T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SODYUM GLUKOZ KOTRANSPORTER-2 İNHİBİTÖRLERİNİN ALZHEİMER HASTALIĞI BENZERİ MODELDE NLRP3 İNFLAMAZOMU ARACILI NÖROİNFLAMASYON ÜZERİNE ETKİSİ

Ecz. Buse Esra MERCAN

Farmakoloji Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA

2026

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SODYUM GLUKOZ KOTRANSPORTER-2 İNHİBİTÖRLERİNİN ALZHEİMER HASTALIĞI BENZERİ MODELDE NLRP3 İNFLAMAZOMU ARACILI NÖROİNFLAMASYON ÜZERİNE ETKİSİ

Ecz. Buse Esra MERCAN

Farmakoloji Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğr. Üyesi İnci KAZKAYASI BÖLÜK

ANKARA

2026

SODYUM GLUKOZ KOTRANSPORTER-2 İNHİBİTÖRLERİNİN ALZHEİMER HASTALIĞI BENZERİ MODELDE NLRP3 İNFLAMAZOMU ARACILI NÖROİNFLAMASYON ÜZERİNE ETKİSİ

Öğrenci: Buse Esra MERCAN

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi İnci KAZKAYASI BÖLÜK

Bu tez çalışması 25.09.2026 tarihinde jürimiz tarafından "Farmakoloji Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Şaban Remzi Erdem
Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi İnci Kazkayası Bölük
Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı

Üye: Doç. Dr. Banu Cahide Tel
Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

07 Ekim 2026

Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA ve FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.
Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.
Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan ***"Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge"*** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü/fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir(1).
- Enstitü/fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren …ay ertelenmiştir (2).
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir (3).

07/10/2026

Buse Esra Mercan

"Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge" Madde 6.

(1) Madde 6.1. Lisansüstü tezle ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6.2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7.1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir.

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Dr. Öğr. Üyesi İnci KAZKAYASI BÖLÜK danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Ecz. Buse Esra MERCAN

TEŞEKKÜR

Değerli bilimsel katkılarından dolayı danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi İnci Kazkayası Bölük'e,

Eczacılık lisans eğitimimden başlayarak farmakoloji sevgisini bana katan Hacettepe Üniversitesi Farmakoloji Anabilim Dalındaki tüm değerli hocalarıma,

BİDEB 2210-A Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı TÜBİTAK Koordinatörlüğünün bursiyer desteği için,

Her zaman sevgileri, destekleri ve varlıklarıyla bana güç veren anneme ve babama; her konuda fikir danışabildiğim abime ve ablama,

Yüksek lisans sürecime güzel anılar katan tüm arkadaşlarıma, özellikle OD7 ekibine, beni her zaman bir adım ileriye taşıyan Aslı'ya, bu süreçteki en büyük kazanımlarımdan olan Sena ile Esra'ya,

İlkokul sıralarından başlayarak her adımımda elimden tutan Ayşe'ye; beni her zaman dinlediği ve özellikle odak süremi artırmama katkı sağladığı için,

Her zaman yanımda olan, aynı hayalleri paylaştığım Öğüt'e; kendi azmini hiçbir zaman kaybetmeyerek beni daha çok çalışmaya teşvik ettiği için,

Beni büyüten ve beni bir yerlerden izlediğine emin olduğum Mehmet Çelikarslan'a; ilerlemek istediğim yolun şekillenmesinde önemli bir rol oynadığı için,

Kadınların eğitim hayatında var olabilmesinin önünü açan ve bilimle var olmayı mümkün kılan Mustafa Kemal ATATÜRK'e,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

I am also thankful to Amit, who, in addition to being my PhD supervisor, supported me whenever needed and generously shared the resources of his laboratory with me; to Isabel, Philipp and Tanvi for generously sharing their laboratory resources; to Dhry, Enna, Beyza and all the lunch table people for their support and friendship; and finally, to Luca, for standing by me through every challenge, and never letting me feel alone in Stockholm.

Bu tez çalışması Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından (Proje No: THD-2025-21818) desteklenmiştir.

ÖZET

Mercan, B.E., Sodyum Glukoz Kotransporter-2 İnhibitörlerinin Alzheimer Hastalığı Benzeri Modelde NLRP3 İnflamazomu Aracılı Nöroinflamasyon Üzerine Etkisi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2026. Nöroinflamasyon, özellikle mikroglial aktivasyon ve NLRP3 inflamazomu aracılı inflamatuvar yanıtlar, Alzheimer hastalığı (AH) patogenezinin önemli bileşenlerindendir. Sodyum glukoz kotransporter-2 (SGLT-2) inhibitörlerinin glukoz düzeyini azaltıcı etkilerinin yanı sıra anti-inflamatuvar özellikleri bulunduğu ve bu etkilerin kısmen NLRP3 inflamazomunun baskılanmasıyla ilişkili olabileceği gösterilmiştir. Bununla birlikte, SGLT-2 inhibitörlerinin AH benzeri koşullarda NLRP3 inflamazomu ile ilişkili inflamatuvar yanıtlar üzerindeki etkileri henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Bu çalışmada beksagliflozin, dapagliflozin, empagliflozin, ertugliflozin ve kanagliflozinin amiloid beta (Aβ) ve lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen BV2 mikroglial inflamasyon modellerindeki etkileri MTT, Griess, *Western blot* ve ELISA yöntemleriyle değerlendirildi. Aβ modelinde beksagliflozin NLRP3, ASC ve kaspaz-1 proteinleri ile IL-1β ve IL-18 düzeylerini anlamlı olarak azaltırken, dapagliflozin NLRP3 ve ASC ile her iki sitokin düzeyini azalttı. Ertugliflozin ve kanagliflozin daha seçici etkiler gösterirken, empagliflozin incelenen belirteçlerde anlamlı değişiklik oluşturmadı. LPS modelinde beş inhibitörün tamamı NLRP3, ASC, IL-1β ve IL-18 düzeylerini anlamlı olarak azalttı; kaspaz-1 ise yalnızca beksagliflozin ve empagliflozin ile azaldı. Bu bulgular, özellikle beksagliflozin ve dapagliflozinin AH ile ilişkili nöroinflamasyonda NLRP3 eksenini hedefleyen potansiyel farmakolojik adaylar olarak daha ileri mekanistik ve preklinik araştırmalarda değerlendirilmesini desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Alzheimer hastalığı, sodyum-glukoz kotransporter-2 inhibitörleri, NLRP3 inflamazomu, nöroinflamasyon, mikroglia

Bu tez çalışması Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Kordinasyon Birimi (BAP, Proje numarası: THD-2025-21818) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Mercan, B.E., Effect of Sodium Glucose Cotransporter-2 Inhibitors on NLRP3 Inflammasome-Mediated Neuroinflammation in an Alzheimer's Disease-Like Model, Hacettepe University, Graduate School of Health Sciences, Master of Science in Pharmacology, Ankara, 2026. Neuroinflammation, particularly microglial activation and NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory responses, is an important component of Alzheimer's disease (AD) pathogenesis. In addition to their glucose-lowering effects, sodium-glucose cotransporter-2 (SGLT-2) inhibitors have been shown to exert anti-inflammatory effects, which may be partly associated with suppression of the NLRP3 inflammasome. However, the effects of SGLT-2 inhibitors on NLRP3 inflammasome-related inflammatory responses under AD-like conditions have not yet been fully elucidated. In this study, the effects of bexagliflozin, dapagliflozin, empagliflozin, ertugliflozin, and canagliflozin were evaluated in amyloid beta (Aβ)- and lipopolysaccharide (LPS)-induced BV2 microglial inflammation models using MTT, Griess, Western blot, and ELISA assays. In the Aβ model, bexagliflozin significantly reduced NLRP3, ASC, and caspase-1 protein levels as well as IL-1β and IL-18 levels, whereas dapagliflozin reduced NLRP3 and ASC protein levels and both cytokines. Ertugliflozin and canagliflozin showed more selective effects, while empagliflozin did not produce significant changes in the evaluated markers. In the LPS model, all five inhibitors significantly reduced NLRP3, ASC, IL-1β, and IL-18 levels, whereas caspase-1 was reduced only by bexagliflozin and empagliflozin. These findings support the further evaluation, particularly of bexagliflozin and dapagliflozin, in mechanistic and preclinical studies as potential pharmacological candidates targeting the NLRP3 axis in AH-associated neuroinflammation.

Key Words: Alzheimer disease, sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors, NLRP3 inflammasome, neuroinflammation, microglia.

This study was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (BAP, Project No: THD-2025-21818).

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI iii

YAYIMLAMA ve FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI iv

ETİK BEYAN v

TEŞEKKÜR vi

ÖZET vii

ABSTRACT viii

İÇİNDEKİLER ix

SİMGELER ve KISALTMALAR xi

ŞEKİLLER xiv

TABLOLAR xv

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1 Alzheimer Hastalığı 3

2.1.1 Alzheimer Hastalığının Patofizyolojisi 4

2.2 NLRP3 İnflamazomu 7

2.2.1 NLRP3 İnhibitörleri 10

2.3 Alzheimer Hastalığında NLRP3 İnflamazomu 12

2.4 Alzheimer ve Diyabet Hastalığı İlişkisi 14

2.5 Sodyum Glukoz Kotransporteri-2 İnhibitörleri 15

2.5.1 SGLT-2 İnhibitörlerinin Antiinflamatuvar Etkileri 16

2.5.2 SGLT-2 İnhibitörlerinin Alzheimer Hastalığı Tedavisinde Kullanılması 17

3. GEREÇ ve YÖNTEM 20

3.1. Hücre Kültürü 20

3.1.1. Hücrelerin Çözdürülmesi ve Dondurulması 21

3.2. Deneysel Ajanlar 22

3.2.1. Amiloid Betanın Hazırlanması 22

3.2.2. Lipopolisakkaritin Hazırlanması 22

3.2.3. SGLT-2 İnhibitörlerinin Hazırlanması 23

3.3. Hücre Canlılığı Testi 23

3.4. Nitrit Düzeyinin Griess Yöntemi ile Ölçülmesi 24

3.5. Hücre Kültürü Örneklerinin Analiz İçin Hazırlanması 25

3.6. Hücre Lizatlarının Protein Konsantrasyonlarının Ölçülmesi 27

3.7. Western Blot Analizi 27
3.7. ELISA ile Sitokin Düzeyi Tayini 29
3.7.1. IL-1β Sitokin Düzeyi Tayini 29
3.7.2. IL-18 Sitokin Düzeyi Tayini 30
3.8. İstatistiksel Analiz 31
4. BULGULAR 32
4.1. SGLT-2 İnhibitörlerinin BV2 Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri 32
4.2. SGLT-2 İnhibitörlerinin Nitrit Üretimi Üzerine Etkileri 34
4.2.1. Aβ ile İndüklenen BV2 Hücrelerinde Nitrit Üretiminin Değerlendirilmesi 34
4.2.2. LPS ile İndüklenen BV2 Hücrelerinde Nitrit Üretiminin Değerlendirilmesi 35
4.2.3. SGLT-2 İnhibitörlerinin Sonraki Deneylerde Kullanılacak Konsantrasyonlarının Belirlenmesi 38
4.3. SGLT-2 İnhibitörlerinin NLRP3 İnflamazom Proteinleri Üzerindeki Etkileri 38
4.3.1. SGLT-2 İnhibitörlerinin NLRP3 Protein Düzeylerine Etkisi 38
4.3.2. SGLT-2 İnhibitörlerinin ASC Protein Düzeylerine Etkisi 39
4.3.3. SGLT-2 İnhibitörlerinin Kaspaz-1 Protein Düzeylerine Etkisi 41
4.4. SGLT-2 İnhibitörlerinin Proinflamatuvar Sitokinler Üzerine Etkileri 42
4.4.1. SGLT-2 İnhibitörlerinin IL-1β Düzeyi Üzerine Etkileri 42
4.4.2. SGLT-2 İnhibitörlerinin IL-18 Düzeyleri Üzerine Etkisi 44
5. TARTIŞMA 46
6. SONUÇ ve ÖNERİLER 53
7. KAYNAKLAR 54
8. EKLER 65
EK-1: Tez Çalışması Orijinallik Raporu 65
EK-2: Tez Çalışması Dijital Makbuz 66
9. ÖZGEÇMİŞ 67

SİMGELER ve KISALTMALAR

4PL	Dört parametreli lojistik regresyon
Aβ	Amiloid beta
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AD	*Alzheimer's disease*; Alzheimer hastalığı
AH	Alzheimer hastalığı
AMPK	Adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz
ANOVA	Varyans analizi
APOE	Apolipoprotein E
APOE ε4	Apolipoprotein E ε4 aleli
APP	Amiloid öncü proteini
ASC	CARD içeren apoptozla ilişkili benek benzeri protein *(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD)*
BCA	Bikinkoninik asit
β-HB	Beta-hidroksibütirat
BSA	Sığır serum albümini
CARD	Kaspaz aktivasyon ve bağlanma bölgesi(*caspase activation and binding domain)*
Casp1	Kaspaz-1 gen sembolü
CDK5	Sikline bağımlı kinaz 5
DAMP	Hasarla/tehlikeyle ilişkili moleküler kalıp *(damage/danger-associated molecular pattern)*
DM	*Diabetes mellitus*
DMEM	Dulbecco tarafından modifiye edilmiş Eagle vasatı *(Dulbecco's modified Eagle's medium)*
DMSO	Dimetil sülfoksit
DPP-4	Dipeptidil peptidaz-4
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
ELISA	Enzime bağlı immünosorbent analiz (*enzyme-linked immunosorbent assay)*

FBS	Fötal sığır serumu
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
GLP-1	Glukagon benzeri peptid-1 *(glucagon-like peptide-1)*
GSDMD	Gasdermin D
GSK-3β	Glikojen sentaz kinaz-3 beta
HFIP	1,1,1,3,3,3-Hekzafloro-2-propanol
IL-1β	İnterlökin-1 beta
IL-6	İnterlökin-6
IL-18	İnterlökin-18
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
JAK	Janus kinaz (*janus activated kinase)*
KBB	Kan-beyin bariyeri
LPS	Lipopolisakkarit
LRR	Lösinden zengin tekrar bölgesi (*leucine-rich repeat)*
MAPK	Mitojenle aktive olan protein kinaz
MAPs	Mikrotübülle ilişkili proteinler (*microtubule-associated proteins)*
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
MyD88	Miyeloid farklılaşma birincil yanıt proteini 88
NED	N-(1-Naftil)etilendiamin dihidroklorür
NF-κB	Nükleer faktör kappa B *(nuclear factor kappa B)*
NFY	Nörofibriler yumak
NLR	Nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon bölgesi benzeri reseptör ailesi
NLRP3	NLR ailesi pirin bölgesi içeren 3 *(NLR family pyrin domain containing 3)*
NO	Nitrik oksit
OD	Optik yoğunluk
PAMP	Patojenle ilişkili moleküler kalıp *(pathogen-associated molecular pattern)*
PBS	Fosfat tamponlu salin
PRR	Kalıp tanıma reseptörü *(pattern-recognition receptor)*
PVDF	Polivinilidin diflorür

PYD	Pirin bölgesi (*pyrin domain)*
ROS	Reaktif oksijen türleri
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SGLT-1	Sodyum-glukoz kotransporter 1
SGLT-2	Sodyum-glukoz kotransporter 2
SH	Standart hata
SSS	Santral sinir sistemi
STAT	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü
T1DM	Tip 1 diabetes mellitus
T2DM	Tip 2 diabetes mellitus
TBS	Tris tamponlu salin
TBS-T	Tween-20 içeren Tris tamponlu salin
TLR	Toll-benzeri reseptör (*Toll-like receptor)*
TNF-α	Tümör nekroz faktörü alfa
TREM2	Miyeloid hücrelerde eksprese edilen tetikleyici reseptör 2
TXNIP	Tiyoredoksin ile etkileşen protein

ŞEKİLLER

Şekil		Sayfa
2.1.	NLRP3 inflamazom aktivasyonu.	8
2.2	AH'de NLRP3 inflamazomunun ön hazırlık ve aktivasyon mekanizmaları.	9
4.1.	Beksagliflozin, dapagliflozin, empagliflozin, ertugliflozin ve kanagliflozinin farklı konsantrasyonlarda BV2 hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin MTT testi ile 24, 48 ve 72. saatlerde değerlendirilmesi.	33
4.2	Aβ ile indüklenen BV2 hücrelerinde beksagliflozin, dapagliflozin, empagliflozin, ertugliflozin ve kanagliflozinin farklı konsantrasyonlarda (1, 5, 10, 25, 50 µM) nitrit üretimi üzerine etkilerinin Griess testi ile değerlendirilmesi.	35
4.3	LPS ile indüklenen BV2 hücrelerinde beksagliflozin, dapagliflozin, ertugliflozin ve kanagliflozinin farklı konsantrasyonlarda (1, 5, 10, 25, 50 µM) nitrit üretimi üzerine etkilerinin Griess testi ile değerlendirilmesi.	37
4.4	Aβ veya LPS ile indüklenen BV2 hücrelerinde beksagliflozin, dapagliflozin, empagliflozin, ertugliflozin ve kanagliflozin uygulamalarının NLRP3 protein düzeyleriüzerine etkisi.	39
4.5	Aβ veya LPS ile indüklenen BV2 hücrelerinde beksagliflozin, dapagliflozin, empagliflozin, ertugliflozin ve kanagliflozin uygulamalarının ASC protein düzeyleri üzerine etkisi.	40
4.6	Aβ veya LPS ile indüklenen BV2 hücrelerinde beksagliflozin, dapagliflozin, empagliflozin, ertugliflozin ve kanagliflozin uygulamalarının kaspaz-1 proteindüzeyleri üzerine etkisi.	42
4.7	SGLT-2 inhibitörlerinin Aβ ve LPS ile indüklenen BV2 hücrelerinde IL-1β düzeyleri üzerine etkileri.	43
4.8	SGLT-2 inhibitörlerinin Aβ ve LPS ile indüklenen BV2 hücrelerinde IL-18 düzeyleri üzerine etkileri.	45

TABLOLAR

Tablo		Sayfa
2.1.	NLRP3 inhibitörleri ve etki mekanizmaları.	11
3.1	BV2 hücre hattının özellikleri.	20
3.2.	Çalışmada kullanılan SGLT-2 inhibitörleri.	23
3.3.	Deneylerde kullanılan antikorlar.	29

1. GİRİŞ

Nörodejeneratif hastalıklar arasında en sık görülen Alzheimer Hastalığı (AH), tüm demans vakalarının yaklaşık %60-70'ini oluşturur. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verileri, 2023 yılı itibarıyla dünya çapında 55 milyondan fazla bireyin demansla yaşadığını ve yaşlanan nüfusla birlikte bu sayının 2050 yılına kadar 130 milyonun üzerinde olacağını öngörmektedir (1).

AH patogenezi uzun yıllar boyunca amiloid beta (Aβ) ve hiperfosforile tau üzerinden açıklanmıştır. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar, hastalığın gelişimi ve ilerlemesinde nöroinflamasyonun da önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Özellikle santral sinir sisteminin (SSS) yerleşik immün hücreleri olan mikrogliaların, patolojik uyaranlara karşı verdiği yanıtın bu süreçte etkili olduğu düşünülmektedir (2). Mikrogliaların uzun süreli aktivasyonu, nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı benzeri reseptör (NLR) ailesi pirin bölgesi içeren 3 (NLRP3) inflamazomu gibi inflamatuvar yolakların uyarılmasına ve proinflamatuvar sitokinlerin salıverilmesine neden olarak hücresel hasarı artırabilmektedir (3, 4).

NLRP3 inflamazomu, hücresel stres ve hasara yanıt olarak aktive olan çok proteinli bir komplekstir. Aktivasyonu sonucunda kaspaz-1 aktifleşip interlökin-1β (IL-1β) ve interlökin-18 (IL-18) gibi çeşitli proinflamatuvar sitokinlerin salıverilmesini tetikler (3). AH'de NLRP3 inflamazomunu aktivasyonunun Aβ birikimini ve tau hiperfosforilasyonunu artırarak AH patojisini kötüleştirdiği bildirilmiştir (5, 6).

Sodyum glukoz kotransporter 2 (SGLT-2) inhibitörleri, yeni nesil antidiyabetik ilaçlardandır. Empagliflozin, dapagliflozin ve kanagliflozin gibi bu gruptaki daha eski ilaçların kardiyovasküler ve renal korucu etkileri iyi bilinmektedir (7). Son yıllarda yapılan preklinik çalışmalar, bu ilaçların glisemik kontrolün ötesinde antiinflamatuvar etkiler gösterebileceğine işaret etmektedir (8). Bazı çalışmalarda NLRP3 inflamazomu aktivasyonunu azaltarak antiinflamatuvar etkiler sağladığı da bildirilmiştir (9).

SGLT-2 inhibitörlerinin AH ile ilişkili nöroinflamasyon bağlamında NLRP3 inflamazomu üzerindeki etkileri henüz yeterince açıklığa kavuşmamıştır. Bu çalışmada SGLT-2 inhibitörlerinin AH benzeri nöroinflamasyon koşullarında NLRP3 aracılı inflamatuvar yanıtı azaltıp azaltmadığını ve bu ilaçların AH açısından olası koruyucu

etkilerini araştırmak hedeflenmiştir. Bu amaçla BV2 mikroglia hücreleri, lipopolisakkarit (LPS) ve Aβ ile inkübe edilerek nöroinflamasyon modeli oluşturulmuş ve SGLT-2 inhibitörlerinin NLRP3 inflamazomu ile IL-1β ve IL-18 düzeyleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Alzheimer Hastalığı

AH; hafıza, muhakeme ve dil becerileri başta olmak üzere çeşitli bilişsel işlevlerde giderek artan kayıplara, karakter değişikliklerine yol açan ilerleyici nörodejeneratif bir hastalıktır. Hastalık ilk kez 1906 yılında Alman psikiyatrist ve nörolog Alois Alzheimer tarafından; Auguste Deter isimli hastasının ölümünün ardından beyin dokusunun histopatolojik olarak incelenmesi ile tanımlanmıştır. Bu incelemelerde, serebral kortekste belirgin yapısal değişiklikler gözlemleyen Alzheimer, bunlara ek olarak günümüzde AH'nin temel nöropatolojik özellikleri olarak kabul edilen ekstraselüler plak benzeri oluşumları tanımlamıştır (10). Alzheimer, o dönem yaptığı histolojik gözlemlerinde plakların çevresinde glial hücresel reaksiyonlara dikkat çekse de bunların mikroglia olduğunun anlaşılması ve bu hücrelerin nöroinflamasyon ile ilişkili özelliklerinin tanımlanması daha sonraki yıllarda gerçekleşmiştir (11).

AH genel olarak ailesel ve sporadik olmak üzere iki grupta değerlendirilmektedir. Ailesel AH daha az görülmekte ve amiloid öncü proteini (APP) ile presenilin-1 ve presenilin-2 proteinlerini kodlayan genlerde meydana gelen patojenik mutasyonlarla ilişkilendirilmektedir (12). Sporadik AH ise hastaların büyük çoğunluğunu oluşturmakta ve tek bir genetik nedenden çok genetik, çevresel ve metabolik faktörlerin etkileşimi sonucunda gelişmektedir. Apolipoprotein E'nin ε4 aleli (*APOE ε4*), sporadik AH gelişimi açısından en güçlü genetik risk faktörlerinden biri olarak kabul edilmektedir (13). *APOE ε4*'e ilaveten, *TREM2* ve *CD33* başta olmak üzere *MS4A* gen ailesi, *INPP5D, SPI1, ABCA7, CR1* ve *CLU* gibi doğuştan bağışıklık sistemi ve mikroglial fonksiyonlarla ilişkili genetik varyantların da AH gelişme riskini artırması, hastalığın patogenezinde nöroimmün mekanizmaların önemini desteklemektedir (14-16).

2.1.1 Alzheimer Hastalığının Patofizyolojisi

Amiloid Kaskat Hipotezi

Amiloid kaskad hipotezi, son birkaç on yıldır hastalığın patofizyolojisinde önemli bir yere sahiptir (17). Bu hipoteze göre, Aβ birikimi AH'nin merkezinde yer alır ve zamanla tau patolojisi, sinaptik ve nöronal hasar, vasküler değişikliklere katkıda bulunan aşağı akış (*downstream*) süreçlerini tetikleyebilmektedir (18). Aβ peptitleri, transmembran bir protein olan APP'nin amiloidojenik yolakta β-sekretaz ve γ-sekretaz tarafından ardışık olarak parçalanması sonucunda oluşur. Bunlardan $A\beta_{40}$ ve $A\beta_{42}$ en yaygın olanlarıdır. Fizyolojik koşullarda üretilen Aβ çeşitli proteolitik, fagositik ve transport mekanizmaları aracılığıyla beyinden uzaklaştırılabilmektedir. Bununla birlikte Aβ üretiminin artması veya temizlenmesinin azalması, çözünür Aβ düzeylerinin artmasına ve peptitlerin oligomerler, protofibriller ve fibriller halinde agregasyonuna yol açabilmektedir. Özellikle çözünür Aβ oligomerlerinin, sinaptikaşırım ve sinaptik plastisiteyi bozarak belirgin sinaptotoksik etkiler oluşturabileceği, daha ileri agregasyon sonucunda ise AH'nin karakteristik patolojik bulgularından biri olan ekstraselüler amiloid plakları meydana getirebileceği bilinmektedir (19-21).

Aβ peptitlerinin birikiminin nörodejenerasyona yol açan olayları tetiklediğine inanılmaktadır. Aβ agregasyonu, glikojen sentaz kinaz-3β (GSK-3β) gibi kinazları aktive ederek tau fosforilasyonunu tetikler. Aβ peptitleri, amilin reseptörleri yoluyla mikroglial aktivasyona da neden olarak NLRP3 inflamazom oluşumunu tetikleyerek nöroinflamasyona neden olabilir (22).

Amiloid kaskad hipotezi AH araştırmalarında önemini hala koruyor olsa da, son zamanlarda yapılan klinik çalışmalardan bazılarının önemli faydalar göstermemesi veya Aβ birikimini hedefleyen tedavilerin ciddi yan etkilere sahip olması nedeniyle AH patogenezinde yer alan tau patolojisi, nöroinflamasyon, sinaptik kayıp gibi diğer alternatif mekanizmalar AH tedavisi araştırmaları için giderek önem kazanmıştır. (23, 24).

Tau Hipotezi

Aβ plaklarının birikimine ek olarak, AH'nin diğer ayırt edici patolojisi, anormal tau proteini agregatlarından oluşan nörofibriler yumakların (NFY) varlığıdır. Tau proteini, nöronlarda eksprese edilen ve mikrotübül ile ilişkili proteinler (*microtubule-associated proteins,* MAPs) ailesine ait bir proteindir. Fizyolojik koşullarda temel görevi, mikrotübüllere bağlanarak mikrotübüllerin stabilitesini sağlamak ve mikrotübüler ağın yapısal bütünlüğünü korumaktır (25, 26). AH'de ise, tau; hiperfosforilasyon gibi posttranslasyonel modifikasyonlara uğrayarak toksik bir hale gelir. Mikrotübüllerden ayrılan hiperfosforile tau proteinleri nöronların somatodendritik bölgelerinde birikerek NFY'lerin oluşmasına sebep olur (27-29).

NFY birikimi; nöronal mikrotübül bütünlüğünün bozulması, nöroinflamasyonun artması ve tau patolojisinin yayılmasıyla ilişkilidir. NFY açısından zengin beyin bölgelerinde mikroglial aktivasyonun ve astrositik yanıtın arttığı, bu kronik inflamatuvar ortamın ise nöronal hasarı ve tau patolojisini daha da şiddetlendirebildiği gösterilmiştir (28, 30, 31)

Ayrıca, tau patolojisinin yalnızca NFY oluşumuyla sınırlı olmadığı; sinaptik disfonksiyon, aksonal transport bozukluğu ve ilerleyici nöronal kayıpla da ilişkili olduğu gösterilmiştir (28, 32). Patolojik tau türleri aksonal mikrotübüllerden ayrılarak somatodendritik ve sinaptik bölgelere yanlış lokalize olabilmekte ve burada sinaptik fonksiyonu bozabilmektedir. Ayrıca tau patolojisinin sinaptik olarak bağlantılı nöronlar boyunca yayılabildiğine ve bu yayılımın NFY oluşumu, sinaptik kayıp, aksonal dejenerasyon ve hücre ölümü ile ilişkili olduğuna dair bulgular bulunmaktadır (33). Bu nedenle tau; fosforilasyon ve diğer posttranslasyonel modifikasyonların düzenlenmesi, agregasyonun ve hücreler arası yayılımın engellenmesi ve tau düzeylerinin azaltılması gibi farklı yaklaşımlarla günümüzde önemli bir hastalık-modifiye edici tedavi hedefi olarak araştırılmaktadır (34).

Nöroinflamasyon

İnflamasyon; organizmanın enfeksiyon, hücresel hasar ve çeşitli zararlı uyaranlara karşı geliştirdiği temel savunma mekanizmalarından biridir. İnflamatuvar yanıtın uzun süre devam etmesi veya yeterince kontrol edilememesi durumunda ise

bu koruyucu özellik patolojikleşmektedir. SSS'de gelişen inflamatuvar yanıt, nöroinflamasyon olarak tanımlanmaktadır ve özellikle nöroinflamasyonun, AH'de hastalığın patogenezine aktif katkıda bulunduğu kabul edilmektedir (35). Deneysel, nöropatolojik ve genetik bulguların doğal ve adaptif bağışıklık mekanizmalarının AH patogenezinde rol oynadığını göstermesi de bu görüşü desteklemektedir (36).

Beyindeki immün mikroçevrenin düzenlenmesine mikroglialar başta olmak üzere astrositler, nöronlar ve endotel hücreleri katkıda bulunmaktadır. Kan beyin bariyerinin (KBB) bütünlüğünün bozulması durumunda periferik bağışıklık hücreleri ve dolaşımdaki inflamatuvar mediyatörler de SSS'ye geçerek nöroinflamatuvar yanıtı etkileyebilmektedir (30, 37, 38).

Mikroglialar, SSS'nin doğuştan gelen rezidüel bağışıklık hücreleridir ve fizyolojik koşullarda çevresel değişiklikleri sürekli izleyerek hasarlı veya apoptotik hücrelerin ve hücresel atıkların fagositoz yoluyla uzaklaştırılmasına, sinaptik yeniden yapılanmaya ve doku homeostazının korunmasına katkıda bulunurlar (39). Mikroglialar, patojen ile ilişkili moleküler kalıpları (*pathogen-associated molecular patterns,* PAMP) ve hasar görmüş ya da ölen hücrelerden salıverilen endojen tehlike sinyallerini (hasar ile ilişkili moleküler kalıplar; *damage/danger-associated molecular patterns*, DAMP) kalıp tanıma reseptörleri (*pattern recognition receptors,* PRR) aracılığıyla algılamaktadır. Mikroglial PRR'lerin önemli üyeleri arasında Toll-benzeri reseptör (TLR) ailesinden TLR4 ve NLR ailesinden NLRP3 yer almakta ve mikroglial doğal bağışıklık yanıtının başlatılmasında rol oynamaktadır (40).

AH'de Aβ oligomerleri ve fibrilleri de DAMP gibi davranarak mikroglia yüzeyinde bulunan TLR2 ve TLR4 gibi çeşitli PRR'ler ile etkişebilmekte ve inflamatuvar sinyallemeyi başlatabilmektedir (36, 41, 42). Kronik olarak aktive olan mikroglialardan, tümör nekroz faktörü α (TNF-α), IL-6 ve IL-1β gibi proinflamatuvar sitokinler, kemokinler, reaktif oksijen türleri (ROS) ve nitrik oksit (NO) vb. inflamatuvar mediyatörlerin üretimi artar (35, 43). Aβ'nin mikroglialar tarafından fagosite edilmesi başlangıçta peptidin uzaklaştırılmasına ve doku homeostazının korunmasına katkıda bulunurken, Aβ birikiminin sürmesi ve inflamatuvar yanıtın yeterince sonlandırılamaması kronik mikroglial aktivasyona yol açabilmektedir.

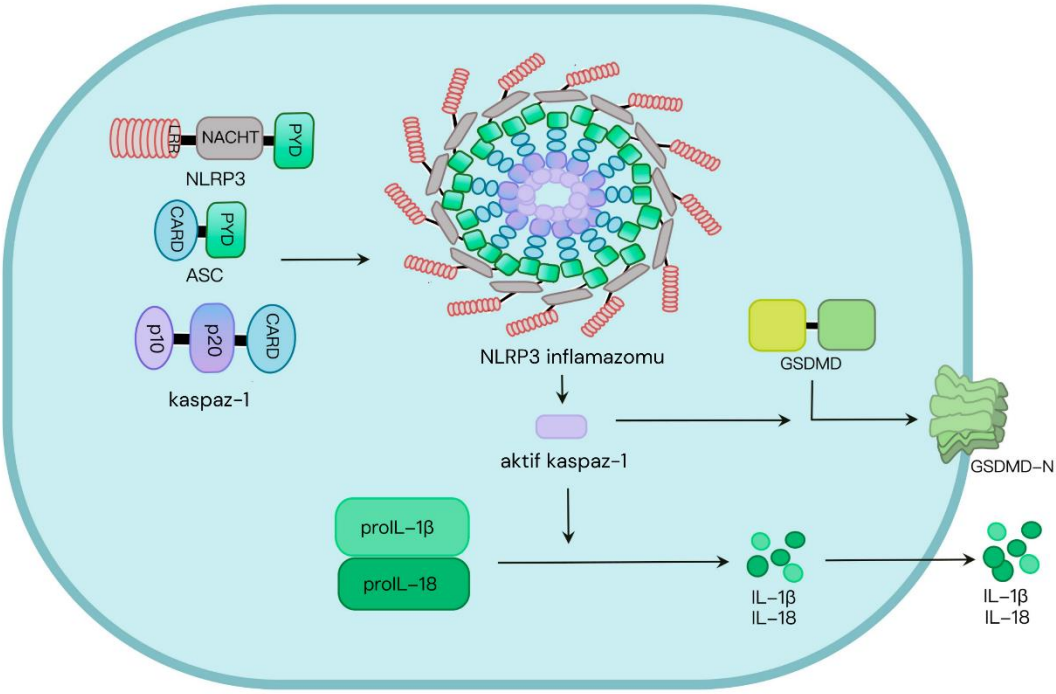
Sürekli inflamatuvar mediyatör üretimi ise sinaptik işlev bozukluğu ve nöronal hasarı artırarak nörodejeneratif sürecin ilerlemesine katkıda bulunabilmektedir. Dolayısıyla mikroglial yanıtın etkisi, aktivasyonun süresi ve şiddeti ile bulunduğu mikroçevrenin özelliklerine bağlı olarak nöroprotektif ya da nörotoksik yönde değişebilmektedir (37-39).

Bunun yanı sıra sistemik inflamasyonun da AH'deki nöroinflamatuvar süreçleri etkileyebileceği öne sürülmektedir. Diyabet, obezite ve kardiyovasküler hastalık gibi kronik sistemik inflamasyonla ilişkili durumlar AH riskinin artışıyla ilişkilendirilmiştir (44, 45). Sistemik inflamasyonun KBB bütünlüğünü bozması, periferik inflamatuvar mediyatörlerin ve bağışıklık hücrelerinin SSS ile etkileşimini artırmasına ek olarak mikroglialarını sonraki inflamatuvar uyaranlara karşı daha duyarlı hale getirebileceği ve böylece mevcut nöroinflamatuvar yanıtı güçlendirebileceği öne sürülmektedir (46, 47).

2.2 NLRP3 İnflamazomu

İnflamazomlar; PAMP ve DAMP'lara yanıt olarak oluşan ve inflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde görev alan sitozolik çoklu protein kompleksleridir (48). NLR ailesinin bir üyesi olan NLRP3 inflamazomu, AH dahil olmak üzere birçok kronik inflamatuvar ve nörodejeneratif hastalığın patolojisinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (49).

NLRP3 inflamazomu üç temel kısımdan oluşur: DAMP ve PAMP'larla ilişkili hücresel değişiklikleri algılayan bir sensör protein olan NLRP3, NLRP3 ile efektör protein arasındaki bağlantıyı sağlayan adaptör protein ASC (apoptozla ilişkili benek benzeri protein) ve aktive olduğunda proteolitik olarak aktif kaspaz-1'e dönüşen efektör prokaspaz-1 (50). NLRP3 proteini; N-terminal pirin bölgesi (PYD), ATPaz aktivitesine sahip merkezi NACHT bölgesi ve C-terminal lösin açısından zengin tekrar (LRR) bölgesinden oluşur (51). Aktivasyon sırasında NLRP3'ün PYD bölgesi, ASC'nin PYD bölgesiyle; ASC'nin kaspaz aktivasyon ve bağlanma bölgesi (CARD) ise prokaspaz-1'in CARD bölgesiyle etkileşerek NLRP3-ASC-prokaspaz-1 kompleksininin kurulmasını sağlar (Şekil 2.1.) (49).

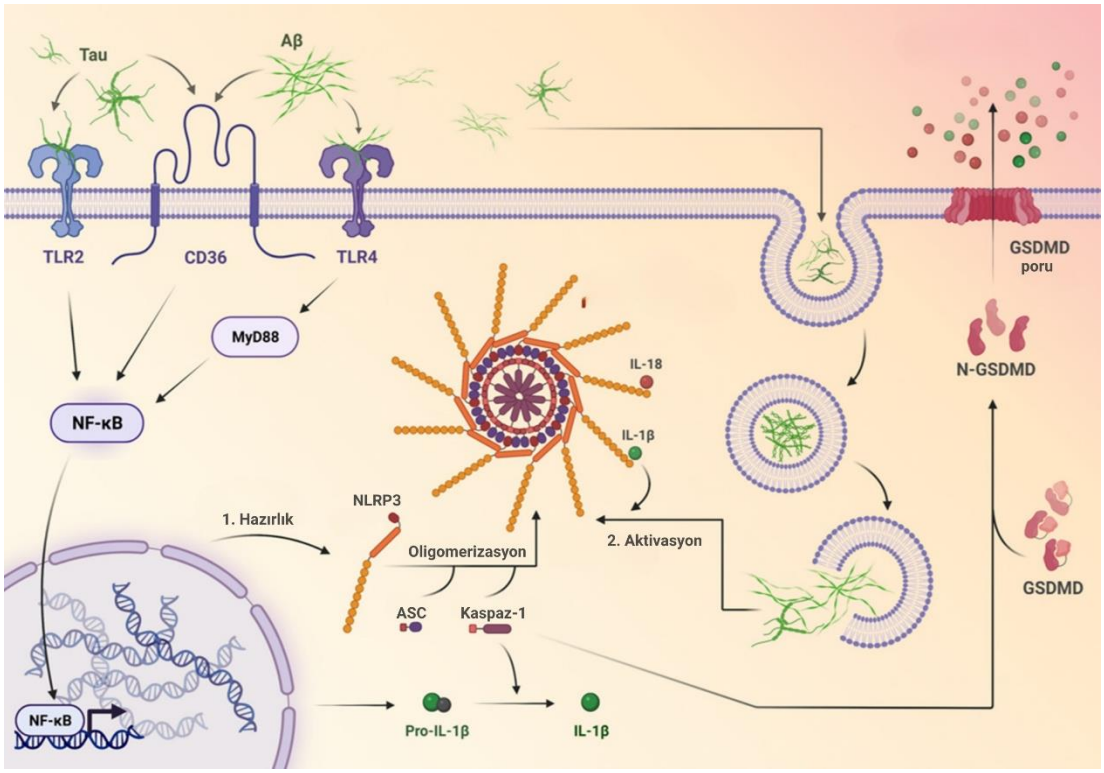


Şekil 2.1. NLRP3 inflamazom aktivasyonu (52 numaralı referanstan modifiye edilerek alınmıştır) (52).

Kanonik NLRP3 inflamazomu aktivasyonu genel olarak hazırlama (*priming)* ve aktivasyon olmak üzere birbirini izleyen basamaklardan oluşur. Hazırlama basamağında PAMP veya DAMP'lar, hücre yüzeyindeki TLR gibi PRR'ler tarafından algılanır. Miyeloid farklılaşma birincil yanıt proteini 88 (MyD88) aracılı sinyal iletimi sonucunda nükleer faktör-κB (NF-κB) sinyal yolağı aktive olarak NLRP3 ile pro-IL-1β ve pro-IL-18 gibi inflamazomla ilişkili proteinlerin ekspresyonunu artırır. Bu sırada meydana gelen posttranslasyonel düzenlemeler NLRP3'ü aktivasyona hazır hale getirir. İkinci basamakta ise hücre dışı ATP, iyon dengesindeki değişiklikler ve özellikle K^+ çıkışı, mitokondriyal stres, ROS oluşumu veya lizozomal bütünlüğün bozulması gibi hücresel değişiklikler NLRP3-ASC-pro-kaspaz-1 kompleksinin aktivasyonunu indükleyebilir. NLRP3 çok çeşitli PAMP ve DAMP'larla ilişkilendirilmiş olsa da NLRP3 yanıtının bu moleküllerle doğrudan bağlanarak değil, bunların oluşturduğu ortak hücresel stres sinyalleri ile oluştuğu kabul edilmektedir (49, 51).

Kompleksin birleşmesi prokaspaz-1'in aktif kaspaz-1'e dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz-1 ise pro-IL-1β ve pro-IL-18'i proteolitik olarak parçalayarak olgun IL-1β ve IL-18'e dönüştürür. Olgun IL-1β, doğal immün hücrelerinin inflamasyonun olduğu yere yönlendirilmesini sağlayan ve edinilmiş immün yanıtın düzenlenmesine katkı

sunan, inflamatuvar yanıtın gelişiminde önemli rol oynayan güçlü bir proinflamatuvar sitokindir. Olgun IL-18 ise doğal katil hücreler ile T hücrelerinin sitozolik aktivitesinin artırılması ve interferon-γ üretiminin uyarılmasında önemli rol oynar (53). Aktive olan kaspaz-1 aynı zamanda, gasdermin D'yi (GSDMD) parçalayarak membranda por oluşturan N-terminal GSDMD fragmanını oluşturur. Bu porlar IL-1B ve IL-18'in hücre dışına salıverilmesini kolaylaştırırken, ileri düzey aktivasyonda hücre şişmesi ile membran bütünlüğünün kaybıyla karakterize piroptoza yol açabilir (Şekil 2.2.) (54, 55).



Şekil 2.2. AH'de NLRP3 inflamazomunun ön hazırlık ve aktivasyon mekanizmaları (51 numaralı referanstan modifiye edilerek alınmıştır) (51).

NLRP3 inflamazomunun anormal veya aşırı aktivasyonu, birçok kronik inflamatuvar hastalığın patogenezinde rol oynamaktadır. Gut, ateroskleroz, tip 2 diyabet (T2DM), multipl skleroz, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, ülseratif kolit, kolon kanseri, meme kanseri, melanom gibi çeşitli kanserlerin yanı sıra AH'de de artmış NLRP3 aktivasyonu bildirilmiştir (56). Özellikle AH'de Aβ'nin TLR'ler ve diğer PRR'ler aracılığıyla NF-κB sinyal yolağını aktive ederek hazırlama sinyalini, diğer yandan fagosite edilen fibriller Aβ'nin lizozomal bütünlüğü bozarak aktivasyon

sinyalini oluşturduğu gösterilmiştir (57). Bu inflamatuvar süreç; nöroinflamasyonun şiddetlenmesine, nöronal apoptozun tetiklenmesine ve böylece AH patolojisinin ilerlemesine neden olabilir (49).

2.2.1 NLRP3 İnhibitörleri

NLRP3 inflamazomunun birçok hastalığın patolojisindeki rolünün aydınlatılması, bu kompleksin önemli bir farmakolojik hedef haline gelmesini sağlamıştır. NLRP3 inflamazomunun potansiyel inhibisyonu için NLRP3 inflamazom aktivasyonunun inhibisyonu, yukarı akış (*upstream*) sinyallerinin baskılanması, inflamazom montajının bloke edilmesi, kaspaz-1 aktivasyonunun inhibisyonu, GSDMD parçalanmasının bloke edilmesi ve NLRP3 inflamazomu tarafından üretilen inflamatuvar sitokinlerin nötralize edilmesi gibi çeşitli mekanizmaları hedefleyen ajanlar geliştirilmiştir (56). Bu ajanlar, hedef seçicilikleri, KBB'yi geçme özellikleri ve preklinik ve klinik geliştirilme aşamaları bakımından birbirinden ayrılmaktadır.

En iyi karakterize edilmiş direkt NLRP3 inhibitörlerinden olan MCC950, NLRP3'ün NACHT bölgesine bağlanıp ATPaz aktivitesini engellediği ve böylece proteinin aktif konformasyona geçişini, oligomerizasyonunu ve bunu izleyen kaspaz-1 aktivasyonunu engeller (58). AH modelinde MCC950'nin Aβ birikimini ve nöroinflamasyonu azalttığı, bilişsel işlevleri iyileştirdiği gösterilmiştir (59).

Benzer şekilde dapansutril (OLT1177) de, ATPaz aktivitesini inhibe edip NLRP3 inflamazom aktivasyonunu bloke ederek etkisini gösterir (56). OLT1177'nin gut ataklarında etkisini değerlendiren tamamlanmış bir Faz 2a çalışmasının sonuçlarına göre OLT1177'nin hedef eklem ağrısını, sistemik inflamasyonu azalttığı ve kabul edilebilir bir güvenlilik profili gösterdiği ve NLRP3 inhibisyonu için etkili olduğu gösterilmiştir (60). AH fare modelinde yapılan bir çalışma, OLT1177'nin NLRP3 kompleksinin oluşumunu ve pro-IL-1β ve pro-IL-18'in IL-1β ve IL-18'e dönüşümünü engelleyerek nöroprotektif etkiler gösterdiğini bildirmiştir (61).

CY-09, tranilast ve oridonin gibi direkt inhibitörler ile KBB'yi geçmek üzere geliştirilen ACI-19764, VTX3232 ve VEN-02XX gibi yeni moleküller farklı preklinik veya klinik geliştirme aşamalarındadır (56, 62, 63). ACI-19764, oral yoldan uygulanabilen

ve KBB'yi geçebilen seçici bir NLRP3 inhibitörü olarak geliştirilmektedir. Mart 2026'da Faz-1 çalışmasının başlatıldığı bildirilmiş olup ağustosta açıklanan ön sonuçlarda 20 mg/gün'e kadar uygulanan dozlarının güvenli olduğu ve iyi tolere edildiği, ayrıca IL-1β salıverilmesinde doza bağlı inhibisyon gözlendiği bildirilmiştir. Bu bulgular şirket tarafından açıklanan ön veriler olup çalışmanın tam sonuçlarının 2027'nin ilk yarısında yayımlanması beklenmektedir (64, 65) .

Direkt inhibitörlere ek olarak; NLRP3'ü dolaylı yoldan inhibe eden glibürid, β-hidroksibütirat (β-HB) gibi ajanlar da sıklıkla preklinik çalışmalarda denenmektedir (56, 63).

Başlıca NLRP3 inhibitörleri ve bildirilen etki mekanizmaları Tablo 2.1.'de özetlenmiştir.

Tablo 2.1. NLRP3 inhibitörleri ve etki mekanizmaları.

Ajan	Farmakolojik Hedef	Etki Mekanizması
MCC950	NLRP3-NACHT bölgesi	NACHT bölgesindeki ATP hidroliz mekanizmasını hedefleyerek NLRP3'ün aktif konformasyona geçişini, oligomerizasyonunu ve ASC/kaspaz-1 aktivasyonunu engeller (66).
CY-09	NLR3-NACHT bölgesi	ATP bağlanma motifine doğrudan bağlanarak ATPaz aktivitesini, NLRP3 oligomerizasyonunu ve inflamazom oluşumunu inhibe eder (67).
OLT1177	NLRP3	NLRP3 ATPaz aktivitesini ve NLRP3–ASC/NLRP3–kaspaz-1 etkileşimlerini azaltarak kompleks oluşumunu ve IL-1β/IL-18 olgunlaşmasını baskılar (68).
Tranilast	NLRP3–NACHT bölgesi	NACHT bölgesine bağlanarak oligomerizasyonu engeller (69).
Oridonin	NLRP3–Cys279	NACHT bölgesindeki Cys279'u modifiye ederek inflamazom oluşumunu engeller (70).
VTX3232	NLRP3; kesin bağlanma bölgesi açıklanmamıştır	Oral ve KBB'yi geçebilen seçici bir inhibitör olarak NLRP3'e bağlı kaspaz-1 ve sitokin oluşumunu baskılar (71).

Tablo 2.1. (Devam) NLRP3 inhibitörleri ve etki mekanizmaları.

ACI-19764	NLRP3; kesin bağlanma bölgesi açıklanmamıştır.	Oral ve KBB'yi geçebilen seçici bir inhibitor olarak NLRP3 aracılı kaspaz-1 aktivasyonu ile IL-1β/IL-18 salıverilmesini azaltır (64).
Glibürid	NLRP3'ün yukarı akış aktivasyon basamakları	NLRP3 oligomerizasyonunu ve ASC kümelenmesini engelleyerek prokaspaz-1'in kaspaz-1'e dönüşmesini inhibe eder (72).
β-HB	K^+ akışı/ASC oligomerizasyonu	ATP gibi NLRP3 aktivatörlerinin neden olduğu K^+ çıkışını azaltarak NLRP3 aktivasyonunu inhibe eder. ASC oligomerizasyonu ve ASC benek oluşumunu azaltır (73).
JC124	NLRP3; kesin bağlanma bölgesi açıklanmamıştır.	NLRP3, ASC, aktif kaspaz-1 ve IL-1β düzeylerini azaltarak inflamazom sinyallemesini baskılar (74).
VEN-02XX	NLRP3; kesin bağlanma bölgesi açıklanmamıştır.	Oral, seçici ve KBB'yi geçebilen küçük moleküllü bir NLRP3 inhibitörüdür; NLRP3 aktivasyonunu ve IL-1β/IL-18 üretimini baskılar (75).

2.3 Alzheimer Hastalığında NLRP3 İnflamazomu

NLRP3 inflamazomunun AH patogenezindeki rolüne ilişkin ilk doğrudan kanıtlardan biri Halle ve arkadaşlarının fibriler Aβ'nın mikroglialar tarafından fagosite edilmesinin lizozomal bütünlüğü bozarak katepsin-B gibi lizozomal bileşenlerin sitoplazmaya salıverilmesinin NLRP3 aktivasyonu yaptığını ve bu nedenle kaspaz-1'in aktive olup IL-1β salıverilmesini tetiklediğini gösterdiği çalışmasıdır (57).

APP/PS1 transgenik AH fare modeli ile yapılan bir çalışmada, NLRP3/kaspaz-1 yolağının aktive olduğu, *Nlrp3* veya *Casp1* gen delesyonunun mikroglial Aβ fagositozunu artırdığı, amiloid birikimini azalttığı ve bilişsel gerilemeye karşı koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (5). İnsanlardan elde edilen bulgular da bu sonuçları desteklemektedir. İleri evre AH hastalarının periferik monositlerinde NLRP3, kaspaz-1, IL-1β, IL-18 aktivasyonunun arttığı gösterilmiştir (76). Postmortem AH beyinlerinde

ise NLRP3, ASC ve kaspaz-1'in mikroglialarda birlikte eksprese edildiği ve inflamazomla ilişkili piroptotik sinyallemenin arttığı gösterilmiştir (77).

NLRP3 aktivasyonu yalnızca inflamatuvar sitokinlerin salıverilmesini tetiklemekle kalmayıp, aynı zamanda Aβ ve tau patolojisini güçlendiren bir geri besleme döngüsü de oluşturabilmektedir. Aktive mikroglialardan hücre dışına salıverilen ASC beneklerinin Aβ'ya bağlanarak Aβ oligomerizasyonunu ve agregasyonunu artırdığı ve böylece Aβ patolojisinin yayılımını desteklediği gösterilmiş; buna karşılık APP/PS1/*Asc*$^{-/-}$ farelerinde veya anti-ASC antikoru uygulanan modellerde Aβ agregasyonu ve patolojisinin yayılımının azaldığı bildirilmiştir (78). Benzer şekilde tau agregatları, mikroglial NLRP3-ASC inflamazomunu aktive etmiş; ASC eksikliği patolojik tau birikimini azaltmıştır (79). NLRP3 fonksiyon kaybının tau kinaz ve fosfatazların aktivitesini düzenleyerek tau hiperfosforilasyonunu ve agregasyonunu azalttığı gösterilmiştir (80). Bu bulgular, NLRP3 aktivasyonunun Aβ birikimine verilen ikincil bir inflamatuvar yanıt olmanın ötesinde hem Aβ hem de tau patolojisini güçlendiren aktif bir mekanizma olabileceğini düşündürmektedir.

NLRP3'ün farmakolojik olarak inhibe edildiği çalışmalar da bu hedefin terapötik potansiyelini desteklemektedir. NLRP3 inhibitörlerinin uygulanmasının farklı AH modellerinde inflamazom aktivasyonunu, nöroinflamasyonu ve amiloid patolojisini azalttığı bildirilmiştir. MCC950 tedavisi APP/PS1 transgenik farelerinde kaspaz-1 ve mikroglia aktivasyonunu azaltmış, mikroglial Aβ fagositozunu artırmış, amiloid yükünü düşürmüş ve bilişsel performansı iyileştirmiştir (59). JC-124 tedavisi TgCRND8 farelerde NLRP3 inflamazom aktivasyonunu, Aβ birikimini, oksidatif stres ve mikroglial aktivasyonu azaltırken sinaptofizin düzeylerini artırmıştır (81); APP/PS1 transgenik farelerde JC-124 uygulanarak gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise NLRP3 inhibisyonu, amiloid yükünü ve nöroinflamasyonu azaltıp sinaptik protein düzeylerini koruyarak bilişsel işlevleri iyileştirmiştir (74). Oral NLRP3 inhibitörü OLT1177 tedavisi, APP/PS1 transgenik farelerinde bozulmuş öğrenme ve bellek işlevlerinde iyileştirme sağlamış; IL-1β, IL-6 gibi inflamatuvar sitokin düzeylerini ve kortikal Aβ plak yükünü azaltmıştır (61). APP/PS1 transgenik fare modelinde, NLRP3

gen delesyonunun veya kronik farmakolojik NLRP3 inhibisyonunun mikroglial glutamin metabolizmasını yeniden düzenleyerek Aβ fagositozunu artırdığı (82), 5XFAD/Rubicon gen delesyonlu transgenik farelerde, selektif NLRP3 inhibitörü VEN-02XX'in bilişsel bozukluğu, mikrogliozu, nöronal kaybı ve tau patolojisini azalttığı bildirilmiştir (75). Bu bulgular, NLRP3 inhibisyonunun AH için araştırılmaya değer bir tedavi stratejisi olduğunu göstermektedir.

2.4 Alzheimer ve Diyabet Hastalığı İlişkisi

DSÖ 2022 verilerine göre yaklaşık 830 milyon *Diabetes Mellitus* (DM) hastası vardır (83).

Artan epidemiyolojik kanıtlar, DM'li bireylerin demans gelişme riskinin daha yüksek olduğunu göstermektedir (84). T2DM'li bireylerde demans gelişme riski, diyabeti olmayanlara kıyasla yaklaşık %60 daha yüksektir (85). DM ve AH arasındaki bağlantı, bu iki hastalığın nörodejeneratif süreçler sırasında benzer patolojik mekanizmaları paylaşmasıyla ortaya çıkmaktadır (86, 87). DM'nin makrovasküler (kardiyovasküler hastalıklar) ve mikrovasküler (nefropati, retinopati ve nöropati) komplikasyonları iyi bilinmektedir ve bilişsel fonksiyon bozukluğuna ve demansa zemin olan beyne özgü komplikasyonları da birçok araştırmanın konusu olmuştur (88). Her iki hastalığın patogenezinde de kronik inflamasyon, vasküler disfonksiyonlar, oksidatif stres, amiloidogenez ile insülin, glukoz ve yağ asidi metabolizmasındaki bozukluklar öne çıkmakta; glikasyona ya da oksidatif modifikasyona uğramış proteinlerin birikimi gözlenmektedir (89).

DM ve AH arasındaki ortak patofizyolojik mekanizmalar, antidiyabetik ilaçların AH tedavisinde yeniden konumlandırılmasına (*repurposing*) yönelik ilgiyi artırmıştır. Bu kapsamda intranazal insülin, metformin ve tiyazolidindionlar gibi insülin sinyallemesini veya duyarlılığını hedefleyen ajanların yanı sıra glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) reseptör agonistleri ve dipeptidil peptidaz-4 (DPP-4) inhibitörleri gibi inkretin temelli tedaviler farklı preklinik ve klinik çalışmalarda değerlendirilmiştir. Preklinik modellerde bu ilaç sınıflarının büyük bölümü Aβ birikimi, tau hiperfosforilasyonu, nöroinflamasyon ve bilişsel bozulma üzerine olumlu etkiler

göstermiş ancak insan çalışmalarına geçildiğinde bulgular ilaç grupları arasında belirgin şekilde farklılaşmıştır. GLP-1 reseptör agonistleri T2DM hastalarında azalmış demans riskiyle ilişkilendirilirken, DPP-4 inhibitörlerine dair kanıtlar karışık olmakla birlikte bazı çalışmalar koruyucu bir etkiye işaret etmektedir. Metformin ve tiyazolidindionlar için ise gözlemsel çalışmalar ve klinik çalışmalar tutarsız sonuçlar verirken, bazı kohort çalışmalarında artmış demans bildirilmektedir. Son yıllarda SGLT-2 inhibitörlerinin de glisemik etkilerinin ötesinde preklinik modellerde Aβ birikimini, tau hiperfosforilasyonunu ve nöronal kaybı azalttığı gösterildiği için AH'de yeniden konumlandırılabilecek potansiyel ilaç adayları arasında yer aldığı ve bu yöndeki preklinik ve gözlemsel kanıtların giderek arttığı bildirilmektedir (90).

2.5 Sodyum Glukoz Kotransporteri-2 İnhibitörleri

SGLT-2 proteinleri, böbrek proksimal tübüllerinde glukozun büyük bölümünün geri emiliminden sorumlu transmembranal proteinlerdir. Günümüzde DM tedavisinde kullanılan ve gliflozinler olarak da adlandırılan SGLT-2 inhibitörleri, renal glukoz geri emilimini azaltıp glukozüriyi artırarak serum glukoz düzeylerini insülinden bağımsız biçimde düşüren bir etki mekanizmasına sahiptirler. Aynı zamanda natriüreze neden olarak kan basıncında azalmaya yol açarlar (91).

SGLT-2 inhibitörlerinin geliştirilme süreci, 1835 yılında elma ağacı kök kabuğundan florizinin izole edilmesine dayanmaktadır. Florizinin düşük biyoyararlanımı, SGLT1 veya SGLT-2'ye karşı seçici olmaması ve ciddi gastrointestinal yan etkileri nedeniyle terapötik kullanımı uygun bulunmamıştır. Kanagliflozin, 2013 yılında T2DM tedavisi için Amerika Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan ilk SGLT-2 inhibitörü olmuş, bunu 2014 yılında empagliflozin ve dapagliflozin izlemiştir (92). Günümüzde klinik kullanım için ruhsatlandırılmış diğer SGLT-2 inhibitörleri ertugliflozin, beksagliflozin, ipragliflozin, luseogliflozin, tofogliflozin, remogliflozin etabonat, sotagliflozindir. Ertugliflozin ve beksagliflozin FDA tarafından onaylanmış olup ipragliflozin, luseogliflozin ve tofogliflozin başta Japonya olmak üzere bazı Asya ülkelerinde, remogliflozin etabonat Hindistan'da ruhsatlıdır. Hem SGLT-1 hem SGLT-2 inhibitörü olan sotagliflozin ise ABD'de kalp yetmezliği ve Avrupa'da ise seçilmiş

T1DM hastalarında kullanım içinruhsatlıdır (93-98). Türkiye'de ise klinik kullanımda olan ajanlar dapagliflozin, empagliflozin ve kanagliflozindir (99).

Kan glukozunu düzenlemedeki rollerinin ötesinde, SGLT-2 inhibitörlerinin kardiyoprotektif ve nefroprotektif etkileri bulunmaktadır veDM varlığından bağımsız olarak kalp yetmezliği ve kronik böbrek hastalığı olan hastalarda kullanılabilmektedir. Bu kardiyovasküler ve renal yararların yalnızca glisemik kontrol ile açıklanamaması, SGLT-2 inhibitörlerinin metabolik etkilerinin ötesinde hücresel stres ve/veya inflamatuvar yanıtları da modüle edebileceğini düşündürmüştür (100-105).

Özellikle kronik inflamasyonun hem DM komplikasyonlarında hem de AH patogenezinde ortak bir mekanizma olarak öne çıkması, SGLT-2 inhibitörlerinin antiinflamatuvar özelliklerine olan ilgiyi artırmıştır.

2.5.1 SGLT-2 İnhibitörlerinin Antiinflamatuvar Etkileri

SGLT-2 inhibitörlerinin antiinflamatuvar etkileri; TLR4/NF-κB, mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) ve Janus kinaz (JAK)/ sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) gibi proinflamatuvar sinyal yolaklarının baskılanması, adenozin monofosfat ile aktive olan protein kinaz (AMPK) aktivasyonunun artırılması, TNF-α, IL-6 ve IL-1β gibi proinflamatuvar mediyatörlerin üretiminin azaltılması ve monosit/makrofajların inflamatuvar aktivasyonu gibi çeşitli mekanizmalarla ilişkilendirilmektedir (106). Bu antiinflamatuvar etkiler arasında NLRP3 inflamazom aktivasyonunun baskılanması da önemli bir mekanizma olarak öne çıkmaktadır. Bununla birlikte SGLT-2 inhibitörleri, NLRP3'e doğrudan bağlanan selektif inhibitörler değildir. NLRP3 üzerindeki etkilerinin β-HB düzeylerini artırmaları, insülin düzeyini azaltmaları, AMPK aktivasyonu, mitokondriyal işlevlerin ve hücre içi Ca^{2+} homeostazını iyileştirilmeleri ile oksidatif ve endoplazmik retikulum stresini azaltmaları gibi dolaylı mekanizmalar aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir (8).

T2DM hastası olan ve yüksek kardiyovasküler riski bulunan hastalarda yapılan bir çalışmada 30 gün süreyle empagliflozin veya sülfonilüre uygulanmıştır. Her iki tedavi benzer glukoz düşürücü etki göstermesine rağmen SGLT-2 inhibitörü alan hastalardan elde edilen makrofajlarda ATP veya palmitat ile uyarılan IL-1β

salıverilmesinin daha fazla azaldığı bildirilmiştir. Bu etkiye serum β-HB düzeylerindeki artış ve insülin düzeylerindeki azalma eşlik etmiş; *ex vivo* deneylerde yüksek β-HB ve düşük insülin düzeylerinin NLRP3 aktivasyonunu baskıladığı doğrulanmıştır. Bu bulgular, SGLT-2 inhibitörlerinin NLRP3 üzerindeki etkisinin yalnızca glisemik kontrole bağlı olmadığını düşündürmüştür (100).

Diyabetik kardiyomiyopati modelinde yapılan bir çalışmada dapagliflozin, NLRP3, ASC, kaspaz-1 ve IL-1β düzeylerini azaltarak kardiyak inflamasyon ve fibrozisi azaltmış ve ventrikül fonksiyonları iyileştirmiştir (107). Empagliflozin de diyabetik olmayan kalp yetmezliği modellerinde NLRP3 aktivasyonunu azaltarak kardiyak fonksiyonların korunmasını sağlamıştır (108).

Benzer etkiler böbrek hastalıklarında da gösterilmiştir. Dapagliflozin, diyabetik nefropati modelinde NLRP3/ASC yolağını ve inflamatuvar sitokinleri inhibe ederek böbrek fonksiyonlarını iyileştirmiştir (109). Renal fibrozis modelinde ise itakonat üretimini artırarak NLRP3 aktivasyonunu ve fibrozisi azaltmıştır (110). Empagliflozinin ayrıca obeziteye bağlı böbrek hasarında ve metabolik karaciğer hastalığında NLRP3 aktivasyonu ile lipid birikimini azalttığı bildirilmiştir (111, 112). Bu bulgular, SGLT-2 inhibitörlerinin farklı hastalıklardaki inflamatuvar mekanizmalara NLRP3 inhibisyonu üzerinden antiinflamatuvar etkisinin olabileceğini göstermektedir.

SGLT-2 inhibitörlerinin kardiyak, renal ve metabolik hastalık modellerinde NLRP3 inflamazomunu baskılayabildiğinin gösterilmesi, benzer mekanizmaların SSS'deki inflamatuvar süreçlerde de etkili olabileceğini düşündürmüş, SGLT-2 inhibitörlerinin AH açısından potansiyel nöroprotektif etkilerinin araştırılmasına temel oluşturmuştur.

2.5.2 SGLT-2 İnhibitörlerinin Alzheimer Hastalığı Tedavisinde Kullanılması

SGLT-2 inhibitörlerinin kardiyak, renal ve metabolik hastalık modellerinde NLRP3 inflamazomunu baskılayabildiğinin gösterilmesi, benzer mekanizmaların SSS'deki inflamatuvar süreçlerde de etkili olabileceğini düşündürmüş, SGLT-2 inhibitörlerinin AH açısından potansiyel nöroprotektif etkilerinin araştırılmasına temel oluşturmuştur.

AH ve T2DM özelliklerini birlikte taşıyan APP/PS1 x db/db fareleriyle yapılan bir çalışmada empagliflozin tedavisinin; kortikal incelmeyi, nöronal kaybı, mikroglial aktivasyonu, serebral hemoraji ve amiloid plak yükünü azalttığı; öğrenme ve bellek bozukluğunu iyileştirdiği gösterilmiştir (113). Yüksek yağlı diyet ve streptozotosinle oluşturulan başka bir T2DM ve AH modelinde de empagliflozin, beyin insülin sinyallemesini iyileştirmiş, Aβ birikimini ve tau hiperfosforilasyonunu azaltarak hipokampal öğrenme ve bellek işlevlerini korumuştur (114).

SGLT-2 inhibitörlerinin AH'deki etkilerinde nöroinflamasyonun baskılanması da önemli görünmektedir. Alüminyum klorürle oluşturulan AH-benzeri sıçan modelinde kanagliflozin, tiyoredoksin ile etkileşen protein (TXNIP)/NLRP3 inflamazom yolağını ve proinflamatuvar sinyallemeyi baskılamış; mitokondriyal fonksiyonları, otofajiyi ve bilişsel performansı doza bağımlı olarak iyileştirmiştir (115). Hücresel AH modellerinde ise empagliflozin ve dapagliflozin, Aβ'nin neden olduğu hücre ölümünü, ROS oluşumunu, NLRP3 aktivasyonunu ve p-tau181 düzeylerini azaltmış; GSK-3β ve sikline bağımlı kinaz 5 (CDK5) sinyallemesini baskılamıştır (116). Daha yakın tarihli bir çalışmada enavogliflozin, 5XFAD farelerde mikroglial AMPK sinyallemesini ve mitokondriyal işlevleri güçlendirerek Aβ fagositozunu artırmış; $A\beta_{40}$, $A\beta_{42}$ düzeylerini, plak yükünü ve nöroinflamasyonu azaltırken sinaptik plastisiteyi ve bilişsel performansı iyileştirmiştir (117).

Klinik çalışmalar da bu potansiyeli desteklemektedir. T2DM'li 110.885 eşleştirilmiş hasta çiftinin incelendiği bir kohort çalışmasında SGLT-2 inhibitörü kullananlarda, DPP-4 inhibitörü kullananlara kıyasla AH gelişme riskinin yaklaşık %39 oranında azaldığı, SGLT-2 inhibitörleriyle DPP-4 inhibitörlerini kullananları karşılaştıran 278.689 kişilik başka bir kohortta bu oranın %18 azaldığı bildirilmiştir (118, 119). Dokuz retrospektif kohort çalışmasını ve toplam 2.433.086 T2DM hastasını (601.692 SGLT-2 inhibitörü kullanıcısı ve 1.831.394 DPP-4 inhibitörü kullanıcısı) kapsayan bir meta-analizde, SGLT-2 inhibitörü kullanımı DPP-4 inhibitörlerine kıyasla Alzheimer hastalığı riskinde %38 azalma ile ilişkili bulunmuştur (120). 1.348.362 kişilik T2DM kohortunda, SGLT-2 inhibitörü kullanan hastalarda,

SGLT-2 inhibitörü dışındaki oral antidiyabetik ilaçları kullanan hastalara kıyasla AH gelişme riskinin yaklaşık %19 daha düşük olduğu bildirilmiştir (121).

Mevcut bulgular, SGLT-2 inhibitörlerinin AH'de metabolik, vasküler ve inflamatuvar yolakları hedefleyen potansiyel ilaç adayları olduğunu göstermekle birlikte, hastalık modifiye edici etkinliklerinin kanıtlanması için daha geniş örneklemli ve uzun süreli klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

AH'de mikroglial aktivasyon ve NLRP3 inflamazomunun aşırı aktivasyonu, kronik nöroinflamasyonun gelişmesinde ve nörodejeneratif sürecin ilerlemesinde önemli rol oynamaktadır. SGLT-2 inhibitörlerinin glisemik kontrolün ötesinde antiinflamatuvar etkiler gösterebildiği ve NLRP3 inflamazom aktivasyonunu baskılayabildiği bildirilmiş olmakla birlikte, bu ilaçların AH ile ilişkili nöroinflamatuvar koşullarda NLRP3 inflamazomu üzerindeki etkileri ve farklı SGLT-2 inhibitörleri arasındaki olası farklılıklar henüz yeterince aydınlatılmamıştır. Bu tez çalışmasında, öncelikle Aβ ve LPS kullanılarak BV2 mikroglia hücrelerinde *in vitro* nöroinflamasyon modelleri oluşturulmuş, devamında beksagliflozin, dapagliflozin, empagliflozin, ertugliflozin ve kanagliflozinin NLRP3 inflamazomu aracılı inflamatuvar yanıt üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Çalışmanın temel hipotezi, SGLT-2 inhibitörlerinin mikroglial NLRP3 inflamazom aktivasyonunu baskılayarak inflamatuvar yanıtı azaltacağı ve bu etkinin farklı SGLT-2 inhibitörleri arasında değişkenlik göstereceğidir. Bu kapsamda, SGLT-2 inhibitörlerinin NLRP3, ASC ve kaspaz-1 protein düzeyleri ile IL-1β ve IL-18 düzeyleri üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi ve Aβ ile LPS tarafından oluşturulan inflamatuvar koşullardaki etkilerinin karşılaştırılması hedeflenmiştir. Mikroglial inflamatuvar yanıtın SGLT-2 inhibitörleriyle değişiminin kontrollü deneysel koşullarda incelenebilmesi, farklı ajanların aynı koşullarda karşılaştırılabilmesi ve sistemik değişkenlerin etkisinin sınırlandırılabilmesi amacıyla *in vivo* bir model yerine BV2 hücrelerine dayalı *in vitro* bir model tercih edilmiştir. Böylece SGLT-2 inhibitörlerinin AH ile ilişkili nöroinflamasyonda NLRP3 inflamazomunu hedefleyen potansiyel farmakolojik yaklaşımlar olarak değerlendirilmesine ve gelecekte yapılacak mekanistik ve preklinik çalışmalara bilimsel zemin oluşturulması amaçlanmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Kordinasyon Birimi (BAP, Proje numarası: THD-2025-21818) tarafından desteklenmiştir. Hücre kültürü deneyleri Hacettepe Üniversitesi Farmakoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı ve Hücre Kültürü biriminde, *Western blot* ve ELISA deneyleri Karolinska Institutet Neo Isotope Core Facility'de gerçekleştirilmiştir. Çalışmada ticari hücre kültürü hattı kullanıldığından etik kurul izni gerekmemektedir.

3.1. Hücre Kültürü

AH benzeri nöroinflamasyon modeli fare mikroglial hücre hattı olan BV2 hücre hattı (Cytion, Almanya) kullanılarak oluşturulmuştur. BV2 hücreleri, primer mikroglial hücrelerin morfolojik ve fonksiyonel özelliğini koruyan immortalize murin mikroglial hücre hattı olması nedeniyle *in vitro* mikroglia modeli olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (122). Çalışmamızda kullanılan BV2 hücre hattının özellikleri Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1 BV2 hücre hattının özellikleri (123).

Hücre hattı	BV2
Organizma	*Mus musculus*
Doku	Beyin
Suş	C57BL/6
Cinsiyet	Dişi
Hücre tipi	Mikroglia
Kültür özelliği	Adherent

BV2 mikroglia hücreleri; ısıyla inaktive edilmiş %10 fötal sığır serumu (FBS; Capricorn Scientific, Almanya), 100 U/mL penisilin ve 100 µg/mL streptomisin (Cegrogen Biotech, Almanya) içeren *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM; Pricella, Çin) vasatında; 37°C'de %5 CO_2 - %95 hava içeren bir hücre kültürü atmosferinde tutuldu. Hücrelerin adherans durumu, morfolojisi ve vasatın pH'sı düzenli aralıklarla izlendi ve 3-4 günde bir vasat değişimi yapıldı. Hücreler uygun

yoğunluğa ulaştığında pasajlandı ve deneylerde 5-10. pasajlar arasındaki BV2 hücreleri kullanıldı.

3.1.1. Hücrelerin Çözdürülmesi ve Dondurulması

Hücreleri çözdürmek için, -80°C'den çıkarılan kriyotüpler hızlıca 37°C'lik su banyosunun içinde çözdürüldü. Çözünen hücre süspansiyonu, vasat ile seyreltilerek 1500 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti yeniden vasatla süspanse edilip aynı yıkama işlemi bir kez daha tekrarlanarak dimetil sülfoksitin (DMSO) ortamdan tamamen uzaklaştırılması sağlandı. Sonrasında kültür vasatında, T25 flasklara (25 cm^2), her flaskta 1x 10^6 hücre olacak şekilde ekilerek, yeterli konfluense ulaşana kadar 37°C'de %5 CO_2'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

Hücreler flaskın yüzeyinin yaklaşık %80'ini kapladığında vasat uzaklaştırılıp hücreler steril fosfat tamponlu salin (PBS; pH 7,4) ile yıkandı. Sonra flask yüzeyine %0,25 tripsin-EDTA (Capricorn Scientific, ABD) eklenip 37°C'de 3 dakika inkübe edildi ve sonrasında tripsinin etkisini durdurmak için vasat eklendi. Elde edilen hücre süspansiyonu 1500 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti, 1 mL vasat içinde yeniden süspanse edildi. Hücre yoğunluğu ve canlılık oranı otomatik hücre sayım cihazı (Biorad TC20 Automated Cell Counter) kullanılarak belirlendi.

Hücre canlılığı testi ve Griess nitrit analizleri için BV2 hücreleri, 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına, her kuyucukta 0,01 x 10^6 olacak şekilde; *Western blot* ve enzime bağlı immünosorbent analizinde (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) kullanılacak hücreler ise 6 kuyucuklu kültür plakalarına her kuyucukta 0,3 x 10^6 hücre olacak biçimde ekildi. Hücrelerin plaka yüzeyine tutunabilmesi için plakalar 37°C'de, %5 CO_2 içeren nemlendirilmiş inkübatörde 24 saat bekletilip ardından belirlenen deney gruplarına uygun ilaç ve indüksiyon uygulamalarına geçildi.

Hücrelerin dondurulması amacıyla aynı şekilde vasat uzaklaştırılıp hücreler PBS ile yıkandı ve %0,25 tripsin-EDTA aracılığıyla flask yüzeyinden ayrıldı. Tripsin aktivitesi vasatla durdurulduktan sonra hücre süspansiyonu 1500 rpm'de 3 dakika

santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılıp kalan hücre pelletinin, %10 DMSO dondurma vasatında yeniden süspanse edilmesi sağlandı. Süspansiyon, 2 mL'lik kriyotüplere tüp başına 1 mL olacak şekilde dağıtıldı ve kademeli soğutma amacıyla kriyotüpler önce -20°C'de 2 saat bekletildi, ardından -80°C'ye aktarılarak saklandı.

3.2. Deneysel Ajanlar

3.2.1. Amiloid Betanın Hazırlanması

AH-benzeri nöroinflamasyon modeli oluşturulmasında insan $A\beta_{1-42}$ aminoasit dizisi temel alınarak kimyasal peptit sentezi yöntemiyle üretilmiş, %95'in üzerinde saflıkta liyofilize Amiloid $Beta_{1-42}$ peptidi (Peptiteam, Türkiye) kullanıldı. Peptit, deneylerde kullanılmak için fibrillere çevrildi (124, 125) Nöroinflamatuvar yanıtın oluşturulması amacıyla, literatürde BV2 hücrelerinde inflamatuvar yanıt oluşturulduğu bildirilen 5 µM konsantrasyonu tercih edildi (126, 127).

Aβ peptidi 1,1,1,3,3,3-hekzafloro-2-propanol (HFIP; AAblocks, ABD) içerisinde çözüldü ve laminar hava akımlı kabin içinde bir gece bekletilerek HFIP'ın tamamen uzaklaşması sağlandı. Elde edilen peptit mikrofilmi steril PBS içerisinde yeniden çözüldü. Aβ agregasyonunu sağlamak için peptit çözeltisi 37°C''de 24 saat inkübe edildi ve ardından nazikçe karıştırıldı. Daha sonra çözelti 5 dakika boyunca sonikasyona tabi tutuldu, alikotlara ayrıldı ve kullanıma kadar -80°C'de saklandı. Aβ tedavisinden hemen önce, stok çözeltisinin bir alikotu dondurucudan çıkarıldı ve çözüldü. Aβ gruplarındaki hücreler 5 µM Aβ ile 24 saat süre ile inkübe edildi.

3.2.2. Lipopolisakkaritin Hazırlanması

Nöroinflamasyon modelinin oluşturulmasında, *Escherichia coli* O55:B5 serotipinden elde edilen LPS kullanıldı. Nöroinflamatuvar yanıtın oluşturulması amacıyla, literatürde BV2 hücrelerinde inflamatuvar yanıt oluşturulduğu bildirilen 100 ng/mL konsantrasyonu tercih edildi (128, 129). LPS, ilgili konsantrasyonda olacak şekilde PBS içinde çözüldü. Bu stok çözeltisinin alikotları -20°C bir dondurucuda saklandı. LPS tedavisinden hemen önce, stok çözeltisinin bir alikotu dondurucudan

çıkarıldı ve çözdürüldü. LPS ile indüklenen deney gruplarındaki BV2 hücreleri, 100 ng/mL LPS varlığında 8 saat süreyle inkübe edildi.

3.2.3. SGLT-2 İnhibitörlerinin Hazırlanması

SGLT-2 inhibitörlerinin 1 mM stok çözeltileri, distile su içerisinde hazırlandı ve deneylerde kullanılmak üzere tek kullanımlık alikotlara ayrılarak -20°C'de saklandı. Deney günü uygun çalışma konsantrasyonlarına seyreltildi.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan SGLT-2 inhibitörleri.

Gliflozin	Üretici	Katalog No	Stok Kons.	Tarama Kons.
Beksagliflozin	Ambeed	A187149	1 mM	1, 5, 10, 25, 50 µM
Dapagliflozin	Ambeed	A120381	1 mM	1, 5, 10, 25, 50 µM
Empagliflozin	Ambeed	A112500	1 mM	1, 5, 10, 25, 50 µM
Ertugliflozin	Ambeed	A191432	1 mM	1, 5, 10, 25, 50 µM
Kanagliflozin	Ambeed	A335983	1 mM	1, 5, 10, 25, 50 µM

3.3. Hücre Canlılığı Testi

Uygulanan ajanların farklı konsantrasyon ve maruziyet sürelerinde hücre canlılığı üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi gerçekleştirildi. Yöntem, metabolik olarak aktif hücrelerde MTT'nin mitokondriyal dehidrojenaz enzimleri aracılığıyla çözünmeyen mor renkli formazan kristallerine indirgenmesi esasına dayanmaktadır (130).

Deneyden 24 saat önce BV2 hücreleri, 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarına, kuyucuk başına 2 x 10^4 hücre olacak şekilde ekildi ve hücrelerin yüzeye tutunması için 37°C'de, %5 CO_2 içeren nemlendirilmiş inkübatörde gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün hücrelere beksagliflozin, dapagliflozin, empagliflozin, ertugliflozin veya kanagliflozin 1, 5, 10, 25 veya 50 µM konsantrasyonlarında uygulandı ve hücreler 24, 48 veya 72 saat inkübe edildi.

İnkübasyon sürelerinin tamamlanmasının ardından kuyucuklardaki vasat uzaklaştırıldı ve hücrelere son konsantrasyonu 0,45 mg/mL olacak şekilde MTT solüsyonu eklendi. Plakalar, formazan kristallerinin oluşması amacıyla 37°C'de ve

ışıktan korunarak 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda MTT içeren ortam dikkatlice uzaklaştırıldı ve oluşan formazan kristallerinin çözünmesi amacıyla her bir kuyucuğa 100 µL DMSO eklendi. Kristallerin tamamen çözünmesini sağlamak amacıyla plakalar yaklaşık 10-15 dakika orbital çalkalayıcıda çalkalandı.

Formazan oluşumuna bağlı absorbans değerleri mikroplaka okuyucu kullanılarak 570 nm dalga boyunda ölçüldü. Elde edilen absorbans değerleri hücrelerin metabolik aktivitesinin ve dolayısıyla hücre canlılığının göstergesi olarak değerlendirildi. Kontrol grubunun hücre canlılığı %100 olarak kabul edilerek uygulama gruplarındaki hücre canlılığı kontrol grubuna göre yüzde (%) olarak hesaplandı.

3.4. Nitrit Düzeyinin Griess Yöntemi ile Ölçülmesi

Uygulanan ajanların, Aβ veya LPS ile indüklenen inflamatuvar yanıtın BV2 hücrelerinde NO üretimi üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla Griess yöntemi kullanıldı. NO kısa ömürlü ve kararsız bir molekül olduğundan, hücre kültürü süpernantlarında NO'nun daha kararlı bir son ürünü olan nitrit (NO^{2-}) düzeyi spektrofotometrik olarak ölçüldü. Yöntem, nitritin asidik ortamda sülfanilamit ile reaksiyona girmesi ve sonrasında N1-1-naftiletilendiamin dihidroklorür (NED) ile birleşerek pembe-mor renkli bir ürün oluşturma esasına dayanır. Oluşan rengin şiddeti, örnekte bulunan nitrit miktarı ile doğru orantılı olarak değerlendirildi (131).

Griess reaktifi, deney günü taze olarak hazırlandı. %1 sülfanilamid ve %0,1 NED, %3 fosforik asit (H_3PO_4) içerisinde çözüldü distile su ile 100 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan reaktif ışıktan korunarak saklandı ve deney sırasında buz üzerinde tutuldu.

Nitrit konsantrasyonlarının hesaplanabilmesi için, 1 mM sodyum nitrit ($NaNO_2$) stok çözeltisinden PBS ile seri seyreltmeler yapılarak 0-100 µM aralığında (0, 1, 2,5, 5, 10, 20, 50 ve 100 µM) standartlar hazırlandı. Elde edilen absorbans değerleri ile standart eğri oluşturuldu.

Deneyden bir gün önce BV2 hücreleri tripsin-EDTA uygulanarak flask yüzeyinden kaldırıldı. BV2 hücreleri 96 kuyucuklu plakalara ekildikten sonra 24 saat inkübe edilerek yüzeye tutunmaları sağlandı. Tripsin aktivitesi serum içeren kültür vasatıyla durdurulduktan sonra hücre süspansiyonu 1500 rpm'de 3 dakika santrifüj

edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelleti kültür vasatında yeniden süspanse edildi. Hücre sayımının ardından BV2 hücreleri, 96 kuyucuklu kültür plakalarına, kuyucuk başına 2 x 10^4 hücre olacak şekilde ekildi. Plakalar, hücrelerin yüzeye tutunması amacıyla 37°C'de ve %5 CO_2 içeren nemlendirilmiş inkübatörde 24 saat bekletildi. İnkübasyonun ardından kültür vasatı uzaklaştırıldı ve hücrelere 1-50 µm aralığında beksagliflozin, dapagliflozin, empagliflozin, ertugliflozin veya kanagliflozin uygulandı. Hücreler SGLT-2 inhibitörleriyle 1 saat ön inkübasyona bırakıldı. Ön inkübasyonun tamamlanmasının ardından, ilaç içeren vasat uzaklaştırılmadan ilgili deney gruplarına 5 µM Aβ veya 100 ng/mL LPS eklendi ve sonra 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her kuyucuktan 50 µL süpernatant alınarak yeni bir 96 kuyucuklu plakaya aktarıldı ve üzerine 50 µL Griess reaktifi eklendikten sonra oda sıcaklığında ve ışıktan korunarak 10 dakika daha inkübe edildi. Oluşan rengin absorbansı, mikroplaka okuyucu kullanılarak 550 nm dalga boyunda ölçüldü.

Aβ deneylerinde kullanılan $NaNO_2$ standart eğri $y = 0{,}0007320x + 0{,}03936$ denklemiyle yüksek doğrusallık gösterdi ($R^2 = 0{,}9992$). LPS deneylerinde kullanılan $NaNO_2$ standart eğri $y = 0{,}001420x + 0{,}05397$ denklemiyle yüksek doğrusallık gösterdi ($R^2 = 0{,}9982$). Bu regresyon denklemleri, hücre kültürü süpernatantlarında ölçülen absorbans değerlerinin nitrit konsantrasyonlarına (µM) dönüştürülmesinde kullanıldı ve örneklerdeki nitrit düzeyleri, BV2 hücrelerinde oluşan NO üretiminin bir göstergesi olarak değerlendirildi.

3.5. Hücre Kültürü Örneklerinin Analiz İçin Hazırlanması

Western blot ve ELISA analizlerinde kullanılacak örneklerin hazırlanması amacıyla BV2 hücreleri 6 kuyucuklu kültür plakalarında çoğaltıldı. Hücreler tripsin-EDTA ile flask yüzeyinden kaldırıldıktan sonra serum içeren vasatla süspanse edilerek tripsin aktivitesi durduruldu. Hücre süspansiyonu 1500 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Elde edilen hücre pelleti vasat içerisinde yeniden süspanse edilerek otomatik hücre sayım cihazıyla hücre yoğunluğu belirlendi.

Hücreler, 6 kuyucuklu kültür plakalarına, her kuyucukta 0,3 x 10^6 hücre ve 2 mL kültür vasatı bulunacak şekilde ekildi. Hücrelerin plaka yüzeyine tutunması için plakalar 37°C'de, %5 CO_2 içeren nemlendirilmiş inkübatörde 24 saat inkübe edildi.

Kullanılan konsantrasyonlar, ön değerlendirmelerde elde edilen hücre canlılığı ve nitrit üretimi sonuçları dikkate alınarak, sitotoksisite oluşturmadan belirgin antiinflamatuvar etkinlik gösteren konsantrasyonlar arasından her SGLT-2 inhibitörü için ayrı olarak belirlendi. Aβ deney gruplarında beksagliflozin, empagliflozin ve ertugliflozin 50 µM; dapagliflozin ve kanagliflozin 10 µM konsantrasyonda kullanıldı. Bir saatlik ilaç ön inkübasyonunun ardından ilgili gruplara 5 µM Aβ eklenerek hücreler 24 saat inkübe edildi. LPS deney gruplarında ise SGLT-2 inhibitörleri 50 µM konsantrasyonda uygulandı ve bir saat sonra ilgili kuyucuklara 100 ng/mL LPS eklenerek inkübasyona 8 saat devam edildi.

Uygulama sürelerinin sonunda hücre kültürü süpernatantları, hücre tabakasına zarar verilmeden dikkatlice toplandı. Süpernatantlar, IL-1β ve IL-18 düzeylerinin ELISA yöntemiyle belirlenmesinde kullanılmak üzere uygun hacimlerde alikotlandı ve analiz zamanına kadar -80°C'de sıcaklıkta muhafaza edildi.

Süpernatantların toplanmasının ardından kuyucuklarda kalan hücreler soğuk PBS ile iki kez yıkandı. Hücreler, yüzeyden hücre kazıyıcı yardımıyla mekanik olarak kaldırılarak toplandı ve 4°C'de 1200 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. *Western blot* analizinde kullanılacak protein örneklerinin hazırlanması amacıyla oluşan hücre pelletine proteaz ve fosfataz inhibitör kokteyli içeren RIPA tamponu (150 mM NaCl; 1% NP-40; 0,5% sodyum deoksikolat; 0,1% SDS; 50 mM Tris-HCl; pH 8,0) eklendi. Hücreler pipetaj ile süspanse edildi ve kısa aralıklarla vortekslenerek homojen hale getirildi. Buz üzerinde 30 dakika bekletildi ve aralıklı olarak vortekslendi. Homojenatlar 4°C'de 1200 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısmı ayrılarak tüplere aktarıldı. Elde edilen hücre lizatları analizlerde kullanılıncaya kadar -80°C'de saklandı.

3.6. Hücre Lizatlarının Protein Konsantrasyonlarının Ölçülmesi

Western blot analizinde kullanılacak hücre lizatlarının toplam protein konsantrasyonu bikinkoninik asit (BCA) yöntemi ile (23227, Pierce, Thermo Fisher Scientific, ABD) belirlendi. Yöntem, alkali ortamda proteinler tarafından Cu^{2+} iyonlarının Cu^{+} iyonlarına indirgenmesi ve oluşan Cu^{+} iyonlarının BCA ile renkli bir kompleks oluşturması esasına dayanmaktadır. Oluşan kompleksin 562 nm'deki absorbansı örnekte bulunan protein miktarı ile doğru orantılıdır (132).

Standartlar kitten çıkan sığır serum albümini (BSA) ile 0-2000 µg/mL aralığında (0, 25, 125, 250, 500, 750, 1500, 2000 µg/mL) hazırlandı. Hücre lizatları distile su ile 1:50 oranında seyreltilerek 96 kuyucuklu plakaya 10 µL olacak şekilde üçer tekrarlı yüklendi ve 50:1 oranında hazırlanan reaktif A:B her kuyucuğa 200 µL eklendi. Plaka 37°C'de ışıktan korunarak 30 dakika inkübe edildikten sonra absorbans değerleri mikroplaka okuyucu (SpectraMax i3x Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Devices, ABD) ile 562 nm'de ölçüldü. Protein konsantrasyonları BSA standart eğrisi kullanılarak hesaplandı. Elde edilen protein konsantrasyonları, *Western blot* analizinde her örnekten eşit miktarda protein yüklenmesi amacıyla kullanıldı.

3.7. Western Blot Analizi

NLRP3, ASC, kaspaz-1 proteinlerinin toplam düzeylerinin belirlenmesi amacıyla *Western blot* yöntemi kullanıldı (133). Hücre lizatlarının protein konsantrasyonları belirlendikten sonra her örnekten 30 µg protein içerecek hacim hesaplandı.

Örnekler, 4X yükleme tamponu (NP0007, NuPAGE; Invitrogen, ABD) ile 1X konsantrasyonunda karıştırıldı ve 95°C'de 5 dakika inkübe edildi. Hazırlanan örnekler ve protein moleküler ağırlık belirteci (LC5925, Invitrogen, ABD), %4-12 Bis-Tris hazır jellere (NP0322BOX, NuPAGE; Invitrogen, ABD) yüklenerek XCell SureLock cihazında (Invitrogen, ABD) 200 Volt'ta 40 dakika elektroforez yöntemiyle ayrıştırıldı. Elektroforez için kullanılmak üzere 20X NuPAGE MES SDS Running Buffer (NP0002, Invitrogen, ABD) distile suyla 1X konsantrasyonunda seyreltilerek kullanıldı.

Elektroforez sonrasında jelde ayrıştırılan proteinler, Bio-Rad Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad, ABD) kullanılarak 200 Volt'ta 90 dakikada, 0,2 µm nitroselüloz membranlara veya Bio-Rad Trans-Blot Turbo Transfer Sistemi (Bio-Rad, ABD) kullanılarak 7 dakikada 0,2 µm polivinilidin diflorür (PVDF) membranlara transfer edildi. Transfer sonrasında membranlar nonspesifik bağlanma bölgelerinin kapatılması amacıyla tris tamponlu salin (TBS) ve %0,1 Tween-20 içeren yıkama tamponunda (TBS-T; 20 mM Tris, 150 mM NaCl ve %0,1 Tween-20, pH 7,4-7,6) hazırlanmış %5 BSA içeren tamponda 1 saat boyunca oda sıcaklığında hafif çalkalamayla bloklandı.

Ardından membranlar Tablo 3.3.'te belirtilen primer antikorlarla 4°C'de gece boyu inkübe edildi. β-aktin, örnekler arasındaki protein yükleme farklılıklarının kontrol edilmesi ve hedef protein sinyallerinin normalizasyonu amacıyla yükleme kontrolü olarak kullanıldı. Ertesi gün membranlar TBS-T ile üç kez yıkandı ve Tablo 3.3.'te belirtilen TBS-T içerisinde hazırlanan sekonder antikor ile oda sıcaklığında karanlıkta yaklaşık 1 saat inkübe edildi. Sekonder antikor inkübasyonunun ardından membranlar tekrar TBS-T ile yıkandı.

Protein bantları, yakın kızılötesi (IR) floresan görüntüleme sistemi (LI-COR Odyssey Imaging System; LI-COR Biosciences, ABD) kullanılarak görüntülendi. Bu yöntemde sekonder antikorlara bağlı IR floresan boyaları (IRDye, *infrared dye*), kendilerine özgü dalga boylarındaki lazerlerle uyarılmakta ve yayılan floresan sinyal cihazın dedektörleri tarafından kaydedilmektedir. Elde edilen bant yoğunlukları ImageJ, Fiji (versiyon 1.54p) programı kullanılarak analiz edildi. Örnekler arasındaki yükleme farklılıklarının kontrol edilmesi amacıyla β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı.

NLRP3, ASC ve kaspaz-1 proteinlerine ait bant yoğunlukları aynı örneğe ait β-aktin bant yoğunluğuna oranlanarak normalize edildi:

$$Göreceli\ protein\ düzeyi\ = \frac{(Hedef\ protein\ bant\ yoğunluğu}{\beta - aktin\ bant\ yoğunluğu}$$

Elde edilen normalize değerler grup karşılaştırmalarında kullanıldı. Kontrol grubunun ortalama değeri %100 olarak kabul edilerek diğer deney gruplarındaki protein düzeyleri kontrole göre göreceli protein düzeyi şeklinde ifade edildi.

Tablo.3.3. Deneylerde kullanılan antikorlar.

Antikorlar	**Kat. No, Marka**	**Seyreltme Oranı**
Anti-NLRP3	30109-1-A, Proteintech	1:2000
Anti-ASC	10500-1-AP, Proteintech	1:10.000
Anti-Kaspaz-1	31020-1-AP, Proteintech	1:1.000
Anti-β-actin	MA5-15739, Invitrogen	1:5.000
IRDye 680RD Donkey Anti-Rabbit IgG	926-68073, LICOR	1:15.000

3.7. ELISA ile Sitokin Düzeyi Tayini

IL-1β ve IL-18 düzeylerinin belirlenmesinde sandviç ELISA yöntemi kullanıldı. Yöntem, kuyucuk tabanına önceden kaplanmış IL-1β'ye ve IL-18'e özgü antikorun, örnekte bulunan IL-1β'yı ve IL-18'i bağlaması ve ardından sırasıyla biyotinlenmiş yakalama antikoru ve streptavidin-HRP konjugatının bağlanmasıyla oluşan antijen-antikor kompleksinin oluşturulmasına dayanmaktadır. Substrat ilavesi sonrasında meydana gelen renk değişiminin şiddeti örnekte bulunan IL-1β ve IL-18 konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (134).

3.7.1. IL-1β Sitokin Düzeyi Tayini

Uygulanan ilaçların BV2 hücrelerinde IL-1β salıverilmesi üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla, hücre kültürü süpernatantlarındaki IL-1β düzeyleri Mouse IL-1β ELISA kiti (RE1074M; Reed Biotech, Çin) kullanılarak ölçüldü.

Standart eğrinin oluşturulması amacıyla kit içerisinde bulunan referans standart, 250 pg/mL konsantrasyonunda hazırlandı. Daha sonra seri dilüsyon yapılarak 3,91; 7,81; 15,625; 31,25; 62,5; 125 ve 250 pg/mL konsantrasyonlarında standart solüsyonları elde edildi. Örnek seyreltme tamponu içeren kuyucuklar kör (0 pg/mL) olarak kullanıldı. Standart solüsyonları deney günü taze olarak hazırlandı.

Standartlar, kör ve deney gruplarına ait hücre kültürü süpernatantları kuyucuklara 100 µL eklendikten sonra 37°C'de 90 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından kuyucuklardaki sıvı uzaklaştırıldı ve her kuyucuğa 300 µL yıkama tamponu eklenerek yaklaşık 30 saniye bekletildi ve yıkama solüsyonu uzaklaştırıldı. Bu işlem toplam üç kez tekrarlandı. Ardından her kuyucuğa 100 µL biyotinlenmiş yakalama

antikorlu çalışma solüsyonu eklenerek 37°C'de 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar üç kez yıkandı ve her kuyucuğa 100 µL HRP konjugatı çalışma solüsyonu ilave edilerek 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Kuyucuklar üç kez yıkandı. Son yıkama işleminin ardından karanlık bir ortamda her kuyucuğa 100 µL substrat reaktifi eklendi ve plaka ışıktan korunarak 37°C'de 15 dakika inkübe edildi. Oluşan enzimatik reaksiyon, her kuyucuğa 50 µL stop solüsyonu ilave edilerek sonlandırıldı. Optik yoğunluk (OD) değerleri stop solüsyonunun eklenmesinin hemen ardından SpectraMax i3x Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, ABD) kullanılarak 450 nm dalga boyunda ölçüldü.

Standartların ve örneklerin ölçümlerinden elde edilen OD değerlerinin ortalamaları hesaplandı ve kör kuyucuklarının ortalama OD değeri bu değerlerden çıkarıldı. Standart konsantrasyonları ile düzeltilmiş OD değerleri kullanılarak dört parametreli lojistik (4PL) regresyon modeli ile standart eğri oluşturuldu. Hücre kültürü süpernatantlarındaki IL-1β konsantrasyonları standart eğri üzerinden hesaplanarak pg/mL cinsinden ifade edildi.

3.7.2. IL-18 Sitokin Düzeyi Tayini

IL-18 düzeylerinin belirlenmesi amacıyla IL-18 ELISA kiti (YLA0109MO; YLBiont, Çin) kullanıldı. Standart eğrinin hazırlanması için kit içerisinde 640 ng/L konsantrasyonunda bulunan standart solüsyon kullanıldı. Seri dilüsyon yapılarak sırasıyla 20, 40, 80, 160 ve 320 ng/L konsantrasyonlarında standart çalışma solüsyonları hazırlandı.

Standart kuyucuklarına 50 µL standart solüsyonu ve 50 µL streptavidin-HRP eklendi. Deney gruplarına ait örnek kuyucuklarına ise 40 µL süpernatant, 10 µL biyotinlenmiş yakalama antikoru ve 50 µL streptavidin-HRP ilave edildi ve 37°C’de 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyonun ardından kuyucuklardaki sıvı uzaklaştırıldı ve yıkama solüsyonu ile beş kere yıkandı.

Her kuyucuğa sırasıyla 50 µL kromojen A ve 50 µL kromojen B solüsyonları eklendi. Plaka ışıktan korunarak 37°C’de 10 dakika inkübe edildi. Reaksiyon, her kuyucuğa 50 µL stop solüsyonu eklenerek sonlandırıldı ve OD değerleri, IL-1β

analizinde kullanılan SpectraMax i3x Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, ABD) ile 450 nm dalga boyunda ölçüldü.

Standart konsantrasyonları ile düzeltilmiş OD değerleri kullanılarak 4PL regresyon modeli ile standart eğri oluşturuldu.

3.8. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler ortalama ± standart hata (SH) şeklinde sunuldu. İstatistiksel analizler GraphPad Prism 9.5 (GraphPad Software, ABD) programı kullanılarak gerçekleştirildi. Analizlerden önce veriler aykırı değerler açısından değerlendirildi ve aykırı değerlerin belirlenmesinde ROUT yöntemi, Q=%1 olacak şekilde kullanıldı. Griess, *Western blot* ve ELISA deneylerinde birden fazla grubun ilgili model grubuyla karşılaştırılması amacıyla tek yönlü varyans analizi (*one-way ANOVA*) ve ardından Dunnett çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. SGLT-2 İnhibitörlerinin BV2 Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

Beksagliflozin, dapagliflozin, empagliflozin, ertugliflozin ve kanagliflozinin BV2 hücre canlılığı üzerindeki etkileri, 1-50 µM konsantrasyon aralığında artan konsantrasyonlarda (1, 5, 10, 25, 50 µM) ve 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde MTT testiyle değerlendirildi (Şekil 4.1.).

Elde edilen sonuçlar, hücre canlılığının kullanılan gliflozine, konsantrasyona ve inkübasyon süresine bağlı olarak değiştiğini ancak incelenen konsantrasyon aralığında konsantrasyona bağlı bir sitotoksik yanıt oluşmadığını gösterdi. (Şekil 4.1.).

Beksagliflozin uygulamasında 24 saatte hücre canlılığı %47,0-84,4 aralığında seyrederken, 48 saatte %50,5-80,9 arasında bulundu; 72 saatte ise özellikle 5-50 µM konsantrasyonlarında kontrol düzeyinin üzerine çıkarak %116,4-146,5 aralığına ulaştı (Şekil 4.1A.).

Dapagliflozin uygulamasında 24 saatte hücre canlılığı %82,0-116,1 arasında değişirken, 48 saatte %71,5-100,3 aralığında seyretti. Buna karşılık 72 saatte düşük konsantrasyonlarda yüksek hücre canlılığı gözlenirken konsantrasyon arttıkça azalma eğilimi ortaya çıktı ve değerler 1 µM'de %186,9'dan 50 µM'de %73,9'a geriledi (Şekil 4.1B.).

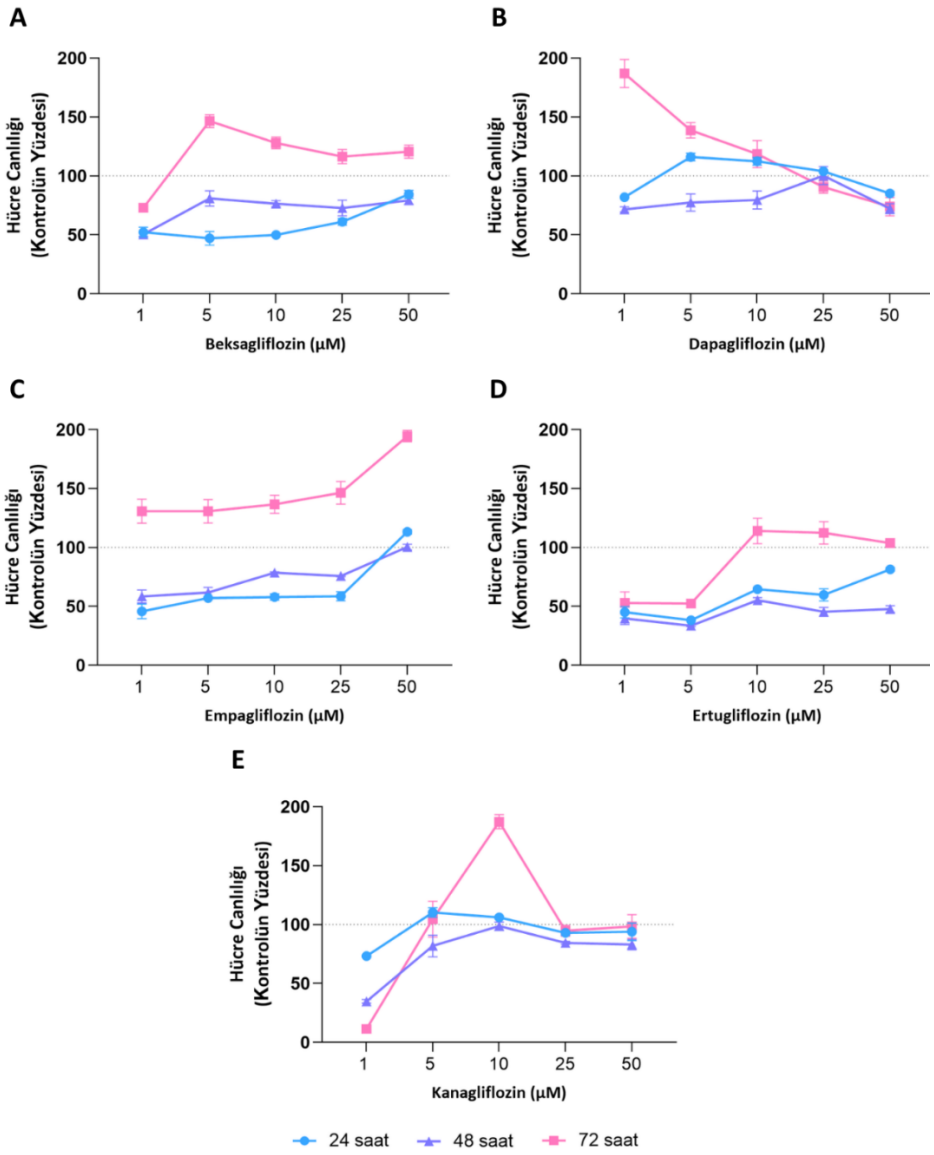
Empagliflozin uygulamasında 24 ve 48 saatte konsantrasyon artışıyla birlikte genel olarak hücre canlılığında artış eğilimi gözlendi; 24 saatte değerler %45,7-113,2, 48 saatte ise %58,4-100,3 arasında değişti. Yetmiş iki saatte tüm konsantrasyonlarda kontrolün üzerinde hücre canlılığı saptandı ve en yüksek değer 50 µM'de %194,4 olarak ölçüldü (Şekil 4.1C.).

Ertugliflozin uygulamasında 24 ve 48 saatte özellikle düşük konsantrasyonlarda hücre canlılığı daha düşük olmakla birlikte, konsantrasyon arttıkça kısmi bir artış gözlendi; 72 saatte ise 10-50 µM konsantrasyonlarında hücre canlılığı yaklaşık kontrol düzeyine ulaştı veya üzerine çıktı (Şekil 4.1D.).

Kanagliflozin uygulamasında 24 saatte 5-50 µM konsantrasyonlarında hücre canlılığı %92,9-110,3 arasında seyrederken, 48 saatte 10-50 µM'de %83,0-98,7

arasında bulundu. Yetmiş iki saatte ise özellikle 1 ve 10 µM konsantrasyonlarında belirgin değişkenlik gözlendi; diğer konsantrasyonlarda hücre canlılığı yaklaşık kontrol düzeyinde seyretti (Şekil 4.1E.).

Bu bulgular genel olarak değerlendirildiğinde, hiçbir gliflozin için konsantrasyon artışıyla paralel ve süreklilik gösteren belirgin bir sitotoksisite paterni saptanmadı. MTT sonuçları Griess testi sonuçlarıyla birlikte değerlendirilerek sonraki deneylerde kullanılacak konsantrasyonlar belirlendi.



Şekil 4.1. Beksagliflozin **(A),** dapagliflozin **(B),** empagliflozin **(C),** ertugliflozin **(D)** ve kanagliflozinin **(E)** farklı konsantrasyonlarda BV2 hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin MTT testi ile 24, 48 ve 72. saatlerde değerlendirilmesi. Veriler ortalama ± SH olarak gösterilmiştir.

4.2. SGLT-2 İnhibitörlerinin Nitrit Üretimi Üzerine Etkileri

4.2.1. Aβ ile İndüklenen BV2 Hücrelerinde Nitrit Üretiminin Değerlendirilmesi

Aβ ile indüklenen AH benzeri nöroinflamasyon modelinde beksagliflozin, dapagliflozin, empagliflozin, ertugliflozin ve kanagliflozinin nitrit düzeyleri üzerindeki etkileri Griess testi ile değerlendirildi (Şekil 4.2.). Kullanılan SGLT-2 inhibitörlerinin çoğunun Aβ inkübasyonu ile artmış olan nitrit düzeylerinde doza bağlı bir azaltma yaptığı görüldü ancak bu azalma anlamlı değildi.

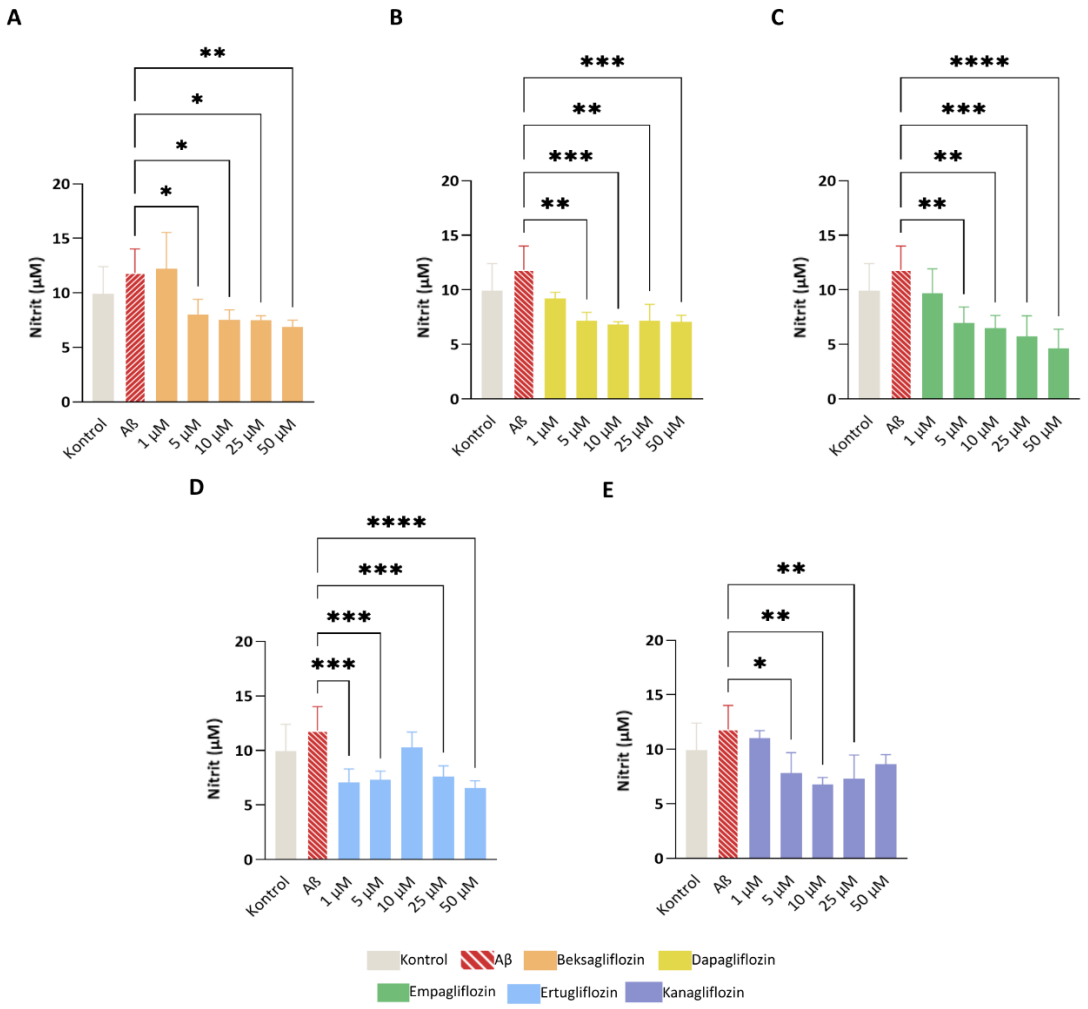
Beksagliflozin 5 µM (*p*=0,0484), 10 µM (*p*=0,0225), 25 µM (*p*=0,0201) ve 50 µM (*p*=0,0072) konsantrasyonlarda nitrit düzeyini Aβ grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı azaltırken, 1 µM konsantrasyonda anlamlı bir değişiklik yapmadı (*p*=0,9996) (Şekil 4.2A.).

Dapagliflozin 5 µM (*p*=0,001), 10 µM (*p*=0,0004), 25 µM (*p*=0,0009) ve 50 µM (*p*=0,0008) konsantrasyonlarda nitrit düzeyini Aβ grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olarak azalttı. Buna karşın 1 µM konsantrasyonda anlamlı bir değişiklik saptanmadı (*p*=0,0832) (Şekil 4.2B.).

Empagliflozin 5 µM (*p*=0,0093), 10 µM (*p*=0,0041), 25 µM (*p*=0,0012) ve 50 µM (*p*=0,0002) konsantrasyonlarda nitrit düzeyini Aβ grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olarak azalttı 1 µM konsantrasyonda anlamlı bir farklılık saptanmadı (*p*=0,4614) (Şekil 4.2C.).

Ertugliflozin 1 µM (*p*=0,0015), 5 µM (*p*=0,0024), 25 µM (*p*=0,0044) ve 50 µM (*p*=0,0005) konsantrasyonlarda nitrit düzeyini Aβ grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olarak azaltırken , 10 µM konsantrasyonda değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (*p*=0,5380) (Şekil 4.2D.).

Kanagliflozin 5 µM (*p*=0,018), 10 µM (*p*=0,0026) ve 25 µM (*p*=0,0067) konsantrasyonlarda nitrit düzeyini Aβ grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olarak azaltırken 1 µM *(p*=0,9687) ve 50 µM (*p*=0,0722) konsantrasyonlardaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 4.2E.).



Şekil 4.2. Aβ ile indüklenen BV2 hücrelerinde beksagliflozin **(A),** dapagliflozin **(B),** empagliflozin **(C),** ertugliflozin **(D)** ve kanagliflozinin **(E)** farklı konsantrasyonlarda (1, 5, 10, 25, 50 µM) nitrit üretimi üzerine etkileri. Veriler ortalama ± SH olarak sunulmuştur (n=4). İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ve Dunnett çoklu karşılaştırma testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. **p*<0,05; ***p*<0,01; ****p*<0,001; *****p*<0,0001.

4.2.2. LPS ile İndüklenen BV2 Hücrelerinde Nitrit Üretiminin Değerlendirilmesi

LPS ile indüklenen BV2 hücrelerinde beksagliflozin, dapagliflozin, ertugliflozin ve kanagliflozinin nitrit düzeyleri üzerindeki etkileri Griess testi ile değerlendirildi (Şekil 4.3.). LPS uygulaması nitrit düzeylerinde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi (*p*<0,05) (Şekil 4.3).

Beksagliflozin 10 µM (*p*=0,0186) ve 50 µM (*p*=0,002) konsantrasyonlarda nitrit düzeyini LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olarak azalttı.

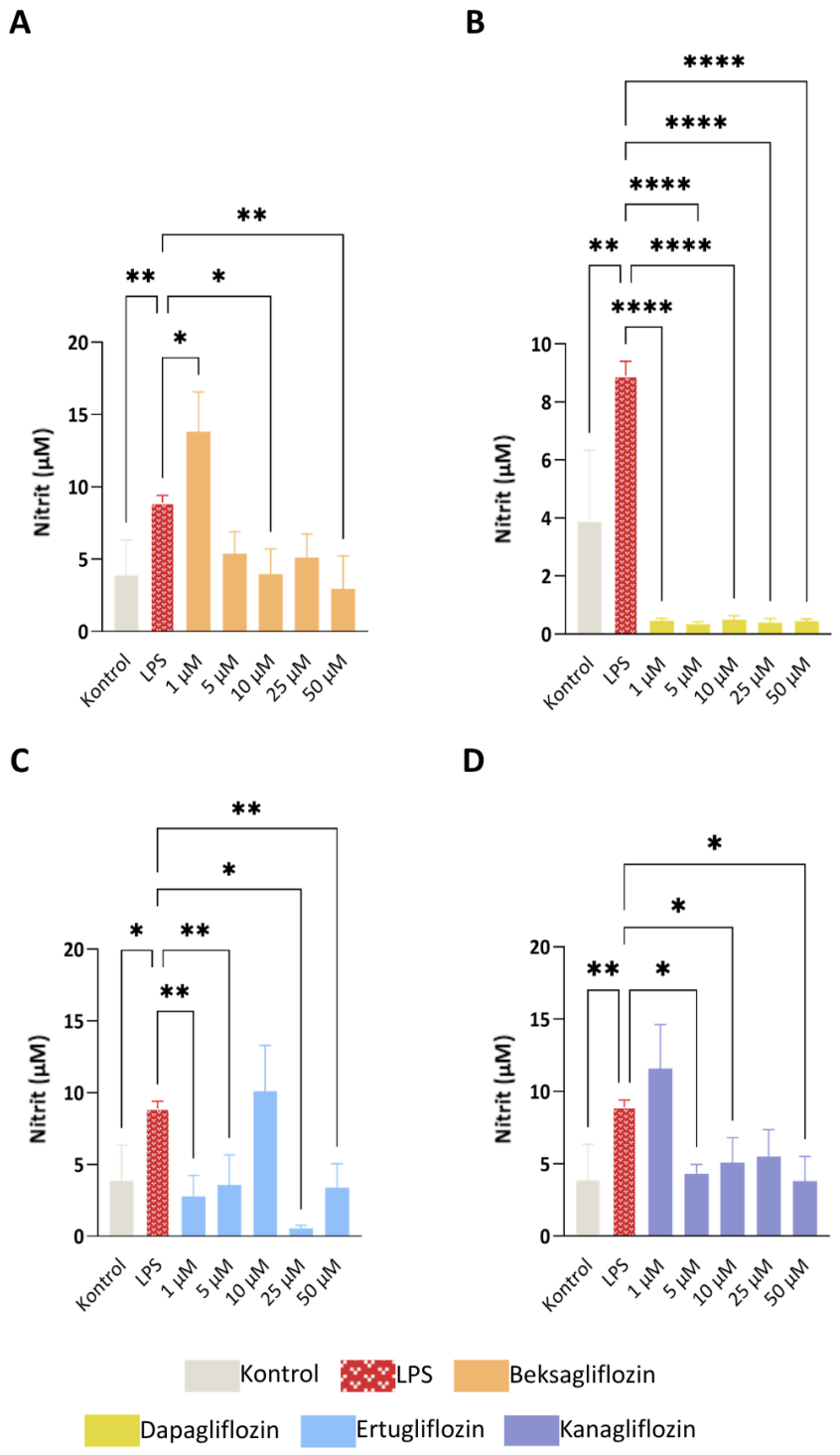
Beksagliflozinin 5 µM (*p*=0,0863) ve 25 µM (*p*=0,0594) konsantrasyonlarında yaptığı azalmalar istatistiksel anlamlılığa ulaşmazken 1 µM beksagliflozin LPS grubuna göre nitrit düzeyini anlamlı şekilde artırdı *(p=0,*0104) (Şekil 4.3A.).

Dapagliflozin uygulaması her konsantrasyonda nitrit düzeylerininLPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olarak azalttı (*p*<0,0001) (Şekil 4.3B.).

Ertugliflozin uygulamasında 1 µM (*p*=0,0029), 5 µM (*p*=0,0097), 25 µM (*p*=0,0118) ve 50 µM (*p*=0,0077) konsantrasyonlarda nitrit düzeyi LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olarak azalırken, 10 µM konsantrasyonundaki değişiklik anlamlı bulunmadı (*p*=0,9175) (Şekil 4.3C.).

Kanagliflozin 5 µM (*p*=0,0143), 10 µM (*p*=0,0480) ve 50 µM (*p*=0,0116) konsantrasyonlarda nitrit düzeyini LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olarak azalttı. Buna karşılık 1 µM (*p*=0,2381) ve 25 µM (*p*=0,0887) konsantrasyonlarda anlamlı farklılık saptanmadı (Şekil 4.3D.).

Empagliflozin deneylerindeki absorbans değerleri standart eğrinin güvenilir ölçüm aralığının altında kaldığından bu gliflozine ait nitrit ölçümleri nicel karşılaştırmaya dahil edilmedi.



Şekil 4.3. LPS ile indüklenen BV2 hücrelerinde beksagliflon **(A)**, dapagliflozin **(B)**, ertugliflozin **(C)** ve kanagliflozinin **(D)** farklı konsantrasyonlarda (1, 5, 10, 25, 50 µM) nitrit üretimi üzerine etkileri. Veriler ortalama ± SH olarak sunulmuştur (n=4). İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ve Dunnett çoklu karşılaştırma testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. **p*<0,05; ***p*<0,01; *****p*<0,0001.

4.2.3. SGLT-2 İnhibitörlerinin Sonraki Deneylerde Kullanılacak Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Her iki indüksiyon yöntemi ile oluşturulan nöroinflamasyon modelinde de SGLT-2 inhibitörlerinin konsantrasyon seçimi, hücre canlılığı ve NO düzeylerindeki etkileri birlikte değerlendirilerek belirlendi. Bu değerlendirmede, hücre canlılığının kontrol grubuna göre en az %80 düzeyinde korunduğu ve NO düzeylerinde azalma gözlenen konsantrasyonlar sonraki deneylerde kullanılmak üzere seçildi.

Aβ modeli için beksagliflozin için 50 µM, dapagliflozin için 10 µM, empagliflozin için 50 µM, ertugliflozin için 50 µM ve kanagliflozin için 10 µM konsantrasyonları seçildi.

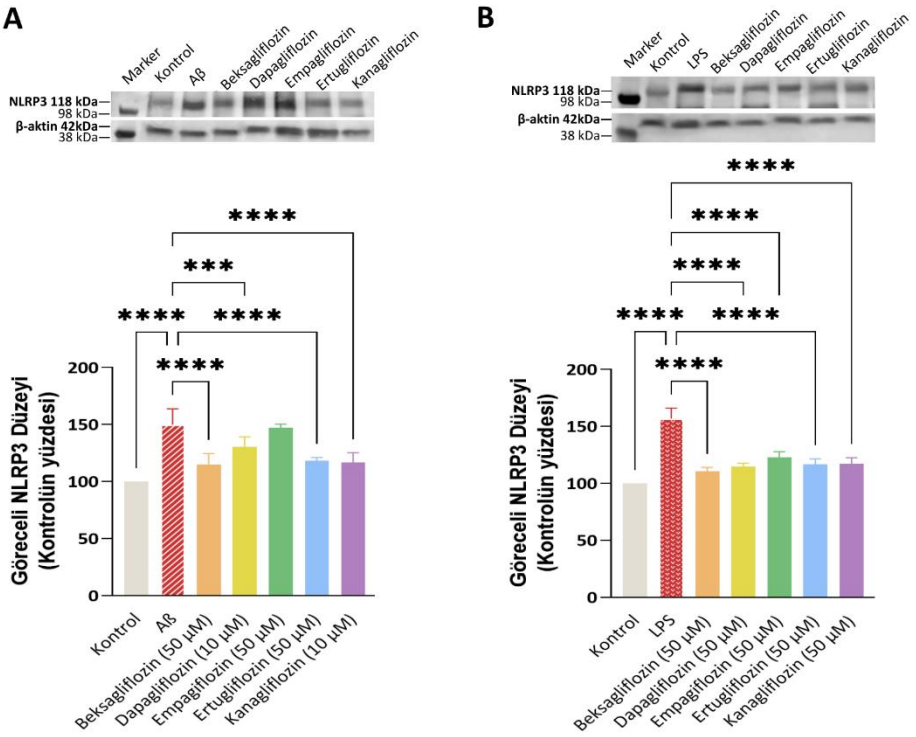
LPS ile indüklenen modelde ise beksagliflozin, dapagliflozin, ertugliflozin ve kanagliflozin için 50 µM konsantrasyonu seçildi. Empagliflozin için konsantrasyon seçimi nitrit verilerine dayandırılmadı. 50 µM konsantrasyon hücre canlılığının korunması ve diğer gliflozinler arasında ortak bir konsantrasyon kullanılabilmesi amacıyla tercih edildi.

4.3. SGLT-2 İnhibitörlerinin NLRP3 İnflamazom Proteinleri Üzerindeki Etkileri

4.3.1. SGLT-2 İnhibitörlerinin NLRP3 Protein Düzeylerine Etkisi

Aβ uygulaması, NLRP3 toplam protein düzeylerini kontrol grubuna kıyasla %49,9 artırdı (p<0,0001). Beksagliflozin, dapagliflozin, empagliflozin, ertugliflozin ve kanagliflozin gruplarında NLRP3 düzeyleri sırasıyla kontrolün %114,8'i, %130,3'ü, %147,2'si, %118,5'i ve %117,0'ı olarak ölçüldü. Aβ grubuyla karşılaştırıldığında, beksagliflozin NLRP3 düzeyini %23,4 oranında azalttı (p<0,0001). Dapagliflozin, ertugliflozin ve kanagliflozin uygulamaları NLRP3 protein düzeylerini Aβ grubuna kıyasla sırasıyla %13,1 (p=0,0003), %21,0 (p<0,0001) ve %22,0 (p<0,0001) oranında azalttı. Empagliflozin grubunda NLRP3 düzeyi Aβ grubuna göre %1,8 oranında azalmış olsa da bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0,9749) (Şekil 4.4A.).

LPS uygulaması ise, NLRP3 protein düzeylerini kontrol grubuna kıyasla %56,9 artırdı (*p*<0,0001). Beksagliflozin, dapagliflozin, empagliflozin, ertugliflozin ve kanagliflozin uygulamalarında NLRP3 düzeyleri sırasıyla kontrolün %110,5'i, %114,9'u, %122,9'u, %116,9'u ve %117,3'ü olarak belirlendi. Bu değerler LPS grubuna kıyasla sırasıyla %29,5; %26,8; %21,6; %25,5 ve %25,2 oranında anlamlı azalmaya karşılık geldi ve hepsinde anlamlı bir azalma sağladı (tümü için *p*<0,0001) (Şekil 4.4B.).



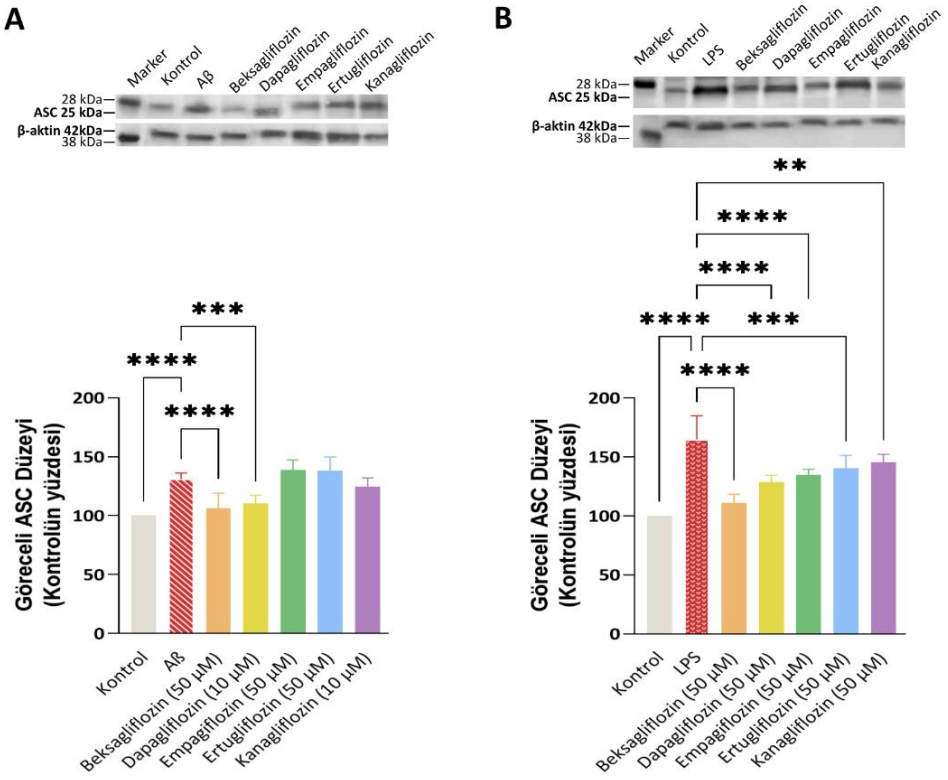
Şekil 4.4. Aβ **(A)** veya LPS **(B)** ile indüklenen BV2 hücrelerinde beksagliflozin, dapagliflozin, empagliflozin, ertugliflozin ve kanagliflozin uygulamalarının NLRP3 protein düzeyleri üzerine etkisi. (Aβ grupları için n=7; LPS grupları için n=6). İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ve Dunnett çoklu karşılaştırma testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ***p<0,001; ****p<0,0001.

4.3.2. SGLT-2 İnhibitörlerinin ASC Protein Düzeylerine Etkisi

Aβ uygulaması, ASC protein düzeylerini kontrol grubuna kıyasla %31,0 artırdı (*p*<0,0001). Beksagliflozin, dapagliflozin, empagliflozin, ertugliflozin ve kanagliflozin gruplarında ASC düzeyleri sırasıyla %106,2, %110,3, %138,7, %138,3 ve %124,8'i olarak belirlendi. Bu değerler Aβ grubuna kıyasla beksagliflozin için %18,9 (*p*<0,0001) ve dapagliflozin için %15,8 (*p*=0,0003) oranında azalarak anlamlı bir azalmaya karşılık

geldi. Kanagliflozin grubunda Aβ grubuna göre %4,7'lik sayısal bir azalma gözlenirken bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (*p*=0,5702). Empagliflozin ve ertugliflozin gruplarında ise ASC düzeyleri Aβ grubuna kıyasla sırasıyla %5,9 ve %5,6 oranında sayısal olarak daha yüksek bulundu ancak bu değerler istatistiksel olarak anlamlı değildi (sırasıyla *p*=0,3513 ve *p*=0,4007) (Şekil 4.5A.).

LPS uygulaması, ASC protein düzeylerini kontrol grubuna kıyasla %64,9 artırdı (*p*<0,0001). Beksagliflozin, dapagliflozin, empagliflozin, ertugliflozin ve kanagliflozin gruplarında ASC düzeyleri sırasıyla kontrolün %111,2, %128,9, %135,1, %140,5 ve %145,2'si olarak belirlendi. LPS grubuyla karşılaştırıldığında, beksagliflozin ASC düzeyini %32,6, dapagliflozin %21,8 ve empagliflozin %18,1 oranında anlamlı olarak azalttı (her üçü için *p*<0,0001). Ertugliflozin ile %14,8 (*p*=0,0007), kanagliflozin ile %12,0 (*p*=0,0072) oranında anlamlı azalma gözlendi (Şekil 4.5B.).

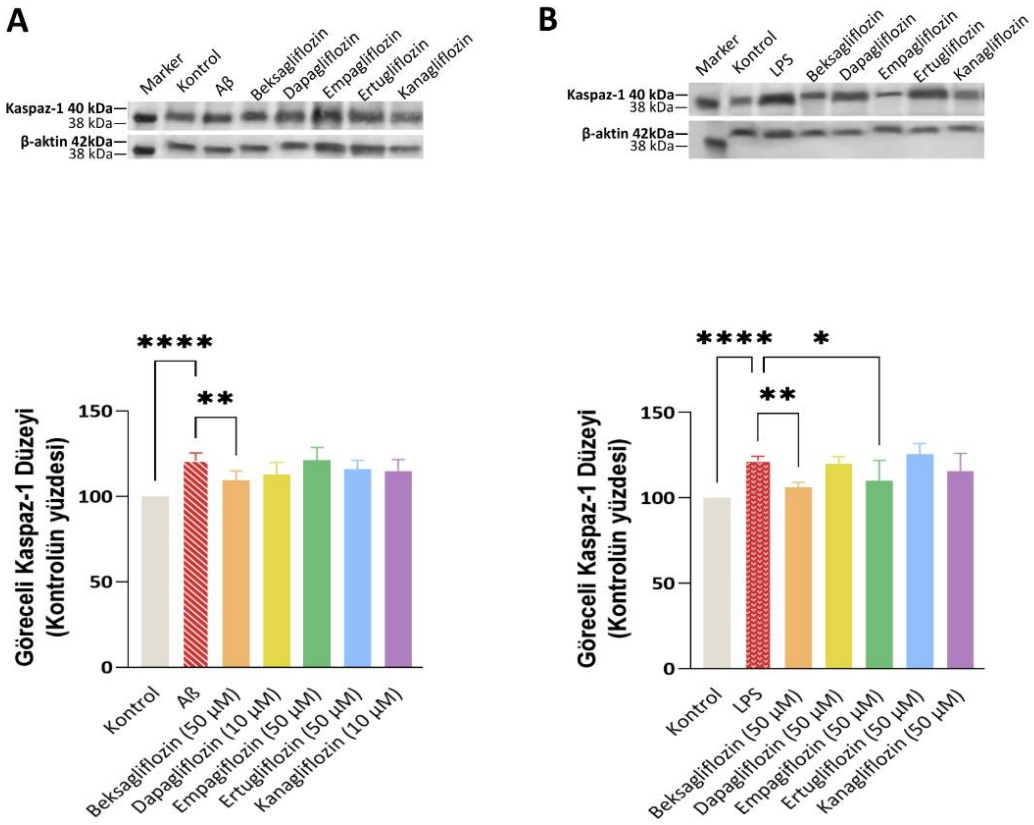


Şekil 4.5. Aβ **(A)** veya LPS **(B)** ile indüklenen BV2 hücrelerinde beksagliflozin, dapagliflozin, empagliflozin, ertugliflozin ve kanagliflozin uygulamalarının ASC protein düzeyleri üzerine etkisi. Veriler ortalama ± SH olarak sunulmuştur (Aβ grupları için n=7; LPS grupları için n=6). İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ve Dunnett çoklu karşılaştırma testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ***p*<0,01; ****p*<0,001; *****p*<0,0001.

4.3.3. SGLT-2 İnhibitörlerinin Kaspaz-1 Protein Düzeylerine Etkisi

Aβ uygulaması, kaspaz-1 protein düzeylerini kontrol grubuna kıyasla %20,9 artırdı (p<0,0001). Beksagliflozin grubunda kaspaz-1 düzeyi Aβ grubuna kıyasla %9,6 oranında anlamlı azalma gösterdi (p=0,0024). Dapagliflozin, ertugliflozin ve kanagliflozin gruplarında kaspaz-1 düzeyleri sırasıyla kontrolün %113,0'ı, %116,0'ı ve %115,0'ı olarak belirlendi. Bu gruplarda Aβ grubuna kıyasla sırasıyla %6,6, %4,0 ve %4,9 oranında sayısal azalma gözlenmesine karşın bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (sırasıyla p=0,0600; p=0,4102 ve p=0,2316). Empagliflozin grubunda kaspaz-1 düzeyi kontrolün %121,2'si olarak ölçüldü. Empagliflozin grubunda kaspaz-1 düzeyinde Aβ grubuna göre gözlenen %0,3'lük sayısal artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p=0,9999) (Şekil 4.6A.).

LPS uygulaması, kaspaz-1 protein düzeylerini kontrol grubuna kıyasla %21,6 artırdı (p<0,0001). Beksagliflozin grubunda kaspaz-1 düzeyi kontrolün %106,2'si olarak ölçüldü ve LPS grubuna göre %12,7 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdi (p=0,0022). Empagliflozin grubunda kaspaz-1 düzeyi kontrolün %109,8'i olarak belirlendi ve LPS grubuna kıyasla %9,7 oranında anlamlı azalma saptandı (p=0,0248). Dapagliflozin ve kanagliflozin gruplarında kaspaz-1 düzeyleri sırasıyla kontrolün %119,7'si ve %115,8'i olarak ölçüldü. LPS grubuna göre gözlenen sırasıyla %1,6 ve %4,8 oranındaki sayısal azalmalar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (sırasıyla p=0,9926 ve p=0,4878). Ertugliflozin grubunda kaspaz-1 düzeyi kontrolün %125,4'ü olarak ölçüldü. Ertugliflozin uygulaması kaspaz-1 düzeyini LPS grubuna kıyasla %3,1 oranında sayısal olarak artırdı; ancak bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p=0,8415) (Şekil 4.6B.).



Şekil 4.6. Aβ **(A)** veya LPS **(B)** ile indüklenen BV2 hücrelerinde beksagliflozin, dapagliflozin, empagliflozin, ertugliflozin ve kanagliflozin uygulamalarının kaspaz-1 protein düzeyleri üzerine etkisi. Veriler ortalama ± SH olarak sunulmuştur (Aβ grupları için n=7; LPS grupları için n=6). İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ve Dunnett çoklu karşılaştırma testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *p<0,05; **p<0,01; ****p<0,0001.

4.4. SGLT-2 İnhibitörlerinin Proinflamatuvar Sitokinler Üzerine Etkileri

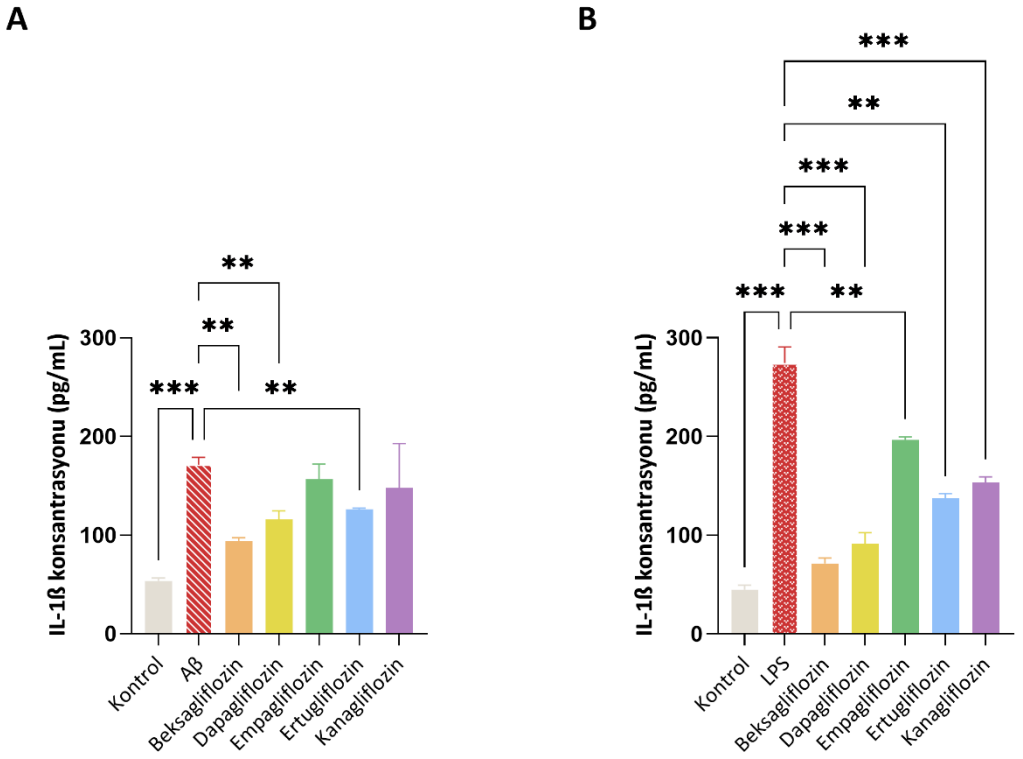
4.4.1. SGLT-2 İnhibitörlerinin IL-1β Düzeyi Üzerine Etkileri

Aβ ile indüklenen AH benzeri nöroinflamasyon modelinde, Aβ uygulaması IL-1β sitokin düzeyinde anlamlı bir artışa neden oldu. Kontrol grubunda 53,57 pg/mL olan IL-1β konsantrasyonu, Aβ grubunda 171,28 pg/mL'ye yükseldi (p=0,0002). Böylece Aβ'nin BV2 hücrelerinde belirgin bir proinflamatuvar sitokin yanıtı oluşturduğu gösterildi.

Aβ ile indüklenen IL-1β artışı, beksagliflozin uygulaması ile 93,99 pg/mL'ye (p=0,0022), dapagliflozin uygulaması ile 115,57 pg/mL'ye (p=0,0040), ertugliflozin uygulaması ile 126,10 pg/mL'ye (p=0,0041) geriledi ve bu gruplardaki IL-1β düzeyleri

Aβ grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olarak azalmış bulundu. Empagliflozin grubunda IL-1β düzeyi 156,97 pg/mL'ye (*p*=0,1726), kanagliflozin grubunda ise 147,87 pg/mL'ye (*p*=0,8179) azalmış olsa da, Aβ grubuna kıyasla gözlenen bu farklılıklar anlamlı bulunmadı (Şekil 4.7A.).

LPS ile indüklenen nöroinflamasyon modelinde LPS uygulaması sonucunda kontrol grubunda 44,84 pg/mL olan IL-1β konsantrasyonu, LPS grubunda 274,34 pg/mL'ye yükseldi (*p*=0,0001). LPS ile indüklenen IL-1β artışı; beksagliflozin grubunda 71,48 pg/mL'ye (*p*=0,002), dapagliflozin grubunda 91,36 pg/mL'ye (*p*=0,0008), empagliflozin grubunda 196,56 pg/mL'ye (*p*=0,0055), ertugliflozin grubunda 137,61 pg/mL'ye (*p*=0,0012) ve kanagliflozin grubunda 153,46 pg/mL'ye (*p*=0,0009) geriledi. Tüm SGLT-2 inhibitörlerinin LPS ile indüklenen IL-1β artışını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı belirlendi (Şekil 4.7B.).



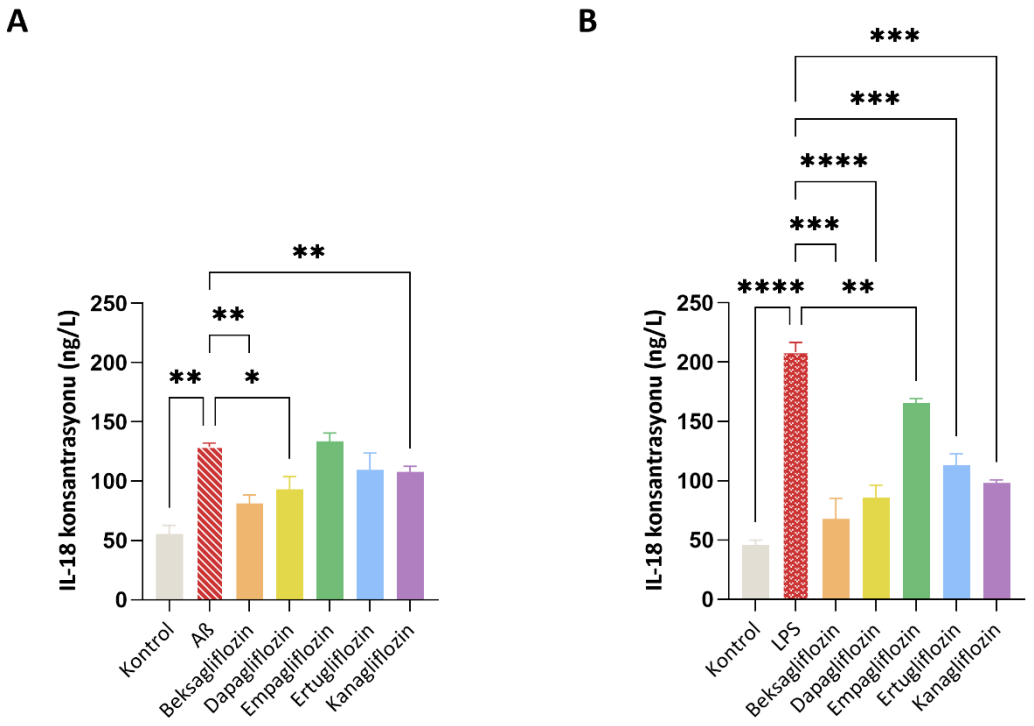
Şekil 4.7. SGLT-2 inhibitörlerinin Aβ **(A)** ve LPS **(B)** ile indüklenen BV2 hücrelerinde IL-1β düzeyleri üzerine etkileri. Veriler ortalama ± SH olarak gösterilmiştir (n=4). İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ve Dunnett çoklu karşılaştırma testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ***p*<0,01; ****p*<0,001.

4.4.2. SGLT-2 İnhibitörlerinin IL-18 Düzeyleri Üzerine Etkisi

Aβ ile indüklenen AH benzeri nöroinflamasyon modelinde, Aβ uygulaması sonucunda IL-18 konsantrasyonu kontrol grubundaki 55,34 ng/L düzeyinden 129,10 ng/L'ye yükseldi ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (*p*=0,0016). Bu sonuç, Aβ'nin BV2 hücrelerinde IL-1β'nın yanı sıra IL-18 yanıtını da indüklediğini gösterdi.

Aβ ile indüklenen IL-18 artışı, beksagliflozin uygulaması ile 81,11 ng/L'ye (*p*=0,0030), dapagliflozin uygulaması ile 92,98 ng/L'ye (*p*=0,0124) ve kanagliflozin uygulaması ile 107,90 ng/L'ye (*p*=0,0020) geriledi. Bu azalışlar Aβ grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ertugliflozin grubunda IL-18 düzeyi 109,59 ng/L'ye azalmasına rağmen bu farklılık istatistiksel olarak anlamlılığa ulaşmadı (*p* =0,2148). Empagliflozin grubunda ise IL-18 konsantrasyonu 133,67 ng/L olarak ölçüldü ve Aβ grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık saptanmadı (*p*=0,7860) (Şekil 4.8A.).

LPS ile oluşturulan nöroinflamasyon modelinde IL-18 konsantrasyonu kontrol grubundaki 45,76 ng/L düzeyinden 208,64 ng/L'ye yükseldi ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (*p*<0,0001). LPS ile indüklenen IL-18 artışı, beksagliflozin grubunda 67,77 ng/L'ye (*p*=0,0003), dapagliflozin grubunda 85,90 ng/L'ye (*p*<0,0001), empagliflozin grubunda 165,51 ng/L'ye (*p*=0,0011), ertugliflozin grubunda 113,21 ng/L'ye (*p*=0,0002) ve kanagliflozin grubunda 98,23 ng/L'ye *p*=0,0002) geriledi. Tüm SGLT-2 inhibitörlerinin LPS ile indüklenen IL-18 artışını LPS grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı belirlendi (Şekil 4.8B.).



Şekil 4.8. SGLT-2 inhibitörlerinin Aβ **(A)** ve LPS **(B)** ile indüklenen BV2 hücrelerinde IL-18 düzeyleri üzerine etkileri. Veriler ortalama ± SH olarak gösterilmiştir (n=3). İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ve Dunnett çoklu karşılaştırma testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. **p*<0,05; ***p*<0,01; ****p*<0,001; *****p*<0,0001.

Aβ ve LPS uygulamalarının BV2 hücrelerinde IL-1β ve IL-18 düzeylerini anlamlı olarak artırması, her iki uyaranın proinflamatuvar sitokin yanıtı oluşturduğunu gösterdi. Aβ modelinde gliflozinlerin etkileri bileşiğe ve sitokine göre farklılık gösterirken, LPS ile oluşturulan daha güçlü inflamatuvar yanıt altında SGLT-2 inhibitörlerinin tamamı her iki sitokin düzeyinde de azalma oluşturdu.

5. TARTIŞMA

Nöroinflamasyon, artık AH'nin sadece sonucu olarak değil, AH patolojisinde Aβ ve tau patolojisinin ilerlemesine katkıda bulunan temel süreçlerden biri olarak kabul edilmektedir (135, 136). NLRP3 inflamazomu; inflamatuvar bir yanıtın başlatılması, sürdürülmesi ve nöronal hasarla ilişkilendirilmesi bakımından giderek önem kazanmaktadır.

SGLT-2 inhibitörlerinin bilinen antiinflamatuvar etkileri ve özellikle NLRP3 inflamazomunun baskılanmasına yönelik etkileri farklı hastalık ve deneysel modellerde gösterilmiş ancak AH özelinde sınırlı sayıda çalışma bulunmakla birlikte, farklı gliflozinlerin aynı deneysel koşullarda ve NLRP3 inflamazomunun birden fazla bileşeni üzerinden karşılaştırmalı olarak değerlendirildiği çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışması kapsamında beş farklı gliflozinin (beksagliflozin, dapagliflozin, empagliflozin, ertugliflozin, kanagliflozin) BV2 hücrelerinde Aβ ve LPS ile indüklenen inflamasyon modellerinde NLRP3 inflamazomu üzerine etkileri araştırılmıştır.

Çalışmamızda nöroinflamasyon modeli oluşturmak için BV2 fare mikroglia hücreleri LPS ile indüklenirken AH benzeri nöroinflamasyon modeli oluşturmak için Aβ ile indüklendi. BV2 hücre hattı, primer mikroglia kültürlerinin sürdürülmesindeki güçlükleri azaltması, hayvan kullanımını sınırlandırması ve deneysel koşulların standardizasyonuna olanak sağlaması nedeniyle nöroinflamasyon çalışmalarında yaygın olan *in vitro* modellerde kullanılan bir hücre hattıdır (122). Çalışmamızda Aβ, AH patolojisinin temel bileşenlerinden biri olan Aβ'nın mikroglial inflamasyonu tetikleyebilme özelliği nedeniyle, gliflozinlerin AH ile ilişkili nöroinflamatuvar koşullardaki etkilerini araştırmak amacıyla kullanılmıştır. Aβ'nın mikroglial hücreler tarafından tanınarak proinflamatuvar yanıtı tetikleyebildiği ve bu nedenle AH'de endojen bir tehlike sinyali olarak işlev görebildiği gösterilmiştir (135, 137). Özellikle fibriler Aβ'nın mikroglial fagositozun ardından lizozomal bütünlüğü bozduğu, katepsin-B salımını ve mitokondriyal reaktif oksijen türlerinin oluşumunu artırdığı ve bu mekanizmalar aracılığıyla NLRP3 inflamazom aktivasyonuna katkıda bulunduğu bildirilmiştir (65,128). LPS ise TLR4/ NF-κB sinyal yolağını aktive ederek indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu artıran, iyi

tanımlanmış ve tekrarlanabilir bir inflamatuvar uyarandır (138). LPS ile uyarılan BV2 hücrelerinin primer mikroglia kültürleri ve *in vivo* nöroinflamasyon modellerine benzer bir proinflamatuvar yanıt sergilediğini göstermesi, bu hücre hattının LPS aracılı inflamasyon çalışmalarında kullanılmasını desteklemektedir. Çalışmamızda LPS, güçlü ve iyi tanımlanmış bir mikroglial inflamatuvar yanıt oluşturan bir uyarıcı olarak, gliflozinlerin inflamatuvar *priming* ve NLRP3 inflamazomu ile ilişkili yanıtlar üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla kullanılmıştır. Bu nedenle LPS, Aβ ile oluşturulan AH'ye özgü nöroinflamatuvar modele karşılaştırmalı bir referans oluşturarak, gliflozinlerin etkilerinin güçlü ve iyi tanımlanmış genel bir inflamatuvar yanıt altında da değerlendirilmesine olanak sağlamıştır.

Çalışmamızda ilk olarak gliflozinlerle çalışma konsantrasyonunun belirlenebilmesi için gliflozinlerin hücre canlılığına etkileri incelendi. Farklı konsantrasyonlarda (1-50 µM) ve sürelerde (24, 48, 72 saat) yapılan uygulamalarda hücre canlılığının kullanılan gliflozinin türüne, konsantrasyonuna ve inkübasyon süresine göre değiştiği ancak bu değişikliklerin konsantrasyon veya inkübasyon süresinin artışıyla paralel olmadığı gözlendi.

Nöroinflamatuvar süreçlerde aktif forma geçen mikroglialardan özellikle iNOS aracılığıyla artan nitrit üretimi, inflamatuvar yanıtın ve buna eşlik eden nitrozatif stresin önemli bileşenlerinden biri olarak kabul edilmektedir (139). Çalışmamızda nitrit düzeyleri, LPS modelinde kontrole kıyasla anlamlı bir artış gösterirken, Aβ modelinde görülen artış istatiksel anlamlılığa ulaşmadı. Bulgularımıza paralel şekilde BV2 hücrelerinde yapılan bir çalışmada LPS'nin, NO düzeylerini artırırken Aβ'nın bir değişiklik oluşturmadığı gösterilmiştir (140). LPS ve Aβ modelleri arasındaki bu farklılık, iki uyaranın mikroglial hücrelerde farklı reseptör ve hücre içi sinyal mekanizmalarını devreye sokmasıyla ilişkili olabilir. Çalışmamızda Aβ modelinde bazı gliflozinlerin nitrit düzeylerini Aβ grubuna kıyasla anlamlı olarak azaltması, Aβ modelinde de bir nitrozatif yanıtın var olduğunu ancak bunun LPS'ye kıyasla daha sınırlı ve değişken olduğunu düşündürdü. Ayrıca Aβ modelinde NLRP3, ASC, kaspaz-1 protein düzeyleri ile IL-1β ve IL-18 düzeylerinde gözlenen değişiklikler, bu modelde

Aβ'nin güçlü bir nitrit yanıtı oluşturmaksızın da inflamatuvar süreçleri en azından NLRP3 inflamazomunu aktive edebildiğini düşündürmektedir.

Tez kapsamında NLRP3 inflamazomunun aktivasyonu ve aşağı akış inflamatuvar yanıtı, üç temel protein (NLRP3, ASC ve kaspaz-1) ve iki efektör sitokin (IL-1β ve IL-18) düzeyinde değerlendirilmiştir. Beksagliflozinin hem Aβ modelinde Aβ grubuna kıyasla, hem de LPS modelinde LPS grubuna kıyasla NLRP3, ASC ve kaspaz-1 proteinleri ile IL-1β ve IL-18'i anlamlı olarak azalttığı görülmüştür. NLRP3 sensörü, ASC adaptörü ve toplam kaspaz-1 ile her iki sitokinin birlikte azalması, beksagliflozinin Aβ ile ilişkili mikroglial inflamatuvar yanıtı NLRP3 ekseninin birden fazla bileşeni üzerinden baskıladığını düşündürmektedir.

Renal iskemi-reperfüzyon modeli üzerinde yapılan bir çalışmada beksagliflozinin IL-6 düzeyini, oksidatif stresi ve doku hasarını azalttığının gösterilmesi ilacın genel antiinflamatuvar potansiyelini desteklemektedir. (141). Ancak bugüne kadar beksagliflozinin nöroinflamasyon, AH-benzeri deneysel modeller ya da NLRP3 inflamazomu üzerindeki etkisini araştıran bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır Bildiğimiz kadarıyla çalışmamız, beksagliflozinin AH-benzeri deneysel modelde nöroinflamasyonu ve NLRP3 inflamazomunu baskıladığını gösteren ilk çalışma olup, bu yönüyle özgün bir nitelik taşımaktadır.

Dapagliflozin hem Aβ ile hem LPS ile indüklenen nöroinflamasyon modelinde NLRP3 ve ASC protein düzeylerini ve IL-1β ve IL-18 sitokin düzeylerini anlamlı olarak azaltırken, kaspaz-1 protein düzeyinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Bulgularımıza paralel olarak dapagliflozinin BV2 hücrelerinde NLRP3 yanıtı üzerindeki baskılayıcı etkisi daha önce de gösterilmiştir (116, 142-144). Yüksek glukozla indüklenen BV2 hücrelerinde dapagliflozin artmış NLRP3 düzeyini azaltmış, IL-1β ile TNF-α düzeylerini azaltmıştır (143). Benzer şekilde, LPS ile indüklenen BV2 nöroinflamasyon modelinde yapılan bir çalışmada dapagliflozin mikroglial aktivasyonu ve oksidatif stresi baskılamış ve IL-1β ile IL-18 düzeyini azaltmıştır (142). İnsan HMC3 ölümsüzleştirilmiş mikroglia hücre hattında Aβ ile oluşturulan hücresel nörotoksisite ve nöroinflamasyon modelinde dapagliflozinin Aβ'ya bağlı ROS oluşumunu ve NLRP3 inflamazom ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir (116). LPS ile

oluşturulan AH-benzeri sıçan modelinde de dapagliflozinin hipokampüste artmış NLRP3 ve NF-κB düzeylerini ve bunlara eşlik eden IL-1β ve IL-18 yanıtını azalttığı gösterilmiştir (144). Tüm bu çalışmalar dapagliflozinin çalışmamızda hem Aβ hem de LPS modellerinde gözlenen NLRP3 inflamazomunu baskılaması ile uyumludur ve dapagliflozinin farklı inflamasyon koşullarında NLRP3 yanıtını baskılayabildiğini desteklemektedir. Bununla birlikte, söz konusu çalışmalarda NLRP3, ASC ve kaspaz-1 düzeylerinin çalışmamızdaki gibi birlikte değerlendirilmemiş olması, çalışmamızın dapagliflozinin NLRP3 inflamazomunun farklı bileşenleri üzerindeki etkisini daha ayrıntılı biçimde ortaya koyması açısından önemlidir (144). Dapagliflozinin NLRP3 inflamazomu üzerindeki baskılayıcı etkisi SSS dışındaki inflamatuvar modellerde de tekrarlanmış; non-alkolik steatohepatit, ateroskleroz, diyabetik kardiyomiyopati, ülseratif kolit, renal hasar modellerinde NLRP3 ve/veya kaspaz-1 ile IL-1β ve IL-18 düzeylerini azalttığı bildirilmiştir (109, 110, 145-147).

Empagliflozin; Aβ ile oluşturulan modelde ne NLRP3, ASC, ve toplam kaspaz-1 proteinlerinin düzeyleri üzerinde ne de IL-1β ve IL-18 sitokin düzeyleri üzerinde anlamlı bir değişiklik göstermiştir. Buna karşılık LPS ile oluşturduğumuz modelde hem NLRP3, ASC ve toplam kaspaz-1 proteinlerinin düzeyleri üzerinde hem de IL-1β ve IL-18 düzeyleri üzerinde anlamlı bir azalma göstermiştir. Bulgularımızla uyumlu olarak yüksek glukoz ile indüklenen BV2 modelinde yapılan bir çalışmada empagliflozin NLRP3 düzeyi üzerinde anlamlı bir etki göstermemiş IL-1β salıverilmesini azaltmamış, yalnızca TNF-α düzeylerinde azalma sağlamıştır (143). Buna karşın bulgularımız insan HMC3 ölümsüzleştirilmiş mikroglia hücre hattında Aβ ile uyarılan modelde empagliflozinin ROS ve NLRP3 düzeylerini azalttığını bildiren çalışma ile uyumsuzdur (116). Bu sonuçlar, empagliflozinin NLRP3 inflamazomu üzerindeki etkisinin hücre, inflamatuvar uyaran tipi ve deneysel koşullara bağlı olarak değişebileceğini düşündürmektedir. Literatürde empagliflozinin SSS ile ilgili olmayan diğer hastalıklarda, NLRP3 inflamazomu üzerinde baskılayıcı etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Kardiyovasküler hastalık geliştirme riski taşıyan T2DM, vasküler proliferatif hastalıklar, kalp yetmezliği, obeziteye bağlı metabolik bozukluklar ve diyabetik kardiyomiyopatide empagliflozin tedavisinin NLRP3 ekspresyonu ve/veya

aktivasyonunu, kaspaz-1 aktivasyonunu ve buna bağlı IL-1β ve IL-18 üretimini azalttığı bildirilmiştir (108, 111, 148-152). Sonuç olarak çalışmamızda empagliflozinin Aβ modelinde etkisiz, LPS modelinde ise NLRP3 iflamazomunu baskılayıcı bulunması, ilacın antiinflamatuvar etkisinin inflamatuvar uyaranın oluşturduğu hücresel sinyal profiline bağlı olarak değişebileceğini düşündürmektedir.

Ertugliflozin, Aβ ile indüklenen modelde NLRP3 ve IL-1β düzeylerini azaltırken ASC, toplam kaspaz-1 ve IL-18'de anlamlı değişiklik yapmamıştır. LPS modelinde ise NLRP3, ASC, IL-1β ve IL-18 düzeylerini anlamlı şekilde azaltırken kaspaz-1 üzerine etki oluşturmamıştır. Benzer şekilde yüksek glukozla indüklenen BV2 hücrelerinde yapılan çalışmada ertugliflozinin artmış NLRP3 protein düzeyi ile IL-1β düzeyini azalttığı bildirilmiştir (143). Bununla birlikte, söz konusu çalışmada ASC ve kaspaz-1 aktivasyonu ile IL-18 düzeylerinin değerlendirilmemiş olması, ertugliflozinin bütüncül NLRP3 inflamazom aktivasyonu üzerindeki etkisine ilişkin kanıtı sınırlamaktadır. Mevcut literatürde, ertugliflozinin Aβ veya LPS ile indüklenen mikroglial modellerde NLRP3–ASC–kaspaz-1 ekseni ve sitokin düzeyindeki etkilerini doğrudan araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamız, ertugliflozinin bu eksen üzerindeki etkilerini ilk kez ortaya koyması bakımından özgün bir nitelik taşımaktadır.

Kanagliflozin, Aβ ile oluşturulan modelde NLRP3 ve IL-18 düzeylerini anlamlı olarak azaltırken ASC, toplam kaspaz-1 ve IL-1β üzerinde anlamlı bir değişiklik oluşturmamıştır. LPS modelinde ise NLRP3, ASC, IL-1β ve IL-18 düzeylerini anlamlı ölçüde azaltmış, toplam kaspaz-1 düzeyini etkilememiştir. Kanagliflozinin NLRP3 inflamazomu üzerindeki baskılayıcı etkilerini gösteren ilk çalışmada, LPS ile indüklenen fareler ve J774A.1 makrofaj hücreleri kullanılmış; NLRP3, aktif kaspaz-1, IL-1β ve IL-18 düzeylerinde azalma gösterilmiş; bu azalmanın NF- κB'nin baskılanması ve Bif-1 aracılı otofajinin artmasıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir (153). Alüminyum klorürle AH benzeri patoloji oluşturulan sıçanlarda kanagliflozinin TXNIP/NF-κB/NLRP3 sinyal yolağını baskıladığı, Aβ ve tau patolojisini azalttığı ve bilişsel işlevleri iyileştirdiği bildirilmiştir (115). Yüksek glukozla uyarılmış BV2 hücrelerinde ise kanagliflozinin ROS, NO, iNOS, NLRP3, IL-1β ve TNF-α düzeylerini azalttığını bildirilmiştir (143). Çalışmamızda her iki deneysel modelde de kanagliflozin

uygulaması, değerlendirilen NLRP3 inflamazomu ile ilişkili parametrelerin ve NO düzeyinin ,bazıları istatistiksel anlamlılığa ulaşmasa da, azalma yönünde bir değişim oluşturmuştur. Gözlenen bu genel azalma eğilimi, yukarıda bahsedilen çalışmalarla uyumludur.

Çalışmamızın tüm sonuçları birlikte değerlendirildiğinde, incelenen beş SGLT-2 inhibitörünün her iki modelde de mikroglial inflamatuvar yanıtı azaltabildiği, ancak her ilacın NO, NLRP3, ASC, toplam kaspaz-1, IL-1β ve IL-18 üzerindeki etkisinin aynı bütünlükte ve büyüklükte olmadığı görülmektedir. .

Protein ve sitokin sonuçları arasındaki bu ayrışmanın birkaç olası nedeni bulunmaktadır. NLRP3 inflamazomunun aktivasyonu; NLRP3 oligomerizasyonu, ASC aracılı kompleks oluşumu ve pro-kaspaz-1'in aktivasyonu gibi protein ekspresyonundan bağımsız olarak gerçekleşen *downstream* süreçlerin yanı sıra K^+ effluksu, hücre içi Ca^{2+} değişiklikleri, mitokondriyal ROS üretimi ve lizozomal hasar gibi aktivasyon sinyallerine de bağlıdır. Çalışmamızda gliflozinler NLRP3 düzeyini modele kıyasla azaltmasına karşın, bu aktivasyon basamaklarını yeterince baskılamamış ve NLRP3'teki azalma ASC ve toplam kaspaz-1 düzeylerine aynı ölçüde yansımamış olabilir.

Çalışmamızda da gliflozinlerin tamamının NLRP3 düzeyini azaltmış olmasına rağmen az bir kısmının kaspaz-1 düzeyini azaltması toplam kaspaz-1 ölçtüğümüz için olabilir.

Bu çalışmada aktif kaspaz-1 p20 oluşumu, ASC oligomerizasyonu ve benek oluşumu, pro-IL-1β'nın olgun IL-1β'ya dönüşümü, GSDMD parçalanması ve piroptoz değerlendirilmemiştir. Bu nedenle sonuçlar, gliflozinlerin NLRP3 inflamazom aktivasyonunu kesin olarak inhibe ettiğini göstermekten çok, NLRP3 inflamazomuyla ilişkili protein ve sitokin yanıtını baskıladığını ortaya koymaktadır. İleri çalışmalarda aktif kaspaz-1 p20, olgun IL-1β, ASC oligomerizasyonu ve parçalanmış GSDMD'nin değerlendirilmesi yararlı olacaktır. Ayrıca seçici bir NLRP3 inhibitörüyle pozitif kontrol oluşturulması, NLRP3'ün genetik olarak susturulması ve gliflozin etkisinin bu koşullarda değişip değişmediğinin incelenmesi, gözlenen antiinflamatuvar etkinin NLRP3'e bağımlılığını daha doğrudan gösterebilir.

Ayrıca çalışmamızda çoklu zamanlarda ölçüm yapılmaması, daha erken veya geç ortaya çıkan etkilerin saptanamamasına neden olmuş olabilir. İnflamatuar uyarının süresi ve tipi, hücre tipi de elde edilen yanıtların farklılaşmasına katkıda bulunmuş olabilir.

Bu sınırlılıklara karşın çalışmamızın özgün katkılarından biri, beksagliflozin, dapagliflozin, empagliflozin, ertugliflozin ve kanagliflozinin nöroinflamasyon bağlamında aynı deneysel koşullar altında değerlendirilmesi ve böylece bu ilaçların NLRP3 inflamazomu ile ilişkili yanıtlar üzerindeki ortak ve farklı etkilerinin ortaya konulmasıdır.. Ayrıca yalnızca tek bir inflamasyon göstergesi incelenmemiş; NLRP3, ASC ve toplam kaspaz-1 protein düzeyleri ile IL-1β ve IL-18 salıverilmesi iki farklı modelde birlikte değerlendirilmiştir. Böylece bazı ilaçlarda NLRP3 düzeyindeki azalmanın ASC veya toplam kaspaz-1'e yansımadığı, bazı koşullarda ise protein düzeylerindeki sınırlı değişikliğe karşın sitokin salıverilmesinin azaldığı gösterilmiştir. Bu durum, gliflozinlerin mikroglial inflamasyon üzerindeki etkilerinin tek bir sonlanım noktası kullanılarak değerlendirilmesinin yeterli olmayabileceğini ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak beksagliflozin ve dapagliflozin başta olmak üzere SGLT-2 inhibitörleri AH ile ilişkili NLRP3 aracılı mikroglial inflamasyonun sınırlandırılmasında potansiyel bir farmakolojik hedef olarak öne çıkmaktadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında beksagliflozin, dapagliflozin, empagliflozin, ertugliflozin ve kanagliflozinin Aβ ve LPS ile oluşturulan mikroglial inflamasyonda NLRP3 inflamazomuyla ilişkili yanıtlar üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çalışmamızda SGLT-2 inhibitörlerinin NLRP3, ASC ve toplam kaspaz-1 protein düzeyleri ile IL-1β ve IL-18 salıverilmesini farklı ölçülerde azaltabildiği gösterilmiştir. Bu bulgular, SGLT-2 inhibitörlerinin mikroglial inflamasyon üzerindeki etkilerinde NLRP3 inflamazomunun rol oynayabileceğini desteklemektedir.

Bildiğimiz kadarıyla bu çalışma, bu beş SGLT-2 inhibitörünü hem Aβ hem LPS ile uyarılan iki farklı modelde ele alan ve etkilerini NLRP3 sensörü, ASC adaptörü, kaspaz-1 efektörü ile IL-1B ve IL-18 yanıtlarını birlikte değerlendirerek inceleyen ilk çalışmadır. Ayrıca beksagliflozinin AH ile ilişkili mikroglial inflamasyon ve NLRP3 yanıtı üzerindeki etkisini gösteren ilk çalışmadır.

Bu yönleriyle çalışma, yalnızca SGLT-2 inhibitörlerinin sınıf düzeyindeki antiinflamatuvar potansiyeline ilişkin kanıt sunmakla kalmamakta, aynı zamanda her bir gliflozinin NLRP3 ile ilişkili inflamatuvar yanıtın farklı bileşenleri üzerinde ayrışan etkiler gösterebildiğini ortaya koymaktadır.

Bulgularımız, NLRP3 inflamazomunun AH ile ilişkili nöroinflamasyonun sınırlandırılmasında potansiyel bir farmakolojik hedef olabileceğini ve SGLT-2 inhibitörlerinin bu hedefle ilişkili inflamatuvar yanıtı modüle edebilecek aday ilaçlar arasında değerlendirilebileceğini desteklemektedir.

Gelecekte bu etkilerin ileri hücresel ve *in vivo* AH modellerinde doğrulanması, gliflozinlerin nöroinflamasyonun kontrolü ve AH tedavisinde yeniden konumlandırılma potansiyelinin belirlenmesine katkı sağlayabilir.

7. KAYNAKLAR

1. World Health Organization. Ageing and health: World Health Organization; 2025 [updated 1 Ekim 2025. Available from: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health.
2. Gao C, Jiang J, Tan Y, Chen S. Microglia in neurodegenerative diseases: mechanism and potential therapeutic targets. Signal Transduction and Targeted Therapy. 2023;8(1):359.
3. Swanson KV, Deng M, Ting JPY. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. Nature Reviews Immunology. 2019;19(8):477-89.
4. Hanslik KL, Ulland TK. The Role of Microglia and the Nlrp3 Inflammasome in Alzheimer's Disease. Front Neurol. 2020;11:570711.
5. Heneka M, Kummer M, Stutz A. NLRP3 is activated in Alzheimer’s disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. Nature. 2013;493:674-8.
6. Ising C, et al. NLRP3 inflammasome activation drives tau pathology. Nature. 2019;575:669-73.
7. Upadhyay A. SGLT2 Inhibitors and Kidney Protection: Mechanisms Beyond Tubuloglomerular Feedback. Kidney360. 2024;5(5):771-82.
8. Kounatidis D, Vallianou N, Evangelopoulos A, Vlahodimitris I, Grivakou E, Kotsi E, et al. SGLT-2 Inhibitors and the Inflammasome: What's Next in the 21st Century? Nutrients. 2023;15(10):2294.
9. Yang L, Zhang X, Wang Q. Effects and mechanisms of SGLT2 inhibitors on the NLRP3 inflammasome, with a focus on atherosclerosis. Frontiers in Endocrinology. 2022;13:992937.
10. Alzheimer A, Stelzmann RA, Schnitzlein HN, Murtagh FR. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Uber eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde". Clin Anat. 1995;8(6):429-31.
11. Boullerne AI, Feinstein DL. History of Neuroscience I. Pío del Río-Hortega (1882-1945): The Discoverer of Microglia and Oligodendroglia. ASN Neuro. 2020;12:1759091420953259.
12. Lendon CL, Ashall F, Goate AM. Exploring the etiology of Alzheimer disease using molecular genetics. Jama. 1997;277(10):825-31.
13. Calero M, Gómez-Ramos A, Calero O, Soriano E, Avila J, Medina M. Additional mechanisms conferring genetic susceptibility to Alzheimer’s disease. Frontiers in Cellular Neuroscience. 2015;Volume 9 - 2015.
14. Malik M, Parikh I, Vasquez JB, Smith C, Tai L, Bu G, et al. Genetics ignite focus on microglial inflammation in Alzheimer's disease. Mol Neurodegener. 2015;10:52.
15. Wang T, Liu X, Wang X, Hua F, Yan L. TREM2 and microglial immunity in Alzheimer's disease: mechanisms, genetics, and therapeutic opportunities. Front Immunol. 2026;17:1739875.
16. Efthymiou AG, Goate AM. Late onset Alzheimer’s disease genetics implicates microglial pathways in disease risk. Molecular Neurodegeneration. 2017;12(1):43.

17. Murphy MP, LeVine H, 3rd. Alzheimer's disease and the amyloid-beta peptide. J Alzheimers Dis. 2010;19(1):311-23.
18. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. Science. 1992;256(5054):184-5.
19. Chen GF, Xu TH, Yan Y, Zhou YR, Jiang Y, Melcher K, et al. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. Acta Pharmacol Sin. 2017;38(9):1205-35.
20. Baranello RJ, Bharani KL, Padmaraju V, Chopra N, Lahiri DK, Greig NH, et al. Amyloid-beta protein clearance and degradation (ABCD) pathways and their role in Alzheimer's disease. Curr Alzheimer Res. 2015;12(1):32-46.
21. Meyer-Luehmann M, Spires-Jones TL, Prada C, Garcia-Alloza M, de Calignon A, Rozkalne A, et al. Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. Nature. 2008;451(7179):720-4.
22. Fu W, Vukojevic V, Patel A, Soudy R, MacTavish D, Westaway D, et al. Role of microglial amylin receptors in mediating beta amyloid (Aβ)-induced inflammation. Journal of Neuroinflammation. 2017;14(1):199.
23. Shi J, Sabbagh MN, Vellas B. Alzheimer's disease beyond amyloid: strategies for future therapeutic interventions. Bmj. 2020;371:m3684.
24. Stögmann E, Schmidt R. Amyloid-beta antibody treatment in Alzheimer's disease : An update on recent data and outlook on implementation in clinical routine. Wien Klin Wochenschr. 2025;137(5-6):182-8.
25. Moloney CM, Lowe VJ, Murray ME. Visualization of neurofibrillary tangle maturity in Alzheimer's disease: A clinicopathologic perspective for biomarker research. Alzheimer's & Dementia. 2021;17(9):1554-74.
26. Rajmohan R, Reddy PH. Amyloid-Beta and Phosphorylated Tau Accumulations Cause Abnormalities at Synapses of Alzheimer's disease Neurons. J Alzheimers Dis. 2017;57(4):975-99.
27. Regan P, Whitcomb DJ, Cho K. Physiological and Pathophysiological Implications of Synaptic Tau. Neuroscientist. 2017;23(2):137-51.
28. Wu M, Zhang M, Yin X, Chen K, Hu Z, Zhou Q, et al. The role of pathological tau in synaptic dysfunction in Alzheimer’s diseases. Translational Neurodegeneration. 2021;10(1):45.
29. Lao PJ, Lee S, Talmasov D, Dass D, Chikwem N, Johnson A, et al. Inflammatory alterations mediate tau-associated neurodegeneration. Brain Communications. 2026;8(4):fcag242.
30. Leng F, Edison P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? Nat Rev Neurol. 2021;17(3):157-72.
31. Vogels T, Murgoci A-N, Hromádka T. Intersection of pathological tau and microglia at the synapse. Acta Neuropathologica Communications. 2019;7(1):109.
32. Wu M, Zhang M, Yin X, Chen K, Hu Z, Zhou Q, et al. The role of pathological tau in synaptic dysfunction in Alzheimer’s diseases. Translational Neurodegeneration. 2021;10(1):45-undefined.

33. Robbins M, Clayton E, Kaminski Schierle GS. Synaptic tau: A pathological or physiological phenomenon? Acta Neuropathologica Communications. 2021;9(1):149.
34. Aslanyan A, Foiani MS, Giovannucci TA, McDade E, Duff KE, Mummery CJ, et al. Targeting tau in Alzheimer's Disease: rationale, approach and challenges. Mol Neurodegener. 2026;21(1).
35. Kinney JW, Bemiller SM, Murtishaw AS, Leisgang AM, Salazar AM, Lamb BT. Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions. 2018;4(1):575-90.
36. Heneka MT, van der Flier WM, Jessen F, Hoozemanns J, Thal DR, Boche D, et al. Neuroinflammation in Alzheimer disease. Nature Reviews Immunology. 2025;25(5):321-52.
37. DiSabato DJ, Quan N, Godbout JP. Neuroinflammation: the devil is in the details. J Neurochem. 2016;139 Suppl 2(Suppl 2):136-53.
38. Kwon HS, Koh SH. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. Transl Neurodegener. 2020;9(1):42.
39. Muzio L, Viotti A, Martino G. Microglia in Neuroinflammation and Neurodegeneration: From Understanding to Therapy. Front Neurosci. 2021;15:742065.
40. Colonna M, Butovsky O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. Annu Rev Immunol. 2017;35:441-68.
41. Heneka MT, Golenbock DT, Latz E. Innate immunity in Alzheimer's disease. Nat Immunol. 2015;16(3):229-36.
42. Heneka MT, Carson MJ, Khoury JE, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. The Lancet Neurology. 2015;14(4):388-405.
43. Wang W-Y, Tan M-S, Yu J-T, Tan L. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer’s disease. Annals of Translational Medicine. 2015;3(10):136.
44. Rohm TV, Meier DT, Olefsky JM, Donath MY. Inflammation in obesity, diabetes, and related disorders. Immunity. 2022;55(1):31-55.
45. Cummings J, Ortiz A, Castellino J, Kinney J. Diabetes: Risk factor and translational therapeutic implications for Alzheimer's disease. Eur J Neurosci. 2022;56(9):5727-57.
46. Galea I. The blood–brain barrier in systemic infection and inflammation. Cellular & Molecular Immunology. 2021;18(11):2489-501.
47. Lima MN, Barbosa-Silva MC, Maron-Gutierrez T. Microglial Priming in Infections and Its Risk to Neurodegenerative Diseases. Front Cell Neurosci. 2022;16:878987.
48. İspir FB, Palabıyık-Yücelik ŞS. The role of inflammasomes in liver toxicity. Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy. 2019;39(2):90-7.
49. Liang T, Zhang Y, Wu S, Chen Q, Wang L. The Role of NLRP3 Inflammasome in Alzheimer’s Disease and Potential Therapeutic Targets. Frontiers in Pharmacology. 2022;13.

50. Liaqat A, Asad M, Shoukat F, Khan A-U. A Spotlight on the Underlying Activation Mechanisms of the NLRP3 Inflammasome and its Role in Atherosclerosis: A Review. Inflammation. 2020;43(6):2011-20.
51. Barczuk J, Siwecka N, Lusa W, Rozpędek-Kamińska W, Kucharska E, Majsterek I. Targeting NLRP3-Mediated Neuroinflammation in Alzheimer's Disease Treatment. International Journal of Molecular Sciences. 2022;23(16):8979.
52. Xia J, Jiang S, Dong S, Liao Y, Zhou Y. The Role of Post-Translational Modifications in Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. International Journal of Molecular Sciences. 2023;24(7):6126.
53. He Y, Hara H, Núñez G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. Trends Biochem Sci. 2016;41(12):1012-21.
54. Toscano ECB, Justo AFO, Paula MCA, Grossi LB, Neves VH, Leite REP, et al. Upregulation of NLRP3 Inflammasome in Specific Hippocampal Regions: Strengthening the Link Between Neuroinflammation and Selective Vulnerability in Alzheimer's Disease. Molecular Neurobiology. 2025;62(9):11348-61.
55. Söderbom G, Zeng BY. The NLRP3 inflammasome as a bridge between neuro-inflammation in metabolic and neurodegenerative diseases. International review of neurobiology. 2020;154:345-91.
56. Zahid A, Li B, Kombe AJK, Jin T, Tao J. Pharmacological Inhibitors of the NLRP3 Inflammasome. Front Immunol. 2019;10:2538.
57. Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. Nat Immunol. 2008;9(8):857-65.
58. Coll RC, Hill JR, Day CJ, Zamoshnikova A, Boucher D, Massey NL, et al. MCC950 directly targets the NLRP3 ATP-hydrolysis motif for inflammasome inhibition. Nature Chemical Biology. 2019;15(6):556-9.
59. Dempsey C, Rubio Araiz A, Bryson KJ, Finucane O, Larkin C, Mills EL, et al. Inhibiting the NLRP3 inflammasome with MCC950 promotes non-phlogistic clearance of amyloid-β and cognitive function in APP/PS1 mice. Brain, Behavior, and Immunity. 2017;61:306-16.
60. Klück V, Jansen TLTA, Janssen M, Comarniceanu A, Efdé M, Tengesdal IW, et al. Dapansutrile, an oral selective NLRP3 inflammasome inhibitor, for treatment of gout flares: an open-label, dose-adaptive, proof-of-concept, phase 2a trial. The Lancet Rheumatology. 2020;2(5):e270-e80.
61. Lonnemann N, Hosseini S, Marchetti C, Skouras DB, Stefanoni D, D'Alessandro A, et al. The NLRP3 inflammasome inhibitor OLT1177 rescues cognitive impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020;117(50):32145-54.
62. Mangan MSJ, Olhava EJ, Roush WR, Seidel HM, Glick GD, Latz E. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. Nature Reviews Drug Discovery. 2018;17(8):588-606.
63. Cabral JE, Wu A, Zhou H, Pham MA, Lin S, McNulty R. Targeting the NLRP3 inflammasome for inflammatory disease therapy. Trends Pharmacol Sci. 2025;46(6):503-19.

64. AC Immune Initiates Phase 1 Clinical Trial of NLRP3 Inhibito [press release]. Lausanne, Switzerland: AC Immune SA, February 24, 2026 2026.
65. AC Immune SA. AC Immune Announces Positive Preliminary Phase 1 Data for NLRP3 Inhibitor ACI-19764. 2026.
66. Ohto U, Kamitsukasa Y, Ishida H, Zhang Z, Murakami K, Hirama C, et al. Structural basis for the oligomerization-mediated regulation of NLRP3 inflammasome activation. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2022;119(11):e2121353119.
67. Jiang H, He H, Chen Y, Huang W, Cheng J, Ye J, et al. Identification of a selective and direct NLRP3 inhibitor to treat inflammatory disorders. J Exp Med. 2017;214(11):3219-38.
68. Marchetti C, Swartzwelter B, Gamboni F, Neff CP, Richter K, Azam T, et al. OLT1177, a β-sulfonyl nitrile compound, safe in humans, inhibits the NLRP3 inflammasome and reverses the metabolic cost of inflammation. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2018;115(7):E1530-E9.
69. Huang Y, Jiang H, Chen Y, Wang X, Yang Y, Tao J, et al. Tranilast directly targets NLRP3 to treat inflammasome-driven diseases. EMBO Mol Med. 2018;10(4).
70. He H, Jiang H, Chen Y, Ye J, Wang A, Wang C, et al. Oridonin is a covalent NLRP3 inhibitor with strong anti-inflammasome activity. Nature Communications. 2018;9(1):2550.
71. Bultinck J, Yuan S, Cantuti-Castelvetri L, Brosens L, Bracke D, Collins J, et al. NLRP3 inhibition by VTX3232 tempers inflammation resulting in reduced body weight, hyperglycemia, and hepatic steatosis in obese male mice. Mol Metab. 2026;103:102282.
72. Lamkanfi M, Mueller JL, Vitari AC, Misaghi S, Fedorova A, Deshayes K, et al. Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome. Journal of Cell Biology. 2009;187(1):61-70.
73. Youm YH, Nguyen KY, Grant RW, Goldberg EL, Bodogai M, Kim D, et al. The ketone metabolite β-hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease. Nature Medicine. 2015;21(3):263-9.
74. Kuwar R, Rolfe A, Di L, Blevins H, Xu Y, Sun X, et al. A Novel Inhibitor Targeting NLRP3 Inflammasome Reduces Neuropathology and Improves Cognitive Function in Alzheimer's Disease Transgenic Mice. J Alzheimers Dis. 2021;82(4):1769-83.
75. Auger A, Faidi R, Rickman AD, Martinez CP, Fajfer A, Carling J, et al. Post-symptomatic NLRP3 inhibition rescues cognitive impairment and mitigates amyloid and tau driven neurodegeneration. npj Dementia. 2025;1(1):3.
76. Saresella M, La Rosa F, Piancone F, Zoppis M, Marventano I, Calabrese E, et al. The NLRP3 and NLRP1 inflammasomes are activated in Alzheimer's disease. Mol Neurodegener. 2016;11:23.
77. Moonen S, Koper MJ, Van Schoor E, Schaeverbeke JM, Vandenberghe R, von Arnim CAF, et al. Pyroptosis in Alzheimer's disease: cell type-specific activation in microglia, astrocytes and neurons. Acta Neuropathol. 2023;145(2):175-95.

78. Venegas C, Kumar S, Franklin BS, Dierkes T, Brinkschulte R, Tejera D, et al. Microglia-derived ASC specks cross-seed amyloid-β in Alzheimer's disease. Nature. 2017;552(7685):355-61.
79. Stancu IC, Cremers N, Vanrusselt H, Couturier J, Vanoosthuyse A, Kessels S, et al. Aggregated Tau activates NLRP3-ASC inflammasome exacerbating exogenously seeded and non-exogenously seeded Tau pathology in vivo. Acta Neuropathol. 2019;137(4):599-617.
80. Ising C, Venegas C, Zhang S, Scheiblich H, Schmidt SV, Vieira-Saecker A, et al. NLRP3 inflammasome activation drives tau pathology. Nature. 2019;575(7784):669-73.
81. Yin J, Zhao F, Chojnacki JE, Fulp J, Klein WL, Zhang S, et al. NLRP3 Inflammasome Inhibitor Ameliorates Amyloid Pathology in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. Mol Neurobiol. 2018;55(3):1977-87.
82. McManus RM, Komes MP, Griep A, Santarelli F, Schwartz S, Ramón Perea J, et al. NLRP3-mediated glutaminolysis controls microglial phagocytosis to promote Alzheimer's disease progression. Immunity. 2025;58(2):326-43.e11.
83. World Health Organization. Diabetes: World Health Organization; 2024 [Available from: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes?utm_source=chatgpt.com.
84. Ninomiya T. Epidemiological Evidence of the Relationship Between Diabetes and Dementia. Adv Exp Med Biol. 2019;1128:13-25.
85. Chatterjee S, Peters SA, Woodward M, Mejia Arango S, Batty GD, Beckett N, et al. Type 2 Diabetes as a Risk Factor for Dementia in Women Compared With Men: A Pooled Analysis of 2.3 Million People Comprising More Than 100,000 Cases of Dementia. Diabetes Care. 2016;39(2):300-7.
86. Athanasaki A, Melanis K, Tsantzali I, Stefanou MI, Ntymenou S, Paraskevas SG, et al. Type 2 Diabetes Mellitus as a Risk Factor for Alzheimer's Disease: Review and Meta-Analysis. Biomedicines. 2022;10(4).
87. Chatterjee S, Mudher A. Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes: A Critical Assessment of the Shared Pathological Traits. Frontiers in Neuroscience. 2018;Volume 12 - 2018.
88. van Sloten TT, Sedaghat S, Carnethon MR, Launer LJ, Stehouwer CDA. Cerebral microvascular complications of type 2 diabetes: stroke, cognitive dysfunction, and depression. Lancet Diabetes Endocrinol. 2020;8(4):325-36.
89. Michailidis M, Moraitou D, Tata DA, Kalinderi K, Papamitsou T, Papaliagkas V. Alzheimer's Disease as Type 3 Diabetes: Common Pathophysiological Mechanisms between Alzheimer's Disease and Type 2 Diabetes. Int J Mol Sci. 2022;23(5).
90. Tran J, Parekh S, Rockcole J, Wilson D, Parmar MS. Repurposing antidiabetic drugs for Alzheimer's disease: A review of preclinical and clinical evidence and overcoming challenges. Life Sci. 2024;355:123001.
91. Caparrotta TM, Greenhalgh AM, Osinski K, Gifford RM, Moser S, Wild SH, et al. Sodium-Glucose Co-Transporter 2 Inhibitors (SGLT2i) Exposure and Outcomes in Type 2 Diabetes: A Systematic Review of Population-Based Observational Studies. Diabetes Ther. 2021;12(4):991-1028.

92. McLean P, Bennett J, “Trey” Woods E, Chandrasekhar S, Newman N, Mohammad Y, et al. SGLT2 inhibitors across various patient populations in the era of precision medicine: the multidisciplinary team approach. npj Metabolic Health and Disease. 2025;3(1):29.
93. Poole RM, Prossler JE. Tofogliflozin: first global approval. Drugs. 2014;74(8):939-44.
94. Markham A, Elkinson S. Luseogliflozin: first global approval. Drugs. 2014;74(8):945-50.
95. Poole RM, Dungo RT. Ipragliflozin: first global approval. Drugs. 2014;74(5):611-7.
96. Saleem MM, Zubair MS, Abbas S, Hojeij M. Novel FDA-approved bexagliflozin drug for treating type 2 diabetes mellitus. Ann Med Surg (Lond). 2024;86(11):6399-403.
97. Giugliano D, Esposito K. Class effect for SGLT-2 inhibitors: a tale of 9 drugs. Cardiovascular Diabetology. 2019;18(1):94.
98. Mohan V, Mithal A, Joshi SR, Aravind SR, Chowdhury S. Remogliflozin Etabonate in the Treatment of Type 2 Diabetes: Design, Development, and Place in Therapy. Drug Des Devel Ther. 2020;14:2487-501.
99. 28.08.2026 Tarihli Ruhsatlı Beşeri Tıbbi Ürünler Listesi [Internet]. 2026 [cited 01.09.2026]. Available from: https://www.titck.gov.tr/dinamikmodul/85.
100. Kim SR, Lee S-G, Kim SH, Kim JH, Choi E, Cho W, et al. SGLT2 inhibition modulates NLRP3 inflammasome activity via ketones and insulin in diabetes with cardiovascular disease. Nature Communications. 2020;11(1):2127.
101. Xiong W, Meng X-F, Zhang C. NLRP3 Inflammasome in Metabolic-Associated Kidney Diseases: An Update. Frontiers in Immunology. 2021;Volume 12 - 2021.
102. Girardi ACC, Polidoro JZ, Castro PC, Pio-Abreu A, Noronha IL, Drager LF. Mechanisms of heart failure and chronic kidney disease protection by SGLT2 inhibitors in nondiabetic conditions. Am J Physiol Cell Physiol. 2024;327(3):C525-c44.
103. Rastogi A, Januzzi JL, Jr. Pleiotropic Effects of Sodium-Glucose Cotransporter-2 Inhibitors in Cardiovascular Disease and Chronic Kidney Disease. J Clin Med. 2023;12(8).
104. Wang Z, Wang Y, Shangguan W, Li T. Cardiovascular protection by SGLT2 inhibitors: an integrative review of mechanistic networks, clinical evidence, and safety considerations. Frontiers in Cardiovascular Medicine. 2026;Volume 13 - 2026.
105. Lee SA, Riella LV. Narrative Review of Immunomodulatory and Anti-inflammatory Effects of Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitors: Unveiling Novel Therapeutic Frontiers. Kidney Int Rep. 2024;9(6):1601-13.
106. Alsereidi FR, Khashim Z, Marzook H, Gupta A, Al-Rawi AM, Ramadan MM, et al. Targeting inflammatory signaling pathways with SGLT2 inhibitors: Insights into cardiovascular health and cardiac cell improvement. Curr Probl Cardiol. 2024;49(5):102524.

107. Ye Y, Bajaj M, Yang HC, Perez-Polo JR, Birnbaum Y. SGLT-2 Inhibition with Dapagliflozin Reduces the Activation of the Nlrp3/ASC Inflammasome and Attenuates the Development of Diabetic Cardiomyopathy in Mice with Type 2 Diabetes. Further Augmentation of the Effects with Saxagliptin, a DPP4 Inhibitor. Cardiovasc Drugs Ther. 2017;31(2):119-32.
108. Byrne NJ, Matsumura N, Maayah ZH, Ferdaoussi M, Takahara S, Darwesh AM, et al. Empagliflozin Blunts Worsening Cardiac Dysfunction Associated With Reduced NLRP3 (Nucleotide-Binding Domain-Like Receptor Protein 3) Inflammasome Activation in Heart Failure. Circ Heart Fail. 2020;13(1):e006277.
109. Birnbaum Y, Bajaj M, Yang HC, Ye Y. Combined SGLT2 and DPP4 Inhibition Reduces the Activation of the Nlrp3/ASC Inflammasome and Attenuates the Development of Diabetic Nephropathy in Mice with Type 2 Diabetes. Cardiovasc Drugs Ther. 2018;32(2):135-45.
110. Ke Q, Shi C, Lv Y, Wang L, Luo J, Jiang L, et al. SGLT2 inhibitor counteracts NLRP3 inflammasome via tubular metabolite itaconate in fibrosis kidney. Faseb j. 2022;36(1):e22078.
111. Benetti E, Mastrocola R, Vitarelli G, Cutrin JC, Nigro D, Chiazza F, et al. Empagliflozin Protects against Diet-Induced NLRP-3 Inflammasome Activation and Lipid Accumulation. J Pharmacol Exp Ther. 2016;359(1):45-53.
112. Ye T, Zhang J, Wu D, Shi J, Kuang Z, Ma Y, et al. Empagliflozin Attenuates Obesity-Related Kidney Dysfunction and NLRP3 Inflammasome Activity Through the HO-1-Adiponectin Axis. Front Endocrinol (Lausanne). 2022;13:907984.
113. Hierro-Bujalance C, Infante-Garcia C, Del Marco A, Herrera M, Carranza-Naval MJ, Suarez J, et al. Empagliflozin reduces vascular damage and cognitive impairment in a mixed murine model of Alzheimer's disease and type 2 diabetes. Alzheimers Res Ther. 2020;12(1):40.
114. Sim AY, Choi DH, Kim JY, Kim ER, Goh AR, Lee YH, et al. SGLT2 and DPP4 inhibitors improve Alzheimer's disease-like pathology and cognitive function through distinct mechanisms in a T2D-AD mouse model. Biomed Pharmacother. 2023;168:115755.
115. Elariny HA, Kabel AM, Selim H, Helal AI, Abdelrahman D, Borg HM, et al. Repositioning Canagliflozin for Mitigation of Aluminium Chloride-Induced Alzheimer's Disease: Involvement of TXNIP/NLRP3 Inflammasome Axis, Mitochondrial Dysfunction, and SIRT1/HMGB1 Signalling. Medicina (Kaunas). 2024;60(11).
116. Alami M, Zerif E, Khalil A, Hajji N, Ramassamy C, Lacombe G, et al. Neuroprotective effects of SGLT2 inhibitors empagliflozin and dapagliflozin on Aβ(1-42)-induced neurotoxicity and neuroinflammation in cellular models of Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 2025;105(2):464-80.
117. Han J, Song J, Jung ES, Choi JW, Ji HY, Mook-Jung I. SGLT2 Inhibition by Enavogliflozin Significantly Reduces Aβ Pathology and Restores Cognitive Function via Upregulation of Microglial AMPK Signaling in 5XFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease. Aging Cell. 2025;24(8):e70101.

118. Shin A, Koo BK, Lee JY, Kang EH. Risk of dementia after initiation of sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors versus dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in adults aged 40-69 years with type 2 diabetes: population based cohort study. Bmj. 2024;386:e079475.
119. Sun M, Wang X, Lu Z, Yang Y, Lv S, Miao M, et al. Sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors and subtype-specific dementia risk: A multinational and multiethnic cohort study. Diabetes Obes Metab. 2025;27(7):3766-79.
120. Kumari K, Bai A, Geeta F, Wadhwani N, Kumar R, Kumar A, et al. Risk of Dementia in Patients With Type 2 Diabetes Using SGLT2 Inhibitors Versus DPP-4 Inhibitors: A Systematic Review and Meta-Analysis. Endocrinol Diabetes Metab. 2026;9(2):e70174.
121. Kim HK, Biessels GJ, Yu MH, Hong N, Lee YH, Lee BW, et al. SGLT2 Inhibitor Use and Risk of Dementia and Parkinson Disease Among Patients With Type 2 Diabetes. Neurology. 2024;103(8):e209805.
122. Henn A, Lund S, Hedtjärn M, Schrattenholz A, Pörzgen P, Leist M. The suitability of BV2 cells as alternative model system for primary microglia cultures or for animal experiments examining brain inflammation. Altex. 2009;26(2):83-94.
123. Cytion. BV2 Cells [Available from: https://www.cytion.com/BV2-Cells/305156.
124. Chen SD, Wu CL, Lin TK, Chuang YC, Yang DI. Renin inhibitor aliskiren exerts neuroprotection against amyloid beta-peptide toxicity in rat cortical neurons. Neurochem Int. 2012;61(3):369-77.
125. Chen YS, Chen SD, Wu CL, Huang SS, Yang DI. Induction of sestrin2 as an endogenous protective mechanism against amyloid beta-peptide neurotoxicity in primary cortical culture. Exp Neurol. 2014;253:63-71.
126. Dou RX, Zhang YM, Hu XJ, Gao FL, Zhang LL, Liang YH, et al. Aβ(1-42) promotes microglial activation and apoptosis in the progression of AD by binding to TLR4. Redox Biol. 2024;78:103428.
127. Liu Y, Dai Y, Li Q, Chen C, Chen H, Song Y, et al. Beta-amyloid activates NLRP3 inflammasome via TLR4 in mouse microglia. Neuroscience Letters. 2020;736:135279.
128. Yang L, Zhou R, Tong Y, Chen P, Shen Y, Miao S, et al. Neuroprotection by dihydrotestosterone in LPS-induced neuroinflammation. Neurobiol Dis. 2020;140:104814.
129. Shimoyama S, Furukawa T, Ogata Y, Nikaido Y, Koga K, Sakamoto Y, et al. Lipopolysaccharide induces mouse translocator protein (18 kDa) expression via the AP-1 complex in the microglial cell line, BV-2. PLoS One. 2019;14(9):e0222861.
130. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983;65(1-2):55-63.
131. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. Anal Biochem. 1982;126(1):131-8.

132. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem. 1985;150(1):76-85.
133. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979;76(9):4350-4.
134. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry. 1971;8(9):871-4.
135. Jung ES, Suh K, Han J, Kim H, Kang HS, Choi WS, et al. Amyloid-β activates NLRP3 inflammasomes by affecting microglial immunometabolism through the Syk-AMPK pathway. Aging Cell. 2022;21(5):e13623.
136. Streit WJ, Mrak RE, Griffin WST. Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. Journal of Neuroinflammation. 2004;1(1):14.
137. McManus RM, Latz E. NLRP3 inflammasome signalling in Alzheimer's disease. Neuropharmacology. 2024;252:109941.
138. Mohammadi A, Aghajan A, Alipour M, Ghorbani A, Limoodehi SM, Ch MH. LPS-Induced Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases: A Double-Edged Sword? Molecular Neurobiology. 2026;63(1):711.
139. Ghasemi M, Fatemi A. Pathologic role of glial nitric oxide in adult and pediatric neuroinflammatory diseases. Neurosci Biobehav Rev. 2014;45:168-82.
140. Janefjord E, Mååg JL, Harvey BS, Smid SD. Cannabinoid effects on β amyloid fibril and aggregate formation, neuronal and microglial-activated neurotoxicity in vitro. Cell Mol Neurobiol. 2014;34(1):31-42.
141. Alkhafaji GA, Janabi AM. Protective effects of bexagliflozin on renal function in a rat model of ischemia-reperfusion injury; an experimental animal study. J Nephropharmacol. 2025;14(2):e12760-e.
142. Liu Y, Yu Y, Chen C, Wu X, Zheng Q, Zhang X, et al. Dapagliflozin alleviated seizures and cognition impairment in pilocarpine induced status epilepticus via suppressing microglia-mediated neuroinflammation and oxidative stress. Int Immunopharmacol. 2025;148:114117.
143. Lee CT, Lin KD, Hsieh CF, Wang JY. SGLT2 Inhibitor Canagliflozin Alleviates High Glucose-Induced Inflammatory Toxicity in BV-2 Microglia. Biomedicines. 2023;12(1).
144. Abd Elmaaboud MA, Estfanous RS, Atef A, Kabel AM, Alnemari KA, Naguib TM, et al. Dapagliflozin/Hesperidin Combination Mitigates Lipopolysaccharide-Induced Alzheimer's Disease in Rats. Pharmaceuticals (Basel). 2023;16(10).
145. Leng W, Wu M, Pan H, Lei X, Chen L, Wu Q, et al. The SGLT2 inhibitor dapagliflozin attenuates the activity of ROS-NLRP3 inflammasome axis in steatohepatitis with diabetes mellitus. Annals of Translational Medicine. 2019;7(18):429.
146. Leng W, Ouyang X, Lei X, Wu M, Chen L, Wu Q, et al. The SGLT-2 Inhibitor Dapagliflozin Has a Therapeutic Effect on Atherosclerosis in Diabetic ApoE(-/-) Mice. Mediators Inflamm. 2016;2016:6305735.

147. Ye Y, Bajaj M, Yang HC, Perez-Polo JR, Birnbaum Y. SGLT-2 Inhibition with Dapagliflozin Reduces the Activation of the Nlrp3/ASC Inflammasome and Attenuates the Development of Diabetic Cardiomyopathy in Mice with Type 2 Diabetes. Cardiovascular Drugs and Therapy. 2017;31(2):119-32.
148. Kim SR, Lee SG, Kim SH, et al. SGLT2 inhibition modulates NLRP3 inflammasome activity via ketones and insulin in diabetes with cardiovascular disease. Nature Communications. 2020;11(1):2127.
149. Sukhanov S, Higashi Y, Yoshida T, Mummidi S, Aroor AR, Jeffrey Russell J, et al. The SGLT2 inhibitor Empagliflozin attenuates interleukin-17A-induced human aortic smooth muscle cell proliferation and migration by targeting TRAF3IP2/ROS/NLRP3/Caspase-1-dependent IL-1β and IL-18 secretion. Cellular Signalling. 2021;77:109825.
150. Quagliariello V, De Laurentiis M, Rea D, Barbieri A, Monti MG, Carbone A, et al. The SGLT-2 inhibitor empagliflozin improves myocardial strain, reduces cardiac fibrosis and pro-inflammatory cytokines in non-diabetic mice treated with doxorubicin. Cardiovascular Diabetology. 2021;20(1):150.
151. Liu P, Zhang Z, Wang J, Zhang X, Yu X, Li Y. Empagliflozin protects diabetic pancreatic tissue from damage by inhibiting the activation of the NLRP3/caspase-1/GSDMD pathway in pancreatic β cells: in vitro and in vivo studies. Bioengineered. 2021;12(2):9356-66.
152. Xue M, Li T, Wang Y, Chang Y, Cheng Y, Lu Y, et al. Empagliflozin prevents cardiomyopathy via sGC-cGMP-PKG pathway in type 2 diabetes mice. Clinical Science. 2019;133(15):1705-20.
153. Niu Y, Zhang Y, Zhang W, Lu J, Chen Y, Hao W, et al. Canagliflozin Ameliorates NLRP3 Inflammasome-Mediated Inflammation Through Inhibiting NF-κB Signaling and Upregulating Bif-1. Front Pharmacol. 2022;13:820541.

8. EKLER

EK-1: Tez Çalışması Orijinallik Raporu

SODYUM GLUKOZ KOTRANSPORTER-2 İNHİBİTÖRLERİNİN ALZHEİMER HASTALIĞI BENZERİ MODELDE NLRP3 İNFLAMAZOMU ARACILI NÖROİNFLAMASYON ÜZERİNE ETKİSİ

ORİJİNALLİK RAPORU

%7	%4	%5	%3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Eskisehir Osmangazi University Öğrenci Ödevi	%1
2	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<%1
3	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
4	Submitted to Uludag University Öğrenci Ödevi	<%1
5	Submitted to Ege Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
6	Submitted to Saglik Bilimleri Universitesi Öğrenci Ödevi	<%1

EK-2: Tez Çalışması Dijital Makbuz

turnitin

Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen:	Buse Esra MERCAN
Ödev başlığı:	SODYUM GLUKOZ KOTRANSPORTER-2 İNHİBİTÖRLERİNİN ALZ...
Gönderi Başlığı:	SODYUM GLUKOZ KOTRANSPORTER-2 İNHİBİTÖRLERİNİN ALZ...
Dosya adı:	DELDE_NLRP3_NFLAMAZOMU_ARACILI_N_RO_NFLAMASYON_Z...
Dosya boyutu:	1.84M
Sayfa sayısı:	55
Kelime sayısı:	12,597
Karakter sayısı:	85,063
Gönderim Tarihi:	07-Eki-2026 03:35ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası:	3053060491

Copyright 2026 Turnitin. Tüm hakları saklıdır.

9. ÖZGEÇMİŞ