

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KORTİKAL YAYILAN DEPOLARİZASYONUN cGAS-STING
YOLAĞI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Kadir Oğuzhan SOYLU

Temel Nörolojik Bilimler Programı

DOKTORA TEZİ

ANKARA

2026

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KORTİKAL YAYILAN DEPOLARİZASYONUN cGAS-STING
YOLAĞI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Kadir Oğuzhan SOYLU

Temel Nörolojik Bilimler Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN

ANKARA

2026

**KORTİKAL YAYILAN DEPOLARİZASYONUN cGAS-STING YOLAĞI
ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Kadir Oğuzhan Soylu

Danışman: Prof. Dr. Müge Yemişçi Özkan

Bu tez çalışması 20.05.2026 tarihinde jürimiz tarafından “Temel Nörolojik Bilimler Programı” nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Hülya Karataş Kurşun
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Mehmet Yıldırım Sara
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Yusuf Çetin Kocaefe
Hacettepe Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Güvem Gümüş Akay
Ankara Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Nihal Apaydın
Ankara Üniversitesi

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

09 Haziran 2026

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ 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. Kütüphaneleri 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⁾

09.06.2026

Kadir Oğuzhan SOYLU

ⁱ“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (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 bulgular 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, Tez Danışmanının Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Dr. Kadir Oğuzhan SOYLU

TEŞEKKÜR

Hem tıp fakültesi boyunca hem de doktora eğitimim boyunca inanılmaz bir sabır ve anlayışla beni destekleyen ve bu zorlu süreçleri kolaylıkla atlatmamı sağlayan canım aileme, arkadaşlarıma ve can yoldaşım Mert Gültekin'e çok teşekkür ederim.

Doktora eğitimimin başından beri bana yol gösteren, tez çalışmalarım sırasında her zaman ve her konuda bana destek olan ve arkamda duran danışman hocam Prof. Dr. Müge Yemişçi Özkan'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarım sırasında bilgisine ve deneyimine sıklıkla başvurduğum, her konuda beni en doğru şekilde yönlendiren ve tezimin gerçekleştirilmesinde büyük emekleri olan Prof. Dr. Hülya Karataş Kurşun'a minnetlerimi sunarım. Doktora programı sırasında teorik ve uygulamalı eğitimlerle doktora eğitimime katkıda bulunan Prof. Dr. Emine Eren Koçak ve Doç. Dr. Şefik Evren Erdener'e de teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca hem bilgi hem iş yükü açısından bana destek olan ve yol gösteren Dr. Buket Nebiye Demir, Dr. Melike Sever Bahçekapılı ve Dr. Canan Çakır-Aktaş'a içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarına başladığımdan beri akran eğitimimin ötesinde bir destekle bana yol gösteren, bilgi ve tecrübesini benden esirgemeyen ve laboratuvara alışmamı kolaylaştıran Dr. Gökçe Gürlü'e, hem bilimsel hem gündelik sohbetiyle laboratuvarımda geçirdiğim zamanı güzelleştiren, inanılmaz inovatif zekasıyla harika bir bilim insanı olacağına inandığım, her an bana yardımcı olmaya hazır "canım çömezim" Dr. Dilan Bozanoğlu'na ve her türlü yardımı için Talha Berk Bolu'ya içten teşekkürlerimi sunarım. Doktora programı boyunca birlikte çalıştığımız ve deneyler sırasında destekleri olan Prof. Dr. Eda Derle Çiftci, Dr. Onur Çağın Gürelek, Dr. Beyza Türken ve Dr. Tuğçe Bilbay'a teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvarımda her türlü sorumu içtenlikle cevaplayan Dr. Taha Solakoğlu, Dr. Aslıhan Bahadır Varol ve Dr. Meftun Doğa Başaran'a teşekkür ederim.

Laboratuvarımızın bel kemiği, her türlü sorunumuzda yardımımıza koşan, bilgi ve becerisiyle sorunları ustalıkla çözen sevgili teknisyenimiz Mesut Fırat'a, yardımlarını esirgemeyen enstitü sekreterlerimiz Hülya Erener, Tuğba Sarıtaş ve Meltem Anlı'ya, ve yardımcımız Zafer Akdoğan'a teşekkür ederim.

Kapiller Western blotlama deneylerinin gerçekleştirilmesinde önemli destekleri olan Hasan Basri Kılıç ve Prof. Dr. Yusuf Çetin Kocaefe'ye, bilgi ve tecrübesiyle deneylerimize yol gösteren Prof. Dr. Mehmet Yıldırım Sara'ya ve acil ihtiyacımız olduğu sırada bize malzeme desteğinde bulunan Prof. Dr. Vildan Bozok'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesine kapsamlı proje (Proje no: TSA-2022-19749) yardımıyla katkıda bulunan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne, tez çalışmam sırasında burs yardımıyla finansal olarak beni destekleyen Yükseköğretim Kurulu (YÖK, 100/2000 doktora bursu) ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK, Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) 2211-A doktora bursu) teşekkür ederim.

ÖZET

Soylu K.O. Kortikal Yayılan Depolarizasyonun cGAS-STING Yolağı Üzerindeki Etkisinin Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Nörolojik Bilimler Programı Doktora Tezi, Ankara, 2026. Kortikal yayılan depolarizasyon (KYD) korteks boyunca yavaşça yayılan nöronal ve gliyal depolarizasyon dalgasıdır. KYD iskemik ve travmatik beyin hasarında rol oynamaktadır ve migren aurası ile baş ağrısının oluşumunda etkili olduğu düşünülmektedir. KYD beyin parankiminde ve meninkslerde steril nöroinflamatuvar cevap başlatmaktadır. *cyclic GMP-AMP synthase* (cGAS)-*stimulator of interferon genes* (STING) yolağı, hücrelerde tip 1 interferon ve inflamatuvar sitokin sentezini uyaran bir doğal bağışıklık sistemi yolağıdır; nöroinflamasyonda ve nosisepsiyonda önemli rolleri olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada KYD ile ilişkili nöroinflamasyon ve nosisepsiyonda cGAS-STING yolağının rolünün aydınlatılması amaçlanmıştır. Thy1-ChR2-YFP transgenik farelerde non-invazif optogenetik yöntemle KYD tetiklenmesi sonrası serebral kortekste cGAS-STING yolağı aktivasyonu immüno Floresan işaretleme ve kapiller temelli Western blot analizi (WES) yöntemleriyle incelenmiş ve yolak ifadesi nöron, astrosit ve mikrogliya hücre tiplerinde değerlendirilmiştir. Buna ek olarak cGAS-STING yolağı aktivitesi spesifik STING antagonisti C-176 (20 mg/kg) ve STING agonisti 2'3' cGAMP (1 mg/kg) ile farmakolojik olarak manipüle edilerek KYD ile ilişkili mikrogliyal aktivasyon, KYD yatkınlığı ve KYD ile ilişkili ağrı davranışlarına etkisi incelenmiştir. KYD tetiklenmesi sonrası serebral kortekste ağırlıklı olarak nöronlarda cGAS-STING yolağı aktivasyonu ve interferon- β sentezi görülmüş ve yolak aktivasyonunun mikrogliyal aktivasyonda rolü olduğu saptanmıştır. 2'3' cGAMP ile yolak aktivasyonu KYD yatkınlığını azaltmış ve KYD sonrası gelişen periorbital allodiniyi hafifletmiştir. Bulgularımız cGAS-STING yolağının KYD ile ilişkili nöroinflamasyon ve nosisepsiyonda rol oynadığını ve STING modülasyonunun KYD ile ilişkili nörolojik hastalıklarda tedavi hedefi olarak potansiyelini ortaya koymuştur.

Anahtar kelimeler: Kortikal yayılan depolarizasyon, nöroinflamasyon, migren, interferon, cGAS-STING

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Proje no: TSA-2022-19749), Yükseköğretim Kurulu (100/2000 doktora bursu) ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK, 2211-A doktora bursu) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Soylu K.O. Investigation of the Impact of Cortical Spreading Depolarization on cGAS-STING Pathway, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Basic Neurological Sciences (Neuroscience) Program, Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2026. Cortical spreading depolarization (CSD) is a slowly spreading neuronal and glial depolarization wave through the cortex. CSD plays roles in ischemic and traumatic brain injury and it is thought to be responsible for aura and headache in migraine. CSD starts a sterile neuroinflammatory response in brain parenchyma and meninges. cyclic GMP–AMP synthase (cGAS)–stimulator of interferon genes (STING) pathway is an innate immune system pathway that induces type 1 interferon and inflammatory cytokine synthesis in the cell. It has been shown to have important roles in neuroinflammation and nociception. In this study, we aimed to elucidate the roles of cGAS-STING pathway in CSD-associated neuroinflammation and nociception. CSD was induced with non-invasive optogenetic method in Thy1-ChR2-YFP transgenic mice and cGAS-STING pathway activation in the cerebral cortex was investigated with immunofluorescent staining and capillary based Western blotting (WES). Expression of pathway proteins were assessed in neuron, astrocyte and microglia cell types. Additionally, cGAS-STING pathway activity was pharmacologically manipulated with specific STING antagonist C-176 (20 mg/kg) and STING agonist 2'3' cGAMP (1 mg/kg) and its effects on CSD-associated microglial activation, CSD susceptibility and CSD-associated nociceptive behaviours were assessed. After CSD induction, cGAS-STING pathway activation and interferon- β synthesis was observed predominantly in neurons in the cerebral cortex with downstream effects on microglial activation. Pathway activation with 2'3'cGAMP decreased CSD susceptibility and significantly alleviated the development of periorbital allodynia following CSD. Our findings suggested that cGAS-STING pathway plays a role in CSD-associated neuroinflammation and nociception and that STING modulation has a therapeutic potential in CSD-associated neurological disorders.

Keywords: Cortical spreading depolarization, neuroinflammation, migraine, interferon, cGAS-STING

This study is supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project no: TSA-2022-19749), Council of Higher Education (100/2000 PhD scholarship) and The Scientific and Technological Research Institution of Turkey (TÜBİTAK, 2211-A PhD scholarship).

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Kortikal Yayılan Depolarizasyon (KYD) ve Migren	5
2.1.1. KYD Oluşum Mekanizmaları	5
2.1.2. KYD ve Beyin Üzerindeki Etkileri	7
2.1.3. Migren Patofizyolojisi ve KYD-Aura İlişkisi	8
2.1.4. Migrenin Klinik Özellikleri	11
2.1.5. Deneysel Migren Modelleri	13
2.1.6. KYD İn Vivo Modelleri	16
2.1.7. KYD, Nöroinflamasyon ve TVS	18
2.2. cGAS-STING Yolağı	21
2.2.1. cGAS-STING Yolağı ve Aktifleşme Mekanizmaları	21
2.2.2. cGAS-STING Yolağının Bağışıklık Sistemi İçindeki Rolü	23
2.2.3. cGAS-STING Yolağının Nörolojik Hastalıklardaki Rolü	25
2.2.4. cGAS-STING Yolağının Nöroinflamasyon Üzerine Etkileri	28
3. GEREÇ ve YÖNTEM	31
3.1. Hayvanlar	31
3.2. Optogenetik Uyarımın Yapıldığı Thy1-ChR2-YFP Transgenik Farelerin Genotiplenmesi	32
3.3. Anestezi ve Yaşamsal Bulguların Takibi	33
3.4. Optogenetik Yöntemle KYD Tetiklenmesi	33
3.5. Hayvanlardan Beyin Dokusunun Elde Edilmesi	36

3.6. İmmünofloresan İşaretleme	36
3.7. Görüntü Elde Edilmesi ve Görüntü Analizi	38
3.8. Kapiller Temelli Western blot analizi (WES) Yöntemiyle Beyindeki Protein Seviyelerinin Tayini	39
3.9. Hayvanlara Uygulanan Farmakolojik Ajanlar	41
3.10. Mikroglia Morfolojisi Analizi	43
3.11. Topikal Potasyum Klorür Uygulamasıyla KYD Tetiklenmesi ve KYD Eşiğinin Belirlenmesi	44
3.12. Periorbital Mekanik Hassasiyetin Manuel von Frey Testiyle İncelenmesi	46
3.13. KYD Sonrası Periorbital Allodini Gelişiminin İncelenmesi için Yapılan Cerrahi	47
3.14. İstatistiksel Analizler	49
4. BULGULAR	51
4.1. KYD Tetiklenmesi Sonrası Serebral Kortekste cGAS-STING Yolağı Aktivitesinin İncelenmesi	51
4.1.1. KYD Sonrası Serebral Kortekste cGAS-STING Yolağı Proteinlerinin İmmünofloresan İşaretlenmesi Artmaktadır	51
4.1.2. KYD Sonrası Serebral Kortekste cGAS-STING Yolağı Proteinlerinin Seviyesi Artmaktadır	55
4.2. KYD Sonrası Serebral Kortekste cGAS-STING Yolağı Aktivitesinin Farklı Hücre Tiplerinde İncelenmesi	57
4.2.1. KYD Sonrası cGAS-STING Yolağı Aktivitesi Nöronlarda Artmaktadır	58
4.2.2. KYD Sonrası cGAS-STING Yolağı Aktivitesi Mikroglialarda Artış Göstermemektedir	61
4.2.3. KYD Sonrası cGAS-STING Yolağı Aktivitesi Astrositlerde Artış Göstermemektedir	63
4.2.4. KYD Sonrası Mikroglialardaki STING aktivasyonu NLRP3 İnflamazomu ve NF-κB Yolağını Aktifleştirmemektedir	66
4.2.5. STING İnhibitörü C-176 KYD Sonrası Artan cGAS-STING Yolağı Aktivitesini Baskılamaktadır	68
4.3. KYD Sonrası Serebral Kortekste Mikroglia Aktivasyonunun İncelenmesi	73
4.3.1. Çoklu KYD Tetiklenmesi Sonrası Serebral Kortekste Mikroglial Aktivasyon Gözlenmektedir	73
4.3.2. cGAS-STING Yolağının Farmakolojik İnhibisyonu KYD Sonrası Görülen Mikroglial Aktivasyonu Engellemektedir	76

4.4. cGAS-STING Yolağı Aktivitesinin Farmakolojik Modülasyonunun KYD Eşiğı ve KYD ile İlişkili Kraniyal Nosisepsiyona Etkisinin İncelenmesi	77
4.4.1. İntranazal 2'3' cGAMP Uygulaması Beyinde cGAS-STING Yolağını Aktifleştirmektedir	78
4.4.2. cGAS-STING Yolağı Aktivasyonu KYD Eşiğini Yükseltmektedir	79
4.4.3. cGAS-STING Yolağı Aktivasyonu Periorbital Mekanik Hassasiyeti Azaltmaktadır	80
4.4.4. Çoklu KYD Öncesi cGAS-STING Yolağının Aktive Edilmesi KYD Sonrası Periorbital Allodini Gelişmesini Engellemektedir	83
5. TARTIŞMA	86
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	103
7. KAYNAKLAR	105
8. EKLER	126
EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri	
EK-2: Tez Çalışması ile İlgili Orijinallik Raporu	
9. ÖZGEÇMİŞ	130

SİMGELER ve KISALTMALAR

20-HETE	20-hidroksieikosatetraenoik asit
AA	Araşidonik asit
Ach	Asetilkolin
Ag/AgCl	Gümüş/gümüş klorür
AIM2	Absent in melanoma 2
ALS	Amyotrofik Lateral Skleroz
ANOVA	Varyans analizi
ATP	Adenozin tri-fosfat
BSA	Bovine serum albumin
Ca⁺²	Kalsiyum
CDN	Siklik dinükleotid
cGAMP	Cyclic GMP–AMP
cGAS	Cyclic GMP– AMP synthase
CGRP	Kalsitonin geni ilişkili peptid
COX-2	Siklooksijenaz
CAA	Çeyrekler arası açıklık
DMSO	Dimetil süloksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DOE	Deneyisel Otoimmün Ensefalomyelit
dsDNA	Dual stranded DNA
EDHF	Endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EET	Epoksieikosatrienoik asit
eIF2α	Eukaryotic initiation factor 2 α
ENPP1	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1
ER	Endoplazmik retikulum
ERGIC	ER–Golgi intermediate compartment
FHM	Familyal Hemiplejik Migren

GOLGA2	Golgi autoantigen, golgin subfamily a, 2
HMBG1	High mobility group box 1
HSV-1	Herpes Simpleks Virüs-1
IDO1	İndolamin 2,3-dioksijenaz 1
IFN	İnterferon
IKK	I kappa B kinaz
IL-1β	İnterlökin-1 β
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
IRF3	İnterferon regulatory factor 3
JAK	Janus kinase
K⁺	Potasyum
KBB	Kan beyin bariyeri
KCl	Potasyum klorür
KYD	Kortikal yayılan depolarizasyon
MGGP	Mitokondriyal geçirgenlik geçiş poru
MMA	Middle meningeal artery
mtDNA	Mitokondriyal DNA
Na⁺	Sodyum
NaOH	Sodyum hidroksit
NE	Nörepinefrin
NF-κB	Nükleer faktör (NF)- κ B
NK-A	Nörokinin-A
NLRP3	NOD-like receptor family pyrin domain containing 3
NMDA	N-metil-D-aspartat
NO	Nitrik oksit
NPY	Nöropeptid Y
NTG	Nitrogliserin
OMA	Orta meningeal arter
P2X7	Pürinerjik reseptör 2X7
PACAP	Pituiter adenilat siklaz aktive edici peptid

Panx1	Pannexin-1
PBS	Phosphate buffered saline
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDL-1	Programlanmış ölüm ligandı-1
PFA	Paraformaldehit
PGA	Periaqueduktal gri alan
PGE₂	Prostaglandin E2
p-IRF3	phospho-Interferon Regulatory Factor 3
PPE	Plazma protein ekstrasvazasyonu
p-STING	Fosforile STING
RIG1	Retinoik asit ile indüklenabilir gen I
RIPA	Radyoimmünopresipitasyon assay
SD	Spreading depolarization
SLE	Sistemik lupus eritematozus
SP	Substans P
STAT	Signal transducer and activator of transcription
STING	Stimulator of interferon genes
TBK-1	TANK- binding kinase 1
TBS	Tris buffered saline
TCC	Trigeminoservikal kompleks
TG	Trigeminal gangliyon
TLR	Toll-like receptor
TNC	Trigeminal nükleus caudalis
TNF-α	Tümör nekroz faktörü- α
TREX1	Three prime repair exonuclease 1
TVS	Trigeminovasküler sistem
VIP	Vazoaktif intestinal peptid

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. KYD'nin kortikal dokuda yayılım mekanizmaları.	6
2.2. KYD'nin beyindeki metabolik ve hemodinamik etkileri ve bunlar arasındaki etkileşimler.	8
2.3. Migren aurası ve ağrısının oluşmasında önerilen KYD aracılı mekanizmalar.	11
2.4. Deneysel migren modellerinin şematik gösterimi.	15
2.5. KYD ile ilişkili parankimal ve meningeal inflamatuvar cevapların ve TVS aktivasyonundaki rolünün şematik olarak özetlenmesi.	21
2.6. cGAS-STING yolağı aktivasyon mekanizmalarının ve hücre içinde aktive ettiği sinyal yolaklarının ve hücresel fonksiyonların şematik gösterimi.	23
2.7. cGAS-STING yolağının nosisepsiyon üzerindeki iki yönlü etkilerinin şematik anlatımı.	30
3.1. %1,5'lik agaroz jel elektroforezinde heterozigot kolonide üretilen Thy1-ChR2-YFP transgenik hayvanların genotiplendirme sonuçlarından örnek görüntü.	33
3.2. Optogenetik yolla KYD tetiklenmesi ve elektrofizyolojik kayıta KYD oluşumunun doğrulanması.	35
3.3. Optogenetik olarak KYD tetiklenmesi sonrası serebral kortekste cGAS-STING yolağı proteinlerinin ifadesinin incelenmesi için yapılan deneylerin şematik olarak özetlenmesi.	41
3.4. KYD tetiklenmesi sonrası mikroglial aktivasyonun mikroglia morfolojisi analiziyle incelenmesi ve mikroglial aktivasyonda cGAS-STING yolağının rolünün incelenmesi için yapılan deneylerin şematik olarak özetlenmesi.	44
3.5. C57BL6/J farelerde dura üzerinde topikal KCl uygulaması için yapılan cerrahinin fare kafatası fotoğrafında gösterilmesi.	46
3.6. Periorbital von Frey testi için kullanılan düzenek.	47
3.7. cGAS-STING yolağı aktivitesinin KYD eşiği ve periorbital ağrı yanıtları üzerindeki etkilerinin incelenmesi için yapılan deneylerin şematik olarak özetlenmesi.	49

4.1.	KYD sonrası ipsilateral pariyetal kortekste cGAS-STING yolağı proteinlerinin ifadesinin immünofloresan işaretleme ile incelenmesi.	53
4.2.	KYD sonrası ipsilateral pariyetal kortekste cGAS-STING yolağı proteinleri için immünopozitif hücre oranlarının belirlenmesi.	54
4.3.	KYD sonrası STING proteininin Golgi veziküllerine geçişinin incelenmesi.	55
4.4.	KYD tetiklenmesi sonrası ipsilateral pariyetal kortekste cGAS-STING yolağı proteinlerinin seviyelerinin kapiller temelli Western blot analizi (WES) ile kantifiye edilmesi.	57
4.5.	KYD sonrası ipsilateral pariyetal kortekste nöronlarda cGAS-STING yolağı proteinlerinin ifadesinin ikili immünofloresan işaretleme ile incelenmesi.	59
4.6.	KYD sonrası ipsilateral pariyetal kortekste cGAS-STING yolağı proteinleri için immünopozitif nöron yüzdesinin belirlenmesi.	60
4.7.	KYD sonrası ipsilateral pariyetal kortekste mikroglialarda cGAS STING yolağı proteinlerinin ifadesinin ikili immünofloresan işaretleme ile incelenmesi.	62
4.8.	KYD sonrası ipsilateral pariyetal kortekste cGAS-STING yolağı proteinleri için immünopozitif mikroglia yüzdesinin belirlenmesi.	63
4.9.	KYD sonrası ipsilateral pariyetal kortekste astrositlerde cGAS-STING yolağı proteinlerinin ifadesinin ikili immünofloresan işaretleme ile incelenmesi.	65
4.10.	KYD sonrası ipsilateral pariyetal kortekste cGAS-STING yolağı proteinleri için immünopozitif astrosit yüzdesinin belirlenmesi.	66
4.11.	KYD sonrası mikroglialarda NLRP3 inflamazomu ve NF-κB yolağı aktivasyonunun incelenmesi.	67
4.12.	STING inhibitörü C-176 uygulaması ile KYD sonrası nöronlarda cGAS-STING yolağı ifadesinin ikili immünofloresan işareleme ile incelenmesi.	70
4.13.	STING inhibitörü C-176 uygulaması ile KYD sonrası cGAS-STING yolağı ifadesinin kapiller temelli Western blot analizi ile incelenmesi.	71
4.14.	STING inhibitörü C-176 uygulaması ile KYD sonrası nöronlarda NLRP3 inflamazomu ifadesinin incelenmesi.	72
4.15.	Tek ve altı KYD tetiklenmesi sonrası mikroglial aktivasyonun mikroglia morfolojisi analiziyle incelenmesi.	75
4.16.	STING inhibisyonunun KYD ile ilişkili mikroglial aktivasyona etkisinin incelenmesi.	76

4.17. STING agonisti 2'3' cGAMP'in intranazal uygulaması sonrası serebral kortekste cGAS-STING yolağı aktivitesinin incelenmesi.	79
4.18. cGAS-STING yolağı aktivitesinin KYD yatkınlığı üzerindeki etkisinin incelenmesi.	80
4.19. cGAS-STING yolağı aktivitesinin periorbital mekanik hassasiyet üzerindeki etkisinin manuel von Frey testiyle incelenmesi.	82
4.20. cGAS-STING yolağı aktivasyonunun çoklu KYD sonrası gelişen periorbital allodiniye etkisinin incelenmesi.	84

TABLÖLAR

Tablo		Sayfa
3.1.	Deney ve kontrol gruplarında kullanılan hayvan sayıları.	31
3.2.	PZR koşulları.	32

1. GİRİŞ

Kortikal yayılan depolarizasyon (KYD), serebral kortekste yavaşça yayılan ve geçtiği bölgelerde nöronları ve gliya hücrelerinin neredeyse tamamını etkileyen bir depolarizasyon dalgasıdır (1-5). KYD, beyinde etkilediği bölgelerde iyonik değişikliklere neden olarak beyin aktivitesinde geçici baskılanmalara ve beyin kan akımında geçici değişikliklere neden olmaktadır (1, 5-8). KYD'nin beyinde neden olduğu büyük iyonik değişiklikler ve nörotransmitter salıverilmesinin düzeltilmesi ve geri döndürülmesi için beyinde yüksek miktarda enerji harcanması gerekmektedir. Bu yüzden KYD metabolik açıdan zorlayıcı bir olaydır (9). İnsanlarda KYD'nin beyin metabolik dengesini bozan iskemi, hipoksi, kanama ve travma gibi durumlarda beyinde tetiklendiği ve beyin dokusuna ek yük bindirerek ikincil doku hasarına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (10-13). Bu bakımdan iskemik inme, hemorajik inme, ve travmatik beyin hasarı gibi nörolojik hastalıklarda önemli bir tedavi hedefi olarak görülmektedir (14). Buna ek olarak deneysel modellerden elde edilen bulgular, KYD'nin migren hastalarının bir kısmında görülen migren aurasının beyindeki elektrofizyolojik karşılığı olduğunu düşündürmektedir (7, 8, 15-18). KYD'nin beyin aktivitesinde yarattığı etkiler migren aurası fenomenolojisiyle güçlü bir korelasyon göstermektedir (7, 8, 18). Bunun yanında, KYD'nin migren ağrısının oluşumunda meningeal nosiseptörlerin ve trigeminovasküler sistemin (TVS) aktivasyonuna neden olarak rol oynayabileceği deneysel modellerde gösterilmiştir (19-25). Migren yaygın görülen ve yüksek maliyetli iş gücü ve yaşam kalitesi kaybına yol açan önemli bir kronik nörolojik hastalıktır (26). Migren patofizyolojisini aydınlatmak ve mevcut tedavilerden fayda görmeyen hastalar için yeni tedavi seçenekleri geliştirmek güncel nörobilimde önemli bir araştırma alanıdır.

KYD'nin nöroinflamasyon ile yakın ilişkili olduğu gösterilmiştir. KYD ile ilişkili nöroinflamasyonun nöronlarda pannexin-1 (Pannx1) megakanallarının açılması ile başladığı, nöronlarda *nucleotide-binding domain (NOD)-like receptor family pyrin domain containing 3* (NLRP3) inflamazomu ve kaspaz-1 aktivasyonuna neden olarak interlökin (IL)-1 β , tümör nekroz faktörü (TNF)- α ve *high mobility group box 1* (HMGB1) alarmin molekülünün salınmasına yol açtığı gösterilmiştir (20, 27). Nöronlardan salınan HMGB1 molekülünün daha sonrasında astrositlerde nükleer

faktör (NF)- κ B yolağı aktivasyonuna neden olarak astrositlerden de inflamatuvar medyatörlerin salınmasına ve mikrogliyal aktivasyona neden olduğu gösterilmiştir (20, 28). KYD ile ilişkili inflamatuvar cevapta ön planda doğal bağışıklık sistemi bileşenleri aktive olmaktadır (29).

KYD'nin meninkslerde de nörojenik inflamasyonun başlamasında rol oynadığı ve trigeminal afferentlerin aktivasyonuna neden olabildiği gösterilmiştir (20, 30-32). Trigeminal afferentlerdeki aktivasyon daha sonrasında TVS'de daha uzun süreli aktivasyona ve sensitizasyona neden olarak baş ağrısı oluşumunda rol oynayabilmektedir (27, 33). Deneysel modellerde KYD tetiklenmesinin kemirgenlerde spontan ağrı davranışlarına ve periorbital allodini gelişimine neden olduğu gösterilmiştir (23-25, 34).

KYD preklinik deneysel modelleri, beyinde KYD oluşmasına yetecek bir depolarizasyon sağlanması için kimyasal, elektriksel veya mekanik bir uyarı verilmesi prensibine dayanmaktadır (35, 36). Bu uyarının verilebilmesi için kortekse veya duraya erişim gereklidir ve bu yöntemler kafatasına kraniyotomi ile bir pencere açılmasını gerektirmektedir. Bu bakımdan konvansiyonel KYD tetikleme yöntemleri invazif yöntemlerdir ve istemsiz doku hasarına yol açarak inflamasyon çalışmaları için karıştırıcı faktörlere neden olmaktadır (35, 37). Yakın zamanda geliştirilen optogenetik yöntemle non-invazif bir şekilde ışık uyarısıyla KYD tetiklemek mümkün hale gelmiştir (38, 39). Kortikal nöronlarında ışıkla uyarılabilir iyon kanalı *channelrhodopsin* ifade eden transgenik farelerde sağlam kafatası üzerinden mavi ışık uyarısı verilmesiyle nöronlarda yeterli depolarizasyon oluşturularak KYD tetiklenebilmektedir (38, 39). Doku hasarına yol açmadan KYD tetiklemesine izin vermesi nedeniyle optogenetik KYD tetiklemesi KYD ile ilişkili inflamasyon ve ağrı davranışlarının çalışılması için önemli bir deneysel modeldir ve laboratuvarımızda da kullanılmaktadır.

cyclic GMP-AMP synthase (cGAS)-stimulator of interferon genes (STING) yolağı hem patojen enfeksiyonuna karşı korumada hem de doğal inflamatuvar süreçlerde rol oynayan bir doğal bağışıklık sistemi yolağıdır (40, 41). cGAS-STING yolağı sitoplazmada yer alan ve patojen enfeksiyonu veya hücre hasarı ilişkili olarak sitoplazmada bulunan serbest çift zincirli deoksiribonükleik asit (DNA)

moleküllerinin cGAS tarafından tanınmasıyla aktive olur ve STING proteininin tip 1 interferon (IFN α ve IFN β) sentezini ve NF- κ B sinyalini uyarması aracılığıyla güçlü bir doğal immün sistem cevabı geliştirir (40, 42-44). cGAS-STING yolağı aktivasyonuna neden olan çift zincirli DNA patojen kaynaklı DNA olabileceği gibi hücrenin kendi nükleer DNA'sı veya mitokondriyal DNA'sı da olabilir (40, 44). Bu sayede patojenlere karşı korunmada rol oynamasının yanı sıra sistemik otoimmün durumlarda da rol oynayabilmektedir.

cGAS-STING yolağının sistemik otoimmün hastalıklarda aktive olduğu ve pro-inflamatuvar sitokin sentezine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (45, 46). cGAS-STING yolağının tümör immünolojisinde de rol oynayarak anti-tümörjenik etkileri olduğu görülmüştür ve kanser immunoterapisinde translaşyonel bir öneme sahiptir (47, 48).

cGAS-STING yolağı çeşitli nörolojik hastalıklarda nöroinflamasyona katkıda bulunarak önemli roller oynamaktadır. Özellikle nörolojik enfeksiyonlar, nöroinflamatuvar hastalıklar, iskemi, travma ve nörodejeneratif hastalıklarda cGAS-STING yolağının patolojideki rolü gösterilmiştir (41, 49). Nörolojik hastalıklarda cGAS-STING yolağı aktifleşmesinin çok yönlü etkileri olduğu ve bazı durumlarda koruyucu etkisi olabileceken, yolağın aşırı aktifleşmesinin ağır inflamatuvar durumlara ve doku hasarına yol açabileceği gösterilmiştir (50-53). Özellikle beyinde iskemik veya travmatik hasar sonrası mikroglialarda aşırı cGAS-STING yolağı aktivasyonu ek doku hasarına ve lezyon genişlemesine neden olabilmektedir bu yüzden cGAS-STING aracılı inflamasyon önemli bir tedavi hedefi olarak görülmektedir (54-57).

cGAS-STING yolağının nosisepsiyon kontrolünde de rol oynadığı görülmüştür. Duyu nöronlarında yolağın aktivasyonunun tip 1 interferon sentezi üzerinden akut dönemde hızlı ve güçlü anti-nosiseptif etkileri olabildiği, buna karşılık kronik ağrı modellerinde mikroglialardaki uzamış cGAS-STING yolağı aktivasyonunun hiperalejiye katkıda bulunduğu gösterilmiştir (58-61). Bu bakımdan cGAS-STING yolağının aktivasyon derecesi, zamanlama ve etkilenen hücre tiplerine bağlı olarak nosisepsiyon üzerinde iki yönlü etkileri olabilmektedir ve bu etkilerin daha detaylı aydınlatılması gerekmektedir (62).

Bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasında nöroinflamasyon ve nosisepsiyonda önemli rolleri olduğu gösterilen cGAS-STING yolağının beyinde KYD ile ilişkili nöroinflamasyonda ve kranial nosiseptif cevaplarda rol oynadığı hipotezi test edilmiştir. Bu doğrultuda, Thy1-ChR2-YFP transgenik farelerde non-invazif optogenetik yöntemle KYD tetiklemesi sonrası serebral kortekste cGAS-STING yolağı aktivasyonunun immünofloresan işaretleme ve kapiller temelli Western blot analizi (WES) yöntemleriyle incelenmesi ve yolak aktivasyonunun nöron, astrosit ve mikrogliya hücre tiplerine özgü etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Buna ek olarak, cGAS-STING yolağı aktivitesinin farmakolojik olarak manipüle edilmesiyle KYD ile ilişkili mikrogliyal aktivasyon, KYD yatkınlığı ve KYD ile ilişkili ağrı davranışları üzerindeki etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular nöroinflamasyonda önemli rolleri olduğu bilinen cGAS-STING yolağının, KYD ile ilişkili nöroinflamasyonun ve nosisepsiyonun gelişimindeki rollerini ortaya koymuş ve auralı migren patofizyolojisinde olası yeni bir tedavi hedefi olarak önemini vurgulamıştır.

2. GENEL BİLGİLER

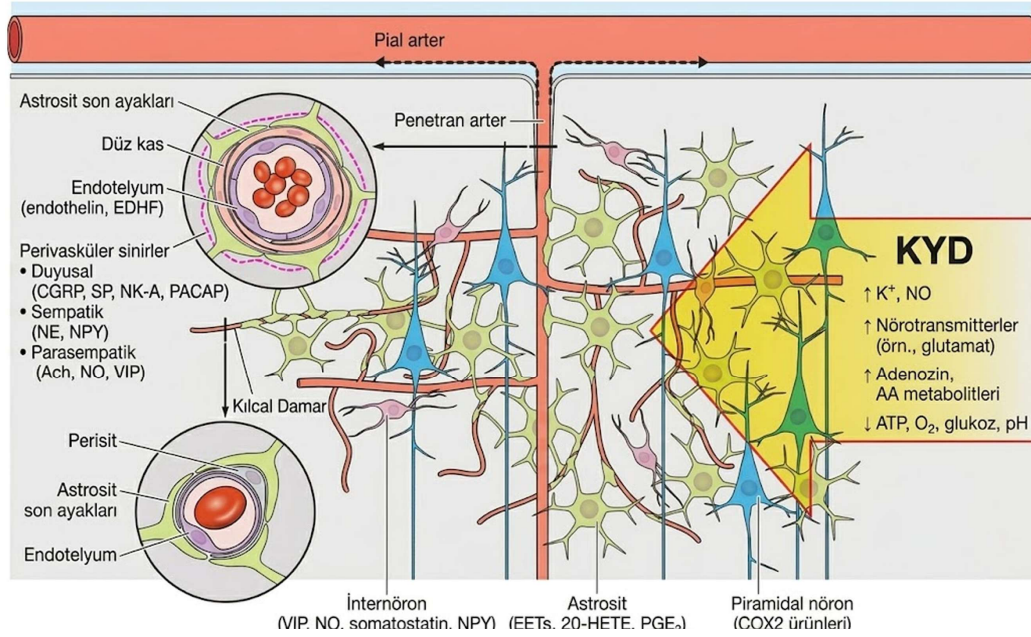
2.1. Kortikal Yayılan Depolarizasyon (KYD) ve Migren

2.1.1. KYD Oluşum Mekanizmaları

KYD serebral kortekste 2-5 mm/dakika hızında yavaşça yayılan, beyinde birçok hücre grubunu etkileyebilen ve birkaç dakika süren bir depolarizasyon aktivitesidir (1-5). Hücrelerde tama yakın bir depolarizasyona neden olduğu için etkilediği beyin bölgelerinde beyin aktivitesinin geçici olarak baskılanmasına neden olur (1, 5, 6, 63). KYD ilk olarak Aristides A. P. Leão tarafından tavşan beyinlerinde yaptığı deneylerde keşfedilmiştir. Leão bu deneylerde kortekse yeterince güçlü bir depolarizasyon uyarısı vermenin korteks boyunca yayılan geçici elektriksel baskılanmaya neden olduğunu görmüştür bu gözlemi üzerine bunu yayılan depresyon olarak tanımlamıştır (1, 6, 63). Sonraki yıllarda yapılan çalışmalar bunun altında yatan etkenin aslında güçlü bir depolarizasyon aktivitesi olduğunu göstermiştir ve kortikal yayılan depolarizasyon ismi kullanılmaya başlanmıştır (64).

KYD beyinde yeterince güçlü uyarının belirli bir alanda depolarizasyona yol açması ile tetiklenebilir. Bu depolarizasyon aktivitesi ekstraselüler potasyum (K^+) konsantrasyonunu kritik bir eşiğin üzerine çıkardığında çevredeki hücrelerde membran direncinde hızlı bir düşüşe neden olur ve membranda non-selektif katyon kanallarının açılmasıyla büyük bir depolarizasyona neden olur (65, 66). Bu süreç K^+ hücre dışına çıkışı ve sodyum (Na^+) ve kalsiyum (Ca^{+2}) hücre içine girişi ile seyreden büyük iyon geçişlerine neden olur (67-69). Nöronlarda bu depolarizasyon aktivitesi ve hücre içine yüksek miktarda Ca^{+2} girişi nörotransmitterlerin ve nöromodülatör bileşiklerin çoğunun salıverilmesine ve etkilenen dokuya yayılmalarına neden olur (68, 70). Hücre dışı ortama salınan büyük miktarda K^+ ve glutamatın çevre dokuya yayılarak çevredeki hücrelerde de benzer depolarizasyon aktivitesine neden olması KYD'nin korteks dokusu boyunca yayılmasından sorumlu kaskadı başlatır (69, 71). KYD'nin kortekste yavaş bir hızda yayılması bu mekanizmaya bağlıdır ve aksiyon potansiyelleri ve sinaptik iletimden bağımsızdır (9, 72, 73). KYD'nin bu yayılım özellikleri temel olarak nöronlar tarafından yürütülmektedir bu yüzden KYD'nin yayılabilmesi için nöron yoğunluğu yüksek dokuya ihtiyacı vardır. Bu bakımdan,

beyinde gri cevher boyunca yayılabilir ve gri cevher devamlılığını bozan lezyonlar ve beyaz cevher KYD yayılımını yavaşlatabilir veya durdurabilir (74) (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. KYD'nin kortikal dokuda yayılım mekanizmaları. KYD korteks boyunca yayılırken etrafa salınan K^+ , nörotransmitterler ve diğer bileşikler aracılığıyla hem parankimdeki hem vasküler kompartmanlardaki hücre tiplerini etkileyebilmektedir (KYD: Kortikal yayılan depolarizasyon, K^+ : Potasyum, NO: Nitrik oksit, AA: Araşidonik asit, ATP: Adenozin trifosfat, O_2 : Oksijen, EDHF: Endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör, CGRP: Kalsitonin geni ilişkili peptid, SP: Substans P, NK-A: Nörokinin-A, PACAP: Pitüiter adenilat siklaz aktive edici peptid, NE: Nörepinefrin, NPY: Nöropeptid Y, Ach: Asetilkolin, VIP: Vazoaktif intestinal peptid, EET: Epoksieikosatrienoik asit, 20-HETE: 20-hidroksieikosatetraenoik asit, PGE_2 : Prostaglandin E2, COX2: Sikloksijenaz 2). (9) numaralı kaynaktan çevrilmiştir.

KYD'nin tetiklenmesine yol açan uyarı beyin hasarı yaratan iskemi, hipoksi, kanama ve travma gibi durumlarda toplu hücre ölümlerine bağlı olarak hücre dışına salınan K^+ ve glutamat ile de oluşabilir (12). Hem deneysel modellerde hem de insanlarda iskemik inme, hemorajik inme, travmatik beyin hasarı gibi durumlarda beyinde çok sayıda tekrarlayan KYD oluşumu gösterilmiştir (75, 76). KYD'nin bu tür durumlarda lezyon üzerine etkisi olmayan bir epifenomen olmadığı, beyine yarattığı metabolik ve hemodinamik etkilerle hastalık çıktılarını üzerinde etkileri olduğu gösterilmiştir (10, 11, 13). Buna ek olarak yıllar içinde biriken güçlü bulgular KYD'nin migren aurasının oluşmasından sorumlu olan elektrofizyolojik etken olduğunu göstermektedir (7, 8, 15-18).

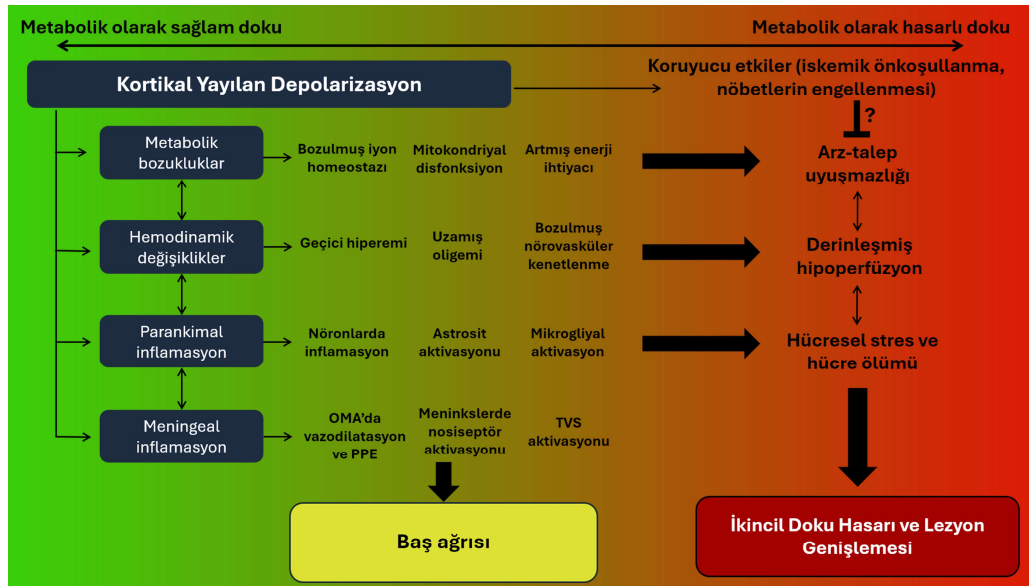
2.1.2. KYD ve Beyin Üzerindeki Etkileri

KYD'nin beyinde neden olduğu büyük iyonik değişikliklerin ve nörotransmitter salıverilmesinin düzeltilmesi ve geri döndürülmesi için beyinde yüksek miktarda enerji harcanması gerekmektedir bu yüzden KYD metabolik açıdan oldukça zorlayıcı bir olaydır (9). Bu süreçte nöron ve gliyalarda iyonik gradiyentlerin düzeltilerek membran polarizasyonunun sağlanması ve salınan nörotransmitterlerin temizlenmesi için yüksek $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ - Adenozin tri-fosfataz (ATPaz) aktivitesi gereklidir ve KYD sonrası beyindeki ATP seviyelerinin belirgin olarak düştüğü gösterilmiştir (77-79). Bu, beyin metabolizmasında ve oksidatif fosforilasyonda sağlıklı beyinde gözlenen en büyük artışlardan birine neden olarak doku glikojen ve oksijen seviyelerinde dakikalar içinde %50'ye kadar düşüşe neden olmaktadır (80, 81). KYD'nin sağlıklı beyinde 2 dakikadan daha uzun süre doku hipoksisine neden olabildiği gösterilmiştir (82). Art arda gelen, tekrarlayan KYD dalgalarının metabolik hızdaki yükselmeyi 2-3 kat artırabileceği gösterilmiştir (83, 84).

Metabolik etkilerine ek olarak KYD beyin kan akımında da geçici ancak belirgin değişikliklere neden olmaktadır. Bu hemodinamik değişiklikler multifazik bir süreçte ortaya çıkmaktadır (9). İlk olarak KYD dalgasıyla eş zamanlı olarak beyin kan akımında kısa süreli bir azalma (oligemi) gözlenmektedir. Bunu dakikalar süren, %30'a kadar çıkabilen kan akımı artışı (hiperemi) takip etmektedir. Son olarak da KYD sonrası 1 saat veya daha uzun sürebilen, bazalden %10-40 daha düşük bir oligemi fazı gözlenmektedir (85-89). KYD'nin neden olduğu bu hemodinamik değişiklikler beyinde birden fazla vasküler kompartmanda, çok sayıda vazomotor etkinin birleşmesiyle oluşmaktadır (9). Bu etkilerin KYD sırasında salınan çok sayıda vazoaaktif bileşiğin nörovasküler üniteyi etkilemesiyle ortaya çıktığı düşünülmektedir (5, 90). Bu bakımdan KYD ile ilişkili hemodinamik değişikliklerin artan metabolik talebe cevap olarak oluşmadığı, bunun aksine KYD'nin nörovasküler kenetlenmeyi bozduğu düşünülmektedir (81, 91, 92).

Metabolik açıdan sağlıklı beyinde KYD ile ilişkili metabolik ve hemodinamik değişiklikler hücre ölümü ve doku hasarına yol açmamaktadır (7, 93). Ancak iskemi, hipoksi, kanama veya travma gibi nedenlerle metabolik açıdan hasarlı beyinde KYD'nin neden olduğu bu etkiler hücrelere ek metabolik yük bindirerek hücre

ölümüne ve ikincil doku hasarına neden olabilir (64, 94). KYD nedeniyle artmış enerji ihtiyacı, mitokondriyal disfonksiyon ve oksijen kullanımındaki bozukluklar nedeniyle karşılanamadığı için enerji açısından bir arz-talep uyumsuzluğuna yol açmaktadır (95, 96). Buna ek olarak, hasarlı dokuda KYD ile ilişkili vazokonstriktif hemodinamik etkiler güçlenmekte ve hipoperfüzyonu kötüleştirmektedir (9, 94, 97). Bu etkiler birleştiğinde metabolik bozukluk derinleşerek doku hasarı artmaktadır (14). Ancak yakın zamanda yapılan bazı çalışmalar KYD'nin iskemi sonrasında peri-enfarkt dokuda zararlı etkiler göstermediğini hatta bazı durumlarda iskemik ön koşullanma ve nöbetleri engelleme yoluyla koruyucu etkileri olabileceğini de öne sürmüştür (29, 98-101) (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. KYD'nin beyindeki metabolik ve hemodinamik etkileri ve bunlar arasındaki etkileşimler. Metabolik açıdan sağlıklı beyinde KYD'nin neden olduğu metabolik ve hemodinamik etkiler hücre ölümüne ve doku hasarına yol açmazken, metabolik açıdan hasarlı beyinde KYD'nin neden olduğu metabolik bozukluklar ve oligemik kan akımı değişiklikleri hücrelerde enerji açısından arz-talep uyumsuzluğu oluşturmakta ve hipoperfüzyonu kötüleştirmektedir. Bu değişikliklere KYD ile ilişkili nöroinflamatuvar cevap da eklendiğinde ek doku hasarına ve lezyon genişlemesine katkıda bulunmaktadır (OMA: Orta meningeal arter; PPE: Plazma protein ekstravazasyonu; TVS: Trigemino-vasküler sistem). (29) numaralı kaynaktan çevrilmiştir.

2.1.3. Migren Patofizyolojisi ve KYD-Aura İlişkisi

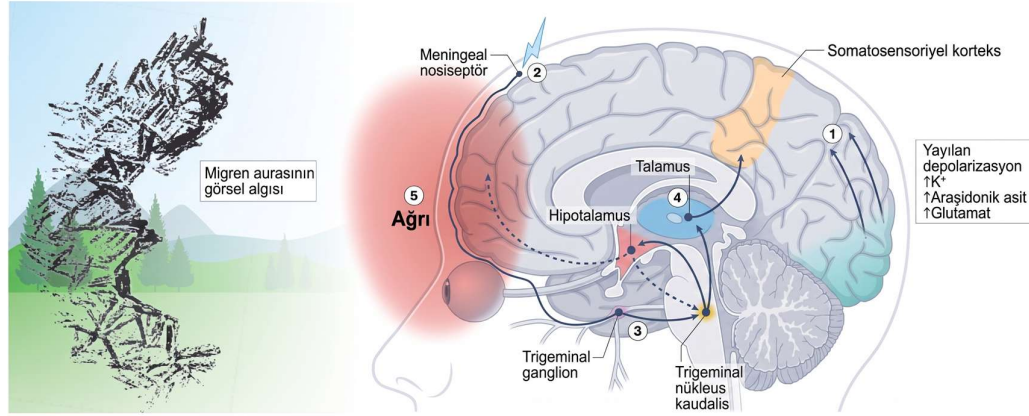
Migren patofizyolojisi henüz tam olarak aydınlatılmamış olsa da migren ağrısının oluşmasında beyinde TVS aktivasyonunun önemli olduğu gösterilmiştir.

Dural damarlar etrafındaki periferik sinir ağları, trigeminal gangliyon nöronları ve beyin sapındaki nükleusların oluşturduğu trigeminoservikal kompleksi (TCC) içeren bu sistem, meninksler, meningeal damarlar, büyük serebral damarlar ve periorbital deri ve kaslardan gelen nosiseptif sinyalleri beyin sapı, hipotalamus ve talamustaki nöronlara iletir (102, 103). Bu bölgelerde gelen sinyallerin işlenmesi, migrende ağrıya eşlik eden duyuşsal, bilişsel ve otonomik semptomların oluşmasında rol oynarken, sinyallerin son olarak duyu korteksi ve çeşitli başka kortikal alanlara iletilmesi migren ağrısı, migrenle ilişkili duyuşsal bozukluklar ve bilişsel bozuklukların ortaya çıkmasında rol oynar (104, 105).

Migren ağrısının oluşumunda TVS aktivasyonu, meninkslerde trigeminal afferentler etrafında oluşan nörojenik inflamasyon ve salınan algojenik bileşikler aracılığıyla gerçekleşebilir. Meningeal damarlarda vazodilatasyon, dural damarlardan plazma proteini ekstrasvazasyonu ve meningeal bağışıklık hücrelerinin aktivasyonu nörojenik inflamasyonun bileşenleridir (106). Meninkslerdeki bu inflamatuvar süreç trigeminal afferentlerin aktivasyonuna neden olmakta ve trigeminal nöronlardan kalsitonin geni ilişkili peptid (CGRP) ve substans P gibi algojenik nöropeptidlerin salınmasına neden olmaktadır (107). CGRP dural afferentler, TVS, talamus, periaqueduktal gri alan (PGA) gibi bölgelerde etki göstererek trigeminal nosiseptif aktiviteyi güçlendirir ve ağrının uzamış seyrinde rol oynar (108). CGRP'nin migren patofizyolojisindeki rolü insan provokasyon çalışmalarında migren hastalarında tutarlı bir şekilde migren atağını tetiklemesi ve CGRP blokajına yönelik tedavilerin migren için klinik etkinlik göstermesi ile pekişmiştir (109, 110). Migren patofizyolojisinde rolü olan başka bir nöropeptid olan pitüiter adenilat siklaz aktive edici peptid (PACAP) proteinin de, CGRP'den bağımsız mekanizmalarla migren ataklarının tetiklenmesinde ve atağa eşlik eden semptomlar ve prodromal belirtilerin oluşmasında rol oynayabileceği gösterilmiştir (111-113). Bu faktörlerle uzamış nosiseptör aktivasyonu zaman içerisinde hem atak sırasında hem de tekrarlayan ataklarda TVS nöronlarının sensitizasyonuna neden olarak atak şiddetinin artmasına neden olabilir (114). Tekrarlayan ataklarla sensitizasyonun daha da ilerleyerek 2. ve 3. sıra trigeminal nöronları ve talamik nöronları da etkilemesi sırasıyla sefalik ve ekstrasfalik allodini gelişmesine neden olabilir ve migrenin zaman içerisinde kronikleşmesinde rol oynar (115).

Migren aurasının altında yatan etkenin KYD olduğu düşünülmektedir. KYD, beyinde etkilediği bölgelerde büyük iyonik değişikliklere neden olarak beyin aktivitesinde geçici baskılanmalara ve beyin kan akımında geçici değişikliklere neden olmaktadır (5, 7, 8). KYD'nin beyin aktivitesinde yarattığı etkiler migren aurası fenomenolojisiyle güçlü bir korelasyon göstermektedir (7, 8, 18). Buna ek olarak görüntüleme çalışmalarında auralı migren hastalarının beyinlerinde aura ve atak sırasında KYD ile uyumlu olarak yayılan bölgesel aktivite ve kan akımı değişiklikleri gözlenmiştir (15, 16). KYD ile aura bağlantısı çeşitli klinik ve deneysel kanıtlarla desteklense de teknik nedenlerden dolayı ve migren atağının doğası gereği henüz migren hastalarında aura sırasında direkt olarak kaydedilmesi mümkün olmamıştır bu yüzden aralarında direkt nedensel bir ilişki kurulamamıştır (8, 18).

KYD'nin auranın yanı sıra migren ağrısının oluşumunda da rol oynayabileceğine dair deneysel kanıtlar bulunmaktadır. KYD'nin beyin parankiminde ve meninkslerde steril inflamatuvar cevap başlatabileceği, meninkslerde nörojenik inflamasyona katkıda bulunarak trigeminal afferentlerin aktivasyonuna neden olabileceği gösterilmiştir (20, 30, 32, 116). KYD bu şekilde deneysel modellerde TVS aktivasyonuna neden olarak spontan ağrı davranışlarına ve periorbital allodiniye neden olabilmektedir (21, 23-25). KYD'nin insanlarda bu etkilerden sorumlu olup olmadığı konusunda bir fikir birliği bulunmamaktadır (8). KYD'nin migren kliniğiyle başka bir bağlantısı, bazı migren önleyici tedavilerin KYD oluşumunu engellemeleri ile kurulmuş ve KYD'nin migren için bir tedavi hedefi olabileceği öne sürülmüştür (8, 35, 117) (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Migren aurası ve ağrısının oluşmasında önerilen KYD aracılı mekanizmalar. KYD'nin görsel kortekste yayılmaya başlamasının görsel aura semptomlarını oluşturabileceği düşünülmektedir. KYD korteks boyunca yayılırken ortaya çıkan alkojenik bileşikler ve inflamatuvar medyatörler, meninkslerde nörojenik inflamasyona ve meningeal nosiseptörlerin aktivasyonuna neden olabilir. Bu süreç TVS aktivasyonunda ve ağrı sinyallerinin talamus aracılığıyla duyu korteksine iletilmesinde rol oynayarak ağrı hissinin oluşumuna neden olabilir. Hipotalamik aktivasyonun da bu sürece katkısı olabileceği düşünülmektedir. (8) numaralı kaynaktan çevrilmiştir.

Migrenin prodromal semptomlarının ortaya çıkmasında ve atak tetiklenmesinde hipotalamusun da rolleri olabileceği düşünülmektedir. Migren ataklarının sirkadyen özellikleri ve dış ortamdaki ışık seviyeleriyle olan bağlantısı hipotalamusu atakların düzenlenmesinde ön plana çıkarmaktadır (118, 119). Buna ek olarak nörogörüntüleme çalışmaları hipotalamusun ataktan önce prodromal fazda erken ve güçlü bir aktivasyon gösterdiği ve bu aktivasyonun atak sırasında da devam ettiği gösterilmiştir. Bu aktivasyon sırasında hipotalamusun spinal trigeminal nükleuslarla fonksiyonel bağlantısının da arttığı görülmüştür (120-122). Bu bulgular hipotalamusun migrenin prodromal belirtilerinin ortaya çıkmasında ve atak tetiklenmesinde rolleri olabileceğine işaret etmektedir.

2.1.4. Migrenin Klinik Özellikleri

Migren tekrarlayan ve tek taraflı, 4 saatten 72 saate kadar sürebilen baş ağrısıyla karakterize bir nörolojik hastalıktır (123). Migren, genel popülasyonun yaklaşık %15'inde görülür ve dünya genelinde 50 yaş altı bireylerde engelliliğin üçüncü en sık sebebidir bu bakımdan yüksek maliyetli iş gücü ve yaşam kalitesi kaybına yol açan önemli kronik nörolojik hastalıklardan biridir (26). Migren kadınlarda erkeklere oranla 3-4 kat daha fazla görülür (124). Migren baş ağrısı,

genellikle tek taraflı, zonklayan şiddetli bir baş ağrısıdır ve hareketle ağrı artabilir. Migren baş ağrısının en ayırt edici özelliklerinden biri genellikle bulantı, kusma, ışığa ve sese aşırı hassasiyet gibi eşlik eden başka semptomlarla beraber görülmesidir (123). Migrenin çok farklı şekilleri olabilse de, baş ağrısına aura eşlik edip etmemesine bağlı olarak 2 ana alt tipe ayrılabilir (123). Migren aurası toplam migren hastalarının yaklaşık üçte birinde gözlenen, baş ağrısından dakikalar önce ortaya çıkan ve bazen ağrıya eşlik eden geçici nörolojik semptomlardır (125). Bu geçici nörolojik semptomlar yüksek oranda görsel semptomlar (ışık çakmaları, skotomlar vb.) olmakla beraber, duyuusal semptomlar (parestezi, bölgesel duyu kaybı), konuşma bozukluğu ve nadiren de geçici motor bozukluklar şeklinde kendini gösterir (126, 127). Bu tipik nörolojik semptomlara ek olarak bazı hastalarda migren aurasının olfaktör halusinasyonlar, derealizasyon ve beyin sisi gibi psikiyatrik belirtilere de yol açabileceği gösterilmiştir (128). Auralı migren hastalarında yüksek oranda aurayı dakikalar içinde baş ağrısı takip eder (127). Ancak auralı migren tanısı almış hastalarda, baş ağrısına aura eşlik etme oranı değişkenlik gösterebilmektedir ve her migren atağında aura gözlenmeyebilir (129). Auralı migren daha yüksek atak sıklığı ve şiddetiyle ilişkilidir ve migrenle bağlantılı komorbiditeler auralı migren hastalarında daha sık görülmektedir (130-132).

Bazı hastalarda migren ataklarına ağrıdan 2-48 saat öncesinde başlayan prodromal faz ve ağrı sonrası çözünme aşamasında postdromal faz eşlik edebilir. Prodromal fazda yorgunluk, aşırı esneme, konsantrasyon bozukluğu gibi nörolojik semptomların yanı sıra gastrointestinal sistemi etkileyen otonomik semptomlar görülebilir (133, 134). Ağrıdan sonraki çözünme aşamasındaki postdromal fazda ise yorgunluk ve bilişsel semptomlar ağrıdan sonra 2 güne kadar devam edebilir (135).

Aktif migreni olan hastalar genellikle ayda en az bir migren atağı geçirirler ve hastaların çoğu atak ve atak-dışı periyotlarla seyreden epizodik migrene sahiptir. Hastaların %5'e kadar olan bir kısmı ise ayda 15 günden daha fazla migren ağrısıyla seyreden kronik migrene sahiptir ve bu grupta tedaviye direnç yüksektir (136).

Migrenin güncel tedavisi atak durdurmaya yönelik tedaviler ve atakları önlemeye ve sıklığını azaltmaya yönelik önleyici tedavilerden oluşmaktadır. Bazı hastalarda hafif ataklarda non-steroid anti-inflamatuar ilaçlar yeterli olabilirken, orta

ve şiddetli ataklarda abortif tedavi olarak en sık triptan grubu ilaçlar kullanılmaktadır (137, 138). Önleyici tedaviler ise çoğunluğu migrene özgü olmayan ve başka endikasyonlarda kullanılan ancak değişen etkinliklerle migren önleyici etkiler gösteren beta blokör, trisiklik antidepresan, anti konvülzan tipinde ilaçlardan oluşmaktadır (139, 140). Yakın zamanda migren patofizyolojisindeki yeri pekişmiş CGRP aracılı mekanizmalara yönelik geliştirilmiş olan CGRP reseptör antagonisti ve CGRP monoklonal antikoru, klasik migren ilaçlarından fayda görmeyen hastalar için abortif ve preventif tedavi seçenekleri olarak kullanıma girmiştir (141, 142).

2.1.5. Deneysel Migren Modelleri

Migren patofizyolojisinin araştırılması ve potansiyel tedavi yöntemlerinin denenmesi için çeşitli deneysel migren modelleri geliştirilmiştir. Migrenin karmaşık ve çok yönlü fenotipini tam anlamıyla tek başına yansıtabilen deneysel bir model bulunmamaktadır ancak her model hastalığın farklı bir yönünü yansıtarak patofizyolojinin anlaşılması için önemli bilgiler sağlamaktadır (143, 144).

Migren patofizyolojisinde TVS aktivasyonu ve nosiseptif sinyallerin daha üst bölgelere aktarılması önemlidir. Migren patofizyolojisini modellemenin en direk yöntemlerinden biri TVS nöronlarının elektriksel olarak uyarılmasıdır (145). Bu uyarılma trigeminal nöronların duradaki afferentleri seviyesinde yapılabileceği gibi trigeminal gangliyonda nöron gövdeleri seviyesinde de yapılabilir (146). Trigeminal nöronların elektriksel olarak uyarılmasının TCC, PAG ve hipotalamusta aktivite artışına neden olduğu ve trigeminal afferent sinir uçlarından CGRP salıverilmesine ve dural damarlarda vazodilatasyona neden olduğu gösterilmiştir (147-149). Elektriksel uyarım modelleri TVS aktivasyonunun direkt etkilerinin görülmesine izin vermesi sayesinde migren tedavilerinin trigeminal etkilerinin ve olası klinik etkinliklerinin test edilmesini sağlamaktadır (150-152). Ancak elektriksel uyarım modellerinin invazif özelliği, güçlü uyarım nedeniyle sadece fizyolojik değerlerin üzerinde ortaya çıkan etkilerin test edilebilmesi ve anestezi altındaki hayvanlarda yapıldığı için davranışların incelenmesine izin vermemesi kısıtlılıklarını oluşturmaktadır (145, 146).

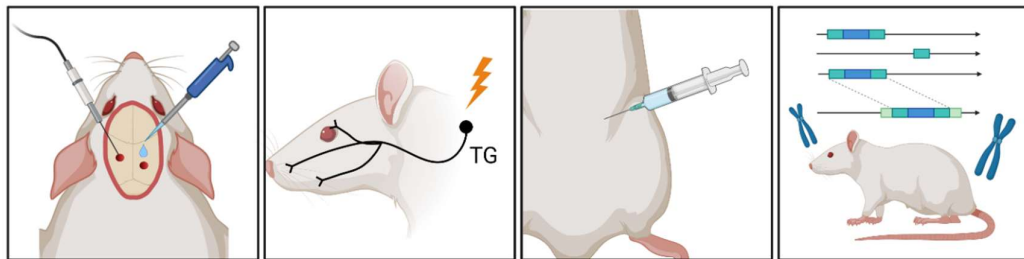
Klinik gözlemlerde migren ataklarını tetiklediği veya migren ataklarını taklit eden semptomlara yol açtığı görülen bazı kimyasal ajanlar, klinik ve prelinik

provokasyon çalışmalarında migren kliniğini modellemek için kullanılmaktadır (153). Bu kimyasal ajanlar arasında en sık kullanılanı nitrogliserindir (NTG) (146). NTG vücutta nitrik oksit donörü olarak etki göstermektedir ve klinik kullanımda yan etki olarak migren benzeri bir baş ağrısına yol açtığı gözlenmiştir (154-156). NTG uygulamasının migren hastalarında spontan migren ataklarına benzer bir atak tetikleyebildiği ve fotofobi, fonofobi ve allodini gibi eşlik eden başka semptomların oluşmasını da sağladığı gösterilmiştir (157, 158). Görüntüleme çalışmalarında NTG uygulaması sonrası migren ile ilişkili TVS, PAG, hipotalamus gibi bölgelerde aktivasyon görüldüğü bildirilmiştir (159). Preklinik modellerde de tek doz NTG uygulamasının hayvanlarda TVS sensitizasyonu, spontan ağrı davranışları ve mekanik allodini gibi migrenle ilişkili belirtilerin ortaya çıkmasını sağladığı gösterilmiştir (160-162). Buna ek olarak tekrarlayan NTG uygulamalarıyla kronik migren de modellenebilmektedir (163). Bu şekilde tekrarlayan NTG uygulamalarının belirgin TVS sensitizasyonuna, uzamış ağrı davranışlarına ve trigeminal nöronlardan CGRP salıverilmesine neden olduğu gösterilmiştir (164, 165). Bu bakımdan NTG uygulaması, migren ataklarını yüksek benzerlikle taklit edebilmesi ve migren tedavilerine migren hastalarındakine benzer şekilde yanıtlar verebilmesi ile migren kliniğini modellemek için yaygın kullanılmaktadır (166). NTG'e ek olarak, migren patofizyolojisinde önemli rolleri olan CGRP ve PACAP gibi nöropeptidler de provokasyon çalışmalarında kullanılmaktadır ve hastaların büyük kısmında migren benzeri ataklar tetikleyebildikleri ve preklinik modellerde TVS sensitizasyonuna neden olabildikleri gösterilmiştir (112, 167, 168).

Migren patofizyolojisinde TVS aktivasyonunda rol oynayan nörojenik inflamasyonu modellemek için dura üzerine inflamatuvar bileşiklerin uygulandığı modeller de geliştirilmiştir (146). Hayvanların kafatasına yerleştirilen bir kanül aracılığıyla histamin, prostaglandin E2 ve bradikinin gibi inflamatuvar bileşikler içeren çözelti direkt olarak dura üzerine uygulanarak nörojenik inflamasyon benzeri bir ortam oluşturulmaktadır (169). Bu modelde akut ve kronik uygulamalar ile daha az invazif yöntemler yardımıyla uyanık hayvanlarda da bu uygulamayı yapmak mümkün olabilmektedir (170). Bu model ile meninkslerdeki inflamatuvar aktivasyonun TVS aktivasyonu ve sensitizasyonu, nöropeptid salıverilmesi ve migren benzeri ağrı davranışlarının oluşumundaki etkilerini incelemek ve migren tedavilerinin bu

değişiklikler üzerindeki etkilerini test etmek mümkün olmaktadır (171, 172). Ancak bu model nörojenik inflamasyon oluşumuna kadar olan basamakları atlaması ve invazif özelliği nedeniyle migren kliniğini modellemek için kısıtlı bir modeldir (173).

Migrenin genetik özelliklerinden yola çıkarak, migren benzeri fenotip oluşturan monogenik mutasyonlarla genetik migren modelleri oluşturulmuştur (174). Bu monogenik migren sebepleri arasında en sık çalışılan Familial Hemiplejik Migren (FHM) modelidir (175). FHM’de şiddetli ataklara ve abartılı aura semptomlarına hemiparezi, ataksi ve epilepsi gibi başka nörolojik semptomlar da eşlik etmektedir (174). FHM fenotipine yol açan 3 farklı mutasyon keşfedilmiştir ve her mutasyon ayrı bir alt tipe neden olmaktadır (176). Bu mutasyonların ortak özelliği sinaptik iletim ve iyon transportunda önemli görevleri olan proteinleri kodlamalarıdır ve mutasyonların etkileri beyinde aşırı uyarılabilir bir ortam yaratarak hastalık belirtilerine neden olduğu düşünülmektedir (177, 178). Bu genlerde keşfedilmiş mutasyonlar gen hedefleme teknolojileriyle deney hayvanlarında da *knock-in* mutasyonlar olarak oluşturulmuş ve transgenik hayvan modelleri elde edilmiştir (179). FHM hayvan modellerinde insanlardakine benzer şekilde hemiparezi, ataksi ve nöbetler gözlenmesinin yanı sıra, artmış KYD yatkınlığı gözlenmiştir (177, 180, 181). Bu hayvanlarda KYD sonrası hemiplejiyle uyumlu anormal davranışlar, jeneralize nöbetler ve abartılı ağrı davranışları gözlenmiştir (182, 183). Daha önemlisi bazı FHM mutasyonlarının hayvanlarda spontan KYD oluşumuna neden olduğu gözlenmiştir. Bu spontan KYD dalgalarının subkortikal yapılardan kaynaklanıp kortekse yayıldığı ve kortekste de aura fenomenolojisini yansıtır biçimde görsel korteksten başlayıp frontale doğru yayıldığı görülmüştür (184, 185). Spontan KYD oluşumu gösteren FHM modelleri, spontan migren ataklarının başlangıç ve sonlanma mekanizmalarının araştırılması için önemli bir prelinik model sunmaktadır (185) (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. Deneysel migren modellerinin şematik gösterimi. Soldan sağa sırayla: Dural trigeminal afferentlerin elektriksel ve kimyasal olarak uyarılması, trigeminal gangliyonun elektriksel olarak uyarılması, sistemik NTG, CGRP ve PACAP uygulamasıyla migren provokasyonu ve monogenik migren modelleri. (TG: Trigeminal gangliyon) (144).

2.1.6. KYD İn Vivo Modelleri

Migren aurasının elektrofizyolojik karşılığı olması nedeniyle KYD auralı migrenin araştırılması için araştırma modeli olarak kullanılmaktadır. KYD'nin migren hastalarında non-invazif ve güvenilir bir şekilde kaydedilmesi ve tetiklenmesi henüz mümkün olmadığı için KYD araştırmaları, KYD'nin dışarıdan bir uyarı verilerek tetiklendiği prelinik deneysel modeller üzerinden yürütülmektedir (8, 18). KYD'nin deneysel çalışmalarda omurgasız ve omurgalı bir çok canlı türünde tetiklenebildiği gösterilmiştir ancak prelinik çalışmalarda en sık kemirgenlerde kullanılmaktadır (186). KYD beyinde yeterince güçlü bir uyarının belirli bir hacimde güçlü bir depolarizasyona yol açması ile tetiklenebilir. Kemirgenlerde bu uyarının 1 mm³ beyin dokusunda en az 12 mM K⁺ artışına yol açan bir depolarizasyon gerektirdiği gösterilmiştir (65). Beyinde bu depolarizasyonun oluşturulması için uyarı olarak kimyasal, elektriksel, mekanik ve optogenetik yaklaşımlar kullanılmaktadır (35).

Kimyasal uyarı olarak en sık potasyum klorür (KCl) uygulaması kullanılmaktadır ve KCl ile beyinde hücre dışı ortamda K⁺ konsantrasyonunun artırılması aracılığıyla KYD tetiklenmektedir (35). KCl kemirgenlerde dura üzerine veya açıkta duran korteks dokusu üzerine topikal olarak uygulanabilir ya da beyin parankimine basınçlı enjeksiyonla uygulanabilir (117, 187). KCl uygulaması deneyleri genellikle hayvanların kafatasına *burr hole* kraniyotomi açılmasını gerektirmektedir. Fareler topikal uygulamayla KCl geçişine izin veren ince bir duraya sahiptir ve deneylerde dura bütünlüğü bozulmadan korunabilir ancak sıçanlar daha kalın bir duraya sahip olduklarından topikal KCl uygulaması için duranın da çıkarılması gerekmektedir (35). Beyine lokal uygulamayla KYD tetiklemek için kullanılabilecek diğer kimyasal ajanlar arasında N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör agonistleri, Na⁺-K⁺-ATPaz pompası blokörleri ve Na⁺ ve Ca⁺² kanal açıcı ilaçlar yer almaktadır (187, 188).

KYD tetiklemesi için gerekli depolarizasyon beyine direk elektriksel uyarı verilmesi ile de sağlanabilir. Korteks içinde yaklaşık 100 µm derinliğe yerleştirilen bipolar uyarı elektrodlarıyla elektriksel uyarı verilmektedir (35). Yeterli yoğunlukta kare akımlarla verilen katodal yük uygulamasıyla elektriksel olarak KYD tetiklenebilmektedir (189). En düşükten başlayarak KYD oluşana kadar verilen uyarının genliği veya süresi belirli aralıklarla artırılarak KYD tetiklemek için gerekli en küçük uyarı şiddeti yani KYD eşiği de belirlenebilir (35).

Mekanik uyarı olarak beyinde küçük bir bölgeye iğne batırılması (*pin prick*) aracılığıyla da yeterli depolarizasyon sağlanabilir. Ancak bu yöntem hem tekrarlanabilir değildir ve uyarı şiddeti titre edilemez, hem de kortekste direkt olarak travmatik hasara neden olmaktadır (37).

KYD araştırmalarında sık kullanılan bu konvansiyonel yöntemler güvenilir bir şekilde KYD tetiklediği bilinen yöntemler olsa da kafatasına kraniyotomi yapılmasını gerektirmeleri, dura ve korteks hasarı, travma ve kanamaya neden olabilmeleri gibi nedenlerden ötürü invazif özelliktedir ve KYD ile ilişkili inflamatuvar cevabın ve ağrı davranışlarının çalışılması açısından önemli karıştırıcı faktörlere neden olmaktadır (35, 37). Bunun aşılması için yakın zamanda yapılan çalışmalarda optogenetik yöntem ile KYD tetiklemesi geliştirilmiştir (38, 39). Optogenetik yöntem *channelrhodopsin* gibi ışıkla aktive olabilen katyon kanallarının istenilen hücre gruplarında ifade ettirilmesi aracılığıyla ışık uyarısı verilerek sadece istenilen hücrelerin aktive edilmesini sağlayan bir yöntemdir (190). Optogenetik yöntemle KYD tetiklemesi için, kortikal 5. katman nöronlarında *channelrhodopsin* ifade eden Thy1-ChR2-YFP genotipine sahip transgenik fareler kullanılmıştır ve bu hayvanlarda sağlam kafatası üstünden 470 nm dalga boylu ışık uyarısı verilmesi ile non-invazif olarak KYD tetiklemesi mümkün olmaktadır (38, 39). Bu şekilde beyine direk erişim gerektirmeden ve beyinde diğer yapıları ve hücreleri etkilemeden sadece nöronal depolarizasyon ile KYD tetiklenebilmektedir. Aynı zamanda, optogenetik uyarım ile gerçek zamanlı ve kontrollü bir uyarı verilebildiği için istenilen sayıda KYD dalgası tetiklenmesi mümkün olmaktadır ve etkileri titre edilebilmektedir (36). Optogenetik yöntemle KYD tetiklemesi, beyin hasarına yol açmaması nedeniyle kronik KYD çalışmaları için ve anestezi altında olmayan uyanık hayvanlarda da KYD tetiklemesine

izin vererek KYD ile ilişkili davranışların çalışılması için en uygun yöntemdir (38, 39).

Tetiklenen KYD çeşitli yöntemlerle saptanabilir. KYD beyne yerleştirilen elektrodlarla alternatif veya doğru akım ölçümlerinde sırasıyla hızlı ve yavaş potansiyel değişiklikleriyle ve elektrokortikogramda spontan beyin aktivitesinin baskılanmasıyla elektrofizyolojik olarak saptanabilir (35). Kafatası üzerinden yapılan elektrod kayıtlarıyla da KYD ile ilişkili doğru akım potansiyel değişiklikleri kaydedilebilmektedir (191). Buna ek olarak KYD beyin kan akımında yol açtığı karakteristik değişiklikler ile de saptanabilir. Lazer Doppler ve lazer *speckle* görüntülemeleriyle KYD ile ilişkili beyin kan akımı değişiklikleri kaydedilebilmektedir (192, 193). Kan akımı değişikliklerinin doku ışık emiliminde değişikliklere neden olması sayesinde özel kamera kayıtlarıyla optik içsel sinyaller kaydedilerek KYD saptanması da mümkün olmaktadır (194).

Preklinik KYD modelleri dışarıdan uyarı verilerek hayvanlarda KYD tetiklemesine dayanmaktadır. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda monogenik migren nedeni FHM mutasyonlarına sahip hayvanlarda spontan KYD oluşumu gerçekleştiği gösterilmiştir (184, 185). Spontan KYD dalgalarının kortekste görsel korteksten başlayarak frontale doğru yayıldığı ve subkortikal yapıları da etkilediği görülmüştür (185). Bu şekilde spontan KYD oluşumunun gözlenen FHM modelleri, migren ataklarının başlangıç mekanizmalarının araştırılması için önemli bir araç sunmaktadır (185).

2.1.7. KYD, Nöroinflamasyon ve TVS

KYD, beyinde neden olduğu metabolik ve hemodinamik değişikliklerle nöronlar ve gliya hücrelerine metabolik bir yük bindirmektedir ve hücresel strese neden olmaktadır (7). Metabolik açıdan sağlam beyinde KYD'nin neden olduğu hücresel stresin hücre ölümü ve doku hasarına neden olmadığı bilinmektedir (7, 93). Ancak bu hücresel stresin beyinde nöronlar ve gliya hücrelerinde steril inflamatuvar cevap başlatabildiği gösterilmiştir (20, 29, 195).

KYD sonrası beyin parankiminde IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-13, TNF- α , siklooksijenaz (COX)-2 ve indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) gibi çok çeşitli inflamatuvar medyatörlerin salındığı gösterilmiştir. Inflamatuvar medyatörlerdeki bu artışın KYD'den sonra 3 saat içinde oluşmaya başladığı, 24 saatte maksimuma ulaştığı ve 72 saate kadar devam edebildiği gösterilmiştir (20, 196-199). KYD ile ilişkili nöroinflamasyonun nöronlarda Panx1 megakanallarının açılması ile başladığı gösterilmiştir (20). Panx1 kanalının açılmasının hızlı bir şekilde kaspaz-1 aktivasyonuna neden olduğu ve aktive kaspaz-1'in nöronlardan IL-1 β ve HMGB1 salınmasına neden olduğu gösterilmiştir (20). HMGB1 bir alarmin molekülüdür ve normalde nöronların nükleusunda bulunur ancak hücre stresine neden olan durumlarda nükleustan çıkar ve hücre dışına salındığında çevre hücrelerde inflamatuvar aktivasyona neden olabilir (200). Nöronlardan salınan HMGB1 molekülünün daha sonrasında astrositlerde NF- κ B yolağı aktivasyonuna neden olarak astrositlerden de inflamatuvar medyatörlerin salınmasına ve mikrogliyal aktivasyona neden olduğu gösterilmiştir (20, 28). Panx1 kanalının nöronlarda inflamatuvar cevabı başlatmasında purinerjik reseptör P2X7 ile oluşturduğu por kompleksinin önemli olduğu görülmüştür ve bu kompleksin oluşumunun inhibe edilmesi KYD sonrası inflamatuvar cevabın başlamasını engellemiştir (191, 201). Panx1 kanalının açılması sonrasında inflamazom aktivasyonunun da KYD sonrası inflamatuvar cevabın oluşumunda rolleri olabileceği gösterilmiştir (20, 195). KYD sonrası NLRP3 inflamazomunun nöronlarda aktive olduğu ve nöronlardaki kaspaz-1 aktivasyonu ve HGMB1 ve pro-inflamatuvar sitokinlerin salınmasından sorumlu olduğu görülmüştür. KYD sonrası NLRP3 inflamazomu aktivasyonunun beyinde sadece nöronlarda görüldüğü ve astrosit ve mikrogliyalarda aktive olmadığı gösterilmiştir (27).

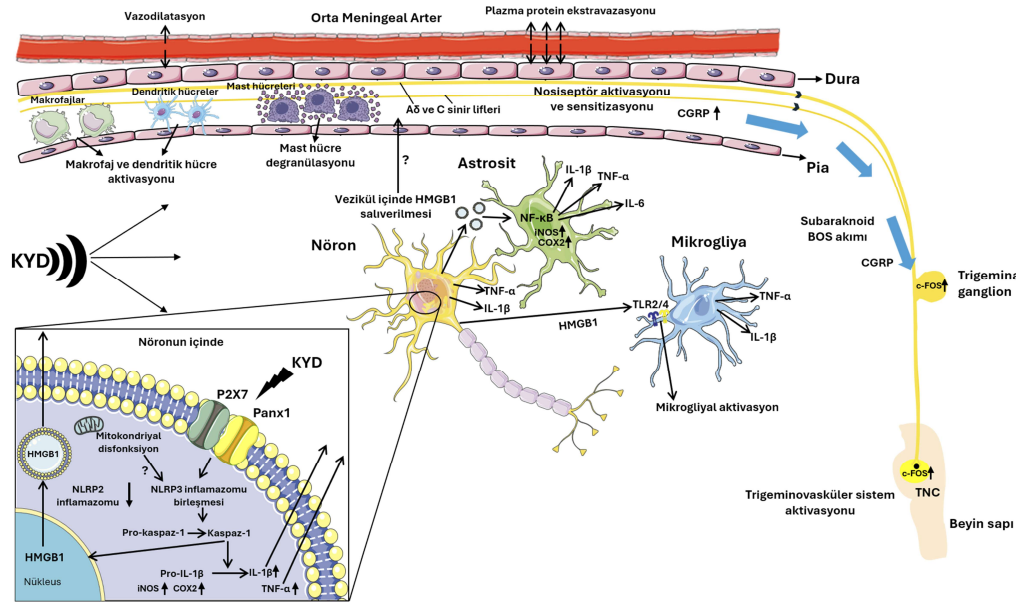
KYD ile inflamasyon ilişkisini inceleyen çoğu çalışma KYD tetikleme yöntemi olarak beyne elektriksel, kimyasal veya mekanik uyarı uygulanan konvansiyonel yöntemleri kullanmıştır. Bu yöntemler sık kullanılan ve güvenilir bir şekilde KYD tetiklediği bilinen yöntemler olsa da kafatasına kraniyotomi yapılmasını gerektirmeleri, dura hasarı, travma ve kanamaya neden olabilmeleri gibi nedenlerden ötürü KYD ilişkili inflamasyonun incelenmesi açısından son derece önemli karıştırıcı faktörler oluşturmaktadır (36, 195). Bunun aşılması için yakın zamanda yapılan çalışmalarda optogenetik olarak KYD tetiklemesi geliştirilmiştir (38, 39). Beyinde

optogenetik yöntemle tetiklenen tek KYD sonrası da inflamatuvar medyatörlerin ifadesinde artış görülmüştür. Bu bulgular sayesinde inflamatuvar aktivasyonun deneysel faktörlerden ziyade KYD'nin kendi etkisi olduğu kanısı güçlenmiştir (27, 191, 202). KYD ile ilişkili inflamatuvar cevabın tek KYD dalgası sonrası başlayabildiği gösterilmiş olsa da bazı inflamatuvar medyatörlerin seviyelerinde çoklu KYD dalgaları sonrası daha belirgin artışlar görülmüştür (202). Özellikle HMGB1 molekülünün çoklu KYD sonrasında nöronlardan salınmasında belirgin artış olduğu görülmüştür. Çoklu KYD sonrası nöronlardan salınan HMGB1 molekülünün daha sonrasında mikrogliyalarda *toll-like receptor* (TLR) 2/4 reseptörleriyle etkileşime girerek mikrogliyal aktivasyonda rol oynadığı görülmüştür. Ancak bu mikrogliyal aktivasyon tek KYD sonrasında oluşmamıştır (28).

KYD'nin başlattığı inflamatuvar cevabın meninksleri de etkilediği ve meninkslerde nörojenik inflamasyonun oluşmasında rol oynadığı gösterilmiştir. KYD meninkslerde yerleşik makrofaj ve dendritik hücrelerin aktivasyonuna ve mast hücrelerinin degranülasyonuna neden olmaktadır (31, 32). Bu şekilde orta meningeal arterde vazodilatasyon ve plazma protein ekstrasvazasyonu gibi nörojenik inflamasyonun temel belirtileri ortaya çıkabilmektedir (19, 20, 30). Beyin parankiminde başlayan inflamatuvar cevapta salınan inflamatuvar medyatörlerin meninkslere direkt diffüzyonu veya HGMB1 alarmin molekülünün meninkslere geçişi aracılığıyla meninkslerdeki inflamatuvar değişikliklere katkıda bulunabileceği öne sürülmüştür (106, 203, 204). Bunu destekler biçimde kortekste HMGB1 salıverilmesinin, Panx1 kanallarının açılmasının ve NLRP3 inflamazomu aktivasyonunun engellenmesi, meninkslerdeki inflamatuvar cevabı hafifletmektedir (20, 27, 205).

KYD'nin meninkslerdeki inflamatuvar değişikliklere katkıda bulunarak TVS aktivasyonuna yol açabileceği ve migren ağrısının oluşumunda rol oynayabileceği düşünülmektedir. Aura ve ağrı arasındaki ilişkiye benzer şekilde KYD sonrası dakikalar içinde meninkslerde trigeminal afferentlerin aktive olabileceği gösterilmiştir (19). KYD sonrası erken dönemde oluşan nosiseptör aktivasyonunun trigeminal nöronlarda daha uzun süreli aktivite artışına yol açabileceği ve trigeminal nöronların sensitizasyonunu sağlayarak CGRP salınmasına neden olabileceği gösterilmiştir (27,

33). KYD sonrası korteksteeki inflamasyonun inhibe edilmesi de KYD sonrası TVS aktivasyonunu engelleyerek parankimal inflamatuvar değişikliklerin önemini vurgulamıştır (20, 27, 205) (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. KYD ile ilişkili parankimal ve meningeal inflamatuvar cevapların ve TVS aktivasyonundaki rolünün şematik olarak özetlenmesi (KYD: Kortikal yayılan depolarizasyon, Panx1: Pannexin-1, P2X7: Pürinerjik reseptör 2X7, HMGB1: *High mobility group box 1*, NLRP3: *NOD-like receptor family pyrin domain containing 3*, iNOS: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz, COX2: Sikloksijenaz 2, IL-1β: İnterlökin-1β, TNF-α: Tümör nekroz faktörü, NF-κB: Nükleer faktör-κB, TLR2/4: Toll benzeri reseptör 2/4, CGRP: Kalsitonin geni ilişkili peptid, TNC: Trigeminal nükleus caudalis). (29) numaralı kaynaktan çevrilmiştir.

KYD tarafından tetiklenen TVS aktivasyonunun kemirgenlerde migren benzeri ağrı davranışlarına neden olduğu gösterilmiştir. Optogenetik yöntemle tetiklenen KYD'nin 1 saat içinde periorbital bölgede mekanik allodiniye neden olabildiği ve tekrarlayan KYD dalgalarıyla allodininin 14 güne kadar devam edebildiği gösterilmiştir (23, 24, 34). Allodiniye ek olarak, artmış kafa bakımı, ağrıyla ilişkili yüz mimikleri ve artmış anksiyete davranışı gibi baş ağrısıyla ilişkili diğer davranışlar da optogenetik KYD sonrası artış göstermiştir (23, 25).

2.2. cGAS-STING Yolağı

2.2.1. cGAS-STING Yolağı ve Aktifleşme Mekanizmaları

cGAS–STING yolağı evrimsel olarak birçok türde korunmuş, hem patojen enfeksiyonuna karşı korunmada hem de doğal inflamatuvar süreçlerde rol oynayan bir doğal bağışıklık sistemi yolağıdır (40, 41). cGAS-STING yolağı patojen enfeksiyonu veya hücre hasarı ilişkili olarak sitoplazmada bulunan serbest çift zincirli DNA moleküllerini tanıyarak aktive olur ve buna karşılık tip 1 interferon (IFN α ve IFN β) aracılı güçlü bir doğal immün sistem cevabı geliştirir (40, 42). DNA bu durumda cGAS-STING yolağı için hem patojen ilişkili hem de hasar ilişkili moleküler desen olarak fonksiyon göstermektedir ve cGAS-STING yolağı tür ve köken fark etmeksizin çift zincirli DNA'yı (*dual stranded* DNA, dsDNA) tanıyabilmektedir bu bakımdan viral DNA, bakteriyel DNA ve hücrenin kendi nükleer ve mitokondriyal DNA'sı cGAS-STING yolağını aktifleştirebilmektedir (40, 44, 206). Yolak aktivasyonunu başlatıcı faktör, cGAS enziminin sitoplazmada bulunan dsDNA'yı tanınmasıdır. cGAS enzimi belirli bir uzunluğun üstündeki dsDNA moleküllerine bağlanarak dsDNA üzerinde merdiven benzeri yapılar oluşturan kompleksler kurar ve bu cGAS-DNA kompleksi katalitik aktivite kazanarak ATP ve GTP'den 2'3' siklik GMP–AMP (cGAMP) üretmesini sağlar (207, 208). Bu ikincil mesajcı molekül STING'in potent bir agonistidir (207). 2'3' cGAMP'in endoplazmik retikulum (ER) membranında yer alan STING'e bağlanması konformasyonel değişikliklere yol açarak oligomerizasyona gitmesini sağlar ve STING'i aktifleştirir. Aktifleşen STING ER membranından ayrılarak *ER–Golgi intermediate compartment* (ERGIC) aracılığıyla Golgi veziküllerine girer. STING Golgi veziküllerinde '*TANK-binding kinase 1*' (TBK-1) proteinine kenetlenerek onu fosforile eder ve alt sinyal iletimini başlatır. Fosforile TBK-1, daha sonrasında *interferon regulatory factor 3* (IRF3) transkripsiyon faktörünü fosforile eder ve dimerize olup aktive olmasını sağlar. Aktive olmuş IRF-3 çekirdeğe girer ve burada tip-1 interferon, interferonla uyarılmış genler ve başka inflamatuvar medyatörlerin ekspresyonunu artırır (44, 209, 210). cGAS-STING yolağının aktive ettiği immün cevaplar sadece tip 1 interferonlarla sınırlı değildir. Aktive STING, NF- κ B sinyal yolağı ve NLRP3 inflamazomu aktivasyonuna da neden olabilir ve pro-inflamatuvar sitokin sentezini başlatabilir (43, 211, 212). STING aktivasyonunun neden olduğu transkripsiyonel çıktılar ve aktive olan yolaklar, aktivasyonun türüne, hücre tipine ve *in vivo* bağlama göre farklılıklar göstermektedir (41, 213, 214). Yolağın inaktivasyon mekanizmaları aktive STING'i Golgi

interferon cevabına ek olarak STING'in anti-viral ve anti-mikrobiyal etkilerinde NF- κ B sinyali aracılı pro-inflamatuar cevabın önemli olduğu görülmüştür (43, 211). cGAS-STING-IFN aksının *absent in melanoma 2* (AIM2) ve NLRP3 inflamazom kompleksleriyle olan karşılıklı etkileşimlerinin inflamatuvar hücre ölümü olan piroptoz gelişiminde rolleri olduğu ve bağışıklık yanıtına bu şekilde de katkıda bulunabileceği gösterilmiştir (219-222).

cGAS-STING yolağının hücreler arasında yaygın inflamatuvar cevap oluşturmasında, yolak aktivasyonunda önemli rol oynayan 2'3' cGAMP ikincil mesajcı molekülün hücreler arasında bir "immünotransmitter" gibi geçiş yaparak cGAS-STING yolağı aktivasyonunun çevre hücrelere yayılmasını sağlaması önemli bir mekanizmadır (223). cGAS-STING yolağı aktive olan hücrelerden hücre dışına salınan veya ölen hücrelerden etrafa saçılan 2'3' cGAMP, bir anyon kanalı olan LRCC8 ve bir transmembran folat reseptörü olan SLC19A1 gibi non-spesifik kanallar aracılığıyla çevre hücrelere geçebilmektedir (224-226). Hücreler arası 2'3' cGAMP transportuyla cGAS-STING yolağı aktivasyonunun, yolağın immünolojik etkilerinin oluşmasında etkili olduğu görülmüştür (227). Ancak hücre dışı ortamda *ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 1* (ENPP1) enzimi 2'3' cGAMP yıkımını sağlayarak bu etkiyi sınırlandırmaktadır bu bakımdan bu mekanizma daha çok parakrin etki göstermektedir (227, 228).

cGAS-STING yolağı aracılı inflamasyon patojenlere karşı korunmanın yanı sıra, hücrelerin kendi DNA'sına karşı aşırı bir bağışıklık cevabı geliştirerek sistemik otoimmün hastalıklarda da rol oynamaktadır. DNA'nın immünojen olarak davrandığı en tipik otoimmün hastalıklardan biri olan sistemik lupus eritematozusda (SLE) bunun örnekleri görülmektedir. SLE hastalarından elde edilmiş serumda artmış 2'3' cGAMP seviyeleri gözlenmiştir bu da cGAS aktivitesinin arttığını göstermektedir (45). Buna ek olarak SLE hastalarından toplanan serumun STING aktivasyonuna neden olarak tip 1 interferon cevabını arttırdığı gösterilmiştir (229). Romatoid artrit hastalarında da sinoviyal inflamasyonda, sinoviyositlerde sitozolik dsDNA birikimi ve cGAS-STING aktivasyonu aracılığıyla oluşan inflamatuvar cevabın önemli olduğu ve cGAS ve STING nakavtıyla inflamatuvar sitokinlerin azaldığı gösterilmiştir (46).

cGAS-STING yolağı aktivasyonunun tümör immünolojisinde de rolleri olduğu ortaya çıkarılmıştır ve cGAS-STING yolağı kanser immunoterapisinde translasyonel bir öneme sahiptir. cGAS-STING yolağı kanser hücrelerinde görülen DNA hasarı ve dsDNA'nın sitoplazmaya sızması sonucu aktifleşip tip 1 interferon cevabı oluşturabilir ve antitümöral T hücrelerinin yetişmesine katkı sağlar (230). cGAS-STING yolağının radyasyonla tetiklenmiş ve doğal antitümör T hücre cevabı için gerekli olduğu da gösterilmiştir (47). STING agonisti olan DMXAA ve 2'3' cGAMP gibi siklik dinükleotitler anti-kanser aşı çalışmalarında deneysel olarak etkili görülmüştür (48, 231). cGAS-STING yolağının kısa süreli aktifleşmesi kanser tedavisi açısından yararlı gözükürken, kronik ve aşırı aktifleşmesinin tümörjenik duruma katkı sağladığı görülmüştür. STING'in kronik aktifleşmesi programlanmış ölüm ligandı (PDL-1) ve indolamin 2,3-dioksijenaz 1 (IDO1) gibi bağışıklık sistemi inhibitörü moleküllerin seviyesini artırabilir ve T hücrelerinde pro-apoptotik etki göstererek tümöre oluşan bağışıklık cevabını sekteye uğratabilir (232, 233). Tümöre yönelik bağışıklık cevaplarını etkilemesinin yanında cGAS-STING yolağı aktifleşmesinin tümörlerde epitelyal mezenkimal dönüşümü desteklediği ve metastaz yapmalarını kolaylaştırdığı da gösterilmiştir (234). Buna rağmen, intratümoral STING agonistleri verilmesiyle tümör damarlarının değişikliğe gittiği ve normalleşmeye başladığı, damarlardaki perisit kapsamının arttığı, daha sağlam bir bazal membran oluşarak efektör CD8+ T hücrelerinin tümöre infiltrasyonunun arttığı ve tümör mikro-çevresindeki hipoksinin de azaldığı gösterilmiştir (235).

cGAS-STING yolağının bağışıklık cevaplarındaki rolleri sadece inflamatuvar medyatörlerin transkripsiyonunu düzenlemesiyle sınırlı değildir. cGAS-STING yolağının otofajiyle yakın ilişkili olduğu ve yolak aktivasyonunun hızlı bir şekilde otofajiyi aktive edebileceği gösterilmiştir (236-238). Otofaji bileşenleri de hücrede STING trafiğini ve lizozomal yıkımını düzenleyerek cGAS-STING yolağı aktivitesini etkileyebilmektedir (239, 240). Bunun dışında hücrelerde yüksek cGAS-STING yolağı aktivasyonunun hücre senesansına neden olabildiği ve apoptoz ve nekroptoz gibi hücre ölümü mekanizmalarını tetikleyebileceği gösterilmiştir (233, 241, 242).

2.2.3. cGAS-STING Yolağının Nörolojik Hastalılardaki Rolü

cGAS-STING yolağının çeşitli nörolojik hastalıklarda nöroinflamasyona katkıda bulunarak önemli roller oynadığı gösterilmiştir. Özellikle nörolojik enfeksiyonlar, nöroinflamatuvar hastalıklar, iskemi, travma ve nörodejeneratif hastalıklarda cGAS-STING yolağının rolü gösterilmiştir (41, 49).

DNA virüsü olan Herpes Simpleks Virüs-1 (HSV-1)'in yol açtığı ensefalitte beyinde mikrogliya hücrelerinin cGAS-STING yolağı üzerinden tip 1 interferon cevabı yürüttüğü gösterilmiştir. cGAS ve STING delesyonu yapılmış farelerde HSV-1 ensefaliti sonucu nörolojik semptomların kötüleştiği, viral yükün arttığı ve sağ kalımın azaldığı gösterilmiştir (243). Aynı çalışmada HSV-1 enfeksiyonu sırasında tip 1 interferonların temel üreticisinin mikrogliyalarda olduğu gösterilmiş ve fizyolojik cGAS ve STING ifadesinin mikrogliyalarda nöron ve astrositlere oranla daha zengin olduğu saptanmıştır. STING bağımlı olarak mikrogliyalarda üretilmiş tip 1 interferonların beyindeki anti-viral cevabı yönettiği ve nöronlarda HSV-1 replikasyonunu engellediği ve astrositlerde de tip 1 interferon cevabı başlattığı gösterilmiştir (243).

Genetik nedenli nöroinflamatuvar bir hastalık olan Aicardi-Goutieres sendromu ağır inflamasyon, beyaz madde kaybı ve mental geriliklerle karakterize genetik ensefalopati sebebidir. Bu sendrom self-DNA'nın sitoplazmada birikmesini engelleyen ekzonükleaz *three prime repair exonuclease 1 (TREX-1)* genindeki mutasyondan kaynaklanmaktadır (244). Bu sendromdaki aşırı inflamasyonun cGAS aracılı olduğu ve *TREX-1* delesyonu yapılmış farelerde ek olarak cGAS delesyonu da yapıldığında interferon cevabının ve inflamatuvar sitokinlerin azaldığı gösterilmiştir (245). İnflamasyonun direkt olarak cGAS aracılı olduğunun gösterilmesi üzerine cGAS'in küçük molekül inhibitörü olan RU.521'i geliştirilmiştir (51). *TREX-1* delesyonu olan farelerden elde edilen makrofajlarda yapılan çalışmalarda RU.521'in tip 1 interferon seviyelerini azalttığı gösterilmiştir. RU.521'in cGAS'e spesifik olduğu ve retinoik asit ile indüklenebilir gen I (RIG-1) ve TLR gibi diğer doğal immün sistem yollarını etkilemediği de gösterilmiştir (51). En yaygın görülen ve engelliliğe sebep olan nörolojik hastalıklardan biri olan multipl skleroz (MS), demyelinizasyonla ve ciddi nörolojik defisitlerle seyreden bir nörolojik hastalıktır. Klinikte MS'in profilaktik tedavisinde interferon betanın uzun zamandır kullanılıyor olması, MS patofizyolojisinde tip 1 interferonların yerini göstermektedir ve cGAS-STING aracılı

mekanizmalara işaret etmektedir (246). MS'in prelinik modeli olan Deneysel Otoimmün Ensefalomyelit (DOE) modelinde STING'in upregüle olduğu görülmüştür (247). DOE yapılmış hayvanlara anti-viral etkili nükleozit analogu Gansiklovir verildiğinde bu STING upregülasyonunun engellendiği, mikrogliyal proliferasyonun inhibe edildiği, inflamatuvar genlerin baskılandığı ve DOE hastalık progresyonunun hafiflediği saptanmıştır. Aynı zamanda Gansiklovirin mikrogliyalarda STING aracılı olarak tip 1 interferon cevabını arttırdığı ve nöroinflamasyonu hafiflettiği de gösterilmiştir (50). Bu çelişkili sonuçlar STING aktifleşmesinin çok yönlü etkileri olduğunu ve bazı durumlarda terapötik etkisi olabilecekken bu yolağın aşırı aktifleşmesinin ağır inflamatuvar durumlara da yol açabileceğini göstermektedir (50, 51, 245).

cGAS-STING yolağı aşırı aktifleşmesinin abartılı nöroinflamasyona ve doku hasarına yol açması özellikle iskemik ve travmatik beyin hasarına yol açan durumlarda gözlenmiştir. İskemik inme, subaraknoid kanama ve travmatik beyin hasarı modellerinde, birincil doku hasarından sonra 24-72 saat içerisinde cGAS-STING yolağında belirgin aktivasyon görüldüğü bildirilmiştir (54, 55, 248). Birincil doku hasarı sırasında ölen hücrelerden salınan dsDNA'nın mikrogliyalardan tarafından temizlenmesi sırasında mikrogliyalarda cGAS-STING yolağı aktivasyonuna yol açması sayesinde bunun gerçekleştiği görülmüştür (248, 249). Bununla uyumlu olarak mikrogliyalarda iskemik hasar sonrası inflamatuvar aktivasyon ve M1 polarizasyona geçiş görülmüştür ve STING inhibisyonu bu engellenerek mikrogliyalarda M2 polarizasyonu desteklenmiştir (248, 249). cGAS veya STING'in farmakolojik inhibisyonu ve genetik nakavtının lezyon büyüklüğünü azalttığı, nöronal apoptozu hafiflettiği ve fonksiyonel nörolojik çıktılarda iyileşme sağladığı görülmüştür (54, 56, 57, 222, 249). Bu bulgular iskemik ve travmatik beyin hasarı sonrası beyinde aşırı cGAS-STING yolağı aktivasyonunun ikincil doku hasarına katkıda bulunduğunu göstermiştir.

cGAS-STING yolağının nörodejeneratif hastalıklarda mitokondriyal mekanizmalar ve mitokondriyal DNA (mtDNA) üzerinden önemli roller oynadığı gösterilmiştir (53). Ailevi Parkinson hastalığı sebeplerinden olan ve bozulmuş mitofajiye neden olan *PARKIN* ve *PINK1* mutasyonlarına sahip farelerin nöronlarında

mtDNA'nın sitozolde biriktiği ve STING aracılı olarak inflamatuvar sitokinlerde artış gözlemlendiği bildirilmiştir. STING delesyonunun *PARKIN* mutasyonuna sahip yaşlı farelerde nöron kaybını ve motor defisitleri azaltabildiği görülmüştür (250). Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) prelinik modellerinde de motor nöronlarda artmış STING ifadesi ve pro-inflamatuvar sitokin sentezi gözlenmiştir. Motor nöronlarda STING delesyonunun nöroinflamasyonu azalttığı, hastalık ilerlemesini yavaşlattığı ve erken ölüm için koruyucu etki gösterdiği görülmüştür (251). Mitokondriyal disfonksiyonun patofizyolojide önemli bir rol oynadığı Alzheimer hastalığının transgenik fare modellerinde de beyinde cGAS ve STING ifadesinde artış görülmüştür (252). İlginç bir şekilde bu farelerde STING agonisti 2'3' cGAMP'in deri altına yerleştirilen ozmotik bir pompa yardımıyla kronik olarak uygulanmasının Alzheimer patolojisini azalttığı ve davranışsal çıktılarda düzelme sağladığı gösterilmiştir (52). Nörolojik hastalıklarda cGAS-STING yolağı aktivasyonunu hangi durumlarda koruyucu veya zararlı etki gösterdiği henüz tam olarak aydınlatılmamıştır ve çalışmalar devam etmektedir (53).

2.2.4. cGAS-STING Yolağının Nosisepsiyon Üzerine Etkileri

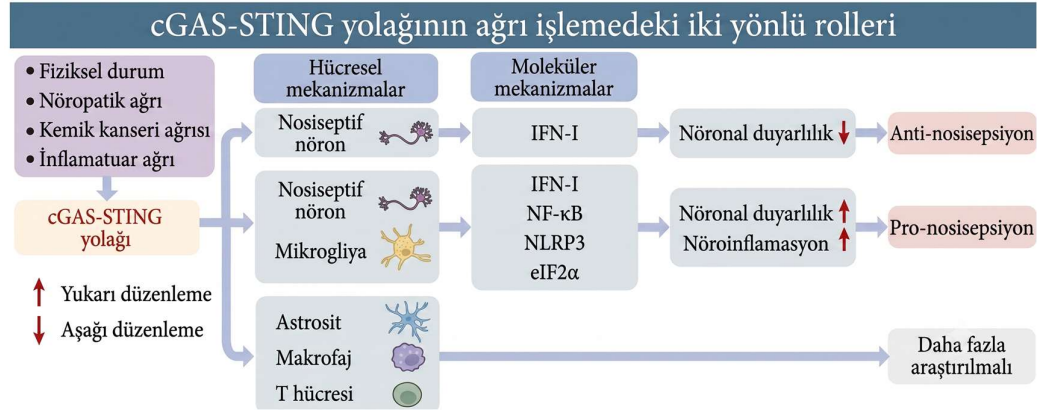
cGAS-STING yolağının nosisepsiyonu düzenleyebildiği çeşitli ağrı modellerinde gösterilmiştir. Yolak aktivasyonunun bağlama bağlı olarak pro-nosiseptif veya anti-nosiseptif etkileri olduğu görülmüştür (62).

STING agonisti uygulamasının farelerde ağrı hassasiyetini hızlı bir şekilde azalttığı görülmüştür. Bu etkinin 4 saat içinde maksimuma ulaştığı ve 48 saate kadar sürebildiği gösterilmiştir. Dorsal kök gangliyonu duyu nöronlarında koşullu STING ve tip 1 interferon reseptörü nakavtının ise ters etki göstererek mekanik ve soğuk uyarıya karşı ağrı hassasiyetini artırdığı görülmüştür (58). Görülen bu etkinin duyu nöronlarından salınan interferonların otokrin ve parakrin etkilerle tip 1 interferon reseptörü sinyali üzerinden nöronlarda sodyum ve kalsiyum kanal aktivitesinde azalmaya yol açarak nöronal uyarılabilirliği azaltmasına bağlı olarak olduğu gösterilmiştir (58, 253). Kanseri ile ilişkili kemik ağrısı ve kemoterapi ile indüklenmiş nöropatik ağrı modellerinde STING agonisti uygulamasının hızlı ve güçlü bir analjezi sağlayabildiği saptanmıştır (58, 59, 253). STING agonistlerinin analjezik etkisinin neredeyse morfin kadar güçlü olduğu ve tekrarlayan uygulamalarla tolerans

gelişmediği gözlenmiştir (58). Elde edilen bu bulgularla cGAS-STING yolağı aracılı immünomodülasyonun ağrı bozukluklarının tedavisinde büyük potansiyeli olduğu vurgulanmıştır.

cGAS-STING yolağının bazı durumlarda pro-nosiseptif etkileri olabileceği de bulunmuştur. Periferik sinir hasarı ve spinal kord hasarı ile oluşturulan nöropatik ağrı modellerinde cGAS-STING yolağının spinal kordda nöronlarda ve mikrogliyalarda aktive olduğu gösterilmiştir (61, 254). Mikrogliyalardaki cGAS-STING yolağı aktivasyonunun uzun süre devam ettiği ve mikrogliyalarda M1 polarizasyona geçişe ve pro-inflamatuar sitokin salıverilmesine neden olarak hiperaljeziye katkıda bulunduğu saptanmıştır (60). Hasar sonrası erken dönemde cGAS veya STING antagonistlerinin uygulanmasının pro-inflamatuar değişiklikleri azaltarak hiperaljeziyi hafiflettiği gösterilmiştir (60, 61). Benzer şekilde kanser ile ilişkili kemik ağrısı modelinde hem spinal kordda hem de kortekste uzamış cGAS-STING yolağı aktivasyonunun mikrogliyalarda M1 polarizasyona geçişe neden olduğu ve STING antagonisti uygulamasıyla bunun geri döndürülerek hiperaljezinin ve ağrı ile ilişkili anksiyete davranışının azaltılabildiği saptanmıştır (255).

cGAS-STING yolağının nosisepsiyon üzerinde gösterdiği etkilerin, yolağın aktivasyon derecesi, akut veya kronik seyri ve etkilenen hücre tiplerine bağlı olarak farklılık gösterebileceği görülmüştür. Yolak aktivasyonunun akut dönemde tip 1 interferon sinyaliyle duyu nöronlarını etkileyerek nöronal uyarılabilirliği azaltılabileceği ve anti-nosiseptif etkiler gösterebileceği gösterilmiştir (58, 253). Ancak cGAS-STING yolağının daha uzun vadeli aktivasyonunun mikrogliya aktivasyonuna neden olarak pro-inflamatuar etkiler gösterdiği ve duyu nöronlarının sensitizasyonuna neden olarak hiperlajezi gelişimine katkıda bulunduğu da saptanmıştır (60, 61, 255). Bu bilgiler ışığında, cGAS-STING yolağının nosisepsiyon üzerinde doz, zamanlama ve hücre tipi spesifik etkilerinin daha detaylı aydınlatılması gerektiği düşünülmüştür (62) (Şekil 2.7.).



Şekil 2.7. cGAS-STING yolağının nosisepsiyon üzerindeki iki yönlü etkilerinin şematik anlatımı (IFN-I: Tip 1 interferon, NF-κB: Nükleer faktör-κB, NLRP3: *NOD-like receptor family pyrin domain containing 3*, eIF2α: *Eukaryotic initiation factor 2α*). (62) numaralı kaynaktan çevrilmiştir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Hayvanlar

Bu çalışmada 25-35 gr ağırlığında 8-12 haftalık dişi ve erkek 78 adet C57BL6/J (Thy1-ChR2-YFP^{+/+}) ve 64 adet C57BL6/J (yabanıl tip) fare kullanılmıştır. Hayvanlar standart barınma koşullarında, aynı cinsiyetten hayvanlar aynı kafeste olacak şekilde, 12 saat aydınlık karanlık döngüsünde, 22±2 °C sıcaklıkta, %50-60 nem oranında, yiyecek ve suya serbest erişecek şekilde barındırılmıştır. Tüm çalışmalar Hacettepe Üniversitesi Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü Beyin Araştırmaları Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Deneyler Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (2021/67 ve 2023/47). Hayvanlar deney gruplarına rastgele atanmıştır (Tablo 3.1.).

Tablo 3.1. Deney ve kontrol gruplarında kullanılan hayvan sayıları.

Deney ve kontrol grupları	Hayvan sayısı
C57BL6/J (Thy1-ChR2-YFP^{+/+}) fareler	
Optogenetik altı KYD tetiklenen gruplar (İF 5. ve 24. saat zaman noktaları için 2x6, WES için 4)	16
Optogenetik tek KYD tetiklenen gruplar (İF 5. ve 24. saat zaman noktaları için 2x6, WES için 4)	16
Yalancı cerrahi uygulanan gruplar (İF 5. ve 24. saat zaman noktaları için 2x6, WES için 4)	16
STING inhibitörü C-176 veya çözücüsü verilen ve altı KYD tetiklenen gruplar (İF için 2x6, WES için 2x3)	18
STING agonisti 2'3' cGAMP veya çözücüsü verilen ve altı KYD tetiklenmesi sonrası von Frey testi yapılan gruplar (2x6)	12
C57BL6/J yabanıl tip fareler	
STING agonisti 2'3' cGAMP veya çözücüsü verilen gruplar (İF için 2x3, WES için 2x3)	12
STING inhibitörü C-176 veya çözücüsü verilen ve KYD eşiği belirlenen gruplar (2x6)	12
STING agonisti 2'3' cGAMP veya çözücüsü verilen ve KYD eşiği belirlenen gruplar (2x6)	12
STING inhibitörü C-176 veya çözücüsü verilen ve von Frey testi yapılan gruplar (2x7)	14
STING agonisti 2'3' cGAMP veya çözücüsü verilen ve von Frey testi yapılan gruplar (2x7)	14

Tablo 3.1. (Devam)

Toplam	142
---------------	------------

(İF: İmmüno Floresan işaretleme, WES: Kapiller temelli Western blot analizi)

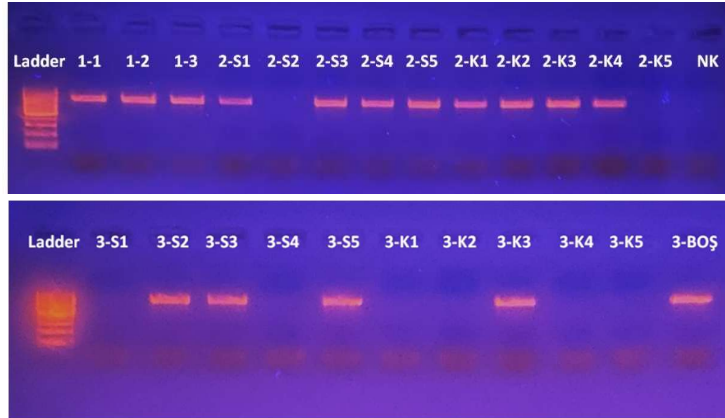
3.2 Optogenetik Uyarımın Yapıldığı Thy1-ChR2-YFP Transgenik Farelerin Genotiplenmesi

Deneylerde kullanılan transkranial optogenetik uyarıma izin veren C57BL/6J Thy1 ChR2-YFP genotipindeki fareler homozigot yavruların üretimindeki sorunlardan dolayı heterozigot kolonide üretilmiştir. Doğan yavruların *channelrhodopsin* transgeni için pozitif veya negatif olduğunun belirlenmesi için polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yapılmış ve deneylerde pozitif çıkan hayvanlar kullanılmıştır.

Farelerin kulakları %70 etanol ile temizlendikten sonra kulaklarının uç kısmından cerrahi makas ile 2 mm parça kesilip 25 mM sodyum hidroksit (NaOH)/0,2 mM etilendiamintetraasetik asit (EDTA) içinde 98 °C’de 1 saat inkübe edildikten sonra 40 mM Tris HCl (pH 5,5) eklenmiş ve santrifüj sonrası süpernatantta farelere ait genomik DNA elde edilmiştir. Elde edilen DNA’ların konsantrasyonu nanodrop cihazı ile ölçülmüştür. Genotiplemede 2,5 ng DNA miktarı kullanılmış ve Tablo 3.2.’de verilen koşullarda PZR gerçekleştirildikten sonra %1,5’lik agaroz jel elektroforezinde transgen bant varlığına göre homozigot ve heterozigot ayrımı yapılmıştır (Şekil 3.1.).

Tablo 3.2.: PZR koşulları

Sıcaklık	Süre	35 döngü
94 °C	3 dakika	
94 °C	30 saniye	
60 °C	1 dakika	
72 °C	1 dakika	
72 °C	5 dakika	



Şekil 3.1. %1,5'lik agaroz jel elektroforezinde heterozigot kolonide üretilen Thy1-ChR2-YFP transgenik hayvanların genotiplendirme sonuçlarından örnek görüntü. 650 bp'de bant gösteren fareler transgen için pozitif, bant göstermeyen fareler negatif olarak değerlendirilmiştir.

3.3 Anestezi ve Yaşamsal Bulguların Takibi

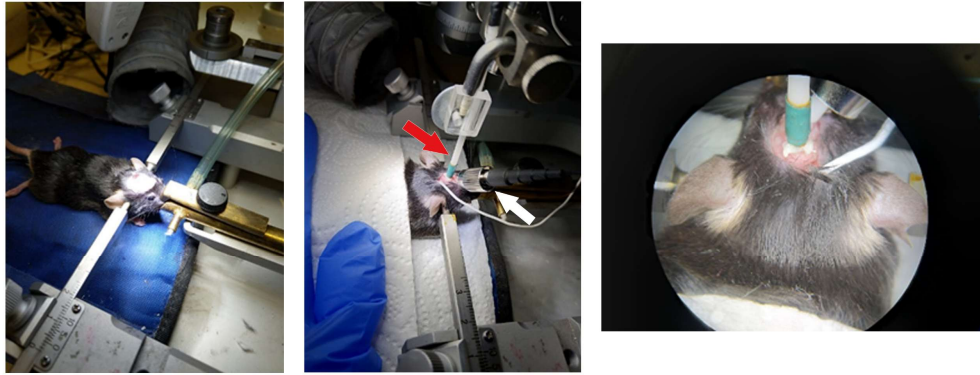
Cerrahi uygulamalardan önce anestezi indüksiyonu %4 izofluran ile sağlanmış ve cerrahi boyunca %1,5-2 izofluran ile idame ettirilmiştir. Cerrahi boyunca hayvanlara 2 litre/dakika %100 oksijen desteği sağlanmış ve hayvanlar spontan solunuma devam edecek şekilde takip edilmiştir. Cerrahi öncesi yeterli anestezi derinliğinin sağlanıp sağlanmadığı parmak sıkıştırma yöntemiyle test edilmiş ve cerrahi boyunca düzenli aralıklarla anestezi derinliği kontrol edilmiştir. Hayvanlar cerrahi işlemler sırasında kafalarının sabitlenmesi için stereotaksik çerçeveye (Digital Lab Standart Stereotaxic Frame, Stoelting, ABD), dış kulak yollarından ve burunlarından sabitlenecek şekilde yerleştirilmiştir. Cerrahi süresince hayvanların vücut sıcaklıkları rektal prob ve ona bağlı homeotermik battaniye yardımıyla $37 \pm 0,5$ °C aralığında tutulmuştur. Nabız hızı ve kan oksijen saturasyonu sağ arka ayağa bağlı pulse oksimetre yardımıyla takip edilmiş ve cerrahi boyunca homeostatik değerlerde kalması sağlanmıştır. Cerrahi sonrasında hayvanlar uyanıp normal aktivitelerine dönenen kadar ısıtıcı battaniye üzerinde bekletilmiş ve sonrasında sakrifiye edilene kadar normal barındırıldıkları yere götürülmüştür.

3.4 Optogenetik Yöntemle KYD Tetiklenmesi

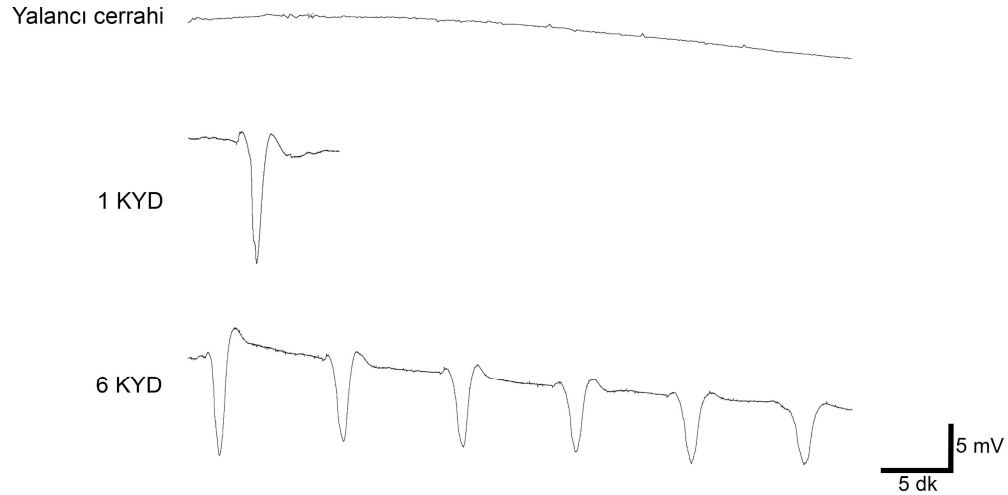
Optogenetik yolla KYD tetiklenmesi literatürde daha önce tanımlandığı şekilde yapılmıştır (38, 39, 191). Deneylerde Thy1-ChR2-YFP^{+/+} genotipine sahip fareler kullanılmıştır. Bu fareler serebral korteks piramidal nöronlarında ışıkla uyarılabilen iyon kanalı *channelrhodopsin* ifade etmektedir ve bu sayede optogenetik uyarımla non-invazif KYD tetiklenmesine olanak sağlamaktadır. Deneyler izofluran anestezisi altında gerçekleştirilmiştir. Hayvanlar anestezi induksiyonu sonrası kafalarının sabitlenmesi için stereotaksik çerçeveye (Digital Lab Standart Stereotaxic Frame, Stoelting, ABD) dış kulak yollarından ve burunlarından sabitlenecek şekilde yerleştirilmiştir. Hayvanların kafa derisi %10 Povidon İyot çözeltisi ve %70 alkolle dezenfekte edildikten sonra kafa derisinde orta hatta cilt kesisi yapılarak kafatası kemikleri ortaya çıkarılmıştır. KYD dalgasının saptanması için yapılan elektrofizyolojik kaydın yapılacağı pariyetal kemik bölgesi yüksek hızlı drill (World Precision Instruments, USA) yardımıyla hafifçe tıraşlanarak inceltilmiştir. Drill ile inceltme sırasında kemikte ısınma ve termal hasar meydana gelmemesi için pariyetal kemik düzenli aralıklarla serum fizyolojik ile yıkanarak soğutulmuştur. Elektrofizyolojik kayıt için gümüş/gümüş klorür (Ag-AgCl) pellet elektrot pariyetal kemikte inceltilen bölgeye yerleştirilmiş ve direkt akım potansiyel değişimleri kaydedilmiştir. Topraklama için bir adet Ag-AgCl disk elektrot ense kaslarının arasına yerleştirilmiştir. Elektrotlar Powerlab veri kazanım sistemine bağlanmıştır. Optogenetik uyarım için fiberoptik kablo (Thorlabs Inc, ABD) frontal kemik üzerine yerleştirilmiştir. KYD tetiklenmesi için 470 nm dalga boyunda 4 mW gücünde mavi lazer ışığı 10 saniye süreyle frontal kemik üzerinden uygulanarak transkraniyal optogenetik uyarım yapılmıştır. Uyarım sonrası KYD dalgası oluşması elektrofizyolojik kayıta en az 5 mV büyüklüğünde direkt akım potansiyel değişikliğinin görülmesiyle doğrulanmıştır. Farklı gruplarda optogenetik uyarım ile tek veya altı KYD dalgası tetiklenmiştir. Çoklu KYD dalgaları tetiklenirken optogenetik uyarımlar 10 dakika aralıklarla verilerek elektrofizyolojik kaydın KYD dalgası sonrası bazale dönmesi için beklenmiştir. KYD tetiklemesi sonlandıktan ve elektrofizyolojik kayıt bazale döndükten sonra hayvanların kafa derisi basit ayrık dikiş yöntemiyle dikilmiş ve deney sonrası uyanıp normal aktivite düzeylerine dönmeleri için ısıtıcı battaniye üzerinde duran kafeslerine konulmuştur.

Kontrol olarak optogenetik uyarımın yalancı cerrahisi uygulanmıştır. Bunun için Thy1-ChR2-YFP^{+/+} genotipine sahip farelere aynı cerrahi basamaklar uygulanmış ancak optogenetik uyarım için mavi lazer ışığı uygulaması yapılmamıştır. Hayvanlarda KYD dalgası oluşmadığı elektrofizyolojik kayıtlarla doğrulanmıştır. Deneyler KYD tetiklenen gruplarla eşit süre sonrasında sonlandırılmıştır. Optogenetik KYD tetiklenmesi ve elektrofizyoloji deneyleri Şekil 3.2.'de gösterilmiştir.

A



B



Şekil 3.2. Optogenetik yolla KYD tetiklenmesi ve elektrofizyolojik kayıta KYD oluşumunun doğrulanması. A) Optogenetik KYD tetiklenmesi için Thy1-ChR2-YFP fareler kulaklarından sabitlenecek şekilde stereotaksik çerçeveye yerleştirilmişlerdir (sol resim). Parietal kemikte inceltilen yere ölçüm elektrodu (kırmızı ok) yerleştirilerek elektrofizyolojik kayıt yapılmış, frontal kemik üzerine fiberoptik kablo (beyaz ok) yerleştirilerek optogenetik uyarım yapılmıştır (orta resim). Kayıt ve uyarı düzeneğinin mikroskop ile yakınlştırılmış görüntüsü (sağ resim). B) Yalancı cerrahi uygulaması, tek KYD ve altı KYD dalgası tetiklenmesi işlemleri sırasında

elektrofizyolojik kayıt traseleri. Yalancı cerrahi uygulamasında optogenetik uyarı verilmediği için KYD dalgası oluşmamıştır. Optogenetik uyarım sonrası KYD dalgası oluşumu elektrofizyolojik kayıta en az 5 mV direkt akım potansiyel değişimi gösteren dalgalarla doğrulanmıştır. Traselerde X eksen süre (5 dk), Y eksen potansiyel büyüklüğünü (5 mV) göstermektedir.

3.5 Hayvanlardan Beyin Dokusunun Elde Edilmesi

Hayvanlarda KYD tetiklenmesinden sonra yapılacak *in vitro* değerlendirmeler için tüm beyin dokusu çıkarılmıştır. İmmüno Floresan işaretlemeler için hayvanların beyin dokusu KYD tetiklenmesinden 5 saat ve 24 saat sonra çıkarılmıştır. Bunun için hayvanlar ürethan/ksilazin (sırasıyla 1,5 g/kg ve 10 mg/kg, i.p.) anestezisi ile uyutulduktan sonra transkardiyak perfüzyon yapılmıştır. Transkardiyak perfüzyon uygulamasında hayvanın göğüs kafesi diseke edilerek kalp açığa çıkarılmış, sağ atriuma cerrahi makas ile kesi atılmıştır. Perfüzyon pompasının iğnesi kalbin apeksinden sol ventriküle yerleştirilmiş ve önce soğuk serum fizyolojik ile ve sonrasında %4 paraformaldehit (PFA) ile tüm vücut perfüze edilmiştir. Perfüzyon işlemi sonrası hayvanların kafatası diseke edilerek tüm beyin çıkartılmıştır. Çıkartılan beyinler post-fiksasyon için %4 PFA (ağırlık/hacim, PBS içinde) içinde +4 °C sıcaklıkta 24 saat, kriyoproteksiyon için %30 sükröz (ağırlık/hacim, PBS içinde) solüsyonu içinde +4°C’de 48 saat bekletilmiştir. Sükröz solüsyonundan çıkarılan beyinler kesit alınmasına kadar – 80 °C’de saklanmıştır.

Kapiller temelli Western blot analizi yöntemiyle beyin dokusunda protein seviyesi tayini için hayvanların beyinleri KYD tetiklenmesinden 5 saat sonra alınmıştır. Bunun için hayvanlar ürethan/ksilazin (sırasıyla 1,5 g/kg ve 10 mg/kg, i.p.) anestezisi ile uyutulduktan sonra servikal dislokasyon ile sakrifiye edilmiştir. Hayvanların kafatası hızla diseke edilmiş ve tüm beyin çıkarılmıştır. Soğuk PBS içinde yıkanan beyin dokusu buz üstünde soğuk metal plakaya alınmış ve burada beyin hızla diseke edilerek ipsilateral hemisfer ve kontralateral hemisferin parietal korteks bölgeleri ayrılmıştır. Eppendorf tüpler içine alınan korteks dokuları sıvı azot ile dondurulmuş ve sonraki analizlere kadar – 80 °C’de saklanmıştır.

3.6 İmmüno Floresan İşaretleme

KYD tetiklenmesi sonrası beyinde cGAS-STING yolağı proteinlerinin hücrelere özgül ifadesini göstermek için immüno Floresan işaretleme yöntemi kullanılmıştır. Bunun için hayvanlardan elde edilen ve fiksasyon ve kriyoproteksiyon adımlarından geçmiş beyinler *optimal cutting temperature* (Tissue-Tek, Sakura) bileşenine gömülmüş, dondurulmuş ve beyinlerden kriyomikrotom (Leica-CM1100) yardımıyla pariyetal korteks bölgesini içeren 20 mikrometrelik beyin kesitleri pozitif şarjlı lam üzerine alınmıştır. Beyin kesitleri immüno Floresan işaretleme işlemine kadar -20 °C sıcaklıkta saklanmıştır.

İmmüno Floresan işaretlemeler için tümü tavşanlarda üretilmiş olmak üzere fare STING proteinine karşı monoklonal anti-STING (Cell Signaling Technology, 13647), poliklonal anti-cGAS (MyBioSource, MBS9143559), monoklonal anti-phospho-Interferon Regulatory Factor 3 (p-IRF3) (Cell Signaling Technology, 29047) ve poliklonal anti-IFN- β primer antikoru (Novus Bio, NBP1-77288) kullanılmıştır. cGAS-STING yolağı proteinlerinin farklı tip hücrelerdeki ifadesini incelemek için nöron belirteci olan NeuN proteinine karşı anti-NeuN fare monoklonal primer antikoru (Merck Millipore, MAB377), mikrogliya belirteci olan Iba1 proteinine karşı keçilerde üretilmiş poliklonal anti-Iba1 primer antikoru (Novus Bio, NB100-1028) ve astrosit belirteci olan S100- β proteinine karşı farelerde üretilmiş monoklonal anti-S100 β antikoru (Atlas Antibodies, AMAb91038) kullanılarak ikili işaretlemeler yapılmıştır. Ek olarak NLRP3 inflamazomu ve NF- κ B p65 ifadesini incelemek için tavşanlarda üretilmiş poliklonal anti-NLRP3 antikoru (Thermo Fisher Scientific, PA5115660), tavşanlarda üretilmiş monoklonal anti-p65 antikoru (Cell Signaling Technology, 8242S) ve STING proteinin Golgi aparatındaki yerleşimini incelemek için Golgi belirteci olan *golgi autoantigen, golgin subfamily a, 2* (GOLGA2) proteinine karşı tavşanlarda üretilmiş poliklonal anti-GOLGA2 antikoru (Proteintech, 11308-1-AP) kullanılmıştır. Görüntülemek için Cyanine 3 (Cy3) kenetli keçi anti tavşan, Cy5 kenetli keçi anti tavşan, Cy5 kenetli eşek anti fare, Cy3 kenetli keçi anti fare ve Cy3 kenetli eşek anti keçi sekonder antikoru kullanılmıştır.

İmmüno Floresan işaretlemelerin optimizasyonu sonucunda tüm işaretlemeler sitrat tamponu (pH=6) ile antijen geri kazanımı uygulanarak yapılmıştır. Antijen geri kazanımı uygulanarak yapılan immüno Floresan işaretlemelerde -20°C'den çıkarılan beyin kesitlerinin yavaşça oda sıcaklığına gelmesi için yaklaşık 20 dakika beklenmiş,

öncesinde 85 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 5 dakika bekletilerek ısıtılmış sodyum sitrat tamponu içine kesitler daldırılmış ve su banyosu içinde 15 dakika bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda kesitleri içeren tamponlar su banyosundan çıkarılmış ve 30 dakika oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir. Sonrasında kesitler 6 kere 5'er dakika *Tris buffered saline* (TBS) ile yıkanmıştır. Daha sonra kullanılan sekonder antikora göre %10 normal keçi veya eşek serumu ve %1 *bovine serum albumin* (BSA) içeren blokaj solüsyonu içinde 1 saat oda sıcaklığında blokaj yapılmıştır. Ardından primer antikolar TBS içinde %1 BSA içeren solüsyonda 1:200 (Anti-STING ve anti-cGAS antikoları) veya 1:300 (Anti-p-IRF3 ve anti-IFN- β antikoları) oranında seyreltilerek kesitlere eklenmiş ve gece boyu +4°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün kesitler, TBS ile 3 kere 5'er dakika yıkanmıştır. Daha sonra kesitlere 1:200 konsantrasyonunda sekonder antikor (Cy3 kenetli keçi anti tavşan veya Cy5 kenetli keçi anti tavşan) eklenmiştir. 60 dakika oda sıcaklığında inkübasyondan sonra kesitler tekrar 3 kere 5'er dakika TBS ile yıkanmıştır. İkinci işaretleme için eğer farklı kökenden gelen sekonder antikor kullanılmışsa kesitler %10 normal serum ile 1 saat inkübe edilerek yeniden blokaj yapılmıştır. İkili işaretleme için ikinci primer antikor olarak anti-NeuN fare monoklonal primer antikoru, anti-Iba1 keçi poliklonal primer antikoru ve fare anti-S100 β antikoru sırasıyla 1:300, 1:250 ve 1:300 oranlarında seyreltilerek konulmuştur ve geceboyu +4°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün kesitler, TBS ile 3 kere 5'er dakika yıkanmıştır. Daha sonra kesitlere 1:200 konsantrasyonunda ikinci sekonder antikor (Cy5 kenetli eşek anti fare veya Cy3 kenetli eşek anti keçi) eklenmiştir. 60 dakika oda sıcaklığında inkübasyondan sonra kesitler tekrar 3 kere 5'er dakika TBS ile yıkanıp çekirdek boyası Hoechst 33258 içeren kapatma medyumumu ile kapatılmıştır.

3.7 Görüntü Elde Edilmesi ve Görüntü Analizi

İmmüno Floresan işaretleme yapılan beyin kesitleri Leica TCS SP8 konfokal lazer taramalı mikroskop (Leica, Almanya) ile görüntülenmiştir. Kesitler diyot (405, 638 nm) ve OPSL (488, 552 nm) lazerler ile uyarılmış ve oluşan floresan ışınlar uygun floresan filtrelerden geçirilerek yüksek çözünürlüklü PMT (Zeiss, Almanya) ve HyD (Leica, Almanya) detektörlerle yakalanmıştır. Görüntüleme için 40x büyütmeli 1,3 numerik aperture sahip yağ immersiyon objektifi (Leica, Almanya) kullanılmıştır.

Görüntülerin dijital olarak saklanması ve görüntüleme parametrelerinin ayarlanması için Leica Application Suite X (sürüm 1.4.8.3) yazılımı kullanılmıştır. Beyin kesitlerinde KYD tetiklenen ipsilateral hemisferde pariyetal korteks bölgesinden 40x optik büyütme ve 0,8 yakınlaştırma faktörüyle 330x330 µm boyutunda birbiriyle kesişmeyen üçer görüntü alınmıştır. Görüntüler Z-aksında farklı odak düzlemlerini de içermesi için 0,5 µm kalınlığında adımlarla Z-stack modunda alınmıştır. Farklı grupların görüntülenmesinde görüntüleme parametreleri sabit tutulmuştur. Görüntü analizlerinde Z-stack içinde odağın ve işaretlenmenin en iyi olduğu orta düzlem görüntüler kullanılmıştır.

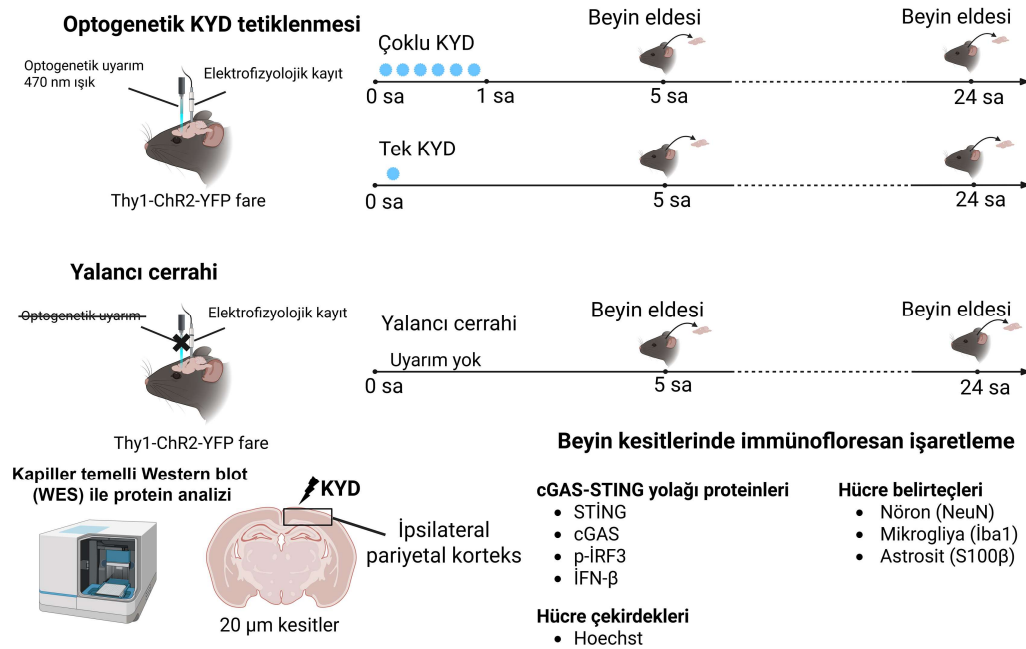
Görüntü işleme ve görüntü analizi için ImageJ (v1.54, National Institutes of Health, ABD) yazılımı kullanılmıştır. Görüntü işlemesi için ImageJ yazılımıyla görüntülerdeki non-spesifik arka plan ve gürültü, yazılımın “*Subtract background*”, “*Remove outliers*” ve “*Despeckle*” fonksiyonları yardımıyla tüm görüntüler için aynı parametreler kullanılarak çıkarılmıştır. İmmünofloresan işaretlemelerin kantifikasyonu için görüntülerde her ikili işaretleme için ayrı ayrı olacak şekilde toplam Hoechst-, NeuN-, Iba1- ve S100β-pozitif hücreler arasında ilgilenilen proteinler (cGAS, STING, p-IRF3, IFN-β, NLRP3) için pozitif işaretlenen hücreler manuel olarak sayılmış ve toplam sayıya oranlanarak pozitif hücre yüzdesi belirlenmiştir. Her hayvanda ipsilateral pariyetal korteks bölgesinden alınan 3 görüntü için pozitif hücre yüzdeleri belirlenmiş ve 3 görüntünün ortalaması alınarak o hayvanın verisi olarak istatistiksel karşılaştırmalarda kullanılmıştır. Görüntü analizlerini yapan kişiler yapılan deneysel müdahale için körlenmişlerdir.

3.8 Kapiller Temelli Western blot analizi (WES) Yöntemiyle Beyindeki Protein Seviyelerinin Tayini

KYD tetiklenmesi sonrası beyinde cGAS-STING yolağı proteinlerinin seviyesinin ölçülmesi için kapiller elektroforez nanoimmünoassay yöntemiyle otomatize Western blot analizi yapan WES Simple Western (ProteinSimple, Bio-technique, ABD) sistemi kullanılmıştır. Bu sistem, kısıtlı örnek miktarında bile yüksek hassasiyetle hedef protein miktarının otomatize ve kantitatif analizine imkan tanıdığı için tercih edilmiştir. Bunun için KYD tetiklendikten 5 saat sonra elde edilen beyinlerden ayrıştırılan pariyetal korteks doku örnekleri soğuk

radioimmünopresipitasyon assay (RIPA) tamponu içinde lizise uğratılmış, sonikasyon ile homojenize edilmiş ve 14000xg, +4 °C’de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatantlar başka tüpe aktarılmış ve süpernatant içindeki protein konsantrasyonları BCA protein assay kitiyle (Thermo Scientific, 23225) ölçülmüştür. Protein konsantrasyonları belirlenen örnekler her örnekte 1 mg/ml protein konsantrasyonu olacak şekilde örnek tamponu içinde seyreltilmiştir. Hazırlanan örnekler internal standartlar ve ditiyotritol içeren master miks eklenmiş ve 95°C’de 5 dakika denatüre edilmiştir. Örnekler kapiller elektroforez 12-230 kDa örnek ayırıştırma modülüne (ProteinSimple, SM-W004, Biotechne, ABD) primer antikorlar, biotin konjuge sekonder antikorlar (anti-tavşan) (ProteinSimple, DM-001, Biotechne, ABD), yıkama tamponu ve kemiluminesans sinyal oluşumu için HRP-streptavidin ve luminol-peroksit karışımı ile birlikte yüklenmiştir. Kullanılan primer antikorlar sırasıyla: tavşan monoklonal anti-STING antikor (Cell Signaling Technology, 13647), STING proteininin Ser365’te fosforile haline (p-STING) karşı geliştirilmiş tavşan monoklonal anti-p-STING antikor (Cell Signaling Technology, 19781), tavşan monoklonal anti-IRF3 antikor (Invitrogen, MA5-32348), tavşan monoklonal anti-p-IRF3 antikor (Cell Signaling Technology, 29047), tavşan poliklonal anti-IFN- β antikor (Novus Bio, NBP1-77288). WES ile protein analizinde yükleme kontrolü olarak ilgilenilen proteinlerden uzakta 116 kDa bant veren ve deneysel prosedürden etkilenmeyen vinkülin proteinine karşı tavşan monoklonal anti-vinkülin antikor (XP, 13901) kullanılmıştır. Kapiller elektroforez ve protein miktarı belirlenmesi WES cihazında varsayılan ayarlarla yapılmıştır: protein ayırıştırılması 475 V 30 dk; blokaj 5 dk; primer ve sekonder antikor inkübasyonları 30 dk; Luminol/peroksit kemiluminesans tespiti 15 dakika (1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, ve 512 saniye maruz kalma süreleriyle) yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Compass for Simple Western (sürüm 7.0) (Bio-techne) yazılımı ile analiz edilmiş ve her protein için elde edilen kemiluminesans grafiklerinde proteinin bant verdiği aralıkta oluşan piklerin grafik altında kalan alanları hesaplanmış ve yükleme kontrolüne oranlanarak rölatif protein miktarları belirlenmiştir. Proteinler için bant görüntüleri yükleme kontrolüyle birlikte uygun kontrast ayarları ile yazılımda oluşturulmuştur.

Optogenetik KYD sonrası kortekste cGAS-STING yolağı proteinleri ifadesinin incelenmesi için yapılan deneyler şekil 3.3.’de özetlenmiştir.



Şekil 3.3. Optogenetik olarak KYD tetiklenmesi sonrası serebral kortekste cGAS-STING yolağı proteinlerinin ifadesinin incelenmesi için yapılan deneylerin şematik olarak özetlenmesi. Optogenetik yöntemle KYD tetiklenmesi sonrası serebral kortekste cGAS-STING yolağı proteinlerinin ifadesinin incelenmesi için KYD tetiklenmesinden 5 veya 24 saat sonra alınan beyinlerde yolak proteinlerinin ifadesi immüno Floresan işaretleme ve kapiller temelli Western blotlama (WES) yöntemleriyle değerlendirilmiştir. Yolak proteinlerinin kortekste farklı hücre tiplerindeki ifadesinin incelenmesi için nöron, mikroglia ve astrosit hücre belirteçleriyle beraber ikili immüno Floresan işaretleme yapılmıştır.

3.9 Hayvanlara Uygulanan Farmakolojik Ajanlar

cGAS-STING yolağı aktivitesinin mikroglial aktivasyon, KYD eşiği ve periorbital ağrı cevapları üzerine olan etkisinin incelenmesi için yolak aktivitesinin farmakolojik modülasyonu STING proteinine spesifik agonist ve antagonistlerle yapılmıştır. STING proteininin antagonisti olarak fare STING proteininin potent ve spesifik kovalent inhibitörü olan ve STING proteininin aktivasyon ile ilişkili palmitoylasyon ve oligomerizasyonunu engelleyen C-176 ilacı (Cayman Chemicals 25859) kullanılmıştır. İlaç %5 dimetil sülfoksit (DMSO) %95 serum fizyolojik çözütüsünde çözündürülmüş ve hayvanlara 20 mg/kg dozunda intraperitoneal (i.p.) yolla tek doz uygulanmıştır. İlaç uygulaması öncesinde çalışma solüsyonu stok solüsyondan taze şekilde hazırlanmıştır. İlaç uygulaması KYD tetiklenmesi, KYD eşiği belirlenmesi ve periorbital ağrı yanıtlarının değerlendirilmesinden 4 saat önce

yapılmıştır. İlacın uygulama şekli, dozu ve uygulanma zamanı aynı ilacı kullanan daha önceki çalışmalardan elde edilen farmakokinetik ve farmakodinamik verilerden yararlanılarak belirlenmiştir (58, 256). C-176 sistemik uygulamayla kan beyin bariyeri (KBB) geçişi iyi olması nedeniyle i.p. olarak uygulanmıştır. Kovalent inhibitör olması bakımından ilacın plazma seviyeleri tek doz i.p. uygulama sonrası 4 saat içinde azalmaya başlasa da ilacın inhibitör etkisi 4 saatten sonra da devam etmektedir (256). Bununla uyumlu olarak farelerde sistemik C-176 uygulamasının nöronal uyarılabilirlik ve ağrı eşikleri üzerindeki etkisinin uygulamadan sonraki 4. saatte maksimuma ulaştığı ve 24 saate kadar devam ettiği gösterilmiştir (58).

STING proteininin agonisti olarak cGAS-STING yolağı aktifleştğinde cGAS enzimi tarafından üretilen endojen STING agonisti 2'3' cGAMP kullanılmıştır. 2'3' cGAMP ikincil mesajcı özelliği gösteren bir moleküldür ve STING proteinine bağlandığında proteinde konformasyonel değişikliklere, dimerizasyon ve oligomerizasyona neden olarak STING aktifleşmesini sağlar (213). 2'3' cGAMP ilacı (Cayman Chemicals 19887) *phosphate buffered saline* (PBS) içinde çözündürülmüştür ve hayvanlara 1 mg/kg dozunda intranazal (i.n.) yolla uygulanmıştır. İntranazal ilaç uygulamasında hayvanlara kısa sedasyon sağlaması için 30 saniye %2 izofluran koklatılmış ve hayvanlar kafaları yere paralel ve ters duracak şekilde uygulayıcının dominant olmayan elinde tutulmuştur. Diğer elle mikropipet içine çekilen 10 µl ilaç veya çözücü hayvanın her burun deliğinden 5 µl verilerek uygulanmıştır. Hayvanın normal nefes alması sırasında pipet ucunda oluşan damlayı koklayarak burnuna çekmesi sağlanmıştır. İlaç uygulaması sonrası ilacın oftalmik epitelden emilmesinin beklenmesi için hayvan aynı pozisyonda 2 dakika tutulmuştur. Hayvanlar sonraki deneylere kadar normal barındırıldıkları yere geri götürülmüştür. 2'3' cGAMP uygulaması KYD tetiklenmesi, KYD eşiği belirlenmesi ve periorbital ağrı yanıtlarının değerlendirilmesinden 4 saat önce yapılmıştır. İlacın uygulama şekli, dozu ve uygulanma zamanı aynı ilacı kullanan daha önceki çalışmalardan elde edilen farmakokinetik ve farmakodinamik verilerden yararlanılarak belirlenmiştir (56, 58). 2'3' cGAMP molekülü hücre dışı ortamda hızla yıkılan bir moleküldür bu da sistemik uygulamada KBB geçişini sınırlandırmaktadır. 2'3' cGAMP molekülünün i.n. uygulama sonrası merkezi sinir sistemine geçebildiği ve beyindeki 2'3' cGAMP seviyelerinin uygulamadan sonra 72 saate kadar yüksek seyrettiği bildirilmiştir (56).

2'3' cGAMP uygulamasının ağırlık eşiklerini arttırdığı ve bu etkinin uygulamadan sonra 4. saatte maksimuma ulaştığı ve 48 saate kadar devam ettiği gösterilmiştir.

3.10 Mikroglia Morfolojisi Analizi

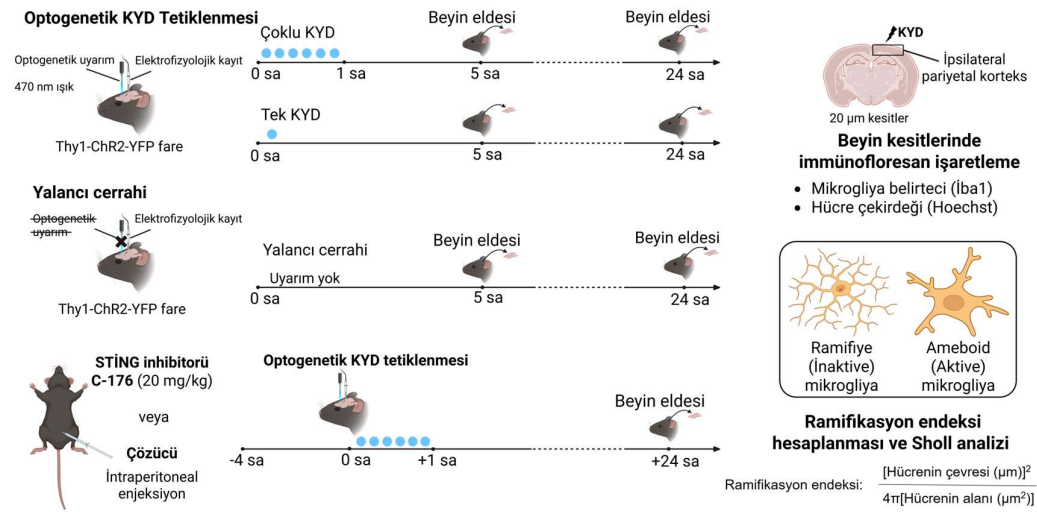
Mikroglia aktivasyonunun değerlendirilmesi için mikroglia morfolojisi FİJİ (sürüm 1.54) yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Iba1 immünofloresan işaretlemesi yapılmış beyin kesitlerinde ipsilateral parietal korteks bölgesinden alınmış Z-stack görüntülerde Z-aksında farklı odak düzlemleri mikroglia hücreleri için incelenmiş ve mikroglia hücrelerini içeren düzlemler, farklı düzlemlerdeki hücrelerin üst üste binmesinden kaçınılarak, “maksimum yoğunluk projeksiyonu” fonksiyonu yardımıyla birleştirilmiştir. Böylece farklı odak düzlemlerinde yer alan Iba1 işaretlenmeleri tek görüntüde birleştirilerek tüm mikroglia morfolojisi ortaya çıkarılmıştır. Yeni oluşan görüntülerdeki non-spesifik arka plan ve gürültü çıkarılmış ve *binary* görüntüler elde edilmesi için floresan eşik belirleme işlemi yapılmıştır. Bu işlemler uygulanırken tüm görüntüler için aynı parametreler kullanılmıştır. *Binary* görüntülerde mikroglia hücreleri belirlenmiş ve hücrelerin *binary* silüetleri kullanılarak hücre alanı ve hücre çevresi parametreleri ölçülmüştür. Bu parametreler kullanılarak ramifikasyon endeksi her hücre için aşağıdaki formülle (Formül 2.1.) hesaplanmıştır:

$$\text{Ramifikasyon endeksi} = \frac{[\text{hücrenin çevresi } (\mu\text{m})]^2}{4\pi[\text{hücrenin alanı } (\mu\text{m}^2)]} \quad (2.1.)$$

Ramifikasyon endeksi mikrogliaların gövde ve uzantılarının büyüklüğünü hesaba katarak mikrogliaların morfolojik karmaşıklığını gösteren bir ölçüttür ve ramifikasyon endeksi skorunda düşme mikroglia morfolojisinin karmaşıklığının azaldığının ve daha dairesel bir morfolojiye sahip olduklarını göstermektedir (257-259). Her hayvanda 3 farklı görüntüde tüm mikroglialar için hesaplanan ramifikasyon endeksi skorlarının ortalaması alınmış ve bu değer o hayvanın verisi olarak istatistiksel karşılaştırmalarda kullanılmıştır. Mikroglia morfolojisinin analizi için ikinci bir yöntem olarak Sholl analizi yapılmıştır. Bunun için FİJİ (sürüm 1.54) yazılımındaki “*Sholl analysis*” eklentisi kullanılmıştır. *Binary* görüntülerde mikroglia hücreleri belirlenmiş ve hücre gövdesinin merkezi başlangıç noktası belirlenerek 3 μm aralıklarla eş merkezli çemberler çizilmiştir. Eş merkezli çemberlerle mikroglia

uzantıları arasındaki kesişme noktaları sayılarak mikroglia uzantılarının dallanma karmaşıklığı değerlendirilmiştir. Kesişme noktalarındaki azalma mikroglia uzantılarının dallanma karmaşıklığının azaldığını göstermektedir (258-260). Öncelikle her görüntüde tüm hücreler için her çemberdeki kesişme sayısının ortalaması alınarak o görüntüdeki değer belirlenmiş, sonra aynı hayvandan alınan 3 görüntüdeki değerlerin ortalaması alınarak belirlenen değer o hayvanın verisi olarak istatistiksel karşılaştırmalarda kullanılmıştır.

Mikroglial aktivasyonun değerlendirilmesi için yapılan deneyler şekil 3.4.'te özetlenmiştir.

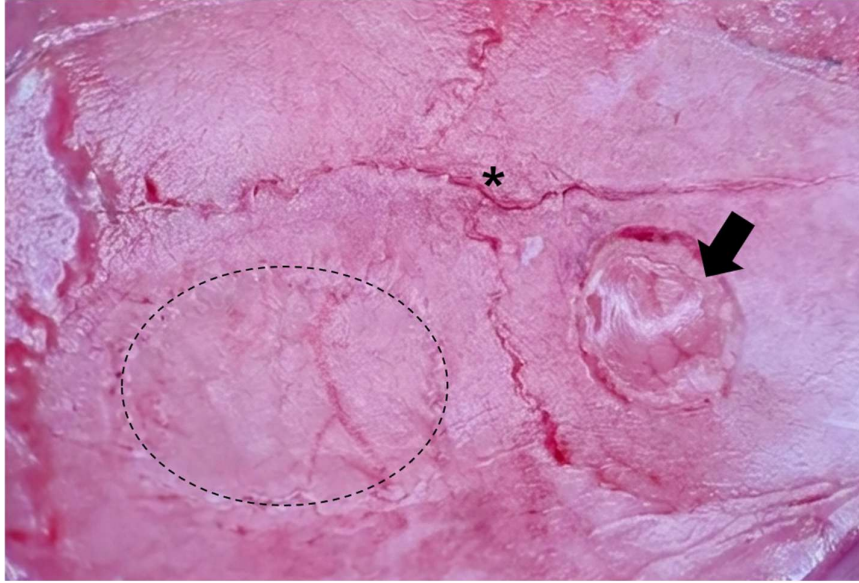


Şekil 3.4. KYD tetiklenmesi sonrası mikroglial aktivasyonun mikroglia morfolojisi analiziyle incelenmesi ve mikroglial aktivasyonda cGAS-STING yolağının rolünün incelenmesi için yapılan deneylerin şematik olarak özetlenmesi. KYD sonrası mikroglial aktivasyonun değerlendirilmesi için KYD tetiklenen ve kontrol beyinlerde mikroglia belirteci Iba1 immüno Floresan işaretleme ve elde edilen görüntülerde mikroglia morfolojisi ramifikasyon endeksi ve Sholl analizi yöntemleriyle analiz edilmiştir. Mikroglial aktivasyonda cGAS-STING yolağının rolünün incelenmesi için KYD tetiklenmesinden önce yolak aktivitesi STING'in spesifik antagonisti C-176 ilacı ile inhibe edilmiştir.

3.11 Topikal Potasyum Klorür Uygulamasıyla KYD Tetiklenmesi ve KYD Eşiğinin Belirlenmesi

KYD eşiğinin belirlenmesi için KYD konvansiyonel yöntem olan dura üzerine topikal KCl uygulamasıyla tetiklenmiştir (35). Bunun için yabanıl tip C57BL/6J fareler kullanılmıştır. Cerrahi izofluran anestezisi altında yapılmıştır. Hayvanlar

anestezi induksiyonu sonrası kafalarının sabitlenmesi için stereotaksik çerçeveye (Digital Lab Standart Stereotaxic Frame, Stoelting, ABD) dış kulak yollarından ve burunlarından sabitlenecek şekilde yerleştirilmiştir. Hayvanların kafa derisi %10 Povidon İyot çözeltisi ve %70 alkolle dezenfekte edildikten sonra kafa derisinde orta hatta cilt kesisi yapılarak kafatası kemikleri ortaya çıkarılmıştır. KYD dalgasının saptanması için yapılan elektrofizyolojik kaydın yapılacağı pariyetal kemik bölgesi yüksek hızlı drill (World Precision Instruments, USA) yardımıyla hafifçe tıraşlanarak inceltirilmiştir. Drill ile inceltme sırasında kemikte ısınma ve termal hasar meydana gelmemesi için pariyetal kemik düzenli aralıklarla serum fizyolojik ile yıkanarak soğutulmuştur. KYD eşiği belirlenmesi için sağ frontal kemikte (bregmaya göre 1 mm anterior, 1 mm lateral) drill yardımıyla 1 mm çapında *burr-hole* kraniyotomi açılmış ve sağlam dura açığa çıkarılmıştır (Şekil 3.5.). Drill ile inceltme sırasında kemikte ısınma ve termal hasar meydana gelmemesi için frontal kemik düzenli aralıklarla serum fizyolojik ile yıkanarak soğutulmuştur. Kraniyotomi açılırken duranın hasar görmemesine ve kanama olmamasına özen gösterilmiştir. Elektrofizyolojik kayıt için Ag-AgCl pellet elektrot pariyetal kemikte inceltilen bölgeye yerleştirilmiş ve direkt akım potansiyel değişimleri kaydedilmiştir. Topraklama için bir adet Ag-AgCl disk elektrot ense kaslarının arasına yerleştirilmiştir. Elektrotlar Powerlab veri kazanım sistemine bağlanmıştır. KYD tetiklenmesi ve KYD eşiğinin belirlenmesi için 1 mm çapında pamuk parçaları giderek artan KCl konsantrasyonlarıyla (12,5, 25, 50, 75, 100, 150 ve 300 mM) ıslatılmış ve sırayla duramater üzerine konulmuştur. Her KCl konsantrasyonu 5 dakika uygulanmış ve KYD dalgası oluşumu elektrofizyolojik kayıttan takip edilmiştir. KYD dalgası 5 dakika içinde oluşmazsa pamuk parçası dura üstünden alınmış ve *burr-hole* serum fizyolojikle yıkanmıştır. Yıkamadan 5 dakika sonra bir üst KCl konsantrasyonuyla ıslatılmış pamuk parçası dura üzerine konulmuştur. Bu uygulama KYD dalgası oluşumu görülene kadar tekrarlanmıştır. KYD dalgası oluşumuna neden olan en düşük KCl konsantrasyonu KYD eşiği olarak belirlenmiştir. Deney sonrası *burr-hole* serum fizyolojikle ıslatılmış *bone wax* ile kapatılmış, kafa derisi basit ayrık dikiş yöntemiyle dikilmiş ve hayvanlar deney sonrası uyanıp normal aktivite düzeylerine dönmeleri için ısıtıcı battaniye üzerinde duran kafeslerine konulmuştur.

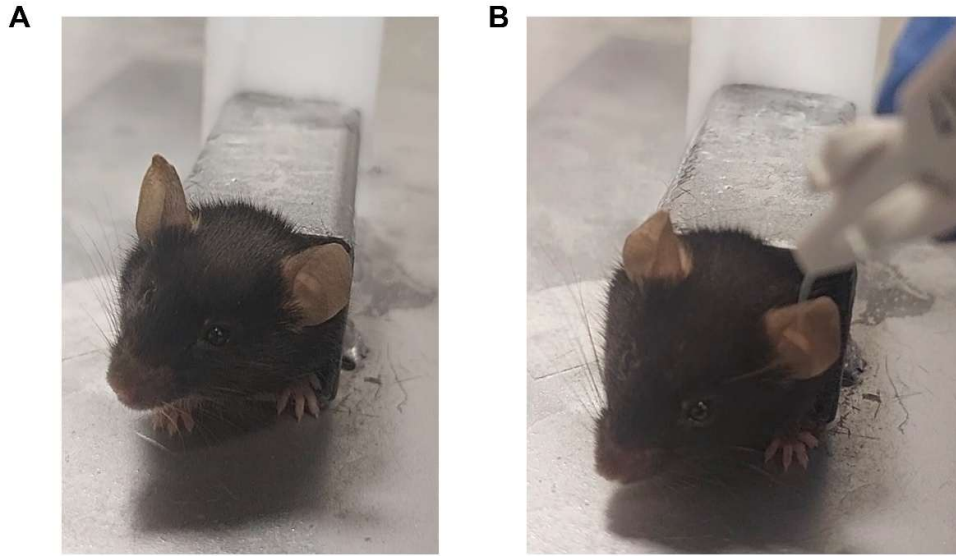


Şekil 3.5. C57BL6/J farelerde dura üzerinde topikal KCl uygulaması için yapılan cerrahinin fare kafatası fotoğrafında gösterilmesi. Siyah ok frontal kemik üzerinde açılan *burr hole* kraniyotomiye göstermektedir, KCl ile ıslatılmış pamuk parçaları bu delik üzerine konulmuştur (Sağlam dura, altındaki dural damarlar ve ışık yansımalarıyla görülmektedir). Kesikli çizgi içine alınan kısım parietal kemikte elektrofizyolojik kayıt için inceltilecek kemik bölgesini göstermektedir. Yıldız işareti bregma noktasını göstermektedir.

3.12 Periorbital Mekanik Hassasiyetin Manuel von Frey Testiyle İncelenmesi

İlaç uygulamalarından ve KYD tetiklenmesinden sonra ağrı eşiklerindeki değişimi incelemek için periorbital mekanik hassasiyet manuel von Frey testiyle değerlendirilmiştir. İlk olarak deneysel müdahalelerden önce bazal durumda von Frey testi yapılmıştır (23, 261). STING agonisti 2'3' cGAMP ve antagonisti C-176 uygulamasından 4 saat sonra von Frey testi yapılmıştır. Optogenetik KYD tetiklenmesinden 2 ve 24 saat sonra von Frey testiyle periorbital mekanik hassasiyet değerlendirilmiştir. Von Frey testi için hayvanlar deney sırasında hareketlerini kısıtlayacak ve kaçmalarını engelleyecek ancak kafalarını ve ön bacaklarını serbest biçimde hareket ettirmelerine izin verecek şekilde 3x3x7 cm boyutlarında restriksiyon aletine sokularak kuyruklarından sabitlenmiş ve deneyden önceki 3 gün boyunca her gün otuzar dakikalık seanslarda düzeneğe alıştırmışlardır (Şekil 3.6.). Deneyde giderek artan güçte (0,008, 0,02, 0,04, 0,07, 0,16, 0,40, 0,60, 1,0 ve 1,4 g) von Frey filamanları (Ugo Basile, İtalya) hayvanın göz çevresine (gözün süperior mediali) dikey

olarak, filamanda hafif bükülme yapacak güçte dokundurulmuş ve hayvanın verdiği cevaplar kaydedilmiştir. Her filaman 3 saniye süreyle dokundurulmuş ve pozitif cevap oluşup oluşmadığı gözlenmiştir. Ani kafa çekme, kafa sallama, uyarılan bölgenin ön bacaklarla ovuşturulması pozitif cevaplar olarak kabul edilmiştir. Beş uygulamanın en az üçünde pozitif cevap oluşturan kuvvet periorbital mekanik geri çekme eşiği olarak belirlenmiştir. Periorbital mekanik geri çekme eşiklerindeki belirgin düşüş periorbital allodini olarak tanımlanmıştır. Davranış deneyleri günün hep aynı saatlerinde yapılmıştır. Von Frey testini değerlendiren kişiler yapılan ilaç müdahaleleri için körlenmişlerdir.



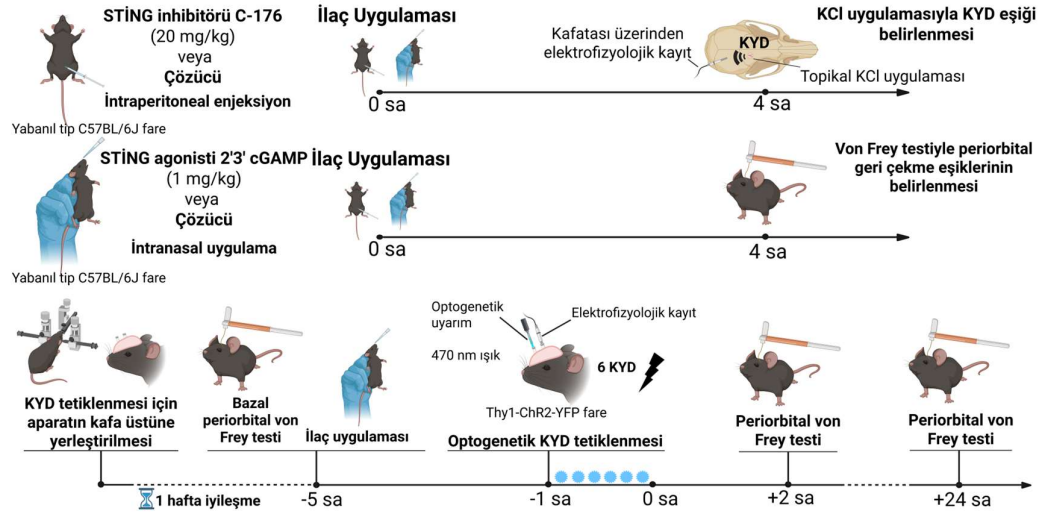
Şekil 3.6. Periorbital von Frey testi için kullanılan düzenek. A) Hayvanlar test sırasında kaçmalarını engelleyecek ancak kafalarını ve ön bacaklarını serbest biçimde hareket ettirmelerine izin verecek şekilde restriksiyon aletine yerleştirilmiş ve düzenekte kuyruklarından sabitlenmişlerdir. B) Von Frey filamanları hayvanların periorbital bölgesine (gözün süperior mediali) dikey olarak, filamanda hafif bükülme yapacak güçte dokundurulmuştur.

3.13 KYD Sonrası Periorbital Allodini Gelişiminin İncelenmesi için Yapılan Cerrahi

KYD tetiklenmesi sonrası periorbital allodini gelişiminin incelenmesinde cerrahinin yarattığı stres ve inflamasyonun etkisinin en aza indirilmesi için periorbital ağrı eşikleri cerrahiden 1 hafta sonra değerlendirilmiştir (262). Bunun için farelerin kafalarına cerrahiden belirli bir süre sonra optogenetik uyarım ve elektrofizyolojik kayda izin veren özel bir düzenek yerleştirilmiştir ve 1 hafta süreyle hayvanların

iyileşmeleri için beklenmiştir. Bunun için cerrahi izofluran anestezisi (%4 indüksiyon, %1-2 idame) altında yapılmıştır. Hayvanlar anestezi induksiyonu sonrası kafalarının sabitlenmesi için stereotaksik çerçeveye yerleştirilmesi ve diğer basamaklar yukarıda belirtilenle aynı şekilde yapılmıştır. Cerrahi sonrası elektrofizyolojik kayda izin vermesi için pariyetal kemikte inceltilen bölgeye 3 mm çapında plastik tüp hızlı kuruyan siyanoakrilat yapıştırıcıyla yapıştırılarak kemiğe erişim sağlanmıştır. Benzer şekilde frontal kemik üzerinde cerrahi sonrası optogenetik uyarıma izin vermesi için 1 mm çapında plastik tüp siyanoakrilat yapıştırıcıyla yapıştırılmıştır. Kafa derisini etkilemeyecek ve germeyecek şekilde, tüplerin etrafı ve kafatası Superbond dental adeziv (Sun Medical, Japonya) kullanılarak kapatılmıştır. Tüp açıklıkları nemli pamuk tıkaç ile kapatılmıştır ve sonraki deneylerde KYD tetiklenmesine kadar nemli tutulmasına özen gösterilmiştir. Deney sonrası hayvanlar uyanıp normal aktivite düzeylerine dönmeleri için ısıtıcı battaniye üzerinde duran kafeslerine konulmuştur. Uyanıp normal aktivite düzeylerine dönen fareler normal barındırıldıkları yere götürülmüş ve 1 hafta iyileşmelerine izin verilmiştir.

Bir hafta sonra KYD tetiklenmesi için fareler izofluran anestezisi (%4 indüksiyon, %1-2 idame) sonrası stereotaksik çerçeveye yerleştirilmiştir. Frontal kemiğe yapıştırılmış plastik tüpten fiberoptik kablo geçirilerek frontal kemiğe yerleştirilmiş ve 470 nm dalga boyunda mavi lazer ışığı uyarısı (4 mW güç, 15 sn) ile transkraniyal optogenetik uyarım yapılmıştır. KYD oluşumunun gözlenmesi için pariyetal kemiğe yapıştırılmış plastik tüpten Ag-AgCl pellet elektrot geçirilerek pariyetal kemiğe yerleştirilmiş ve direkt akım potansiyel değişimleri kaydedilmiştir. Topraklama için bir adet Ag-AgCl iğne elektrot bacak kaslarının arasına yerleştirilmiştir. Bu şekilde her hayvanda toplamda altı KYD dalgası tetiklenmiştir. KYD tetiklemesi sonlandıktan ve elektrofizyolojik kayıt bazale döndükten sonra elektrotlar ve fiberoptik kablo çıkarılmış, tüp açıklıkları nemli pamuk tıkaçlarla kapatılmış ve hayvanlar deney sonrası uyanıp normal aktivite düzeylerine dönmeleri için ısıtıcı battaniye üzerinde duran kafeslerine konulmuştur. Deneyden 2 ve 24 saat sonra von Frey testiyle periorbital mekanik hassasiyet değerlendirilmiştir.



Şekil 3.7. cGAS-STING yolağı aktivitesinin KYD eşiği ve periorbital ağrı yanıtları üzerindeki etkilerinin incelenmesi için yapılan deneylerin şematik olarak özetlenmesi. cGAS-STING yolağı aktivitesinin KYD yatkınlığı ve periorbital ağrı eşikleri üzerindeki etkisinin incelenmesi için yolak aktivitesi STING proteinine spesifik agonist 2'3' cGAMP ve antagonist C-176 ilaçlarının uygulamasıyla manipüle edilmiştir. İlaç uygulamalarından 4 saat sonra KYD eşikleri topikal KCl uygulamasıyla belirlenmiştir. Periorbital ağrı eşiklerinin belirlenmesi için ilaç uygulamalarından 4 saat sonra manuel von Frey testi yapılarak periorbital mekanik hassasiyet değerlendirilmiştir. cGAS-STING yolağı aktivasyonunun KYD ile ilişkili ağrı davranışlarına etkisinin incelenmesi için 2'3' cGAMP uygulaması sonrası optogenetik yöntemle KYD tetiklenmiş ve 2 saat ve 24 saat sonra periorbital mekanik hassasiyet değerlendirilmiştir.

3.14 İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler için IBM Statistical Package for Social Sciences (SPSS, sürüm 26.0), GraphPad Prism 9.0 (GraphPad, ABD) yazılımları kullanılmıştır. Grafikler GraphPad Prism 9.0 (GraphPad, ABD) yazılımında oluşturulmuştur. Veriler, veri dağılımına bağlı olarak, ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası veya medyan $\pm$ çeyreklerarası açıklık (CAA) şeklinde sunulmuştur. Veri dağılımı Shapiro-Wilk testiyle incelenmiş ve normal dağılan verilerde ikili grup karşılaştırmalarında bağımlı ve bağımsız gruplarda Student t testleri; ikiden fazla grup karşılaştırmalarında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve tekrarlayan ölçümlerde ANOVA testleri kullanılmıştır. Normal dağılmayan verilerde ikili grup karşılaştırmalarında bağımlı ve bağımsız gruplar için sırasıyla Wilcoxon ve Mann Whitney-U testleri; ikiden fazla grup karşılaştırmalarında bağımlı ve bağımsız gruplar için sırasıyla Friedman ve Kruskal-Wallis testleri kullanılmıştır. Verilerde uç değer varlığı ROUT yöntemiyle

incelenmiş, Q katsayısı %10 olarak belirlenmiştir. ROUT yöntemiyle uç değer olduğu belirlenen veriler analizden çıkarılmıştır. İlgilenilen parametrelere cinsiyet etkisinin incelenmesi için iki yönlü ANOVA ve tekrarlayan ölçümlerde ANOVA testleri kullanılmıştır. Tüm analizlerde istatistiksel anlamlılık için $p < 0,05$ değeri kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. KYD Tetiklenmesi Sonrası Serebral Kortekste cGAS-STING Yolağı Aktivitesinin İncelenmesi

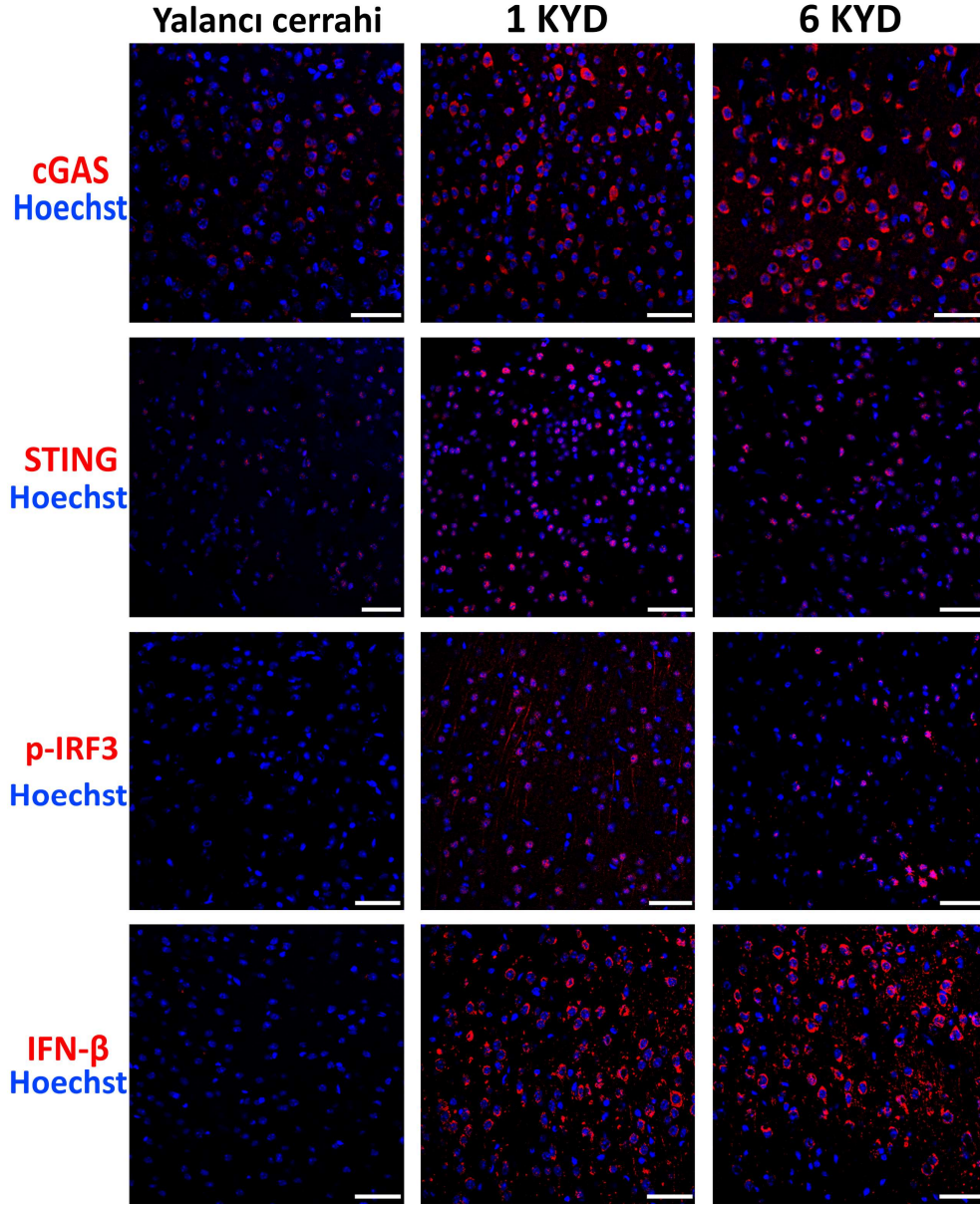
KYD tetiklenmesi sonrası serebral kortekste cGAS-STING yolağı aktivitesinin incelenmesi için deneyler Thy1-ChR2-YFP transgenik farelerde yapılmıştır. KYD optogenetik uyarımla tetiklenmiştir. Tek ve altı KYD dalgası tetiklenen gruplar oluşturulmuştur. Kontrol grubu olarak optogenetik uyarımın yalancı cerrahisi uygulanan hayvanlar kullanılmıştır (n=6/grup). Hayvanların beyinleri immünofloresan işaretleme ve kapiller temelli Western blot analizi (WES) işlemleri için deneyden 5 veya 24 saat sonra alınmıştır. İmmünofloresan işaretlemelerde cGAS-STING yolağı proteinleri olan cGAS, STING, p-IRF3 ve IFN- β proteinleri beyin kesitlerinde spesifik antikolar kullanılarak işaretlenmiş ve lazer taramalı konfokal mikroskop yardımıyla görüntülenmiştir. Görüntüler KYD tetiklenen ipsilateral parietal korteksten alınmıştır. Kapiller temelli Western blot analizi (WES) ile ipsilateral parietal kortekste cGAS, STING, p-STING, p-IRF3 ve IFN- β proteinlerinin protein seviyeleri ölçülmüştür.

4.1.1. KYD Sonrası Serebral Kortekste cGAS-STING Yolağı Proteinlerinin İmmünofloresan İşaretlenmesi Artmaktadır

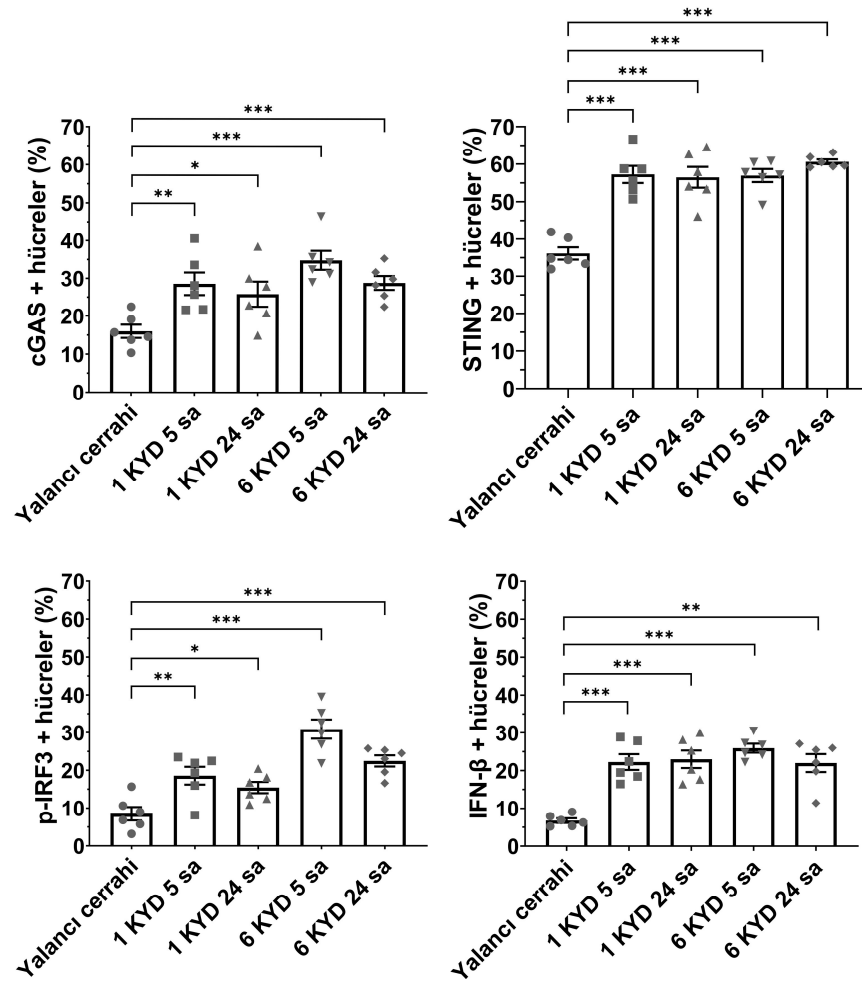
Optogenetik KYD tetiklenen beyinlerde cGAS-STING yolağı proteinlerinin ifadelerinin incelenmesi için öncelikle yolak aktivasyonunun birincil medyatörleri olan cGAS ve STING proteinleri immünofloresan olarak işaretlenmiştir. Altı KYD dalgası tetiklenen beyinlerde KYD'den 5 saat sonra cGAS ve STING immüno pozitif hücre oranının yalancı cerrahi kontrol grubuna kıyasla belirgin olarak arttığı görülmüştür (Yalancı cerrahi ve altı KYD sırasıyla, cGAS: $16,01 \pm 1,74$ ve $34,85 \pm 2,51$, $p < 0,001$; STING: $36,12 \pm 1,64$ ve $56,94 \pm 1,72$, $p < 0,001$) (Şekil 4.2, Şekil 4.3). Bu artışın KYD'den sonra 24. saatte devam ettiği gözlenmiştir (Yalancı cerrahi ve altı KYD sırasıyla, cGAS: $16,01 \pm 1,74$ ve $28,86 \pm 1,85$, $p < 0,001$; STING: $36,12 \pm 1,64$ ve $60,61 \pm 0,63$, $p < 0,001$) (Şekil 4.1, Şekil 4.2). KYD sonrası cGAS ve STING proteinlerinin immünofloresan işaretlenmesindeki artış yolak aktivasyonuna işaret ettiği için sonrasında yolağın efektörleri olan ve cGAS-STING yolağı aracılı

inflamasyonda önemli roller oynayan p-IRF3 ve IFN- β proteinleri immünofloresan olarak işaretlenmiştir. Yolak aktivasyonunun destekler biçimde p-IRF3 ve IFN- β immüno pozitif hücre oranının da KYD dalgalarından 5 saat ve 24 saat sonra yalancı cerrahi grubuna kıyasla belirgin olarak arttığı gözlenmiştir (p-IRF3: Yalancı cerrahi: $8,50 \pm 1,78$ ve altı KYD 5. saat: $30,93 \pm 2,54$, $p < 0,001$; altı KYD 24. saat: $22,48 \pm 1,49$, $p < 0,001$; IFN- β : Yalancı cerrahi: $6,76 \pm 0,61$ ve altı KYD 5. saat: $25,92 \pm 1,18$, $p < 0,001$; altı KYD 24. saat: $21,98 \pm 2,38$, $p = 0,001$) (Şekil 4.1., Şekil 4.2.). cGAS-STING yolağı aktivasyonu için tek KYD dalgası tetiklenmesinin yeterli olup olmadığının incelenmesi için yolak proteinlerinin ifadesi optogenetik olarak tek KYD tetiklenen beyinlerde de incelenmiştir. Tek KYD dalgasından 5 saat sonra cGAS (Yalancı cerrahi ve tek KYD sırasıyla $16,01 \pm 1,74$ ve $28,58 \pm 3,01$, $p = 0,006$), STING (Yalancı cerrahi ve tek KYD sırasıyla $36,12 \pm 1,64$ ve $57,25 \pm 2,27$, $p < 0,001$), p-IRF3 (Yalancı cerrahi ve tek KYD sırasıyla $8,50 \pm 1,78$ ve $18,56 \pm 2,35$, $p = 0,007$) ve IFN- β (Yalancı cerrahi ve tek KYD sırasıyla $6,76 \pm 0,61$ ve $22,24 \pm 2,08$, $p < 0,001$) immüno pozitifliğinin yalancı cerrahi grubuna kıyasla artmış olduğu ve bu artışın 24. saate kadar devam ettiği görülmüştür (Yalancı cerrahi ve tek KYD sırasıyla, cGAS: $16,01 \pm 1,74$ ve $25,84 \pm 3,33$, $p = 0,032$; STING: $36,12 \pm 1,64$ ve $56,48 \pm 2,76$, $p < 0,001$; p-IRF3: $8,50 \pm 1,78$ ve $15,43 \pm 1,48$, $p = 0,014$; IFN- β : $6,76 \pm 0,61$ ve $22,97 \pm 2,31$, $p < 0,001$) (Şekil 4.1., Şekil 4.2.). Tek KYD tetiklemesiyle cGAS-STING yolağı proteinlerinin immünofloresan işaretlenmesindeki artışın altı KYD tetiklenen beyinlerdekiyle karşılaştırılabilir düzeyde olduğu dikkat çekmektedir (Şekil 4.1., Şekil 4.2.).

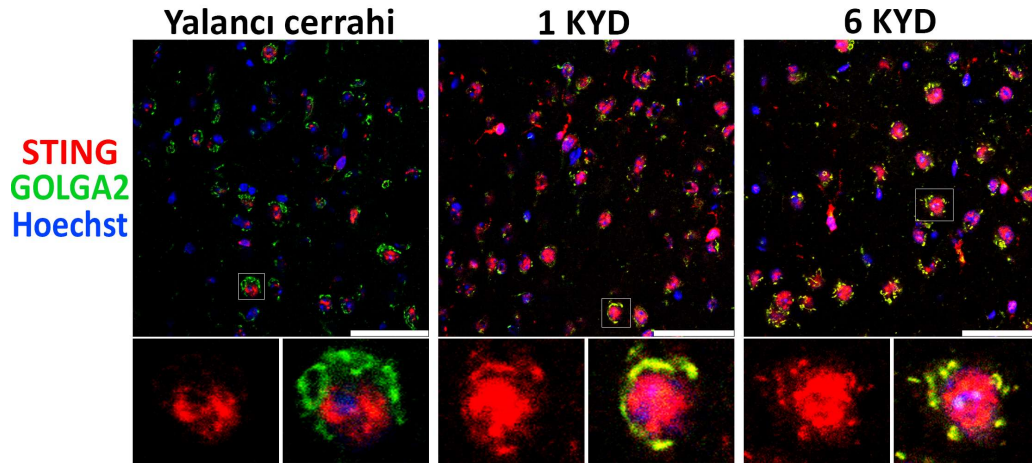
cGAS-STING yolağı aktifleşmesinde STING proteininin oligomerize olup Golgi veziküllerine geçiş yaptığı bilgisinden yola çıkarak yolak aktivasyonunu gösteren ek bulgu olarak STING proteini, bir Golgi belirteci olan GOLGA2 ile beraber immünofloresan yolla işaretlenmiştir (263). Yalancı cerrahi uygulanan grupta STING proteini ile Golgi belirteci arasında kolokalizasyon gözlenmezken hem tek hem altı KYD dalgası tetiklenen gruplarda STING proteininin Golgi belirteciyle kolokalizasyonu olduğu görülmüştür (Şekil 4.3.). Bu bulgular tek KYD dalgası tetiklenmesinin bile serebral kortekste cGAS-STING yolağı aktivasyonuna neden olabileceğine işaret etmektedir.



Şekil 4.1. KYD sonrası ipsilateral pariyetal kortekste cGAS-STING yolu proteinlerinin ifadesinin immüno Floresan işaretleme ile incelenmesi. cGAS, STING, p-IRF3 ve IFN- β proteinlerinin (kırmızı) yalancı cerrahi uygulanan, tek KYD tetiklenen ve altı KYD tetiklenen farelerin ipsilateral pariyetal korteks bölgesinde immüno Floresan işaretlenmesini gösteren örnek mikroskop görüntüleri. Yolak proteinlerinin işaretlenmesinin tek KYD ve altı KYD tetiklenen gruplarda arttığı gözlenmektedir. Ölçek çubukları 50 mikrometreyi göstermektedir.



Şekil 4.2. KYD sonrası ipsilateral pariyetal kortekste cGAS-STING yolağı proteinleri için immünopozitif hücre oranlarının belirlenmesi. cGAS, STING, p-IRF3 ve IFN- β proteinlerinin immüno Floresan işaretlenmesinin kantifiye edilmesi için, yalancı cerrahi, tek KYD ve altı KYD sonrası 5. saatte ve 24. saatte ilgilenilen proteinler için immünopozitif olan hücrelerin, toplam hücre sayısına oranı belirlenmiştir ($n=6/\text{grup}$). İncelenen yolak proteinleri için immünopozitif hücre oranları hem tek KYD hem altı KYD sonrası iki zaman noktasında artış göstermiştir. Grafiklerdeki veri noktaları bir hayvanın verisini göstermektedir ve her veri noktası birbiriyle kesişmeyen 3 görüntüden elde edilen sonuçların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Grafiklerde veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası ile gösterilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için Welch düzeltmesi yapılarak student t testi kullanılmıştır. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

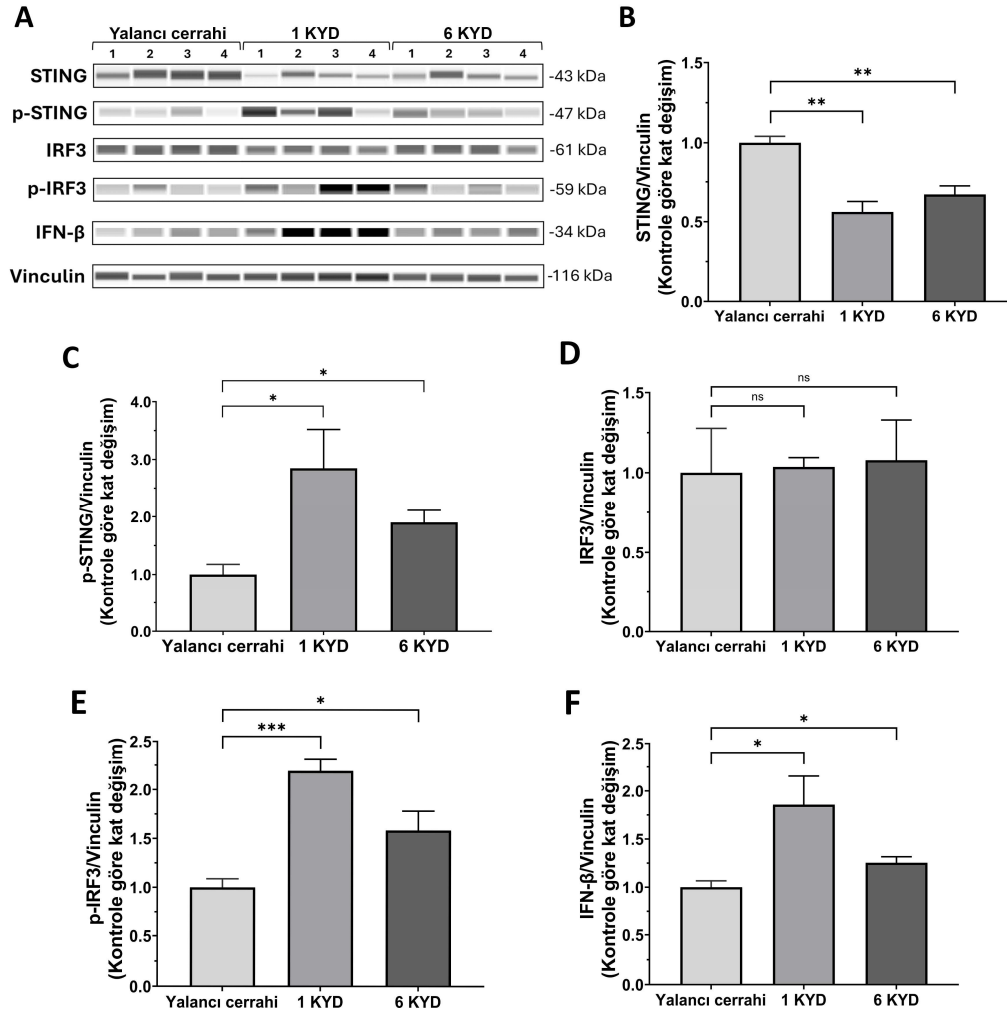


Şekil 4.3. KYD sonrası STING proteininin Golgi veziküllerine geçişinin immüno Floresan işaretleme ile incelenmesi. Yalancı cerrahi uygulanan, tek KYD ve altı KYD tetiklenen farelerin ipsilateral pariyetal korteks bölgesinde STING proteini ile Golgi belirteci olan GOLGA2 proteininin ikili immüno Floresan işaretlenmesi sonrası kolokalizasyonu değerlendirilmiştir. Üst görüntülerde beyaz karelere denk gelen ve aşağıda verilen büyütülmüş görüntülerde; yalancı cerrahi grubunda STING (kırmızı) ile GOLGA2 (yeşil) arasında kolokalizasyon gözlenmezken KYD tetiklenen gruplarda STING proteininin GOLGA2 ile kolokalize olduğu (sarı) görülmektedir. Ölçek çubukları 50 mikrometreyi göstermektedir.

4.1.2. KYD Sonrası Serebral Kortekste cGAS-STING Yolağı Proteinlerinin Seviyesi Artmaktadır

KYD tetiklenmesi sonrası serebral kortekste cGAS-STING yolağı protein seviyelerinin kantitatif olarak incelenmesi için bir ve altı KYD dalgası tetiklenen ve yalancı cerrahi uygulanan hayvanların ipsilateral serebral korteks örneklerinde kapiller temelli Western blot analizi (WES) yapılmıştır ($n=4/\text{grup}$). İmmüno Floresan işaretlemelerde yolak proteinlerinin ifadesinin KYD sonrası 5. ve 24. saatlerde karşılaştırılabilir düzeyde arttığı görüldüğü için WES ile protein tayini için hayvanların beyinleri KYD tetiklendikten 5 saat sonra alınmıştır. Hem tek hem altı KYD dalgası sonrası kortekste total STING proteini seviyesinin azaldığı (Yalancı cerrahi: $1 \pm 0,04$ ve tek KYD: $0,56 \pm 0,06$, $p=0,002$; altı KYD: $0,67 \pm 0,05$, $p=0,003$, yalancı cerrahi grubuna göre kat değişim), p-STING proteini seviyesinin arttığı gözlenmiştir (Yalancı cerrahi: $1 \pm 0,17$ ve tek KYD: $2,84 \pm 0,67$, $p=0,028$; altı KYD: $1,90 \pm 0,21$, $p=0,036$, yalancı cerrahi grubuna göre kat değişim) (Şekil 4.4.). STING seviyeleri arasındaki bu ayırım, aktivasyon sırasında STING proteininin fosforilasyon ve palmitoylasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlara uğramasıyla uyumludur ve STING down-

regülasyonundan ziyade aktivasyon sırasındaki post-translasyonel modifikasyonlara işaret etmektedir (213, 256, 264, 265). Bununla paralel olarak STING'in efektörleri olan p-IRF3 ve IFN- β proteinlerinin seviyeleri altı KYD dalgası tetiklendikten sonra, yalancı cerrahi grubuna kıyasla belirgin artış göstermiştir (Yalancı cerrahi ve altı KYD sırasıyla, p-IRF3: $1\pm0,08$ ve $1,58\pm0,19$, $p=0,042$; IFN- β : $1\pm0,07$ ve $1,25\pm0,06$, $p=0,023$, yalancı cerrahi grubuna göre kat değişim) (Şekil 4.4.). Tek KYD dalgası tetiklenmesinin de p-IRF3 ve IFN- β protein seviyelerinde güçlü bir artışa neden olduğu görülmüştür (Yalancı cerrahi ve tek KYD sırasıyla, p-IRF3: $1\pm0,08$ ve $2,19\pm0,11$, $p<0,001$; IFN- β : $1\pm0,07$ ve $1,85\pm0,33$, $p=0,042$, yalancı cerrahi grubuna göre kat değişim) (Şekil 4.4.). KYD sonrası cGAS-STING yolağı proteinlerinin ifadesinin değişimine cinsiyet etkisi görülmemiştir ($p=0,774$, iki yönlü ANOVA). Beraber ele alındığında bu bulgular KYD tetiklenmesi sonrası cGAS-STING yolağının aktifleştğini göstermektedir.



Şekil 4.4. KYD tetiklenmesi sonrası ipsilateral parietal kortekste cGAS-STING yolağı proteinlerinin seviyelerinin kapiller temelli Western blot analizi (WES) ile kantifiye edilmesi. A) STING, p-STING, IRF3, p-IRF3, IFN-β ve yükleme kontrolü vinkülin proteinleri için WES analizinde oluşturulan örnek bant görüntüleri (n=4/grup). B-F) STING, p-STING, IRF3, p-IRF3 ve IFN-β protein seviyelerinin WES analizi ile belirlenmesi. KYD tetiklenen gruplarda toplam STING proteini seviyesinde azalma, p-STING seviyesinde artış görülmüştür. p-IRF3 ve IFN-β proteinlerinin seviyeleri de KYD tetiklenmesi sonrası artmıştır. Her protein için hesaplanan seviyeler, yükleme kontrolü vinküline oranlanarak normalize edilmiştir. Grafiklerde veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası ile gösterilmiştir ve yalancı cerrahi kontrol grubuna göre kat değişim cinsinden sunulmuştur. İstatistiksel karşılaştırmalar için Welch düzeltmesi yapılarak student t testi kullanılmıştır. *not significant (ns):* $p > 0,05$, ***: $p < 0,05$, ****: $p < 0,01$, *****: $p < 0,001$.

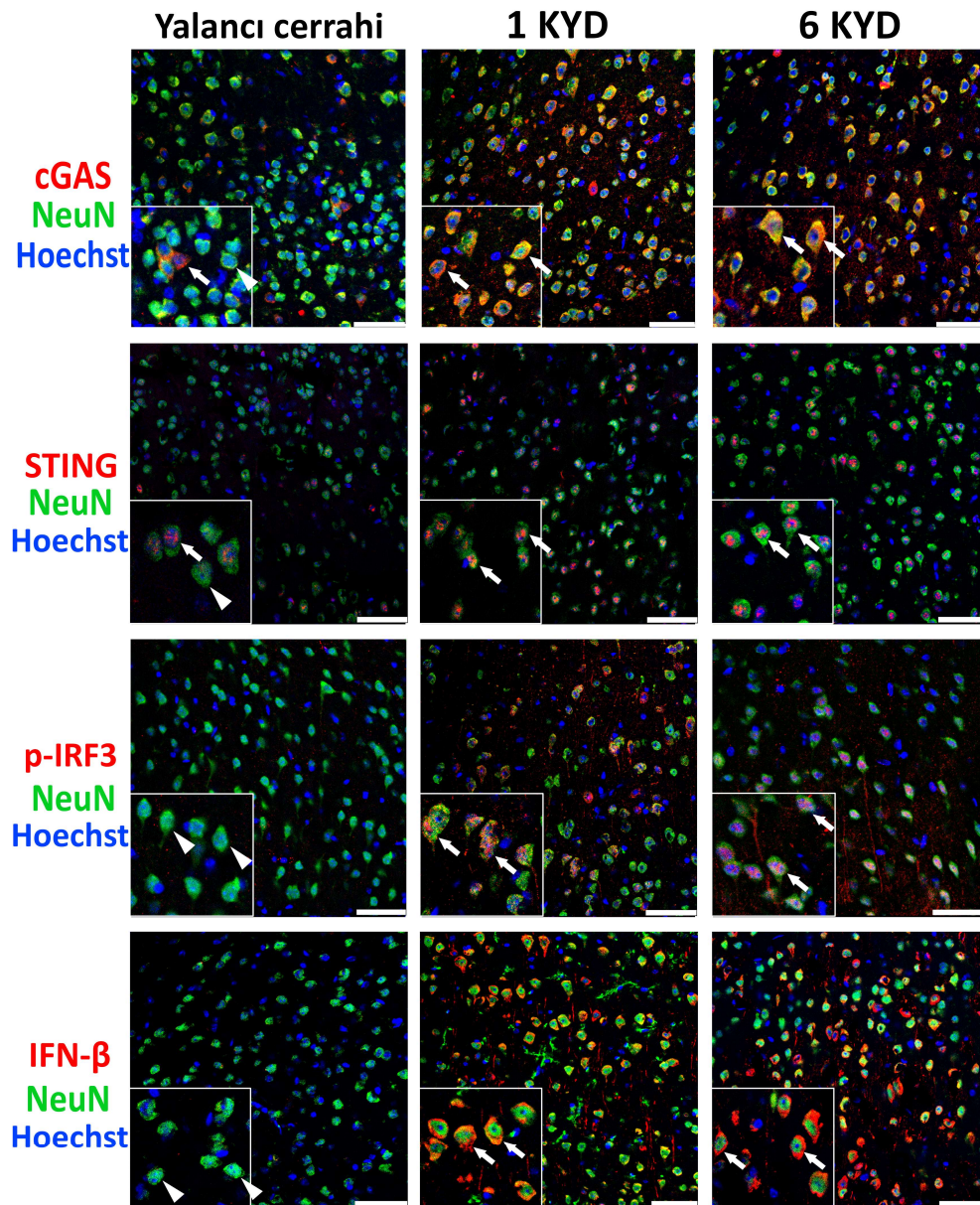
4.2. KYD Sonrası Serebral Kortekste cGAS-STING Yolağı Aktivitesinin Farklı Hücre Tiplerinde İncelenmesi

KYD tetiklenmesi sonrası serebral kortekste artan cGAS-STING yolağı aktivitesinin hangi hücre tiplerinden kaynaklandığının incelenmesi için yalancı cerrahi uygulanan ve tek ve altı KYD tetiklenen farelerden elde edilen beyin kesitlerinde cGAS, STING, p-IRF3 ve IFN- β proteinleri ile birlikte nöron (NeuN), mikrogliya (Iba1) ve astrosit (S100 β) hücre tiplerine spesifik hücre belirteçleri için ikili immüno Floresan işaretlemeler yapılmıştır. İncelemeler deney sonrası 5. ve 24. saatte yapılmıştır. İmmüno Floresan işaretleme yapılan kesitler lazer taramalı konfokal mikroskop yardımıyla görüntülenmiştir ve ipsilateral parietal korteks bölgesinden birbiriyle kesişmeyen 3 görüntü alınmıştır. Görüntülerde her hücre tipinde cGAS-STING yolağı proteinleri için immüno pozitif olan hücrelerin yüzdesi belirlenerek nöron, mikrogliya ve astrosit hücre tiplerinde cGAS-STING yolağı ifadesi kantifiye edilmiştir. 3 görüntüden elde edilen verilerin ortalaması alınarak bir hayvanın verisi olarak kullanılmıştır.

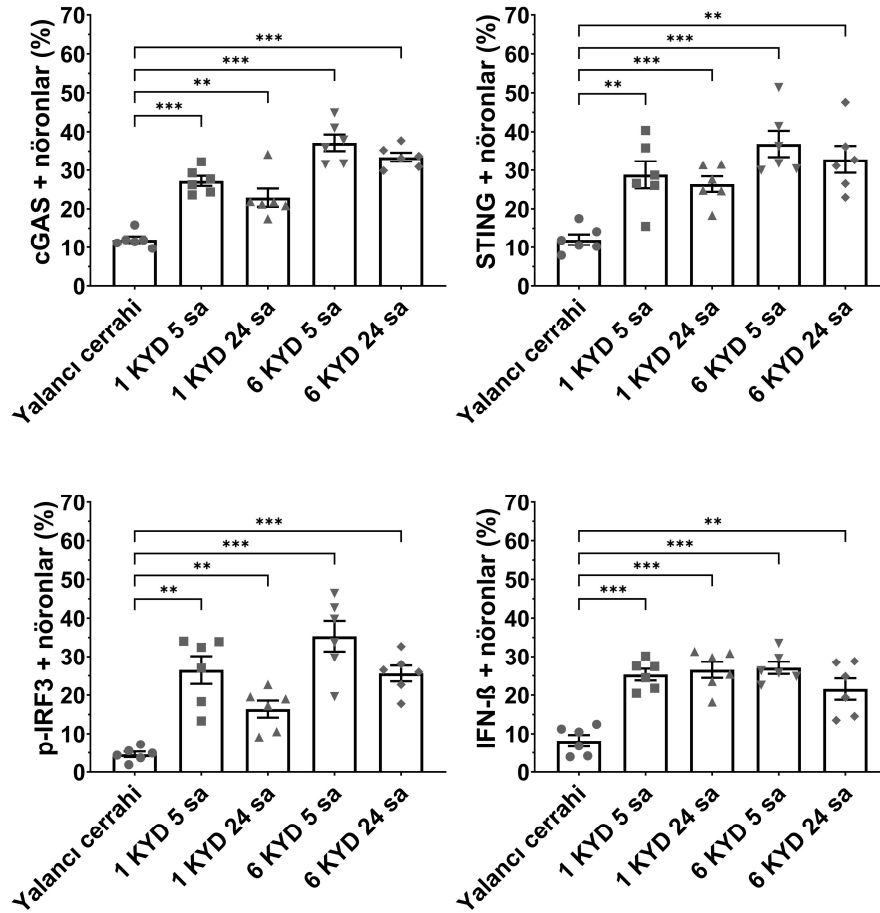
4.2.1. KYD Sonrası cGAS-STING Yolağı Aktivitesi Nöronlarda Artmaktadır

KYD tetiklenmesi sonrası ipsilateral parietal kortekste nöronlarda cGAS-STING yolağı aktivitesinin incelenmesi için yolak proteinleri, nöron belirteci NeuN ile beraber immüno Floresan işaretlenmiştir. Kontrol grubunda nöronlarda bazal durumda cGAS (Yalancı cerrahi: $12,01 \pm 0,83$) ve STING (Yalancı cerrahi: $12,02 \pm 1,37$) immüno pozitifliği gözlenmiştir (Şekil 4.5., Şekil 4.6.). Altı KYD tetiklendikten sonra 5. saatte ve 24. saatte cGAS ve STING immüno pozitifliğinde belirgin bir artış gözlenmiştir (cGAS: Yalancı cerrahi: $12,01 \pm 0,83$ ve altı KYD 5. saat: $37,15 \pm 2,13$ $p < 0,001$; altı KYD 24. saat: $33,42 \pm 1,16$, $p = 0,004$; STING: Yalancı cerrahi: $12,02 \pm 1,37$ ve altı KYD 5. saat: $36,85 \pm 3,40$, $p < 0,001$; altı KYD 24. saat: $32,84 \pm 3,50$, $p = 0,001$) (Şekil 4.5., Şekil 4.6.). Yolak aktivasyonu ile uyumlu olarak nöronlarda p-IRF3 ve IFN- β immüno pozitifliği de altı KYD tetiklenmesiyle anlamlı artış göstermiştir (p-IRF3: Yalancı cerrahi: $4,56 \pm 0,73$ ve altı KYD 5. saat: $35,30 \pm 3,99$, $p < 0,001$; altı KYD 24. saat: $25,58 \pm 2,05$, $p < 0,001$; IFN- β : Yalancı cerrahi: $8,16 \pm 1,51$ ve altı KYD 5. saat: $27,05 \pm 1,59$, $p < 0,001$; altı KYD 24. saat: $21,56 \pm 2,76$, $p = 0,003$) (Şekil 4.7., Şekil 4.8.). Tek KYD tetiklenmesi de nöronlarda cGAS, STING, p-IRF3 ve IFN- β immüno pozitifliğinde anlamlı artışa neden olmuştur

(cGAS: Yalancı cerrahi: $12,01 \pm 0,83$ ve tek KYD 5. saat: $27,22 \pm 1,31$, $p < 0,001$; tek KYD 24. saat: $22,90 \pm 2,35$, $p = 0,004$; STING: Yalancı cerrahi: $12,02 \pm 1,37$ ve tek KYD 5. saat: $28,83 \pm 3,52$, $p = 0,003$; tek KYD 24. saat: $26,42 \pm 2,03$, $p < 0,001$; p-IRF3: Yalancı cerrahi: $4,56 \pm 0,73$ ve tek KYD 5. saat: $26,49 \pm 3,59$, $p = 0,001$; tek KYD 24. saat: $16,37 \pm 2,18$, $p = 0,002$; IFN- β : Yalancı cerrahi: $8,16 \pm 1,51$ ve tek KYD 5. saat: $25,28 \pm 1,52$, $p < 0,001$; tek KYD 24. saat: $26,52 \pm 2,10$, $p < 0,001$)(Şekil 4.5., Şekil 4.6.). Bu bulgularımız serebral kortekste KYD sonrası cGAS-STING yoluğu aktivitesinin nöronlarda belirgin ölçüde arttığını göstermektedir.



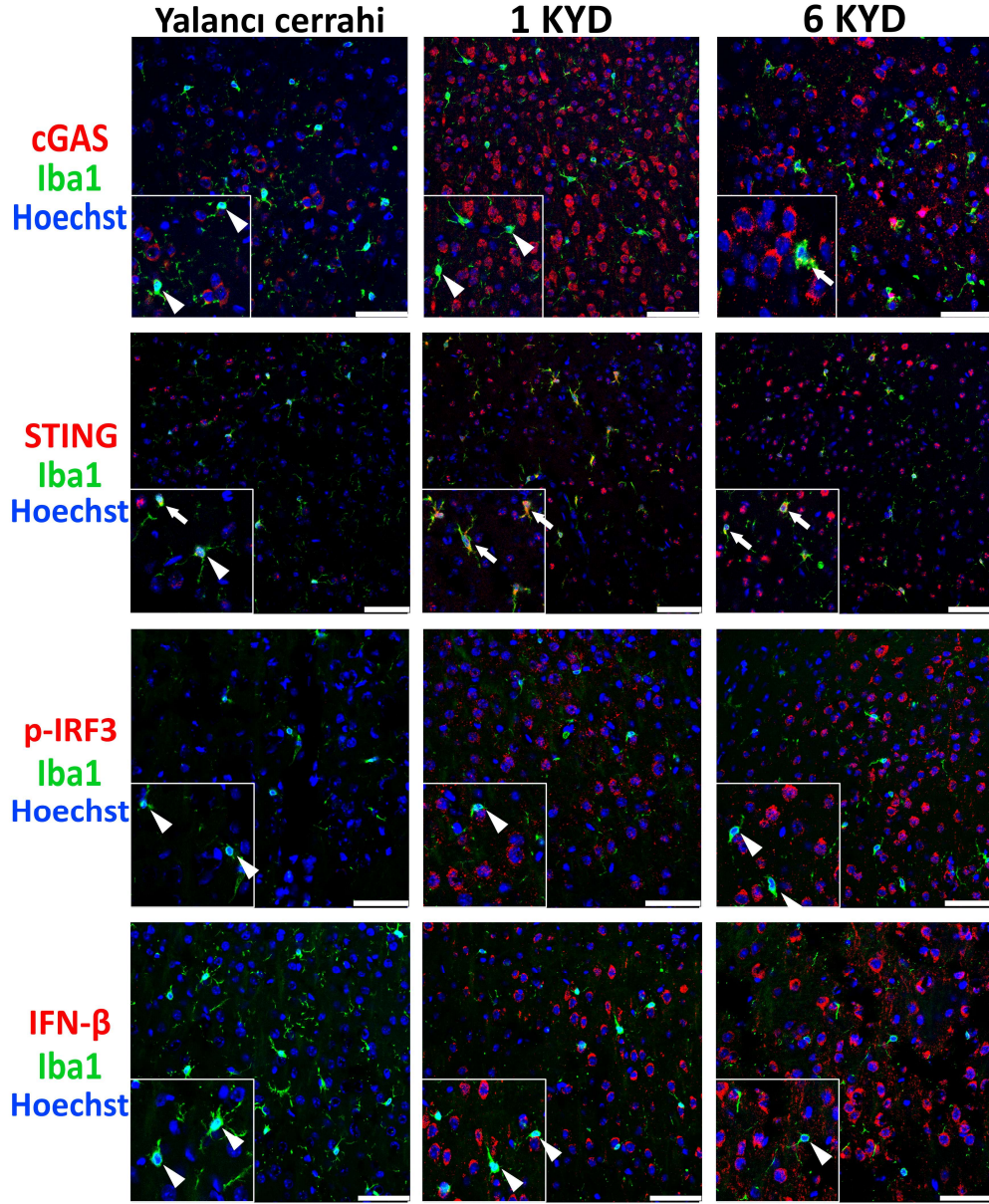
Şekil 4.5. KYD sonrası ipsilateral pariyetal kortekste nöronlarda cGAS-STING yolağı proteinlerinin ifadesinin ikili immüno Floresan işaretleme ile incelenmesi. KYD tetiklenen ve kontrol beyin kesitlerinde cGAS, STING, p-IRF3 ve IFN- β proteinlerinin (kırmızı) nöron belirteci NeuN (yeşil) ile ikili immüno Floresan işaretlenmesini gösteren örnek mikroskop görüntüleri. İncelenen yolak proteinlerinin nöron belirteci NeuN ile kolokalizasyonunun KYD tetiklenmesi sonrası arttığı gözlenmiştir. Ölçek çubukları 50 mikrometreyi göstermektedir. Ekli küçük resimlerde beyaz oklarla gösterilen hücreler ilgilenilen protein (kırmızı) için immüno pozitif hücreleri, beyaz ok başları ilgilenilen protein için immüno negatif hücreleri göstermektedir.



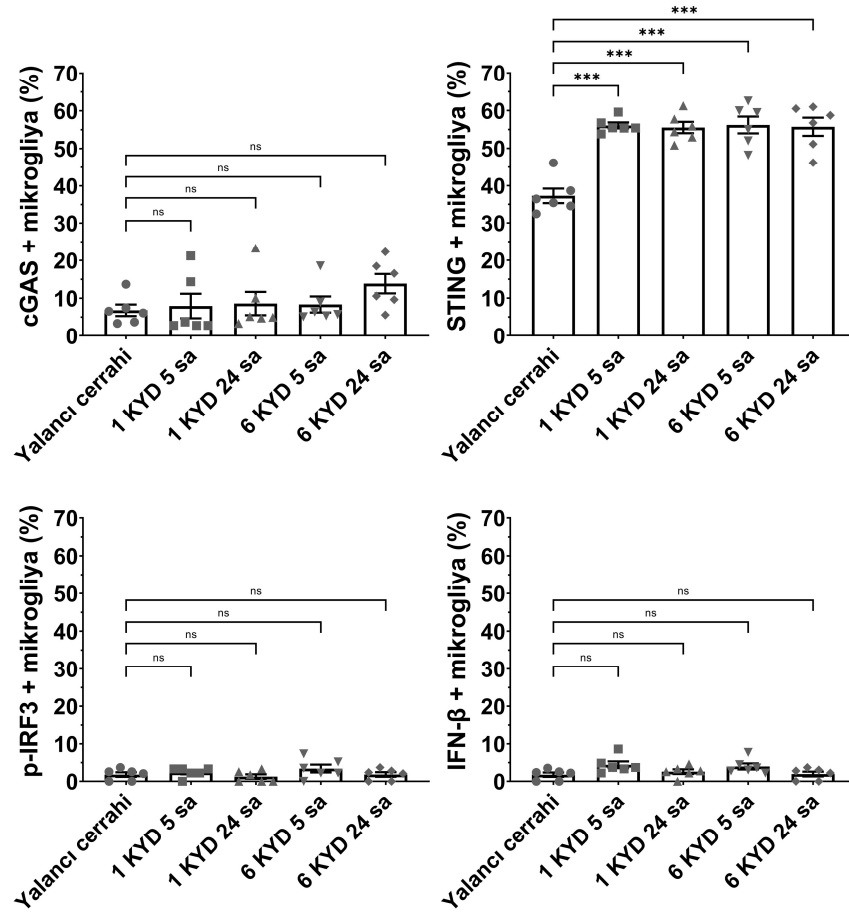
Şekil 4.6. KYD sonrası ipsilateral pariyetal kortekste cGAS-STING yolağı proteinleri için immüno pozitif olan nöron yüzdesinin belirlenmesi. Yalancı cerrahi, tek KYD ve altı KYD sonrası 5. saat ve 24. saatte cGAS, STING, p-IRF3 ve IFN- β proteinleri için immüno pozitif olan nöron sayısı, toplam nöron sayısına oranlanmıştır (n=6/grup). cGAS-STING yolağı proteinleri için immüno pozitif olan nöron yüzdesinin hem tek hem de altı KYD sonrası iki zaman noktasında arttığı görülmüştür. Grafiklerdeki veri noktaları bir hayvanın verisini göstermektedir ve her veri noktası birbiriyle kesişmeyen 3 görüntüden elde edilen sonuçların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Grafiklerde veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası ile gösterilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için Welch düzeltmesi yapılarak student t testi kullanılmıştır. **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

4.2.2. KYD Sonrası cGAS-STING Yolağı Aktivitesi Mikroglialarda Artış Göstermemektedir

Beynin yerleşik bağışıklık hücreleri olması bakımından serebral kortekste KYD sonrası mikroglialardaki cGAS-STING yolağı aktivitesi de incelenmiştir. Bunun için cGAS-STING yolağı proteinleri, mikroglia belirteci Iba1 ile beraber immüno Floresan işaretlenmiştir. Mikroglialarda bazal durumda yüksek STING immüno pozitifliği (Yalancı cerrahi: $37,26 \pm 1,95$) gözlenmiştir. Mikroglialarda STING immüno pozitifliği hem tek hem altı KYD sonrası anlamlı artış göstermiştir (Yalancı cerrahi: $37,26 \pm 1,95$ ve tek KYD 5. saat: $56,06 \pm 0,80$, $p < 0,001$; tek KYD 24. saat: $55,52 \pm 1,50$, $p < 0,001$; altı KYD 5. saat: $56,19 \pm 2,22$, $p < 0,001$; altı KYD 24. saat: $55,71 \pm 2,40$, $p = 0,002$) (Şekil 4.7., Şekil 4.8.). Ancak cGAS immüno pozitifliği KYD sonrası mikroglialarda anlamlı bir artış göstermemiştir (Yalancı cerrahi: $6,79 \pm 1,52$ ve tek KYD 5. saat: $7,92 \pm 3,23$, $p = 0,759$; tek KYD 24. saat: $8,58 \pm 3,08$, $p = 0,617$; altı KYD 5. saat: $8,33 \pm 2,11$, $p = 0,568$; altı KYD 24. saat: $13,84 \pm 2,56$, $p = 0,452$) (Şekil 4.7., Şekil 4.8.). Yolak aktivasyonunu gösteren p-IRF3 ve IFN- β proteinlerinin immüno pozitifliği de mikroglialarda KYD tetiklenmesi sonrası artış göstermemiştir (p-IRF3: Yalancı cerrahi: $1,81 \pm 0,61$ ve tek KYD 5. saat: $2,40 \pm 0,52$, $p = 0,485$; tek KYD 24. saat: $1,27 \pm 0,60$, $p = 0,542$; altı KYD 5. saat: $3,41 \pm 1,04$, $p = 0,224$; altı KYD 24. saat: $1,82 \pm 0,61$, $p = 0,994$; IFN- β : Yalancı cerrahi: $1,79 \pm 0,58$ ve tek KYD 5. saat: $4,40 \pm 0,90$, $p = 0,074$; tek KYD 24. saat: $2,58 \pm 0,61$, $p = 0,371$; altı KYD 5. saat: $3,96 \pm 0,81$, $p = 0,087$; altı KYD 24. saat: $1,95 \pm 0,64$, $p = 0,846$) (Şekil 4.7., Şekil 4.8.). KYD sonrası mikroglialarda STING ifadesinde artış olsa da diğer yolak proteinlerinde belirgin artış olmaması, çalışılan zaman diliminde cGAS-STING yolağı aktivasyonunun mikroglialarda sınırlı olduğuna işaret etmektedir.



Şekil 4.7. KYD sonrası ipsilateral parietal kortekste mikrogliyalarda cGAS-STING yolağı proteinlerinin ifadesinin ikili immüno Floresan işaretleme ile incelenmesi. KYD tetiklenen ve kontrol beyin kesitlerinde cGAS, STING, p-IRF3 ve IFN- β proteinlerinin (kırmızı) mikrogliya belirteci Iba1 (yeşil) ile ikili immüno Floresan işaretlenmesini gösteren örnek mikroskop görüntüleri. KYD tetiklenmesi sonrası STING proteininin mikrogliya belirteci Iba1 ile kolokalizasyonunda artış görülmüştür ancak incelenen diğer yolak proteinleri mikrogliya belirteci Iba1 ile kolokalizasyon göstermemiştir. Ölçek çubukları 50 mikrometreyi göstermektedir. Ekli küçük resimlerde beyaz oklarla gösterilen hücreler ilgilenilen protein (kırmızı) için immüno pozitif hücreleri, beyaz ok başları ilgilenilen protein için immüno negatif hücreleri göstermektedir.

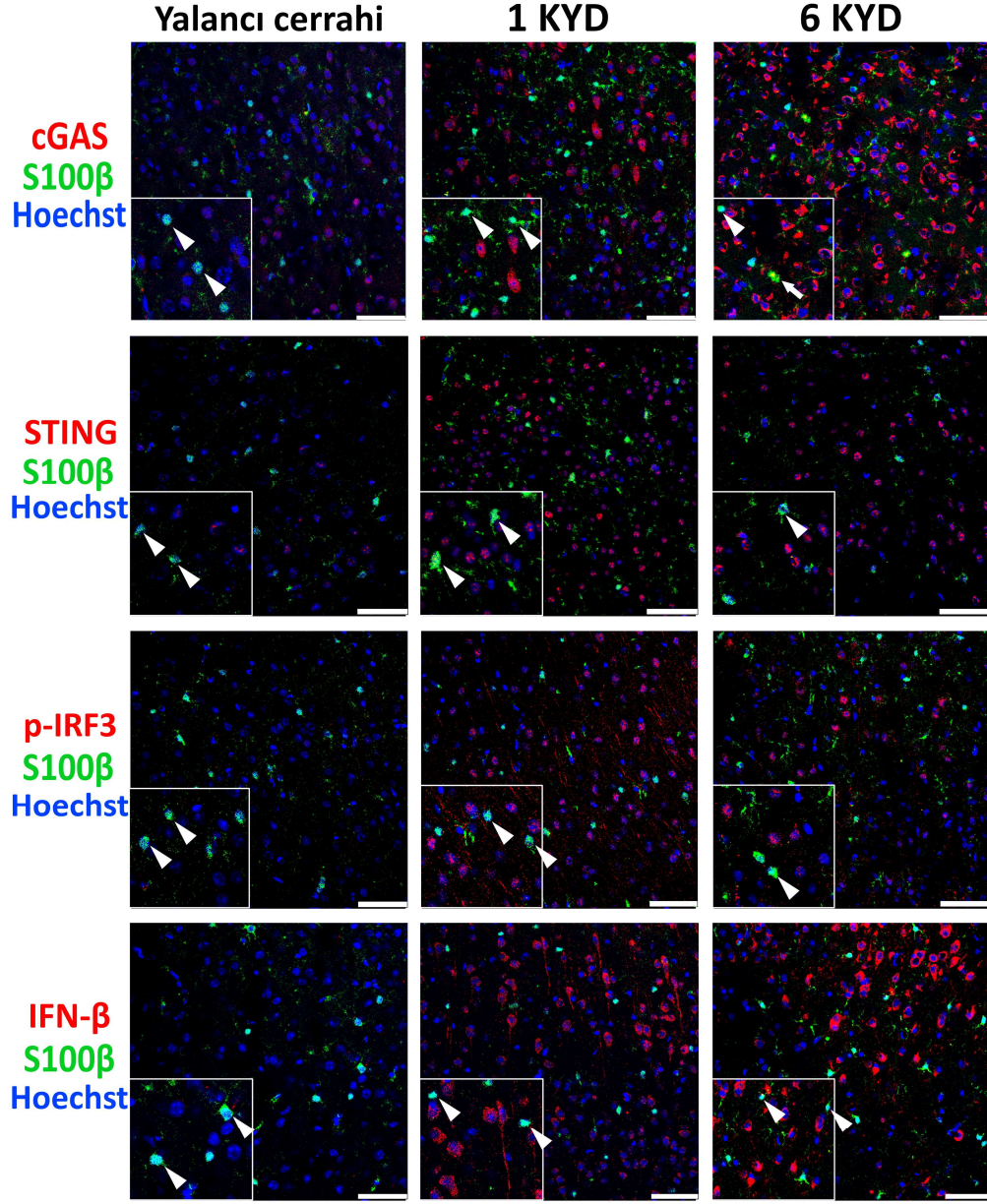


Şekil 4.8. KYD sonrası ipsilateral parietal kortekste cGAS-STING yolağı proteinleri için immüno pozitif olan mikrogliya yüzdesinin belirlenmesi. Yalancı cerrahi, tek KYD ve altı KYD sonrası 5. saat ve 24. saatte cGAS, STING, p-IRF3 ve IFN-β proteinleri için immüno pozitif olan mikrogliya sayısı, toplam mikrogliya sayısına oranlanmıştır (n=6/grup). KYD tetiklenmesi sonrası STING proteini için immüno pozitif olan mikrogliya yüzdesi artmıştır ancak incelenen diğer yolak proteinleri için immüno pozitif olan mikrogliya yüzdesi belirgin değişiklik göstermemiştir. Grafiklerdeki veri noktaları bir hayvanın verisini göstermektedir ve her veri noktası birbiriyle kesişmeyen 3 görüntüden elde edilen sonuçların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Grafiklerde veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası ile gösterilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için Welch düzeltmesi yapılarak student t testi kullanılmıştır. *not significant (ns):* $p > 0,05$, ****:* $p < 0,001$.

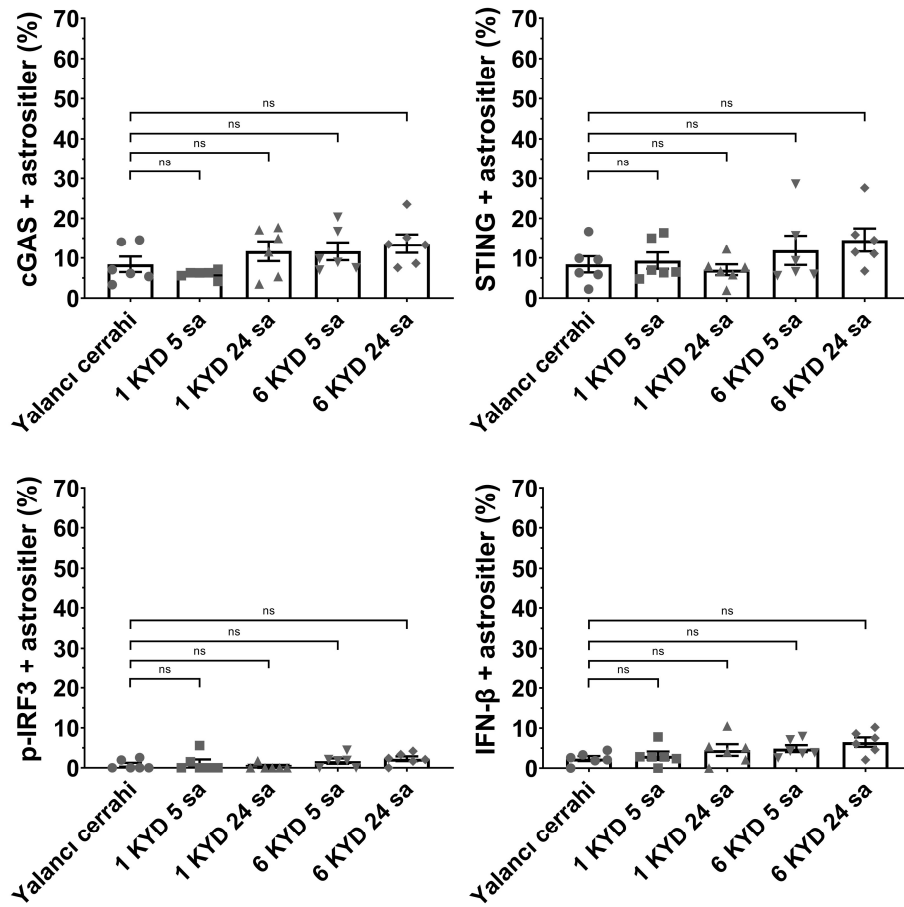
4.2.3. KYD Sonrası cGAS-STING Yolağı Aktivitesi Astrositlerde Artış Göstermemektedir

Beyinde cGAS-STING aracılı nöroinflamasyonda rol oynadıkları bilinen astrositlerde de KYD sonrası yolak aktivasyonu değerlendirilmiştir. Bunun için cGAS-STING yolağı proteinleri, astrosit belirteci olan S100β ile birlikte immüno floresan

işaretlenmiştir. Astrositlerde bazal durumda cGAS (Yalancı cerrahi: $8,39 \pm 1,92$) ve STING (Yalancı cerrahi: $8,53 \pm 2,08$) immüno pozitifliği görülse de, tek veya altı KYD tetiklenmesi sonrası cGAS ve STING immüno pozitifliğinde anlamlı artış gözlenmemiştir (cGAS: Yalancı cerrahi: $8,39 \pm 1,92$ ve tek KYD 5. saat: $5,94 \pm 0,40$, $p=0,783$; tek KYD 24. saat: $11,69 \pm 2,47$, $p=0,329$; altı KYD 5. saat: $11,67 \pm 2,23$, $p=0,179$; altı KYD 24. saat: $13,59 \pm 2,32$, $p=0,132$; STING: Yalancı cerrahi: $8,53 \pm 2,08$ ve tek KYD 5. saat: $9,31 \pm 2,04$, $p=0,756$; tek KYD 24. saat: $7,04 \pm 1,36$, $p=0,590$; altı KYD 5. saat: $11,92 \pm 3,66$, $p=0,424$; altı KYD 24. saat: $14,52 \pm 2,92$, $p=0,118$) (Şekil 4.9., Şekil 4.10.). p-IRF3 ve IFN- β proteinlerinin immüno pozitifliği de astrositlerde KYD tetiklenmesi sonrası artış göstermemiştir (p-IRF3: Yalancı cerrahi: $0,75 \pm 0,48$ ve tek KYD 5. saat: $1,18 \pm 0,91$, $p=0,690$; tek KYD 24. saat: $0,29 \pm 0,20$, $p=0,436$; altı KYD 5. saat: $1,68 \pm 0,66$, $p=0,287$; altı KYD 24. saat: $2,27 \pm 0,58$, $p=0,074$; IFN- β : Yalancı cerrahi: $2,39 \pm 0,61$ ve tek KYD 5. saat: $3,09 \pm 1,03$, $p=0,574$; tek KYD 24. saat: $4,52 \pm 1,45$, $p=0,220$; altı KYD 5. saat: $4,88 \pm 0,86$, $p=0,426$; altı KYD 24. saat: $6,50 \pm 1,18$, $p=0,165$) (Şekil 4.9., Şekil 4.10.). Bu bulgular KYD sonrasında cGAS-STING yolağının astrositlerde aktifleşmediğine işaret etmektedir. Beraber ele alındığında bulgularımız, KYD sonrası serebral kortekste cGAS-STING yolağının temel olarak nöronlarda aktive olduğunu ve gliyal hücrelerde aktivasyonun sınırlı olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.9. KYD sonrası ipsilateral pariyetal kortekste astrositlerde cGAS-STING yolağı proteinlerinin ifadesinin ikili immüno Floresan işaretleme ile incelenmesi. KYD tetiklenen ve kontrol beyin kesitlerinde cGAS, STING, p-IRF3 ve IFN- β proteinlerinin (kırmızı) astrosit belirteci S100 β (yeşil) ile ikili immüno Floresan işaretlenmesini gösteren örnek mikroskop görüntüleri. KYD tetiklenmesi sonrası cGAS-STING yolağı proteinlerinin astrosit belirteci S100 β ile kolokalizasyonunda artış görülmemektedir. Ölçek çubukları 50 mikrometreyi göstermektedir. Ekli küçük resimlerde beyaz oklarla gösterilen hücreler ilgilenilen protein (kırmızı) için immüno pozitif hücreleri, beyaz ok başları ilgilenilen protein için immüno negatif hücreleri göstermektedir.

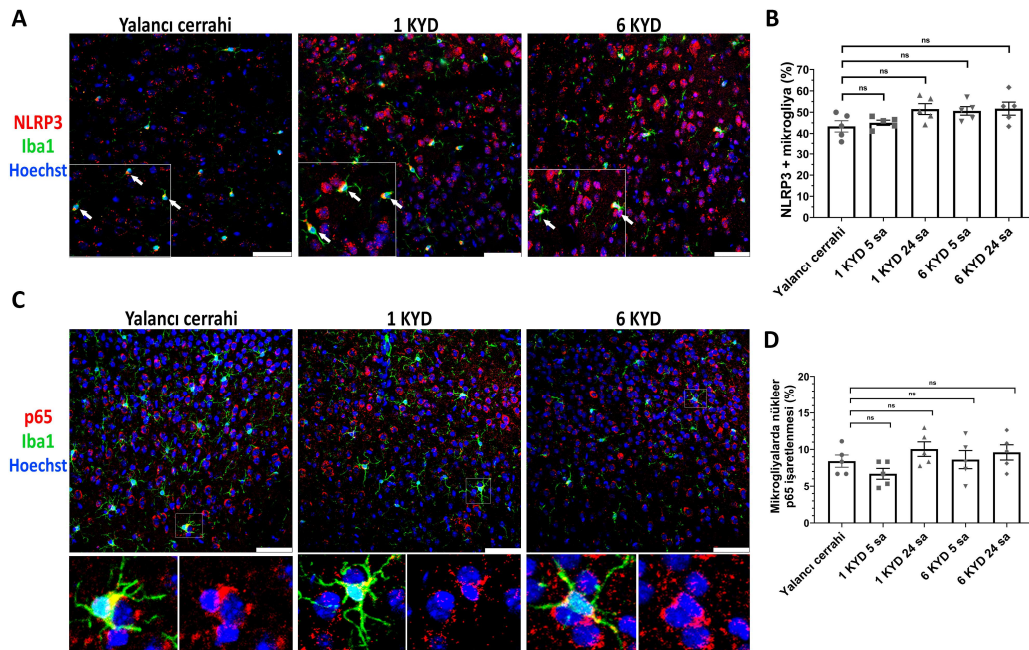


Şekil 4.10. KYD sonrası ipsilateral parietal kortekste cGAS-STING yolağı proteinleri için immüno pozitif olan astrosit yüzdesinin belirlenmesi. Yalancı cerrahi, tek KYD ve altı KYD sonrası 5. saat ve 24. saatte cGAS, STING, p-IRF3 ve IFN-β proteinleri için immüno pozitif olan astrosit sayısı, toplam astrosit sayısına oranlanmıştır (n=6/grup). cGAS-STING yolağı proteinleri için immüno pozitif olan astrosit yüzdesi KYD tetiklenmesi sonrasında artış göstermemiştir. Grafiklerdeki veri noktaları bir hayvanın verisini göstermektedir ve her veri noktası birbirleriyle kesişmeyen 3 görüntüden elde edilen sonuçların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Grafiklerde veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası ile gösterilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için Welch düzeltmesi yapılarak student t testi kullanılmıştır. *not significant (ns): $p > 0,05$*

4.2.4 KYD Sonrası Mikroglialardaki STING aktivasyonu NLRP3 İnflamazomu ve NF-κB Yolağını Aktifleştirmemektedir

cGAS-STING yolağının çeşitli nörolojik hasar durumlarında mikroglialarda NLRP3 inflamazomu ve NF-κB yolağı aracılı inflamasyonu uyarabildiği gösterilmiştir (55, 249, 266). KYD sonrasında mikroglialarda artan STING ifadesinin tip 1 interferon sentezi dışında başka yolları uyarıp uyarmadığının incelenmesi için,

NLRP3 inflamazomu ve NF- κ B p65 alt birimi mikroglia belirteci Iba1 ile beraber ikili immünofloresan işaretlemeyle incelenmiştir. Mikrogliaların bazal durumda yüksek NLRP3 immünopozitifliği olduğu görülmüştür ancak tek veya altı KYD tetiklenmesi mikroglialardaki NLRP3 immünopozitifliğinde değişime neden olmamıştır (Yalancı cerrahi: $43,38 \pm 2,66$ ve tek KYD 5. saat: $45,07 \pm 1,21$, $p=0,584$; tek KYD 24. saat: $51,48 \pm 2,55$, $p=0,089$; altı KYD 5. saat: $50,62 \pm 1,98$, $p=0,093$; altı KYD 24. saat: $51,68 \pm 3,06$, $p=0,175$) (Şekil 4.11.). NF- κ B p65 alt birimi, yolak aktive olduğunda çekirdeğe translokasyon gösteren bir proteindir. NF- κ B p65 işaretlenmesi mikroglialarda hem kontrol grubunda hem KYD tetiklenen gruplarda sitoplazmik pattern göstermiştir ve nükleer işaretlenme oranında artış olmamıştır (Yalancı cerrahi: $8,40 \pm 0,83$ ve tek KYD 5. saat: $6,68 \pm 0,64$, $p=0,162$; tek KYD 24. saat: $10,05 \pm 0,98$, $p=0,242$; altı KYD 5. saat: $8,61 \pm 1,23$, $p=0,893$; altı KYD 24. saat: $9,59 \pm 1,03$, $p=0,399$) (Şekil 4.11.). Bu bulgularımız çalıştığımız zaman diliminde mikroglialarda KYD sonrası artan STING ifadesinin NLRP3 inflamazomu ve NF- κ B yolağı aktifleşmesine neden olmadığını göstermektedir. Bu bulgu KYD sonrası NLRP3 inflamazomu ve NF- κ B yolağı aktifleşmesini çalışan daha önceki çalışmalarla uyumludur (27, 267, 268).



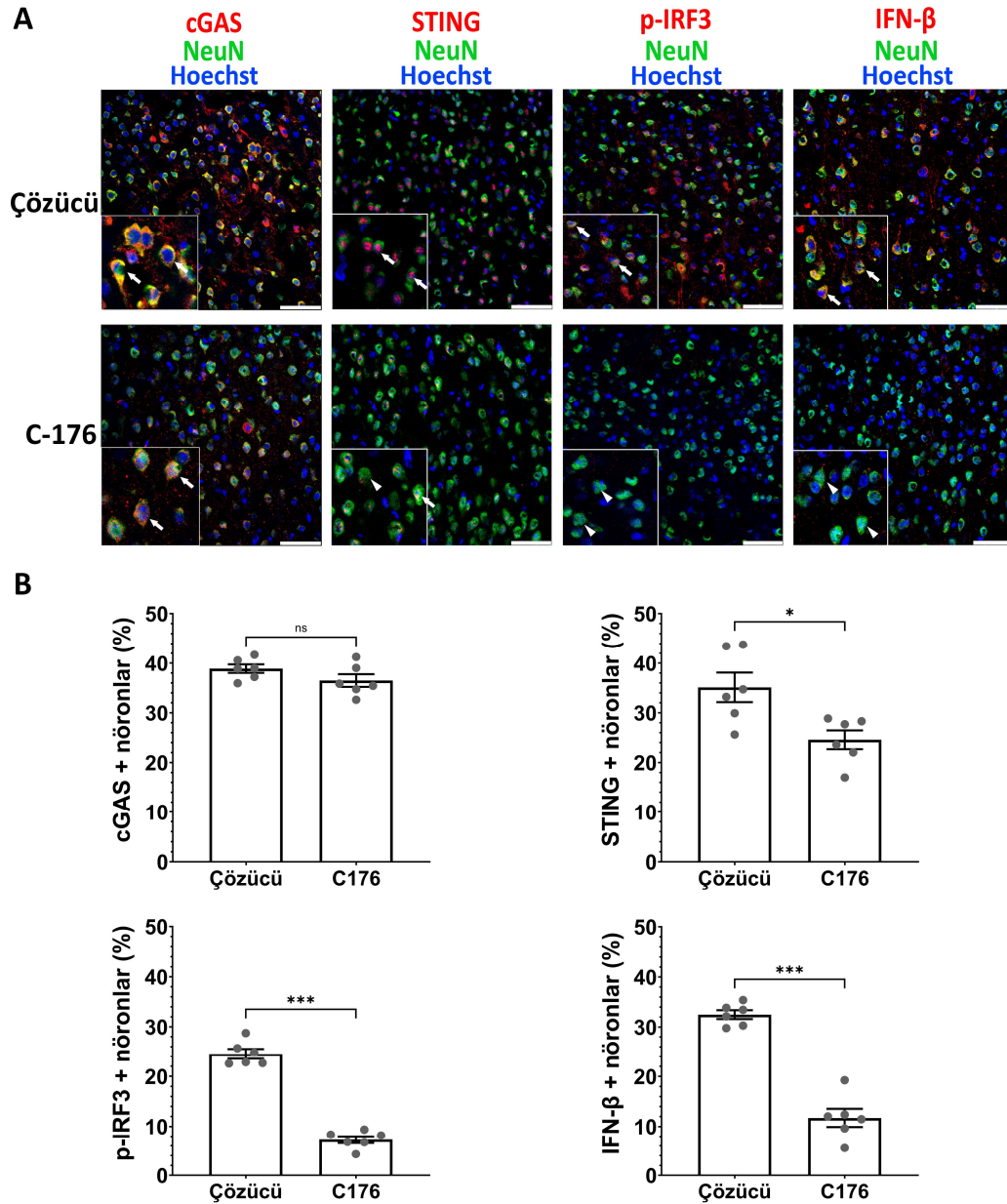
Şekil 4.11. KYD sonrası mikroglialarda NLRP3 inflamazomu ve NF- κ B yolağı aktivasyonunun ikili immünofloresan işaretleme ile incelenmesi. A) KYD tetiklenen

ve kontrol beyin kesitlerinde NLRP3 proteininin mikrogliya belirteci Iba1 (yeşil) ile ikili immüno Floresan işaretlenmesini gösteren örnek mikroskop görüntüleri. Hem yalancı cerrahi uygulanan hem de KYD tetiklenen gruplarda NLRP3 işaretlenmesinin mikrogliya belirteci Iba1 ile yüksek kolokalizasyon gösterdiği görülmektedir. Ölçek çubukları 50 mikrometreyi göstermektedir. Ekli küçük resimlerde beyaz oklarla gösterilen hücreler ilgilenilen protein (kırmızı) için immüno pozitif hücreleri göstermektedir. B) Yalancı cerrahi, tek KYD ve altı KYD sonrası 5. saat ve 24. saatte NLRP3 için immüno pozitif olan mikrogliya yüzdesinin belirlenmesi (n=5/grup). NLRP3 için immüno pozitif olan mikrogliya yüzdesinin KYD tetiklenmesi sonrasında belirgin değişiklik göstermediği görülmüştür. C) KYD tetiklenen ve kontrol beyin kesitlerinde NF- κ B p65 alt biriminin mikrogliya belirteci Iba1 ile ikili immüno Floresan işaretlenmesini gösteren örnek mikroskop görüntüleri. Ölçek çubukları 50 mikrometreyi göstermektedir. Orjinal görüntülerde beyaz karelere denk gelen büyütülmüş görüntülerde hem yalancı cerrahi uygulanan hem de KYD tetiklenen beyinlerde mikrogliyalarda NF- κ B p65 işaretlenmesinin büyük ölçüde sitoplazmik patternde olduğu ve nükleer işaretlenme olmadığı görülmektedir. D) Yalancı cerrahi, tek KYD ve altı KYD sonrası 5. saat ve 24. saatte p65 immüno pozitif mikrogliyalar arasında nükleer p65 işaretlenme patterni gösteren hücrelerin oranının belirlenmesi (n=5/grup). Nükleer p65 işaretlenmesi gösteren mikrogliya oranı KYD tetiklenmesi sonrasında artış göstermemiştir. Grafiklerdeki veri noktaları bir hayvanın verisini göstermektedir ve her veri noktası birbiriyle kesişmeyen 3 görüntüden elde edilen sonuçların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Grafiklerde veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası ile gösterilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için Welch düzeltmesi yapılarak student t testi kullanılmıştır. *not significant (ns): $p > 0,05$*

4.2.5 STING İnhibitörü C-176 KYD Sonrası Artan cGAS-STING Yolağı Aktivitesini Baskılamaktadır

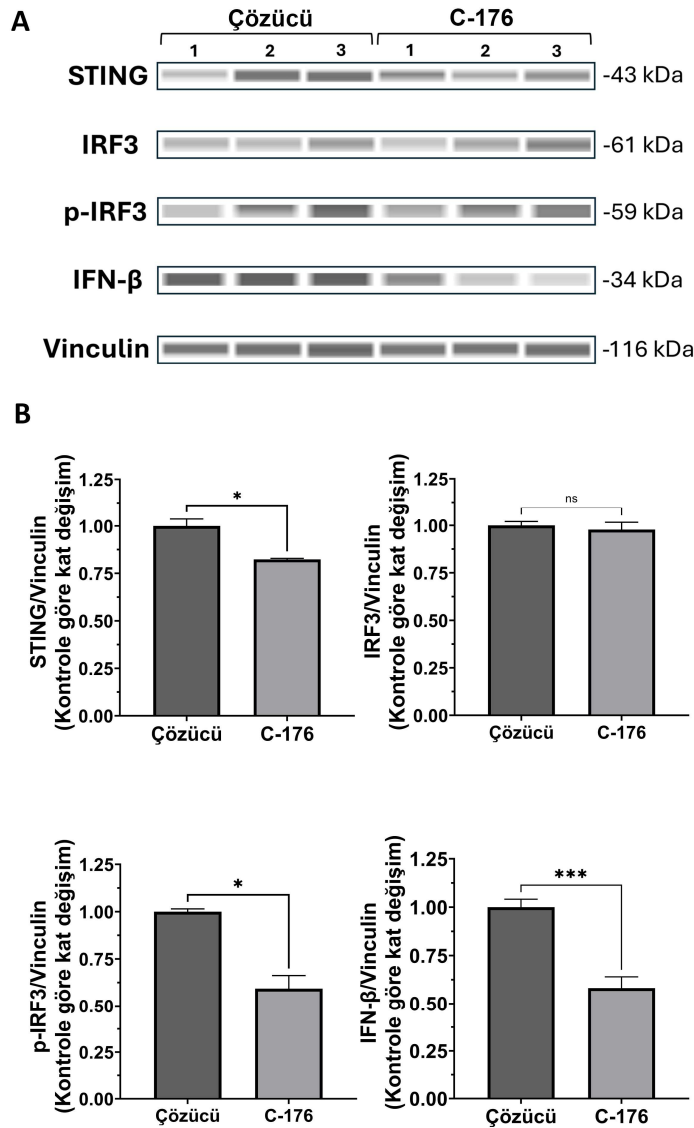
cGAS-STING yolağı aktifleşmesinin KYD ile ilişkili inflamatuvar ve nosiseptif cevaplardaki etkisinin incelenmesi için yolak aktivitesi spesifik agonist ve antagonistlerle farmakolojik olarak manipüle edilmiştir. STING inhibisyonu için STING'e spesifik kovalent inhibitör olan C-176 kullanılmıştır. C-176, KYD tetiklenmesinden 4 saat önce 20 mg/kg dozda intraperitoneal yolla uygulanmıştır (58, 256). Kontrol olarak ilacın sadece çözücüsünün (%5 DMSO) verildiği grup kullanılmıştır. İmmüno Floresan işaretleme ve kapiller temelli Western blot analizi (WES) yöntemleriyle cGAS-STING yolağı proteinlerinin ifadesinin incelenmesi için hayvanların beyinleri altı KYD dalgası tetiklenmesinden 24 saat sonra alınmıştır. Nöron belirteci NeuN ile beraber immüno Floresan işaretlemeyle bakıldığında, C-176 verilen grupta KYD sonrası nöronlarda cGAS hariç, diğer cGAS-STING yolağı proteinlerinin immüno pozitifliğinin, çözücü verilen gruptakine kıyasla belirgin olarak daha az olduğu görülmüştür (Çözücü ve C-176 sırasıyla, cGAS: $38,88 \pm 0,86$ ve

%36,49±1,27, $p=0,153$; STING: %35,11±2,97 ve %24,58±1,88, $p=0,016$; p-IRF3: %24,55±0,98 ve %7,29±0,72, $p<0,001$; IFN- β : %32,47±0,88 ve %11,73±1,81, $p<0,001$) (Şekil 4.12.). Bunu destekleyen şekilde kapiller temelli Western blot analizinde C-176 verilmiş grupta KYD sonrası kortekste STING, p-IRF3 ve IFN- β proteinlerinin seviyesinin çözücü verilmiş gruba kıyasla belirgin olarak daha düşük olduğu görülmüştür (Çözücü ve C-176 sırasıyla, STING: $1\pm0,03$ ve $0,82\pm0,005$, $p=0,037$; p-IRF3: $1\pm0,01$ ve $0,59\pm0,06$, $p=0,023$; IFN- β : $1\pm0,04$ ve $0,58\pm0,005$, $p<0,001$, çözücü grubuna göre kat değişim) (Şekil 4.13.). Bu bulgular sistemik C-176 uygulamasıyla beyinde etkin yolak inhibisyonu sağlanabildiğini ve KYD sonrası nöronlarda artan cGAS-STING yolağı aktivitesinin baskılanabildiğini göstermektedir.



Şekil 4.12. STING inhibitörü C-176 uygulaması ile KYD sonrası nöronlarda cGAS-STING yolu ifadesinin ikili immüno Floresan işaretleme ile incelenmesi. A) C-176 veya çözücü uygulanan hayvanlarda altı KYD sonrası cGAS, STING, p-IRF3 ve IFN- β proteinlerinin (kırmızı) nöron belirteci NeuN (yeşil) ile ikili immüno Floresan işaretlenmesini gösteren örnek mikroskop görüntüleri. C-176 uygulanmış grupta KYD tetiklenmesi sonrası STING, p-IRF3 ve IFN- β proteinlerinin nöronlardaki işaretlenmesinin azaldığı görülmektedir. Ölçek çubukları 50 mikrometreyi göstermektedir. Ekli küçük resimlerde beyaz oklarla gösterilen hücreler ilgilenilen protein (kırmızı) için immüno pozitif hücreleri, beyaz ok başları ilgilenilen protein için immüno negatif hücreleri göstermektedir. B) C-176 veya çözücü uygulanan hayvanlarda altı KYD sonrası cGAS, STING, p-IRF3 ve IFN- β proteinleri için

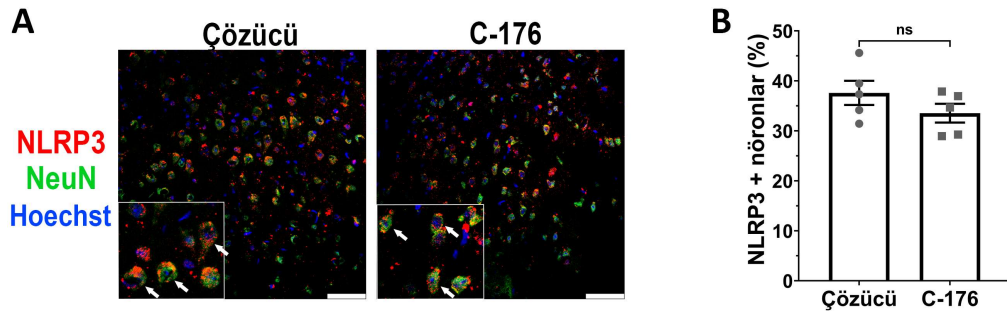
immünopozitif olan nöron yüzdesinin belirlenmesi (n=6/grup). C-176 uygulanmış grupta KYD tetiklenmesi sonrası cGAS için immünopozitif olan nöron yüzdesi belirgin değişiklik göstermemiştir ancak STING, p-IRF3 ve IFN- β proteinleri için immünopozitif olan nöron yüzdesi çözücü uygulanan gruba göre azalmıştır. Grafiklerdeki veri noktaları bir hayvanın verisini göstermektedir ve her veri noktası birbiriyle kesişmeyen 3 görüntüden elde edilen sonuçların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Grafiklerde veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası ile gösterilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için Welch düzeltmesi yapılarak student t testi kullanılmıştır. *not significant (ns):* $p > 0,05$, ***: $p < 0,05$, *****: $p < 0,001$.



Şekil 4.13. STING inhibitörü C-176 uygulaması ile KYD sonrası cGAS-STING yolağı ifadesinin kapiller temelli Western blot analizi ile incelenmesi A) C-176 veya çözücü uygulanan hayvanlarda altı KYD sonrası STING, IRF3, p-IRF3, IFN- β ve yükleme kontrolü vinkülin proteinleri için WES analizinde oluşturulan temsili bant görüntüleri

(n=3/grup). B) C-176 veya çözücü uygulanan hayvanlarda altı KYD sonrası STING, IRF3, p-IRF3 ve IFN- β protein seviyelerinin WES analizi ile belirlenmesi. C-176 uygulanmış grupta KYD tetiklenmesi sonrası STING, p-IRF3 ve IFN- β proteinlerinin seviyesinin çözücü uygulanan gruptakine kıyasla azalmış olduğu görülmektedir. Her protein için hesaplanan seviyeler, yükleme kontrolü vinküline oranlanarak normalize edilmiştir. Grafiklerde veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası ile gösterilmiştir ve çözücü kontrol grubuna göre kat değişim cinsinden sunulmuştur. İstatistiksel karşılaştırmalar için Welch düzeltmesi yapılarak student t testi kullanılmıştır. *not significant (ns)*: $p > 0,05$, *: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$.

KYD sonrasında nöronlarda NLRP3 inflamazomunun aktifleştiği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir ve cGAS-STING yolağının çeşitli nöroinflamatuvar durumlarda NLRP3 inflamazomu aktivasyonunda rol oynadığı bilinmektedir (27, 266). Bu bilgilerden yola çıkarak cGAS-STING yolağının KYD sonrası nöronlarda görülen NLRP3 inflamazomu aktivasyonunda rol oynayıp oynamadığının incelenmesi için C-176 ile STING inhibisyonu yapıp KYD tetiklenen hayvanlarda nöronlardaki NLRP3 ifadesi ikili immüno Floresan işaretleme ile incelenmiştir. KYD sonrası nöronlardaki NLRP3 immüno pozitifliği C-176 uygulanan ($33,53 \pm 1,88$) ve çözücü uygulanan ($37,59 \pm 2,42$) gruplar arasında belirgin fark göstermemiştir ($p=0,225$) (Şekil 4.14.). Bu bulgu KYD sonrası nöronlardaki NLRP3 inflamazomu aktivasyonunun cGAS-STING yolağı aktivitesinden bağımsız gerçekleştiğine işaret etmektedir.



Şekil 4.14. STING inhibitörü C-176 uygulaması ile KYD sonrası nöronlarda NLRP3 inflamazomu ifadesinin incelenmesi A) C-176 veya çözücü uygulanan hayvanlarda altı KYD sonrası NLRP3 proteininin (kırmızı) nöron belirteci NeuN (yeşil) ile ikili immüno Floresan işaretlenmesini gösteren örnek mikroskop görüntüleri. Hem çözücü uygulanan hem de C-176 uygulanan gruplarda KYD tetiklenmesi sonrası NLRP3 işaretlenmesinin nöron belirteci NeuN ile yüksek kolokalizasyon gösterdiği görülmektedir. Ölçek çubukları 50 mikrometreyi göstermektedir. Ekli küçük resimlerde beyaz oklarla gösterilen hücreler NLRP3 proteini (kırmızı) için immüno pozitif hücreleri göstermektedir. B) C-176 veya çözücü uygulanan hayvanlarda altı KYD sonrası NLRP3 proteini için immüno pozitif olan nöron

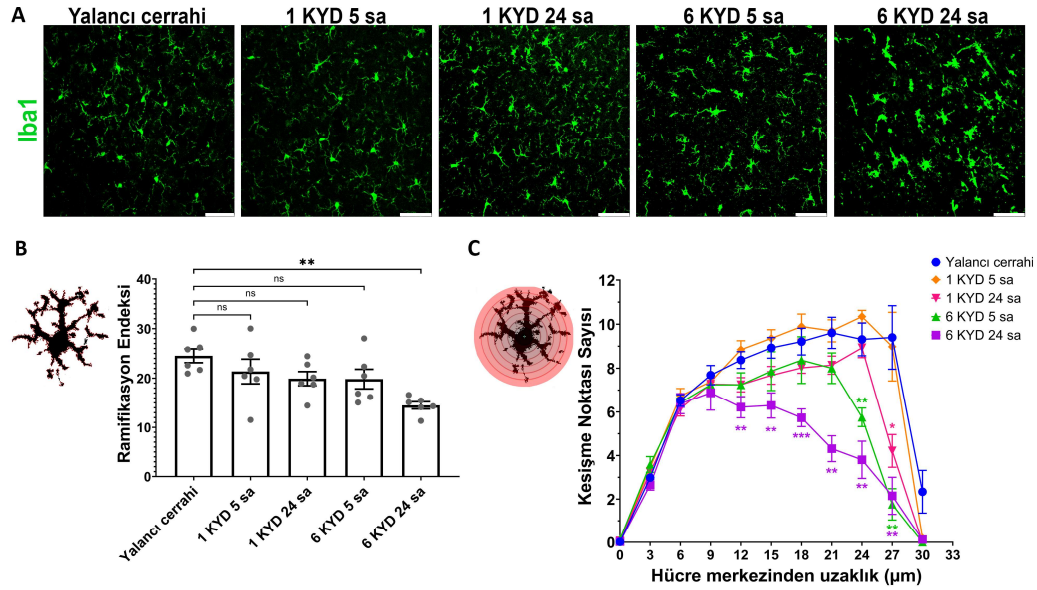
yüzdesinin belirlenmesi (n=5/grup). NLRP3 proteini için immüno pozitif olan nöron yüzdesi çözücü ve C-176 uygulanan gruplar arasında belirgin fark göstermemiştir. Grafiklerdeki veri noktaları bir hayvanın verisini göstermektedir ve her veri noktası birbiriyle kesişmeyen 3 görüntüden elde edilen sonuçların ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Grafiklerde veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası ile gösterilmiştir. İstatistiksel karşılaştırmalar için Welch düzeltmesi yapılarak student t testi kullanılmıştır. *not significant (ns):* $p > 0,05$

4.3. KYD Sonrası Serebral Kortekste Mikroglia Aktivasyonunun İncelenmesi

Çoklu KYD dalgalarının mikroglial aktivasyona neden olduğu gösterilmiştir (27, 28). Bu mikroglial aktivasyon küçük gövdeli, dallanan (*ramifiye*) uzantılara sahip mikroglia morfolojisinden, büyük gövdeli, kısa ve kalın uzantılara sahip *ameboid* morfolojiye geçişle karakterize morfolojik değişikliklerle tespit edilebilmektedir (28, 258, 259). cGAS-STING yolu aktivasyonunun mikroglial aktivasyonda rol oynayabileceği ve mikroglial M1 polarizasyonu desteklediği literatürde gösterilmiştir (61, 255, 269, 270). Çalışmamızda KYD sonrası kortekste artan cGAS-STING yolu aktivitesi ve mikroglialarda STING ifadesinde artışı gösteren bulgularımız üzerine cGAS-STING yolunun KYD ile ilişkili mikroglial aktivasyonda rolü olup olmadığı araştırıldı. Bunun için optogenetik yolla tek veya altı KYD tetiklenen ve yalancı cerrahi uygulanan hayvanların beyinleri deneyden 5 veya 24 saat sonra alınmış, beyinlerden elde edilen kesitlerde mikroglia belirteci Iba1 immüno floresan yolla işaretlenmiştir. Lazer taramalı konfokal mikroskop yardımıyla elde edilen görüntülerde mikroglia morfolojisinin analiz edilmesi için mikroglia hücreleri için ramifikasyon endeksi hesaplaması ve Sholl analizi uygulanmıştır (257-260). cGAS-STING yolunun KYD sonrası mikroglial aktivasyon üzerindeki etkisinin araştırılması için altı KYD dalgası tetiklenmesinden 4 saat önce spesifik STING inhibitörü C-176 (veya çözücüsü) intraperitoneal yolla uygulanmıştır. KYD tetiklenmesinden 24 saat sonra hayvanların beyinleri alınmış ve mikroglia morfolojisi analiz edilmiştir.

4.3.1. Çoklu KYD Tetiklenmesi Sonrası Serebral Kortekste Mikroglial Aktivasyon Gözlenmektedir

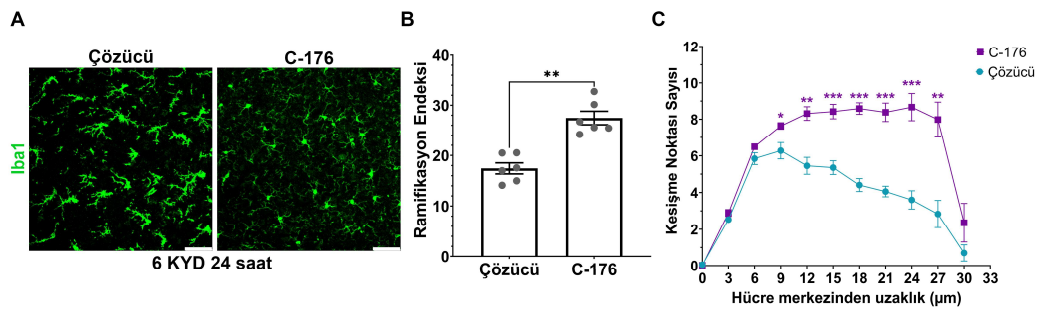
Tek ve altı KYD tetiklenen beyinlerde mikrogliyal aktivasyon incelendiğinde, altı KYD tetiklendikten sonra 24. saatte ipsilateral pariyetal kortekste mikrogliyaların büyük gövdeli ve kısa uzantılı *ameboid* morfoloji sergiledikleri ve ramifikasyon endeksi skorlarında yalancı cerrahi grubuna kıyasla anlamlı bir düşüş olduğu görülmüştür (Yalancı cerrahi: $24,54 \pm 1,39$ ve altı KYD 24. saat: $14,49 \pm 0,73$, $p=0,002$) (Şekil 4.15.). Altı KYD sonrası 5. saatte mikrogliyalarda belirgin morfolojik değişiklikler görülmemiştir ve ramifikasyon endeksi skorları yalancı cerrahi grubuna kıyasla anlamlı fark göstermemiştir (Yalancı cerrahi: $24,54 \pm 1,39$ ve altı KYD 5. saat: $19,83 \pm 1,99$, $p=0,093$) (Şekil 4.15.). Benzer şekilde tek KYD tetiklenen grupta hem 5. saatte hem 24. saatte mikrogliyalarda aktivasyonla uyumlu morfolojik değişiklikler gözlenmemiştir (Yalancı cerrahi: $24,54 \pm 1,39$ ve tek KYD 5. saat: $21,37 \pm 2,49$, $p=0,309$; tek KYD 24. saat: $19,92 \pm 1,42$, $p=0,064$) (Şekil 4.15.). Bu bulgularla paralel olarak, Sholl analiziyle mikrogliya uzantılarının karmaşıklığı incelendiğinde yalancı cerrahi grubuna kıyasla altı KYD sonrası 24. saatte, mikrogliyaların hücre merkezinden 12 mikrometre mesafeden itibaren daha az dallanan ve daha az karmaşık uzantılara sahip olduğu görülmüştür (Kesişme noktası sayısı, 12 mikrometrede yalancı cerrahi: $8,37 \pm 0,38$ ve altı KYD 24. saat: $6,22 \pm 0,48$, $p=0,009$; 24 mikrometrede yalancı cerrahi: $9,30 \pm 0,74$ ve altı KYD 24. saat: $3,80 \pm 0,85$, $p=0,001$; 27 mikrometrede yalancı cerrahi: $9,39 \pm 1,44$ ve altı KYD 24. saat: $2,15 \pm 0,85$, $p=0,004$) (Şekil 4.15.). Altı KYD sonrası 5. saatte ve tek KYD sonrası iki zaman noktasında mikrogliya uzantılarının karmaşıklığında, hücre merkezinden 24 mikrometre mesafeye kadar bir düşüş gözlenmemiştir (Kesişme noktası sayısı, 12 mikrometrede yalancı cerrahi: $8,37 \pm 0,38$ ve altı KYD 5. saat: $7,24 \pm 0,54$, $p=0,134$; tek KYD 5. saat: $8,84 \pm 0,40$, $p=0,421$; tek KYD 24. saat: $7,24 \pm 0,32$, $p=0,066$; 24 mikrometrede yalancı cerrahi: $9,30 \pm 0,74$ ve altı KYD 5. saat: $5,75 \pm 0,42$, $p=0,005$; tek KYD 5. saat: $10,35 \pm 0,28$, $p=0,246$; tek KYD 24. saat: $8,92 \pm 0,44$, $p=0,675$; 27 mikrometrede yalancı cerrahi: $9,39 \pm 1,44$ ve altı KYD 5. saat: $1,76 \pm 0,72$, $p=0,003$; tek KYD 5. saat: $8,97 \pm 1,56$, $p=0,848$; tek KYD 24. saat: $4,21 \pm 0,75$, $p=0,018$) (Şekil 4.15.). KYD sonrası gözlenen mikrogliya morfolojisindeki değişimler üzerinde cinsiyet etkisi görülmemiştir ($p=0,877$, iki yönlü ANOVA). Bu bulgular çoklu KYD'den 24 saat sonra mikrogliyaların *ameboid* morfoloji sergilediklerini ve belirgin mikrogliyal aktivasyon olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.15. KYD tetiklenmesi sonrası mikrogliyal aktivasyonun mikrogliya morfolojisi analiziyle incelenmesi. A) Tek veya altı KYD tetiklendikten sonra 5. saat ve 24. saatte ipsilateral pariyetal kortekste mikrogliya belirteci Iba1 immüno Floresan işaretlenmesini (yeşil) gösteren örnek mikroskop görüntüleri. Altı KYD tetiklenmesi sonrası 24. saatte mikrogliyaların büyük gövdeli ve kısalmış uzantılara sahip *ameboid* morfoloji sergiledikleri görülmektedir. Ölçek çubukları 50 mikrometreyi göstermektedir. B) Mikrogliya morfolojisinin ramifikasyon endeksi hesaplanması ile analiz edilmesi. Ramifikasyon endeksi hesaplanmasında hücre çevresi (kırmızı) ve hücre alanı (siyah) parametreleri kullanılmıştır. Altı KYD tetiklenmesi sonrası 24. saatte mikrogliyaların ramifikasyon endeksi skorlarının yalancı cerrahi grubuna kıyasla belirgin düşüş gösterdiği görülmektedir. Ancak 5. saat zaman noktasında ve tek KYD tetiklenmesi sonrasında mikrogliyaların ramifikasyon endeksi skorları yalancı cerrahi grubuna kıyasla belirgin fark göstermemiştir. Grafikteki veri noktaları bir hayvanın verisini göstermektedir ve her veri noktası hayvan başına analiz edilen mikrogliyaların ramifikasyon endeksi skorlarının ortalaması alınarak hesaplanmıştır ($n=6/\text{grup}$). Grafikte veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası ile gösterilmiştir. C) Mikrogliya uzantılarının karmaşıklığının Sholl analizi yapılarak analiz edilmesi. Sholl analizinde hücre merkezinden başlayarak 3 μm aralıklı eş merkezli çemberler (kırmızı) çizilmiş ve her çemberin mikrogliya uzantılarıyla olan kesişme noktaları sayılmıştır. Grafikte X eksen her çemberin hücre merkezinden uzaklığını, Y eksen her çemberin mikrogliya uzantılarıyla kesişme noktası sayısını göstermektedir. Altı KYD tetiklenmesi sonrası 24. saatte kesişme noktası sayısının hücre merkezinden 12 mikrometre mesafeden başlayarak kontrol grubuna kıyasla belirgin düşüş gösterdiği görülmüştür. Altı KYD tetiklenmesi sonrası 5. saatte 24 mikrometrede ve tek KYD tetiklenmesi sonrası 24. saatte 27 mikrometrede uzantıların kesişme noktası sayısı yalancı cerrahi grubuna kıyasla belirgin düşüş göstermiştir. Grafikte veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası ile gösterilmiştir. Her çemberde yalancı cerrahi grubuyla yapılan anlamlı karşılaştırmalar grup rengine denk gelen yıldız işaretiyle gösterilmiştir ($n=5/\text{grup}$). İstatistiksel karşılaştırmalar için Welch düzeltmesi yapılarak student t testi kullanılmıştır. *not significant (ns)*: $p > 0,05$, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

4.3.2. cGAS-STING Yolağının Farmakolojik İnhibisyonu KYD Sonrası Görülen Mikroglial Aktivasyonu Engellemektedir

KYD sonrası görülen mikroglial aktivasyonda cGAS-STING yolağının rolünün incelenmesi için STING, spesifik inhibitörü C-176 ile inhibe edilmiş ve altı KYD tetiklenmesinden 24 saat sonra mikroglia morfolojisi analiz edilmiştir. C-176 uygulanan grupta çözücü grubuna kıyasla, mikrogliaların daha küçük hücre gövdesine ve dallanan uzantılara sahip *ramifiye* morfoloji sergilediği ve ramifikasyon endeks skorlarının daha fazla olduğu görülmüştür (Çözücü: $17,44 \pm 1,09$ ve C-176: $27,45 \pm 1,34$, $p=0,002$) (Şekil 4.16.). Buna ek olarak Sholl analizinde C-176 uygulanan grupta KYD sonrası mikroglia uzantı karmaşıklığındaki düşüşün olmadığı ve çözücü uygulanan gruptakine kıyasla hücre merkezinden 9 mikrometre mesafeden itibaren anlamlı biçimde daha yüksek mikroglia uzantı karmaşıklığına sahip olduğu görülmüştür (Kesişme noktası sayısı, 9 mikrometrede çözücü: $6,27 \pm 0,44$ ve C-176: $7,63 \pm 0,18$, $p=0,034$; 24 mikrometrede çözücü: $3,59 \pm 0,49$ ve C-176: $8,66 \pm 0,75$, $p<0,001$) (Şekil 4.16.). Bu bulgular çoklu KYD sonrası gözlenen mikroglial aktivasyonla uyumlu morfolojik değişikliklerin STING inhibisyonu ile engellenebildiğine ve KYD ile ilişkili mikroglial aktivasyonda STING'in rol oynadığına işaret etmektedir.



Şekil 4.16. STING inhibisyonunun KYD ile ilişkili mikroglial aktivasyona etkisinin incelenmesi. A) STING inhibitörü C-176 veya çözücüsü verilen gruplarda altı KYD sonrası 24. saatte ipsilateral pariyetal kortekste mikroglia belirteci Iba1 immüno Floresan (yeşil) işaretlenmesini gösteren örnek mikroskop görüntüleri. Çözücü uygulanan grupta KYD tetiklenmesi sonrası mikrogliaların *ameboid* morfoloji kazandıkları görülürken C-176 uygulanan grupta mikrogliaların KYD sonrası ramifiye morfolojilerini koruduğu görülmektedir. Ölçek çubukları 50 mikrometreyi göstermektedir. B) C-176 ile STING inhibisyonunun mikroglia morfolojisine etkisinin ramifikasyon endeksi hesaplanması ile analiz edilmesi. C-176 uygulanan grupta KYD tetiklenmesi sonrası mikrogliaların ramifikasyon endeksi skorlarının

çözücü uygulanan gruptakine kıyasla belirgin olarak daha yüksek olduğu görülmüştür. Grafikteki veri noktaları bir hayvanın verisini göstermektedir ve her veri noktası hayvan başına analiz edilen mikrogliyaların ramifikasyon endeksi skorlarının ortalaması alınarak hesaplanmıştır ($n=6/\text{grup}$). Grafikte veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası ile gösterilmiştir. C) C-176 ile STING inhibisyonunun mikrogliya uzantı karmaşıklığına etkisinin Sholl analizi ile incelenmesi. Grafikte X eksen her çemberin hücre merkezinden uzaklığını, Y eksen her çemberin mikrogliya uzantılarıyla kesişme noktası sayısını göstermektedir. C-176 uygulanan grupta kesişme noktası sayısının hücre merkezinden 9 mikrometre mesafeden itibaren çözücü uygulanan gruba kıyasla belirgin olarak daha fazla olduğu görülmektedir. Grafikte veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası ile gösterilmiştir. Her çemberde yalnız cerrahi grubuyla yapılan anlamlı karşılaştırmalar grup rengine denk gelen yıldız işaretiyle gösterilmiştir ($n=5/\text{grup}$). İstatistiksel karşılaştırmalar için Welch düzeltmesi yapılarak student t testi kullanılmıştır. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

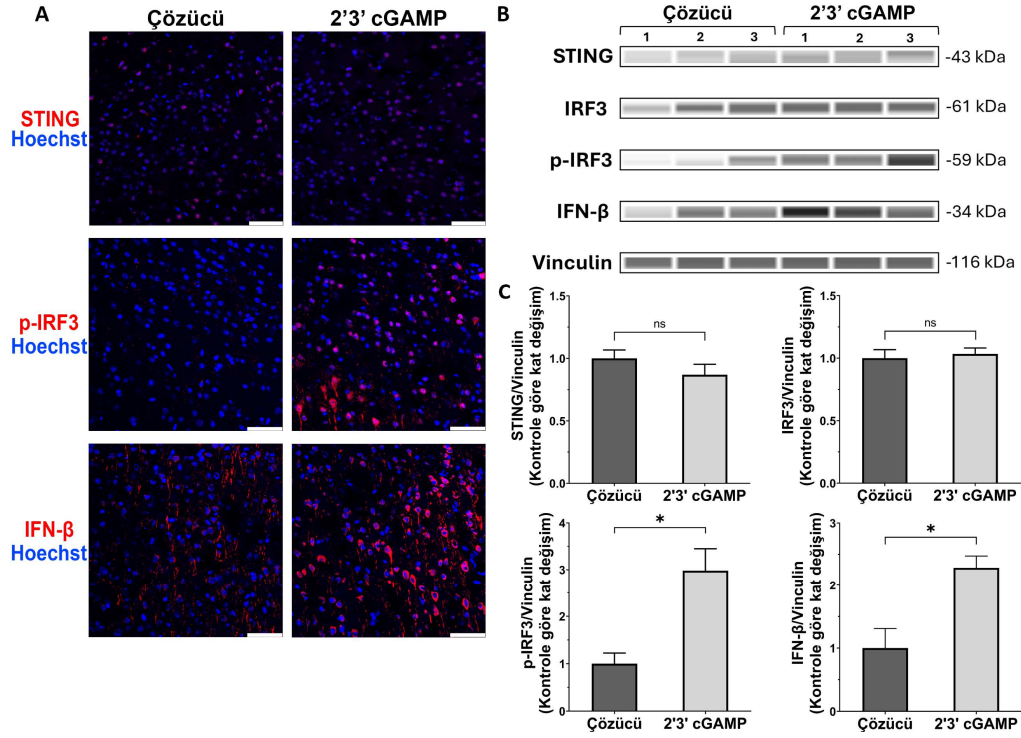
4.4. cGAS-STING Yolağı Aktivitesinin Farmakolojik Modülasyonunun KYD Eşiği ve KYD ile İlişkili Kraniyal Nosisepsiyona Etkisinin İncelenmesi

cGAS-STING yolağının nöronlarda artmış tip 1 interferon sinyaliyle nöronal uyarılabilirliği ve nosisepsiyonu düzenleyebildiğine dair bulgular literatürde yer almaktadır (58, 59, 253). Çalışmamızda KYD sonrasında beyinde cGAS-STING yolağının ağırlıklı olarak nöronlarda aktive olduğu ve tip 1 interferon sentezini arttırdığı bulgularından yola çıkarak cGAS-STING yolağı aktivasyonunun KYD yatkınlığına ve KYD ile ilişkili nosiseptif cevaplara etkisi incelenmiştir. Bunun için cGAS-STING yolağı aktivitesi STING'in endojen agonisti 2'3' cGAMP ve spesifik antagonisti C-176 uygulamasıyla farmakolojik olarak manipüle edilmiş ve KYD eşiğine ve periorbital ağrı eşiklerine etkisine bakılmıştır. STING agonisti 2'3' cGAMP KBB geçişi iyi olmaması nedeniyle intranasal yolla 1 mg/kg dozda uygulanmıştır (56). C-176 ilacı intraperitoneal yolla 20 mg/kg dozda uygulanmıştır. İlaç uygulamasından 4 saat sonra KYD eşiği ve periorbital ağrı eşikleri belirlenmiştir. KYD eşiğinin belirlenmesinde dura üzerine topikal KCl uygulaması yöntemi kullanılmıştır. Periorbital ağrı eşiklerinin belirlenmesinde manuel von Frey testi kullanılmıştır. Ek olarak cGAS-STING yolağı aktivasyonunun KYD sonrası gelişen periorbital allodiniye etkisinin incelenmesi için hayvanların kafasına daha sonradan optogenetik yolla KYD tetiklenmesine izin verecek özel bir düzenek yerleştirilmiş ve cerrahinin yarattığı stres ve inflamasyonun etkisinin en aza indirilmesi için 1 hafta iyileşmelerine izin verilmiştir. Deney günü ilk olarak bazal periorbital ağrı eşikleri belirlenmiş ve sonrasında 2'3' cGAMP ilacı 1 mg/kg dozda intranasal yolla uygulanmıştır. İlaç

uygulamasından 4 saat sonra optogenetik yolla altı KYD dalgası tetiklenmiş ve son KYD dalgasından 2 saat sonra ve 24 saat sonra periorbital ağrı eşikleri yeniden belirlenmiştir.

4.4.1 İntranazal 2'3' cGAMP Uygulaması Beyinde cGAS-STING Yolağını Aktifleştirmektedir

İntranazal 2'3' cGAMP uygulamasının serebral kortekste cGAS-STING yolağı aktivasyonuna neden olduğunun doğrulanması için kortekste cGAS-STING yolağı proteinlerinin ifadesi 2'3' cGAMP uygulamasından 4 saat sonra immünofloresan işaretleme ve kapiller temelli Western blot analizi (WES) yöntemleriyle analiz edilmiştir. İmmünofloresan işaretlemelerde intranazal olarak 2'3' cGAMP uygulanan grupta serebral kortekste p-IRF3 ve IFN- β proteinlerinin işaretlenmesinde artış görülmüştür (Şekil 4.17.). Bununla paralel olarak kapiller temelli Western blot analizi (WES) yöntemiyle cGAS-STING proteinlerinin serebral kortekste seviyeleri incelendiğinde intranazal 2'3' cGAMP uygulanan grupta toplam STING seviyelerinde anlamlı değişiklik gözlenmezken, p-IRF3 ve IFN- β proteinlerinin seviyelerinin çözücü uygulanan gruptakine göre anlamlı olarak fazla olduğu görülmüştür (Çözücü ve 2'3' cGAMP sırasıyla, STING: $1\pm0,06$ ve $0,86\pm0,08$, $p=0,290$; p-IRF3: $1\pm0,22$ ve $2,98\pm0,46$, $p=0,033$; IFN- β : $1\pm0,30$ ve $2,28\pm0,18$, $p=0,032$, çözücü grubuna göre kat değişim) (Şekil 4.17.). Bu bulgular intranazal 2'3' cGAMP uygulamasının uygulamadan sonra 4 saat içinde beyinde cGAS-STING yolağı aktivasyonuna neden olduğunu göstermektedir.

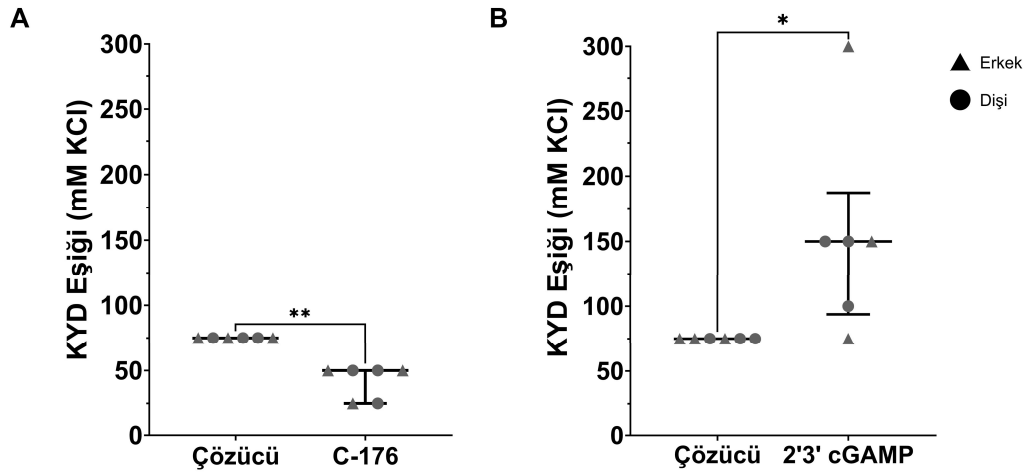


Şekil 4.17. STING agonisti 2'3' cGAMP'in intranasal uygulaması sonrası serebral kortekste cGAS-STING yolağı aktivitesinin incelenmesi. A) 2'3' cGAMP veya çözücü uygulanan gruplarda pariyetal kortekste STING, p-IRF3 ve IFN-β proteinlerinin immüno Floresan işaretlemesini (kırmızı) ve hoechst ile hücre çekirdeklerini (mavi) gösteren örnek mikroskop görüntüleri. 2'3' cGAMP uygulanan grupta p-IRF3 ve IFN-β proteinlerinin işaretlenmesinin arttığı görülmektedir. Ölçek çubukları 50 mikrometreyi göstermektedir. B) 2'3' cGAMP veya çözücü uygulanan hayvanlarda serebral kortekste STING, IRF3, p-IRF3, IFN-β ve yükleme kontrolü vinkülin proteinleri için WES analizinde oluşturulan örnek bant görüntüleri (n=3/grup). C) 2'3' cGAMP veya çözücü uygulanan hayvanlarda serebral kortekste STING, IRF3, p-IRF3 ve IFN-β protein seviyelerinin WES analizi ile belirlenmesi. 2'3' cGAMP uygulanan grupta p-IRF3 ve IFN-β proteinlerinin seviyesinin çözücü uygulanan gruba kıyasla daha yüksek olduğu görülmektedir. Her protein için hesaplanan seviyeler, yükleme kontrolü vinküline oranlanarak normalize edilmiştir. Grafiklerde veriler ortalama ± ortalamanın standart hatası ile gösterilmiştir ve çözücü kontrol grubuna göre kat değişim cinsinden sunulmuştur. İstatistiksel karşılaştırmalar için Welch düzeltilmesi yapılarak student t testi kullanılmıştır. *not significant (ns):* $p > 0,05$, ***: $p < 0,05$

4.4.2 cGAS-STING Yolağı Aktivasyonu KYD Eşiğini Yükseltmektedir

cGAS-STING yolağı aktivitesinin KYD yatkınlığına etkisinin incelenmesi için STING agonist ve antagonisti uygulamasından 4 saat sonra dura üzerine topikal KCl uygulaması ile KYD eşikleri belirlenmiştir. C-176 ile STING inhibisyonu sonrası KYD eşiklerinde çözücü uygulamasına kıyasla anlamlı düşüş gözlenmiştir [Çözücü:

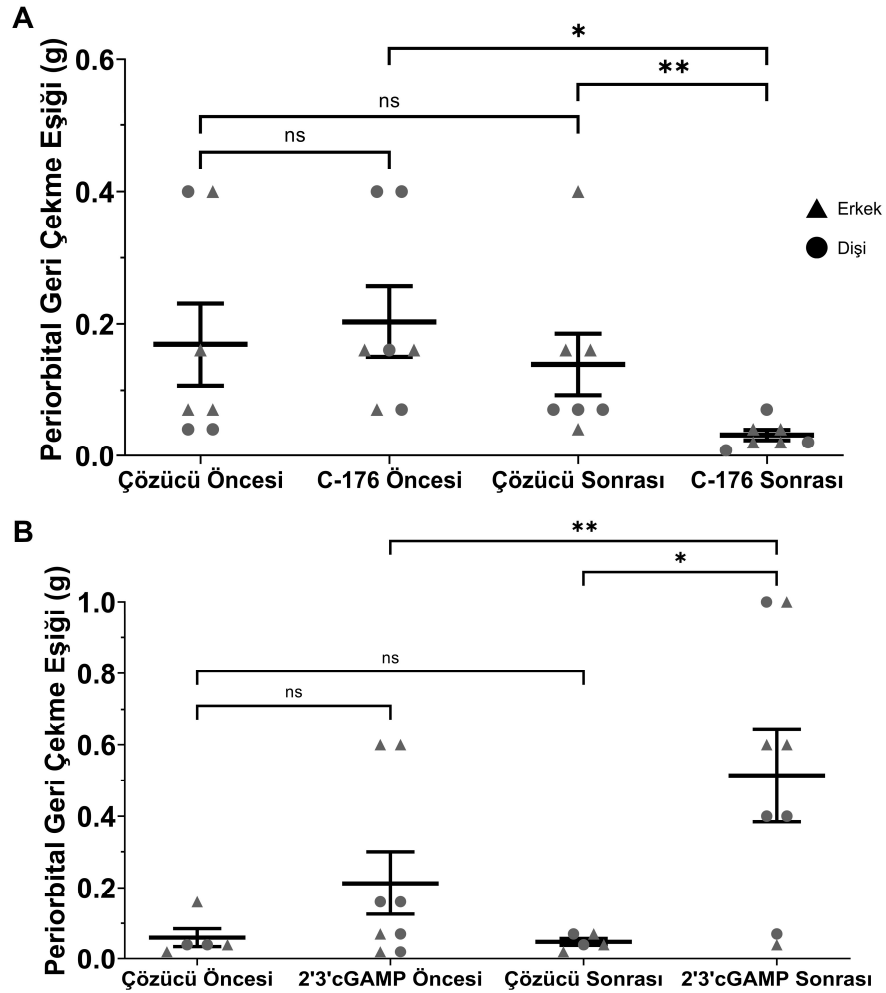
75 (ÇAA 75-75) ve C-176: 50 (ÇAA 25-50), $p=0,002$] (Şekil 4.18.). Bu bulgu KYD yatkinlığının arttığını göstermektedir. Bunun tersi bir biçimde 2'3' cGAMP ile STING aktivasyonu sonrası KYD eşiklerinde çözücü uygulamasına kıyasla anlamlı artış gözlenmiştir [Çözücü: 75 (ÇAA 75-75) ve 2'3' cGAMP: 150 (ÇAA 93,75-187,5), $p=0,015$] (Şekil 4.18.). Bu bulgu KYD yatkinlığının azaldığını göstermektedir. C-176 veya 2'3' cGAMP uygulaması sonrası KYD eşikindeki değişimler üzerinde cinsiyet etkisi gözlenmemiştir (sırasıyla $p>0,999$ ve $p=0,910$, iki yönlü ANOVA). Birlikte ele alındığında bu bulgular cGAS-STING yolağı aktivitesinin KYD yatkinlığını ve nöronal uyarılabilirliği etkileyebildiğine ve cGAS-STING yolağının KYD ile ilişkili patofizyolojide rol oynadığına işaret etmektedir.



Şekil 4.18. cGAS-STING yolağı aktivitesinin KYD yatkinlığı üzerindeki etkisinin incelenmesi. A) STING antagonisti C-176 veya çözücü uygulaması sonrası KYD eşikleri topikal KCl uygulaması ile incelendiğinde C-176 uygulanan grupta KYD eşiklerinin çözücü uygulanan gruptakine kıyasla belirgin olarak düştüğü gözlenmiştir. B) STING agonisti 2'3' cGAMP veya çözücü uygulaması sonrası KYD eşikleri topikal KCl uygulaması ile incelendiğinde 2'3' cGAMP uygulanan grupta KYD eşiklerinin çözücü uygulanan gruptakine kıyasla belirgin olarak yükseldiği gözlenmiştir. Grafiklerde veriler medyan $\pm$ çeyrekler arası açıklık (ÇAA) ile gösterilmiştir. Grafiklerdeki veri noktaları her bir hayvanın KYD eşiklerini mM KCl konsantrasyonu cinsinden göstermektedir ($n=6/\text{grup}$). Veri noktalarında üçgen sembolü erkek hayvanı, daire sembolü dişi hayvanı göstermektedir. İstatistiksel karşılaştırmalar için normal dağılım göstermeyen veri nenediyle Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$.

4.4.3 cGAS-STING Yolağı Aktivasyonu Periorbital Mekanik Hassasiyeti Azaltmaktadır

cGAS-STING yolağının kraniyofasiyal nosisepsiyon üzerindeki etkilerinin incelenmesi için öncelikle bazal durumda periorbital mekanik hassasiyet üstündeki etkisine bakılmıştır. Bunun için STING antagonisti C-176 ve STING agonisti 2'3' cGAMP veya çözücü uygulamasından önce ve 4 saat sonra manuel von Frey testi ile periorbital mekanik hassasiyet değerlendirilmiştir. Kontrol olarak yapılan çözücü uygulaması ile periorbital mekanik geri çekme eşiklerinde değişiklik görülmemiştir [C-176: Çözücü (%5 DMSO) öncesi: $0,16 \pm 0,06$ ve çözücü sonrası: $0,13 \pm 0,04$, $p=0,698$; 2'3' cGAMP: Çözücü (PBS) öncesi: $0,06 \pm 0,02$ ve çözücü sonrası: $0,04 \pm 0,009$, $p=0,603$] (Şekil 4.19.). C-176 uygulaması periorbital geri çekme eşiklerini bazal duruma kıyasla anlamlı ölçüde düşürmüştür, bu artmış periorbital mekanik hassasiyete işaret etmektedir (C-176 öncesi: $0,20 \pm 0,05$ ve C-176 sonrası: $0,03 \pm 0,007$, $p=0,023$) (Şekil 4.19.). 2'3' cGAMP uygulaması ise periorbital geri çekme eşiklerinde anlamlı bir yükselmeye neden olarak periorbital mekanik hassasiyette azalmaya neden olmuştur (2'3' cGAMP öncesi: $0,21 \pm 0,08$ ve 2'3' cGAMP sonrası: $0,51 \pm 0,12$, $p=0,002$) (Şekil 4.19.). C-176 veya 2'3' cGAMP uygulaması sonrası periorbital geri çekme eşiklerinde oluşan değişimler üzerinde cinsiyet etkisi görülmemiştir (sırasıyla $p=0,569$ ve $p=0,722$, tekrarlayan ölçümlerde ANOVA). Bu bulgular cGAS-STING yolağının bazal durumda trigeminal ağrı işlemlerini ve kraniyal nosiseptif hassasiyeti düzenleyebileceğine işaret etmektedir.

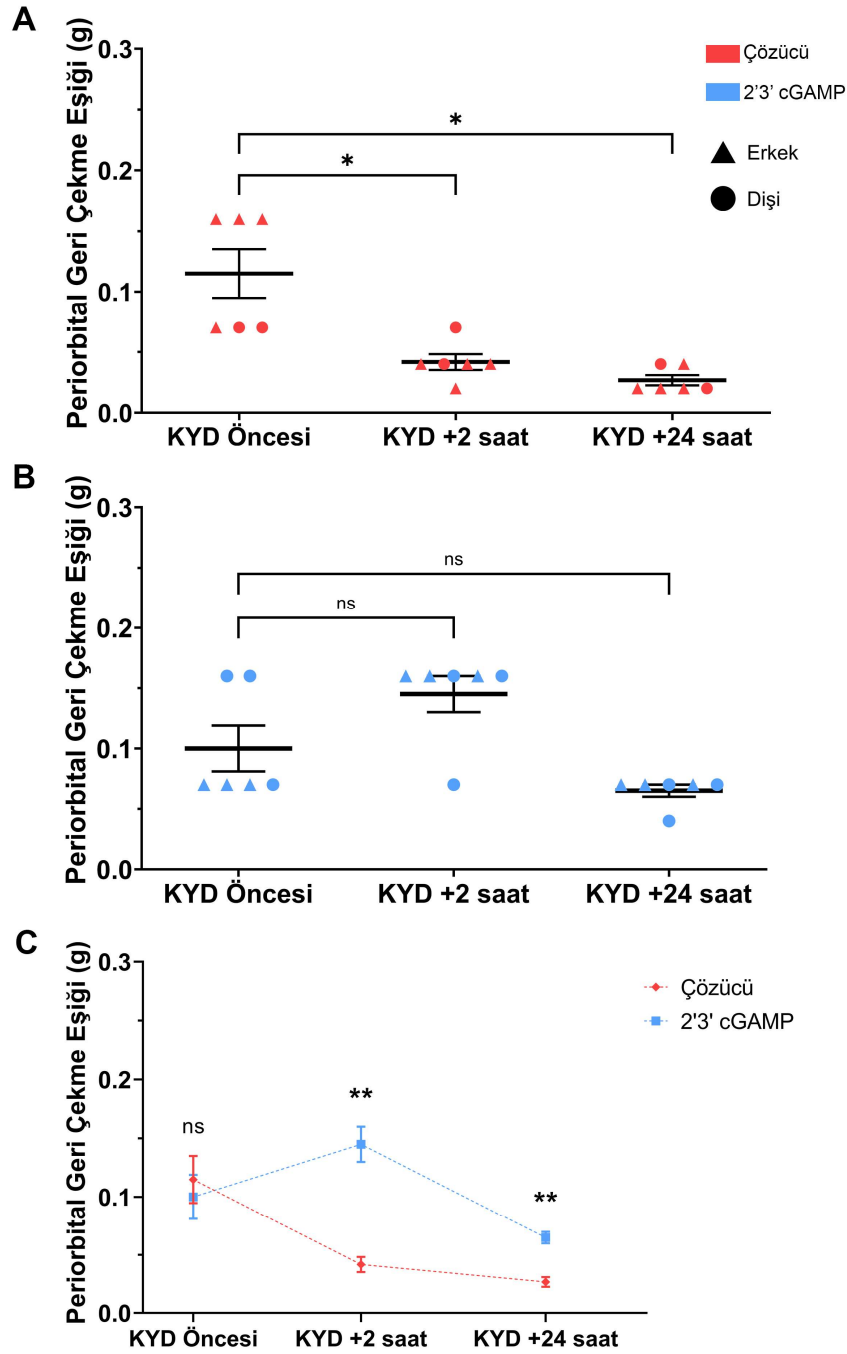


Şekil 4.19. cGAS-STING yolağı aktivitesinin periorbital mekanik hassasiyet üzerindeki etkisinin manuel von Frey testiyle incelenmesi. A) STING inhibitörü C-176 veya çözücü uygulamasından önce ve uygulamadan 4 saat sonra periorbital geri çekme eşikleri manuel von Frey testiyle incelendiğinde çözücü uygulaması sonrası periorbital geri çekme eşiklerinde belirgin değişiklik gözlenmezken, C-176 uygulaması sonrası periorbital geri çekme eşiklerinde belirgin düşüş görülmüştür (n=7/grup). B) STING agonisti 2'3' cGAMP veya çözücü uygulamasından önce ve uygulamadan 4 saat sonra periorbital geri çekme eşikleri manuel von Frey testiyle incelendiğinde çözücü uygulaması sonrası periorbital geri çekme eşiklerinde belirgin değişiklik gözlenmezken, 2'3' cGAMP uygulaması sonrası periorbital geri çekme eşiklerinde belirgin artış gözlenmiştir (Çözücü için n=5/grup; 2'3' cGAMP için n=8/grup.). Grafiklerde veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası ile sunulmuştur. Grafiklerde veri noktaları her bir hayvanın periorbital geri çekme eşiklerini uygulanan kuvvet (g) cinsinden göstermektedir. Veri noktalarında üçgen sembolü erkek hayvanı, daire sembolü dişi hayvanı göstermektedir. İstatistiksel karşılaştırmalar için Welch düzeltilmesi yapılarak bağımlı veya bağımsız grup student t testi kullanılmıştır. *not significant (ns):* $p > 0,05$, $*$: $p < 0,05$, $**$: $p < 0,01$.

4.4.4. Çoklu KYD Öncesi cGAS-STING Yolağının Aktive Edilmesi KYD Sonrası Periorbital Allodini Gelişmesini Engellemektedir

cGAS-STING yolağı aktivasyonunun KYD yatkınlığını ve periorbital mekanik hassasiyeti azalttığı bulgularından yola çıkarak, çoklu KYD öncesi cGAS-STING yolağı aktivasyonunun KYD sonrası gelişen periorbital allodiniye etkisi incelenmiştir. Bunun için STING agonisti 2'3' cGAMP veya çözücüsü optogenetik yolla altı KYD tetiklenmesinden 4 saat önce uygulanmıştır. Periorbital geri çekme eşikleri ilaç uygulamasından önce, KYD tetiklenmesinden 2 saat ve 24 saat sonra manuel von Frey testi ile incelenmiştir. Çözücü uygulanan grupta altı KYD tetiklenmesi KYD sonrası 2. ve 24. saatte periorbital geri çekme eşiklerinde belirgin düşüşe neden olarak periorbital allodini gelişmesini sağlamıştır (Altı KYD öncesi: $0,11 \pm 0,02$ ve altı KYD sonrası 2. saat: $0,04 \pm 0,006$, $p=0,020$; altı KYD sonrası 24. saat: $0,02 \pm 0,004$, $p=0,011$) (Şekil 4.20.). Dikkate değer şekilde 2'3' cGAMP uygulaması ile KYD sonrası 2. ve 24. saatte periorbital geri çekme eşikleri bazal durumdan belirgin fark göstermemiştir (Altı KYD öncesi: $0,10 \pm 0,01$ ve altı KYD sonrası 2. saat: $0,14 \pm 0,01$, $p=0,075$; altı KYD sonrası 24. saat: $0,06 \pm 0,005$, $p=0,109$) (Şekil 4.20.). Bu bulgu 2'3' cGAMP uygulamasının KYD sonrası periorbital allodini gelişimini engelleyerek koruyucu bir etki sağlayabileceğini göstermektedir.

İlaç uygulamasından bağımsız olarak bazal durumda ve KYD sonrasında hayvanların cinsiyetinin periorbital geri çekme eşikleri üzerinde bir etkisi görülmemiştir ($p=0,302$, tekrarlayan ölçümlerde ANOVA). Birlikte ele alındığında bu bulgular cGAS-STING yolağının hem KYD yatkınlığını hem de KYD ile ilişkili nosiseptif cevapları düzenleyebildiğine ve tedavi hedefi olarak kullanılabileceğine işaret etmektedir.



Şekil 4.20. cGAS-STING yolu aktivasyonunun çoklu KYD sonrası gelişen periorbital alldiniye etkisinin incelenmesi. A) Çözücü uygulanan grupta optogenetik altı KYD sonrası 2. saatte ve 24. saatte periorbital geri çekme eşikleri von Frey testiyle incelendiğinde KYD sonrası 2. saatte ve 24. saatte periorbital geri çekme eşiklerinin belirgin düşüş gösterdiği gözlenmiştir (n=6/grup). B) 2'3' cGAMP uygulanan grupta optogenetik altı KYD sonrası 2. saatte ve 24. saatte periorbital geri çekme eşikleri von Frey testiyle incelendiğinde KYD tetiklenmesi sonrası periorbital geri çekme eşiklerinin bazal duruma göre belirgin değişiklik göstermediği görülmüştür

(n=6/grup). Grafiklerde veri noktaları her bir hayvanın periorbital geri çekme eşiğini uygulanan kuvvet (g) cinsinden göstermektedir. Veri noktalarında üçgen sembolü erkek hayvanı, daire sembolü dişi hayvanı göstermektedir. C) Her zaman noktasında periorbital geri çekme eşiği verisinin grup ortalamaları karşılaştırıldığında KYD öncesinde çözücü ve 2'3' cGAMP grupları arasında belirgin fark gözlenmezken, KYD tetiklenmesi sonrası 2. saatte ve 24. saatte çözücü uygulanan gruptaki periorbital geri çekme eşiklerinin 2'3' cGAMP uygulanan gruba kıyasla belirgin olarak düştüğü gözlenmiştir (n=6/grup). Grafiklerde veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası ile sunulmuştur. İstatistiksel karşılaştırmalar için Welch düzeltmesi yapılarak bağımlı veya bağımsız grup student t testi kullanılmıştır. *not significant (ns):* $p > 0,05$, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada farelerde optogenetik yöntemle KYD tetiklenmesi sonrası serebral kortekste nöronlarda cGAS-STING yolağının aktive olduğu ve yolak aktivasyonunun mikrogliyal aktivasyonda da rol oynadığı gösterilmiştir. Çalışmamızda cGAS-STING yolağı aktivitesinin farmakolojik olarak manipüle edilmesinin KYD yatkınlığını ve periorbital ağrı yanıtlarını etkilediği ve yolak aktivasyonunun KYD sonrası gelişen periorbital allodini için koruyucu etki gösterdiği görülmüştür. Bu bakımdan bu tez çalışması, KYD ile nöroinflamasyon ve kraniyal ağrı gelişimi arasındaki ilişkide bilinmeyen bir mekanizmayı ortaya çıkarmış ve elde edilen bulgular cGAS-STING yolağının KYD ile ilişkili nörolojik hastalıklarda potansiyel bir tedavi hedefi olabileceğini vurgulamıştır. Bu tez çalışmasından elde edilen bulgular uluslararası hakemli bir dergide yayınlanmıştır (271).

KYD beyinde 2-5 mm/dakika hızında yavaşça yayılan, nöronları ve gliya hücrelerini etkileyen güçlü bir depolarizasyon dalgasıdır. KYD beyin aktivitesinde geçici bir baskılanma ve beyin kan akımında belirgin değişiklikler ile karakterizedir (1, 5). KYD beyinde neden olduğu bölgesel ve zamansal değişiklikler nedeniyle migren aurası fenomenolojisiyle ilişkilendirilmiştir bu bakımdan migren aurasının beyindeki elektrofizyolojik karşılığı olduğu düşünülmektedir (5, 7, 8). KYD'nin auranın yanı sıra TVS aktivasyonuna neden olarak migren ağrısı gelişiminde de rol oynayabileceği gösterilmiştir. KYD'nin migren patofizyolojisindeki önemi, klinik etkinliği kanıtlanmış bazı migren önleyici tedavilerin KYD oluşumunu engellemesiyle vurgulanmıştır (8, 117, 272). KYD'nin aynı zamanda beyinde iskemi, hipoksi, travma ve kanama gibi doku hasarına yol açan durumlarda tetiklendiği hem deneysel modeller hem de hastalarda gösterilmiştir (12, 64, 273, 274).

KYD etkilediği beyin dokusundaki hücrelerde tama yakın büyük bir depolarizasyona neden olmaktadır. Bu depolarizasyon aktivitesi büyük miktarda iyonik geçiş ve nörotransmitter salıverilmesine neden olmaktadır ve KYD'nin beyinde yarattığı bu değişikliklerin geri döndürülmesi yüksek enerji gerektirmektedir (7, 9). KYD sonrası beyinde artan enerji ihtiyacı, KYD nedeniyle azalmış beyin kan akımıyla birleştiğinde nöronlar ve gliya hücrelerine metabolik bir yük bindirmektedir ve hücrel strese neden olmaktadır (7). KYD'nin yol açtığı bu değişiklikler, iskemi ve

travma gibi durumlarda ek doku hasarına ve lezyonun genişlemesine neden olabilmektedir (9, 97). Ancak bazı durumlarda KYD'nin iskemik önkoşullanma ve nöbetleri engellemesi yoluyla koruyucu etkileri olabileceği de görülmüştür (98-101). İskemi ve hipoksi olmayan sağlam beyinde KYD'nin neden olduğu hücresel stres hücre ölümü ve doku hasarına neden olmamaktadır (7, 93). Ancak bu hücresel stresin beyinde nöronlar ve gliya hücrelerinde steril inflamatuvar cevap başlatabildiği gösterilmiştir (20, 29, 195).

KYD beyin parankiminde dakikalar içinde başlayan ve KYD sonrası 72 saate kadar sürebilen güçlü bir inflamatuvar cevap başlatmaktadır (20, 29, 196-199). KYD'nin başlattığı bu inflamatuvar cevapta ön planda doğal bağışıklık sistemi bileşenleri aktive olmaktadır (29). KYD ile ilişkili nöroinflamasyonun nöronlarda Panx1 megakanallarının açılması ile başladığı gösterilmiştir (20). Bunun sonucunda nöronlarda NLRP3 inflamazom kompleksinin birleştiği, aktive olan kaspaz-1 aracılığıyla nöronlardan IL-1 β ve TNF- α gibi inflamatuvar sitokinler ve HMGB1 alarmin molekülünün salındığı gösterilmiştir (20, 27). Nöronlardan salınan HMGB1 molekülünün daha sonrasında astrositlerde NF- κ B sinyali aktivasyonuna ve mikrogliyal aktivasyona neden olduğu gösterilmiştir (20, 28). Beyinde bu inflamatuvar cevabın non-invazif şekilde optogenetik yöntemle tetiklenen tek KYD dalgası sonrası da aktifleştiği gösterilmiştir, bu yüzden bu etkinin deneysel faktörlerden ziyade KYD'nin kendi etkisi olduğu kanısı güçlenmiştir (27, 191, 202). Biz de çalışmamızda optogenetik yolla tetiklenen tek KYD dalgasının bile beyinde doğal bağışıklık sisteminin parçası olan cGAS-STING yolağının aktivasyonuna ve tip 1 interferon sentezine neden olduğunu gözlemledik.

Çalışmamızda KYD sonrası cGAS-STING yolağı aktivasyonunu incelemek için, yolak proteinlerinin serebral kortekste ifadesi immünofloresan işaretleme ve kapiller temelli Western blot analizi (WES) yöntemleriyle incelenmiştir. KYD sonrası serebral kortekste yolak proteinleri cGAS, STING, p-IRF3 ve IFN- β proteinlerinin ifadesinin artışı cGAS-STING yolağı aktivasyonuna işaret etmektedir. KYD tetiklenmesi sonrası beyinde STING proteini seviyeleri immünofloresan işaretleme ile incelendiğinde serebral kortekste artmış STING işaretlenmesi görülürken, WES ile STING seviyesi, toplam STING proteinine yönelik geliştirilmiş bir antikor ile

incelendiğinde STING seviyesinde azalma görülmüştür. Bu farklılığın STING proteinin aktivasyon mekanizmalarından kaynaklı ortaya çıktığı gösterilmiştir. STING proteini aktive olduğunda ER membranında oligomerize olur, Golgi veziküllerine geçer ve burada fosforilasyon ve palmitoylasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlara uğrar (213, 256, 263-265). Bununla uyumlu olarak, WES analizinde STING proteininin seviyesine Ser365 pozisyonunda fosforile haline spesifik bir antikör kullanılarak bakıldığında, KYD tetiklenmesi sonrasında serebral kortekste fosforile STING proteini seviyesinin arttığı gösterilmiştir. Buna ek olarak immüno Floresan işaretleme ile KYD tetiklenmesi sonrası STING'in hücrelerde Golgi belirteciyle kolokalizasyon gösterdiği de görülmüştür. Bu bulgular WES analizinde azalmış toplam STING seviyesinin STING ifadesinde bir azalmadan ziyade, STING'in aktivasyon ile ilişkili olarak fosforilasyonu ve hücre içi transport mekanizmalarını yansıttığını ve kullanılan antikorun fosforile olmamış STING proteinini saptadığını göstermiştir. KYD sonrası STING'in downstream efektörleri olan p-IRF3 ve IFN- β proteinlerinin seviyelerindeki belirgin artış da cGAS-STING yoluyla aktivasyonunu ve tip 1 interferon sentezinin uyarıldığını göstermektedir. Yolak proteinlerindeki artışın KYD sonrası 24. saatte de devam etmesi, cGAS-STING yoluyla aktivasyonunun beyinde uzun süreli nöroinflamatuvar süreçlere katkıda bulunabileceğini göstermektedir ve KYD ile ilişkili inflamatuvar cevabın özellikleri ile uyumludur.

Hücrelerde cGAS-STING yoluyla aktifleşmesinde en önemli faktörlerden biri sitoplazmada serbest halde bulunan çift zincirli DNA'nın cGAS enzimi tarafından tanınmasıdır. Buna neden olan çift zincirli DNA belirgin hücre hasarı durumunda nükleustan çıkan nükleer DNA olabileceği gibi, hücresel stres ve mitokondri disfonksiyonu durumunda mitokondriden sızan mtDNA da olabilir (40, 41, 206, 207). Çeşitli nörolojik hastalıklarda mitokondri disfonksiyonu, bozulmuş mitofaji ve bunun sonucunda sitoplazmaya sızan mtDNA'nın cGAS-STING yoluyla ve inflamazom aktifleşmesinde kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir (41, 49, 53, 250, 252). KYD'nin de mitokondriyal disfonksiyona yol açabileceği gösterilmiştir. KYD sonrasında mitokondri morfolojisinde değişiklikler, mitokondri membran depolarizasyonu ve membranda mitokondriyal geçirgenlik geçiş porunun (MGGP) açıldığı görülmüştür (29, 96, 275, 276). Bu değişiklikler mitokondri membran geçirgenliğinin artmasına yol

açarak mitokondriden mtDNA, kalsiyum ve sitokrom-C salınmasına neden olabilir ve doğal bağışıklık sistemi yollarının aktifleşmesine ve hatta hücrenin apoptoza gitmesine neden olabilir (277). KYD sonrası cGAS-STING yolağı aktivasyonuna neden olan mekanizma, KYD aracılı mitokondriyal disfonksiyon ve mtDNA'nın sitoplazmaya geçişi aracılığıyla olabilir. KYD ile ilişkili inflamatuvar yanıtın gelişiminde olası mitokondriyal mekanizmaların rolünü aydınlatmaya yönelik çalışmalarımız başlatılmıştır. Altta yatan patofizyolojik süreçlerin anlaşılması açısından önemli olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda optogenetik yolla tetiklenen tek KYD dalgasının, çoklu KYD dalgaları ile karşılaştırılabilecek düzeyde, güçlü cGAS-STING yolağı aktivasyonuna ve tip 1 interferon sentezine neden olduğu ancak tekrarlayan KYD dalgalarının cGAS-STING yolağında daha ileri aktivasyona neden olmadığı görülmüştür. Literatürde de KYD ile ilişkili inflamatuvar cevabın optogenetik tek KYD sonrası başlayabildiği gösterilmiştir (27, 191, 202). Ancak bazı inflamatuvar mediyatörlerin bir doz-cevap ilişkisi içinde beyindeki seviyelerinin tekrarlayan KYD dalgalarıyla daha fazla arttığı da gösterilmiştir (202, 205). Çalışmamızda tekrarlayan KYD dalgaları ile daha güçlü yolak aktivasyonu gözlemlemememiz, tek KYD dalgasının yolak aktivasyonu için yeterli uyarıyı sağlaması ve geri bildirim düzenleyici mekanizmalar nedeniyle tekrarlayan dalgalar ile kümülatif bir etkinin görülememesi ile açıklanabilir (278).

Deneysel KYD literatüründe önceleri KYD ile ilişkili nöroinflamasyonun beyinde tek bir hemisferi etkilediği düşünülmekteydi (279). Bu bakımdan deneysel çalışmalarda kontralateral hemisfer kontrol olarak yaygın kullanılmaktaydı (196-198, 202). Ancak yakın zamanda yapılan çalışmalar hem yabanıl tip hayvanların hem de genetik migren nedeni olan FHM mutasyonuna sahip hayvanların beyinlerinde KYD sonrası inflamatuvar yanıtın iki hemisferde de başladığını göstermiştir (22, 191). İpsilateral hemisferde NMDA reseptörü ve pürinerjik P2X7 reseptörü antagonizması kontralateral hemisferdeki inflamatuvar yanıtı engelleyebilmiştir, KYD ile bir hemisferde başlayan inflamatuvar değişikliklerin sinaptik ve parakrin mekanizmalarla diğer hemisfere de yansıdığı ortaya konulmuştur (22, 191). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda KYD ile ilişkili inflamatuvar değişikliklerin incelenmesinde kontrol olarak kontralateral hemisfer kullanılmamış, onun yerine yalancı cerrahi uygulanan

hayvanların beyinleri kontrol olarak kullanılmış ve KYD tetiklenen ipsilateral hemisfer ile karşılaştırılmıştır.

KYD'nin başlattığı inflamatuvar cevabın meninksleri de etkilediği ve meninkslerde nörojenik inflamasyon ve nosiseptör aktivasyonunda rol oynadığı görülmüştür. KYD meninkslerde yerleşik makrofaj ve dendritik hücrelerin aktivasyonuna ve mast hücrelerinin degranülasyonuna neden olmaktadır (31, 32). Bu şekilde orta meningeal arterde vazodilatasyon ve plazma protein ekstrasvazasyonu gibi nörojenik inflamasyonun temel belirtilerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır ve salınan inflamatuvar medyatörler trigeminal afferentlerin aktivasyonuna yol açabilmektedir (19, 20, 30). Beyin parankiminde başlayan inflamatuvar cevabın, inflamatuvar medyatörlerin meninkslere direkt diffüzyonu veya HMGB1 alarmin molekülünün meninkslere salınması aracılığıyla meninkslerdeki inflamatuvar değişikliklere katkıda bulunabileceği öne sürülmüştür (106, 203, 204). Bunu destekler biçimde kortekste HMGB1 salıverilmesinin, Panx1 kanallarının açılmasının ve NLRP3 inflamazomu aktivasyonunun engellenmesi, meninkslerdeki inflamatuvar cevabı ve nosiseptör aktivasyonunu hafifletmektedir (20, 27, 205).

Bazı hastalık modellerinde, dorsal kök gangliyonu ve trigeminal gangliyon nöronlarında cGAS-STING yolağı aktivasyonunun patogeneizde rol oynadığı gösterilmiştir (59, 61, 280, 281). Bu çerçevede, KYD sonrasında cGAS-STING yolağı aktivasyonunun meninkslerde ve TVS nöronlarında da ortaya çıkabileceği öngörülmektedir. Söz konusu bağlantının aydınlatılması, cGAS-STING yolağının baş ağrısı oluşumundaki rolünün anlaşılması açısından önem taşıdığından, bu doğrultudaki çalışmalar da başlatılmıştır.

Çalışmamızda KYD tetiklenmesi sonrası serebral kortekste cGAS-STING yolağı aktivasyonunun hangi hücre tiplerinde gözlendiğini aydınlatmaya yönelik incelemelerimiz, cGAS-STING yolağı aktivasyonunun ağırlıklı olarak nöronlarda gözlendiğini ve gliya hücrelerinde aktivasyonun sınırlı kaldığını göstermiştir. Beyinde KYD ile ilişkili inflamasyonu çalışan daha önceki çalışmalar, inflamasyonu başlatıcı faktörlerin KYD sonrası öncelikle nöronlarda ortaya çıktığını göstermiştir. KYD aracılığıyla nöronlarda Panx1 kanallarının açılması, kaspaz-1 aktivasyonu ve IL-1 β gibi inflamatuvar sitokinler ve HMGB1 alarmin molekülünün salınması beyinde

inflamatuvar kaskadı başlatan faktörlerdir (20). Nöronlardan salınan HMGB1 sonrasında astrositlerde NF- κ B aracılığıyla inflamatuvar sitokin sentezine ve mikroglial aktivasyona neden olmaktadır (20, 28). Başka bir doğal bağışıklık sistemi yolağı olan NLRP3 inflamazomunun da KYD sonrasında beyinde nöronlarda aktive olduğu ancak mikroglia ve astrositlerde bu aktivasyonun gerçekleşmediği gösterilmiştir (27). NLRP3 inflamazomu, cGAS-STING yolağı ile yakın ilişkilidir ve çeşitli nöroinflamatuvar durumlarda cGAS-STING yolağı aktivasyonu sonrası NLRP3 inflamazomunun da aktive olduğu görülmüştür (222, 266, 282). Çalışmamızda KYD sonrası nöronlarda NLRP3 inflamazomu ile cGAS-STING yolağı aktivitesi arasındaki ilişkiyi incelediğimizde STING inhibisyonunun KYD sonrası nöronlarda görülen NLRP3 inflamazomu aktivasyonuna etkisi olmadığını gördük. Bu bulgu, KYD ile ilişkili nöroinflamasyon bağlamında NLRP3 inflamazomu aktivasyonunun cGAS-STING aktivitesinden bağımsız gerçekleştiğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda mikroglia ve astrositlerde, nöronlarda görüldüğü şekilde cGAS-STING yolağı aktivasyonu ve tip 1 interferon sentezi gözlenmemiştir. Mikroglialarda STING ifadesi KYD sonrası artmış olsa da bu artışa p-IRF3 ve IFN- β proteinlerinin ifadesindeki artış eşlik etmemiştir. Bu bulgu mikroglialarda STING sinyalinin etkisinin interferon sentezini uyarmaktan ziyade, NF- κ B ve NLRP3 inflamazomu gibi alternatif yollar üzerinden ilerlediğini düşündürmektedir (55, 213, 222, 266). Ancak mikroglialarda KYD sonrası NF- κ B ve NLRP3 inflamazomu aktivasyonunu incelediğimizde, iki yolağın da KYD sonrası mikroglialarda aktive olmadığını gözlemledik. Bu bulgu daha önce KYD sonrası NF- κ B ve NLRP3 inflamazomunu inceleyen çalışmalarla uyumlu bir bulgudur (27, 267, 268). Bu bulgulara rağmen, KYD sonrası mikroglialarda cGAS-STING yolağı aktivasyonu ve ilişkili tip 1 interferon veya NF- κ B ve NLRP3 inflamazomu sinyali çalışmamızda incelenenden daha ileri zaman noktalarında ortaya çıkabilir. Bu olasılık, KYD sonrası erken dönemde cGAS-STING yolağı sinyalizasyonunun mikroglialarda yeni başladığı ve tam yolak aktivasyonu ve tip 1 interferon sentezinin daha sonra gerçekleştiği şeklinde bir aktivasyon modeli ile açıklanabilir. Beyin iskemisi ve travmatik hasar modellerinde mikroglialarda cGAS-STING yolağı aktivasyonu ve ilişkili inflamatuvar cevabın hasardan sonraki 3. günde maksimum seviyeye ulaştığı gözlenmiştir (249, 266). Literatürdeki bu bulgu, KYD sonrasında da benzer şekilde

mikroglialarda tam yolak aktivasyonu ve interferon cevabının 24 saatten daha ileri zaman noktalarında ortaya çıkabileceği ihtimalini desteklemektedir ve bu ihtimal KYD ile cGAS-STING yolağı arasındaki ilişkinin daha uzun süreli seyrinin incelendiği gelecek çalışmalarla test edilmelidir. Buna ek olarak KYD sonrası nöronlardaki cGAS-STING yolağı aktivasyonu mikroglialarda görülen inflamatuvar değişikliklere katkıda bulunabilir. Özellikle çoklu KYD sonrasında nöronlardan salınan inflamatuvar medyatörlerin mikroglial aktivasyonda rol oynadığı gösterilmiştir (27, 28). KYD sonrası nöronlarda erken cGAS-STING yolağı aktivasyonu benzer şekilde mikroglial aktivasyonda rol oynuyor olabilir. Bu bakımdan, KYD sonrası nöronlardaki cGAS-STING aktivitesinin mikroglial aktivasyonda nasıl bir rol oynadığı ve KYD ile ilişkili nöroinflamasyonda mikroglial cGAS-STING aktivasyonunun gecikmiş etkileri gelecek çalışmalarda aydınlatılmalıdır.

Astrositlerin santral sinir sisteminde nöroinflamasyona katkıda bulundukları bilinmektedir ve cGAS-STING proteinlerini ifade ettikleri gösterilmiştir (283). Ancak KYD ile ilişkili nöroinflamasyonda astrositlerin gösterdiği inflamatuvar cevabın kapsamının nöronlardakinden daha dar olduğu görülmüştür (20, 284, 285). KYD sonrası nöronlardaki inflamatuvar aktivasyondan sonra astrositlerde de NF- κ B yolağında aktifleşme ve pro-inflamatuvar sitokin sentezi görülmüştür ancak NLRP3 inflamazomu aktivasyonu KYD sonrasında sadece nöronlarda gözlenmiş ve astrositlerde görülmemiştir (20, 27). Benzer şekilde çalışmamızda KYD sonrasında astrositlerde cGAS-STING yolağı aktivasyonu gözlemlenemedi. Beraber ele alındığında bulgularımız KYD tarafından uyarılan doğal bağışıklık yanıtlarının öncelikle nöronlarda ortaya çıktığını desteklemektedir ve nöronları KYD'nin başlattığı inflamatuvar kaskadların ana sorumlusu pozisyonuna getirmektedir.

Çalışmamızda optogenetik KYD sonrası mikroglialarda belirgin cGAS-STING yolağı aktivasyonu görülmemiş olsa da, mikroglialardaki cGAS-STING yolağı sinyalinin çeşitli nöroinflamatuvar ve nörodejeneratif hastalıklarda patolojide rol oynadığı ve yolağın aşırı aktifleşmesinin beyinde iskemi, kanama, travma gibi durumlarda doku hasarına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (41, 56, 57, 248, 249). Bu durumlarda mikroglialarda cGAS-STING yolağı aktivasyonunun NF- κ B ve NLRP3 inflamazomunu uyarak pro-inflamatuvar etkiler gösterdiği ve mikrogliaların

piroptozis ile ölümüne neden olabildiği de gösterilmiştir (55, 222, 249, 266, 269, 286). Bunlara ek olarak beyin iskemisi ve nöropatik ağrı gelişimi gibi durumlarda, mikroglialarda cGAS-STING yolağı aktifleşmesinin mikrogliaların M1 polarizasyona geçişinde ve inflamatuvar aktivasyonunda rol oynadığı ve yolağın inhibisyonunun bunu engelleyerek mikrogliaların M2 polarizasyona geçişini sağladığı gösterilmiştir (61, 222, 269, 270). KYD, metabolik olarak sağlam beyinde doku hasarı ve hücre ölümüne yol açmasa da özellikle tekrarlayan KYD dalgalarının beyinde mikroglial aktivasyona neden olabildiği gösterilmiştir (28). Bununla uyumlu olarak, çalışmamızda optogenetik yöntemle tetiklenen çoklu KYD dalgalarından 24 saat sonra mikroglialarda inflamatuvar aktivasyonla uyumlu morfolojik değişiklikler gözlenmiştir. Bu morfolojik değişiklikler küçük gövdeli, dallanan (*ramifiye*) uzantılara sahip mikroglia morfolojisinden, büyük gövdeli, kısa ve kalın uzantılara sahip *ameboid* morfolojiye geçişle karakterizedir (28). Çalışmamızda mikroglialardaki morfolojik değişiklikler ramifikasyon endeksi ve Sholl analizi yöntemleriyle incelenmiştir. Bu yöntemler mikrogliaların gövde büyüklüğü, uzantılarının uzunluğu ve dallanma karmaşıklığını hesaba katarak mikrogliaların morfolojik karmaşıklığını değerlendiren yöntemlerdir ve mikroglial aktivasyonun incelenmesinde yaygın kullanılmaktadır (257-260). Bu bakımdan, ramifikasyon endeks skorlarındaki düşüş ve Sholl analizinde uzantılarla kesişme noktalarının sayısında azalma mikrogliaların ameboid morfolojiye geçtiklerini ve aktive olduklarını yansıtmaktadır (259, 260, 287). Bulgularımız KYD ile ilişkili mikroglial aktivasyonun tek KYD dalgası sonrasında gözlenmediğini ve çoklu KYD dalgalarından en az 24 saat sonrasında oluşmaya başladığını ortaya koymaktadır. KYD sonrası mikroglial aktivasyonun gelişiminde nöronlardan salınan HMGB1 gibi medyatörlerin etkili olduğu ve nöronlardan HMGB1 salınmasının tekrarlayan KYD dalgalarıyla belirgin olarak arttığı gösterilmiştir. Çoklu KYD dalgaları sonrası nöronlardan salınan HMGB1 molekülünün mikroglialarda TLR2/4 reseptörlerini uyarak mikroglialarda aktivasyona neden olduğu gösterilmiştir (28). Bu bulgular, KYD sonrası mikroglial aktivasyonun gelişiminden önce nöronal inflamatuvar aktivasyonun olduğu ve nöronlardan salınan inflamatuvar medyatörlerin daha sonrasında mikroglia aktivasyonuna neden olduğu bir modeli öne sürmektedir. Bu modelde, mikroglia aktivasyonunda doğal bağışıklık sistemi sinyalleri önemli rol oynamaktadır. Karşılıklı bir etkileşim içinde mikroglial

aktivasyonun, nöronlardaki inflamatuvar cevabın devamlılığı ve NLRP3 inflamazomu aktivitesi için de gerekli olduğu gösterilmiştir (27). Çalışmamızda önemli bir bulgu olarak KYD öncesi STING inhibisyonunun KYD sonrasında mikrogliyalarda görülen morfolojik değişiklikleri engelleyebildiği ve mikrogliyaların ramifiye morfolojilerini koruduğu görülmüştür. Bu bulgu STING inhibisyonu ile KYD sonrası mikrogliyal aktivasyonun engellenebildiğini göstermektedir ve KYD ile ilişkili mikrogliyal aktivasyonda cGAS-STING yolağının rolünü vurgulamaktadır. Bu sayede çalışmamız, KYD durumunda, ve muhtemelen auralı migrende, cGAS-STING yolağının inflamatuvar cevapları ve mikrogliyal aktivasyonu düzenlediğini ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda cGAS-STING yolağı aktivitesinin KYD ile ilişkili inflamatuvar değişiklikler, KYD eşiği ve kraniyal ağrı yanıtlarına etkisini incelemek için yolak aktivitesi farmakolojik olarak manipüle edilmiştir. Bunun için STING proteinine spesifik antagonist C-176 ve STING proteinin endojen agonisti olan 2'3' cGAMP kullanılmıştır. STING proteininin kovalent inhibitörü olan C-176, STING oligomerizasyonunu baskılamaktadır ve sonrasındaki sinyal yolaklarının aktifleşmesini engellemektedir. Kovalent inhibitör olması bakımından, sistemik uygulamada plazma seviyesi 4 saat içinde azalmaya başlasa da inhibisyon etkisi 4 saatten daha uzun sürmektedir (256). Bununla uyumlu olarak, farelerde sistemik C-176 uygulamasının ağrı yanıtlarına etkisine bakıldığında, uygulamadan sonra 24 saate kadar farelerde azalmış ağrı eşikleri gözlenmiştir (58). Normalde hücrelerde cGAS enzimi tarafından üretilen ve STING proteininin endojen agonisti olan 2'3' cGAMP, küçük molekülü ilaçtır ancak sistemik uygulamada hücre dışı ortamda ENPP1 enzimi tarafından hızlıca yıkılmaktadır (228). Bu özelliği sistemik uygulama ile KBB geçişini sınırlandırmaktadır, ancak intranazal uygulama ile santral sinir sistemine kolaylıkla geçebildiği ve uygulama sonrası beyinde 2'3' cGAMP seviyesinin 72 saate kadar artmış olduğu gösterilmiştir (56). Bu farmakokinetik özelliklerinden dolayı çalışmamızda da 2'3' cGAMP ilacı farelere intranazal yolla uygulanmıştır. 2'3' cGAMP uygulamasının farelerde ağrı yanıtları üzerindeki akut etkilerine bakıldığında, 2'3' cGAMP uygulamasının ağrı eşiklerinde yükselmeye yol açtığı ve bu etkinin 4 saat içinde maksimum seviyeye ulaşp 48 saate kadar sürdüğü görülmüştür (58). Bu farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri nedeniyle, çalışmamızda bu ilaçlar tercih edilmiştir.

Çalışmamızda KYD sonrası beyinde cGAS-STING yolağı aktivasyonunun inflamatuvar değişiklikleri düzenlemesinin yanı sıra nöronal uyarılabilirliği de etkileyerek KYD yatkinlığını ve periorbital ağrı hassasiyetini etkilediği görülmüştür. STING proteininin C-176 ile farmakolojik inhibisyonu, KYD yatkinlığını ve periorbital ağrı hassasiyetini artırırken; STING'in 2'3' cGAMP ile aktive edilmesi KYD yatkinlığını ve periorbital ağrı hassasiyetini azaltmıştır. Daha önemlisi, optogenetik yolla çoklu KYD tetiklenmesi öncesinde STING proteini 2'3' cGAMP uygulamasıyla aktive edildiğinde, KYD sonrası görülen periorbital allodininin hafiflediği görülmüştür. Bu bulgularımız beyinde cGAS-STING yolağı aktivasyonunun, KYD oluşumu ve KYD ile ilişkili kraniyal ağrı yanıtlarına karşı akut koruyucu bir etki gösterdiğine işaret etmektedir.

KYD yatkinlığı, beyinde KYD dalgalarının ne kadar kolay tetiklendiğinin bir göstergesidir ve hem beyindeki eksitasyon-inhibisyon dengesinden hem de sistemik fizyolojik parametrelerden etkilenebilmektedir (35). KYD yatkinlığı, klinikte kullanılan bazı migren önleyici tedavilerden etkilenmesi nedeniyle translasyonel açıdan en önemli KYD parametrelerinden biridir ve KYD ile ilişkili hastalıklarda tedavi hedefi olarak görülmektedir (8, 35, 117). Çalışmamızda cGAS-STING yolağı aktivitesinin KYD yatkinlığı üzerindeki etkilerini incelemek için KYD eşiği, konvansiyonel yol olan dura üzerine topikal KCl uygulaması yöntemiyle değerlendirilmiştir. Optogenetik uyarım doku hasarına yol açmadan güvenilir bir şekilde KYD tetikleme imkanı sunsa da optogenetik yolla tetiklenen KYD yatkinlığı, konvansiyonel yöntemlerle tetiklenenlerden farklılıklar göstermektedir (38). Optogenetik KYD'lerin diğer elektrofizyolojik özellikleri konvansiyonel yöntemlerle tutarlıdır ancak optogenetik KYD yatkinlığının korteksteki göreceli *channelrhodopsin* ifadesiyle güçlü bir şekilde korele olduğu ve beynin doğal KYD yatkinlığını yansıtmadığı gösterilmiştir (39). Buna ek olarak optogenetik lazer ışığı uyarımı sağlam kafatası üzerinden yapıldığından kafatası kalınlığındaki bölgesel ve hayvanlar arası farklılıklar optogenetik KYD yatkinlığını etkileyerek varyasyona sebep olabilir (39). Dura üzerine topikal KCl uygulamasıyla KYD eşiği belirlenirken, *burr hole* açılması sırasında duraya ve korteks dokusuna zarar verilmezse tutarlı sonuçlar elde edilebilir (38). Ayrıca KCl uygulamasıyla belirlenen KYD eşikleri, elektriksel uyarım gibi diğer konvansiyonel yöntemlerle iyi konkordans göstermektedir, bu bakımdan KYD

yatkınlığının değerlendirilmesi için sık kullanılmaktadır (35, 288). Bu bilgiler ışığında, topikal KCl uygulamasıyla KYD eşiklerinin belirlenmesi beynin doğal KYD yatkınlığını daha iyi yansıtmayı nedeniyle çalışmamızda optogenetik uyarmı yerine kullanılmıştır.

KYD ile kraniyal ağrı yanıtları arasındaki bağlantı yakın zamanda yapılan çalışmalarla kurulmuştur. Optogenetik yolla tetiklenen KYD'nin 1 saat içinde periorbital allodini gelişimine neden olduğu ve allodininin 2 gün içinde normale döndüğü gösterilmiştir. Tekrarlayan KYD dalgalarının daha uzun süreli ağrı yanıtlarına yol açtığı ve allodininin 14 güne kadar devam edebildiği gösterilmiştir (23, 24, 34, 262). Allodiniye ek olarak, artmış kafa bakımı, ağrıyla ilişkili yüz mimikleri ve artmış anksiyete davranışı gibi baş ağrısıyla ilişkili diğer davranışlar optogenetik KYD sonrası artış göstermiştir (8, 23, 25). Bulgularımız KYD ile ilişkili inflamatuvar cevaplarda cGAS-STING yolağının rolünü açığa çıkartması üzerine, yolağın KYD ile ilişkili periorbital ağrı yanıtları üzerindeki etkisi de incelenmiştir. Yakın zamanda çeşitli ağrı modellerinde yapılan çalışmalarda duyu nöronlarında cGAS-STING yolağı aktivasyonu ve tip 1 interferon sentezi bildirilmiştir. Duyu nöronlarından salınan interferonlar otokrin ve parakrin etkilerle tip 1 interferon reseptörü sinyali üzerinden nöronlarda sodyum ve kalsiyum kanal aktivitesinde azalmaya yol açarak nöronal uyarılabilirliği azaltmış ve ağrı davranışlarında hafiflemeye neden olmuştur (58, 253). Kanseri ağrısı ve nöropatik ağrı gibi ağrı modellerinde, dışarıdan uygulanan STING agonistleri de benzer şekilde 4 saat içinde başlayan ve 48 saate kadar sürebilen akut analjezik etkiler göstermiştir (58, 59, 253). Analjezik etkinin neredeyse morfin kadar güçlü olduğu gözlenmiş ve etkinin STING aktivasyonu ve tip 1 interferon sinyali üzerinden dorsal kök gangliyonundaki duyu nöronlarının aktivitesini baskılaması ile gerçekleştiği doğrulanmıştır (58, 59).

cGAS-STING yolağının nosisepsiyondaki rolü henüz tartışmalıdır çünkü çelişkili bazı bulgular yolak aktivasyonunun ağrı oluşumunu destekleyici etkileri olabileceğini de göstermiştir. Kronik ağrı modellerinde yapılan çalışmalarda, uzamış cGAS-STING yolağı aktivasyonunun mikrogliyalarda M1 polarizasyona geçiş ve pro-inflamatuvar sitokin salıverilmesine neden olarak hiperaljeziye katkıda bulunduğunu gösterilmiştir (60, 61, 255). cGAS-STING yolağı inhibisyonunun kronik

ağrı modellerinde inflamatuvar değişiklikleri azalttığı ve hiperaljeziyi hafiflettiği görülmüştür (62). Bu bulgular cGAS-STING yolağının, etkilenen hücre tipleri, zamanlama ve kullanılan deneysel tasarıma bağlı olarak ağrı yanıtları üzerinde iki yönlü etkileri olabileceğini vurgulamaktadır. Çalışmamızda STING aktivasyonunun 24 saate kadar olan akut etkilerine odaklanılmıştır ve KYD yatkınlığı ve KYD ile ilişkili ağrı yanıtlarını azaltıcı yönde bir etkisi olduğunu gözlenmiştir. Bulgularımız, STING aktivasyonunun akut etkilerinin nöronal uyarılabilirlikteki değişiklikleri yansıttığına işaret etmektedir. Çalışılan zaman diliminde mikrogliyalarda tip 1 interferon veya NF- κ B aracılı pro-inflamatuvar cevap gözlenmemesi ve mikrogliyal aktivasyonun ilk 24 saatten sonra ortaya çıkması görülen anti-nosiseptif etkilerin nöronal mekanizmalarla oluştuğunu desteklemektedir.

cGAS-STING yolağı aktivasyonunun erken dönemde koruyucu etki göstermesi, yolağın KYD oluşumu ve ilişkili ağrı yanıtları üzerinde karmaşık ve bağlama göre değişen rolleri olabileceğini göstermektedir. Sistemik STING inhibisyonunun beyinde KYD sonrası mikrogliyal aktivasyonu engellemesine rağmen KYD yatkınlığını ve periorbital ağrı yanıtlarını kötüleştirmediği, mikrogliyal cGAS-STING yolağı aktivasyonunun her zaman pro-inflamatuvar ve zararlı etkileri olacağı yönündeki bir modele karşı sonuçlar oluşturmaktadır. Mikrogliyaların spesifik patoloji ve aktivasyon derecesine bağlı olarak, KYD ve ilişkili inflamatuvar yanıt üzerinde koruyucu veya zararlı etkiler gösterebileceği bildirilmiştir (289, 290). Buna göre, bulgularımız daha adaptif bir mikrogliyal cevapla uyumludur ve nöronlarda ve/veya mikrogliyalarda cGAS-STING yolağı aktifleşmesinin KYD sonrası erken dönemde kortikal uyarılabilirliği sınırlandırarak çözünme mekanizmalarını destekleyebileceğine işaret etmektedir. Doğal bağışıklık sistemi açısından daha geniş bağlamda düşünüldüğünde cGAS-STING yolağının aktivasyon derecesi, zamanlama ve etkilenen hücre tiplerine bağlı olarak hem koruyucu hem zararlı etkileri olabileceği söylenebilir (53, 62, 291). Bu bakımdan bulgularımız, cGAS-STING yolağının gelişigüzel sistemik olarak hedeflenmesinin iyi bir tedavi stratejisi olmayabileceğine dikkat çekmektedir ve cGAS-STING yolağı ile genel olarak inflamatuvar yolların, auralı migren için tedavi hedefi olarak değerlendirilirken doz, zamanlama ve farklı hücre tiplerindeki özgül etkilerinin dikkatli bir şekilde değerlendirilmesi gerektiğini vurgulamaktadır. Gelecek çalışmalarda kronik migren modellerinde cGAS-STING

yolağının ağrı gelişimi üzerindeki daha uzun vadeli etkilerinin incelenmesi, baş ağrısı oluşumunda nöronal ve mikrogliyal cGAS-STING yolağı sinyalinin rolünün daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.

Çalışmamızın güçlü ve özgün yönlerinden biri KYD sonrası inflamatuvar cevap ve cGAS-STING yolağı aktivasyonunun incelenmesi için KYD dalgalarının optogenetik yöntemle tetiklenmiş olmasıdır. KYD tetiklemesi çeşitli şekillerde yapılabilir. Konvansiyonel yöntemler arasında topikal KCl uygulanması, beyine elektriksel uyarı, beyine mekanik uyarı (*pin prick*) gibi yöntemler yer almaktadır (35, 37). Bu yöntemler sık kullanılan ve güvenilir bir şekilde KYD tetiklediği bilinen yöntemler olsa da kafatasına kraniyotomi yapılmasını gerektirmeleri, dura hasarı, travma ve kanamaya neden olabilmeleri gibi nedenlerden ötürü KYD ilişkili nöroinflamasyonun incelenmesi açısından karıştırıcı faktörler oluşturmaktadır. Bunun aşılması için yakın zamanda yapılan çalışmalarda optogenetik olarak KYD tetiklemesi geliştirilmiştir. Thy1-ChR2-YFP genotipine sahip transgenik farelerde, kortikal nöronlarında ışıkla uyarılabilen bir iyon kanalı olan *channelrhodopsin* ifade etmeleri sayesinde bütünlüğü bozulmamış sağlam kafatası üzerinden mavi ışık uyarımıyla KYD tetiklenmesi için gerekli olan depolarizasyon aktivitesi non-invazif bir şekilde oluşturulabilmektedir (38, 39). Optogenetik uyarım ile gerçek zamanlı ve kontrollü bir uyarı verilebildiği için istenilen sayıda KYD dalgası tetiklenmesi mümkün olmaktadır ve etkileri titre edilebilmektedir. Optogenetik yöntemle tetiklenen KYD'nin beyinde konvansiyonel yöntemlerle tetiklenene benzer şekilde inflamatuvar aktivasyon sağladığı gösterildiğinden güncel literatürde KYD ile ilişkili inflamasyonun çalışılması için optogenetik yöntemler önem kazanmıştır (27, 191, 202). Laboratuvarımız KYD araştırmalarında optogenetik yöntemi kullanan dünyada sayılı laboratuvarlardan biridir.

KYD ile ilişkili ağrı davranışlarının optogenetik KYD tetiklenmesi sonrası incelenmesi çalışmamızın bir diğer güçlü yönünü oluşturmaktadır. Optogenetik KYD tetiklenmesi non-invazif biçimde, beyne direk erişim gerektirmeden KYD tetiklenmesine imkan vermesi sayesinde KYD ile ilişkili davranışsal cevapların incelenmesi için bir dönüm noktası olmuştur. Bu sayede KYD tetiklenmesi sonrası erken dönemde oluşan davranışsal değişikliklerin karıştırıcı faktörler olmadan

incelenmesi mümkün olmaktadır (23, 38). Ayrıca KYD dalgalarının uyanık ve serbest şekilde hareket eden hayvanlarda da tetiklenebilmesi KYD dalgası sırasında ve sonrasında oluşan davranışların gerçek zamanlı olarak gözlenmesine olanak sağlamış ve KYD sırasında oluşan özgül davranışların karakterize edilebilmesini sağlamıştır (23, 24, 34, 38). Çalışmamızda KYD ile ilişkili ağrı yanıtlarını değerlendirmek için optogenetik yöntem kullanılmıştır ve KYD tetiklemesinden önce cerrahinin etkilerinin geçmesi için 1 hafta beklenerek cerrahi ve stres ile ilişkili karıştırıcı faktörlerin etkileri azaltılmıştır. Bu sayede KYD tetiklemesi sonrasında görülen davranışsal değişikliklerin ve ilaç müdahalesinin etkisinin direkt olarak KYD ile ilişkili mekanizmalarla ortaya çıktığı konusunda daha güçlü kanıtlar elde edilmiştir.

KYD sonrası mikroglial aktivasyonun ve mikroglialarda gözlenen morfolojik değişikliklerin detaylı ve güçlü analiz yöntemleriyle incelenmiş olması da çalışmamızın güçlü ve özgün bir yönüdür. KYD literatüründe mikroglial aktivasyonu inceleyen önceki çalışmalarda mikrogliaların gövde büyüklüğü ve hücre alanının artışı değerlendirilmiş ancak mikrogliaların morfolojik karmaşıklığını ve uzantıların dallanma derecesini birlikte inceleyen analizler yapılmamıştır (27, 28, 292). Çalışmamızda mikroglia morfolojisi mikrogliaların gövde büyüklüğü, uzantılarının uzunluğu, dallanma derecesi ve morfolojik karmaşıklığını hesaba katan ramifikasyon endeksi ve Sholl analizleri kullanılarak değerlendirilmiştir ve KYD'nin neden olduğu morfolojik değişiklikler daha detaylı incelenerek kantifiye edilmiştir. Gelecek çalışmalarda KYD sonrası mikroglia morfolojisinin analizi için daha fazla parametreyi değerlendiren otomatize yöntemlerin de kullanılması morfolojideki daha ince detayların açığa çıkarılması için önemli olacaktır.

Çalışmamızın bazı kısıtlılıkları da bulunmaktadır. İlk olarak, çalışmamızda hastalık modeli olarak KYD kullanılmıştır. KYD, iskemik ve travmatik beyin hasarında önemli rolleri olan bir nörolojik fenomendir. Bunun yanı sıra KYD'nin, migren aurasının elektrofizyolojik karşılığı olduğu düşünülmektedir ve migren aurasının prelinik modeli olarak kullanılmaktadır. Bu bakımdan elde ettiğimiz bulgular translasyonel açıdan sadece auralı migren için genellenebilir ve tüm migren kliniğine genellenemez. Auralı migren, tüm migren hastalarının küçük bir grubunda görülmektedir ve migren aurası her zaman baş ağrısına eşlik etmemektedir (129). KYD

modeli üzerinden elde edilen bulguları geniş klinik süreçlere genellemek uygun olmayabilir. Deneylerde kullanılan hayvanlar ile insanların beyinleri arasındaki farklılıklar da KYD yayılımı ve nosiseptif süreçler açısından fark yaratacağından elde edilen bulguların insan çalışmalarına aktarılması kısıtlı olabilir (293). KYD'nin migren kliniğiyle bağlantısı, klinik olarak etkinliği gösterilmiş bazı migren önleyici tedavilerin KYD yatkınlığı üzerinde de etkili olması sayesinde gösterilmiş olsa da literatürde tutarsızlıklar gözlenmektedir. KYD yatkınlığını etkileyen her tedavi stratejisi migren için klinik etkinlik göstermemektedir ve arada direkt nedensel bir ilişki henüz kurulamamıştır (8, 117, 294, 295). KYD deneysel modellerde TVS aktivasyonuna yol açarak spontane ağrı davranışları, periorbital allodini ve fotofobi gibi migren hastalarında görülen bazı semptomların ortaya çıkmasını sağlamaktadır ancak bu deneysel çıktılar klinik migren fenotipini tam olarak yansıtmamaktadır (8, 23, 25, 262). Bunlar KYD modellerinden elde edilen bulguların migren kliniği için translasyonel geçerliliği değerlendirilirken göz önünde bulundurulmalıdır.

Çalışmamızın başka bir kısıtlılığı KYD sonrası cGAS-STING yolağı aktivitesinin sadece kortekte incelenmesi ve KYD ve ağrı üzerindeki etkilerinin kortikal mekanizmalar üzerinden araştırılmasıdır. Migren ağrısının oluşumunda kritik rolleri olan trigeminovasküler sistem ve ikinci sıra nosiseptif nöronlar henüz incelenmemiştir. cGAS-STING yolağı modülasyonunun kraniyal ağrı fenotipleri üzerinde bu kadar belirgin etkileri olması cGAS-STING aracılı inflamasyonun trigeminovasküler sistemi de etkilediğine işaret etmektedir. cGAS-STING yolağının meningeal inflamasyon ve trigeminovasküler sistem aktivasyonunda oynadığı rollerin araştırılması baş ağrısı patofizyolojisindeki yerinin anlaşılması açısından önem taşımaktadır.

Çalışmamızda optogenetik KYD tetikleme için Thy1-ChR2-YFP genotipli transgenik fareler kullanılmıştır. Optogenetik yöntem doku hasarından kaynaklanan karıştırıcı faktörlerin önüne geçmeyi sağlasa da, soy içi üreme ile elde edilmiş transgenik fareler, daha yüksek genetik varyasyon gösteren yabanıl tip fareler ve insanlara kıyasla farklı inflamatuvar ve davranışsal tepkiler oluşturabilirler (296). Bununla birlikte, KYD ile ilişkili inflamatuvar cevapların transgenik farelerde optogenetik yöntemle tetiklenmesi durumunda da yabanıl tip farelerde konvansiyonel

yöntemlerle tetiklenmesi durumuna benzer özellikler gösterdiği daha önceki çalışmalarda görülmüştür (202).

cGAS-STING yolağının spesifik agonist ve antagonistler kullanılarak farmakolojik modülasyonunun KYD yatkınlığı ve ağrı yanıtları üzerinde belirgin etkileri görülmüş olsa da bu etkilerin genetik yöntemlerle doğrulanması elde edilen bulguları güçlendirecektir. Önceki çalışmalarda STING proteininin hem global hem duyu nöronlarına spesifik nakavt edilmesinin farelerde ağrı hassasiyetini arttırdığı gösterilmiştir. Benzer etki tip 1 interferon reseptörünün nakavt edilmesiyle de görülmüştür ve bu şekilde nosisepsiyonda STING-IFN aksının rolü doğrulanmıştır (58). Gelecek çalışmalarda benzer koşullu nakavt stratejilerinin trigeminal ikinci ve üçüncü sıra nöronlara uygulanması STING ve tip 1 interferon sinyalinin kranial ağrı oluşumundaki spesifik rollerinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.

Son olarak, çalışmamızda tüm gruplarda eşit sayıda erkek ve dişi fare kullanılmış olsa da incelenen parametrelere cinsiyet etkisinin değerlendirilmesi için örneklem büyüklüğümüz yeterli değildir ve dişi hayvanlarda östrus döngüsü takibi yapılmamıştır. Dişi hayvanlarda farklı östrus döngülerindeki gonadal hormonların inflamatuvar yanıtlar ve ağrı davranışları açısından önemli etkileri olduğu bilindiğinden bu da çalışmamızın kısıtlılıklarından biridir. Önceki çalışmalarda dişilerin daha yüksek KYD yatkınlığı ve artmış ağrı yanıtları gösterdiği ve yüksek östrojen seviyeleriyle karakterize östrus döngülerinde bu farkın daha da belirginleştiği görülmüştür (182, 262, 297-299). Ancak KYD tetiklenmesi sonrası östrus döngüsünden bağımsız olarak tüm aşamalarda benzer ölçüde periorbital allodini geliştiği görülmüştür bu bakımdan KYD etkisinin hormonal etkiden daha baskın olduğu öne sürülmüştür (262). Çalışmamızda incelediğimiz parametrelerde cinsiyet etkisi ve cinsiyet temelli farklılıklar gözlemlenmemiştir. Ancak bu alandaki geniş literatür cinsiyetin, inflamasyon ve nosisepsiyon için önemli bir biyolojik etken olduğunu desteklemektedir. Cinsiyet hormonlarının bağışıklık hücrelerinin fonksiyonları, mikrogliyal aktivasyon ve interferon yanıtları gibi çeşitli bağışıklık sistemi süreçlerini etkileyebildiği gösterilmiştir ve migren çalışmalarında özellikle dişilerde daha belirgin ağrı yanıtları gözlenmiştir (182, 298, 300-304). Bu bakımdan çalışmamızdaki KYD ile ilişkili inflamatuvar ve nosiseptif süreçler üzerinde cinsiyet etkisine yönelik negatif

bulgularımız, bu süreçler üzerinde cinsiyet temelli modülasyonun olmadığından ziyade, bizim deneysel koşullarımızda KYD tarafından tetiklenen cGAS-STING yolağı aktivasyonunun ve ağrı davranışlarının her iki cinsiyette benzer şekilde geliştiği şeklinde yorumlanmıştır. Bu süreçler üzerinde cinsiyet etkisini daha iyi aydınlatmak ve cinsiyet temelli farklılıkları açığa çıkarmak için yeterli istatistik güce sahip ve östrus döngüsü takibi yapılan çalışmalar gereklidir.

Bu tez çalışmasında KYD ile inflamatuvar süreçler arasındaki ilişkiyi inceleyen literatüre, daha önce çeşitli nöroinflamatuvar süreçlerde rolleri gösterilmiş ancak bu bağlamdaki rolleri henüz bilinmeyen cGAS-STING yolağı kazandırılmıştır. Buna ek olarak KYD ile baş ağrısı oluşumu arasındaki mekanistik boşlukları doldurabilecek bir mekanizma olarak cGAS-STING yolağının rolü ortaya konmuştur. Çalışmamızda cGAS-STING yolağı, beyinde protein seviyelerini ve protein modifikasyonlarını değerlendiren moleküler yöntemlerle incelenmiş ve hücre tipine özgün değişiklikler gösterilmiştir. cGAS-STING yolağının mikrogliyal aktivasyondaki rolü mikrogliya morfolojisini değerlendiren detaylı analiz yöntemleriyle incelenmiştir. Daha önemlisi, cGAS-STING yolağının KYD ile ilişkili ağrı yanıtlarındaki rolü, uyanık hayvanlarda mekanik ağrı hassasiyetinin incelenmesini sağlayan von Frey testi ile incelenmiştir. Araştırma sürecinde mikrogliya morfolojisi analizi ve optogenetik KYD sonrası allodini gelişiminin von Frey testiyle incelenmesi gibi yöntemler laboratuvarımızın repertuarına kazandırılmıştır. KYD ile ilişkili nöroinflamatuvar ve nosiseptif süreçlerde cGAS-STING bağışıklık sistemi yolağının rollerinin güçlü ve yenilikçi yöntemlerle ortaya çıkarılması sayesinde bu tez çalışmasının literatüre önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak bu tez çalışmasında farelerde non-invazif biçimde optogenetik yöntemle tetiklenen KYD sonrası serebral kortekste cGAS-STING yolağının nöronlarda aktive olduğu görülmüş ve yolak aktivasyonunun çoklu KYD sonrası gözlenen mikrogliyal aktivasyonda rol oynadığı gösterilmiştir. Doğal bağışıklık sisteminin önemli bileşenlerinden biri olan cGAS-STING yolağı ve ilişkili tip 1 interferon cevabının rolü migren aurası preklinik modeli olan KYD modelinde incelenmiştir. cGAS-STING yolağının KYD yatkınlığını ve KYD ile ilişkili kraniyal ağrı davranışlarını düzenleyebildiği ve yolak aktivasyonunun erken dönemde allodini gelişimi için koruyucu etki gösterebildiği görülmüştür. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular KYD ile nöroinflamasyon ve nosisepsiyon arasındaki ilişkiye yeni mekanizmalar kazandırmış ve nöroinflamasyonda önemli rolleri olduğu bilinen cGAS-STING yolağının bu ilişkide, bağışıklık yanıtları ve nöral fonksiyonlar arasındaki bağı kuran etkenlerden biri olduğunu açığa çıkarmıştır.

Bu tez çalışması beyindeki doğal, steril nöroinflamatuvar süreçlerin nöronal uyarılabilirlik ve baş ağrısı oluşumu üzerindeki etkilerinin incelenmesi için güçlü bir çerçeve sunmaktadır. Beyin parankiminde ve ekstra aksiyal meninksler ve trigeminal yolaklarda steril inflamatuvar cevapla ilişkili olan ve kemirgenlerde migren benzeri ağrı davranışlarına neden olan KYD modeli bu süreçlerin aydınlatılması için önemli bir araştırma aracıdır. Bu çalışmada KYD modeli kullanılarak cGAS-STING yolağı ve ilişkili interferon cevabının, kortikal mekanizmalar üzerinden nöroinflamasyon ve kraniyal ağrı oluşumu üzerindeki etkileri aydınlatılmıştır. cGAS-STING yolağının migren kliniğinin aura dışında başka yönlerini de modelleyen ve kronik migren gelişimini yansıtan modellerde de incelenmesi, migren patofizyolojisindeki yerinin daha iyi anlaşılması açısından gelecek çalışmalar için önemli bir araştırma yönü olacaktır. Buna ek olarak, cGAS-STING aracılı inflamasyonun meninksler ve trigeminovasküler sistem yolaklarındaki etkilerinin de incelenmesi baş ağrısı oluşumundaki rollerini daha detaylı bir şekilde açığa çıkartacaktır. Bu çalışmalardan elde edilecek bulgular doğal bağışıklık sistemi aracılı inflamatuvar süreçlerin migrene yönelik tedavi hedefi olarak kullanılabilirliğine dair önemli bilgiler verecek ve var olan

migren tedavilerine cevap vermeyen hastalar için yeni tedavilerin geliştirilmesine öncülük edecektir.

7. KAYNAKLAR

1. Leao AAP. Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *Journal of Neurophysiology*. 1944;7(6):359–90.
2. Brozek G. Changes in the membrane potential of cortical cells during spreading depression. *Physiol Bohemoslov*. 1966;15(2):98–103.
3. Collewijn H, Harreveld AV. Membrane potential of cerebral cortical cells during spreading depression and asyxia. *Exp Neurol*. 1966;15(4):425–36.
4. Sugaya E, Takato M, Noda Y. Neuronal and glial activity during spreading depression in cerebral cortex of cat. *Journal of neurophysiology*. 1975;38 4:822–41.
5. Somjen GG. Mechanisms of Spreading Depression and Hypoxic Spreading Depression-Like Depolarization. *Physiological Reviews*. 2001;81(3):1065–96.
6. Leao AA. Further observations on the spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol*. 1947;10(6):409–14.
7. Pietrobon D, Moskowitz MA. Chaos and commotion in the wake of cortical spreading depression and spreading depolarizations. *Nature Reviews Neuroscience*. 2014;15(6):379–93.
8. Harriott AM, Ayata C. Spreading depolarization as a therapeutic target in migraine. *Nature Reviews Neurology*. 2025;21(10):529–43.
9. Ayata C, Lauritzen M. Spreading Depression, Spreading Depolarizations, and the Cerebral Vasculature. *Physiological Reviews*. 2015;95(3):953–93.
10. Hartings JA, Rolli ML, Lu XC, Tortella FC. Delayed secondary phase of peri-infarct depolarizations after focal cerebral ischemia: relation to infarct growth and neuroprotection. *J Neurosci*. 2003;23(37):11602–10.
11. Dreier JP, Woitzik J, Fabricius M, Bhatia R, Major S, Drenckhahn C, et al. Delayed ischaemic neurological deficits after subarachnoid haemorrhage are associated with clusters of spreading depolarizations. *Brain*. 2006;129(Pt 12):3224–37.
12. Oliveira-Ferreira AI, Winkler MK, Reiffurth C, Milakara D, Woitzik J, Dreier JP. Spreading depolarization, a pathophysiological mechanism of stroke and migraine aura. *Future Neurology*. 2012;7(1):45–64.
13. Hartings JA, Shuttleworth CW, Kirov SA, Ayata C, Hinzman JM, Foreman B, et al. The continuum of spreading depolarizations in acute cortical lesion development: Examining Leão's legacy. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017;37(5):1571–94.
14. Mehra A, Gomez F, Bischof H, Diedrich D, Laudanski K. Cortical Spreading Depolarization and Delayed Cerebral Ischemia; Rethinking Secondary Neurological Injury in Subarachnoid Hemorrhage. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(12):9883.
15. Olesen J. Cerebral and extracranial circulatory disturbances in migraine: pathophysiological implications. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*. 1991;3(1):1–28.

16. Hadjikhani N, Sanchez Del Rio M, Wu O, Schwartz D, Bakker D, Fischl B, et al. Mechanisms of migraine aura revealed by functional MRI in human visual cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(8):4687–92.
17. Ayata C. Cortical spreading depression triggers migraine attack: pro. *Headache*. 2010;50(4):725–30.
18. Ferrari MD, Goadsby PJ, Burstein R, Kurth T, Ayata C, Charles A, et al. Migraine. *Nature Reviews Disease Primers*. 2022;8(1):2.
19. Zhang X, Levy D, Nosedá R, Kainz V, Jakubowski M, Burstein R. Activation of Meningeal Nociceptors by Cortical Spreading Depression: Implications for Migraine with Aura. *The Journal of Neuroscience*. 2010;30(26):8807.
20. Karatas H, Erdener SE, Gursoy-Ozdemir Y, Lule S, Eren-Koçak E, Sen ZD, et al. Spreading Depression Triggers Headache by Activating Neuronal $Panx1$ Channels. *Science*. 2013;339(6123):1092–5.
21. Zhao J, Levy D. Dissociation between CSD-Evoked Metabolic Perturbations and Meningeal Afferent Activation and Sensitization: Implications for Mechanisms of Migraine Headache Onset. *The Journal of Neuroscience*. 2018;38(22):5053.
22. Dehghani A, Phisonkunkasem T, Yilmaz Ozcan S, Dalkara T, van den Maagdenberg AMJM, Tolner EA, et al. Widespread brain parenchymal HMGB1 and NF- κ B neuroinflammatory responses upon cortical spreading depolarization in familial hemiplegic migraine type 1 mice. *Neurobiology of Disease*. 2021;156:105424.
23. Harriott AM, Chung DY, Uner A, Bozdayi RO, Morais A, Takizawa T, et al. Optogenetic Spreading Depression Elicits Trigeminal Pain and Anxiety Behavior. *Ann Neurol*. 2021;89(1):99–110.
24. Morais A, Qin T, Ayata C, Harriott AM. Inhibition of persistent sodium current reduces spreading depression-evoked allodynia in a mouse model of migraine with aura. *Pain*. 2023;164(11):2564–71.
25. Dehghani A, Schenke M, van Heiningen SH, Karatas H, Tolner EA, van den Maagdenberg AMJM. Optogenetic cortical spreading depolarization induces headache-related behaviour and neuroinflammatory responses some prolonged in familial hemiplegic migraine type 1 mice. *The Journal of Headache and Pain*. 2023;24(1):96.
26. Kassebaum NJ, Arora M, Barber RM, Bhutta ZA, Brown J, Carter A, et al. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 315 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE), 1990–2013;2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*. 2016;388(10053):1603–58.
27. Chen P-Y, Yen J-C, Liu T-T, Chen S-T, Wang S-J, Chen S-P. Neuronal NLRP3 inflammasome mediates spreading depolarization-evoked trigeminovascular activation. *Brain*. 2023;146(7):2989–3002.
28. Takizawa T, Shibata M, Kayama Y, Shimizu T, Toriumi H, Ebine T, et al. High-mobility group box 1 is an important mediator of microglial activation induced by cortical spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017;37(3):890–901.

29. Soylu KO, Yemisci M, Karatas H. The link between spreading depolarization and innate immunity in the central nervous system. *The Journal of Headache and Pain*. 2025;26(1):25.
30. Bolay H, Reuter U, Dunn AK, Huang Z, Boas DA, Moskowitz MA. Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nat Med*. 2002;8(2):136–42.
31. Levy D, Burstein R, Kainz V, Jakubowski M, Strassman AM. Mast cell degranulation activates a pain pathway underlying migraine headache. *Pain*. 2007;130(1-2):166–76.
32. Schain AJ, Melo-Carrillo A, Borsook D, Grutzendler J, Strassman AM, Burstein R. Activation of pial and dural macrophages and dendritic cells by cortical spreading depression. *Annals of Neurology*. 2018;83(3):508–21.
33. Zhao J, Levy D. Modulation of intracranial meningeal nociceptor activity by cortical spreading depression: a reassessment. *J Neurophysiol*. 2015;113(7):2778–85.
34. Harriott AM, Kaya M, Ayata C. Oxytocin shortens spreading depolarization-induced periorbital allodynia. *The Journal of Headache and Pain*. 2024;25(1):152.
35. Ayata C. Pearls and pitfalls in experimental models of spreading depression. *Cephalalgia*. 2013;33(8):604–13.
36. Harriott AM, Takizawa T, Chung DY, Chen S-P. Spreading depression as a preclinical model of migraine. *The Journal of Headache and Pain*. 2019;20(1):45.
37. Akerman S, Holland PR, Goadsby PJ. Mechanically-induced cortical spreading depression associated regional cerebral blood flow changes are blocked by Na⁺ ion channel blockade. *Brain Res*. 2008;1229:27–36.
38. Houben T, Loonen IC, Baca SM, Schenke M, Meijer JH, Ferrari MD, et al. Optogenetic induction of cortical spreading depression in anesthetized and freely behaving mice. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2017;37(5):1641–55.
39. Chung DY, Sadeghian H, Qin T, Lule S, Lee H, Karakaya F, et al. Determinants of Optogenetic Cortical Spreading Depolarizations. *Cerebral Cortex*. 2018;29(3):1150–61.
40. Ablasser A, Chen ZJ. cGAS in action: Expanding roles in immunity and inflammation. *Science*. 2019;363(6431).
41. Decout A, Katz JD, Venkatraman S, Ablasser A. The cGAS–STING pathway as a therapeutic target in inflammatory diseases. *Nature Reviews Immunology*. 2021;21(9):548–69.
42. Ishikawa H, Ma Z, Barber GN. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature*. 2009;461(7265):788–92.
43. Cerboni S, Jeremiah N, Gentili M, Gehrman U, Conrad C, Stolzenberg MC, et al. Intrinsic antiproliferative activity of the innate sensor STING in T lymphocytes. *J Exp Med*. 2017;214(6):1769–85.
44. Morehouse BR, Govande AA, Millman A, Keszei AFA, Lowey B, Ofir G, et al. STING cyclic dinucleotide sensing originated in bacteria. *Nature*. 2020;586(7829):429–33.

45. An J, Durcan L, Karr RM, Briggs TA, Rice GI, Teal TH, et al. Expression of Cyclic GMP-AMP Synthase in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* 2017;69(4):800–7.
46. Wang J, Li R, Lin H, Qiu Q, Lao M, Zeng S, et al. Accumulation of cytosolic dsDNA contributes to fibroblast-like synoviocytes-mediated rheumatoid arthritis synovial inflammation. *Int Immunopharmacol.* 2019;76:105791.
47. Woo SR, Fuertes MB, Corrales L, Spranger S, Furdyna MJ, Leung MY, et al. STING-dependent cytosolic DNA sensing mediates innate immune recognition of immunogenic tumors. *Immunity.* 2014;41(5):830–42.
48. Ohkuri T, Ghosh A, Kosaka A, Zhu J, Ikeura M, David M, et al. STING contributes to antglioma immunity via triggering type I IFN signals in the tumor microenvironment. *Cancer Immunol Res.* 2014;2(12):1199–208.
49. Fryer AL, Abdullah A, Taylor JM, Crack PJ. The Complexity of the cGAS-STING Pathway in CNS Pathologies. *Front Neurosci.* 2021;15:621501.
50. Mathur V, Burai R, Vest RT, Bonanno LN, Lehallier B, Zardeneta ME, et al. Activation of the STING-Dependent Type I Interferon Response Reduces Microglial Reactivity and Neuroinflammation. *Neuron.* 2017;96(6):1290–302.e6.
51. Vincent J, Adura C, Gao P, Luz A, Lama L, Asano Y, et al. Small molecule inhibition of cGAS reduces interferon expression in primary macrophages from autoimmune mice. *Nature Communications.* 2017;8(1):750.
52. Xu Q, Xu W, Cheng H, Yuan H, Tan X. Efficacy and mechanism of cGAMP to suppress Alzheimer's disease by elevating TREM2. *Brain, Behavior, and Immunity.* 2019;81:495–508.
53. Fritsch LE, Kelly C, Pickrell AM. The role of STING signaling in central nervous system infection and neuroinflammatory disease. *WIREs Mechanisms of Disease.* 2023;15(3):e1597.
54. Abdullah A, Zhang M, Frugier T, Bedoui S, Taylor JM, Crack PJ. STING-mediated type-I interferons contribute to the neuroinflammatory process and detrimental effects following traumatic brain injury. *Journal of Neuroinflammation.* 2018;15(1):323.
55. Liao Y, Cheng J, Kong X, Li S, Li X, Zhang M, et al. HDAC3 inhibition ameliorates ischemia/reperfusion-induced brain injury by regulating the microglial cGAS-STING pathway. *Theranostics.* 2020;10(21):9644–62.
56. Gamdzyk M, Doycheva DM, Araujo C, Ocak U, Luo Y, Tang J, et al. cGAS/STING Pathway Activation Contributes to Delayed Neurodegeneration in Neonatal Hypoxia-Ischemia Rat Model: Possible Involvement of LINE-1. *Mol Neurobiol.* 2020;57(6):2600–19.
57. Wang R, Zhu Y, Liu Z, Chang L, Bai X, Kang L, et al. Neutrophil extracellular traps promote tPA-induced brain hemorrhage via cGAS in mice with stroke. *Blood.* 2021;138(1):91–103.
58. Donnelly CR, Jiang C, Andriessen AS, Wang K, Wang Z, Ding H, et al. STING controls nociception via type I interferon signalling in sensory neurons. *Nature.* 2021;591(7849):275–80.

59. Wang K, Donnelly CR, Jiang C, Liao Y, Luo X, Tao X, et al. STING suppresses bone cancer pain via immune and neuronal modulation. *Nature Communications*. 2021;12(1):4558.
60. Sun J, Zhou Y-q, Xu B-y, Li J-y, Zhang L-q, Li D-y, et al. STING/NF- κ B/IL-6-Mediated Inflammation in Microglia Contributes to Spared Nerve Injury (SNI)-Induced Pain Initiation. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2022;17(3):453–69.
61. Wu W, Zhang X, Wang S, Li T, Hao Q, Li S, et al. Pharmacological inhibition of the cGAS-STING signaling pathway suppresses microglial M1-polarization in the spinal cord and attenuates neuropathic pain. *Neuropharmacology*. 2022;217:109206.
62. Hu Y, Chen Y, Liu T, Zhu C, Wan L, Yao W. The bidirectional roles of the cGAS-STING pathway in pain processing: Cellular and molecular mechanisms. *Biomed Pharmacother*. 2023;163:114869.
63. Leo AAP, Morison RS. Propagation of spreading cortical depression. *Journal of Neurophysiology*. 1945;8(1):33–45.
64. Dreier JP. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nature Medicine*. 2011;17(4):439–47.
65. Matsuura T, Bureš J. The minimum volume of depolarized neural tissue required for triggering cortical spreading depression in rat. *Experimental Brain Research*. 1971;12(3):238–49.
66. Tang YT, Mendez JM, Theriot JJ, Sawant PM, López-Valdés HE, Ju YS, et al. Minimum conditions for the induction of cortical spreading depression in brain slices. *J Neurophysiol*. 2014;112(10):2572–9.
67. Lothman E, Lamanna J, Cordingley G, Rosenthal M, Somjen G. Responses of electrical potential, potassium levels, and oxidative metabolic activity of the cerebral neocortex of cats. *Brain Res*. 1975;88(1):15–36.
68. Kraig RP, Nicholson C. Extracellular ionic variations during spreading depression. *Neuroscience*. 1978;3(11):1045–59.
69. Hansen AJ, Zeuthen T. Extracellular ion concentrations during spreading depression and ischemia in the rat brain cortex. *Acta Physiol Scand*. 1981;113(4):437–45.
70. Fabricius M, Jensen LH, Lauritzen M. Microdialysis of interstitial amino acids during spreading depression and anoxic depolarization in rat neocortex. *Brain Res*. 1993;612(1-2):61–9.
71. Grafstein B. Mechanism of spreading cortical depression. *J Neurophysiol*. 1956;19(2):154–71.
72. Peters O, Schipke CG, Hashimoto Y, Kettenmann H. Different mechanisms promote astrocyte Ca²⁺ waves and spreading depression in the mouse neocortex. *J Neurosci*. 2003;23(30):9888–96.
73. Chuquet J, Hollender L, Nimchinsky EA. High-resolution in vivo imaging of the neurovascular unit during spreading depression. *J Neurosci*. 2007;27(15):4036–44.
74. Fujita S, Mizoguchi N, Aoki R, Cui Y, Koshikawa N, Kobayashi M. Cytoarchitecture-Dependent Decrease in Propagation Velocity of Cortical Spreading

- Depression in the Rat Insular Cortex Revealed by Optical Imaging. *Cereb Cortex*. 2016;26(4):1580–9.
75. Fabricius M, Fuhr S, Bhatia R, Boutelle M, Hashemi P, Strong AJ, et al. Cortical spreading depression and peri-infarct depolarization in acutely injured human cerebral cortex. *Brain*. 2006;129(Pt 3):778–90.
 76. Dohmen C, Sakowitz OW, Fabricius M, Bosche B, Reithmeier T, Ernestus RI, et al. Spreading depolarizations occur in human ischemic stroke with high incidence. *Ann Neurol*. 2008;63(6):720–8.
 77. Mies G, Paschen W. Regional changes of blood flow, glucose, and ATP content determined on brain sections during a single passage of spreading depression in rat brain cortex. *Exp Neurol*. 1984;84(2):249–58.
 78. Gault LM, Lin CW, LaManna JC, Lust WD. Changes in energy metabolites, cGMP and intracellular pH during cortical spreading depression. *Brain Res*. 1994;641(1):176–80.
 79. Selman WR, Lust WD, Pundik S, Zhou Y, Ratcheson RA. Compromised metabolic recovery following spontaneous spreading depression in the penumbra. *Brain Res*. 2004;999(2):167–74.
 80. Gjedde A, Hansen AJ, Quistorff B. Blood-brain glucose transfer in spreading depression. *J Neurochem*. 1981;37(4):807–12.
 81. Lauritzen M, Diemer NH. Uncoupling of cerebral blood flow and metabolism after single episode of cortical spreading depression in the rat brain. *Brain Res*. 1986;370(2):405–8.
 82. Takano T, Tian G-F, Peng W, Lou N, Lovatt D, Hansen AJ, et al. Cortical spreading depression causes and coincides with tissue hypoxia. *Nature Neuroscience*. 2007;10(6):754–62.
 83. Mies G, Niebuhr I, Hossmann KA. Simultaneous measurement of blood flow and glucose metabolism by autoradiographic techniques. *Stroke*. 1981;12(5):581–8.
 84. Kocher M. Metabolic and hemodynamic activation of postischemic rat brain by cortical spreading depression. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1990;10(4):564–71.
 85. Duckrow RB. Regional cerebral blood flow during spreading cortical depression in conscious rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1991;11(1):150–4.
 86. Dreier JP, Petzold G, Tille K, Lindauer U, Arnold G, Heinemann U, et al. Ischaemia triggered by spreading neuronal activation is inhibited by vasodilators in rats. *J Physiol*. 2001;531(Pt 2):515–26.
 87. Dunn AK, Bolay H, Moskowitz MA, Boas DA. Dynamic imaging of cerebral blood flow using laser speckle. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001;21(3):195–201.
 88. Ayata C, Shin HK, Salomone S, Ozdemir-Gursoy Y, Boas DA, Dunn AK, et al. Pronounced hypoperfusion during spreading depression in mouse cortex. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004;24(10):1172–82.
 89. Hanalioglu S, Taskiran-Sag A, Karatas H, Donmez-Demir B, Yilmaz-Ozcan S, Eren-Kocak E, et al. Cortical spreading depression can be triggered by sensory

stimulation in primed wild type mouse brain: a mechanistic insight to migraine aura generation. *The Journal of Headache and Pain*. 2022;23(1):107.

90. Gorji A. Spreading depression: a review of the clinical relevance. *Brain Res Brain Res Rev*. 2001;38(1-2):33–60.

91. Piilgaard H, Lauritzen M. Persistent increase in oxygen consumption and impaired neurovascular coupling after spreading depression in rat neocortex. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2009;29(9):1517–27.

92. Chang JC, Shook LL, Biag J, Nguyen EN, Toga AW, Charles AC, et al. Biphasic direct current shift, haemoglobin desaturation and neurovascular uncoupling in cortical spreading depression. *Brain*. 2010;133(Pt 4):996–1012.

93. Nedergaard M, Hansen AJ. Spreading depression is not associated with neuronal injury in the normal brain. *Brain Research*. 1988;449(1):395–8.

94. Shin HK, Dunn AK, Jones PB, Boas DA, Moskowitz MA, Ayata C. Vasoconstrictive Neurovascular Coupling during Focal Ischemic Depolarizations. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2006;26(8):1018–30.

95. von Bornstädt D, Houben T, Seidel JL, Zheng Y, Dilekoz E, Qin T, et al. Supply-Demand Mismatch Transients in Susceptible Peri-infarct Hot Zones Explain the Origins of Spreading Injury Depolarizations. *Neuron*. 2015;85(5):1117–31.

96. van Hameren G, Muradov J, Minarik A, Aboghazleh R, Orr S, Cort S, et al. Mitochondrial dysfunction underlies impaired neurovascular coupling following traumatic brain injury. *Neurobiology of Disease*. 2023;186:106269.

97. Strong AJ, Anderson PJ, Watts HR, Virley DJ, Lloyd A, Irving EA, et al. Peri-infarct depolarizations lead to loss of perfusion in ischaemic gyrencephalic cerebral cortex. *Brain*. 2007;130(4):995–1008.

98. Horiguchi T, Snipes JA, Kis B, Shimizu K, Busija DW. Cyclooxygenase-2 mediates the development of cortical spreading depression-induced tolerance to transient focal cerebral ischemia in rats. *Neuroscience*. 2006;140(2):723–30.

99. Shuttleworth CW, Andrew RD, Akbari Y, Ayata C, Balu R, Brennan KC, et al. Which Spreading Depolarizations Are Deleterious To Brain Tissue? *Neurocritical Care*. 2020;32(1):317–22.

100. Tamim I, Chung DY, de Moraes AL, Loonen ICM, Qin T, Misra A, et al. Spreading depression as an innate antiseizure mechanism. *Nature Communications*. 2021;12(1):2206.

101. Sugimoto K, Yang J, Fischer P, Takizawa T, Mulder IA, Qin T, et al. Optogenetic Spreading Depolarizations Do Not Worsen Acute Ischemic Stroke Outcome. *Stroke*. 2023;54(4):1110–9.

102. Nosedá R, Burstein R. Migraine pathophysiology: anatomy of the trigeminovascular pathway and associated neurological symptoms, CSD, sensitization and modulation of pain. *Pain*. 2013;154 Suppl 1.

103. Ashina M, Hansen JM, Do TP, Melo-Carrillo A, Burstein R, Moskowitz MA. Migraine and the trigeminovascular system-40 years and counting. *Lancet Neurol*. 2019;18(8):795–804.

104. Burstein R, Jakubowski M, Levy D. Anti-migraine action of triptans is preceded by transient aggravation of headache caused by activation of meningeal nociceptors. *Pain*. 2005;115(1-2):21–8.
105. Nosedá R, Jakubowski M, Kainz V, Borsook D, Burstein R. Cortical projections of functionally identified thalamic trigeminovascular neurons: implications for migraine headache and its associated symptoms. *J Neurosci*. 2011;31(40):14204–17.
106. Levy D, Labastida-Ramirez A, MaassenVanDenBrink A. Current understanding of meningeal and cerebral vascular function underlying migraine headache. *Cephalalgia*. 2019;39(13):1606–22.
107. Edvinsson L, Haanes KA, Warfvinge K, Krause DN. CGRP as the target of new migraine therapies - successful translation from bench to clinic. *Nat Rev Neurol*. 2018;14(6):338–50.
108. Goadsby PJ, Edvinsson L, Ekman R. Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache. *Annals of Neurology*. 1990;28(2):183–7.
109. Olesen J, Diener HC, Husstedt IW, Goadsby PJ, Hall D, Meier U, et al. Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist BIBN 4096 BS for the acute treatment of migraine. *N Engl J Med*. 2004;350(11):1104–10.
110. Ashina M. Migraine. *New England Journal of Medicine*. 2020;383(19):1866–76.
111. Schytz HW, Birk S, Wienecke T, Kruuse C, Olesen J, Ashina M. PACAP38 induces migraine-like attacks in patients with migraine without aura. *Brain*. 2009;132(Pt 1):16–25.
112. Guo S, Vollesen AL, Hansen RD, Esserlind AL, Amin FM, Christensen AF, et al. Part I: Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-38 induced migraine-like attacks in patients with and without familial aggregation of migraine. *Cephalalgia*. 2017;37(2):125–35.
113. Wienholtz NKF, Christensen CE, Zhang DG, Coskun H, Ghanizada H, Al-Karagholi MA, et al. Early treatment with sumatriptan prevents PACAP38-induced migraine: A randomised clinical trial. *Cephalalgia*. 2021;41(6):731–48.
114. Strassman AM, Raymond SA, Burstein R. Sensitization of meningeal sensory neurons and the origin of headaches. *Nature*. 1996;384(6609):560–4.
115. Burstein R, Cutrer MF, Yarnitsky D. The development of cutaneous allodynia during a migraine attack clinical evidence for the sequential recruitment of spinal and supraspinal nociceptive neurons in migraine. *Brain*. 2000;123 (Pt 8):1703–9.
116. Zhang X, Levy D, Nosedá R, Kainz V, Jakubowski M, Burstein R. Activation of meningeal nociceptors by cortical spreading depression: implications for migraine with aura. *J Neurosci*. 2010;30(26):8807–14.
117. Ayata C, Jin H, Kudo C, Dalkara T, Moskowitz MA. Suppression of cortical spreading depression in migraine prophylaxis. *Ann Neurol*. 2006;59(4):652–61.

118. Alstadhaug KB, Bekkelund S, Salvesen R. Circannual periodicity of migraine? *Eur J Neurol*. 2007;14(9):983–8.
119. Holland PR, Barloese M, Fahrenkrug J. PACAP in hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythm: importance for headache. *The Journal of Headache and Pain*. 2018;19(1):20.
120. Denuelle M, Fabre N, Payoux P, Chollet F, Geraud G. Hypothalamic activation in spontaneous migraine attacks. *Headache*. 2007;47(10):1418–26.
121. Schulte LH, May A. The migraine generator revisited: continuous scanning of the migraine cycle over 30 days and three spontaneous attacks. *Brain*. 2016;139(Pt 7):1987–93.
122. May A. Understanding migraine as a cycling brain syndrome: reviewing the evidence from functional imaging. *Neurol Sci*. 2017;38(Suppl 1):125–30.
123. The International Classification of Headache Disorders: 2nd edition. *Cephalalgia*. 2004;24 Suppl 1:9–160.
124. Bigal ME, Lipton RB. The epidemiology, burden, and comorbidities of migraine. *Neurol Clin*. 2009;27(2):321–34.
125. Rasmussen BK, Olesen J. Migraine with aura and migraine without aura: an epidemiological study. *Cephalalgia*. 1992;12(4):221–8; discussion 186.
126. Russell M, Olesen J. A nosographic analysis of the migraine aura in a general population. *Brain : a journal of neurology*. 1996;119 (Pt 2):355–61.
127. Viana M, Sances G, Linde M, Ghiotto N, Guaschino E, Allena M, et al. Clinical features of migraine aura: Results from a prospective diary-aided study. *Cephalalgia*. 2017;37(10):979–89.
128. Petrusic I, Pavlovski V, Vucinic D, Jancic J. Features of migraine aura in teenagers. *J Headache Pain*. 2014;15(1):87.
129. Eriksen MK, Thomsen LL, Olesen J. Sensitivity and specificity of the new international diagnostic criteria for migraine with aura. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2005;76(2):212.
130. Lipton RB, Fanning KM, Buse DC, Martin VT, Reed ML, Manack Adams A, et al. Identifying Natural Subgroups of Migraine Based on Comorbidity and Concomitant Condition Profiles: Results of the Chronic Migraine Epidemiology and Outcomes (CaMEO) Study. *Headache*. 2018;58(7):933–47.
131. Oedegaard KJ, Neckelmann D, Mykletun A, Dahl AA, Zwart JA, Hagen K, et al. Migraine with and without aura: association with depression and anxiety disorder in a population-based study. The HUNT Study. *Cephalalgia*. 2006;26(1):1–6.
132. Spector JT, Kahn SR, Jones MR, Jayakumar M, Dalal D, Nazarian S. Migraine headache and ischemic stroke risk: an updated meta-analysis. *Am J Med*. 2010;123(7):612–24.
133. Giffin NJ, Ruggiero L, Lipton RB, Silberstein SD, Tvedskov JF, Olesen J, et al. Premonitory symptoms in migraine: an electronic diary study. *Neurology*. 2003;60(6):935–40.

134. Karsan N, Goadsby PJ. Biological insights from the premonitory symptoms of migraine. *Nat Rev Neurol*. 2018;14(12):699–710.
135. Giffin NJ, Lipton RB, Silberstein SD, Olesen J, Goadsby PJ. The migraine postdrome: An electronic diary study. *Neurology*. 2016;87(3):309–13.
136. Diener HC, Dodick DW, Goadsby PJ, Lipton RB, Olesen J, Silberstein SD. Chronic migraine--classification, characteristics and treatment. *Nat Rev Neurol*. 2012;8(3):162–71.
137. Goadsby PJ, Lipton RB, Ferrari MD. Migraine--current understanding and treatment. *N Engl J Med*. 2002;346(4):257–70.
138. Worthington I, Pringsheim T, Gawel MJ, Gladstone J, Cooper P, Dilli E, et al. Canadian Headache Society Guideline: acute drug therapy for migraine headache. *Can J Neurol Sci*. 2013;40(5 Suppl 3):S1–s80.
139. Evers S, Afra J, Frese A, Goadsby PJ, Linde M, May A, et al. EFNS guideline on the drug treatment of migraine--revised report of an EFNS task force. *Eur J Neurol*. 2009;16(9):968–81.
140. Silberstein SD, Holland S, Freitag F, Dodick DW, Argoff C, Ashman E. Evidence-based guideline update: pharmacologic treatment for episodic migraine prevention in adults: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the American Headache Society. *Neurology*. 2012;78(17):1337–45.
141. Lipton RB, Croop R, Stock EG, Stock DA, Morris BA, Frost M, et al. Rimegepant, an Oral Calcitonin Gene-Related Peptide Receptor Antagonist, for Migraine. *New England Journal of Medicine*. 2019;381(2):142–9.
142. Forbes RB, McCarron M, Cardwell CR. Efficacy and Contextual (Placebo) Effects of CGRP Antibodies for Migraine: Systematic Review and Meta-analysis. *Headache*. 2020;60(8):1542–57.
143. Bergerot A, Holland PR, Akerman S, Bartsch T, Ahn AH, MaassenVanDenBrink A, et al. Animal models of migraine: looking at the component parts of a complex disorder. *Eur J Neurosci*. 2006;24(6):1517–34.
144. Spekker E, Fejes-Szabó A, Nagy-Grócz G. Models of Trigeminal Activation: Is There an Animal Model of Migraine? *Brain Sciences* [Internet]. 2024; 14(4):[317 p.].
145. Akerman S, Holland PR, Hoffmann J. Pearls and pitfalls in experimental in vivo models of migraine: Dural trigeminovascular nociception. *Cephalalgia*. 2013;33(8):577–92.
146. Harriott AM, Strother LC, Vila-Pueyo M, Holland PR. Animal models of migraine and experimental techniques used to examine trigeminal sensory processing. *The Journal of Headache and Pain*. 2019;20(1):91.
147. Hoskin KL, Bulmer DC, Lasalandra M, Jonkman A, Goadsby PJ. Fos expression in the midbrain periaqueductal grey after trigeminovascular stimulation. *J Anat*. 2001;198(Pt 1):29–35.

148. Benjamin L, Levy MJ, Lasalandra MP, Knight YE, Akerman S, Classey JD, et al. Hypothalamic activation after stimulation of the superior sagittal sinus in the cat: a Fos study. *Neurobiol Dis.* 2004;16(3):500–5.
149. Sixt ML, Messlinger K, Fischer MJ. Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist olcegepant acts in the spinal trigeminal nucleus. *Brain.* 2009;132(Pt 11):3134–41.
150. Hoskin KL, Kaube H, Goadsby PJ. Central activation of the trigeminovascular pathway in the cat is inhibited by dihydroergotamine. A c-Fos and electrophysiological study. *Brain.* 1996;119 (Pt 1):249–56.
151. Storer RJ, Goadsby PJ. Topiramate inhibits trigeminovascular neurons in the cat. *Cephalalgia.* 2004;24(12):1049–56.
152. Petersen KA, Birk S, Doods H, Edvinsson L, Olesen J. Inhibitory effect of BIBN4096BS on cephalic vasodilatation induced by CGRP or transcranial electrical stimulation in the rat. *Br J Pharmacol.* 2004;143(6):697–704.
153. Ashina M, Hansen JM, BO ÁD, Olesen J. Human models of migraine - short-term pain for long-term gain. *Nat Rev Neurol.* 2017;13(12):713–24.
154. Thomsen LL, Iversen HK, Lassen LH, Olesen J. The Role of Nitric Oxide in Migraine Pain. *CNS Drugs.* 1994a;2(6):417–22.
155. Marsh N, Marsh A. A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* 2000;27(4):313–9.
156. Dieterle A, Fischer MJ, Link AS, Neuhuber WL, Messlinger K. Increase in CGRP- and nNOS-immunoreactive neurons in the rat trigeminal ganglion after infusion of an NO donor. *Cephalalgia.* 2011;31(1):31–42.
157. Maniyar FH, Sprenger T, Monteith T, Schankin C, Goadsby PJ. Brain activations in the premonitory phase of nitroglycerin-triggered migraine attacks. *Brain.* 2013;137(1):232–41.
158. Sureda-Gibert P, Romero-Reyes M, Akerman S. Nitroglycerin as a model of migraine: Clinical and preclinical review. *Neurobiology of Pain.* 2022;12:100105.
159. Afridi SK, Matharu MS, Lee L, Kaube H, Friston KJ, Frackowiak RSJ, et al. A PET study exploring the laterality of brainstem activation in migraine using glyceryl trinitrate. *Brain.* 2005;128(4):932–9.
160. Zhang X, Kainz V, Zhao J, Strassman AM, Levy D. Vascular extracellular signal-regulated kinase mediates migraine-related sensitization of meningeal nociceptors. *Annals of Neurology.* 2013;73(6):741–50.
161. Akerman S, Karsan N, Bose P, Hoffmann JR, Holland PR, Romero-Reyes M, et al. Nitroglycerine triggers triptan-responsive cranial allodynia and trigeminal neuronal hypersensitivity. *Brain.* 2018;142(1):103–19.
162. Vuralli D, Wattiez A-S, Russo AF, Bolay H. Behavioral and cognitive animal models in headache research. *The Journal of Headache and Pain.* 2019;20(1):11.
163. Pradhan AA, Smith ML, McGuire B, Tarash I, Evans CJ, Charles A. Characterization of a novel model of chronic migraine. *PAIN®.* 2014;155(2):269–74.

164. Torres-Ferrús M, Ursitti F, Alpuente-Ruiz A, Brunello F, Chiappino D, De Vries T, et al. From transformation to chronification of migraine: Pathophysiological and clinical aspects. *Journal of Headache and Pain*. 2020;21(1).
165. Guo Z, Czerpaniak K, Zhang J, Cao Y-Q. Increase in trigeminal ganglion neurons that respond to both calcitonin gene-related peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in mouse models of chronic migraine and posttraumatic headache. *PAIN*. 2021;162(5):1483–99.
166. Thomsen LL, Kruuse C, Iversen HK, Olesen J. A nitric oxide donor (nitroglycerin) triggers genuine migraine attacks. *European Journal of Neurology*. 1994b;1(1):73–80.
167. Hansen JM, Hauge AW, Olesen J, Ashina M. Calcitonin gene-related peptide triggers migraine-like attacks in patients with migraine with aura. *Cephalalgia*. 2010;30(10):1179–86.
168. De Logu F, Landini L, Janal MN, Li Puma S, De Cesaris F, Geppetti P, et al. Migraine-provoking substances evoke periorbital allodynia in mice. *The Journal of Headache and Pain*. 2019;20(1):18.
169. Oshinsky ML, Gommonchareonsiri S. Episodic dural stimulation in awake rats: a model for recurrent headache. *Headache*. 2007;47(7):1026–36.
170. Burgos-Vega CC, Quigley LD, Trevisan Dos Santos G, Yan F, Asiedu M, Jacobs B, et al. Non-invasive dural stimulation in mice: A novel preclinical model of migraine. *Cephalalgia*. 2019;39(1):123–34.
171. Boyer N, Signoret-Genest J, Artola A, Dallel R, Monconduit L. Propranolol treatment prevents chronic central sensitization induced by repeated dural stimulation. *PAIN*. 2017;158(10).
172. Han X, Ran Y, Su M, Liu Y, Tang W, Dong Z, et al. Chronic changes in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and related receptors in response to repeated chemical dural stimulation in rats. *Mol Pain*. 2017;13:1744806917720361.
173. Reducha PV, Edvinsson L, Haanes KA. Could Experimental Inflammation Provide Better Understanding of Migraines? *Cells*. 2022;11(15):2444.
174. Dehghani A, Karatas H. Mouse Models of Familial Hemiplegic Migraine for Studying Migraine Pathophysiology. *Curr Neuropharmacol*. 2019;17(10):961–73.
175. Ferrari MD, Klever RR, Terwindt GM, Ayata C, van den Maagdenberg AM. Migraine pathophysiology: lessons from mouse models and human genetics. *Lancet Neurol*. 2015;14(1):65–80.
176. Pietrobon D, Brennan KC. Genetic mouse models of migraine. *The Journal of Headache and Pain*. 2019;20(1):79.
177. Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, van Eijk R, Oefner PJ, Hoffman SM, et al. Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca²⁺ channel gene CACNL1A4. *Cell*. 1996;87(3):543–52.
178. Dichgans M, Freilinger T, Eckstein G, Babini E, Lorenz-Depiereux B, Biskup S, et al. Mutation in the neuronal voltage-gated sodium channel SCN1A in familial hemiplegic migraine. *Lancet*. 2005;366(9483):371–7.

179. Eising E, de Vries B, Ferrari MD, Terwindt GM, van den Maagdenberg AM. Pearls and pitfalls in genetic studies of migraine. *Cephalalgia*. 2013;33(8):614–25.
180. van den Maagdenberg AM, Pietrobon D, Pizzorusso T, Kaja S, Broos LA, Cesetti T, et al. A *Cacnala* knockin migraine mouse model with increased susceptibility to cortical spreading depression. *Neuron*. 2004;41(5):701–10.
181. van den Maagdenberg AM, Pizzorusso T, Kaja S, Terpolilli N, Shapovalova M, Hoebeek FE, et al. High cortical spreading depression susceptibility and migraine-associated symptoms in *Ca(v)2.1 S218L* mice. *Ann Neurol*. 2010;67(1):85–98.
182. Eikermann-Haerter K, Dileköz E, Kudo C, Savitz SI, Waeber C, Baum MJ, et al. Genetic and hormonal factors modulate spreading depression and transient hemiparesis in mouse models of familial hemiplegic migraine type 1. *J Clin Invest*. 2009;119(1):99–109.
183. Chanda ML, Tuttle AH, Baran I, Atlin C, Guindi D, Hathaway G, et al. Behavioral evidence for photophobia and stress-related ipsilateral head pain in transgenic *Cacnala* mutant mice. *Pain*. 2013;154(8):1254–62.
184. Jansen NA, Dehghani A, Linssen MML, Breukel C, Tolner EA, van den Maagdenberg AMJM. First FHM3 mouse model shows spontaneous cortical spreading depolarizations. *Annals of Clinical and Translational Neurology*. 2020;7(1):132–8.
185. Jansen NA, Linnenbank C, Schenke M, Voskuyl RA, Jorge MS, Krivoshein G, et al. Spontaneous spreading depolarizations originate subcortically in a novel mouse model of familial hemiplegic migraine type 2. *Neurobiology of Disease*. 2024;202:106714.
186. Van Harreveld A, Stamm JS, Christensen E. Spreading depression in rabbit, cat and monkey. *Am J Physiol*. 1956;184(2):312–20.
187. Obrenovitch TP, Urenjak J, Zilkha E. Intracerebral microdialysis combined with recording of extracellular field potential: a novel method for investigation of depolarizing drugs in vivo. *Br J Pharmacol*. 1994;113(4):1295–302.
188. Wang M, Obrenovitch TP, Urenjak J. Effects of the nitric oxide donor, DEA/NO on cortical spreading depression. *Neuropharmacology*. 2003;44(7):949–57.
189. Reid KH, Marrannes R, De Prins E, Wauquier A. Strength-duration properties of cathodal pulses eliciting spreading depression in rat cerebral cortex. *Brain Res*. 1987;404(1-2):361–4.
190. Tan P, He L, Huang Y, Zhou Y. Optophysiology: Illuminating cell physiology with optogenetics. *Physiological Reviews*. 2022;102(3):1263–325.
191. Uzay B, Donmez-Demir B, Ozcan SY, Kocak EE, Yemisci M, Ozdemir YG, et al. The effect of P2X7 antagonism on subcortical spread of optogenetically-triggered cortical spreading depression and neuroinflammation. *The Journal of Headache and Pain*. 2024;25(1):120.
192. Holland PR, Akerman S, Goadsby PJ. Cortical spreading depression-associated cerebral blood flow changes induced by mechanical stimulation are modulated by AMPA and GABA receptors. *Cephalalgia*. 2010;30(5):519–27.

193. Hanalioglu S, Hidayatov T, Isikay I, Aktas CC, Yemisci M, Mut M. Early Cerebral Blood Flow Changes, Cerebrovascular Reactivity and Cortical Spreading Depolarizations in Experimental Mild Traumatic Brain Injury Model. *Turk Neurosurg.* 2022;32(3):488–99.
194. Chung DY, Sugimoto K, Fischer P, Böhm M, Takizawa T, Sadeghian H, et al. Real-time non-invasive in vivo visible light detection of cortical spreading depolarizations in mice. *J Neurosci Methods.* 2018;309:143–6.
195. Kursun O, Yemisci M, van den Maagdenberg AMJM, Karatas H. Migraine and neuroinflammation: the inflammasome perspective. *The Journal of Headache and Pain.* 2021;22(1):55.
196. Jander S, Schroeter M, Peters O, Witte OW, Stoll G. Cortical Spreading Depression Induces Proinflammatory Cytokine Gene Expression in the Rat Brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.* 2001;21(3):218–25.
197. Kunkler PE, Hulse RE, Kraig RP. Multiplexed Cytokine Protein Expression Profiles from Spreading Depression in Hippocampal Organotypic Cultures. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.* 2004;24(8):829–39.
198. Urbach A, Bruehl C, Witte OW. Microarray-based long-term detection of genes differentially expressed after cortical spreading depression. *European Journal of Neuroscience.* 2006;24(3):841–56.
199. Thompson CS, Hakim AM. Cortical spreading depression modifies components of the inflammatory cascade. *Molecular Neurobiology.* 2005;32(1):51–7.
200. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol.* 2007;81(1):1–5.
201. Chen SP, Qin T, Seidel JL, Zheng Y, Eikermann M, Ferrari MD, et al. Inhibition of the P2X7-PANX1 complex suppresses spreading depolarization and neuroinflammation. *Brain.* 2017;140(6):1643–56.
202. Takizawa T, Qin T, Lopes de Moraes A, Sugimoto K, Chung JY, Morsett L, et al. Non-invasively triggered spreading depolarizations induce a rapid pro-inflammatory response in cerebral cortex. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.* 2020;40(5):1117–31.
203. Levy D. Endogenous Mechanisms Underlying the Activation and Sensitization of Meningeal Nociceptors: The Role of Immuno-Vascular Interactions and Cortical Spreading Depression. *Current Pain and Headache Reports.* 2012;16(3):270–7.
204. Carneiro-Nascimento S, Levy D. Cortical spreading depression and meningeal nociception. *Neurobiol Pain.* 2022;11:100091.
205. Takizawa T, Shibata M, Kayama Y, Toriumi H, Ebine T, Koh A, et al. Temporal profiles of high-mobility group box 1 expression levels after cortical spreading depression in mice. *Cephalalgia.* 2016;36(1):44–52.
206. Ablasser A, Hur S. Regulation of cGAS- and RLR-mediated immunity to nucleic acids. *Nat Immunol.* 2020;21(1):17–29.

207. Diner EJ, Burdette DL, Wilson SC, Monroe KM, Kellenberger CA, Hyodo M, et al. The innate immune DNA sensor cGAS produces a noncanonical cyclic dinucleotide that activates human STING. *Cell Rep.* 2013;3(5):1355–61.
208. Andreeva L, Hiller B, Kostrewa D, Lässig C, de Oliveira Mann CC, Jan Drexler D, et al. cGAS senses long and HMGB/TFAM-bound U-turn DNA by forming protein-DNA ladders. *Nature.* 2017;549(7672):394–8.
209. Burdette DL, Monroe KM, Sotelo-Troha K, Iwig JS, Eckert B, Hyodo M, et al. STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature.* 2011;478(7370):515–8.
210. Abe T, Harashima A, Xia T, Konno H, Konno K, Morales A, et al. STING recognition of cytoplasmic DNA instigates cellular defense. *Mol Cell.* 2013;50(1):5–15.
211. de Oliveira Mann CC, Orzalli MH, King DS, Kagan JC, Lee ASY, Kranzusch PJ. Modular Architecture of the STING C-Terminal Tail Allows Interferon and NF- κ B Signaling Adaptation. *Cell Rep.* 2019;27(4):1165–75.e5.
212. Li N, Zhou H, Wu H, Wu Q, Duan M, Deng W, et al. STING-IRF3 contributes to lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction, inflammation, apoptosis and pyroptosis by activating NLRP3. *Redox Biology.* 2019;24:101215.
213. Motwani M, Pesiridis S, Fitzgerald KA. DNA sensing by the cGAS-STING pathway in health and disease. *Nat Rev Genet.* 2019;20(11):657–74.
214. Zhang C, Shang G, Gui X, Zhang X, Bai XC, Chen ZJ. Structural basis of STING binding with and phosphorylation by TBK1. *Nature.* 2019;567(7748):394–8.
215. Gonugunta VK, Sakai T, Pokatayev V, Yang K, Wu J, Dobbs N, et al. Trafficking-Mediated STING Degradation Requires Sorting to Acidified Endolysosomes and Can Be Targeted to Enhance Anti-tumor Response. *Cell Rep.* 2017;21(11):3234–42.
216. Mukai K, Ogawa E, Uematsu R, Kuchitsu Y, Kiku F, Uemura T, et al. Homeostatic regulation of STING by retrograde membrane traffic to the ER. *Nat Commun.* 2021;12(1):61.
217. Platanias LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature Reviews Immunology.* 2005;5(5):375–86.
218. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:513–45.
219. Gaidt MM, Ebert TS, Chauhan D, Ramshorn K, Pinci F, Zuber S, et al. The DNA Inflammasome in Human Myeloid Cells Is Initiated by a STING-Cell Death Program Upstream of NLRP3. *Cell.* 2017;171(5):1110–24.e18.
220. Swanson KV, Junkins RD, Kurkjian CJ, Holley-Guthrie E, Pendse AA, El Morabiti R, et al. A noncanonical function of cGAMP in inflammasome priming and activation. *Journal of Experimental Medicine.* 2017;214(12):3611–26.
221. Wang Y, Ning X, Gao P, Wu S, Sha M, Lv M, et al. Inflammasome Activation Triggers Caspase-1-Mediated Cleavage of cGAS to Regulate Responses to DNA Virus Infection. *Immunity.* 2017;46(3):393–404.

222. Zhang L-M, Xin Y, Wu Z-Y, Song R-X, Miao H-T, Zheng W-C, et al. STING mediates neuroinflammatory response by activating NLRP3-related pyroptosis in severe traumatic brain injury. *Journal of Neurochemistry*. 2022;162(5):444–62.
223. Ablasser A, Goldeck M, Cavlar T, Deimling T, Witte G, Röhl I, et al. cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. *Nature*. 2013;498(7454):380–4.
224. Ahn J, Xia T, Rabasa Capote A, Betancourt D, Barber GN. Extrinsic Phagocyte-Dependent STING Signaling Dictates the Immunogenicity of Dying Cells. *Cancer Cell*. 2018;33(5):862–73.e5.
225. Luteijn RD, Zaver SA, Gowen BG, Wyman SK, Garelis NE, Onia L, et al. SLC19A1 transports immunoreactive cyclic dinucleotides. *Nature*. 2019;573(7774):434–8.
226. Lahey LJ, Mardjuki RE, Wen X, Hess GT, Ritchie C, Carozza JA, et al. LRRC8A:C/E Heteromeric Channels Are Ubiquitous Transporters of cGAMP. *Molecular Cell*. 2020;80(4):578–91.e5.
227. Zhou C, Chen X, Planells-Cases R, Chu J, Wang L, Cao L, et al. Transfer of cGAMP into Bystander Cells via LRRC8 Volume-Regulated Anion Channels Augments STING-Mediated Interferon Responses and Anti-viral Immunity. *Immunity*. 2020;52(5):767–81.e6.
228. Li L, Yin Q, Kuss P, Maliga Z, Millán JL, Wu H, et al. Hydrolysis of 2'3'-cGAMP by ENPP1 and design of nonhydrolyzable analogs. *Nat Chem Biol*. 2014;10(12):1043–8.
229. Kato Y, Park J, Takamatsu H, Konaka H, Aoki W, Aburaya S, et al. Apoptosis-derived membrane vesicles drive the cGAS-STING pathway and enhance type I IFN production in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2018;77(10):1507–15.
230. Ahn J, Xia T, Konno H, Konno K, Ruiz P, Barber GN. Inflammation-driven carcinogenesis is mediated through STING. *Nature Communications*. 2014;5(1):5166.
231. Li Q, Song Q, Ma L, Kang K, Zhu X, Li Y, et al. The cGAS-STING pathway in cancer: friend or foe. *Cell Death & Disease*. 2026;17(1):374.
232. Hou Y, Liang H, Rao E, Zheng W, Huang X, Deng L, et al. Non-canonical NF- κ B Antagonizes STING Sensor-Mediated DNA Sensing in Radiotherapy. *Immunity*. 2018;49(3):490–503.e4.
233. Gulen MF, Koch U, Haag SM, Schuler F, Apetoh L, Villunger A, et al. Signalling strength determines proapoptotic functions of STING. *Nature Communications*. 2017;8(1):427.
234. Bakhoun SF, Ngo B, Laughney AM, Cavallo JA, Murphy CJ, Ly P, et al. Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response. *Nature*. 2018;553(7689):467–72.
235. Yang H, Lee WS, Kong SJ, Kim CG, Kim JH, Chang SK, et al. STING activation reprograms tumor vasculatures and synergizes with VEGFR2 blockade. *J Clin Invest*. 2019;129(10):4350–64.

236. Saitoh T, Fujita N, Hayashi T, Takahara K, Satoh T, Lee H, et al. Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(49):20842–6.
237. Gui X, Yang H, Li T, Tan X, Shi P, Li M, et al. Autophagy induction via STING trafficking is a primordial function of the cGAS pathway. *Nature*. 2019;567(7747):262–6.
238. Liu D, Wu H, Wang C, Li Y, Tian H, Siraj S, et al. STING directly activates autophagy to tune the innate immune response. *Cell Death Differ*. 2019;26(9):1735–49.
239. Konno H, Konno K, Barber GN. Cyclic dinucleotides trigger ULK1 (ATG1) phosphorylation of STING to prevent sustained innate immune signaling. *Cell*. 2013;155(3):688–98.
240. Prabakaran T, Bodda C, Krapp C, Zhang BC, Christensen MH, Sun C, et al. Attenuation of cGAS-STING signaling is mediated by a p62/SQSTM1-dependent autophagy pathway activated by TBK1. *Embo j*. 2018;37(8).
241. Glück S, Guey B, Gulen MF, Wolter K, Kang TW, Schmacke NA, et al. Innate immune sensing of cytosolic chromatin fragments through cGAS promotes senescence. *Nat Cell Biol*. 2017;19(9):1061–70.
242. Zierhut C, Yamaguchi N, Paredes M, Luo JD, Carroll T, Funabiki H. The Cytoplasmic DNA Sensor cGAS Promotes Mitotic Cell Death. *Cell*. 2019;178(2):302–15.e23.
243. Reinert LS, Lopusná K, Winther H, Sun C, Thomsen MK, Nandakumar R, et al. Sensing of HSV-1 by the cGAS–STING pathway in microglia orchestrates antiviral defence in the CNS. *Nature Communications*. 2016;7(1):13348.
244. Crow YJ, Manel N. Aicardi-Goutières syndrome and the type I interferonopathies. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(7):429–40.
245. Gao D, Li T, Li XD, Chen X, Li QZ, Wight-Carter M, et al. Activation of cyclic GMP-AMP synthase by self-DNA causes autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(42):E5699–705.
246. Elmazny A, Hamdy SM, Abdel-Naseer M, Shalaby NM, Shehata HS, Kishk NA, et al. Interferon-Beta-Induced Headache in Patients with Multiple Sclerosis: Frequency and Characterization. *J Pain Res*. 2020;13:537–45.
247. Lemos H, Huang L, Chandler PR, Mohamed E, Souza GR, Li L, et al. Activation of the STING adaptor attenuates experimental autoimmune encephalitis. *J Immunol*. 2014;192(12):5571–8.
248. Kong L, Li W, Chang E, Wang W, Shen N, Xu X, et al. mtDNA-STING Axis Mediates Microglial Polarization via IRF3/NF- κ B Signaling After Ischemic Stroke. *Frontiers in Immunology*. 2022;Volume 13 - 2022.
249. Li Q, Cao Y, Dang C, Han B, Han R, Ma H, et al. Inhibition of double-strand DNA-sensing cGAS ameliorates brain injury after ischemic stroke. *EMBO Molecular Medicine*. 2020;12(4):e11002.

250. Sliter DA, Martinez J, Hao L, Chen X, Sun N, Fischer TD, et al. Parkin and PINK1 mitigate STING-induced inflammation. *Nature*. 2018;561(7722):258–62.
251. McCauley ME, O'Rourke JG, Yáñez A, Markman JL, Ho R, Wang X, et al. C9orf72 in myeloid cells suppresses STING-induced inflammation. *Nature*. 2020;585(7823):96–101.
252. Hou Y, Wei Y, Lautrup S, Yang B, Wang Y, Cordonnier S, et al. NAD⁺ supplementation reduces neuroinflammation and cell senescence in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease via cGAS–STING. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2021;118(37):e2011226118.
253. Tan PH, Ji J, Yeh CC, Ji RR. Interferons in Pain and Infections: Emerging Roles in Neuro-Immune and Neuro-Glial Interactions. *Front Immunol*. 2021;12:783725.
254. Wang YY, Shen D, Zhao LJ, Zeng N, Hu TH. Sting is a critical regulator of spinal cord injury by regulating microglial inflammation via interacting with TBK1 in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019;517(4):741–8.
255. Zhang X, Li X, Wang W, Zhang Y, Gong Z, Peng Y, et al. STING Contributes to Cancer-Induced Bone Pain by Promoting M1 Polarization of Microglia in the Medial Prefrontal Cortex. *Cancers*. 2022;14(21):5188.
256. Haag SM, Gulen MF, Reymond L, Gibelin A, Abrami L, Decout A, et al. Targeting STING with covalent small-molecule inhibitors. *Nature*. 2018;559(7713):269–73.
257. Fujita H, Tanaka J, Toku K, Tateishi N, Suzuki Y, Matsuda S, et al. Effects of GM-CSF and ordinary supplements on the ramification of microglia in culture: A morphometrical study. *Glia*. 1996;18(4):269–81.
258. Heindl S, Gesierich B, Benakis C, Llovera G, Duering M, Liesz A. Automated Morphological Analysis of Microglia After Stroke. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2018;Volume 12 - 2018.
259. Reddaway J, Richardson PE, Bevan RJ, Stoneman J, Palombo M. Microglial morphometric analysis: so many options, so little consistency. *Front Neuroinform*. 2023;17:1211188.
260. Chen K, Qi X, Zhu L-l, Li M-l, Cong B, Li Y-m. Quantitative analysis of microglia morphological changes in the hypothalamus of chronically stressed rats. *Brain Research Bulletin*. 2024;206:110861.
261. Romero-Reyes M, Ye Y. Pearls and pitfalls in experimental in vivo models of headache: Conscious behavioral research. *Cephalalgia*. 2013;33(8):566–76.
262. Harriott AM, Waruinge A, Appiah-Danquah V, Berhanu L, Morais A, Ayata C. The effect of sex and estrus cycle stage on optogenetic spreading depression induced migraine-like pain phenotypes. *The Journal of Headache and Pain*. 2023;24(1):85.
263. Guo Y, Gu R, Gan D, Hu F, Li G, Xu G. Mitochondrial DNA drives noncanonical inflammation activation via cGAS–STING signaling pathway in retinal microvascular endothelial cells. *Cell Communication and Signaling*. 2020;18(1):172.

264. Liu S, Cai X, Wu J, Cong Q, Chen X, Li T, et al. Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation. *Science*. 2015;347(6227):aaa2630.
265. Aydemir S, Yildirim Z, Bara B, Dogan E, Bozok V. Differential regulation of STING expression and cisplatin sensitivity by autophagy in non-small cell lung cancer cells. *Medical Oncology*. 2025;42(7):227.
266. Ding R, Li H, Liu Y, Ou W, Zhang X, Chai H, et al. Activating cGAS–STING axis contributes to neuroinflammation in CVST mouse model and induces inflammasome activation and microglia pyroptosis. *Journal of Neuroinflammation*. 2022;19(1):137.
267. Kaya Z, Belder N, Sever-Bahcekapili M, Donmez-Demir B, Erdener ŞE, Bozbeyoglu N, et al. Vesicular HMGB1 release from neurons stressed with spreading depolarization enables confined inflammatory signaling to astrocytes. *Journal of Neuroinflammation*. 2023;20(1):295.
268. Kaya Z, Belder N, Sever-Bahcekapili M, Erdener ŞE, Dönmez-Demir B, Bağcı C, et al. Spreading depolarization triggers pro- and anti-inflammatory signalling: a potential link to headache. *Brain*. 2025;148(7):2522–36.
269. Jiang G-L, Yang X-L, Zhou H-J, Long J, Liu B, Zhang L-M, et al. cGAS knockdown promotes microglial M2 polarization to alleviate neuroinflammation by inhibiting cGAS-STING signaling pathway in cerebral ischemic stroke. *Brain Research Bulletin*. 2021;171:183–95.
270. Gulen MF, Samson N, Keller A, Schwabenland M, Liu C, Glück S, et al. cGAS–STING drives ageing-related inflammation and neurodegeneration. *Nature*. 2023;620(7973):374–80.
271. Soylu KO, Donmez-Demir B, Kilic HB, Sever-Bahcekapili M, Cakir-Aktas C, Kocaefe YC, et al. Spreading depolarization activates the cGAS–STING pathway and drives cranial nociception: therapeutic potential of STING modulation. *The Journal of Headache and Pain*. 2026;27(1):24.
272. Ayata C. Spreading Depression: From Serendipity to Targeted Therapy in Migraine Prophylaxis. *Cephalalgia*. 2009;29(10):1095–114.
273. Nedergaard M, Hansen AJ. Characterization of cortical depolarizations evoked in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1993;13(4):568–74.
274. Ayata C, Hougaard A, Schiff SJ, Ferrari MD, Noebels JL, Diener HC, et al. Tsunamis hiding in plain sight: spreading depression in clinical neurology. *Nature Reviews Neurology*. 2026;22(4):251–66.
275. Zhou N, Gordon GRJ, Feighan D, MacVicar BA. Transient Swelling, Acidification, and Mitochondrial Depolarization Occurs in Neurons but not Astrocytes during Spreading Depression. *Cerebral Cortex*. 2010;20(11):2614–24.
276. Palzur E, Edelman D, Sakas R, Soustiel JF. Etifoxine Restores Mitochondrial Oxidative Phosphorylation and Improves Cognitive Recovery Following Traumatic Brain Injury. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(23):12881.
277. Bader V, Winklhofer KF. Mitochondria at the interface between neurodegeneration and neuroinflammation. *Semin Cell Dev Biol*. 2020;99:163–71.

278. Zhang Z, Zhang C. Regulation of cGAS–STING signalling and its diversity of cellular outcomes. *Nature Reviews Immunology*. 2025;25(6):425–44.
279. Megirian D. Unilateral cortical spreading depression and conditioned eye blink responses in rabbits. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 1973;33(4):699–710.
280. Verzosa AL, McGeever LA, Bhark S-J, Delgado T, Salazar N, Sanchez EL. Herpes Simplex Virus 1 Infection of Neuronal and Non-Neuronal Cells Elicits Specific Innate Immune Responses and Immune Evasion Mechanisms. *Frontiers in Immunology*. 2021;Volume 12 - 2021.
281. Chen Y, Hu Y, He X, Zang H, Sun R, Zhu C, et al. Activation of mitochondrial DNA-mediated cGAS-STING pathway contributes to chronic postsurgical pain by inducing type I interferons and A1 reactive astrocytes in the spinal cord. *International Immunopharmacology*. 2024;127:111348.
282. Liu J, Zhang X, Wang H. The cGAS-STING-mediated NLRP3 inflammasome is involved in the neurotoxicity induced by manganese exposure. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022;154:113680.
283. Jeffries AM, Marriott I. Human microglia and astrocytes express cGAS-STING viral sensing components. *Neurosci Lett*. 2017;658:53–6.
284. Kraig RP, Dong LM, Thisted R, Jaeger CB. Spreading depression increases immunohistochemical staining of glial fibrillary acidic protein. *J Neurosci*. 1991;11(7):2187–98.
285. Ghaemi A, Alizadeh L, Babaei S, Jafarian M, Khaleghi Ghadiri M, Meuth SG, et al. Astrocyte-mediated inflammation in cortical spreading depression. *Cephalalgia*. 2018;38(4):626–38.
286. Liu J, Zhou J, Luan Y, Li X, Meng X, Liao W, et al. cGAS-STING, inflammasomes and pyroptosis: an overview of crosstalk mechanism of activation and regulation. *Cell Communication and Signaling*. 2024;22(1):22.
287. Morrison HW, Filosa JA. A quantitative spatiotemporal analysis of microglia morphology during ischemic stroke and reperfusion. *Journal of Neuroinflammation*. 2013;10(1):782.
288. Ayata C, Shimizu-Sasamata M, Lo EH, Noebels JL, Moskowitz MA. Impaired neurotransmitter release and elevated threshold for cortical spreading depression in mice with mutations in the $\alpha 1A$ subunit of P/Q type calcium channels. *Neuroscience*. 2000;95(3):639–45.
289. Risher WC, Ard D, Yuan J, Kirov SA. Recurrent Spontaneous Spreading Depolarizations Facilitate Acute Dendritic Injury in the Ischemic Penumbra. *The Journal of Neuroscience*. 2010;30(29):9859.
290. Shibata M, Suzuki N. Exploring the role of microglia in cortical spreading depression in neurological disease. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2017;37(4):1182–91.
291. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):428–35.
292. Frank R, Szarvas PA, Pesti I, Zsigmond A, Berkecz R, Menyhárt Á, et al. Nimodipine inhibits spreading depolarization, ischemic injury, and neuroinflammation

in mouse live brain slice preparations. *European Journal of Pharmacology*. 2024;977:176718.

293. Santos E, Sánchez-Porras R, Sakowitz OW, Dreier JP, Dahlem MA. Heterogeneous propagation of spreading depolarizations in the lissencephalic and gyrencephalic brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2017;37(7):2639–43.

294. Bogdanov VB, Multon S, Chauvel V, Bogdanova OV, Prodanov D, Makarchuk MY, et al. Migraine preventive drugs differentially affect cortical spreading depression in rat. *Neurobiology of Disease*. 2011;41(2):430–5.

295. Vuralli D, Karatas H, Yemisci M, Bolay H. Updated review on the link between cortical spreading depression and headache disorders. *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2021;21(10):1069–84.

296. Mogil JS. The genetic mediation of individual differences in sensitivity to pain and its inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(14):7744–51.

297. Brennan KC, Romero Reyes M, López Valdés HE, Arnold AP, Charles AC. Reduced threshold for cortical spreading depression in female mice. *Ann Neurol*. 2007;61(6):603–6.

298. Chauvel V, Multon S, Schoenen J. Estrogen-dependent effects of 5-hydroxytryptophan on cortical spreading depression in rat: Modelling the serotonin-ovarian hormone interaction in migraine aura. *Cephalalgia*. 2018;38(3):427–36.

299. Kudo C, Harriott AM, Moskowitz MA, Waeber C, Ayata C. Estrogen modulation of cortical spreading depression. *The Journal of Headache and Pain*. 2023;24(1):62.

300. Boes T, Levy D. Influence of sex, estrous cycle, and estrogen on intracranial dural mast cells. *Cephalalgia*. 2012;32(12):924–31.

301. McIlvried LA, Cruz JA, Borghesi LA, Gold MS. Sex-, stress-, and sympathetic post-ganglionic-dependent changes in identity and proportions of immune cells in the dura. *Cephalalgia*. 2017;37(1):36–48.

302. Murtaj V, Belloli S, Di Grigoli G, Pannese M, Ballarini E, Rodriguez-Menendez V, et al. Age and Sex Influence the Neuro-inflammatory Response to a Peripheral Acute LPS Challenge. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2019;Volume 11 - 2019.

303. Han J, Fan Y, Zhou K, Blomgren K, Harris RA. Uncovering sex differences of rodent microglia. *Journal of Neuroinflammation*. 2021;18(1):74.

304. Pujantell M, Altfeld M. Consequences of sex differences in Type I IFN responses for the regulation of antiviral immunity. *Frontiers in Immunology*. 2022;Volume 13 - 2022.

8. EKLER

EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri

 T.C. HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu	
Sayı : 52338575 – 125	
HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL KARARI	
TOPLANTI TARİHİ	: 26.10.2021 (SALI)
TOPLANTI SAYISI	: 2021/08
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2021/67
KARAR NUMARASI	: 2021/08- 02
ONAY BİTİŞ TARİHİ	: 26.10.2026
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Prof. Dr. Müge Yemişçi ÖZKAN
HAYVAN DENEYLERİNDE	: Kadir Oğuzhan SOYLU, Prof. Dr. Müge Yemişçi
GÖREVLİ ARAŞTIRMACILAR	: ÖZKAN, Prof. Dr. Hülya Karataş KURŞUN, Öğr. Gör. Dr. Buket Nebiye DEMİR, Öğr. Gör. Dr. Canan Çakır AKTAŞ, Öğr. Gör. Dr. Melike Sever BAHÇEKAPILI
DİĞER YARDIMCI	:
ARAŞTIRMACILAR	: -
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve	: 132 Adet C57BL/6J- Thy1-COP4/Eyfp-C57BL/6J
SAYISI	: Yabanıl Tip Fare (8-12 Hafta)
Üniversitemiz Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Müge Yemişçi ÖZKAN'ın araştırma yürütücüsü olduğu 2021/67 kayıt numaralı "<i>Kortikal Yayılan Depolarizasyonun cGAS-STING Yoluyla Üzerindeki Etkisinin Araştırılması</i>" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir. Araştırma yürütücüsü en geç, onay bitiş tarihinden sonraki 1 ay içerisinde proje sonuç raporunu Kurulumuza teslim etmekle yükümlüdür.	
Prof. Dr. Sema ÇALIŞ Etik Kurul Başkanı	



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 52338575-96

HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 28.11.2023 (SALI)
TOPLANTI SAYISI	: 2023/09
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2023/47
KARAR NUMARASI	: 2023/09- 04
ONAY BİTİŞ TARİHİ	: 28.11.2028
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN
HAYVAN DENEYLERİNDE	: Kadir Oğuzhan SOYLU, Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ
GÖREVLİ ARAŞTIRMACILAR	: ÖZKAN, Öğr. Gör. Dr. Melike BAHÇEKAPILI,
	: Öğr. Gör. Dr. Buket Nebiye DEMİR, Öğr. Gör. Dr.
	: Canan ÇAKIR AKTAŞ
DİĞER YARDIMCI	: -
ARAŞTIRMACILAR	
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve	
SAYISI	: 42 Adet C57BL/6J Fare (8-12 Haftalık)

Üniversitemiz Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü öğretim üyesi Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN'ın araştırma yürütücüsü olduğu 2023/47 kayıt numaralı "**Kortikal Yayılan Depolarizasyonun Mitokondriyal DNA Üzerindeki Etkisinin Araştırılması**" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Araştırma yürütücüsü en geç, onay bitiş tarihinden sonraki 1 ay içerisinde proje sonuç raporunu Kurulumuza teslim etmekle yükümlüdür.

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı

EK-2: Tez Çalışması ile İlgili Orjinallik Raporu



Dijital Makbuz

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

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Kadir Oğuzhan Soylu
 Ödev başlığı: Quick Submit
 Gönderi Başlığı: Kortikal Yayılan Depolarizasyonun cGAS-STING Yolağı Üzerind...
 Dosya adı: TEZ_KOS_cGAS-STING_turnitin_SON.docx
 Dosya boyutu: 39.7M
 Sayfa sayısı: 106
 Kelime sayısı: 24,015
 Karakter sayısı: 176,897
 Gönderim Tarihi: 09-Haz-2026 01:48ÖS (UTC+0300)
 Gönderim Numarası: 2979676375



turnitin

Yeni Görünüm git Kadir Oğuzhan Soyulu

Kortikal Yayılan Depolarizasyonun cGAS-STING Yolağı Üzerindeki ...

←

3 / 8

?

Eşleşmelere Genel Bakış

%3

1

Hacettepe University' n...

Oğrenci Yazılı Odevi

%1

2

pubmed.ncbi.nlm.nih.g...

İnternet Kaynağı

%<1

3

www.researchsquare.c...

İnternet Kaynağı

%<1

4

acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

%<1

5

openaccess.hacettepe....

İnternet Kaynağı

%<1

6

docplayer.biz.tr

İnternet Kaynağı

%<1

7

acikkaynak.bilecik.edu.tr

İnternet Kaynağı

%<1

8

nek.istanbul.edu.tr:4444

İnternet Kaynağı

%<1

9

public-pages-files-2025...

İnternet Kaynağı

%<1

10

Afyon Kocatepe Univer...

Oğrenci Yazılı Odevi

%<1

11

Anadolu University' ne ...

%<1

1

3

Y

AI

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ

NÖROLOJİK BİLİMLER VE PSİKİYATRİ ENSTİTÜSÜ

KORTİKAL YAYILAN DEPOLARİZASYONUN cGAS-STING

YOLAĞI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Kadir Oğuzhan SOYLU

TEMEL NÖROLOJİK BİLİMLER PROGRAMI

DOKTORA TEZİ

Salt-Metin Raporu

Yüksek Çözünürlük

Kapalı

Sayfa: 1 / 106

Kalime Sayısı: 24015

9. ÖZGEÇMİŞ