir deyişle, YYD anksiyolitik etkide bulunmuş ancak ovariektominin etkisi nedeniyle YYD+OVX birlikteliğinde bu etki ortadan kaybolmuş olabilir. Nitekim literatürde menopozun anksiyojenik etkisi olduğu bildirilmiştir (229). Bu bulgumuz yukarıda bahsedilen, Dornellas ve arkadaşlarının (2018) ovariektomi ile oluşan anksiyete davranışının, yüksek yağlı diyet ile ortadan kalktığını bildirdikleri çalışma sonuçlarıyla da uyumlu

görünmektedir (228). Nitekim bu tez çalışmasında diyetin yağ kaynağı hayvansal değil, bitkisel içerikli olmasına rağmen benzer bir azalma gözlenmiştir.

Sonuç olarak çalışmamız, 8 hafta boyunca kalorinin %60 oranında bitkisel içerikli yüksek yağlı diyetten sağlanması ile anksiyete benzeri davranışların azaldığını, YYD+OVX birlikteliğinde bu etkinin görülmediğini göstermektedir. **Bilgimiz dahilinde daha önce, bitkisel yağ ile ovariektomi birlikteliği, anksiyete yönüyle ele alınmamış olup, çelişkili bulguların yer aldığı bu zeminde araştırma sonuçlarımız literatüre önemli bir katkı sunmaktadır.**

Çalışmamızda DNP'nin rolü sadece OVX+YYD birlikteliğinde değerlendirilmiştir. Bunun temel nedeni, çalışmanın ana hipotezinin östrojen yoksunluğu ve diyet kaynaklı metabolik stresin birlikte etkisi sonucu, metabolik ve nörodavranışsal bozuklukların yoğun olarak ortaya çıkmasına yönelik kurulmuş olmasıdır. Dolayısıyla, DNP'nin potansiyel terapötik etkisinin 'yalnızca stresin ve metabolik yükün maksimum olduğu koşulda' test edilmesi amaçlanmıştır. Bu yaklaşım, hem farmakolojik etkinin tavan patolojide gözlenebilmesini sağlamakta hem de klinik karşılığını (postmenopozal obez/insülin dirençli bireyler) daha gerçekçi biçimde yansıtmaktadır. Ayrıca DNP'nin daha hafif fenotiplerde (örneğin yalnızca OVX veya yalnızca YYD) etkin olup olmadığı bu çalışmanın kapsamı dışında bırakılmış, odak nokta **"yüksek riskli modelde mitokondriyal eşleşme bozucu müdahalesi"** olarak belirlenmiştir. Enjeksiyon prosedürünün ve PBS çözücüsünün tek başına etkisini değerlendirmek amacıyla OVX+HFD grubu ile OVX+HFD+PBS grubu ayrıca karşılaştırılmış ve anlamlı bir fark saptanmaması

üzerine, DNP uygulamasının etkileri yalnızca PBS enjeksiyonu yapılan grup referans alınarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda 1 mg/kg ve 5 mg/kg DNP uygulaması açık alan testinde lokomotor aktivite ve keşfetme davranışı üzerine anlamlı fark oluşturmadı. DNP'nin subletal dozlarda kilo kaybı amaçlı kullanımında kullanıcı yorumlarının yer aldığı dijital platformlarda en çok bildirilen toksik etkisi yorgunluktur (230). Açık alan testinde lokomotor aktivitenin korunmuş olması, 1 mg/kg ve 5 mg/kg dozlarında belirgin yorgunluk ve performans düşüşünün bulunmadığına işaret etmektedir. DNP ile lokomotor aktivitede düşüş gözlenen çalışmalarda, bu etkinin doz-bağımlı olarak oluşan hipermetabolik tablonun bir parçası olduğu ifade edilmektedir (231). Buradan yola çıkarak, **çalışmamızda gözlenen lokomotor aktivitenin korunması, seçilen dozun tolerabilitesine ek bir kanıt** olarak düşünülebilir.

Çalışmamızda, OVX+YYD grubunda anksiyetede bir artış olmamakla birlikte, 1 mg/kg ve 5 mg/kg DNP uygulamasının çözücü grubuna kıyasla yükseltilmiş artı labirentinde anksiyete benzeri davranışı azalttığını gözlemledik. Literatürde DNP'nin araştırmamıza benzer bir tasarımla anksiyete üzerine etkilerini inceleyen bir çalışma bilgimiz dahilinde bulunmamaktadır. Mekanizma üzerinden yola çıktığımızda, DNP ile akut eşleşme bozulması ATP üretimini geçici olarak azaltırken, kronik/tekrarlayan düşük şiddetli eşleşme bozulması mitokondri sayısını (biyogenez) ve uzun dönem ATP kapasitesini artırabilir; bu durum sinaptik verimlilik ve stres direnci üzerinde koruyucu etki yaratır (232). Ovariektominin tetiklediği oksidatif/inflamatuvar stres bağlamında,

DNP ile oluşturulan hafif düzeyde eşleşme bozulması, ROS'u baskılayıp nöronal enerji esnekliğini artırarak anksiyolitik fenotipe katkıda bulunabilir (232). Nitekim bulgularımızla uyumlu olarak, vücudumuzda doğal olarak bulunan eşleşme bozucu proteinleri kodlayan *Ucp-2* geni silinmiş (*knockout*) farelerin, yabanıl (*wildtype*) farelere kıyasla yükseltilmiş artı labirentte artmış anksiyete benzeri davranış sergilediği bildirilmiştir (233). UCP-2, DNP'ye benzer şekilde iç mitokondriyal zarda proton sızıntısı ile oksidatif fosforilasyonu birbirinden ayırarak eşleşmeyi bozmaktadır. Ayrıca mikroglianın anormal aktivitesinin, çeşitli nöropsikiyatrik hastalıklar, depresyon ve anksiyetenin gelişimi ile ilişkilendirilmesinden yola çıkarak tasarlanan bir başka çalışma, mikroglialardaki UCP-2'nin davranışsal süreçlere etkisini incelemiştir (234-236). Çalışmada, mikrogliada *Ucp-2*'nin seçici olarak silindiği MGKO (*microglia-specific Ucp2 knockout*) erkek farelerin kontrol hayvanlarıyla karşılaştırıldığında daha yüksek kaygı seviyeleri gösterdiği bildirilmiştir. İlginç bir şekilde bu çalışmada dişi farelerde bu etki görülmemiştir (236). Buradan yola çıkarak, bu tez çalışması ile uyumlu şekilde **östrojenin mitokondriyal süreçler aracılığı ile anksiyete benzeri davranışta koruyucu etkilere sahip olabileceği düşünülebilir. DNP'nin de mitokondriyal eşleşme bozulması aracılığıyla anksiyete benzeri davranışı iyileştirebileceği** hipotezi öne sürülebilir.

UCP'lerin anksiyete üzerine etkileri, anksiyolitik etki mekanizmaları ile UCP etki mekanizmalarının benzerliğinden yola çıkarak da ortaya konabilir. Örneğin, UCP-2'nin mitokondriyal dinamiklerin dengesi üzerine etkileri literatürde iyi tanımlanmıştır (237). Yapılan bir çalışmada, erken dönemde yavru farelerin,

tekrarlanan şekilde, annelerinden kısa süreli ayrılıp *(Early Handling*) tekrar kafese alınmasının, mitokondriyal dinamiklerin (DRP-1, OPA-1) düzenlenmesi aracılığıyla, yetişkinlikte yüksek kaygılı farelerde *(HAB line)* anksiyolitik etki gösterdiği bildirilmiştir (238).

Bir başka açıdan literatür ele alındığında, doksorubisinin (2 mg/kg, i.p.) yetişkin sıçanlarda mekansal öğrenme/belleği bozduğu ve mitokondrilerinde UCP-2 protein içeriğini azalttığı bildirilmiş ve bu etkilerin her ikisinin de fiziksel aktivite ile önlendiği ifade edilmiştir (239). Egzersizle (1 hafta koşu tekerleği) tetiklenen UCP-2 artışı, sıçanlarda hipokampus BDNF artışıyla ilişkili olarak gösterilmiştir (240). Bir başka çalışmada doksorubisin kaynaklı bilişsel bozukluğa karşı rosuvastatinin nöroprotektif etki gösterdiği bildirilmiştir (241). Rosuvastatin, sıçanlarda ovariektomi ile indüklenen anksiyete benzeri davranışı da önlemiştir (242). Rosuvastatinin kardiyomiyositler üzerine iskemi/reperfüzyon hasarında koruyucu etkilerinin UCP-2 upregülasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (243). Doksorubisinin UCP-2'yi azaltarak nörodavranışsal bozukluklara yol açması ve rosuvastatinin kardiyomiyositler üzerine iskemi/reperfüzyon hasarında koruyucu etkilerinin UCP-2 upregülasyonu ile ilişkili olduğunun gösterilmesi birlikte ele alındığında, rosuvastatinin de anksiyete üzerine koruyucu etkilerinin hafif düzeyde mitokondriyal eşleşme bozulması aracılığı ile ortaya çıkabileceği düşünülebilir.

Her ne kadar farmakolojik bir ajan olarak 2,4-Dinitrofenolün direkt anksiyete benzeri davranış üzerine etkilerini ele alan bir çalışmaya rastlamasak da, UCP-2 nin anksiyete üzerine etkileri ve doksorubisin gibi farklı bir farmakolojik

ajanın da UCP-2 üzerinden benzer etki mekanizmasına sahip olabileceğine yönelik önemli veriler bulgularımızı destekler niteliktedir.

Depresyon benzeri davranışlar

Araştırmamızda depresyon benzeri davranışlar, sükroz tercih testi ve zorunlu yüzdürme testi ile değerlendirilmiştir. Sükroz tercih testinde, ovariektomi ve/veya yüksek yağlı diyet uygulanan gruplar arasında fark gözlenmemiş, bununla birlikte zorunlu yüzdürme testinde OVX+YYD birlikteliğinin immobiliteyi (depresyon benzeri davranışı) anlamlı olarak artırdığı gösterilmiştir**.** Bu bulgumuz, menopoz ve yüksek yağlı diyetin birlikte depresyon benzeri davranışı kuvvetle pekiştirdiğini gösteren çalışmalarla uyumludur ve özellikle hayvansal doymuş yağlarla yürütülen modellerde sükroz tercih testi ve zorunlu yüzdürme testinde benzer artışlar bildirilmiştir (244). Klinik veriler de menopozun depresyon ve/veya anksiyete için bir risk faktörü olabileceğini desteklemektedir (40). Benzer şekilde, yüksek yağlı diyet tüketiminin tek başına depresyon benzeri davranış oluşturduğuna yönelik araştırmalar mevcuttur (245,194). Buna karşın, çalışmamızda OVX ya da YYD grupları tek başına doğrudan istatistiksel anlamlı olarak depresyon benzeri davranış oluşturmamıştır. Ovariektominin tek başına depresyon benzeri davranış oluşturduğuna yönelik çalışmalar olsa da, bir yönüyle bu durum literatürdeki preklinik postmenopozal depresyon çalışmalarında, ovariektomi etkilerinin sıklıkla kronik öngörülemeyen hafif stres modeli ile eşleştirilerek davranışsal yanıtın güçlendirildiği raporlarla bağdaşmaktadır (246). Ayrıca bir çalışmada yine bu tez çalışmasına benzer şekilde, depresyon benzeri davranış, ovariektomi ve kronik öngörülemeyen hafif stres modelinin

birlikteliğinde gözlemlenmiş, tek başına ovariektomi ise depresyon benzeri davranış oluşturmakta yetersiz kalmıştır (247).

Literatürde yüksek yağlı diyetin depresyon benzeri davranış geliştirme potansiyeline yönelik çalışmalar, sıklıkla hayvansal yağ kullanılarak tasarlanmıştır. Bir çalışmada, 12 hafta boyunca palm yağı ile beslenen deney grubunda kontrol grubuna göre toplam hareketsiz kalma süresinin arttığı gösterilmiştir (248). Fareler ile yapılan bir çalışmada ise bu etki 4 haftalık bitkisel kaynaklı yüksek yağlı diyetle gözlenmiştir (249). Araştırmamızda, 8 hafta uygulanan bitkisel kaynaklı yüksek yağlı diyet zorunlu yüzdürme testinde tek başına depresyon geliştirmezken; OVX+YYD birlikteliği depresyon benzeri davranışa neden oldu. Literatür ve bulgularımız birlikte ele alındığında yüksek yağlı diyetin depresyon üzerine etkilerinin, diyet kompozisyonu, maruziyet süresi, yaş/cinsiyet/tür/soy gibi faktörlerle belirgin şekilde değişkenlik gösterdiği; bu bağlamda protokol tasarımının (diyet türü, süre, yaş/cinsiyet ve tür/soy seçimi) sonuçların yorumlanmasında kritik belirleyici olduğu sonucuna varılabilir.

Diğer yandan, **çalışmamızda sıçanlarda hareketsiz kalınan süre artışının sadece OVX+YYD birlikteliğinde görülmesi, depresyon ve metabolizma arasındaki ilişkiye dikkat çekmektedir**. Bu etki, modelimizde depresyon benzeri fenotipin metabolik durumdan bağımsız düşünülemeyeceğini ve ovariektomiyle oluşturduğu yeni bir nöroendokrin zeminin, yüksek yağlı diyetin yarattığı stresle birleştiğinde davranış düzeyinde eşiği aşan bir etki yarattığını düşündürmektedir. Ayrıca **hem YYD hem de OVX+YYD gruplarımızda total yağlanma ve kilo artışı olmasına karşın; OVX+YYD grubunda, tek başına YYD grubuna**

kıyasla da depresyon benzeri davranış gelişmiş olması önemli bir bulgudur ve bu veriler ileride tekrar ele alınacaktır.

Çalışmamızda zorunlu yüzdürme testinde, OVX+YYD grubunda depresyon benzeri davranış izlenirken, sükroz tercih testinde benzer sonuçlar elde edilmemiştir. Bu testlerden birinde ödül arayışı (*reward seeking behavior*) değerlendirilirken diğerinde ise stres dayanıklılığı (*stress-resilience*) değerlendirilir (250,251). **Menopoz ve yüksek yağlı diyetin, depresyon bileşenleri arasında farklı etki oluşturması çalışmamızın önemli bir bulgusudur.** Bu bileşenlerin ayrı değerlendirebileceği yönünde çalışmalar literatürde daha önce bildirilmiştir (252). Majör depresyonun göründüğünden çok daha fazla çeşitlilik gösterdiği bilgisi günümüzün tartışılan konularından birisidir (253). Özellikle tedaviye dirençli depresyon yönünden bu doğrultuda detaylı incelemeler gerçekleştirilmektedir (254).

Bunun yanı sıra, beğenme, isteme ve ödülle ilgili karar vermeyle bağlantılı olarak anhedoninin farklı alt tipleri olduğu ve her biri belirli, ancak birbiriyle bağlantılı nörobiyolojik süreçler tarafından yönetildiği bilinmektedir (255). Bu bakımdan sükroz tercihi testi, görünüşte istemekten (motivasyonel anhedoni) ziyade beğenmenin (tüketimsel anhedoni) bir ölçüsü olarak değerlendirilmektedir. Bu nedenle bir anhedoni alt tipindeki eksikliğin genel bir eksikliği tamamen yansıtması gerektiğini varsaymak doğru olmayabilir (97). Bu açıdan, anhedoni davranışını daha detaylı değerlendirmek için sükroz tercih testinin yanı sıra ödül duyarlılığı için edimsel koşullanma paradigması gibi testlere başvurulabilir.

Sonuç olarak bulgularımız, ilk yönüyle depresyon biyolojisinin çok-bileşenli doğasına işaret etmekte, menopozda metabolik durumun davranışsal çıktılar üzerinde belirleyici olabileceğini göstermektedir. İkinci yönüyle ise sükroz tercihi testinde fark saptanmamasına karşın zorunlu yüzdürme testinde immobilitenin yalnızca OVX+YYD grubunda artması, depresif fenotipin alt bileşenler düzeyinde değerlendirilebileceğine, özellikle preklinik araştırmalarda tek bir test sonucunun depresyon ile ilişkili durumu temsil etmeyebileceğine dikkat çekmektedir.

Depresyon benzeri davranış üzerine DNP'nin etkisi bilgimiz dahilinde daha önce literatürde araştırılmamıştır. Bu yönü ile **çalışmamız DNP'nin depresyon benzeri davranışlar üzerine etkilerini araştıran ilk çalışmadır**. Araştırmamızda OVX+YYD birlikteliği sükroz tercih testinde bir fark yaratmamış, DNP de ÇÖZ grubuna kıyasla bir değişikliğe neden olmamıştır. Ancak, **zorunlu yüzdürme testinde OVX+YYD birlikteliğinin oluşturduğu depresyon benzeri davranışı DNP'nin 1 mg/kg dozunda iyileştirdiği, yüksek dozda ise bu etkinin kaybolduğu bulunmuştur.**

Literatürü incelediğimizde, kronik hafif stres modelinin *Ucp-2* geni silinmiş farelerde daha şiddetli depresyon oluşturduğu bulunmuştur (256). Başka bir çalışmada, UCP-2'nin astrositlerdeki inflamasyon yanıtlarını düzenlediği ve depresyon patogenezinde önemli bir rol oynadığı gösterilerek, UCP-2'nin depresyon için umut vadeden bir terapötik hedef olduğu vurgulanmıştır (257).

Depresyon patogenezine yönelik, monoamin nörotransmitter eksikliği, hipotalamus-hipofiz-adrenal eksen düzensizliği, mikrobiyom-beyin-bağırsak

ekseni anormalliği ve inflamatuvar aşırı aktivasyon dahil olmak üzere birden fazla mekanizma önerilmiştir. Bununla birlikte, mitokondriyal işlev bozukluğunun depresyonun nedenlerinden biri olduğu kavramı da, hücre kültürleri, hayvan modelleri ve klinik araştırmalar alanında yapılan çok çeşitli çalışmalarla desteklenmektedir (258). Güncel bir derleme, postmenopozal depresyonda, östrojen kaybını nöropsikiyatrik semptomlarla ilişkilendirilmekte; merkezi mekanizma olarak bozulmuş oksidatif fosforilasyon, kalsiyum dengesizliği, redoks stresi ve kusurlu mitofaji ve mitokondriyal dinamiklerin etkilenmesi başta olmak üzere bozulmuş mitokondriyal homeostazı ön plana çıkarmaktadır (259). Ayrıca, depresyon üzerine olumlu etki gösteren ajanların mitokondriyal eşleşme bozulması aracılı muhtemel etkileri açısından literatürde dikkat çekici veriler yer almaktadır (260). Tiroid hormonunun, özellikle, UCP-1 ve UCP-3'ün yukarı (*upstream*) düzenlenmesi, mitokondriyal geçiş gözeneklerinin aktive edilmesi ve ADP/ATP translokazının düzenlenmesi yoluyla mitokondrideki oksidatif fosforilasyon eşleşmesinin bozulmasına neden olduğu bilinmektedir (260,261). Alzheimer hastalığı, depresyon ve anksiyete gibi bazı nörodejeneratif ve nörobilişsel bozukluklarda tiroid hormonunun mitokondriler üzerinden rolü giderek daha fazla ilgi görmektedir (260). Triiyodotironinin, trisiklik antidepresanlarla birlikte majör depresif bozukluk tedavisinde kullanılmasının, tedavi yanıtını artırma veya hızlandırma yöntemi olarak etkili olabileceği bildirilmiştir (262). Emzirme döneminde aşırı beslenen sıçanlarda fluoksetin uygulamasının mitokondriyal fonksiyonu ve oksidatif dengeyi iyileştirdiği ve mitokondriyal biyogenezi aktive ettiği bildirilmiştir. Ayrıca aşırı beslenen sıçanlarda fluoksetin uygulamasının,

UCP-2 ifadelenmesini artırdığı, ROS üretimini ve oksidatif stres biyobelirteçlerini azalttığı ve mitokondriyal biyogenezle ilişkili genlerin ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (263). Resveratrolün, hipokampusta mitokondriyal fonksiyonlar üzerine koruyucu etkiler göstererek, depresyon benzeri davranışları iyileştirdiği bilgisi de mevcuttur (264).

Bu veriler, mitokondri üzerinden hafif eşleşme bozulmasının, klinik duygudurum modülasyonuna katkı verebileceğini düşündürmektedir. **Çalışmamızda gözlediğimiz DNP-aracılı davranışsal iyileşmenin, DNP'nin mitokondriyal membran potansiyelini kontrollü biçimde düşürerek, ROS miktarını azaltan, hafif eşleşme bozucu (*uncoupling)* etkisi ile uyumlu olduğu kanaatindeyiz**. Bu etki doz penceresine son derece duyarlıdır; literatür hafif düzeyle eşleşme bozulmasının yararlı etkilerle ilişkilendirildiğine, aşırı düzeyde ise enerji yetersizliği ve toksisite riskine işaret etmektedir (20). Çalışmamızda davranışsal iyileşme, yüksek dozların yol açabileceği performans düşüşü ve toksisite bulguları olmaksızın elde edilmiştir. Araştırmamızda depresyon benzeri davranışta DNP'nin 5 mg/kg dozunda etki görülmemesi de önemli bir bulgudur. Hungtington hastalığı modelinde 0,5 mg/kg, 1 mg/kg ve 5 mg/kg dozlarında DNP'nin etkileri araştırıldığında, özellikle 1 mg/kg/gün dozunda uygulanmasının motor fonksiyonları iyileştirdiği bulunmuştur (128). Başka bir çalışmada ise 5 mg/kg DNP'nin 1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin kaynaklı Parkinson hastalığı modelinde koruyucu etkilere sahip olduğunu bildirilmiştir (265). Bu sonuçlar çalışmamızda depresyon ve anksiyetede farklı dozlara özgü yanıtlar

görmemizle uyumludur. **DNP'nin doza bağımlı etkisi, altta yatan patolojiye bağımlı görünmektedir.**

Bellek süreçleri

Çalışmamızda, bellek süreçleri yeni nesne tanıma testi ile değerlendirilmiştir**. Yeni nesne tanıma test sonuçlarına göre OVX ve/veya YYD gruplarında bellek açısından bir farklılık gözlenmemiştir.** Bu durum bellek üzerine ovariektomi ve/veya yüksek yağlı diyetin bir etkisi olmadığı yönünde yorumlanabileceği gibi, yeni nesne tanıma testinin özellikleri ve bazı karıştırıcı faktörlerin etkisi ile test sonuçlarının değişebileceği şeklinde de yorumlanabilir. Nitekim, yeni nesne tanıma testinin kısıtlılıklarından birisi öğrenme ve yeniye olan ilgi davranışını tek potada değerlendirmeye çalışmasıdır. Bağımlılık eğilimi olan hayvanlarda yapılan çalışmalarda yeni olanı arama davranışının (*novelty seeking behavior)* arttığı literatürde gösterilmiştir (266). Dolayısıyla, yeni nesne tanıma testinin doğası gereği "öğrenme" ile "yeniliğe ilgi/merak (*novelty seeking*)" eğilimini aynı anda yansıtması, anksiyete düzeyi ve ödül arama davranışındaki değişimlere duyarlı olması, yeni nesne tanıma testinde normal görünen bir performansın gerçek öğrenme/konsolidasyon süreçlerinin sağlam kaldığı anlamına gelmeyebileceğini düşündürmektedir. Bu tez çalışmasında da OVX ve/veya YYD gruplarında bellek fonksiyonlarında bir bozulma beklenebilirdi. Nitekim literatürde yüksek yağlı diyetin ve ovariektominin öğrenme üzerine olumsuz etkiler gösterdiği bildirilmiştir (267). Yüksek yağlı diyetin yalnızca bir gün uygulanmasının bellek üzerine olumsuz etkilerini inceleyen bir çalışma, epizodik hafızanın, uzamsal ve bağlamsal ilişkisel hafızayla birlikte, yalnızca bir günlük yüksek yağlı diyetten

sonra sıçanlarda olumsuz etkilenebileceğini, fakat nesne tanıma testinin etkilenmediğini göstermektedir (268). Yüksek yağlı diyetle beslenen C57BL6 farelerle yapılan bir çalışmada, 22. haftanın sonunda farelerde yeni yer bulma testinde kontrole kıyasla anlamlı olarak mekânsal hafızada bozulma olduğu, ancak yeni nesne testinde nesne tanıma hafızalarının bozulmadığı bildirilmiştir. (269). Benzer şekilde kemirgen modellerinde yüksek yağlı diyetin öğrenme ve hafızaya olan etkisinin ele alındığı bir derlemede de, yüksek yağlı diyetlerinin yeni nesne tanıma üzerindeki etkilerinin karışık olduğu literatürdeki çalışmalar ile örneklendirilmiştir (270).

Ovariektominin hafıza üzerine etkilerini araştıran bir çalışmada ise, ovariektomi sonrası 4. haftada pasif kaçınma testinde belirgin hafıza bozulmaları tespit edilirken, Morris su labirenti ve yeni nesne tanıma testinde hafıza bozulması ovariektomiden 8 hafta sonra ancak ortaya çıkmıştır (271). Yeni nesne tanıma testinin özelliği gereği, merak ve ilgi üzerine etkili farklı değişkenler de bizim çalışmamızdaki sonuçlar üzerinde karıştırıcı rol oynamış olabilir. Araştırmamızda gözlemlediğimiz yükssek yağlı diyetin anksiyete azaltıcı etkisi ve tartıştığımız ödül arama davranışının beraber oluşturabileceği potansiyel “merak ve ilgi” artışı, OVX+YYD grubunda bellek fonksiyonlarının değişmiyor olması üzerine bir etken olabilir. Yani hem anksiyete azaltıcı etkinin oluşması hem de sükroz tercih testi ile ödül arama davranışında bir değişikliğin görülmemiş olması, yeniye olan merakın canlı kalmasını sağlamış olabilir. Bu durum OVX+YYD grubunda yeni nesne tanıma testinde bellek fonksiyonlarının değişmemesini açıklayabilir.

Bu bilgiler ışığında ovariektomi ve yüksek yağlı diyetin etkileri araştırılırken, öğrenmenin farklı boyutlarını ele almak ve hipokampus kaynaklı uzamsal bellek duyarlılığını daha yüksek özgüllükle test etmek amacıyla Barnes labirenti veya radyal kol labirenti gibi uzamsal referans/işleyen bellek ağırlıklı paradigmaların eklenmesi uygun olacaktır. Bu testler, motivasyon ve yeniliğe ilgi etkilerini en aza indirirken strateji kullanımı, hata örüntüleri ve hatırlama-konsolidasyon sürekliliği hakkında daha ayrıntılı veri sağlamaktadır. Dolayısıyla Barnes testi veya radyal labirent testi gibi başka testler ile ileri değerlendirmeler yapılması gerekmektedir. Ayrıca bellek fonksiyonlarındaki değişikliklerin daha uzun dönemde gelişebileceği göz önünde bulundurularak, farklı deney tasarımlarındaki ileri araştırmalar yararlı olacaktır.

Çalışmamızda DNP'nin 1 ve 5 mg/kg dozlarında uygulanması duygudurumla ilişkili testlerde yararlı etkiler gösterse de, aynı dozlarda ve sürede yeni nesne tanıma testi performansını çözücü grubuna göre anlamlı şekilde değiştirmemiştir. Ayrıca yukarıda söz edildiği üzere, deney modelimizde bellek fonksiyonları yeni nesne tanıma testinde bozulmamıştı.

Bulgumuz literatürle karşılaştırıldığında, farklı örüntüler görülmektedir. Örneğin 6 aylık C57BL/6 erkek farelerde 14 gün süreyle 5 mg/kg i.p. DNP uygulaması ile pasif kaçınma testinde belirgin bir iyileşme bildirmiş ve bu etki sinaptik plastisiteyle ilişkili mTOR/CREB yollarındaki artan sinyalizasyon ile uyumlu bulunmuştur (272). Travmatik beyin hasarı modelinde mitokondriyal eşleşme bozucuların etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada ise, DNP'nin ön ilacı olan MP201'in 80 mg/kg dozunda 14 gün tedavi ile yeni nesne tanıma hafızasını

iyileştirdiği bildirilmiştir (273). Öte yandan Alzheimer modelinde (APP/PS1 çift mutant transgenik fareler), çok düşük doz DNP'nin (0,5 mg/kg) 4 ay boyunca günlük uygulanması, Morris su labirenti testinde uzaysal öğrenme ve belleği düzeltirken, 1 mg/kg ve 5 mg/kg dozlarında ise bu etki gözlenmemiştir (20). DNP'nin nöroprotektif etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada da, bu ajanın nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde doza, süreye ve cinsiyete bağlı olarak yararlı olabileceği bildirilmiştir (274).

Sonuç olarak, **bulgularımız DNP'nin bilişsel çıktılar üzerindeki etkisinin altta yatan patoloji, doza ve süreye bağımlı dar bir pencere içinde ortaya çıktığını, ovariektomi ve yüksek yağlı diyet ile beslenen sıçanlarda, bilişsel fonksiyonların bu tez çalışmasında kullanılan doz ve sürede etkilemediğini göstermektedir.**

Vücut ağırlığı, kalori verimliliği, adipoz doku ve yağların dağılımı

Çalışmamızda ovariektomi uygulanan gruplarda, yüksek yağlı diyetten bağımsız olarak, kalori verimliliğinde (*feed efficiency*), yani tüketilen birim yem başına alınan vücut ağırlığında artış gözlenmiştir. Literatürde menopozun kalori verimliliğini artırdığı bilinmektedir (275,276). Ayrıca, östrojen eksikliğinin hiperfaji oluşması ve kıpırdanma gibi kendiliğinden oluşan aktivitelerde azalma ile ilişkili olduğunu bilinmektedir (277). Araştırmamızda, kafes bazında diyet tüketim ölçümü yapıldığı için deney hayvanlarının bireysel olarak ne kadar yem yedikleri takip edilememiştir. Bu nedenle tüketilen yemi, kafesteki hayvan sayısına bölme yöntemi ile yapılacak bir istatistik hatadan kaçınılarak, grupların kümülatif olarak

tükettikleri yem ve alınan vücut ağırlığı üzerinden grupların yem verimliliği hesaplanarak tanımlayıcı veri olarak tabloda sunulmuştur.

Çalışmamızda ovariektominin kalori verimliliğinde yaptığı artışın yanısıra vücut ağırlığı artışında da tek başına belirgin etkiye sahip olduğu görüldü. Menopoz ile ilişkili kilo artışı uzun yıllardan beri bilinen ve tartışılan bir olgudur ve yakın tarihli çalışmalarda da bu etki ile ilgili gözlem devam etmektedir (278,279). Kalıtsal hipertrigliseridemili sıçanların prediyabetik dişilerinde yapılan bir çalışmada, ovariektomi uygulanan sıçanların sham grubuna kıyasla vücut ağırlıklarının arttığı ve bu artışın %10'luk gıda alımı artışı ile açıklanabileceğine değinilmiştir. Ancak östradiol tedavisinin 2. haftasından itibaren kilo alımının, tedavi uygulanmayan sıçanlara kıyasla önemli ölçüde düştüğü bildirilmiştir. OVX ve OVX+östradiol grupları arasında besin alımında bir fark olmamasına rağmen, kilo kazanımı arasındaki farkın deneyin sonuna kadar korunduğu vurgulanmıştır (279). Bu bulgu, çalışmamızda saptadığımız "**enerji alımı benzer olsa dahi kilo kazanımının artması**" gözlemiyle uyumludur ve ovariektomi sonrası artan kilo alımının, hiperfajiden bağımsız mekanizmaları da içerdiğine işaret eder. Fareler üzerinde yapılmış bir çalışmada, deney gruplarının besin tüketimi benzer olmasına rağmen ovariektomi yapılan grubun %25 daha fazla kilo almış olduğu bulunmuştur. İndirekt kalorimetre ile ölçüm yapılmış ve OVX yapılan farelerin hem karanlık hem de aydınlık fazlarda kontrol farelerine göre önemli ölçüde daha az oksijen tükettiği, ayrıca karanlık fazda kendiliğinden oluşan fiziksel aktivite düzeylerinin OVX grubunda önemli ölçüde daha düşük olduğu bildirilmiştir (275). Bu veriler,

çalışmamızdaki kalori verimliliği artışı ile uyumludur ve enerji harcamasındaki düşüşün kilo artışına katkıda bulunduğunu destekler niteliktedir.

Çalışmamızda sadece kilo ve yağlanma artışı değil, yağlanma profilinde de değişiklikler bulduk. Bilindiği üzere, fizyolojik östrojen düzeyleri hiperplazi yoluyla subkutan adipoz doku artışını desteklerken, östrojen azalması visseral yağ dokusunda hipertrofi ile genişlemeye neden olur ve bu durum vücut yağ dağılımında östrojenin belirgin etkisini yansıtmaktadır (280). Klinik ve preklinik veriler, menopoz/OVX ile bölgesel yağlanmada selektivite geliştiğini, visseral kompartmanın orantısız şekilde etkilendiğini göstermektedir (281,282). OVX'nin visseral yağ dokusunda lipid metabolizmasını yeniden programladığı proteomik düzeyde de ortaya konmuştur (283). **Çalışmamızda, bu çerçeveyle tutarlı olarak**, **menopoza girmeyen sadece YYD grubunda subkutan yağlanmayı temsil eden inguinal yağın**, **menopozlu gruplarda ise visseral yağlanmayı temsil eden retroperitoneal yağın belirgin şekilde arttığı saptandı**. Davranış bulguları ile birlikte ele alındığında, özellikle **OVX+YYD grubunda visseral kompartmandaki artışın anlamlı düzeye ulaşması ve depresyon benzeri davranışın yalnızca bu grupta gözlenmesi dikkat çekicidir.** Bu birliktelik literatürdeki insan verileriyle de desteklenmektedir. Depresyon ve vücut kompozisyonu arasındaki değişiklikleri 12 aylık bir kilo verme çalışmasında ele alan bir araştırmada, sadece kadınlarda ve Latin ırkta visseral adipoz doku ile depresyon arasındaki ilişki anlamlı bulunurken, daha geniş bir kapsamdaki derleme ise visseral adipozite ile majör depresif bozukluk arasında çift yönlü bir ilişki olabileceğini göstermektedir (284,285). Ek olarak, aşırı kilolu ve obez peri- ve

postmenopozal kadınlar üzerinde yapılan bir çalışmada depresif semptomların visseral adipoz doku ile güçlü bir şekilde ilişkili bulunduğu belirtilmiştir (286).

Literatür ve bulgularımız birlikte ele alındığında, yağ dağılımındaki **menopoz-spesifik kaymanın** (subkutandan visserale) özellikle yüksek yağlı diyet ile birleştiğinde belirginleştiğini ifade edebiliriz. Bu **visseral odaklı yağlanma, depresyon benzeri davranışla birlikte seyrettiğinde translasyonel açıdan anlam kazanır ve postmenopozal dönemde metabolik-psikiyatrik eksende ortak bir risk örüntüsüne** işaret eder.

Diğer yandan çalışmamızda, ovariektominin, diyetten bağımsız olarak total kolesterolü non-HDL fraksiyonu üzerinden artırdığını, yüksek yağlı diyetin ise **HDL'yi yükselttiğini**, **ancak bu HDL artışının OVX varlığında kaybolduğunu saptadık**. Bulgumuz, östrojen eksikliğinin lipoprotein metabolizması üzerinde doğrudan etkisi olduğunu ve diyetle indüklenen değişimlerin bu zeminde farklı yönlendirilebildiğini düşündürmektedir.

OVX'nin diyetten bağımsız etkisi incelendiğinde, klinik veriler menopozun diğer etkilerden bağımsız biçimde LDL kolesterolü ve total kolesterolü artırabildiğini göstermektedir (287). (387). Rodent modellerinde de benzer yönde bulgular vardır. Bazı çalışmalarda OVX'nin HDL'yi azalttığı, total kolesterolde anlamlı değişim olmaksızın daha aterojenik bir profile yol açtığı gösterilmiştir (288). (388). Ayrıca OVX veya OVX+YYD koşullarında HDL düşüşü ile birlikte non-HDL kolesterol artışlarıyla tanımlı dislipidemi rapor edilmiştir (289). Bu veriler, bu tez çalışmasında standart diyetle beslenen OVX grubunda gözlenen non-HDL artışını biyolojik olarak açıklamaktadır.

Literatür incelendiğinde YYD'in, süre ve içerik bağımlı HDL yanıtı oluşturabileceği düşünülmektedir**.** Wistar sıçanlarda yüksek yağ/kolesterol diyeti altında erken dönemde (≈30 gün) HDL-dışı kolesterol artarken**,** uzayan maruziyette (≈90 gün) HDL-C'nin yükseldiği bildirilmiştir (290). Bizim verilerimizde YYD'nin HDL'yi artırması bu zaman-bağımlı patern ile uyumludur. Bununla birlikte, sıçan ve farelerde kolesterol ester transfer proteini **(**CETP) yokluğu HDL taşınmasında tür-özgül bir zemin oluşturur; kemirgenler kolesterolü ağırlıklı HDL parçacıklarıyla taşırlar; bu da YYD'ye verilen HDL yanıtını insan biyolojisinden farklı kılabilir (291,292). Bu zeminde östrojen eksikliği, hepatik lipoprotein üretimi ve reseptör dinamikleri üzerinden HDL miktarını baskılayabilir; nitekim OVX koşullarında YYD'nin HDL yükseltici etkisinin kaybolması da literatürle tutarlıdır (389). Bununla birlikte, bazı modellerde OVX (veya farklı diyet bileşimleri) altında HDL'de değişiklik izlenmemesi de rapor edilmiştir; bu farklılık diyet kompozisyonu, süre, yaş/soy ve analitik yöntem farklılıklarının önemini vurgular (293).

Bulgularımız bir arada değerlendirildiğinde, OVX'nin non-HDL'yi arttırdığı, YYD'nin ise HDL'yi artırdığı, ancak östrojen yoksunluğunda bu HDL artışının sönümlendiği görülmektedir. Tür-özgül CETP yokluğu nedeniyle HDL dinamiklerinin insanla birebir örtüşmediği not edilmelidir. Buna rağmen, menopozun LDL üzerindeki bağımsız etkisi**,** OVX modellerinde HDL düşüşü ve YYD'nin zaman/kompozisyon bağımlı HDL yanıtı sunulan literatürle uyumlu görünmektedir.

Sonuçlarımızı özetleyecek olursak, OVX+YYD ile vücut ağırlığı, toplam adipoz doku ağırlığı, retroperitoneal adipoz doku ağırlığı anlamlı olarak yüksekti. OVX+YYD total kolesterol ve non-HDL kolesterolü arttırdı**.** Bu bulgular üzerine DNP'nin etkisi değerlendirildiğinde, DNP'nin 1 ve 5 mg/kg dozlarının, ovariektomi ve yüksek yağlı diyetin indüklediği adipozite üzerinde bir azalma oluşturmadığını; vücut ağırlığı artışı, total yağ kütlesi ile retroperitoneal ve inguinal yağ yastıkçığı ağırlıklarında anlamlı değişikliğe neden olmadığını gösterdik. Benzer şekilde DNP uygulaması ile total kolesterol, HDL ve non-HDL düzeylerinde de bir değişiklik gözlenmedi. Bu **bulgu, OVX+YYD modelinde, DNP'nin uygulanan doz ve süre koşullarında yağ kütlesine yansıyacak büyüklükte enerji dengesinde değişiklik oluşturmadığına** da işaret etmektedir. Değerlendirilebilen literatüre göre, DNP'nin kilo kaybına neden olduğu en düşük doz 16 mg/kg/gün olarak ifade edilmektedir (294). Yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanlarda 3 gün boyunca 16 mg/kg/gün DNP tedavisi, toplam kilo alımını %30 oranında azaltmıştır (294). Çalışmamızda ise DNP, kilo kaybı yaratmayan nöroprotektif dozlarda (1 ve 5 mg/kg) kullanılmıştır (127).

DNP-aracılı mitokondriyal eşleşme bozulması, diyetle ilişkili obezite ve insülin direnci tedavisinde potansiyel bir terapötik yaklaşımdır. Mitokondriyal eşleşme bozulması, yetersiz beslenme veya aşırı beslenmeyle ilişkili komplikasyonlara neden olmamaktadır (295). Yeni geliştirilen bir mitokondriyal eşleşme bozucu olan BAM15, daha geniş bir doz aralığına sahip olması ve mitokondride proton taşınımını artırırken plazma membranı elektrofizyolojisini etkilemeyen seçiciliği ile umut vadeden bir terapötik ajandır (296). BAM15 ile

beslenen farelerde telafi edici gıda alımının olmaması, DNP alan kişilerin açlık hissinde artış bildirmediğini gösteren insan verileriyle tutarlıdır. Bir çalışmada, dişi *db/db* fare modelinde, %60 kalori kısıtlaması, semaglutid, rosiglitazon, BAM15 ve bir diğer mitokondriyal eşleşme bozucu olan niklosamid etanolaminin etkileri karşılaştırılmıştır (297). Bu araştırmada BAM15 ve kalori kısıtlaması kaybı karaciğer yağlanmasının azaltılmasında en etkiliyken, BAM15 glukoz toleransında da en etkili ajanlardan biri olarak bulunmuştur. DNP, metabolizmayı hızlandırarak kilo kaybı ortaya çıkardığı dozlarda akut toksisite gösterme riski taşırken, preklinik çalışmalar BAM15'in bu açıdan daha güvenli olduğunu göstermektedir. Ancak bu çıkarımlar preklinik araştırmalardan elde edilmiş olup klinik güvenliliği henüz kanıtlanmış değildir.

Araştırma bulgularımız arasında yer alan tanımlayıcı verilerde, kalori verimliliğinin DNP gruplarında da bir azalmaya neden olmadığını görmekteyiz. Bu durumda **DNP'nin sıçanlarda 1 mg/kg ve 5 mg/kg günlük dozlarının metabolizma hızını etkilemediği; toksik riskler açısından bu bakımdan güvenli görülebileceği şeklinde yorumlanabilir.** Dolayısıyla bu tez çalışmasında kullanılan dozun metabolizma açısından subterapötik düzeyde kaldığı söylenebilir. Bu bulgu, **görülen potansiyel etkilerin DNP'nin nöroprotekif potansiyelinden kaynaklanmış olabileceğini** de göstermektedir. Ayrıca literatürde de gösterildiği üzere DNP kalori açığı olmayan durumlarda toksik olarak değerlendirilmemiştir (132). Dolayısıyla **kullanılan dozlarda DNP'nin metabotoksik etkisi olmadığı** tarafımızca da gösterilmiştir.

Glukoz, İnsülin, HOMA IR, kolesteroller ve leptin

Çalışmamızda açlık glukozu OVX içeren gruplarda yükselirken**,** insülin artışı yalnızca YYD verilen grupta gözlendi. Bu durum, iki farklı direnç paternini işaret ediyor olabilir. YYD'de hiperinsülinemik (kompanse) insülin direnci**,** OVX'de ise hipoinsülinemik (dekompanse) insülin direnci gelişmiş olabilir. Östrojeninin, pankreatik beta hücrelerinde ERα aracılığıyla oksidatif stresin neden olduğu apaptozu önleyerek insülin sekresyonunu koruduğu literatürde bildirilmiştir (298). Bir araştırmada ovariektomi sonrasında insülin salgılanmasında azalma ve glukoz düzeylerinde artış gösterilmiş ve bu durum östreojen tedavisi ile geri çevrilmiştir (299). Ayrıca östrojenin Langerhans adacıklarını koruyucu etkisi de bildirilmiştir (300). Diğer yandan hem yüksek yağlı diyetin hem de menopozun insülin direncini artırıcı etkisi bilinmektedir. (301,302). Tüm bu veriler ışığında, yüksek yağlı diyette insülin düzeyinin korunduğu bir insülin direnci oluştuğu, menopozlu hayvanlarda ise insülin seviyelerinin düşük kaldığı bir insülin direncinin meydana geldiği, bu yüzden de açlık kan glukoz düzeyinin yüksek seyrettiği düşünülebilir. Bu nedenle OVX'de insülin düzeyinin düşük kalması**,** açlık kan glukoz düzeyinin yükselmesine rağmen HOMA-IR'de anlamlı fark oluşmamasını açıklayabilir; HOMA-IR'ın insülin sekresyonu baskılanmış durumlarda insülin direncini, olduğundan az yansıtabileceği unutulmamalıdır.

DNP'nin 1 ve 5 mg/kg dozu glukozu, 1 mg/kg dozu ise HOMA-IR değerlerini, çözücü grubuna kıyasla anlamlı olarak azaltmıştı. **DNP'nin kilo kaybı oluşturmaksızın insülin direncini ve kan glukoz düzeylerini iyileştirmesi beklenmedik fakat dikkat çekici bir sonuçtur.** Nitekim metabolizmayı

hızlandırıcı etkileriyle glukoz toleransını düzenleyen BAM15'e benzer biçimde, niklosamid etanolamin ile tedavi edilen farelerde de daha iyi glisemik kontrol, daha düşük vücut ağırlığı kazanımı bildirilmiştir (303). Bu bağlamda**, OVX+YYD modelinde gözlenen DNP'ye ait glukoz düzenleyici faydaların, birden çok ve kısmen farklı mekanizmalar üzerinden gerçekleştiği** düşünülebilir.

İskelet kasında ERα, insülin sinyalizasyonu ve GLUT4 ekspresyonu üzerinde pozitif bir etkiye sahiptir (179). İnsülinin uyardığı glukoza duyarlı taşıyıcı GLUT4'ün plazma membranına taşınması fosfatidilinozitol-3-kinaz/Akt yolu ile gerçekleşir; bu translokasyonundaki aksaklık insülin direncinin özelliklerinden biridir (304). Ayrıca, aşırı besin alımı nedeniyle iskelet kası mitokondriyal işlev bozukluğu, insülin direncine ve tip 2 diyabet gelişimine zemin hazırlamaktadır (189). Yüksek yağ alımıyla oluşan biyolojik olarak etkin lipid ara ürünleri olan diaçilgliseroller (DAG) ve seramidler, kas insülin direncinde kilit rol oynar (172). Bu moleküllerin anormal birikiminin stresle aktive olan serin kinazları ve PKC izoformlarını devreye sokarak sinyal iletimini olağan akışın dışına çıkardığı, sonuçta insülin etkisinin zayıfladığı ve glukoz alımının bozulduğu düşünülmektedir (305). Bu bilgiler ışığında, modelimizde yüksek yağlı diyet ve ovariektominin yarattığı bu birleşik etki ile GLUT4 translokasyonunun potansiyel olarak azalmış olması bulgularımızı açıklayabilir. Bu konuda ileri araştırmalar yararlı olacaktır**.**

Öte yandan, mitokondriyal biyogenez ve kalite kontrolünün güçlenmesi ATP üretimini ve GLUT4 translokasyonunu destekleyerek insülinle uyarılan glukoz alımını kolaylaştırabilir (306). İnsanlarda mitokondri kaynaklı oksidatif

yükün azaltılmasının lipid kaynaklı kas insülin direncini hafiflettiği de yakın zamanda gösterilmiştir (307).

Bu doğrultuda, mitokondriyal "hafif düzeyle eşleşme bozulması" yapan DNP'nin olası etkileri benzer şekilde olabilir. Mitokondriyal eşleşmenin hafif düzeyde bozulması, ROS üretimini sınırlar; yağ asidi akışını artırıp DAG/seramid birikimini azaltarak PKC-aracılı sinyal bozukluklarını hafifletebilir. Böylece kilo değişimi olmaksızın glukoz alımı ve glisemik kontrol iyileşebilir. **OVX+YYD modelimizde gözlenen DNP etkisi, tam da bu ortak mekanizmaya, kilo kaybı olmaksızın mitokondri stresinin giderilmesi ve iskelet kasının insüline işlevsel yanıtının geri kazanılmasına işaret ediyor olabilir.** Sonuç olarak, mitokondriyal dinamikler ve kalite kontrolünü hedefleyen stratejiler, insülin direnci ve tip 2 Diyabetes Mellitus tedavisi için umut vadeden farmakolojik yaklaşımlar olarak öne çıkmaktadır (189).

Çalışmamızda serum leptin düzeyleri, ovariektomiden bağımsız olarak YYD ile anlamlı biçimde yükseldi; standart diyet altında ise OVX tek başına leptini değiştirmedi.

Yüksek yağlı diyetlerin leptin düzeyini artırdığı literatürde bildirilmiştir (308). Dört hafta yüksek yağlı diyetle beslenmenin erkek farelerde leptin düzeylerini artırdığı gösterilmiştir (249). Premenopozal ve postmenopozal dönemdeki kadınların serum leptin düzeylerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada da, serum leptin düzeylerinin menopoz durumuyla ilişkili bulunmadığı bildirilmiştir (309). Postmenopozal kadınlarda yapılan bir çalışmada ise daha yüksek yağlanma düzeylerinin, daha yüksek serum leptin konsantrasyonlarıyla ilişkili olduğu

bulunmuştur (310). Obezite ile kolorektal kanserin ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmada leptinin yüksek yağlı diyet tüketen tüm gruplarda arttığı, düşük yağlı diyet tüketen gruplarda ise, ovariektomi grubu, over intakt grup ve erkek fare grupları arasında bir fark bulunmadığı gösterilmiştir (311).

Bulgularımız, menopozun tek başına leptin düzeylerini istikrarlı biçimde değiştirmediğini bildiren bulgularla uyumludur. Benzer biçimde, yalnızca YYD maruziyeti kısa sürede bile leptini yükseltebilmektedir. Bu tablo, leptin için diyet yağ yükü ve adipozite kontrolünün belirleyici olduğunu, OVX'nin tek başına leptini değiştirmeyebileceğini göstermektedir Ayrıca ovariektominin kolesterol değerlerini belirgin şekilde değiştirip leptin düzeylerinde değişiklik oluşturmaması da lipid profili ve leptin çalışmaları açısından ufuk açıcı bir nokta niteliğindedir.

Çalışmamızda DNP, glukoz ve HOMA-IR'i iyileştirirken serum leptini anlamlı biçimde değiştirmedi. Bu veri, DNP'nin etkisinin adipozite aracılı olmaktan çok, kas karaciğer insülin duyarlılığı ve mitokondriyal stres üzerinden ilerlediğini destekleyen ek bir bulgudur. Serum leptininin daha çok toplam yağ kütlesini yansıtması nedeniyle, DNP uygulanan gruplarda vücut ağırlığı ve adipoz doku ağırlığı belirgin değişmediğinden, leptinin sabit kalması beklenen bir durum olarak düşünülebilir.

BDNF, NGF

Çalışmamızda serum BDNF düzeyi, OVX+YYD grubunda, OVX ve SHAM gruplarına kıyasla anlamlı olarak azalmıştır. Yüksek yağlı diyetlerin BDNF düzeylerinde azalma yaptığı bildirilmiştir (312). Diğer yandan serum BDNF'de gerilemenin artan depresif semptomlarla ilişkilendirildiği araştırmalar da mevcuttur

(313,314). Literatürde BDNF'nin, menopozdaki kadınlarda ve fare ovariektomi modelinde düşebileceği de gösterilmiştir (315,316). Buna karşın, ovariektominin BDNF düzeyi üzerine etkisi olmadığını bildiren araştırmalar da vardır (317). Ayrıca Alzheimer Hastalığı modelinde yapılan bir çalışmada, ovariektominin hipokampal nörogenez üzerine olan olumsuz etkilerinin yüksek yağlı diyete bağlı olarak geliştiğine dikkat çekilmiştir (267).

Çalışma sonuçlarımız, ovariektomi zemininde **yüksek yağlı diyetin BDNF üzerine büyük ölçüde negatif etkileri olduğunu** göstermektedir. Bu durum**, OVX zemininde YYD'in BDNF üzerinde ek/olası sinerjik bir baskılayıcı etkisine işaret ediyor olabilir**. Bu açıdan, menopoz döneminde beslenme temelli müdahaleler ve BDNF destekleyici stratejiler yararlı olabilir.

BDNF'de saptadığımız belirgin düşüşe karşın NGF'nin BDNF ile uyumlu bir azalma göstermemesi dikkat çekicidir. Literatürde beyin dokusunda, özellikle postmortem verilerde, BDNF ve NGF ekspresyonunun birlikte azaldığı bildirilmiştir (318). Bu durum, santral düzeyde eş yönlü azalmaya işaret etmektedir. Buna karşılık periferik (serum) NGF için literatür daha heterojendir. Major depresyonda sağlıklı bireylere kıyasla serum NGF düzeylerinin daha düşük olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (319). Orta yaşlı obez kadınlarda yapılan bir çalışmada, postmenopozal dönemde NGF düzeylerinin premenopozdaki kadınlara kıyasla anlamlı olarak daha düşük olduğu da bulunmuştur (320). Ancak seruma bakıldığında NGF düzeylerinin stres ve depresyon durumunda artabileceğine dair güncel çalışmalar da vardır (153). Yapılan bir çalışmada bipolar depresyon grubunda NGF düzeyleri arasında sağlıklı kontrol grubuna kıyasla bir

değişiklik saptanmazken, bipolar mani grubunda anlamlı artış saptanmıştır (321). Ayrıca metabolik sendrom ve obezitede de NGF artışı raporlanmıştır (322). Bununla birlikte literatürde metabolik sendrom hastalarında tutarsız NGF düzeyleri bildirilmiştir (323). Çeşitli bağışıklık sistemi bileşenlerinin NGF salgılamasının mikroçevrelerindeki koşullara ve moleküler yapılara bağlı olduğu belirtilmiş; bu durumun hastalığın evresine bağlı olarak NGF'nin yukarı ve aşağı regülasyonunu değiştirebileceği vurgulanmıştır (323). Bir araştırmada, periferik NGF düzeyleri ile depresyon skoru ters orantılı bulunmuş, ancak NGF yeterli tedaviden önce ve sonra anlamlı olarak değişmemiştir (318). Periferik NGF düzeylerinin depresif ruh hallerine doğrudan bir tepkiden ziyade, ruh halinin stresiyle daha fazla ilişkili olabileceğini öne süren Liu ve arkadaşlarının hipotezi bu noktada öne çıkmaktadır (321). NGF düzeylerindeki artışın, daha çok stres durumu ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Paraşütle ilk kez atlayacak genç askerlerde yapılan bir çalışma, atlamadan önceki gece ve inişten 20 dk sonra alınan örneklerde NGF seviyelerinin kontrole kıyasla (daha önce atlamış olanlarla) anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir (324). Yapılan bir meta-analizde, hastalığın şiddeti, kan alma zamanı ve fiziksel sağlık durumu gibi faktörlerin tümünün, periferik NGF düzeyi sonuçları üzerinde olası karıştırıcı etkilere neden olabileceği vurgulanmıştır (319).

Depresyon çalışmalarındaki heterojen bulgular ile çalışma sonuçlarımız birlikte ele alındığında, hastalıkların evresine ve eşlik eden inflamasyon fenotipine göre NGF'nin yönünün değişkenlik gösterebildiği ortaya çıkmaktadır**.** Bu nedenle, araştırmamız sonucundaki serum NGF düzeyi bulgumuz, santral nörotrofik durumu

yansıtmaktan ziyade bireyin metabolik-inflamatuvar/stres mikroçevresini yansıtıyor olabilir.

BDNF ve NGF düzeyleri üzerine DNP uygulamasının etkilerine bakılacak olursa, deney hayvanlarına uygulanan dozlarda bir değişiklik oluşturmadığı gözlenmiştir. DNP'nin OVX+YYD modeli üzerine etkileri bilgimiz dahilinde daha önce araştırılmamıştır. Bir çalışmada, hem DNP hem de ön ilacı olan MP201'in Multiple Skleroz modelinde spinal kordda BDNF'yi artırdığı raporlanmıştır (325). Yine başka bir çalışmada 6 aylık farelerde 5 mg/kg DNP ile serabral kortekste BDNF ifadelenmesinin arttığı bildirilmiştir (272). Daha güncel bir çalışmada ise, deneysel otoimmün nörit modelinde 1 mg/kg DNP'nin klinik iyileşme sağlamazken, sağ siyatik sinir kesitlerinde BDNF ifadelenmesini artırdığı gösterilmiştir (326).

Bu bulgular bir arada değerlendirildiğinde, DNP'nin lokal olarak dokularda (spinal kord, korteks, periferik sinir gibi) BDNF ekspresyonunu artırabildiği, ancak bunun dolaşıma yansımayabileceği düşünülebilir. Nitekim BDNF ve NGF'nin reseptörlere bağlı formları ve hücre içinde bulunmaları nedeniyle serum ölçümleri her zaman doku düzeyindeki biyolojik etkinliği yansıtmayabilir. Ayrıca model farklılıkları (inflamasyon/demiyelinizasyon, metabolik veya endokrin arka plan gibi) doz, zamanlama ve ölçüm yöntemi (immünohistokimya, serum ELISA gibi) sonuçlar arasındaki farklılığı açıklayabilir.

Öte yandan ovariektomi ve yüksek yağlı diyet uygulanan bir çalışmada; östradiol tedavisinin farelerde hipokampus proBDNF düzeylerini etkilemediği bulunmuş, yüksek yağlı diyetin oluşturduğu obeziteye dikkat çekilmiştir (327).

Yüksek yağlı diyetin hipokampusta BDNF'yi belirgin olarak azaltmasının, östrojen tedavisinin davranış değişikliklerini düzenlerken, BDNF üzerindeki yararlı etkisini engelleyebileceği şeklinde yorumlanmıştır. DNP'nin de benzer şekilde etki göstermesi dikkat çekicidir. Çalışmamızda da DNP'nin davranış üzerine olumlu etkileri gözlenmişken, BDNF ve yağlanma üzerine etkisi görülmemiştir. DNP, BDNF transkripsiyonunu artırabilirken, bu artış seruma yansımamış olabilir ya da yüksek yağlı diyetin BDNF'yi baskılayıcı etkisiyle maskelenmiş olabilir.

Son olarak, DNP'nin bu araştırma kapsamında tartışılan etkileri dışında, potansiyel terapötik bir ajan olarak 100 yılı aşkın bir süreçte inişli-çıkışlı bir molekül olduğunu hatırlamakta fayda vardır. Tarihsel olarak sanayi, savaş ve tıbbın kesişiminde bir molekül olan 2,4-dinitrofenol, I. Dünya Savaşı'nda mühimmat üretiminde kullanılırken maruziyetle birlikte belirgin kilo kaybı, ısı artışı ve toksisite gözlemleriyle tıbbın ilgi odağına girmiş; 1930'larda ise metabolizma hızını artıran etkisi nedeniyle hızla ''**zayıflama ilacı**'' olarak yaygınlaşmıştır. (231). Ancak kontrolsüz kullanım, dar terapötik aralığına bağlı ciddi advers etkilerin (körlük ve hipertermi gibi) raporlanması üzerine FDA tarafından insan tüketimine uygun olmayan, yani yasaklı bir madde olarak değerlendirilmiştir (231). Artık raflarda yer almayan DNP, atletlerin kilo kontrolü amacıyla dikkatini çekmeye devam etmiş, Dünya Dopingle Mücadele Ajansı tarafından da 'kullanımı her zaman yasaklı madde sınıfında' nitelendirilmiştir (328). Bu tarihsel seyir, modern dönemde düşük dozlarda yeniden konumlandırma (*repurposing*) arayışlarını bütünüyle dışlamamış; benzer biçimde bir dönem teratojenite nedeniyle

yasaklanıp daha sonra sıkı düzenlemeler altında belirli endikasyonlarda geri dönen talidomid örneğine paralel bir çerçeve doğmuştur.

Günümüzde DNP'nin iyi imalat uygulamalarıyla formüle edilen ilaç adayları arasında yer alan **MP-101** düşük dozlarda gösterdiği nöroprotektif potansiyeli ve zayıf toksikolojik profili sayesinde FDA tarafından Araştırma Amaçlı Yeni İlaç (*Investigational New Drug*) statüsünde onaylanmıştır (24). Ayrıca Avrupa İlaç Ajansı (*European Medicines Agency,* EMA), MP-101'in Amyotrofik Lateral Skleroz ve Alzheimer hastalarında hastalığın laboratuvar biyobelirteçleri üzerindeki etkilerini değerlendirmeyi amaçlayan, biyobelirteç odaklı bir klinik çalışmanın yürütülmesine izin vermiş olup çalışma hâlihazırda sürmektedir (*EU trial number*: 2023-507195-43-00; "A clinical trial to learn how an investigational drug (MP-101) affects on the laboratory signs of the disease when given to Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) and Alzheimer's Disease (AD) patients"). Bu durum, bizim bulgularımızda gözlenen davranışsal iyileşmelerin 'düşük doz etkililik ve güvenlilik' ekseninde klinik araştırma gündemiyle tutarlı bir bilimsel zemine oturduğunu göstermektedir.

6. SONUÇLAR

Çalışmamızda, ovariektomi ve/veya yüksek yağlı diyetin duygudurum ve bellek üzerine etkileri davranış deneyleri ile araştırılmış, toplanan serum örnekleri ve dokular ile metabolik durum ve nörotrofik faktör düzeyleri üzerine etkiler gözlemlenmiştir. Bu çerçevede DNP'nin, 1 ve 5 mg/kg dozlarında, ovariektomi ve yüksek yağlı diyet birlikteliğinin oluşturduğu tabloya olan etkileri **literatürde ilk kez bu çalışma kapsamında** ele alınmıştır.

Lökomotor aktivite ovariektomi ve/veya yüksek yağlı diyet ile değişmemiştir, bu bulgu diğer davranışsal değerlendirmelerde gözlenen etkilerin lokomotor performanstaki farklılıklardan bağımsız olduğunu göstermektedir.

YYD grubu, anksiyete benzeri davranışları azaltırken, OVX+YYD birlikteliğinde bu etki sönümlenmiştir. OVX+YYD grubunda anksiyetede bir artış olmamakla birlikte, DNP anksiyete benzeri davranışı azaltmıştır. DNP'nin anksiyete üzerine etkilerini araştırıldığı bu ilk çalışmada, bulgularımız anksiyete üzerine DNP'nin terapötik potansiyeline işaret ediyor olabilir.

Araştırmamızda, OVX+YYD birlikteliğinin oluşturduğu nöroendokrin zeminin depresyon benzeri davranışı anlamlı olarak artırdığı, DNP'nin düşük dozda antidepresan etki gösterdiği, yüksek dozda ise bu etkinin kaybolduğu bulunmuştur. DNP'nin bu etkisi, mitokondriyal işlev bozukluğunun depresyonun nedenlerinden biri olduğuna dair hipotezi destekler nitelikte olup, bir mitokondriyal eşleşme bozucunun depresyondaki olumlu etkilerinin gözlendiği ilk çalışmadır.

OVX ve/veya YYD gruplarında, yeni nesne tanıma testinde bellek açısından bir farklılık gözlenmemesi ve DNP'nin de bu durumu etkilememesi; bu deney

tasarımının öğrenme üzerine etkisiz olduğunu ve/veya öğrenmenin farklı boyutlarını araştıran diğer özgül testler ile yeni araştırmalar yapılması gerektiğini düşündürmektedir.

Ovariektomi, yüksek yağlı diyetten bağımsız olarak, kilo alımında artışa neden olup, DNP kilo dağılımı üzerine etkili görünmemektedir. OVX+YYD grubunda visseral yağlanmanın belirgin şekilde artması ve yalnızca bu grupta depresyon benzeri davranışın görülmesi; kardiyovasküler hastalıklarda olduğu gibi psikiyatrik yaklaşımda da yalnızca kilo artışının değil adipoz doku dağılımının önemine işaret etmektedir.

OVX ve/veya YYD'nin serum lipidleri ve leptin üzerine etkileri, östrojen eksikliği ve yüksek yağlı diyetle beslenmenin literatürde belirtilen etkileri ile uyumlu olup, kullanılan dozlarda DNP'nin bu sistem üzerine etkili olmadığı görülmüştür. Bu bulgular DNP'nin metabolizmayı etkilemeyen dozlarda, güvenli ve nöroprotektif olduğuna işaret etmektedir.

Çalışmamızda açlık glukozu OVX içeren gruplarda yükselirken, DNP'nin kilo kaybı oluşturmaksızın insülin direncini ve glukoz düzeylerini iyileştirmesi; mitokondri stresinin giderilmesi ve iskelet kasının insüline işlevsel yanıtının geri kazanılmasına işaret ediyor olabilir**.** Bu açıdan, insülin direnci ve tip 2 Diyabetes Mellitus'ta mitokondriyal fonksiyonları hedefleyen umut vadedici farmakolojik stratejiler geliştirilebilir.

KISITLILIKLAR

Çalışmamızda, ovariektomi ile oluşturulan model, doğal süreçteki perimenopozal kademeli östrojen düşüşünü bütünüyle yansıtmamaktadır; özellikle akut hormon yoksunluğu yaratması, yaşa bağlı fizyolojik değişimleri ve siklik progesteron/androjen dinamiklerini içermemesi modelin başlıca kısıtlılıklarıdır.

Bazı araştırmalarda ovariektomiyi doğrulamak için sakrifikasyon sonrası östrojen düzeyleri de ölçülmüştür (242, 329). Çalışmamızda, bu bir kısıtlılık olarak düşünülebilir. Bununla birlikte, uterus ıslak ağırlığının literatürde iyi bir belirteç olarak kabul edilmesi ve operasyonun uzman bir veteriner hekim tarafından yapılarak, sakrifikasyon esnasında overlerin bulunmadığının makroskopik olarak teyit edilmesi nedeniyle menopoz modelinin başarılı olduğu düşünülmüştür.

Bir diğer kısıtlılık, kontrol ve yüksek yağlı diyet gruplarındaki dişi sıçanların östrus döngülerinin takip edilmemesidir. Ovariektomize hayvan sayısının görece fazla olması ve sham gruplarında döngü izlemenin yaratabileceği ek stresin davranışsal çıktıları etkileyebileceği göz önünde bulundurulmuştur. Ayrıca literatürde dişi kemirgenlerin araştırma protokollerine dahil edilmesinin, erkeklere kıyasla ekstra değişkenlik yaratmadığı ve rutin olarak östrus takibi gerektirmediğine dair kanıtlar mevcuttur (330). Bununla birlikte, yüksek yağlı diyetin östrus siklusunu bozabildiği bilindiğinden, döngüye dayalı planlama yapıldığında dahi öngörü doğruluğu tartışmalı hale gelebilir (331,332).

Çalışmamızda östradiolün bulgularımız üzerine etkilerini karşılaştırabileceğimiz pozitif bir kontrol grubunun olmaması bir kısıtlılık olarak düşünülebilir. Ancak bu tez çalışmasında gerek deney grupları sayısının fazla

olması (7 grup) gerekse de sadece menopozun değil, öncelikle menopoz ve yüksek yağlı diyet birlikteliğinin yarattığı tablo üzerine DNP'nin etkilerinin araştırılması hedeflendiği için östradiol ile karşılaştırmalı olarak etkileri incelemek ileriye dönük bir hedef olarak düşünülmüştür.

Çalışmamızda depresyon benzeri davranış, anksiyete benzeri davranış ve bellek işlevi deney hayvanlarında, belirli bir zaman çizelgesi içinde ardışık olarak değerlendirilmiştir. Davranış testlerinin ardışık uygulanması, sonraki davranışsal ölçümleri kısmen etkileyebilir. Bu durum, elde edilen bazı davranışsal sonuçların yorumlanmasında kısıtlılık oluşturabilecek bir faktör olarak değerlendirilebilir.

Son olarak, çalışmamızda olası etki mekanizmalarına yönelik hücresel/moleküler düzeyde analizler (ör. reseptör düzeyleri, sinyal yolakları, nörotrofin ekspresyonu) yapılmamıştır. Ovariektomi ve yüksek yağlı diyet birlikteliğinin oluşturduğu duygudurum, nörobilişsel fonksiyonlar ve nörotrofik faktörler üzerine DNP'nin etkileri literatürde ilk kez bu çalışma kapsamında ele alınmış olduğundan, öncelikle potansiyel etkilerin ortaya konması hedeflenmiş, hücresel/moleküler mekanizmalar ise devam eden araştırmaların hedefleri olarak düşünülmüştür. Bu amaçla etik kuruldan gerekli izinler alınmış ve deney hayvanlarının sakrifikasyonundan sonra beyin, karaciğer, pankreas dokuları uygun koşullarda disseke edilerek ileri çalışmalar için saklanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Öz ŞM, Turan P. Kadının Güçlenmesi Kapsamında Yaşlı Kadınların Çalışma Hayatına Katılmalarındaki İmkân ve Kısıtların Belirlenmesi Üzerine Nitel Bir Çalışma: Karabük İli Örneği. Senex: Yaşlılık Çalışmaları Dergisi. 2021;5(2):30–47.
2. Terzic S, Bapayeva G, Kadroldinova N, Sarria-Santamera A, Gusmanov A, Semenova Y, Aimagambetova G, Laganà AS, Chiantera V, Ukybassova T, Kongrtay K, Abdukassimova M, Babazhanova A, Togyzbayeva K, Terzic M. Menopausal Status Impact on the Quality of Life in Kazakhstani Healthcare Workers: A Cross-sectional Study. Journal of General Internal Medicine. 2024;39(6):969–977.
3. Tavasoli F, Sharifian J. Age at natural menopause among women referring to health centers in Mashhad. Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility. 2002;2(4):26–32.
4. Monteleone P, Mascagni G, Giannini A, Genazzani AR, Simoncini T. Symptoms of menopause — global prevalence, physiology and implications. Nature Reviews Endocrinology. 2018;14:199–215.
5. Lejri I, Grimm A, Eckert A. Mitochondria, Estrogen and Female Brain Aging. Frontiers in Aging Neuroscience. 2018;10:124.
6. Albert PR. Why is depression more prevalent in women? Journal of Psychiatry and Neuroscience. 2015;40(4):219–221.
7. Kang HJ, Park Y, Yoo KH, Kim KT, Kim ES, Kim JW, Kim SW, Shin IS, Yoon JS, Kim JH, et al. Sex differences in the genetic architecture of depression. Scientific Reports. 2020;10(1):9927.
8. Lovejoy JC, Champagne CM, de Jonge L, Xie H, Smith SR. Increased visceral fat and decreased energy expenditure during the menopausal transition. International Journal of Obesity. 2008;32(6):949–958.
9. Bromberger JT, Epperson CN. Depression During and After the Perimenopause: Impact of Hormones, Genetics, and Environmental Determinants of Disease. Obstetrics and Gynecology Clinics of North America. 2018;45(4):663–678.
10. Valencia-Olvera AC, Maldonado Weng J, Christensen A, LaDu MJ, Pike CJ. Role of estrogen in women's Alzheimer's disease risk as modified by APOE. Journal of Neuroendocrinology. 2023;35(2):e13209.
11. Sánchez-Zamorano LM, Flores-Luna L, Angeles-Llerenas A, Ortega-Olvera C, Lazcano-Ponce E, Romieu I, Mainero-Ratchelous F, Torres-Mejía G. The Western dietary pattern is associated with increased serum concentrations of free estradiol in postmenopausal women: implications for breast cancer prevention. Nutr Res. 2016;36(8):845–854.

12. Mauvais-Jarvis F, Clegg DJ, Hevener AL. The role of estrogens in control of energy balance and glucose homeostasis. Endocrine Reviews. 2013;34(3):309–338.

13. Yao J, Brinton RD. Estrogen regulation of mitochondrial bioenergetics: implications for prevention of Alzheimer's disease. Advances in Pharmacology. 2012;64:327–371.

14. Estrada CM, et al. Estrogen signaling in the medial amygdala decreases emotional stress responses and obesity in ovariectomized rats. Hormones and Behavior. 2018;98:33–44.

15. Conde DM, Verdade RC, Valadares ALR, Mella LFB, Pedro AO, Costa-Paiva L. Menopause and cognitive impairment: A narrative review of current knowledge. World Journal of Psychiatry. 2021;11(8):412–428.

16. Renke G, Kemen E, Scalabrin P, Braz C, Baesso T, Pereira MB. Cardio-Metabolic Health and HRT in Menopause: Novel Insights in Mitochondrial Biogenesis and RAAS. Current Cardiology Reviews. 2023;19(4):e060223213459.

17. Elmadfa I, Meyer AL. Trends in nutrition in Europe. Acta Alimentaria Hungarica. 2009;38:153–159.

18. Stranahan AM, Mattson MP. Recruiting adaptive cellular stress responses for successful brain ageing. Nature Reviews Neuroscience. 2012;13(3):209–216.

19. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. Cell. 1999;98(1):115–124.

20. Geisler JG, Marosi K, Halpern J, Mattson MP. DNP, mitochondrial uncoupling, and neuroprotection: A little dab'll do ya. Alzheimer's & Dementia. 2017;13(5):582–591.

21. Cheng A, Wan R, Yang JL, et al. Involvement of PGC-1α in the formation and maintenance of neuronal dendritic spines. Nature Communications. 2012;3:1250.

22. Praticò D, Uryu K, Leight S, Trojanoswki JQ, Lee VM. Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. Journal of Neuroscience. 2001;21(12):4183–4187.

23. Adamczuk G, Humeniuk E, Adamczuk K, Grabarska A, Dudka J. 2,4-Dinitrophenol as an Uncoupler Augments the Anthracyclines Toxicity against Prostate Cancer Cells. Molecules. 2022;27(21):7227.

24. Zhong R, Dionela DLA, Kim NH, Harris EN, Geisler JG, Wei-LaPierre L. Micro-doses of DNP preserve motor and muscle function with a period of functional recovery in amyotrophic lateral sclerosis mice. Annals of Neurology. 2025;97(3):542–557.

25. Cano A, Marshall S, Zolfaroli I, et al. The Mediterranean diet and menopausal health: An EMAS position statement. Maturitas. 2020;139:90–97.

26. Kulkarni J, Gurvich C, Mu E, et al. Menopause depression: Under recognised and poorly treated. Australian and New Zealand Journal of Psychiatry. 2024;58(8):636–640.

27. Peacock K, Carlson K, Ketvertis KM. Menopause. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.

28. Davis SR, Lambrinoudaki I, Lumsden M, Mishra GD, Pal L, Rees M, Santoro N, Simoncini T. Menopause. Nature Reviews Disease Primers. 2015;1:15004.

29. Davis SR, Taylor S, Hemachandra C, Magraith K, Ebeling PR, Jane F, Islam RM. The 2023 Practitioner's Toolkit for Managing Menopause. Climacteric: The Journal of the International Menopause Society. 2023;26(6):517–536.

30. Harlow SD, Gass M, Hall JE, Lobo R, Maki P, Rebar RW, Sherman S, Sluss PM, de Villiers TJ, STRAW+10 Collaborative Group. Executive summary of the Stages of Reproductive Aging Workshop +10: addressing the unfinished agenda of staging reproductive aging. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2012;97(4):1159–1168.

31. Bjelland EK, Hofvind S, Byberg L, Eskild A. The relation of age at menarche with age at natural menopause: a population study of 336,788 women in Norway. Human Reproduction. 2018;33(6):1149–1157.

32. Brinton RD, Yao J, Yin F, Mack WJ, Cadenas E. Perimenopause as a neurological transition state. Nature Reviews Endocrinology. 2015;11(7):393–405.

33. Gu Y, Han F, Xue M, Wang M, Huang Y. The benefits and risks of menopause hormone therapy for the cardiovascular system in postmenopausal women: a systematic review and meta-analysis. BMC Women’s Health. 2024;24(1):60.

34. Kublickiene K, Fu XD, Svedas E, Landgren BM, Genazzani AR, Simoncini T. Effects in postmenopausal women of estradiol and medroxyprogesterone alone and combined on resistance artery function and endothelial morphology and movement. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2008;93(5):1874–1883.

35. Maltais ML, Desroches J, Dionne IJ. Changes in muscle mass and strength after menopause. Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions. 2009;9(4):186–197.

36. Yang JL, Hodara E, Sriprasert I, Shoupe D, Stanczyk FZ. Estrogen deficiency in the menopause and the role of hormone therapy: integrating the findings of basic science research with clinical trials. Menopause. 2024;31(10):926–939.

37. Mervosh N, Devi G. Estrogen, menopause, and Alzheimer’s disease: understanding the link to cognitive decline in women. Frontiers in Molecular Biosciences. 2025;12:1634302.

38. Venetsanaki V, Polyzos SA. Menopause and non-alcoholic fatty liver disease: a review focusing on therapeutic perspectives. Current Vascular Pharmacology. 2019;17(6):546–555.

39. Zhou Q, Wang B, Hua Q, et al. Investigation of the relationship between hot flashes, sweating and sleep quality in perimenopausal and postmenopausal women: the mediating effect of anxiety and depression. BMC Women's Health. 2021;21:293.

40. Alblooshi S, Taylor M, Gill N. Does menopause elevate the risk for developing depression and anxiety? Results from a systematic review. Australasian Psychiatry. 2023;31(2):165–173.

41. Rodríguez-San Nicolás A, Sánchez-Rodríguez MA, Zacarías-Flores M, Correa-Muñoz E, Mendoza-Núñez VM. Relación entre la obesidad central y el estrés oxidativo en mujeres premenopáusicas versus posmenopáusicas [Relationship between central obesity and oxidative stress in premenopausal versus postmenopausal women]. Nutrición Hospitalaria. 2020;37(2):267–274. doi:10.20960/nh.02552. PMID:32054278.

42. Beckett T, Tchernof A, Toth MJ. Effect of ovariectomy and estradiol replacement on skeletal muscle enzyme activity in female rats. Metabolism. 2002;51(11):1397–1401.

43. Huang S, Wang Z, Zheng D, Liu L. Anxiety disorder in menopausal women and the intervention efficacy of mindfulness-based stress reduction. American Journal of Translational Research. 2023;15(3):2016–2024.

44. Arnold S, Victor MB, Beyer C. Estrogen and the regulation of mitochondrial structure and function in the brain. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 2012;131(1–2):2–9.

45. Morgan KN, Derby CA, Gleason CE. Cognitive Changes with Reproductive Aging, Perimenopause, and Menopause. Obstetrics and Gynecology Clinics of North America. 2018;45(4):751–763.

46. Tseng PT, Chiu HJ, Suen MW, Zeng BS, Wu MK, Tu YK, Hung KC, Wu YC, Su KP, Li DJ, et al. Pharmacological interventions and hormonal therapies for depressive symptoms in peri- and post-menopausal women: A network meta-analysis of randomized controlled trials. Psychiatry Research. 2023;326:115316.

47. Soules MR, Sherman S, Parrott E, Rebar R, Santoro N, Utian W, Woods N. Executive summary: Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW). Fertility and Sterility. 2001;76(5):874–878.

48. Maki PM, Kornstein SG, Joffe H, Bromberger JT, Freeman EW, Athappilly G, Bobo WV, Rubin LH, Koleva HK, Cohen LS, Soares CN, Board of Trustees for The North American Menopause Society (NAMS) and the Women and Mood Disorders Task Force of the National Network of Depression Centers. Guidelines for the evaluation and treatment of

perimenopausal depression: summary and recommendations. Menopause (New York, N.Y.). 2018;25(10):1069–1085.

49. De Kruif M, Spijker AT, Molendijk ML. Depression during the perimenopause: a meta-analysis. Journal of Affective Disorders. 2016;206:174–180.

50. Tang R, Luo M, Li J, et al. Symptoms of anxiety and depression among Chinese women transitioning through menopause: findings from a prospective community-based cohort study. Fertility and Sterility. 2019;112(6):1160–1171.

51. Çalişkan Pala S, Ünsal A, Arslantaş D, et al. Evaluation of depression, social support and quality of life in perimenopausal and postmenopausal women in semi-rural Turkey. Psychogeriatrics. 2022;22(5):679–687.

52. Timur S, Sahin NH. The prevalence of depression symptoms and influencing factors among perimenopausal and postmenopausal women. Menopause. 2010;17(3):545–551.

53. Freeman EW, Sammel MD, Lin H, Nelson DB. Associations of hormones and menopausal status with depressed mood in women with no history of depression. Archives of General Psychiatry. 2006;63(4):375–382.

54. Herson M, Kulkarni J. Hormonal Agents for the Treatment of Depression Associated with the Menopause. Drugs & Aging. 2022;39(8):607–618.

55. Soares CN, Thase ME, Clayton A, Guico-Pabia CJ, Focht K, Jiang Q, et al. Open-label treatment with desvenlafaxine in postmenopausal women with major depressive disorder not responding to acute treatment with desvenlafaxine or escitalopram. CNS Drugs. 2011;25(3):227–238.

56. De Novaes SC, Almeida OP, Joffe H, Cohen LS. Efficacy of estradiol for the treatment of depressive disorders in perimenopausal women: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. Archives of General Psychiatry. 2001;58(6):529–534.

57. Genazzani AR, Bernardi F, Pluchino N, Begliuomini S, Lenzi E, Casarosa E, et al. Endocrinology of menopausal transition and its brain implications. CNS Spectrums. 2005;10(6):449–457.

58. Koebele SV, Bimonte-Nelson HA. Modeling menopause: The utility of rodents in translational behavioral endocrinology research. Maturitas. 2016;87:5–17.

59. Goldman JM, Murr AS, Cooper RL. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology. 2007;80(2):84–97.

60. Herrera-Pérez JJ, Hernández-Hernández OT, Flores-Ramos M, Cueto-Escobedo J, Rodríguez-Landa JF, Martínez-Mota L. The intersection between

menopause and depression: overview of research using animal models. Frontiers in Psychiatry. 2024;15:1408878.

61. Finch CE. The menopause and aging, a comparative perspective. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology. 2014;142:132–41.

62. Diaz Brinton R. Minireview: translational animal models of human menopause: challenges and emerging opportunities. Endocrinology. 2012;153:3571–8.

63. Brooks HL, Pollow DP, Hoyer PB. The VCD mouse model of menopause and perimenopause for the study of sex differences in cardiovascular disease and the metabolic syndrome. Physiology (Bethesda). 2016;31(4):250–257.

64. Mark-Kappeler CJ, Sen N, Lukefahr A, McKee L, Sipes IG, Konhilas J, Hoyer PB. Inhibition of ovarian KIT phosphorylation by the ovotoxicant 4-vinylcyclohexene diepoxide in rats. Biology of Reproduction. 2011;85:755–762.

65. Souza VR, Mendes E, Casaro M, Antiorio ATFB, Oliveira FA, Ferreira CM. Description of ovariectomy protocol in mice. Methods in Molecular Biology. 2019;1916:303–309.

66. Olson ME, Bruce J. Ovariectomy, ovariohysterectomy and orchidectomy in rodents and rabbits. Canadian Veterinary Journal. 1986;27(12):523–527.

67. Varlamov O. Western-style diet, sex steroids and metabolism. Biochimica et Biophysica Acta Molecular Basis of Disease. 2017;1863(5):1147–1155.

68. Cordain L, Eaton SB, Sebastian A, Mann N, Lindeberg S, Watkins BA, O'Keefe JH, Brand-Miller J. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. The American Journal of Clinical Nutrition. 2005;81(2):341–354.

69. Christ A, Lauterbach M, Latz E. Western diet and the immune system: an inflammatory connection. Immunity. 2019;51(5):794–811.

70. Malesza IJ, Malesza M, Walkowiak J, Mussin N, Walkowiak D, Aringazina R, Bartkowiak-Wieczorek J, Mądry E. High-fat, Western-style diet, systemic inflammation, and gut microbiota: a narrative review. Cells. 2021;10(11):3164.

71. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. The Journal of Clinical Investigation. 2004;114(12):1752–1761.

72. Brito AKDS, Mendes AVDS, Timah Acha B, Santos Oliveira ASDS, Lopes Macedo J, Suzuki Cruzio A, et al. Experimental models of type 2 diabetes mellitus induced by combining hyperlipidemic diet (HFD) and streptozotocin administration in rats: an integrative review. Biomedicines. 2025;13(5):1158.

73. Taylor LE, Gillis EE, Musall JB, Baban B, Sullivan JC. High-fat diet-induced hypertension is associated with a proinflammatory T cell profile in male and

female Dahl salt-sensitive rats. American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology. 2018;315(6):H1713–H1723.

74. de Paula GC, Brunetta HS, Engel DF, Gaspar JM, Velloso LA, Engblom D, de Oliveira J, de Bem AF. Hippocampal function is impaired by a short-term high-fat diet in mice: increased blood-brain barrier permeability and neuroinflammation as triggering events. Frontiers in Neuroscience. 2021;15:734158.

75. Knight EM, Martins IV, Gümüsgöz S, Allan SM, Lawrence CB. High-fat diet-induced memory impairment in triple-transgenic Alzheimer's disease (3xTgAD) mice is independent of changes in amyloid and tau pathology. Neurobiology of Aging. 2014;35(8):1821–1832.

76. Thériault P, ElAli A, Rivest S. High fat diet exacerbates Alzheimer's disease-related pathology in APPswe/PS1 mice. Oncotarget. 2016;7(42):67808–67827.

77. Attuquayefio TN, Stevenson RJ, Oaten MJ, Francis HM. A four-day Western-style dietary intervention causes reductions in hippocampal-dependent learning and memory and interoceptive sensitivity. PLoS One. 2017;12:e0172645.

78. Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. Obesity (Silver Spring, Md.). 2007;15(4):798–808.

79. Kubant R, Poon AN, Sanchezhernandez D, Domenichiello AF, Huot PSP, Pannia E, et al. A comparison of effects of lard and hydrogenated vegetable shortening on the development of high-fat diet-induced obesity in rats. Nutrition and Diabetes. 2015;5:e188.

80. Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, Schölmerich J, Bollheimer LC. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. Journal of Molecular Endocrinology. 2006;36(3):485–501.

81. Delarue J, LeFoll C, Corporeau C, Lucas D. N-3 long chain polyunsaturated fatty acids: a nutritional tool to prevent insulin resistance associated to type 2 diabetes and obesity?. Reproduction Nutrition Development. 2004;44(3):289–299.

82. Molteni R, Barnard RJ, Ying Z, Roberts CK, Gómez-Pinilla F. A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning. Neuroscience. 2002;112(4):803–814.

83. Drougard A, Fournel A, Valet P, Knauf C. Impact of hypothalamic reactive oxygen species in the regulation of energy metabolism and food intake. Frontiers in Neuroscience. 2015;9:56.

84. Lambertucci RH, Hirabara SM, Silveira LdosR, Levada-Pires AC, Curi R, Pithon-Curi TC. Palmitate increases superoxide production through

mitochondrial electron transport chain and NADPH oxidase activity in skeletal muscle cells. Journal of Cellular Physiology. 2008;216(3):796–804.

85. Carraro RS, Souza GF, Solon C, Razolli DS, Chausse B, Barbizan R, Victorio SC, Velloso LA. Hypothalamic mitochondrial abnormalities occur downstream of inflammation in diet-induced obesity. Molecular and Cellular Endocrinology. 2018;460:238–245.

86. Cavaliere G, Trinchese G, Penna E, et al. High-Fat Diet Induces Neuroinflammation and Mitochondrial Impairment in Mice Cerebral Cortex and Synaptic Fraction. Frontiers in Cellular Neuroscience. 2019;13:509.

87. Huang L, Xiao D, Sun H, Qu Y, Su X. Behavioral tests for evaluating the characteristics of brain diseases in rodent models: Optimal choices for improved outcomes (Review). Molecular Medicine Reports. 2022;25(5):183.

88. Hall CS. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. Journal of Comparative Psychology. 1934;18:385–403.

89. Vuralli D, Wattiez AS, Russo AF, Bolay H. Behavioral and cognitive animal models in headache research. The Journal of Headache and Pain. 2019;20(1):11.

90. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. European Journal of Pharmacology. 2003;463(1–3):3–33

91. Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. Journal of Visualized Experiments. 2015;(96):e52434.

92. Pentkowski NS, Rogge-Obando KK, Donaldson TN, Bouquin SJ, Clark BJ. Anxiety and Alzheimer's disease: Behavioral analysis and neural basis in rodent models of Alzheimer's-related neuropathology. Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 2021;127:647–658.

93. Pellow S, File SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. Pharmacology Biochemistry and Behavior. 1986;24(3):525–529.

94. Pinheiro SH, Zangrossi H Jr, Del-Ben CM, Graeff FG. Elevated mazes as animal models of anxiety: Effects of serotonergic agents. Anais da Academia Brasileira de Ciencias. 2007;79(1):71–85.

95. Carobrez AP, Bertoglio LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 2005;29:1193–1205.

96. Snyder JS, Soumier A, Brewer M, Pickel J, Cameron HA. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. Nature. 2011;476:458–461.

97. Berrio JP, Kalliokoski O. Rethinking data treatment: The sucrose preference threshold for anhedonia in stress-induced rat models of depression. Journal of Neuroscience Methods. 2023;395:109910.

98. Liu MY, Yin CY, Zhu LJ, Zhu XH, Xu C, Luo CX, Chen H, Zhu DY, Zhou QG. Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. Nature Protocols. 2018;13:1686–1698.

99. Primo MJ, Fonseca-Rodrigues D, Almeida A, Teixeira PM, Pinto-Ribeiro F. Sucrose preference test: A systematic review of protocols for the assessment of anhedonia in rodents. European Neuropsychopharmacology. 2023;77:80–92.

100. Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. European Journal of Pharmacology. 1978;47:379–391.

101. Bogdanova OV, Kanekar S, D'Anci KE, Renshaw PF. Factors influencing behavior in the forced swim test. Physiology and Behavior. 2013;118:227–239.

102. Armario A. The forced swim test: Historical, conceptual and methodological considerations and its relationship with individual behavioral traits. Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 2021;128:74–86.

103. Borsini F, Meli A. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? Psychopharmacology. 1988;94(2):147–160.

104. Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1. Behavioral data. Behavioural Brain Research. 1988;31:47–59.

105. Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: Neurobiology, test procedure, and its modifications. Cognitive Processing. 2012;13(2):93–110.

106. Grayson B, Leger M, Piercy C, Adamson L, Harte M, Neill JC. Assessment of disease-related cognitive impairments using the novel object recognition (NOR) task in rodents. Behavioural Brain Research. 2015;285:176–193.

107. Cohen SJ, Stackman RW Jr. Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task: A review. Behavioural Brain Research. 2015;285:105–117.

108. Gummesson A, Zack F, Buettner A. 2,4-dinitrophenol intoxication and its morphological findings as an indication of substance intake. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2025;252:116498.

109. Cutting WC, Mehrtens HG, Tainter ML. Actions and uses of dinitrophenol. JAMA. 1933;101:193–195.

110. Sousa D, Carmo H, Roque Bravo R, Carvalho F, Bastos ML, Guedes de Pinho P, Dias da Silva D. Diet aid or aid to die: an update on 2,4-dinitrophenol (2,4-

DNP) use as a weight-loss product. Archives of Toxicology. 2020;94(4):1071–1083.

111. Colman E. Dinitrophenol and obesity: an early twentieth-century regulatory dilemma. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 2007;48:115–117.

112. Bellamy C. From Explosives to Diet Pills: DNP Poisoning in Wales. Pharmacology Matters (British Pharmacological Society). 2021 Mar 24 [cited 2025 Sep 14]. Available from: https://www.bps.ac.uk/publishing/pharmacology-matters/march-2021/from-explosives-to-diet-pills-dnp-poisoning-in-wa.

113. Tainter ML, Stockton AB, Cutting WC. Use of dinitrophenol in obesity and related conditions: a progress report. JAMA. 1933;101:1472–1475.

114. Margo CE, Harman LE. Diet pills and the cataract outbreak of 1935: reflections on the evolution of consumer protection legislation. Survey of Ophthalmology. 2014;59(5):568–573.

115. Kurt TL, Anderson R, Petty C, et al. Dinitrophenol in weight loss: the poison centre and public safety. Veterinary and Human Toxicology. 1986;28:574–575.

116. Geisler JG. Targeting energy expenditure via fuel switching and beyond. Diabetologia. 2011;54(2):237–244

117. Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. Nature. 1961;191:144–148.

118. Cadenas S. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics. 2018;1859(9):940–950.

119. Ikeda K, Yamada T. UCP1 Dependent and Independent Thermogenesis in Brown and Beige Adipocytes. Frontiers in Endocrinology. 2020;11:498.

120. Kotova EA, Antonenko YN. Fifty Years of Research on Protonophores: Mitochondrial Uncoupling as a Basis for Therapeutic Action. Acta Naturae. 2022;14(1):4–13.

121. Saparov SM, Antonenko YN, Pohl P. A new model of weak acid permeation through membranes revisited: does Overton still rule? Biophysical Journal. 2006;90(11):L86–L88.

122. Bertholet AM, Natale AM, Bisignano P, Suzuki J, Fedorenko A, Hamilton J, Brustovetsky T, Kazak L, Garrity R, Chouchani ET, Brustovetsky N, Grabe M, Kirichok Y. Mitochondrial uncouplers induce proton leak by activating AAC and UCP1. Nature. 2022;606(7912):180–187

123. Liu SS. Generating, partitioning, targeting and functioning of superoxide in mitochondria. Bioscience Reports. 1997;17(3):259–272.

124. Perry RJ, Kim T, Zhang XM, Lee HY, Pesta D, Popov VB, Zhang D, Rahimi Y, Jurczak MJ, Cline GW, Spiegel DA, Shulman GI. Reversal of

hypertriglyceridemia, fatty liver disease, and insulin resistance by a liver-targeted mitochondrial uncoupler. Cell Metabolism. 2013;18(5):740–748

125. Lou PH, Hansen BS, Olsen PH, Tullin S, Murphy MP, Brand MD. Mitochondrial uncouplers with an extraordinary dynamic range. Biochemical Journal. 2007;407:129–140.
126. De Felice FG, Ferreira ST. Novel neuroprotective, neuritogenic and anti-amyloidogenic properties of 2,4-dinitrophenol: the gentle face of Janus. IUBMB Life. 2006;58(4):185–191.
127. Geisler JG. 2,4 Dinitrophenol as Medicine. Cells. 2019;8(3):280.
128. Wu B, Jiang M, Peng Q, Li G, Hou Z, Milne GL, Mori S, Alonso R, Geisler JG, Duan W. 2,4 DNP improves motor function, preserves medium spiny neuronal identity, and reduces oxidative stress in a mouse model of Huntington's disease. Experimental Neurology. 2017;293:83–90.
129. Padalko VI. Uncoupler of oxidative phosphorylation prolongs the lifespan of Drosophila. Biochemistry (Moscow). 2005;70(9):986–989.
130. Caldeira da Silva CC, Cerqueira FM, Barbosa LF, Medeiros MH, Kowaltowski AJ. Mild mitochondrial uncoupling in mice affects energy metabolism, redox balance and longevity. Aging Cell. 2008;7(4):552–560.
131. Stier A, Bize P, Massemin S, Criscuolo F. Long-term intake of the illegal diet pill DNP reduces lifespan in a captive bird model. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. 2021;242:108944.
132. Strilbytska OM, Semaniuk U, Yurkevych I, et al. 2,4-Dinitrophenol is toxic on a low caloric diet but extends lifespan of Drosophila melanogaster on nutrient-rich diets without an impact on metabolism. Biogerontology. 2025;26:27.
133. Gospodaryov DV, Yurkevych IS, Jafari M, Lushchak VI, Lushchak OV. Lifespan extension and delay of age-related functional decline caused by Rhodiola rosea depends on dietary macronutrient balance. Longevity & Healthspan. 2013;2(1):5.
134. Semaniuk UV, Gospodaryov DV, Strilbytska OM, Kucharska AZ, Sokół-Łętowska A, Burdyliuk NI, Storey KB, Bayliak MM, Lushchak O. Chili pepper extends lifespan in a concentration-dependent manner and confers cold resistance on Drosophila melanogaster cohorts by influencing specific metabolic pathways. Food & Function. 2022;13(15):8313–8328.
135. Maragos WF, Rockich KT, Dean JJ, Young KL. Pre- or post-treatment with the mitochondrial uncoupler 2,4-dinitrophenol attenuates striatal quinolinate lesions. Brain Research. 2003;966:312–316.
136. Korde AS, Pettigrew LC, Craddock SD, Maragos WF. The mitochondrial uncoupler 2,4-dinitrophenol attenuates tissue damage and improves mitochondrial homeostasis following transient focal cerebral ischemia. Journal of Neurochemistry. 2005;94(6):1676–1684.

137. Palasz E, Wysocka A, Gasiorowska A, Chalimoniuk M, Niewiadomski W, Niewiadomska G. BDNF as a promising therapeutic agent in Parkinson's disease. International Journal of Molecular Sciences. 2020;21(3):1170.

138. Maisonpierre PC, Belluscio L, Squinto S, Ip NY, Furth ME, Lindsay RM, Yancopoulos GD. Neurotrophin-3: A neurotrophic factor related to NGF and BDNF. Science. 1990;247(4949):1446–1451.

139. Brigadski T, Leßmann V. The physiology of regulated BDNF release. Cell and Tissue Research. 2020;382(1):15–45.

140. Trushina E, Trushin S, Hasan F. Mitochondrial Complex I as a Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. Acta Pharmaceutica Sinica B. 2022;12(2):483–495.

141. Li S, Weinstein G, Zare H, Teumer A, et al. The genetics of circulating BDNF: Towards understanding the role of BDNF in brain structure and function in middle and old ages. Brain Communications. 2020;2(2):fcaa078.

142. Colucci-D'Amato L, Speranza L, Volpicelli F. Neurotrophic Factor BDNF, Physiological Functions and Therapeutic Potential in Depression, Neurodegeneration and Brain Cancer. International Journal of Molecular Sciences. 2020;21(20):7777.

143. Kowiański P, Lietzau G, Czuba E, Waśkow M, Steliga A, Moryś J. BDNF: A key factor with multipotent impact on brain signaling and synaptic plasticity. Cellular and Molecular Neurobiology. 2018;38(3):579–593.

144. Ventriglia M, Zanardini R, Bonomini C, Zanetti O, Volpe D, Pasqualetti P, Gennarelli M, Bocchio-Chiavetto L. Serum brain-derived neurotrophic factor levels in different neurological diseases. BioMed Research International. 2013;2013:901082.

145. Fernandes BS, Berk M, Turck CW, Steiner J, Goncalves CA. Decreased peripheral brain-derived neurotrophic factor levels are a biomarker of disease activity in major psychiatric disorders: A comparative meta-analysis. Molecular Psychiatry. 2014;19(7):750–751.

146. Mahmoud R, Kimonis V, Butler GM. Genetics of obesity in humans: A clinical review. International Journal of Molecular Sciences. 2022;23(19):11005.

147. Mruczyk K, Molska M, Wójciak RW, Śliwicka E, Cisek-Woźniak A. Association between cognition, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and macronutrients in normal and overweight postmenopausal women. Experimental Gerontology. 2024;192:112449.

148. Florent B, Maxime B, Catherine-Alexandra G, et al. Differences in cognitive function, cardiorespiratory fitness and BDNF concentration in physically active CHD patients vs healthy controls. Brain Research. 2022;1793:148019.

149. Scharfman HE, MacLusky NJ. Estrogen and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in hippocampus: Complexity of steroid hormone–growth

factor interactions in the adult CNS. Frontiers in Neuroendocrinology. 2006;27(4):415–435.

150. Fortress AM, Kim J, Poole RL, Gould TJ, Frick KM. 17β-estradiol regulates histone alterations associated with memory consolidation and increases Bdnf promoter acetylation in middle-aged female mice. Learning and Memory. 2014;21(9):457–467.

151. Whittemore SR, Seiger A. The expression, localization and functional significance of beta-nerve growth factor in the central nervous system. Brain Research Reviews. 1987;434(4):439–464.

152. Black IB. Trophic molecules and evolution of the nervous system. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1986;83(21):8249–8252.

153. Salsabil L, Shahriar M, Islam SMA, Bhuiyan MA, Qusar MS, Islam MR. Higher serum nerve growth factor levels are associated with major depressive disorder pathophysiology: A case-control study. The Journal of International Medical Research. 2023;51(4):3000605231166222.

154. Frade JM, Barde YA. Nerve growth factor: Two receptors, multiple functions. BioEssays. 1998;20(2):137–145.

155. Vega JA, García-Suárez O, Hannestad J, Pérez-Pérez M, Germanà A. Neurotrophins and the immune system. Journal of Anatomy. 2003;203(1):1–19.

156. Mondal AC, Fatima M. Direct and indirect evidences of BDNF and NGF as key modulators in depression: Role of antidepressant treatment. International Journal of Neuroscience. 2019;129(3):283–296.

157. Galvez-Contreras AY, Campos-Ordonez T, Lopez-Virgen V, et al. Growth factors as clinical biomarkers of prognosis and diagnosis in psychiatric disorders. Cytokine and Growth Factor Reviews. 2016;32:85–96.

158. Montalcini R, Aloe L, Alleva E. A role for nerve growth factor in nervous, endocrine and immune systems. Progress in Neuroendocrinoimmunology. 1990;3:1–10.

159. Maes M, Rachayon M, Jirakran K, Sodsai P, Sughondhabirom A. Lower nerve growth factor levels in major depression and suicidal behaviors: Effects of adverse childhood experiences and recurrence of illness. Brain Sciences. 2023;13(7):1090.

160. Espinosa-Raya J, Plata-Cruz N, Neri-Gómez T, Camacho-Arroyo I, Picazo O. Effects of short-term hormonal replacement on learning and on basal forebrain ChAT and TrkA content in ovariectomized rats. Brain Research. 2011;1375:77–84.

161. Otero M, Lago R, Lago F, Casanueva FF, Dieguez C, Gómez-Reino JJ, Gualillo O. Leptin: A metabolic hormone that functions like a proinflammatory adipokine. Drug News & Perspectives. 2006;19(1):21–26.

162. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. Cell. 1995;83(7):1263–1271.

163. Klok MD, Jakobsdottir S, Drent ML. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: A review. Obesity Reviews. 2007;8(1):21–34.

164. Cone RD. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. Nature Neuroscience. 2005;8(5):571–578.

165. Perakakis N, Farr OM, Mantzoros CS. Leptin in leanness and obesity: JACC State-of-the-Art Review. Journal of the American College of Cardiology. 2021;77(6):745–760.

166. Zou X, Zhong L, Zhu C, Zhao H, Zhao F, Cui R, Gao S, Li B. Role of leptin in mood disorder and neurodegenerative disease. Frontiers in Neuroscience. 2019;13:378.

167. Mainardi M, Pizzorusso T, Maffei M. Environment, leptin sensitivity, and hypothalamic plasticity. Neural Plasticity. 2013;2013:438072.

168. Ge T, Fan J, Yang W, Cui R, Li B. Leptin in depression: A potential therapeutic target. Cell Death & Disease. 2018;9(11):1096.

169. AlGhamdi S, Alsulami N, Khoja S, Alsufiani H, Tayeb HO, Alshaibi H, Tarazi FI. Serum ghrelin and leptin concentrations in patients with major depressive disorder before and after supplementation with vitamin D3. Depression and Anxiety. 2024;2024:2057881.

170. Kraus T, Haack M, Schuld A, Hinze-Selch D, Pollmächer T. Low leptin levels but normal body mass indices in patients with depression or schizophrenia. Neuroendocrinology. 2001;73(4):243–247.

171. Milaneschi Y, Lamers F, Bot M, Drent ML, Penninx BWJH. Leptin dysregulation is specifically associated with major depression with atypical features: Evidence for a mechanism connecting obesity and depression. Biological Psychiatry. 2017;81(9):807–814.

172. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. Physiological Reviews. 2018;98(4):2133–2223.

173. Ashcroft FM, Rorsman P. Diabetes mellitus and the β cell: the last ten years. Cell. 2012;148(6):1160–1171.

174. Haeusler RA, McGraw TE, Accili D. Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2018;19:31–44.

175. Belfiore A, et al. Insulin receptor isoforms in physiology and disease: an updated view. Endocrine Reviews. 2017;38(5):379-431.

176. Yunn NO, Kim J, Ryu SH, Cho Y. A stepwise activation model for the insulin receptor. Experimental & Molecular Medicine. 2023;55(10):2147–2161

177. Sangwung P, Petersen KF, Shulman GI, Knowles JW. Mitochondrial Dysfunction, Insulin Resistance, and Potential Genetic Implications. Endocrinology. 2020;161(4):bqaa017

178. Meyer MR, Clegg DJ, Prossnitz ER, Barton M. Obesity, insulin resistance and diabetes: sex differences and role of oestrogen receptors. Acta Physiologica (Oxford, England). 2011;203(1):259–269.

179. Gupte AA, Pownall HJ, Hamilton DJ. Estrogen: an emerging regulator of insulin action and mitochondrial function. Journal of Diabetes Research. 2015;2015:916585.

180. Zhou Z, Moore TM, Strumwasser AR, Ribas V, Iwasaki H, Morrow N, Ma A, Tran PH, Wanagat J, de Aguiar Vallim TQ, Clifford B, Zhang Z, Sallam T, Parks BW, Reue K, Shirihai O, Acin-Perez R, Morselli M, Pellegrini M, Mahata SK, et al. Muscle metabolic resilience and enhanced exercise adaptation by Esr1-induced remodeling of mitochondrial cristae-nucleoid architecture in males. Cell Reports Medicine. 2025;6(5):102116

181. Pu D, Tan R, Yu Q. Metabolic syndrome in menopause and associated factors: a meta-analysis. Climacteric. 2017;20:583–591.

182. Kim JE, Choi J, Park J. Associations of postmenopausal hormone therapy with metabolic syndrome among diabetic and non-diabetic women. Maturitas. 2019;121:76–82.

183. Kanaya AM, Herrington D, Vittinghoff E, et al. Glycemic effects of postmenopausal hormone therapy: the Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Annals of Internal Medicine. 2003;138(1):1–9.

184. Nishida Y, Nawaz A, Kado T, Takikawa A, Igarashi Y, Onogi Y, et al. Astaxanthin stimulates mitochondrial biogenesis in insulin resistant muscle via activation of AMPK pathway. Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle. 2020;11:241–258.

185. Sebastián D, Hernández-Alvarez MI, Segalés J, Sorianello E, Muñoz JP, Sala D, et al. Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2012;109:5523–5528.

186. Henschke S, Nolte H, Magoley J, Kleele T, Brandt C, Hausen AC, et al. Food perception promotes phosphorylation of MFFS131 and mitochondrial fragmentation in liver. Science. 2024;384:438–446.

187. Landrier JF, Kasiri E, Karkeni E, Mihály J, Béke G, Weiss K, et al. Reduced adiponectin expression after high-fat diet is associated with selective up-regulation of ALDH1A1 and further retinoic acid receptor signaling in adipose tissue. The FASEB Journal. 2017;31(1):203–211.

188. Marques C, Meireles M, Norberto S, Leite J, Freitas J, Pestana D, Faria A, Calhau C. High-fat diet-induced obesity rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley rat. Adipocyte. 2015;5(1):11–21.

189. Axelrod CL, Fealy CE, Erickson ML, Davuluri G, Fujioka H, Dantas WS, Huang E, Pergola K, Mey JT, King WT, Mulya A, Hsia D, Burguera B, Tandler B, Hoppel CL, Kirwan JP. Lipids activate skeletal muscle mitochondrial fission and quality control networks to induce insulin resistance in humans. Metabolism: Clinical and Experimental. 2021;121:154803.

190. Jacobs AJ, Roskam AL, Hummel FM, Ronan PJ, Gorres-Martens BK. Exercise improves high-fat diet- and ovariectomy-induced insulin resistance in rats with altered hepatic fat regulation. Current Research in Physiology. 2020;3:11–19.

191. Sama S, Jain G, Kant R, Bhadoria AS, Naithani M, Kumar A. Quantifying the Homeostatic Model Assessment of Insulin Resistance to Predict Mortality in Multi-organ Dysfunction Syndrome. Indian Journal of Critical Care Medicine. 2021;25(12):1364–1369.

192. Paiva IHR, Maciel LM, Silva RSD, Mendonça IP, Souza JRB, Peixoto CA. Prebiotics modulate the microbiota–gut–brain axis and ameliorate anxiety and depression-like behavior in HFD-fed mice. Food Research International. 2024;182:114153.

193. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. Behavior Research Methods. 2007;39(2):175–191.

194. Wu J, Xu H, Wang S, Weng H, Luo Z, Ou G, Chen Y, Xu L, So KF, Deng L, Zhang L, Chen X. Regular exercise ameliorates high-fat diet-induced depressive-like behaviors by activating hippocampal neuronal autophagy and enhancing synaptic plasticity. Cell Death & Disease. 2024;15(10):737.

195. Yakan B, Yay A, Rıhtım T, Doğanyiğit Z. Dişi sıçan midesinde ghrelin ekspresyonu üzerine ovariektominin etkilerinin analizi. Bozok Tıp Dergisi. 2017;7(1):22–31.

196. Baloğlu M, Gökalp-Özkorkmaz E. Ovarektomize sıçanlarda kan ve tibia kemik dokularında akut dönemde meydana gelen değişikliklerin biyokimyasal, histopatolojik ve immünohistokimyasal yönden değerlendirilmesi. Kocatepe Tıp Dergisi. 2020;21(4):306–311.

197. Akdeniz GT, Bildik A. Ovariektomize ratlarda borik asit uygulamasının kemik metabolizması üzerine olası etkisi. Animal Health, Production and Hygiene. 2017;6(2):526–530.

198. O'Neill N, Khan RS, Abd Alhadi S, Dine KE, Geisler JG, Chaqour B, Ross AG, Shindler KS. Mitochondrial uncoupler, 2,4-dinitrophenol, reduces spinal cord paralysis and retinal ganglion cell loss in the experimental autoimmune

encephalomyelitis model of multiple sclerosis. Biomolecules. 2025;15(2):189.

199. Hu C, Luo Y, Wang H, Kuang S, Liang G, Yang Y, Mai S, Yang J. Re-evaluation of the interrelationships among the behavioral tests in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. PLoS One. 2017;12(9):e0185129.

200. Sestakova N, Puzserova A, Kluknavsky M, Bernatova I. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide. Interdisciplinary Toxicology. 2013;6(3):126–135.

201. Choi B, Jung D. Open-field test. Bio-protocol Preprint. 2021. Available from: bio-protocol.org/prep1019.

202. Liebsch G, Montkowski A, Holsboer F, Landgraf R. Behavioural profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behaviour. Behavioural Brain Research. 1998;94:301–310.

203. Lueptow LM. Novel object recognition test for the investigation of learning and memory in mice. Journal of Visualized Experiments. 2017;126:e55718.

204. Güvel MC, Aykan U, Paykal G, Uluoğlu C. Chronic administration of caffeine, modafinil, AVL-3288 and CX516 induces time-dependent complex effects on cognition and mood in an animal model of sleep deprivation. Pharmacology Biochemistry and Behavior. 2024;241:173793.

205. Küçükkarapınar M, Dönmez A, Candansayar S, Bozkurt A, Akçay E, Gülbahar Ö. Erken dönem müdahalelerin erişkin Wistar sıçanlarında davranışsal ve nörogelişimsel etkileri. Archives of Neuropsychiatry. 2020.

206. Komada M, Takao K, Miyakawa T. Elevated plus maze for mice. Journal of Visualized Experiments. 2008;(22):1088.

207. Leo LM, Pamplona FA. Elevated Plus Maze Test to Assess Anxiety-like Behavior in the Mouse. Bio-protocol. 2014;4(16):e1211.

208. Elabscience. Rat BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) ELISA Kit instruction manual (Cat. No. E-EL-R1235). 2024. Elabscience Biotechnology Inc. Available from: https://www.elabscience.com/p/rat-bdnf-brain-derived-neurotrophic-factor-elisa-kit--e-el-r1235

209. Elabscience. Rat NGF (Nerve Growth Factor) ELISA Kit instruction manual (Cat. No. E-EL-R0652). 2024. Elabscience Biotechnology Inc. Available from: https://www.elabscience.com/p/rat-ngf-nerve-growth-factor-elisa-kit--e-el-r0652

210. Elabscience. Rat Leptin ELISA Kit instruction manual (Cat. No. E-EL-R0582). 2024. Elabscience Biotechnology Inc. Available from: https://www.elabscience.com/p/rat-lep-leptin-elisa-kit--e-el-r0582

211. Elabscience. Rat Insulin ELISA Kit instruction manual (Cat. No. E-EL-R3034). 2024. Elabscience Biotechnology Inc. Available from: https://www.elabscience.com/p/rat-ins-insulin-elisa-kit--e-el-r3034

212. Şimşek AS. The power and type I error of Wilcoxon–Mann–Whitney, Welch's t, and Student's t tests for Likert-type data. International Journal of Assessment Tools in Education. 2023;10(1):114–128.

213. Ghasemi A, Zahediasl S. Normality tests for statistical analysis: a guide for non-statisticians. International Journal of Endocrinology and Metabolism. 2012;10(2):486–489.

214. Sullivan LM, Weinberg J, Keaney JF Jr. Common statistical pitfalls in basic science research. Journal of the American Heart Association. 2016;5(10):e004142.

215. Lemini C, Jaimez R, Figueroa A, Martinez-Mota L, Avila ME, Medina M. Ovariectomy differential influence on some hemostatic markers of mice and rats. Exp Anim. 2015;64(1):81–89.

216. Kitajima Y, Doi H, Ono Y, Urata Y, Goto S, Kitajima M, et al. Estrogen deficiency heterogeneously affects tissue-specific stem cells in mice. Sci Rep. 2015;5:12861.

217. Cooke PS, Buchanan DL, Young P, Setiawan T, Brody J, Korach KS, et al. Stromal estrogen receptors mediate mitogenic effects of estradiol on uterine epithelium. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(12):6535–6540.

218. Cunha GR, Cooke PS, Kurita T. Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. Arch Histol Cytol. 2004;67(5):417–434.

219. Witte MM, Resuehr D, Chandler AR, Mehle AK, Overton JM. Female mice and rats exhibit species-specific metabolic and behavioral responses to ovariectomy. Gen Comp Endocrinol. 2010;166(3):520–528.

220. Grabowska K, Grabowski M, Morys J, Olakowska E, Małecki A, Barski JJ, et al. Age-dependent neuroinflammation response to voluntary wheel running and metformin treatment in the frontal cortex of ovariectomized female mice. Sci Rep. 2025;15(1):26382.

221. Miller CK, Meitzen J. No detectable changes in anxiety-related and locomotor behaviors in adult ovariectomized female rats exposed to estradiol, the ERβ agonist DPN or the ERα agonist PPT. Horm Behav. 2023;152:105363.

222. Ogawa S, Chan J, Gustafsson JA, Korach KS, Pfaff DW. Estrogen increases locomotor activity in mice through estrogen receptor alpha: specificity for the type of activity. Endocrinology. 2003;144(1):230–239.

223. Ajayi AM, John KA, Emmanuel IB, Chidebe EO, Adedapo ADA. High-fat diet-induced memory impairment and anxiety-like behavior in rats attenuated by peel extract of Ananas comosus fruit via atheroprotective, antioxidant and anti-inflammatory actions. Metab Open. 2021;9:100077.

224. Sivanathan S, Thavartnam K, Arif S, Elegino T, McGowan PO. Chronic high-fat feeding increases anxiety-like behaviour and reduces transcript abundance of glucocorticoid signalling genes in the hippocampus of female rats. Behav Brain Res. 2015;286:265–270.

225. Xu L, Xu S, Lin L, Gu X, Fu C, Fang Y, et al. High-fat diet mediates anxiolytic-like behaviors in a time-dependent manner through the regulation of SIRT1 in the brain. Neuroscience. 2018;372:237–245.

226. Huang H, Huang J, Lu W, Huang Y, Luo R, Bathalian L, et al. A four-week high-fat diet induces anxiolytic-like behaviors through mature BDNF in the mPFC of mice. Brain Sci. 2024;14(4):389.

227. Yoshizaki K, Asai M, Hara T. High-fat diet enhances working memory in the Y-maze test in male C57BL/6J mice with less anxiety in the elevated plus maze test. Nutrients. 2020;12(7):2036.

228. Dornellas APS, Boldarine VT, Pedroso AP, Carvalho LOT, de Andrade IS, Vulcani-Freitas TM, dos Santos CCC, do Nascimento CMdPO, Oyama LM, Ribeiro EB. Corrigendum: High-Fat Feeding Improves Anxiety-Type Behavior Induced by Ovariectomy in Rats. Front Neurosci. 2018;12:738.

229. Puga-Olguín A, Rodríguez-Landa JF, Rovirosa-Hernández MJ, Germán-Ponciano LJ, Caba M, Meza E, et al. Long-term ovariectomy increases anxiety- and despair-like behaviors associated with lower Fos immunoreactivity in the lateral septal nucleus in rats. Behav Brain Res. 2019;360:185–195.

230. Abdelati A, Burns MM, Chary M. Sublethal toxicities of 2,4-dinitrophenol as inferred from online self-reports. PLoS One. 2023;18(9):e0290630.

231. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US). Toxicological profile for dinitrophenols. Atlanta (GA): ATSDR; 2021 Aug. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK590065/

232. Coppola A, Liu ZW, Andrews ZB, Paradis E, Roy MC, Friedman JM, et al. A central thermogenic-like mechanism in feeding regulation: an interplay between arcuate nucleus T3 and UCP2. Cell Metab. 2007;5:21–33.

233. Gimsa U, Kanitz E, Otten W, Aheng C, Tuchscherer M, Ricquier D, et al. Alterations in anxiety-like behavior following knockout of the uncoupling protein 2 (UCP2) gene in mice. Life Sci. 2011;89(19–20):677–684.

234. Trankner D, Boulet A, Peden E, Focht R, Van Deren D, Capecchi M. A microglia sublineage protects from sex-linked anxiety symptoms and obsessive compulsion. Cell Rep. 2019;29:791–799.e3.

235. Mondelli V, Vernon AC, Turkheimer F, Dazzan P, Pariante CM. Brain microglia in psychiatric disorders. Lancet Psychiatry. 2017;4:563–572.

236. Yasumoto Y, Stoiljkovic M, Kim JD, Sestan-Pesa M, Gao XB, Diano S, et al. UCP2-dependent microglia-neuronal coupling controls ventral

hippocampal circuit function and anxiety-like behavior. Mol Psychiatry. 2021;26(7):2740–2752

237. He M, Ma Y, Wang R, Zhang J, Jing L, Li PA. Deletion of mitochondrial uncoupling protein 2 exacerbates mitochondrial damage in mice subjected to cerebral ischemia and reperfusion injury under both normo- and hyperglycemic conditions. Int J Biol Sci. 2020;16(15):2788–2802.

238. Thomou C, Nussbaumer M, Grammenou E, Komini C, Vlaikou AM, Papageorgiou MP, et al. Early handling exerts anxiolytic effects and alters brain mitochondrial dynamics in adult high anxiety mice. Mol Neurobiol. 2024;61(12):10593–10612.

239. Marques-Aleixo I, Santos-Alves E, Balca MM, Moreira PI, Oliveira PJ, Magalhães J, et al. Physical exercise mitigates doxorubicin-induced brain cortex and cerebellum mitochondrial alterations and cellular quality control signaling. Mitochondrion. 2016;26:43–57.

240. Gomez-Pinilla F, Vaynman S, Ying Z. Brain-derived neurotrophic factor functions as a metabotrophin to mediate the effects of exercise on cognition. Eur J Neurosci. 2008;28:2278–2287.

241. Yeni Y, Cicek B, Hacimuftuoglu A, Ozkaraca M, Lacin BB. Protective effect of HMG-CoA reductase inhibitor rosuvastatin on doxorubicin-induced cognitive impairment, oxidative stress and neuroinflammation: possible role of CREB, ERK1/2, and BDNF. J Neuroimmune Pharmacol. 2025;20(1):53.

242. Emre-Aydingöz S, Lux KM, Efe OE, Topcu DI, Erdem SR. Effect of rosuvastatin on spatial learning, memory, and anxiety-like behaviour in ovariectomized rats. J Obstet Gynaecol. 2022;42(7):3268–3276.

243. Wei W, Peng J, Shen T. Rosuvastatin alleviates ischemia/reperfusion injury in cardiomyocytes by downregulating hsa-miR-24-3p to target upregulated uncoupling protein 2. Cell Reprogramming. 2019;21(2):99–107.

244. Wada T, Sameshima A, Yonezawa R, Morita M, Sawakawa K, Tsuneki H**,** et al**.** Impact of central and peripheral estrogen treatment on anxiety and depression phenotypes in a mouse model of postmenopausal obesity. PLoS One. 2018;13(12):e0209859.

245. Hu J, Zhang S, Wu H, Wang L, Zhang Y, Gao H, Li M, Ren H, Xiao H, Guo K, Li W, Liu Q. 1-Methyltryptophan treatment ameliorates high-fat diet-induced depression in mice through reversing changes in perineuronal nets. Transl Psychiatry. 2024 May 30;14(1):228.

246. Grigoryan GA. Ovariectomy as a model of anxiety-depressive disorders. Neurochemical Journal. 2022;16(1):1–13.

247. Lagunas N, Calmarza-Font I, Diz-Chaves Y, Garcia-Segura LM. Long-term ovariectomy enhances anxiety and depressive-like behaviors in mice submitted to chronic unpredictable stress. Horm Behav. 2010;58(5):786–791.

248. Décarie-Spain L, Sharma S, Hryhorczuk C, Issa-Garcia V, Barker PA, Arbour N, et al. Nucleus accumbens inflammation mediates anxiodepressive behavior and compulsive sucrose seeking elicited by saturated dietary fat. *Mol Metab.* 2018;10:1–13.

249. Hassan AM, Mancano G, Kashofer K, Liebisch G, Farzi A, Zenz G, et al. Anhedonia induced by high-fat diet in mice depends on gut microbiota and leptin. Nutr Neurosci. 2022;25(2):299–312.

250. Wulff AB, Cooper P, Kodjo E, Abel E, Thompson SM. How sucrose preference is gained and lost: an in-depth analysis of drinking behavior during the sucrose preference test in mice. eNeuro. 2023;10(9):ENEURO.0195-23.2023.

251. de Kloet ER, Molendijk ML. Coping with the forced swim stressor: towards understanding an adaptive mechanism. Neural Plast. 2016;2016:6503162.

252. Manolova AO, Stepanichev MYu, Gulyaeva NV. Behavior of rats in a forced swimming test is not an unambiguous predictor for the development of anhedonia in chronic stress. Neurosci Behav Physiol. 2019;49:1016–1021.

253. Tompa R. Six distinct types of depression identified in Stanford Medicine-led study [Internet]. Stanford (CA): Stanford Medicine; 2024 Jun 17 [cited 2025 Nov 7]. Available from: https://med.stanford.edu/news/all-news/2024/06/depression-biotypes.html

254. Williams LM, Yesavage J. Cognitive control circuit function predicts antidepressant outcomes: a signal detection approach to actionable clinical decisions. Pers Med Psychiatry. 2024;45–46:100126.

255. Treadway MT, Zald DH. Reconsidering anhedonia in depression: Lessons from translational neuroscience. Neurosci Biobehav Rev. 2011;35(3):537-555.

256. Sun XL, Liu Y, Dai T, Ding JH, Hu G. Uncoupling protein 2 knockout exacerbates depression-like behaviors in mice via enhancing inflammatory response. Neuroscience. 2011;192:507–514.

257. Du RH, Wu FF, Lu M, Shu XD, Ding JH, Wu G, et al. Uncoupling protein 2 modulation of the NLRP3 inflammasome in astrocytes and its implications in depression. Redox Biol. 2016;9:178–187.

258. Jiang M, Wang L, Sheng H. Mitochondria in depression: the dysfunction of mitochondrial energy metabolism and quality control systems. CNS Neuroscience & Therapeutics. 2024;30(2):e14576.

259. Yu Y, Yapeng H, Liu Z, Fang L, Li J, Luan Y, Li W, Cong H, Wu X. Mitochondrial dysfunction in perimenopausal mood disorders: from hormonal shifts to neuroenergetic failure (Review). International Journal of Molecular Medicine. 2025;56(6):215.

260. Sagliocchi S, Restolfer F, Cossidente A, Dentice M. The key roles of thyroid hormone in mitochondrial regulation, at interface of human health and

disease. Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology. 2024;35(4–5):231–240.

261. Yehuda-Shnaidman E, Kalderon B, Azazmeh N, Bar-Tana J. Gating of the mitochondrial permeability transition pore by thyroid hormone. FASEB Journal. 2010;24:93–104.

262. Touma KTB, Zoucha AM, Scarff JR. Liothyronine for depression: a review and guidance for safety monitoring. Innovations in Clinical Neuroscience. 2017;14(3–4):24–29.

263. Braz GRF, Silva SCA, Pedroza AADS, de Lemos MD, de Lima FA, da Silva AI, Lagranha CJ. Fluoxetine administration in juvenile overfed rats improves hypothalamic mitochondrial respiration and REDOX status and induces mitochondrial biogenesis transcriptional expression. European Journal of Pharmacology. 2020;881:173200.

264. Chen WJ, Du JK, Hu X, Yu Q, Li DX, Wang CN, Zhu XY, Liu YJ. Protective effects of resveratrol on mitochondrial function in the hippocampus improves inflammation-induced depressive-like behavior. Physiology & Behavior. 2017;182:54–61

265. Lee Y, Heo G, Lee KM, Kim AH, Chung KW, Im E, Chung HY, Lee J. Neuroprotective effects of 2,4-dinitrophenol in an acute model of Parkinson's disease. Brain Research. 2017;1663:184–193.

266. Bekci E, Gokmen RC, Kanit L, Gozen O, Balkan B, Koylu EO, Keser A. Enhanced Novel Object Recognition and Spatial Memory in Rats Selectively Bred for High Nicotine Preference. Brain Sciences. 2024;14(5):427.

267. Abi-Ghanem C, Kelly RD, Groom EA, Valerian CG, Paul AS, Thrasher CA, Salinero AE, Batchelder MR, Lafrican JJ, Wang M, Smith RM, Temple S, Zuloaga DG, Zuloaga KL. Interactions between menopause and high-fat diet on cognition and pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. Alzheimer’s & Dementia. 2025;21(3):e70026.

268. McLean FH, Grant C, Morris AC, Horgan GW, Polanski AJ, Allan K, Campbell FM, Langston RF, Williams LM. Rapid and reversible impairment of episodic memory by a high-fat diet in mice. Scientific Reports. 2018;8(1):11976.

269. Heyward FD, Walton RG, Carle MS, Coleman MA, Garvey WT, Sweatt JD. Adult mice maintained on a high-fat diet exhibit object location memory deficits and reduced hippocampal SIRT1 gene expression. Neurobiology of Learning and Memory. 2012;98(1):25–32.

270. Cordner ZA, Tamashiro KL. Effects of high-fat diet exposure on learning & memory. Physiology & Behavior. 2015;152(Pt B):363–371.

271. Tao X, Yan M, Wang L, Zhou Y, Wang Z, Xia T, Liu X, Pan R, Chang Q. Effects of estrogen deprivation on memory and expression of related proteins in ovariectomized mice. Annals of Translational Medicine. 2020;8(6):356.

272. Liu D, Zhang Y, Gharavi R, Park HR, Lee J, Siddiqui S, Telljohann R, Nassar MR, Cutler RG, Becker KG, Mattson MP. The mitochondrial uncoupler DNP triggers brain cell mTOR signaling network reprogramming and CREB pathway up-regulation. Journal of Neurochemistry. 2015;134(4):677–692.

273. Hubbard WB, Harwood CL, Geisler JG, Vekaria HJ, Sullivan PG. Mitochondrial uncoupling prodrug improves tissue sparing, cognitive outcome, and mitochondrial bioenergetics after traumatic brain injury in male mice. Journal of Neuroscience Research. 2018;96(10):1677–1688.

274. Aribal P, Alver EN, Kaltalioglu K, Balabanli B, Ebegil M, Coskun-Cevher S. The relationship between experimental 2,4-dinitrophenol administration and neurological oxidative stress: in terms of dose, time and gender differences. Molecular and Cellular Biochemistry. 2023;478(5):1161–1168.

275. Rogers NH, Perfield JW 2nd, Strissel KJ, Obin MS, Greenberg AS. Reduced energy expenditure and increased inflammation are early events in the development of ovariectomy-induced obesity. Endocrinology. 2009;150(5):2161–2168.

276. Boldarine VT, Joyce E, Pedroso AP, Telles MM, Oyama LM, Bueno AA, Ribeiro EB. Oestrogen replacement fails to fully revert ovariectomy-induced changes in adipose tissue monoglycerides, diglycerides and cholesteryl esters of rats fed a lard-enriched diet. Scientific Reports. 2021;11(1):3841.

277. Fenton A. Weight, Shape, and Body Composition Changes at Menopause. Journal of Mid-life Health. 2021;12(3):187–192.

278. Simpson SJ, Raubenheimer D, Black KI, Conigrave AD. Weight gain during the menopause transition: Evidence for a mechanism dependent on protein leverage. *BJOG*: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology. 2023;130(1):4–10.

279. Marková I, Hüttl M, Miklánková D, Šedová L, Šeda O, Malínská H. The Effect of Ovariectomy and Estradiol Substitution on the Metabolic Parameters and Transcriptomic Profile of Adipose Tissue in a Prediabetic Model. Antioxidants (Basel, Switzerland). 2024;13(6):627.

280. Steiner BM, Berry DC. The Regulation of Adipose Tissue Health by Estrogens. Frontiers in Endocrinology. 2022;13:889923.

281. Juppi HK, Sipilä S, Fachada V, Hyvärinen M, Cronin N, Aukee P, Karppinen JE, Selänne H, Kujala UM, Kovanen V, Karvinen S, Laakkonen EK. Total and regional body adiposity increases during menopause—evidence from a follow-up study. Aging Cell. 2022;21(6):e13621.

282. Abildgaard J, Ploug T, Al-Saoudi E, et al. Changes in abdominal subcutaneous adipose tissue phenotype following menopause is associated with increased visceral fat mass. Scientific Reports. 2021;11:14750.

283. Boldarine VT, Pedroso AP, Brandão-Teles C, LoTurco EG, Nascimento CMO, Oyama LM, Bueno AA, Martins-de-Souza D, Ribeiro EB.

Ovariectomy modifies lipid metabolism of retroperitoneal white fat in rats: a proteomic approach. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 2020;319(2):E427–E437.

284. Cameron N, Godino JG, Skipper T, Dillon L, Waalen J, Hill L, Patrick K. Associations between reliable changes in depression and changes in BMI, total body fatness and visceral adiposity during a 12-month weight loss trial. International Journal of Obesity. 2019;43(9):1859–1862.

285. Lee JI, Busler JN, Millett CE, Principe JL, Levin LL, Corrigan A, Burdick KE. Association between visceral adipose tissue and major depressive disorder across the lifespan: A scoping review. Bipolar Disorders. 2022;24(4):375–391.

286. Murabito JM, Massaro JM, Clifford B, Hoffmann U, Fox CS. Depressive symptoms are associated with visceral adiposity in a community-based sample of middle-aged women and men. Obesity. 2013;21(8):1713–1719.

287. Pasquali R, Casimirri F, Pascal G, Tortelli O, Morselli Labate A, Bertazzo D, Vicennati V, Gaddi A. Influence of menopause on blood cholesterol levels in women: the role of body composition, fat distribution and hormonal milieu. Journal of Internal Medicine. 1997;241(3):195–203.

288. Ryou SH, Kang MS, Kim KI, Kang YH, Kang JS. Effects of green tea or *Sasa quelpaertensis* bamboo leaves on plasma and liver lipids, erythrocyte Na efflux, and platelet aggregation in ovariectomized rats. Nutrition Research and Practice. 2012;6(2):106–112.

289. Muhammad MH, Hussien NI, Elwia SK. Vitamin D Replacement Mitigates Menopause-Associated Dyslipidaemia and Atherogenic Indices in Ovariectomized Rats; A Biochemical Study. Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes: Official Journal of the German Society of Endocrinology and the German Diabetes Association. 2020;128(3):144–151.

290. Zhukova NV, Novgorodtseva TP, Denisenko YK. Effect of the prolonged high-fat diet on the fatty acid metabolism in rat blood and liver. Lipids in Health and Disease. 2014;13:49.

291. Hogarth CA, Roy A, Ebert DL. Genomic evidence for the absence of a functional cholesteryl ester transfer protein gene in mice and rats. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology. 2003;135(2):219–229.

292. Huang C, Zhang J, Huang J, et al. Proteomic and functional analysis of HDL subclasses in humans and rats: a proof-of-concept study. *Lipids in Health and Disease*. 2023;22:86.

293. Lei Z, Wu H, Yang Y, Hu Q, Lei Y, Liu W, Nie Y, Yang L, Zhang X, Yang C, Lin T, Tong F, Zhu J, Guo J. Ovariectomy Impaired Hepatic Glucose and Lipid Homeostasis and Altered the Gut Microbiota in Mice With Different Diets. Frontiers in Endocrinology. 2021;12:708838.

294. Samuel VT, Petersen KF, Shulman GI. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. Journal of Biological Chemistry. 2004;279(31):32345–32353.

295. Alexopoulos SJ, Chen SY, Brandon AE, Byrne FL, Garcia CJ, Beretta M, Olzomer EM, Shah DP, Philp A, Ayala V, Hoehn KL. Mitochondrial uncoupler BAM15 reverses diet-induced obesity and insulin resistance in mice. Nature Communications. 2020;11:2397.

296. Xiong G, Zhang K, Ma Y, Song Y, Zhang W, Qi T, Qiu H, Shi J, Kan C, Zhang J, Sun X. BAM15 as a mitochondrial uncoupler: a promising therapeutic agent for diverse diseases. Frontiers in Endocrinology. 2023;14:1252141.

297. Chen SY, Beretta M, Olzomer EM, Alexopoulos SJ, Shah DP, Byrne FL, Salamoun JM, Garcia CJ, Smith GC, Larance M, Philp A, Turner N, Santos WL, Cantley J, Hoehn KL. Head-to-head comparison of BAM15, semaglutide, rosiglitazone, NEN, and calorie restriction on metabolic physiology in female db/db mice. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease. 2024;1870(1):166908.

298. Le May C, Chu K, Hu M, Ortega CS, Simpson ER, Korach KS, Tsai MJ, Mauvais-Jarvis F. Estrogens protect pancreatic beta-cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2006;103(24):9232–9237.

299. El Seifi S, Green IC, Perrin D. Insulin release and steroid-hormone binding in isolated islets of Langerhans in the rat: effects of ovariectomy. Journal of Endocrinology. 1981;90(1):59–67.

300. Ghaemmaleki F, Mohammadi P, Baeeri M, Navaei-Nigjeh M, Abdollahi M, Mostafalou S. Estrogens counteract tributyltin-induced toxicity in the rat islets of Langerhans. Heliyon. 2020;6(3):e03562.

301. von Frankenberg AD, Marina A, Song X, Callahan HS, Kratz M, Utzschneider KM. A high-fat, high-saturated fat diet decreases insulin sensitivity without changing intra-abdominal fat in weight-stable overweight and obese adults. European Journal of Nutrition. 2017;56(1):431–443.

302. Whitcroft S, Herriot A. Insulin resistance and management of the menopause: a clinical hypothesis in practice. Menopause International. 2011;17(1):24–28.

303. Tao H, Zhang Y, Zeng X, Shulman GI, Jin S. Niclosamide ethanolamine-induced mild mitochondrial uncoupling improves diabetic symptoms in mice. Nature Medicine. 2014;20(11):1263–1269.

304. Cong LN, Chen H, Li Y, Zhou L, McGibbon MA, Taylor SI, Quon MJ. Physiological role of Akt in insulin-stimulated translocation of GLUT4 in transfected rat adipose cells. Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.). 1997;11(13):1881–1890.

305. Szendroedi J, Yoshimura T, Phielix E, Koliaki C, Marcucci M, Zhang D, Jelenik T, Müller J, Herder C, Nowotny P, Shulman GI, Roden M. Role of diacylglycerol activation of PKCθ in lipid-induced muscle insulin resistance in humans. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2014;111(26):9597–9602.

306. Chen Y, Liu X, Liu Y, Li Y, Li D, Mei Z, Deng Y. Mitochondrial quality control in diabetes mellitus and complications: molecular mechanisms and therapeutic strategies. Cell Death & Disease. 2025;16(1):652.

307. Fiorenza M, Onslev J, Henríquez-Olguín C, Persson KW, Hesselager SA, Jensen TE, Wojtaszewski JFP, Hostrup M, Bangsbo J. Reducing the mitochondrial oxidative burden alleviates lipid-induced muscle insulin resistance in humans. Science Advances. 2024;10(44):eadq4461.

308. Lin X, Chavez MR, Bruch RC, Kilroy GE, Simmons LA, Lin L, Braymer HD, Bray GA, York DA. The effects of a high fat diet on leptin mRNA, serum leptin and the response to leptin are not altered in a rat strain susceptible to high fat diet-induced obesity. The Journal of Nutrition. 1998;128(10):1606–1613.

309. Douchi T, Iwamoto I, Yoshimitsu N, Kosha S, Nagata Y. Leptin production in pre- and postmenopausal women. Maturitas. 2002;42(3):219–223.

310. Mahabir S, Baer D, Johnson LL, et al. Body Mass Index, percent body fat, and regional body fat distribution in relation to leptin concentrations in healthy, non-smoking postmenopausal women in a feeding study. Nutrition Journal. 2007;6:3.

311. Bader J, Carson M, Enos R, Velazquez K, Sougiannis A, Singh U, Becker W, Nagarkatti M, Fan D, Murphy A. High-fat diet-fed ovariectomized mice are susceptible to accelerated subcutaneous tumor growth potentially through adipose tissue inflammation, local insulin-like growth factor release, and tumor associated macrophages. Oncotarget. 2020;11(49):4554–4569.

312. Gomes FTDS, Andrade AVD, Moura Melo PK, Júnior RRDS, Souza DLS, Tavares ÉAF, Sena IG, Fernandes TAAM, Morais PLAG, Fonseca IAT, Borges CDS, Cavalcanti JRLP. The Effects of the Association Between a High-Fat Diet and Physical Exercise on BDNF Expression in the Hippocampus: A Comprehensive Review. Life (Basel, Switzerland). 2025;15(6):945.

313. Correia AS, Cardoso A, Vale N. BDNF Unveiled: Exploring Its Role in Major Depression Disorder Serotonergic Imbalance and Associated Stress Conditions. Pharmaceutics. 2023;15(8):2081.

314. Sen S, Duman R, Sanacora G. Serum brain-derived neurotrophic factor, depression, and antidepressant medications: meta-analyses and implications. Biological Psychiatry. 2008;64(6):527–532.

315. Zhang Z, He Z, Pan J, Yuan M, Lang Y, Wei X, Zhang C. The interaction of BDNF with estrogen in the development of hypertension and obesity,

particularly during menopause. Frontiers in Endocrinology (Lausanne). 2024;15:1384159.

316. Baek DC, Kang JY, Lee JS, et al. Linking alterations in estrogen receptor expression to memory deficits and depressive behavior in an ovariectomy mouse model. Scientific Reports. 2024;14:6854.

317. Hajali V, Sheibani V, Mahani SE, Hajializadeh Z, Shabani M, Aliabadi HP, Saadati H, Esmaeilpour K. Ovariectomy does not exacerbate the negative effects of sleep deprivation on synaptic plasticity in rats. Physiology & Behavior. 2015;144:73–81.

318. Banerjee R, Ghosh AK, Ghosh B, Bhattacharyya S, Mondal AC. Decreased mRNA and Protein Expression of BDNF, NGF, and their Receptors in the Hippocampus from Suicide: An Analysis in Human Postmortem Brain. Clinical Medicine Insights: Pathology. 2013;6:1–11.

319. Chen YW, Lin PY, Tu KY, Cheng YS, Wu CK, Tseng PT. Significantly lower nerve growth factor levels in patients with major depressive disorder than in healthy subjects: a meta-analysis and systematic review. Neuropsychiatric Disease and Treatment. 2015;11:925–933.

320. Kim B, Kang S. Regular Leisure-Time Physical Activity is Effective in Boosting Neurotrophic Factors and Alleviating Menopause Symptoms. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2020;17(22):8624.

321. Liu X, Zhang T, He S, et al. Nerve growth factor variations in patients with mood disorders: no changes in eight weeks of clinical treatment. Neuropsychiatric Disease and Treatment. 2014;10:835–840.

322. Bulló M, Peeraully MR, Trayhurn P, Folch J, Salas-Salvadó J. Circulating nerve growth factor levels in relation to obesity and the metabolic syndrome in women. European Journal of Endocrinology. 2007;157(3):303–310.

323. Samario-Román J, Larqué C, Pánico P, Ortiz-Huidobro RI, Velasco M, Escalona R, Hiriart M. NGF and Its Role in Immunoendocrine Communication during Metabolic Syndrome. International Journal of Molecular Sciences. 2023;24(3):1957.

324. Aloe L, Bracci-Laudiero L, Alleva E, Lambiase A, Micera A, Tirassa P. Emotional stress induced by parachute jumping enhances blood nerve growth factor levels and the distribution of nerve growth factor receptors in lymphocytes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1994;91(22):10440–10444.

325. Bando Y, Geisler JG. Disease modifying mitochondrial uncouplers, MP101, and a slow release prodrug, MP201, in models of Multiple Sclerosis. Neurochemistry International. 2019;131:104561.

326. Kohle F, Ackfeld R, Klein I, Svačina MKR, Schneider C, van Beers T, Grandoch A, Fink GR, Lehmann HC, Barham M. 2,4-Dinitrophenol does not

exert neuro-regenerative potential in experimental autoimmune neuritis. Neuroscience Letters. 2023;814:137456.

327. Wada T, Sameshima A, Yonezawa R, Morita M, Sawakawa K, Tsuneki H, Sasaoka T, Saito S. Impact of central and peripheral estrogen treatment on anxiety and depression phenotypes in a mouse model of postmenopausal obesity. PLoS ONE. 2018;13(12):e0209859.

328. World Anti-Doping Agency. The 2025 Prohibited List [Internet]. Montréal (QC); 2024. Section S0 (Non-approved substances): "2,4-dinitrophenol (DNP)". [cited 2025 Nov 6]. Available from: https://www.wada-ama.org/en/prohibited-list

329. Al-Rahbi B, Zakaria R, Othman Z, Hassan A, Muthuraju S, Wan Mohammad WM. Mood and memory function in ovariectomised rats exposed to social instability stress. Biomed Res Int. 2013;2013:493643.

330. Prendergast BJ, Onishi KG, Zucker I. Female mice liberated for inclusion in neuroscience and biomedical research. Neurosci Biobehav Rev. 2014;40:1–5.

331. Khan D, Sridhar A, Flatt PR, Moffett RC. Disturbed ovarian morphology, oestrous cycling and fertility of high fat fed rats are linked to alterations of incretin receptor expression. Reprod Biol. 2023;23(3):100784.

332. Hohos NM, Elliott EM, Giornazi A, Silva E, Rice JD, Skaznik-Wikiel ME. High-fat diet induces an ovulatory defect associated with dysregulated endothelin-2 in mice. Reproduction. 2021;161(3):307–317.

ÖZET

Ovariektomi Yapılmış ve Yüksek Yağlı Diyetle Beslenen Sıçanlarda Duygudurum Değişikliği ve Bilişsel Fonksiyonlar Üzerine 2,4-Dinitrofenolün Etkileri

Bu çalışmada; menopoz, obezite, duygudurum ve bellek bozukluklarının karmaşık etkileşiminden yola çıkarak, ovariektomi (OVX) ve/veya yüksek yağlı diyetin (YYD) duygudurum, bellek, metabolizma, nörotrofik faktörler üzerine etkisini incelemek ve potansiyel bir terapötik ajan olarak mitokondriyal eşleşme bozucu 2,4-dinitrofenolün (DNP) etkisini değerlendirmek amaçlanmıştır.

Dişi Wistar Albino sıçanlar yedi gruba ayrıldı: Sham+Standart Diyet (SD), Sham+YYD, OvX+SD, OvX+YYD, OvX+YYD+Çözücü, OvX+YYD+DNP 1 mg/kg, OvX+YYD+DNP 5 mg/kg. OvX/Sham sonrası hayvanlar 8 hafta SD veya YYD ile beslendi. DNP sırasıyla 1 ve 5 mg/kg/gün, intraperitoneal 4 hafta uygulandı. Açık alan, yükseltilmiş artı labirenti, yeni nesne tanıma, sükroz tercih ve zorunlu yüzdürme testi kullanılarak sıçanların lokomotor aktivitesi, anksiyete benzeri davranışı, depresyon benzeri davranışı ve bellekleri değerlendirildi. Vücut ağırlığı değişimi, total kolesterol, HDL, retroperitoneal ve inguinal yağ yastıkçıkları, serum leptin, BDNF ve NGF düzeyleri ölçüldü.

Yükseltilmiş artı labirenttte, Sham+YYD grubu sıçanların, Sham+SD ve OvX+SD'ye kıyasla açık kolda kalma süresi daha uzundu. DNP 5 mg/kg, çözücüye kıyasla açık kol süresini artırdı. Zorunlu yüzdürme testinde OvX+YYD grubu

sıçanlar, Sham+SD ve Sham+YYD'ye kıyasla daha uzun süre hareketsiz kalırken; DNP 1 mg/kg, hareketsizlik süresini azalttı. OvX ve/veya YYD açık alan, yeni nesne tanıma ve sükroz tercih testinde değişiklik oluşturmadı. OVX+YYD retroperitoneal yağlanmayı belirgin artırdı. Açlık glukozu OVX uygulanmış gruplarda yükseldi. DNP adipoziteyi değiştirmezken**,** her iki dozda glukozu**,** düşük dozda ise HOMA-IR'ı düşürdü. BDNF, OVX+YYD grubunda anlamlı azaldı; DNP bu düzeyleri değiştirmedi.

Düşük doz DNP, kilo alımı ve lipid profilini etkilemeksizin anksiyete ve depresyon benzeri davranışları iyileştirebilme potansiyeline sahip görünmektedir. Bu nörodavranışsal faydalar, DNP'nin menopozla ilişkili duygudurum bozuklukları için potansiyel terapötik etkilerine işaret ediyor olabilir.

Anahtar Kelimeler: Menopoz, Dinitrofenol, Depresyon

ABSTRACT

Effects of 2,4-Dinitrophenol Administration on Mood and Cognitive Functions in Ovariectomized Rats Fed a High-Fat Diet

This study investigated how menopause, obesity, and mood disturbances interact by testing the effects of ovariectomy (OVX) and/or a high-fat diet (HFD) on affect, memory, metabolism, and neurotrophic factors, and by evaluating the mitochondrial uncoupler 2,4-dinitrophenol (DNP) as a candidate therapy.

Female Wistar Albino rats were randomized to seven groups: Sham+standard diet (SD), Sham+HFD, OVX+SD, OVX+HFD, OVX+HFD+vehicle, OVX+HFD+DNP 1 mg/kg, and OVX+HFD+DNP 5 mg/kg. Following OVX or sham, animals received SD or HFD for eight weeks; DNP was administered intraperitoneally for four weeks. Open field, elevated plus maze, novel object recognition, sucrose preference, and forced swim tests were used to quantify locomotion, anxiety-like and depression-like behavior, and memory. Body-weight, total cholesterol, HDL, retroperitoneal and inguinal fat pads, serum leptin, BDNF, and NGF were measured; fasting glucose and HOMA-IR were evaluated. In the elevated plus maze, Sham+HFD spent more time in the open arm than Sham+SD and OVX+SD; DNP 5 mg/kg increased open-arm time versus vehicle. In the forced swim test, OVX+HFD exhibited greater immobility than Sham+SD and Sham+HFD, whereas DNP 1 mg/kg reduced immobility. OVX and/or HFD did not alter open-field activity, novel object recognition, or sucrose preference. OVX+HFD increased retroperitoneal adiposity and elevated fasting glucose in

OVX groups. DNP did not change adiposity or lipid profile, lowered glucose at 1 and 5 mg/kg and reduced HOMA-IR at 1 mg/kg. BDNF decreased in OVX+HFD; DNP did not restore it.

Overall, low-dose DNP ameliorated anxiety- and depression-like behaviors without affecting weight gain or lipids, suggesting therapeutic potential for menopause-related mood disorders.

Keywords: Menopause, Dinitrophenol, Depression