



**İLAÇLA İNDÜKLENEN SENESENS GELİŞİMİNDE VE SEKRETOM
OLUŞUMUNDA FLOTİLLİN-1 VE FLOTİLLİN-2 PROTEİNLERİNİN
OLASI ROLLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Esra ÖZDEK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

MART 2024

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Esra ÖZDEK

08/03/2024

İLAÇLA İNDÜKLENEN SENESENS GELİŞİMİNDE VE SEKRETOM
OLUŞUMUNDA FLOTİLLİN-1 VE FLOTİLLİN-2 PROTEİNLERİNİN OLASI
ROLLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ
(Yüksek Lisans Tezi)

Esra ÖZDEK

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Mart 2024

ÖZET

Günümüzde dünyada görülme sıklığı açısından artış gösteren en önemli sağlık sorunlarından biri olan kanser, hücrelerin kontrolsüz bölünmesi ve anormal yayılımı ile karakterize edilen bir hastalıktır. Teknolojinin ilerlemesiyle birlikte yeni tedavi yöntemlerini bulmaya yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Kanser tedavileri, çeşitli mekanizmalar yoluyla tümörün yok edilmesine yol açmayı hedeflemektedir. Ancak tedavide kullanılan radyasyon ve kemoterapi kanserli hücreleri yok etmenin yanı sıra, normal olan sağlıklı hücrelere de zarar verdiğinden ve başka patolojilere neden olduğundan hastalarda pek çok yan etkiye sebep olmaktadır. Bunlardan bir tanesi de hücrel senesensin uyarılmasıdır. Hücrel senesens, kanser hücrelerinin kalıcı olarak büyümesinin durdurulmasını sağlamakla birlikte yaşlanmayla ilişkili salgı fenotipi (SASP) nin salgılanmasında neden olur. SASP, yaşlanmış hücrelerden sitokinler, kemokinler, proteazlar gibi faktörlerin salgılanmasını tanımlar. Dolayısıyla kanserin nüksetmesine ve kronik enflamasyona yol açabilir. Etkin bir kanser tedavisi geliştirilebilmesi için, kanseri teşvik eden SASP'ı baskılayan tedaviler geliştirilmesi gerekmektedir. Buradan yola çıkarak, hücre membranında bulunan ve birçok biyolojik süreçte rol alan düzlemsel lipid raflarını oluşturan flotillin-1 ve flotillin-2 proteinlerinin senesent hücre davranışlarında önemli olabileceğine işaret eden mikrodizi verilerimizin ışığında, bu durumun protein ekspresyonu ve işlevi düzeyinde araştırılmasına ihtiyaç olduğu değerlendirilmiştir. Flotillinlerin senesens gelişimi, SASP oluşumu ve işlevi ile ilgili etkinliğinin araştırılması literatür için yeni bir bilgi olacaktır. Mikrodizi verilerimiz, flotillinlerin senesent hücre davranışlarında önemli olabileceğine yönlendirmekle birlikte bu durumun protein ekspresyonu ve görevi düzeyinde değerlendirilmesine ihtiyaç vardır. Bu çalışmada; Senesens gelişimini ve sekretuar aktivitesini değerlendirdiğimiz deneylerde HeLa hücreleri kullanıldı. HeLa hücrelerinde, ilaçla indükleyerek senesent hale getirdiğimiz HeLa hücrelerinde, flotillin-1 ve flotillin-2 proteinli ve *knockdown* yaptığımız hücrelerde western-blot yöntemi, SA- β -Gal boyaması, IL-6 ölçümü, faz kontrast mikroskopisi, hologram mikroskopisi yöntemleriyle hücrelerin morfolojik özellikleri ve birbirleri arasındaki farkları incelenerek flotillin-1 ve flotillin-2'nin rolü değerlendirildi. Bu çalışmada amacımız; kanser hücrelerinde kemoterapi ile indüklenen senesente hücre morfolojisinin gelişmesinde ve SASP miktarının düzenlenmesinde flotillin-1 ve flotillin-2 proteinlerinin olası rolünü incelemektir. Bu tez kapsamında elde ettiğimiz bulgular, yeni senomorfik ilaç keşfi açısından flotillin-1 ve flotillin-2 proteinlerinin bir hedef olabileceğine işaret etmektedir. Bu proteinleri hedefleyen yeni ilaç adaylarının senomorfik etkinliklerinin değerlendirilmesi önemli olacaktır.

Bilim Kodu : 1064.1
Anahtar Kelimeler : Senesens, Flotillin-1, Flotillin-2
Sayfa Adedi : 49
Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Yaprak Dilber ŞİMAY DEMİR

THE EVALUATION OF THE POSSIBLE ROLES OF FLOTILLIN-1 AND FLOTILLIN-2 PROTEINS IN DRUG-INDUCED SENESENCE DEVELOPMENT AND SECRETOME FORMATION

(M. Sc. Thesis)

Esra ÖZDEK

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

March 2024

ABSTRACT

Cancer, one of the most important health problems with increasing incidence in the world today, is a disease characterized by uncontrolled division and abnormal spread of cells. With the advancement of technology, studies are being carried out to find new treatment methods. Cancer treatments aim to lead to tumor destruction through various mechanisms. However, in addition to destroying cancerous cells, the radiation and chemotherapy used in treatment also cause many side effects in patients because they damage normal, healthy cells and cause other pathologies. One of these is the stimulation of cellular aging. Cellular senescence causes the permanent growth arrest of cancer cells and the secretion of the senescence-associated secretory phenotype (SASP). SASP describes the secretion of factors such as cytokines, chemokines, and proteases from senescent cells. Therefore, it can lead to cancer recurrence and chronic inflammation. In order to develop an effective cancer treatment, it is necessary to develop treatments that suppress cancer-promoting SASP. Based on this, in the light of our microarray data indicating that flotillin-1 and flotillin-2 proteins, which form planar lipid shelves in the cell membrane and play a role in many biological processes, may be important in senescent cell behavior, it has been evaluated that this situation needs to be investigated at the level of protein expression and function. Investigating the effectiveness of flotillins regarding senescence development, SASP formation and function will be new information for the literature. Although our microarray data suggest that flotillins may be important in senescent cell behavior, this situation needs to be evaluated at the level of protein expression and function. In this study, HeLa cells were used in the experiments in which we evaluated senescence development and secretory activity. In HeLa cells, in Hela cells that we senescent by inducing with drugs, in cells with flotillin-1 and flotillin-2 proteins, and in cells that we knocked down, the cells were detected by western-blot method, SA- β -Gal staining, IL-6 measurement, phase contrast microscopy, hologram microscopy methods. The role of flotillin-1 and flotillin-2 was evaluated by examining their morphological characteristics and differences between each other. Our aim in this study is, to examine the possible role of flotillin-1 and flotillin-2 proteins in the development of cell morphology and regulation of the amount of SASP in chemotherapy-induced senescence in cancer cells. The findings we obtained within the scope of this thesis indicate that flotillin-1 and flotillin-2 proteins may be a target for new senomorphic drug discovery. It will be important to evaluate the senomorphic activity of new drug candidates targeting these proteins.

Science Code : 1064.1

Key Words : Senescence, Flotillin-1, Flotillin-2.

Page Number : 49

Supervisor : Dr. Öğr. Üyesi Yaprak Dilber ŞİMAY DEMİR

TEŞEKKÜR

Tez çalışması süresince bilgilerini ve zamanını sabırla paylaşan sevgili danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Yaprak Dilber ŞİMAY DEMİR'e, değerli hocalarım Prof. Dr. Mustafa ARK'a ve Prof. Dr. Aysun ÖZDEMİR'e,

Tez yazım sürecinde beni destekleyen iş arkadaşlarıma,

Bütün hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen ve her daim yanımda olan aileme,

Saygılarımı ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez TÜBİTAK 122S564 no'lu proje tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	ix
RESİMLERİN LİSTESİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Senesens Nedir?	5
2.1.1. Kanser ve senesens.....	6
2.1.2. Senesens oluşum mekanizmaları.....	6
2.1.3. Senesens hücre morfolojisi	7
2.1.4. SASP	8
2.1.5. Kemoterapötiklerle indüklenen senesens	9
2.2. Senoterapötikler	12
2.2.1. Senolitik ve senomorfikler	14
2.3. Flotillinler.....	16
2.3.1. Flotillin proteinlerinin fonksiyonları.....	16
2.3.2. Flotillin proteinlerinin sekresyonla ilişkisi	17
2.4. Sitokin Sekresyonu.....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	25
3.2. Kullanılan Aletler.....	26

	Sayfa
3.3. Yöntem.....	26
3.3.1. Hücre kültürü ve senesensin indüksiyonu.....	26
3.3.2. Flotillin-1 ve Flotillin-2 <i>knockdown</i>	27
3.3.3. Western-blot yöntemi.....	27
3.3.4. SA- β -Gal boyaması.....	28
3.3.5. SASP' ın eldesi	29
3.3.6. Sekretomda IL-6 ölçümü.....	29
3.3.7. Faz kontrast mikroskopisi	30
3.3.8. Holografik mikroskopi.....	30
3.4. İstatistiksel Analiz.....	30
4. BULGULAR.....	31
5. TARTIŞMA	37
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	39
KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ	49

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 4.1. % SA- β -Gal pozitif hücre yüzdesinin istatistiksel analizi	32
Şekil 4.2. HeLa hücrelerinde holografik görüntülerden elde edilen morfolojik parametrelerin istatistiksel analizi	34
Şekil 4.3. HeLa hücre hattında siRNA uygulamalarının western blot yöntemi ile doğrulanması	35
Şekil 4.4. Hela hücrelerinden elde edilen sekretomlardaki IL-6 düzeylerinin istatistiksel analizi	35

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. HeLa hücrelerinde doksorubisin ile indüklenen senesens gelişiminde lipid raft deplesyonunun olası etkisinin değerlendirildiği SA- β -Gal boyaması görüntüleri.....	31
Resim 4.2. HeLa hücrelerinde doksorubisin ve/veya lipit deplesyonu sonrası faz kontrast mikroskobu görüntüleri	33
Resim 4.3. HeLa hücrelerinde doksorubisin ve/veya lipit deplesyonu sonrası holografik görüntüler	33

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
-----------------	--------------------

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
g	Gram
kg	Kilogram
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mmHg	Milimetre civa
mmol	Milimol
ng	Nanogram
nm	Nanometre
V	Volt

Kısaltmalar	Açıklamalar
--------------------	--------------------

DNA	Deoksiribonükleik asit
GADPH	Gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz
GAP	GTPaz aktive eden protein
HeLa	İnsan servikal kanser hücre dizisi
IL6	İnterlökin 6
PBS	Fosfat tamponlu salin çözeltisi
RNA	Ribonükleik asit
SA-β-Gal	Senesens ilişki-β-Galaktozidaz
TME	Tümör Mikro ortamı
DC	Dendritik hücre

Kısaltmalar**Açıklamalar****NK**

Doğal öldürücü

TLR

Toll benzeri reseptör

PRR

Kalıp tanıma reseptörü

TNF

Tümör nekroz faktör

SASP

Senesensle İlişkili Salgı Fenotipi

MIF

Makrofaj göçü önleyici faktör

LRO

Lizozomla ilgili organel

GTPazlar

Guanosin trifosfataz

SNAP

Çözünür NSF bağlanma proteini

SNARE

SNAP (çözünür NSF bağlanma proteini) reseptörleri

VAMP

Vezikülle ilişkili membran proteini

HUVEC

İnsan umbilikal ven endotel hücreleri

NLRP3

Nükleotid bağlayıcı alan benzeri reseptör protein 3

SCAP

Senesent hücre anti-apoptotik yolları

EMT

Epitelyal-mezenkimal geçiş

1. GİRİŞ

Hücrel senesens, tarihsel olarak, kansere karşı koruma görevi gören geri dönüşümsüz bir hücre döngüsü durdurma mekanizması olarak tanımlanmıştır, ancak son keşifler, bilinen tanımını gelişme, doku onarımı, yaşlanma ve yaşa bağlı bozukluklar gibi karmaşık biyolojik olaylara genişletmiştir [1]. Hücrel stresin sebep olduğu kalıcı bir hücre döngüsü durması durumu olan hücrel senesens, son zamanlarda kanser, ateroskleroz ve osteoartrit dahil olmak üzere çok sayıda hastalıklara katkıda bulunan temel bir yaşlanma mekanizması olarak ortaya çıkmıştır [2]. Aynı zamanda senesent hücrelerin birikmesi, yaşla ilişkili birçok fenotipi ve patolojiyi de yönlendirebilir [3]. Senesent hücreler premalign lezyonlarda ve doku hasarı bölgelerinde bulunur, yaşla birlikte bu dokularda artar [4]. Stresli veya premalign hücrelerin çoğalmasını durduran güçlü bir tümör koruma mekanizması olan hücrel senesense doku mikroçevresinde proinflatuvar sinyallerin bol miktarda salgılanmasını gerektiren ve paradoksal olarak kanser de dahil olmak üzere yaşla ilgili koşullara katkıda bulunan Senesensle İlişkili Salgı Fenotipi (SASP) eşlik eder [5]. Yapılan son çalışmalar, senesent hücrelerin, yerel doku ortamını değiştiren, kronik iltihaplanma ve kansere katkıda bulunan bir dizi inflamatuvar sitokin, kemokin, büyüme faktörü ve matris yeniden modelleme faktörü salgıladığını ortaya çıkarmıştır [6].

SASP, senesent hücrelerin sitokinler, kemokinler, proteazlar, büyüme faktörleri ve biyoaktif lipidleri içeren çeşitli hücre dışı modülatörleri ifade etme ve salgılama yeteneğini temsil eder. SASP senesent hücrelerdeki hücre döngüsünün durdurulmasını güçlendirir, potansiyel olarak tümörijenik hücrelerin immün aracılı temizlenmesini indükler, fibrozu sınırlar, yara iyileşmesini ve doku rejenerasyonunu destekler. Diğer yandan SASP, kronik enflamasyona aracılık edebilir ve tümör hücrelerinin büyümesini ve hayatta kalmasını teşvik edebilir [7].

Son birkaç on yılda kanser, acil ilaç keşfini vurgulayarak insan sağlığını tehlikeye atan en ölümcül hastalıklardan biri olmaya devam etmiştir. Hücrel senesens, kanser tedavisinin gelişimiyle bağlantısı nedeniyle son yıllarda büyük ilgi görmüştür [8]. Kanser hücrelerinde, kemoterapötik ajanlara, radyoterapiye ve moleküler hedefli tedaviye yanıt olarak senesens gelişmektedir. Bu senesens şekli, terapi kaynaklı senesens olarak adlandırılır ve kanser tedavisinde arzu edilen bir hedefi temsil eder [9]. İlaça bağlı senesens, kemoterapötik tedavinin bir sonucu olarak hem normal hücrelerde hem de kanser hücrelerinde aktive olabilir, bu da SASP, ikincil yaşlanma ve kanserin ilerlemesi gibi bazı olumsuz yan etkilere

yol açar [10]. Sonuç olarak, senesent hücreler ve SASP, doğal veya sentetik bileşikler yoluyla ya senesent hücrelerin seçici olarak öldürülmesi ya da seçici SASP blokajı yoluyla potansiyel terapötik hedefler olarak görülür. Bu bileşikler, senolitikler ve senomorfikler olarak ikiye ayrılan senoterapötikler adı verilen bir ailenin üyeleridir. Bunların bazıları halihazırda klinik deneylerde olup, ateroskleroz, osteoartrit, osteoporoz, kanser, diyabet, Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, hepatik steatoz, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, idiyopatik pulmoner fibroz ve yaşa bağlı makula dejenerasyonu gibi hastalıklar da dahil yaşa bağlı patolojilerin gelecekteki tedavisini temsil etmektedir [11]. Kanser hayvan modellerinde senesent hücreleri seçici olarak hedefleyen (senolitikler) veya senesensle ilişkili salgı fenotipini baskılayan (senomorfikler) farmasötik yaklaşımlar kullanarak hücre yaşlanması yükünün azaltılması büyük umut vaat etmektedir. Çalışmalar, senolitiklerin veya senomorfiklerin insanlarda senesent hücrelerin sayısını azaltmada etkili olduğuna dair kanıt sağlasa da, bu tedavilerin kısa vadeli ve uzun vadeli yan etkileri büyük ölçüde bilinmemektedir [12].

Lipid raftları, sfingolipid, kolesterol ve proteinlerin dalgalanan nano ölçekli düzenekleridir; bir araya gelerek stabilize edilebilen, membran sinyalleme ve iletimde işlev gören platformlar oluşturur [13]. Flotillinler, raftlar olarak bilinen, kolesterol ve sfingolipidle zenginleştirilmiş membran mikro alanlarıyla ilişkilidir ve hatta bazı bulgular, onların kendi türde bir mikro alanı tanımladıklarını öne sürmektedir [14]. Mevcut hipotezler, hücre duvarı sentetik proteinleri de dahil olmak üzere membran proteinlerinin komplekslerinin oluşumu için flotillin proteinlerinin gerekli olduğunu ileri sürmektedir [15]. Yapılan çalışmalar, flotillinlerin insülin sinyali, T hücresi aktivasyonu, membran iletimi, fagositoz ve epidermal büyüme faktörü reseptör sinyali gibi çeşitli hücresel süreçlerde bir rolü olduğunu öne sürmüştür. Son bulgular ayrıca flotillin-1'in hücre hareketliliği ve dönüşümü ile ilişkili olduğunu da göstermektedir [16]. Birçok invaziv karsinomda ve sarkomda flotillinler aşırı eksprese edilir ve bu durum, kötü prognoz ve metastaz oluşumu ile ilişkilidir. Flotillinlerin aşırı eksprese edilmesi, plazma membranının invaginasyonunu teşvik eder ve flotillinlerin biriktiği geç endozomal bölmedeki kargo proteinlerinin hedeflenmesine izin veren bir endositik yolu indükler [17].

Kanser hücreleri, uygun bir tümör mikro ortamı (TME) oluşturmak için çoğunlukla sitokinler, kemokinler veya büyüme faktörleri gibi çözünür faktörler aracılığıyla çevreleriyle iletişim kurar. Farklılaşmış ve progenitör hücrelerin heterojen bir popülasyonu olan TME,

tümör gelişimi, büyümesi, istilası, metastazı ve tedavi direncinin düzenlenmesinde kritik bir rol oynar. Bu bağlamda, kanser hücrelerinden gelen sitokinler ve TME hücreleri birbirini etkileyerek tümör büyümesini ve metastazı artırabilen veya baskılayabilen inflamatuvar bir ortam ortaya çıkarır [18]. Bağışıklık düzenleyicileri olarak sitokinler, tehlikeye, doku hasarına veya yaralanmaya yanıt olarak sinyal molekülleri olarak önemli bir role sahiptir. Daha da önemlisi, immünolojik sürveyanstaki hayati rolleri nedeniyle sitokin tedavisi, kanser tedavisi için umut verici bir terapötik yöntem haline gelmiştir [19]. Kanserlerde karmaşık sitokin ağları tanımlanmış ve kanserlerle ilişkili sitokinlere olan ilgi giderek artmaktadır. Son zamanlarda, bu sitokinlerden bazıları, hastalık prognozu için belirteçler olarak tanımlanan IL-6 gibi diğer birkaç sitokin dışında, kanser tedavisi için potansiyel hedefler olarak bile tanımlanmıştır. Kanser araştırmalarına en çok katkıda bulunanlar arasında kanser hücre dizileri, in vitro en yaygın kullanılan materyal olarak en üst sırada yer almaktadır [20].

Lipid raftları, sinyal entegrasyonunda ve bir dizi sitokin ve büyüme faktörü reseptörünün hücresel aktivasyonunda önemli bir rol oynar. Yakın zamanda flotillin proteinlerinin hücresel aktivasyon üzerine lipid raft mikroalanlarına alındığı ve nöral hücre rejenerasyonunda, reseptör sinyallemede ve lenfosit aktivasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir. Giri ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma, kemokine maruz kalma sırasında hücresel flotillin-1'in lipid raftı mikro alanları ile artan ilişkisinin, kemokin reseptörü sinyallemede ve lipid raftları ile reseptör bölünmesinde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir [21].

Daha önce 215S998 nolu TÜBİTAK 1001 projesi kapsamında gerçekleştirmiş olduğumuz mikrodizi verilerinde lipid raft proteinleri taranmıştır. Bu tarama sonucunda doksorubisin ile indüklenen HeLa hücrelerinde kontrole kıyasla kaveolar proteinlerde (kaveolin-1, kavin-1, kavin-2) anlamlı bir değişiklik belirlenmezken, Flotillin-1 ve Flotillin-2 mRNA'larının yaklaşık olarak 2 kat artmış (*Log2-fold changes*) olduğu belirlendi [Mikrodizi verilerimiz NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) database'de yer almaktadır, erişim numarası: GSE160234]. Bu durum özellikle flotillinlerin senesens hücreler için önemli proteinler olabileceğini düşündürmektedir. Literatürde senesens gelişiminde lipid raftlarının rolünü inceleyen çalışmaların çoğunluğunun kaveolinler üzerinden ilerlediği görülmektedir. Bu nedenle flotillinlerin hem senesens gelişimi hem de SASP oluşumu ve işlevi ile ilgili etkinliğinin gösterilmesi literatür için oldukça yeni bir bilgi olacaktır. Mikrodizi verilerimiz,

flotillinlerin senesent hücre davranışlarında önemli olabileceğine işaret etmekle birlikte bu durumun protein ekspresyonu ve işlevi düzeyinde değerlendirilmesine ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada amacımız; kanser hücrelerinde kemoterapi ile indüklenen senesente hücre morfolojisinin gelişmesinde ve SASP miktarının düzenlenmesinde flotillin-1 ve flotillin-2 proteinlerinin olası rolünü incelemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Senesens Nedir?

Tarihsel olarak hücresel senesens, kansere karşı koruma görevi gören geri dönüşümsüz bir hücre döngüsü durdurma mekanizması olarak görülmüştür, ancak son keşifler bilinen rolünü gelişme, doku onarımı, yaşlanma ve yaşa bağlı bozukluklar gibi karmaşık biyolojik süreçlere genişletmiştir. Yeni görüşler, senesensin, ilk büyümenin durmasından sonra edinilen bir dizi ilerleyici ve fenotipik olarak farklı hücresel durumu temsil ettiğini göstermektedir [1].

Hücresel senesens ilk olarak telomer kısalması ile karakterize edilen ve hücre çoğalmasının sınırlanmasına neden olan bir durum olarak tanımlanmıştır. Replikatif senesens olarak adlandırılan bu senesens türü dışında, farklı stres faktörlerine maruz kaldıktan sonra diğer senesens türleri de ortaya çıkmaktadır. Tedaviden (kemoterapi ve radyoterapi) sonra indüklenen bu senesens türlerinden birine tedavi ile indüklenen senesens denir. Kemoterapötiklerle tedavi, tümör mikroçevresindeki normal ve kanser hücrelerinde hücresel senesensi indükler. Bu nedenle, kanser mikroçevresinde tedavi ile indüklenen senesens, tümör ilerlemesinin itici güçlerinden biri olarak kabul edilir [22]. Hücresel senesens, çeşitli içsel ve dışsal faktörler tarafından indüklenebilir [23].

Farklı streslere maruz kalarak çoğalan hücrelerde meydana gelen kalıcı bir hücre döngüsü durması durumu olarak karşımıza çıkan hücresel senesens, hücrelerin gereksiz yere zarar görmesini engelleyen bir hücresel savunma mekanizmasıdır. Senesens durumuna, mitojenik uyarılara yanıt olarak hücre döngüsüne yeniden girememe, gelişmiş bir salgı fenotipi ve hücre ölümüne karşı direnç eşlik eder. Senesens, doku yeniden şekillenmesi, yaralanma, kanser ve yaşlanma gibi farklı fizyolojik ve patolojik süreçler sırasında birçok dokuda gerçekleşir. Senesens, yaşlanmanın nedensel süreçlerinden biri olmasına ve yaşlanmaya bağlı bozukluklardan sorumlu olmasına rağmen, senesent hücreler de olumlu bir rol oynayabilir. Embriyogenez ve doku yeniden modellenmesinde, embriyonun düzgün gelişimi ve doku onarımı için senesent hücreler gereklidir. Kanserde de, tümöröjenezi önlemek için güçlü bir engeldir [24]. Bununla birlikte senesent hücrelerin birikmesi, yaşla ilişkili birçok fenotipi ve patolojiyi yönlendirebilir [3]. Hücresel senesens, gelişim sırasında ve yaralanma sonrasında doku yeniden şekillenmesini destekleyen, ancak aynı zamanda dokuların rejeneratif potansiyelinin ve işlevinin azalmasına, iltihaplanmaya ve yaşlı organizmalarda

tümör oluşumuna katkıda bulunabilen kalıcı bir hücre döngüsü durması durumudur [25]. Yapılan çalışmalarda, senesent hücrelerin in vivo zararlı etkilere sahip olabileceğine ve doku yeniden şekillenmesine, organizmanın yaşlanmasına ve yaşla ilgili birçok hastalığa katkıda bulunabileceğine dair veriler mevcuttur [23]. Senesent hücreler premalign lezyonlarda ve doku hasarı bölgelerinde bulunur ve yaşla birlikte dokularda birikir [4]. Kanseri, ateroskleroz ve osteoartrit dahil olmak üzere hastalıklara da katkıda bulunan temel bir yaşlanma mekanizması olarak ortaya çıkmaktadır [2].

Senesent hücrelerin dokularda birikmesi, öncelikle "inflamasyon" yoluyla, sağlığın azalmasına ve yaşam süresinin bir sınırı olduğuna inandırmıştır. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalarda, senesent hücreleri ortadan kaldıran müdahaleler, farelerde sağlık ve yaşam süresinde belirgin iyileşmeler sağlamıştır. Artan sayıda çalışma, çevresel uyaranların, kromatin durumlarını modüle eden korunmuş yollar yoluyla yaşlanmayı ve uzun ömürlülüğü etkileyebileceğini göstermektedir [26].

2.1.1. Kanseri ve senesens

Son birkaç on yılda kanser, acil ilaç keşfini vurgulayarak insan sağlığını tehlikeye atan en ölümcül hastalıklardan biri olmaya devam etti. Hücresel yaşlanma, kanser tedavisinin gelişimiyle bağlantısı nedeniyle son yıllarda büyük ilgi görmüştür [8].

Hücresel senesens, stabil bir hücrenin büyümesinin durmasıdır [26]. Aynı zamanda, stresli veya premalign hücrelerin çoğalmasını durduran güçlü bir tümör koruma mekanizmasını temsil eder. Bununla birlikte, bu stabil proliferatif tutuklama durumuna, doku mikroçevresinde proinflamatuvar sinyallerin bol miktarda salgılanmasını gerektiren ve paradoksal olarak kanser de dahil olmak üzere yaşla ilgili koşullara katkıda bulunan Senesens ile ilişkili Salgı Fenotipi (SASP)'ne eşlik eder [5].

2.1.2. Senesens oluşum mekanizmaları

Senesens, eski, hasarlı veya kanserli hücrelerin çoğalmasını önleyen hücresel bir programdır. Senesent hücreler büyümeyi durdurur ve morfolojilerinde, kromatin organizasyonlarında ve metabolizmalarında değişikliklere uğrar ve biyoaktif bir sekretom üretir. Bu sekretom SASP olup, örneğin makrofajlar gibi bağışıklık hücrelerinin alınması ve

etkinleştirilmesi gibi yaşlanan hücrelerle ilişkili patofizyolojik etkilerin çoğuna aracılık eder. Senesent hücreler ve makrofajlar arasındaki ilişki ilgi çekicidir: senesent hücreler makrofajları toplar, onları yaşlanmaya teşvik edebilir veya polarizasyonlarını etkileyebilir. Senesent hücreler ve makrofajlar birden çok fenotipik özelliği paylaşır; her ikisi de yüksek salgılama durumuna, artan lizozom sayılarına veya iltihaplanmayı aktive etme yeteneğine sahiptir. Senesent hücreler yaşlanma ve hastalık sırasında birikir ve onları öldürmek etkin fayda sağlar [27].

Hücresel senesens, DNA hasarı da dahil olmak üzere çeşitli potansiyel olarak onkojenik uyarılar tarafından indüklenebilen, geri dönüşümsüz bir hücre döngüsü durması durumudur. Bu nedenle, uzun zamandır senesensin homeostazın koruyucusu olarak hareket ederek tümörjenez baskıladığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, son araştırmalar, senesent hücrelerin, yerel doku ortamını değiştiren ve kronik iltihaplanma ve kansere katkıda bulunan bir dizi inflamatuvar sitokin, kemokin, büyüme faktörü ve matris yeniden modelleme faktörü salgıladığını ortaya koymuştur [6].

Hücresel senesens, hücre döngüsünden stabil çıkışa eşlik eden bir stres tepkisidir. Klasik olarak, özellikle insan hücrelerinde senesens, p53 ve p16/Rb yollarını içerir ve genellikle bu tümör baskılayıcı yolların her ikisinin de yaşlanmayı atlatmak için iptal edilmesi gerekir. Buna paralel olarak, senesensin bir dizi efektör mekanizması tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. Bu çalışmalar, senesensin bu çoklu efektörlerin toplu bir fenotipi olduğunu ve yoğunluklarının ve kombinasyonlarının tetikleyicilere ve hücre tiplerine bağlı olarak farklı olabileceğini ve senesense karmaşık ve çeşitli bir doğa kazandırdığını öne sürmektedir [28].

2.1.3. Senesens hücre morfolojisi

Hücresel senesens, hücrelerin metabolik olarak aktif kaldığı ve senesensle ilişkili salgı fenotipinin bir parçası olarak bir dizi proinflamatuvar ve proteolitik faktör salgıladığı, esas olarak geri döndürülemez bir proliferatif durma durumunu gerektirir. Farklı senesent hücre türleri vardır ve senesens, birçok DNA hasar sinyaline yanıt olarak indüklenebilir. Senesent hücreler, farklı fizyolojik ve patolojik işlevlere sahip oldukları farklı doku ve organlarda birikirler. Bu çeşitliliğe rağmen, tüm senesent hücreler, kendilerini DNA hasar tepkisinin sürekli aktivasyonuna bağlı pozitif geri besleme döngülerinden korurken, bölünmeyen bir durumda hayatta kalabilmelidir. Bu kapasite, çekirdek hücresel programlarda değişiklik

yapılmasını gerektirir [29]. Senesens durumuna, mitojenik uyaranlara yanıt olarak hücre döngüsüne yeniden girememe, gelişmiş bir salgı fenotipi ve hücre ölümüne karşı direnç eşlik eder. Senesens, doku yeniden şekillenmesi, yaralanma, kanser ve yaşlanma gibi farklı fizyolojik ve patolojik süreçler sırasında birçok dokuda gerçekleşir. Senesens, yaşlanmanın nedensel süreçlerinden biri olmasına ve yaşlanmaya bağlı bozukluklardan sorumlu olmasına rağmen, senesent hücreler de olumlu bir rol oynayabilir. Embriyogenez ve doku yeniden modellenmesinde, embriyonun düzgün gelişimi ve doku onarımı için senesent hücreler gereklidir. Kanserde senesens, tümörijenizi önlemek için güçlü bir engel olarak çalışır [24]. Akut senesens indüksiyonu, kansere karşı koruma sağlar ve fibrozu sınırlar, ancak kronik senesens indüksiyonu yaşa bağlı bozuklukları tetikler [30].

Senesensin ayırt edici özellikleri; genomik istikrarsızlık, telomer yıpranması, epigenetik değişiklikler, proteostaz kaybı, engelli makrotofaji, düzensiz besin algılama, mitokondriyal işlev bozukluğu, hücresel yaşlanma, kök hücre tükenmesi, değişmiş hücreler arası iletişim, kronik iltihaplanma ve disbiyozdur. Bu ayırt edici özellikler birbirleriyle de bağlantılıdır [31].

Hücresel yaşlanma, embriyogenez sırasında ve normal yetişkin organizmalarda yararlı bir rol oynayan, homeostazın korunmasına katkıda bulunan bir stres tepki mekanizmasıdır. Buna karşılık, kronik senesens aktivasyonu, yaşa bağlı bozukluklar, HIV ve kanser gelişimi gibi diğer olaylardan sorumlu olabilir. Hücresel senesensin aktivasyonu, farklı nedenlerle tetiklenebilir. İndükleyiciden bağımsız olarak, genellikle senesent hücreler arasında paylaşılan birkaç fenotip vardır: hücre bölünmesinin durması, anormal bir şekil, artan boyut, artan sayıda lizozom ve vakuol nedeniyle yüksek granülerlik, apoptoz direnci, kusurlu metabolizma ve bazı kromatin değişiklikleri. Senesent hücreler, kırılabilirlik, sarkopeni gibi farklı hastalıkların patogeneze ve kanser ve HIV enfeksiyonu gibi hızlı yaşlanma gösteren yaşlanmaya bağlı hastalıkların patogeneze katkıları nedeniyle önemli bir araştırma alanı oluşturmaktadır [32].

2.1.4. SASP

SASP, senesent hücrelerin sitokinler, kemokinler, proteazlar, büyüme faktörleri ve biyoaktif lipidleri içeren çeşitli hücre dışı modülatörleri ifade etme ve salgılama yeteneğini tanımlar. Senesens hücre döngüsünün durdurulmasını güçlendirir, potansiyel olarak tümörjenik

hücrelerin immün aracılı temizlenmesini uyarır, fibrozu sınırlar, yara iyileşmesini ve doku rejenerasyonunu destekler. Öte yandan SASP, kronik enflamasyona aracılık edebilir ve tümör hücrelerinin büyümesini ve hayatta kalmasını teşvik edebilir. SASP'nin regülasyonu, kromatinin yeniden modellenmesi, C/EBP ve NF- κ B gibi spesifik transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, mRNA translasyonunun kontrolü ve hücre içi kaçakçılık dahil olmak üzere birçok seviyede gerçekleşir [7].

Senesent hücreler SASP aracılığıyla mikroçevreyi modüle eden çok sayıda inflamatuvar ve pro-fibrojenik faktör salgılar. HücreSEL SASP ve ilişkili salgılanan faktörler, safra kanallarını kaplayan safra epitel hücrelerini hedef alan kolestatik hasar gibi karaciğer hastalıklarının ilerlemesinde de rol oynamıştır [32].

2.1.5. Kemoterapötiklerle indüklenen senesens

HücreSEL senesens, hücre çoğalmasını geri dönüşümsüz olarak durdurarak kanseri baskılar [33]. İnflamatuvar moleküller ve kemoterapötik ilaçlar dahil olmak üzere çok sayıda stres etkeni tarafından tetiklenebilir [34]. Kanser hücreleri, kemoterapötik ajanlara, radyoterapiye ve moleküler hedefli tedaviye yanıt olarak yaşlanmaya maruz kalır. Bu senesens şekli, terapi kaynaklı yaşlanma olarak adlandırılır ve kanser tedavisinde arzu edilen bir hedefi temsil eder [9]. Pek çok genotoksik kemoterapi, spesifik olmayan bir şekilde çoğalan hücreleri hedefler [33]. Senesensin proliferatif olmayan bir terminal durumu temsil ettiği ve bu nedenle tümör oluşumuna karşı etkili bir bariyer olduğu düşünülmektedir [35]. Ancak hücreSEL senesens dolayısıyla SASP'a maruz kaldıktan sonra, kanser hücreleri hücreSEL plastisiteye maruz kalır ve bu da artan proliferasyon, göç ve epitelyal-mezenkimal geçiş ile sonuçlanır. SASP'ın bu pro-tümörjenik özellikleri düzenlediği moleküler mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır [36]. Son araştırmalar, hücreSEL senesensin oldukça heterojen ve dinamik bir süreç olduğunu göstermiştir. Bağışıklık sistemi tarafından temizlenmenin yanı sıra, senesent kanser hücreleri uzun süre hayatta kalabilir ve yaşlanma durumundan kurtulabilir. Özellikle, bu hücreler, sonunda kanserin nüksetmesini kolaylaştıran yüksek agresiflik ile yeniden kazanma potansiyeline sahiptir. Ayrıca, senesent hücrelerin SASP içeriği her zaman aynı değildir, immün baskılama ve bir protümör mikroortamı oluşturabilir. Bu zararlı etkiler göz önüne alındığında, senesense neden olan kemoterapi ve ardından senoterapi ortaya çıkmıştır. Bu birleşik terapi, kalıcı senesent hücrelerin gereksiz yan etkilerini hafifletebilir,

senesens öncesi tedavinin toksisitesini azaltabilir ve kanser hastalarının hayatta kalma süresini uzatabilir ve kanser tedavisinde potansiyel bir geleceğe sahiptir [9].

Senesent hücrelerin izlenmesini ve ortadan kaldırılmasını amaçlayan transgenik fare kullanılan bir çalışmada tedaviye bağlı senesent hücrelerin kalıcı olduğu, lokal ve sistemik iltihaplanmaya katkıda bulunduğu anlaşılmıştır. Senesent hücrelerin ortadan kaldırılması, ilaçların kemik iliği baskılanması, kalp fonksiyon bozukluğu, kanser nüksü, fiziksel aktivite ve güç dahil olmak üzere birçok kısa ve uzun vadeli etkisini azaltmıştır [33].

Son zamanlarda, kemoterapötik ilaca bağlı hücresel senesens, umut verici bir anti-kanser yaklaşımı olarak kabul edilmiştir. Replikatif ve onkojen kaynaklı senesensden hem benzer hem de farklı özellikler gösteren ilaca bağlı senesens, kemoterapiye in vitro ve in vivo tümör yanıtının önemli bir belirleyicisi olarak kabul edilmiştir. Bugüne kadar, kanser hücrelerinde senesensi tetikleyebilen etkili kemoterapötik ilaçlar keşfedilmiştir. Bu ilaçların hedefleri, senesens sinyal yolları, DNA replikasyon süreci, DNA hasar yolları, epigenetik modifikasyonlar, mikrotübül polimerizasyonu, SASP ve benzeri dahil olmak üzere önemli ölçüde farklılık gösterir [37].

Sisplatinin terapötik süreç sırasında yumurtalık hücrelerinde senesense yol açabileceğini ve senolitik ilaçların hayvanları sisplatin kaynaklı yumurtalık hasarına karşı koruyabileceğini varsayan bir çalışmada; sisplatinle tedavi edilen yumurtalıklarda senesent hücreler bulunmuştur, senesens ile ilişkili salgı fenotipi belirlenmiş ve metformin veya dasatinib ve kersetin ile bağımsız olarak veya kombinasyon halinde tedavi ederek yumurtalık işlevinde önemli iyileşme gözlemlenmiştir [38].

Doksorubisin klinik doz uygulaması kardiyovasküler toksisite ile sınırlanan güçlü bir antrasiklin antikanser ilacıdır. Hücresel senesensin doksorubisin tarafından ortaya çıkarılan vasküler hasara katkıda bulunup bulunmadığı araştırılmıştır. İnsan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC) kültürlerinde doksorubisin, senesens belirteçleri olarak kullanılan SA- β -gal pozitif hücrelerin sayısını ve γ H2AX, p21 ve p53 seviyelerini artırmıştır. Ayrıca, doksorubisin ile indüklenen senesense, interlökin (IL)-1 β salabilen doğuştan gelen bağışıklık sisteminin önemli bir üyesi olan nükleotid bağlayıcı alan benzeri reseptör protein 3 (NLRP3) iltihaplanmasının aracılık ettiği belirlenmiştir. Aslında, IL-1 β 'nin kendisi, Doksorubisinin hem NLRP3 aktivasyonu hem de hücresel senesens üzerindeki uyarıcı

etkisini taklit ederken, IL-1 reseptörlerinin farmakolojik blokajı, doksorubisinin senesens yanlısı etkilerini önemli ölçüde azaltmıştır [34].

Antrasiklinler, kanser tedavisinin ön saflarında yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ilaçlardır. Kardiyak hücreler, antrasiklinlere maruz kaldıklarında, öncelikle hücre döngüsü durması, organel disfonksiyonu ve SASP'a geçiş ile karakterize edilen bir durum olan stres kaynaklı senesense maruz kalabilir. SASP, senesensi, senesent hücrelerin birikmesine yol açan hücresel işlev bozukluğunu ve hücre dışı matrisin yeniden şekillenmesini teşvik ederek komşu hücrelere yayılabilir. Bu nedenle, senesent kalp hücrelerinin birikmesi, antrasiklin kaynaklı kardiyotoksisite ile ilişkili ortaya çıkan patofizyolojik bir mekanizmadır. Bu paradigma ayrıca, antrasiklin kaynaklı kardiyotoksisitenin (yani senolitik terapiler) tedavisinde yaşanan hücreleri temizlemeye yönelik terapötik yaklaşımların potansiyelini de artırmaktadır [39].

Kanser ilerlemesi, tümör hücreleri ve çevreleyen stroma arasındaki çapraz etkileşim ile desteklenir. Bu bağlamda, tümör mikroçevresindeki senesent hücreler, proinflatuvar bir ortamın gelişmesine ve kanser hücreleri tarafından agresif özelliklerin kazanılmasına katkıda bulunur. Antikanser tedaviler hem tümör hem de kanserli olmayan hücrelerde hücresel senesensi (tedavi kaynaklı yaşlanma, TIS) indükleyerek tedavilerin birçok zararlı yan etkisine katkıda bulunur. Bu nedenle kemoterapinin prostat ve yumurtalık kanserinin stromal kompartmanı üzerindeki etkilerine odaklanılan bir çalışmada; antikanser kemoterapötiklerin, spesifik etki mekanizmalarına bakılmaksızın, stromal fibroblastlarda SASP'ı teşvik ettiğini, metabolik değişikliklere ve parakrin faktörlerin salgılanmasına yol açarak hem prostat hem de yumurtalık kanseri hücrelerinin istilacı ve klonojenik potansiyelini sürdürdüğü gösterilmiştir [40].

İlaça bağlı gelişen senesens, kemoterapötik tedavinin bir sonucu olarak hem normal hücrelerde hem de kanser hücrelerinde aktive olabilir, bu da SASP, ikincil yaşlanma ve kanserin ilerlemesi gibi bazı olumsuz yan etkilere yol açar. Senesent hücrelerin hedeflenen eliminasyonu, özellikle kinaz inhibitörü dasatinib ile birlikte tedavi edildiğinde, örneğin bitkiden türetilen doğal bileşik kersetin gibi senolitik aktiviteye sahip ilaçlarla sağlanabilir. [10].

2.2. Senoterapötikler

Hücrel senesens, homeostazı sağlayan bir stres yanıt mekanizmasıdır. Embriyonik gelişim veya normal yetişkin yaşamı sırasındaki geçici aktivasyonu, faydalı özelliklerle bağlantılıdır [41]. Hücrel senesens, yara onarımı ve embriyogenez de dahil olmak üzere doku yeniden şekillenmesinde rolü olan bir süreçtir [42]. Ayrıca senesens, kanserli hücrelerin çoğalmasını önleyerek güçlü bir antitümör mekanizmasıdır [43]. Hücrelerin senesense girmesi, tümör oluşumuna karşı bir engel görevi görebilir ve bu nedenle prensipte herhangi bir antikanser tedavisi için arzu edilen bir sonucu oluşturabilir [44].

Aynı zamanda senesens, vücudun fizyolojik işlev bozukluğu olarak tanımlanır ve insan hastalıkları için önemli bir risk faktörüdür. Senesens sürecinde, radyasyona bağlı DNA hasarı, onkogenlerin aktivasyonu ve oksidatif stres gibi çeşitli dışsal ve içsel faktörlere yanıt olarak hücrel yaşlanma meydana gelir. Bu senesent hücreler birçok dokuda birikir ve apoptoza direnç, senesensle ilişkili salgı fenotipi üretimi, hücrel düzleşme ve hücrel hipertrofi gibi çeşitli fenotipler sergiler. Ayrıca mikro çevrede anormal işlev bozukluğuna neden olurlar ve komşu hücrelere zarar verirler, sonunda diyabet, kanser ve nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli kronik hastalıkların gelişiminde zararlı etkilere neden olurlar [45]. Son on yılda yayınlanan araştırmalar, paradoksal olarak belirli koşullar ve bağlamlarda, kalıcı olarak senesent habis ve habis olmayan hücrelerin pro-tümörijenik özellikler kazanabileceğini göstermiştir [44]. Uzun süreli senesens kanser gelişimine ve yaşa bağlı hastalıklara yol açabilir. Hücrel senesens, hücre döngüsünün durdurulmasını ve otokrin, parakrin ve endokrin aktivitelerle inflamatuvar sitokinlerin salınmasını içerir. Bağışıklık ve parankimal hücrelerin senesense uğraması, çeşitli hastalıkların ve metabolik bozuklukların gelişimine katkıda bulunur. Senolitik ve senomorfik ilaçlar, kök hücre terapileri ve diğer müdahaleler dahil olmak üzere yaşlanmayı hedefleyen tedavilerin, çeşitli hayvan modellerinde yaşam süresini uzattığı ve doku hasarını azalttığı gösterilmiştir. İlk klinik deneyler, senoterapötik yaklaşımların insan hastalıklarında faydalı olabileceğini doğrulamaktadır [42]. Senesent hücreler biriktiğinde, kronik, sistemik ve düşük dereceli bir iltihaplanma indüklenir. Buna karşılık, bu kronik bağışıklık sistemi aktivasyonu, senesent hücre klirensinin azalmasına neden olur ve böylece iltihaplanmayı besleyen bir kısır döngü oluşturur. Senesent hücre birikimi yaşa bağlı çeşitli patolojiler için nedensel bir faktörü temsil eder. Birkaç senesens özelliğinin hedeflenmesi, sağlık süresini ve muhtemelen yaşam süresini iyileştirmek için bir strateji olarak önerilmiştir [11]. Senesent hücrelerin, çoğunlukla

SASP'ın parakrin aktivitelerinden dolayı, çeşitli anatomik bölgelerde tümör oluşumunun çeşitli aşamalarına yol açtığına dair artan kanıtlar vardır [8]. Son çalışmalar, senesens ile ilişkili salgı fenotip indüksiyonunun, epitelyal-mezenkimal geçişin indüklenmesi ve tümör vaskülarizasyonunun teşvik edilmesi gibi patolojik süreçlerde rol oynadığını ortaya koymuştur [22]. Hücrel senesens, yaşlanma ve yaşa bağlı hastalık başlangıcında önemli bir rol oynar. Hücrel stres, DNA hasarı, telomer kısalması ve onkojen aktivasyonu dahil olmak üzere çeşitli uyarılarla uyarılabilen oldukça dinamik ve çok adımlı bir süreçtir. Bununla birlikte, senesent hücrelerin bir kısmı apoptoz direncine sahiptir ve kanserde nükse neden olabilir [43]. Senesens, organizma yaşlanmasının bir parçası olarak replikatif yaşlanmaya yanıt olarak somatik hücrelerde indüklenmeye ek olarak, onkojen hiperaktivasyonu veya tümör baskılayıcı disfonksiyon tarafından da zamanından önce tetiklenebilir. Sonuç olarak, senesent hücreler deri, ağız mukozası, nazofarenks, prostat, bağırsak ve akciğerdeki prekanseröz lezyonların ana bileşenini oluşturur. Ne yazık ki, invaziv müdahaleler, şu anda kanser ilerlemesi potansiyeli taşıyan premalign lezyonları yok etmek için kullanılan tek mevcut yaklaşımdır [46].

Sonuç olarak, senesent hücreler ve SASP, doğal veya sentetik bileşikler yoluyla ya senesent hücrelerin seçici olarak öldürülmesi ya da seçici SASP blokajı yoluyla potansiyel terapötik hedefler olarak görülür. Bu bileşikler, senolitikler ve senomorfikler olarak ikiye ayrılan senoterapötikler adı verilen bir ailenin üyeleridir. Bunların bazıları halihazırda klinik deneylerde olup, muhtemelen ateroskleroz, osteoartrit, osteoporoz, kanser, diyabet, Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, hepatik steatoz, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, idiyopatik pulmoner fibroz ve yaşa bağlı makula dejenerasyonu gibi hastalıklar da dahil yaşa bağlı patolojilerin gelecekteki tedavisini temsil etmektedir [11]. Senoterapötikler, kanseri etkili bir şekilde engellediği kanıtlanmış, yeni geliştirilmiş antikanser ajanlardır. Bunlar; miliusanlar, epigallocatechin gallate, phloretin, silybin, resveratrol, genistein, sulforaphane, kersetin, allicin, fisetin, piperlongumine, berberine, triptolide, tocotrienols ve kurkumin analoglarıdır. Bazıları klinik öncesi deneylerle doğrulanmıştır ve klinik için muazzam bir potansiyele sahiptir [8]. Senolitik olarak adlandırılan ilaç sınıfı, senesent hücreleri seçici olarak öldürür ve yok eder. Son yıllarda kersetin gibi doğal bileşiklerin senolitik ajanlar olarak etkili olduğu keşfedilmiştir. kersetin, güçlü antioksidan özelliklere ve proapoptotik etkilere sahip olan ve uzun yıllardır araştırılan bir fitokimyasaldır. Ek olarak, senolitik bir ajan olarak kullanım için büyük bir potansiyele sahiptir. Senolitik ajan araştırmasının prelinik ve erken faz klinik verilerine

göre, kersetin uygulamasının kanser oluşumunu önlemede veya hafifletmede etkili olduğu görülmektedir [43].

Kardiyometabolik bozukluklar, inflamatuvar durumlar, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser hayvan modellerinde yaşlanan hücreleri seçici olarak hedefleyen (yani senolitikler) veya senesensle ilişkili salgı fenotipini (yani senomorfikler) baskılayan farmasötik yaklaşımlar kullanarak hücre yaşlanması yükünün azaltılması büyük umut vaat etmektedir. Çalışmalar, senolitiklerin veya senomorfiklerin insanlarda biriken senesent hücrelerin sayısını azaltmada etkili olduğuna dair kanıt sağlasa da, bu tedavilerin kısa vadeli ve uzun vadeli yan etkileri büyük ölçüde bilinmemektedir [12].

Senoterapi bir *antiaging* stratejisidir. Senesent hücrelerin senolitik ajanlar tarafından seçici olarak öldürülmesi, senesent hücreleri ortadan kaldıran bağışıklık hücrelerinin aktivitesinin güçlendirilmesi veya SASP'ın hafifletilmesi anlamına gelir. Yaşla birlikte senesent hücreler biriktiğinden ve yaşa bağlı bozuklukların kökünde olduğu düşünüldüğünden, senoterapi sağlık süresinin iyileştirilmesinde çok umut verici görünmektedir. Transgenik farelerde senesent hücrelerin ölümünü seçici olarak indüklemeye izin veren genetik yaklaşımlar, senesent hücrelerin ortadan kaldırılmasının yaşa bağlı birçok hastalığın tedavisi için terapötik bir yaklaşım olabileceğine dair kavram kanıtı sağlamıştır. Bu sonuçları insanlara çevirmek, bu tür yararlı etkiler gösterebilen sentetik ve doğal bileşiklerin araştırılmasına dayanmaktadır. Alandaki en büyük zorluk, insanlarda senoterapinin etkinliğini, güvenliğini ve tolere edilebilirliğini göstermektir. Soru, bu terapötiklerin bölünmeyen post-mitotik hücrelerin yaşlanmasını nasıl etkileyebileceğidir. Başka bir konu, kanser yenilenmesinde sona erebilecek senesent hücre bölünmesinin yeniden başlaması riski olduğundan, tedavi sırasında indüklenen kanser hücrelerinin yaşlanmasıyla ilgilidir. Bu nedenle, etkili bir senoterapötik stratejinin geliştirilmesi de kanser tedavisinde acil bir konudur [47].

2.2.1. Senolitik ve senomorfikler

Senesent hücreler yaşam boyunca ortaya çıkabilir ve kalıcı olmaları halinde salgıladıkları birçok protein nedeniyle doku işlevi üzerinde zararlı etkileri olabilir. Buna paralel olarak, senesent hücreleri seçici olarak temizleyen küçük moleküllü senolitik ilaçların keşfi, insanlarda çok sayıda hastalığı ve yaşa bağlı durumu önlemek veya tedavi etmek için umut verici stratejilere yol açmıştır [48].

Senoterapötikler, senesens sürecini geciktiren, önleyen veya tersine çeviren bir ilaç ve doğal ürün sınıfıdır [49]. Senolitikler, senesent hücreleri seçici olarak ortadan kaldıran moleküller iken senomorfikler, spesifik SASP'a karşı inflamatuvar yanıtı modüle eder veya azaltır. Bu iki tür farmakolojik yaklaşımı tanımlayan fizikokimyasal, yapısal ve farmakolojik özellikler belirsizliğini koruduğu için istenen senoterapötik aktiviteyi sergilemesi muhtemel olan moleküllerin fizikokimyasal, yapısal ve farmakolojik özelliklerine dayalı olarak tanımlanması ve doğru seçimi, etkili, seçici ve güvenli senoterapiler geliştirmek için çok önemlidir [50]. Eski preklinik modeller, senesensi hedeflemenin sağlık süresini iyileştirmek için güçlü bir yaşlanma karşıtı strateji olduğunu ortaya koymuştur [51]. Senoterapötikler, yeni bir ilaç sınıfıdır. 2015'ten bu yana, birkaç senolitik, tanımlamadan klinik deneye geçmiştir. Klinik öncesi veriler, senolitiklerin çok sayıda organda hastalığı hafiflettiğini, fiziksel işlevi ve dayanıklılığı iyileştirdiğini ve yaşlılarda bile tüm ölüm nedenlerini engellediğini göstermektedir [52]. Senesent hücreler, DNA ve organellerde hasar birikmesine rağmen ölmelerini önleyen senesent hücre anti-apoptotik yollarını (SCAP'ler) yukarı regüle eder. Bu SCAP'ler ve senesent hücrelerde değiştirilen diğer yollar, senesent hücrelerin seçici hücre ölümüne neden olan, özellikle senolitikler olarak adlandırılan veya yaşlanma belirteçlerini, özellikle senomorfikler olarak adlandırılan SASP'ı baskılayan senoterapötik ilaçların geliştirilmesi için terapötik hedefleri temsil eder [53].

Dasatinib, kersetin ve fisetin gibi senesent hücrelerin apoptozunu indükleyen moleküller, hayvan modellerinde fayda sağlar ve yaşam süresini uzatır [54]. Senolitik bileşiklerin kullanımı da dahil olmak üzere senesent hücrelerin ortadan kaldırılmasına yönelik yaklaşımları belirlemek için büyük çabalar sarf edilmiştir. Bugüne kadarki en yerleşik senolitik tedavi, SRC kinaz ailesinin bir antagonisti olan dasatinib ve antioksidan kersetin kombinasyonudur. Bu kombinasyon, deneysel hayvan modellerinde hücre senesensini azaltır ve kronik bozuklukları iyileştirir. İnsanlarda sadece küçük ve kısa süreli çalışmalar yapılmış olmasına rağmen ciddi yan etkiler bildirilmemiştir [55]. Dasatinib ve kersetinin senolitik kombinasyonunun kullanıldığı ilk insan deneyleri, diyabetik böbrek hastalarının adipoz dokusunda senesent hücre yükünün azaldığını ve idiyopatik pulmoner fibrozlu hastalarda fiziksel fonksiyonun iyileştiğini göstermiştir. Flavonoid Fisetin ve BCL-xL inhibitörleri dahil olmak üzere diğer senolitiklerle yapılan klinik deneyler devam etmektedir. Preklinik ve erken klinik çalışmalardan elde edilen bu sonuçlar, senolitiklerin yaşa bağlı işlev bozukluğunu ve hastalıkları hafifletme potansiyelini göstermektedir [56].

Senesensi hedefleyen terapötikler, birçok dokuda ve hastalık durumunda metabolik işlev bozukluğunu tedavi etmek için önemli bir umut vaat etmektedir [57]. Senoterapötikler tarafından senesent hücrelerin uzaklaştırılması, hem klinik öncesi hem de klinikte temel senesens süreçlerinin etkilerini hafifletmede fayda göstermiştir, bu da senesent hücrelerin farmakolojik bir hedefi temsil ettiğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, senesent hücre popülasyonları biçim, işlev, doku dağılımı bakımından heterojendir ve hatta türler arasında farklılık göstermektedir [58].

2.3. Flotillinler

Lipid raft işaretleyici proteinler, flotillin-1 ve flotillin-2, ilk olarak akson rejenerasyonu sırasında akvaryum balığı retina ganglion hücrelerinde bulunmuştur. O zamandan beri çeşitli hücrelerde, özellikle hücre zarlarının iç yüzeyinde bulunmuşlar ve yalnızca protein-protein etkileşimleri için bir platform sağlamak üzere bir iskelet görevi görmeye kalmıyor, aynı zamanda sinyal iletimi, sinir rejenerasyonu, endositoz ve lenfosit aktivasyonu işlevlerini de yerine getiriyorlar [59].

2.3.1. Flotillin proteinlerinin fonksiyonları

Hücre zarları, hücrelerin ihtiyaç duyduğu işlevleri yerine getirmek üzere tasarlanmış muazzam bir lipid ve protein karmaşıklığı sergiler. Bu işlevleri koordine etmek için membran, bileşenlerini yatay olarak ayırabilir. Bu yetenek, dinamik sıvı-sıvı karışmazlığına dayanır ve membran alt bölümlendirmesinin 5 konseptinin temelini oluşturur. Lipid raftları, sfingolipid, kolesterol ve proteinlerin dalgalanan nano ölçekli düzenekleridir; bir araya gelerek stabilize edilebilen, membran sinyalleme ve iletimde işlev gören platformlar oluşturur [13]. Bu alanların, sinyalleşme ve membran iletimi gibi çeşitli hücresel olaylar için platform görevi gördüğü öne sürülmüştür. Ancak bu mikroalanlardaki lipidlerin dağılımı ve dinamikleri hakkında çok az şey bilinmektedir [60].

Reggie/Flotillin proteinleri, lipid raftlarının bileşenleri olarak kabul edilir ve genellikle lipid mikro alanları için işaretleyici proteinler olarak kullanılır [61]. Reggie-1 ve reggie-2 olarak da adlandırılan flotillin-2 ve flotillin-1, her yerde eksprese edilen ve yüksek oranda korunan proteinlerdir. Başlangıçta nöronal rejenerasyon proteinleri olarak tanımlandılar, ancak membran reseptör sinyalleme, endositoz, fagositoz ve hücre yapışması gibi çok çeşitli

hücrel işlemlerde işlev gördükleri görülmektedir. Flotilinler, raftlar olarak bilinen, kolesterol ve sfingolipidle zenginleştirilmiş membran mikro alanlarıyla ilişkilidir ve hatta bazı bulgular, onların kendi türde bir mikro alanı tanımladıklarını öne sürmektedir. Flotilinlerin membran birleşiminin mekanizması esas olarak açılasyona (miristilasyon ve/veya palmitoilasyon) dayanıyor gibi görünmektedir, flotilinleri membranların sitozolik tarafında lokalize ederken hiçbir transmembran alanı mevcut değildir. Ayrıca flotilinler birbirleriyle homo ve hetero oligomerler oluşturma yönünde güçlü bir eğilim gösterir [14]. Flotillin heterotetramerleri, plazma zarındaki kümelenmeyi ve çeşitli reseptörlerin aktivitesini düzenleyen moleküler yapı iskeleleri oluşturmak üzere büyük oligomerler halinde bir araya gelebilir [17].

Mevcut hipotezler, hücre duvarı sentetik proteinleri de dahil olmak üzere membran proteinlerinin komplekslerinin oluşumu için flotillin proteinlerinin gerekli olduğunu ileri sürmektedir [15]. Yapılan çalışmalar, insülin sinyali, T hücresi aktivasyonu, membran iletimi, fagositoz ve epidermal büyüme faktörü reseptör sinyali gibi çeşitli hücrel süreçlerde bir rolü olduğunu öne sürmüştür. Son bulgular ayrıca flotillin-1'in hücre hareketliliği ve dönüşümü ile ilişkili olduğunu da göstermektedir [16].

2.3.2. Flotillin proteinlerinin sekresyonla ilişkisi

Flotillin-1 ve flotillin-2 her yerde eksprese edilen, hücre sinyalleme, endositoz ve protein iletiminden gen ekspresyonuna kadar çok çeşitli hücrel olaylarda rol oynayan membranla ilişkili proteinlerdir [62]. Flotillin-1 ve flotillin-2, hücrel membranlarda kolesterol açısından zengin mikro alanlarda lokalize olan yüksek oranda korunmuş proteinlerdir [63]. Onkojenik sinyalleme de katkıda bulunurlar. Flotilinler, plazma membranının ve endomembranların sitozolik yaprakçığına bağlanır ve hetero-oligomerizasyon üzerine, membran-sitozol arayüzünde çoklu protein komplekslerinin birleştirilmesini kolaylaştıran iskele görevi görür. Son zamanlarda flotillin-1'e özgü ek işlevler keşfedildi. Flotilinlerin membrana bağlanması, S-palmitoilasyon ve N-miristilasyon, polipeptit zincirinin spesifik bölgelerini içeren hidrofobik etkileşimler ve bir dereceye kadar bunların oligomerizasyonu ile düzenlenir. Tüm bu faktörler, flotillinlere, raftlar adı verilen sfingolipid/kolesterol açısından zengin plazma membran alanları ile birleşme yeteneği kazandırır [62].

Flotilinler, çeşitli insan kanser türlerinin ortaya çıkması ve gelişmesiyle yakından ilişkilidir. Flotillin-1, meme kanserinde yüksek düzeyde eksprese edilir ve flotillin-1'in yüksek ekspresyon seviyesi, daha kötü hasta profili ile önemli ölçüde ilişkilidir [63]. Birçok invaziv karsinomda ve sarkomda flotilinler yukarı regüle edilir ve bu, kötü prognoz ve metastaz oluşumu ile ilişkilidir. Yukarı regüle edildiğinde, flotilinler plazma membranının invaginasyonunu teşvik eder ve flotilinlerin biriktiği geç endozomal bölmedeki kargo proteinlerinin hedeflenmesine izin veren bir endositik yolu indükler. Bu geç endozomlar parçalayıcı değildir ve protein yüklerinin geri dönüşümüne ve salgılanmasına katılırlar. Bu Yukarı Düzenlenmiş Flotillin Kaynaklı Kaçakçılık yolunun iletim, sinyalleme, yapışma ve hücre dışı matris yeniden yapılanmasında yer alan molekülleri içerir, böylece metastaz oluşumuna yol açan istilacı bir hücresel davranışın edinilmesini destekler. Bu nedenle, plazma zarından endozomal bölmeye kadar olan flotilinin varlığı aktiviteyi etkiler ve hatta anahtar protein kargolarının iletimini ve kaderini değiştirerek hastalıkların ve bazı tümörlerin gelişimini destekler [17].

Yapılan çalışmalar, Flotillin-1'in çeşitli kanser türlerinde aşırı ekspresyonunu bildirmiştir [64]. Flotillin-1, çeşitli malign karsinomların ilerlemesinde ve gelişmesinde önemli bir rol oynar ve metastazı teşvik etmek için çeşitli katı tümörlerin epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) sürecine dahil olur. Huang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; Flotillin-1'in mide kanserinde yukarı regüle edildiğini ve Flotillin-1'in yüksek ekspresyonunun daha kötü prognozla ilişkili olduğunu bulunmuştur. Mide kanseri hücrelerinin göç ve istila yeteneğinin, Flotillin-1'in aşırı ekspresyonuyla arttığı ve Flotillin-1'in yıkılmasının ise mide kanseri hücrelerinin metastazını engellediği anlaşılmıştır. Ayrıca EMT sürecinin önemli bir düzenleyicisidir ve EMT'yi indükleyerek mide kanseri hücrelerinin metastazını destekler [65].

2.4. Sitokin Sekresyonu

Sitokinlerin ve kemokinlerin hücrelerden salgılanması, vücuttaki yaralanma ve enfeksiyona karşı temel bir tepkidir. Sitokinler vücudun hücresel hasara veya istilacı patojenlere verdiği tepkiyi değiştirir ve çok çeşitli hücre tipleri tarafından salgılanır. Patojenik veya zararlı sinyallere yanıt olarak sitokin salgılayan ilk hücreler arasında, güçlü bağışıklık ve fizyolojik yanıtları başlatan epitelyal ve endotelyal hücreler yer alır. Bu hücreler doğuştan gelen çeşitli bağışıklık hücrelerine sinyal verir ve bunları yaralanma veya enfeksiyon bölgelerine çeker.

Epitel hücreleri, uygun inflamatuvar veya adaptif immün yanıtları oluşturmak için doğuştan gelen bağışıklık sistemiyle uyum içinde çalışır. Doğuştan gelen bağışıklık hücreleri önemli bir dizi sitokin üretir ve yaralanma veya enfeksiyona karşı bağışıklık tepkisini düzenler ve bunlar arasında makrofajlar/monositler, dendritik hücreler (DC'ler), doğal öldürücü (NK'lar) hücreler, mast hücreleri, eozinofiller ve nötrofiller bulunur. Bu hücreler toplu olarak, önemli bir dizi viral, bakteriyel ve parazitik patojenin fırsatçı istilasını kontrol ederek bağışıklıkta önemli bir rolü yerine getirir ve Toll benzeri reseptörler (TLR'ler) gibi kalıp tanıma reseptörleri (PRR'ler) dahil olmak üzere çeşitli reseptörler dizisi aracılığıyla patojenleri veya ürünlerini doğrudan tanıyabilir. Doğuştan gelen bağışıklık hücreleri, sitotoksik medyatörlerin üretimi yoluyla patojenlerle doğrudan savaşabilir ve birçok durumda bu, patojenlerin fagositoz ve hücre içi öldürülmesiyle birleştirilir [66].

Epitelyal ve doğuştan gelen bağışıklık hücreleri, çok sayıda proinflamatuvar ve immün düzenleyici sitokin ve kemokin salgılayarak bağışıklık sisteminin geri kalanını uyarma veya etkisiz hale getirme yeteneğine sahiptir. Doğuştan gelen bağışıklık hücreleri tarafından salınan en güçlü proinflamatuvar sitokinler ve kemokinlerden bazıları arasında tümör nekroz faktörü (TNF), interlökin (IL)-6, IL-1 β ve CCL5 yer alır. Bu hücrelerden sitokin salgılanması, diğer doğuştan gelen bağışıklık hücreleriyle çapraz iletişim için bir köprü görevi görür ve edinsel bağışıklık sistemi ile inflamasyonun amplifikasyonunu ve ilişkili antikor üretimi ve sitotoksik yanıtlarla birlikte T hücreleri ve B hücrelerinin genişlemesini düzenler. Son zamanlarda, membran füzyonu ve ekzositozu içeren klasik sekresyon için Golgi kompleksinden membrana bağlı organeller yoluyla sitokin salgılanmasının farklı adımlarına ilişkin doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinden daha fazla bilgi ortaya çıkmıştır. Sitokinler ayrıca klasik olmayan salgılarda moleküler taşıyıcılar gibi alternatif yollardan da salınabilir [66].

Çeşitli iletim yolları bireysel doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinde sitokinler için çoklu salgı yolları karakterize edilmiştir. Bu farklı yolların anahtar işlevi, sitokinlerin doku mikro ortamına hem uzaysal hem de zamansal olarak salınması üzerinde seçici kontrol sağlamak ve dolayısıyla kontrollü ve uygun bir bağışıklık veya fizyolojik tepkinin geliştirilmesini sağlamaktır [66].

Yeni bulgular çoğu sitokinin klasik sekresyon yoluyla salındığını göstermiştir. Bu salgılama biçiminde, sitokinler, salgı keseciklerinde veya granüllerde depolanmak üzere Golgide

paketlenebilir ve daha sonra yalnızca "düzenlenmiş ekzositoz" biçiminde reseptör aracılı salınım sırasında salgılanabilir veya endozomların ve küçük salgı keseciklerinin "yapısal ekzositoz" yoluyla geri dönüştürülmesi yoluyla sentezlenmeleri üzerine hızla salınabilirler. Yapıcı ekzositoz, nükleer DNA transkripsiyonu ve RNA translasyonunun reseptör uyarımı ile başlatılabilen veya başlatılamayan yeni sentezlenmiş protein yükünün trafiğini içerir. Salgı granülü, hücre tipine bağlı olarak değişen miktarda bulunan, hücre zarındaki reseptörler tarafından uyarıldığında salınmak üzere salgı proteinlerini tutan, zara bağlı hücre içi bir organel olarak tanımlanır. Lenfositler, DC ve NK hücreleri gibi hücreler, fagozomlarla veya hücre zarıyla kaynaşma ve lizozomal enzimleri serbest bırakma yeteneğine sahip salgılayıcı lizozomlar içerir. Eozinofillerdeki kristaloid granüller aynı zamanda salgı lizozomlarına da benzer olabilir, çünkü bunların lizozomal enzimler ve belirteçlerin ekspresyonu nedeniyle özelleşmiş primer lizozomlar olduğu düşünülür. Bazı durumlarda sitokinlerin salınımı, yapısal ekzositoz yoluyla immünolojik sinapslara veya fagositik kaplara doğru polarize olur. Çoğu sitokin, ER'de sentezlenmelerine ve paketlenmelerine izin veren bir sinyal dizisine sahiptir ve daha sonra depolanmaları veya anında salınmaları için hücrelerdeki belirli bölgelere taşınmak üzere küçük, membrana bağlı kesecikler aracılığıyla Golgi kompleksi boyunca yönlendirir. IL-1, IL-15, IL-18 ve makrofaj göçü önleyici faktör (MIF) gibi diğer birçok sitokin, sinyal dizisine sahip değildir. Bu salgı proteinleri, hücreden çıkmak için klasik ekzositotik yolu izlemezler ve farklı mekanizmalar tarafından salgılanırlar. Bunun aksine makrofajlar granül içermez. Salgı organellerinin morfolojik ve biyokimyasal analizine dayanan çalışmalar, makrofajların granül proteinleri depolamayan, bunun yerine içeriklerini sürekli olarak hücre yüzeyine aktaran lizozomla ilgili organel (LRO)'lara sahip olduğunu göstermiştir. Makrofajlar, bağışıklık tepkilerini başlatmak için bir dizi sitokin salgılanmasını geçici olarak düzenler [66].

Maya hücrelerinden memeli hücrelerine kadar hemen hemen tüm salgı hücrelerinde veziküller yoluyla protein alışverişi, Ras ile ilişkili guanosin trifosfataz (GTPazlar), Rab ve Rho proteinleri, aktin mikrotübül motorları, Lyst gibi lizozomal trafik molekülleri ve SNAP (çözünür NSF bağlanma proteini) reseptörleri (SNARE'ler) olarak bilinen hücre içi membran reseptörleri ailesi de dahil olmak üzere bir dizi moleküler aileye bağlıdır [66].

SNARE'ler, bitişik zarların füzyonuna izin vermek için birbirleriyle etkileşime giren hücre içi proteinlerdir ve sitokin ve granüllerin doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinden salınmasına yönelik yolların tanımlanmasında en bilgilendirici protein grubu oldukları

kanıtlanmıştır. SNARE hipotezi, donör membranındaki tek bir SNARE proteininin, hedef membranlardaki iki aynı kökenli SNARE'ye bağlanarak trans-SNARE kompleksi adı verilen dört sarmallı bir kompleks oluşturduğunu ileri sürer. "SNARE motifi" olarak adlandırılan merkezi sarmal alan, SNARE ailesinin üyeleri arasındaki SNARE-SNARE protein etkileşimi için bağlanma bölgesi görevi görür. SNARE ailesi, SNARE motiflerindeki merkezi fonksiyonel kalıntının arginin (R) veya glutamin (Q) olması temelinde R-SNARE'lere (genellikle keseciklerde) ve Q-SNARE'lere (genellikle hedef membranda) ayrılır [66].

Membran füzyonu meydana geldiğinde, R-SNARE'ler ve Q-SNARE'ler, vezikül ve hedef membranların birbirine yakın bir şekilde bir araya getirilmesine izin vermek için birbirine bağlanır. Füzyondan sonra trans-SNARE kompleksi hızla cis-SNARE kompleksine ayrıştırılır ve böylece bileşenlerin daha sonraki füzyon olayları için döngüye devam etmesine izin verilir. R-SNARE'lerin üyeleri vezikülle ilişkili membran proteinlerini (VAMP'ler) içerirken, Q-SNARE'ler sözdizimleri ve SNAP-25 protein ailesiyle ilişkilidir. Sec/Munc ve Rab proteinleri de dahil olmak üzere diğer birçok protein ailesi, SNARE bağlanmasını ve parçalanmasını düzenler. Ekzositozda, R-SNARE'ler genellikle vezikül veya granül membran ile ilişkilidir, oysa bunların aynı kökenli Q-SNARE'leri genellikle plazma membranının iç yaprakçığı üzerinde bulunur. Ekzositozda veziküler membranın hedef plazma membranıyla füzyonu, hücrenin veziküler ve granüler içeriğinin çoğunun hücre dışı ortama salınmasında temel bir rol oynar [66].

Epitel hücreleri, TLR'lerin viral, bakteriyel ve fungal ligandlar tarafından aktivasyonunu takiben immün yanıtların Th1, Th2 veya T düzenleyici hücreler lehine şekillendirilmesinde derin bir etkiye sahiptir. Bu hücreler, TNF ve IL-1 β dahil olmak üzere önemli miktarda sitokin ve kemokin salgılar ve TNF, kolonik epitel hücrelerinin lipid gövdelerinde tespit edilmiştir. Sitokinlerin epitelyal hücrelerden taşınmasının mekanizmaları henüz anlaşılamamıştır, ancak bunun yapısal ekzositotik yolları kullanması muhtemeldir ve epitelyal hücrelerde polarize protein alışverişinin farklı SNARE kümeleri gerektirdiği gösterilmiştir [66].

Ekzositoz, hücre içi sıvı dolu keseciklerin plazma zarı ile kaynaştığı, kesecik proteinlerini ve lipidleri plazma zarına dahil ettiği ve kesecik içeriklerini hücre dışı ortama bıraktığı süreçtir. Ekzositoz yapısal olarak meydana gelebilir veya sinir uçlarından nörotransmitter

salınımı gibi sıkı bir şekilde düzenlenebilir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, ekzositoz için gerekli olan çok çeşitli proteinlerin ve protein komplekslerinin tanımlanmasına tanık olmuştur ve plazma zarında zenginleştirilmiş lipid yığınlarının, kolesterolün ve sfingolipid açısından zengin mikro alanların, düzenlenmiş ekzositoz yollarında önemli bir rol oynadığını göstermektedir [67]. Lipid raftları çoğu hücre tipinin zarlarında bulunan mikro alanlardır. Kolesterol ve glikosfingolipidler açısından zengin olan bu membran mikro alanları, belirli sinyal iletimi ve membran iletim yollarının düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Lipid raftlarının nöroendokrin hücrelerde ekzositotik yolları organize etme olasılığını araştırmak için yapılan çalışmada, SNARE proteinlerinin lipid raftları ile etkileşiminin ekzositoz için önemli olduğunu ve salgı mekanizmasının yapısal ve mekansal organizasyonuna imkan verebileceğini göstermektedir [68]. SNARE'lerin lipid raftlarla ilişkisi, bu proteinlerin plazma zarının tanımlanmış bölgelerinde yoğunlaşmasını sağlar. Ayrıca, kolesterolün azalması düzenlenmiş ekzositozu inhibe eder, bu da lipid raft alanlarının ekzositozun düzenlenmesinde anahtar bir rol oynadığını gösterir [67]. SNAP25 ve SNAP23, çeşitli hücre tiplerinde düzenlenmiş ekzositoz için gerekli olan plazma membranı SNARE proteinleridir. Son zamanlarda yapılan birkaç çalışma, bu proteinlerin kısmen lipid raftlarında, sfingolipidlerle zenginleştirilmiş plazma zarı alanlarında ve kolesterolde lokalize olduğunu göstermiştir. Raftların SNARE fonksiyonunu ve ekzositozu düzenlediğine ve SNAP25/23'ün sistein açısından zengin merkezi bölgesini önemli bir düzenleyici alan olarak tanımladığına dair kanıt sağlar [69].

Lipid salları oldukça dinamiktir, deterjanlara dayanıklıdır ve hem kolesterol hem de glikosfingolipidlerle zenginleştirilmiştir. İki ana tipi vardır. Bunlar; flotilin açısından zengin düzlemsel lipid salları ve kaveolin açısından zengin kaveolalardır. Flotillin ve kaveolin proteinlerinin, ilgili lipid mikro alanları içindeki sinyal iletim proteinlerini bölümlere ayırarak ve bunlarla etkileşime girerek hücre iletişimini düzenlediği öne sürülmektedir. Sonuç olarak, membran salları migrasyon, invazyon ve sinyalleşme dahil hayati hücresel işlevlerde önemli bir rol oynar; Bu nedenle, mikro ortamlarındaki değişiklikler, hücresel işlevi ve davranışı etkileyen sinyal yollarını başlatabilir [70].

Sitokinler, karmaşık ağlar yoluyla bağışıklık ve inflamatuvar yanıtları denetleyen ve düzenleyen kritik araçlardır ve birçok hastalık için biyobelirteç olarak görev yapar. Sitokinlerin miktarının belirlenmesi, hem klinik tıpta hem de biyolojide önemli bir değere

sahiptir; çünkü seviyeleri fizyolojik ve patolojik süreçlere ilişkin bilgiler sağlar ve tanı ve tedaviye yardımcı olmak için kullanılabilir [71].

Kanser hücreleri, uygun bir tümör mikro-çevresi (TME) oluşturmak için çoğunlukla sitokinler, kemokinler veya büyüme faktörleri gibi çözünür faktörler aracılığıyla çevreleriyle iletişim kurar. Farklılaşmış ve progenitör hücrelerin heterojen bir popülasyonu olan TME, tümör gelişimi, büyümesi, istilası, metastazı ve tedavi direncinin düzenlenmesinde kritik bir rol oynar. Bu bağlamda, kanser hücrelerinden gelen sitokinler ve TME hücreleri birbirini etkileyerek tümör büyümesini ve metastazı artırabilen veya baskılayabilen inflamatuvar bir ortam ortaya çıkarır [18]. Tümör bölgesindeki kemokinler ve sitokinler tarafından yönlendirilen kronik inflamasyonun, anti-tümör bağışıklığını teşvik etmek yerine tümörün ilerlemesini kolaylaştırabileceği yönünde yeni bir paradigma yaygın olarak kabul görmektedir. Tümörler ve aktive edilmiş stromal hücreler, lökositleri tümöre toplamak için vasküler endotelyumun uyarılması yoluyla doğrudan veya dolaylı olarak etki eden proinflamatuvar kemokinler ve sitokinler salgılar. Aktivasyondan sonra, tümörle ilişkili bu lökositler, anjiyogenik faktörleri, mitojenleri, proteolitik enzimleri ve kemotaktik faktörleri serbest bırakır, daha fazla inflamatuvar hücre toplar ve tümör büyümesini sürdürmek ve tümör metastazını kolaylaştırmak için anjiyogenezi uyarır. Sitokinler, kemokinler ve diğer inflamatuvar medyatörler gibi hedefleri tek başına veya daha gerçekçi bir şekilde anti-anjiyogenik veya sitotoksik ajanlar gibi diğer tedavilerle kombinasyon halinde inhibe ederek bu döngüyü kırmak, malignitelerin tedavisi için oldukça etkili terapötik rejimler sağlayabilir [72].

Kanser tedavisi için inflamatuvar mikro ortamın modüle edilmesi söz konusu olduğunda, inflamatuvar sitokinler en etkili hedeflerdir [73]. Tümör hücreleri ve tümör mikro ortamı tarafından salgılanan proinflamatuvar sitokinler, anjiyogenezi ve metastazı indükler ve tümör büyümesini teşvik eder [74]. Sitokinler, hücreler arası iletişimde aracı olarak görev yapan, hücreler tarafından üretilen proteinlerdir [75]. Sitokinler, bağışıklık tepkilerinin başlatılmasında, sürdürülmesinde ve çözülmesinde önemli rol oynayan salgılanan sinyal proteinleridir [76]. Sitokinler, çeşitli uyaranlara yanıt olarak salgılanan ve insan fizyolojisi ve hastalığının birçok yönünü düzenlemek için yerel olarak hareket eden güçlü immün düzenleyici proteinlerin bir sınıfıdır [77].

Son zamanlardaki birçok rapor, tümörlerdeki kontrolsüz sitokin ekspresyonunun, tümör büyümesine, tümör ilerlemesine ve immün baskılamaya, konakçı anti-tümör tepkisinde olağan işlevlerini aşan aktivitelere katkıda bulunduğunu göstermektedir. Ayrıca kanser duyarlılığı ve şiddetinin sitokin genlerindeki fonksiyonel polimorfizmlerle ilişkili olduğu görülmektedir [75]. Sitokinler kanserin başlatılmasında, ilerlemesinde ve ortadan kaldırılmasında önemli roller oynar ve bu nedenle rekombinant sitokinlerin kanseri tedavi etmek için kullanımıyla ilişkili uzun bir klinik geçmiş vardır [77]. Ancak terapötik dozların yüksek toksisitesi ve kemoterapiyle kombinasyon halinde bile düşük etkinliği nedeniyle bu strateji genellikle kabul edilmez. Öte yandan, sitokin genleriyle modifiye edilmiş hücrelerin kullanıldığı kanser gen terapisi yaklaşımları, umut verici yeni bir yaklaşımı temsil ediyor gibi görünmektedir. Son on yılda, sitokin geniyle modifiye edilmiş hücrelere dayalı farklı tedavileri değerlendiren çok sayıda Faz I ve II klinik çalışma yürütülmüştür. İlk çalışmalarda, çeşitli stratejilerin klinik sonuçları iyileştirdiği ve güçlü antitümör immün tepkilerini tetiklediği gösterilmiştir. Son zamanlarda, belirli kanser immünojen tedavi stratejilerinin etkinliğini nihai olarak belirlemek amacıyla birkaç prospektif, randomize, Faz III klinik çalışma başlatılmıştır [78].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Flotillin-1 (D2V7J) Rabbit mAb (Cell Signaling Technology)

Flotillin-2 (C42A3) Rabbit mAb (Cell Signaling Technology)

Anti-rabbit Antikoru (Pierce 3135)

DMEM (1X) (Gibco)

Human IL-6 ELISA Kit (Invitrogen)

BSA (Gibco)

PBS (Gibco)

Penisilin/Streptomisin Antibiyotik (Capricorn Scientific)

FBS (Fetal Bovine Serum) (Gibco)

DAPI (Invitrogen)

Akrilamid/Bisakrilamid (Invitrogen)

TEMED (Invitrogen)

APS (Santa Cruz Biotechnology)

Protein Miktar Tayini Kiti (Thermo Scientific)

Süt tozu (Serva)

Tween 20 (Amresco)

SDS (Merck)

Tris Baz (Santa Cruz Biotechnology)

NaCl (Merck)

Bütanol (Merck)

Sükroz (Merck)

Bromofenol mavisi (Merck)

β -merkapttoetanol (Sigma)

Glisin (Multicell)

Metanol (Isolab)

Doksorubisin hidroklorid (Tocris, 2252)

FLOT-1 siRNA (Thermo)

FLOT-2 siRNA (Thermo)

Hedeflenmemiş siRNA (Thermo)

ECL görüntüleme çözeltisi (Advansta, K-12045-D50)

Transfer membran filtresi PVDF 0.45 µm Immobilon-P (Merck, IPVH00010)
Alfa tubulin antikoru (Santa Cruz, sc-25778)

3.2. Kullanılan Aletler

Isıtıcı ve Karıştırıcı (Falc)
Vorteks (Daihan Scientific)
Hassas terazi (Shimadzu)
Santrifüj (Nüve NF800R)
Su banyosu (Nüve BM 402)
Laminar akımlı sınıf II kabin (Sanyo),
CO₂'li İnkübatör (Sanyo)
Holografik Görüntüleme Sistemi (HoloMonitor M4)
Plaka okuyucu (SpectraMax i3x)
Faz Kontrast-Floresan Mikroskop (Leica)
Görüntüleme Cihazı (Azure Biosystems) western
İnkübatör ve shaker (JSR)
Güç kaynağı (Bio-Rad)
Mini spin (Scilogex)
pH metre (XS Instruments)
Western Tankı (Bio Rad)
Western Tankı (Invitrogen)
Kemilüminesan görüntüleme sistemi (SynGene)
Mikropipet seti (Brand Transferpette)
Mikroskop Kamerası (Leica DFC 420C)
Sonikatörlü Homojenizatör (SONICS)

3.3. Yöntem

3.3.1. Hücre kültürü ve senesensin indüksiyonu

Senesens gelişimini ve sekretuar aktivitesini değerlendireceğimiz deneylerde HeLa (insan serviks kanser hücre dizisi, Şap enstitüsünden temin edildi) hücreleri kullanıldı. Hücreler %10 serum, %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM'li besiyerinde hücre kültürü

flasklarına ekildi. Hücreler, 37°C’de %5 CO₂ içeren inkübatörde tutundukları alanı %70-80 oranında kaplayıncaya kadar iki günde bir besiyeri değişimi yapılarak çoğaltıldı ve daha sonra pasajlandı. Pasajlama işlemi sırasında, laminar akımlı kabin altında %70-80 konfluensiye ulaşmış hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldı ve 37°C sıcaklıktaki izotonik fosfat tamponu (PBS) ile bir kez yıkandı. Daha sonra 37°C sıcaklıktaki %0,05’lik Tripsin-EDTA solüsyonu ilave edildi ve 2 dk inkübe edildi. Hücrelerin zeminden ayrıldığı mikroskop ile doğrulandıktan sonra 7-8 ml besiyeri ilave edildi ve flask içeriği steril falkona aktarıldı. 10 dk 400 x g 25°C’de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Pellet pasajlama için gereken hacimde besiyeri ile resüspande edildi ve deney planına uygun olarak kültür flasklarına bölündü.

Senesensi indüklemek için; kültür flasklarına ekilen hücelere 72 saat boyunca 300 nM doksorubisin uygulanarak senesens indüksiyonu gerçekleştirildi [79]. İlaç inkübasyonundan sonra senesens oluşumu SA-β Gal boyaması ile doğrulandı [80].

3.3.2. Flotillin-1 ve Flotillin-2 *knockdown*

HeLa hücrelerinde flotillin-1 ve flotillin-2 proteinlerine özgü siRNA’lar uygulanarak ilgili proteinlerin ekspresyonları baskılandı. Hücreler antibiyotik içermeyen besiyerinde flask yüzeyini %60-80 kaplayıncaya kadar inkübatörde bekletildi. Daha sonra hücreler uygun transfeksiyon çözeltisi (lipofektamin 3000) ile karıştırılan –siRNA ve +siRNA (flotillin-1 ve flotillin-2) (final konsantrasyonu 30 pmol) ile 24 saat boyunca inkübe edildi. *Knockdown* işleminin doğrulanması için bu hücrelerde ilgili protein ekspresyonları western blotlama ile değerlendirildi.

3.3.3. Western-blot yöntemi

Knockdown işlemlerinin doğrulanması amacıyla flotillin-1 ve flotillin-2 protein ekspresyonlarının değerlendirilmesi için western blotlama tekniği kullanıldı. Yöntemde yükleme kontrolü olarak tubulin proteini kullanıldı. İlgili proteinlerin antikor dilüsyonları kullanım kılavuzlarındaki oranlar dikkate alınarak kendi deneysel koşullarımızda optimize edilerek seçildi. *Knockdown* inkübasyonları sonrasında hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler 2 kez soğuk PBS ile yıkandı. Hücreler soğukta PBS içerisinde kazınarak tüplere alındı ve tüpler 10 dk 4100 rpm +4°C’de santrifüj edildi. Hücreler, ultrasonik

homojenizatörde homojenizasyon tamponu ile homojenize edildikten sonra 10400 rpm’de ($\sim 10000 \times g$) 10dk $+4^{\circ}\text{C}$ ’de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatantlar (hücre lizatları) ependorflara bölünüp bisinkoninik asit yöntemi ile protein miktar tayininde kullanıldı. Protein miktar tayini için kullanılan kitin albumin standartları 2mg-1mg-0,5mg-0,25mg-0,125mg olarak seyreltildi. 96’lık plate’e standartlar ve örneklerimiz 4’er μl yüklendi. Herbir çukura Reagent A+ Reagent B (50:1 oranında) karıştırılarak elde edilen çözelti herbir çukura 150’er μl eklendi. Daha sonra yarım saat shaker özellikli inkübatörde inkübe edildi. SpectraMax ABS Plus cihazında SoftMax Pro 7.1.2 programı ile 562 nm’deki absorbans değerleri ölçüldü. Böylelikle kitin içindeki konsantrasyon değerleri bilinen standartlara göre örneklerin konsantrasyonları hesaplandı. Protein miktar tayini yapılan hücre lizatları 4:1 oranında Laemmli çözeltisi ile karıştırıldı, 100°C ’de 5dk kaynatıldı, sonra buz üzerine alındı. Örnekler hesaplanan miktarlarda SDS-poliakrilamid jellere yüklendi ve 2 saat 120 v’da elektroforez işlemine tabii tutuldu. Daha sonra jeldeki proteinler 16 saat boyunca 120 mA’de $+4^{\circ}\text{C}$ ’de PVDF membrana transfer edildi. Transfer işlemi sonrasında membran %5’lik süt tozu çözeltisi ile oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 1 saat bloklandı. 3 kez 5’er dakika TBS-T çözeltisiyle yıkandı. Daha sonra membran 16 saat ilgili proteinlerin primer antikorları (flotillin-1, flotillin-2, alfa tübülün) 1:1000 oranında %3’lük BSA’da seyreltilerek oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 2 saat boyunca muamele edildi ve 3 kez 5’er dakika TBS-T çözeltisiyle yıkandı. HRP-konjuge ikincil antikorlar (anti-rabbit) 1:2000 oranında %3’lük BSA’da seyreltilerek 2 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon işlemlerinden sonra membranlar kemilüminesans özellikteki çözeltiyle (ECL) muamele edildi ve kemilüminesans görüntüleme cihazı kullanılarak western blot sonuçları elde edildi. Bant dansiteleri *image j* programı aracılığıyla hesaplandı.

3.3.4. SA- β -Gal boyaması

Hücresel senesensin en yaygın kullanılan belirteci Senesens-ilişkili beta galaktozidaz boyamasıdır. Hücresel senesensin doğrulanması için kullanılacak olan bu deneyler “Senescence β -galactosidase staining kit” kullanım talimatlarına göre gerçekleştirildi. Hücre kültürü flasklarının yüzeyini %40-50 kaplayan hücrelere doksorubisin ve / veya lipit raft depleasyonu uygulandı ve 72 saat sonra hücrelerin morfolojileri incelenerek SA-beta gal boyamasına geçildi. Bunun için öncelikle besiyeri uzaklaştırılan hücreler 37°C sıcaklıktaki PBS ile bir kez yıkandı ve üzerine kit içinde bulunan Fiksasyon Solüsyonu ilave edildi. Hücreler, 10-15 dakika oda sıcaklığında fikse olduktan sonra iki kez 37°C sıcaklıktaki PBS

ile yıkandı. Daha sonra kit içerisindeki β -Galaktozidaz Boyama Solüsyonu (pH=6.0) ilave edildi ve 37°C'lik CO₂ içermeyen kuru inkübatörde yaklaşık 16 saat (gece boyunca) inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün β -Galaktozidaz Boyama Solüsyonu uzaklaştırılmadan hücrelerde mavi renk oluşumu ışık mikroskobu altında incelendi ve hücrelerin hem ışık mikroskobu hem de faz kontrast görüntüleri kamera yardımıyla kaydedildi. SA- β -gal pozitif hücre (Mavi renk ile boyanmış hücre) sayısı toplam hücre sayısına oranlanarak “% SA- β -gal pozitif hücre sayısı” hesaplandı.

3.3.5. SASP'ın eldesi

Yirmi dört saatlik Flotillin-1 ve Flotillin-2 siRNA uygulamaları sonrasında 72 saatlik 300 nM doksorubisin uygulaması gerçekleştirildi. Daha sonra hücreler iki kez 37°C sıcaklıktaki PBS ile yıkandı ve hücrelerin besiyeri serum içermeyen besiyeri ile değiştirildi. 48 saat serumsuz besiyerinde bekleyen hücrelerin üzerindeki serumsuz besiyeri toplandı (SASP) ve tüpler 10 dk 800 x g'de +4°C'de santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant 0.22 μ m'lik steril filtrelerden geçirildi ve böylece SASP elde edildi [79]. Ayrıca sekretomu toplanan hücreler tripsinize edilerek hücre kültür flasklarından toplandı ve hücre sayım cihazı kullanılarak hücre sayıları belirlendi. Böylece sekretomların kaç hücreden sekrete edildiği belirlendi. Sekretom çalışmasında kontrol gruplarıyla (senesent olmayan hücreler) karşılaştırmalı bir analiz yapılacağından, eşit hücre sayısından sekrete edilen sekretom elde edilmelidir. Bu amaçla, çok sayıda hücre içeren gruplardan toplanan sekretom serumsuz besiyeri kullanılarak hücre sayısına göre normalize edildi. SASP gelişimi IL-6 ölçümü ile değerlendirildi [81].

3.3.6. Sekretomda IL-6 ölçümü

Hücre sayısına göre normalize edilmiş sekretomlarda IL-6 ölçümü için insan IL-6 elisa kiti kullanıldı. -20 °C'de buzdolabından çıkardığımız sekretomların oda sıcaklığında erimesi beklenildi. Kit içerisindeki 96'lık plakadaki çukurlara 70 μ l hücre sekretomu eklendi. Daha sonra 35 μ l biotin konjugat solüsyonu eklendi. Çalkalayıcı üzerinde 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Plakanın içindeki sıvı tamamen boşaltıldıktan sonra 4 kez kit içerisindeki yıkama solüsyonu ile yıkandı. Herbir çukura 100 μ l Streptavidin-HRP karışımı eklendi. Çalkalayıcı üzerinde 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Çukurların içindeki sıvı uzaklaştırıldıktan sonra yıkama solüsyonu ile 4 kez yıkandı. Daha sonra herbir çukura 100

µl TMB substratı eklendi ve mavi renk oluştu. 30 dk karanlıkta inkübe edildi. Herbir çukura 100 µl reaksiyon durdurucu solüsyon eklendi ve mavi renk sarı renge dönüştü. Daha sonra 450 nm'deki absorpsiyon değerleri SpectraMax i3x cihazında ölçüldü.

3.3.7. Faz kontrast mikroskopisi

Leica DMİ8 mikroskobu ve Leica Application Suite X 3.7.2.22383 programı kullanılarak ilaç uygulanan senesent kanser hücrelerinde ve kontrol gruplarında meydana gelen morfolojik değişiklikler incelendi ve fotoğraflandı.

3.3.8. Holografik mikroskopi

Doksorubisin ile indüklenen senesent hücre morfolojisinde lipit raft deplesyonunun (lipit raft proteinlerinin *knockdown* 'u ile) olası etkilerinin hücre alanı, hücre hacmi, hücre kalınlığı gibi çeşitli morfolojik parametreler yönünden değerlendirilmiştir. Bu morfolojik parametreler holografik mikroskop ile 3D olarak değerlendirilmiştir. HeLa hücrelerinde, senesent hücre morfolojisi ve bu morfoloji üzerinde lipit raft deplesyonunun olası faz kontrast mikroskobu ve holografik mikroskop ile değerlendirildi. Lipit raft deplesyonu sırasında 72 saatlik 300 nM doksorubisin inkübasyonu sonrasında tüm grupların faz kontrast ve holografik görüntüleri çekilmiştir. Holografik mikroskop (HOLOMONITOR M4) kullanılarak elde edilen üç boyutlu görüntülerden cihazın yazılımı kullanılarak; hücre alanı, hücre hacmi, maksimum hücre kalınlığı ve ortalama hücre kalınlığı olmak üzere 4 parametre incelenmiştir.

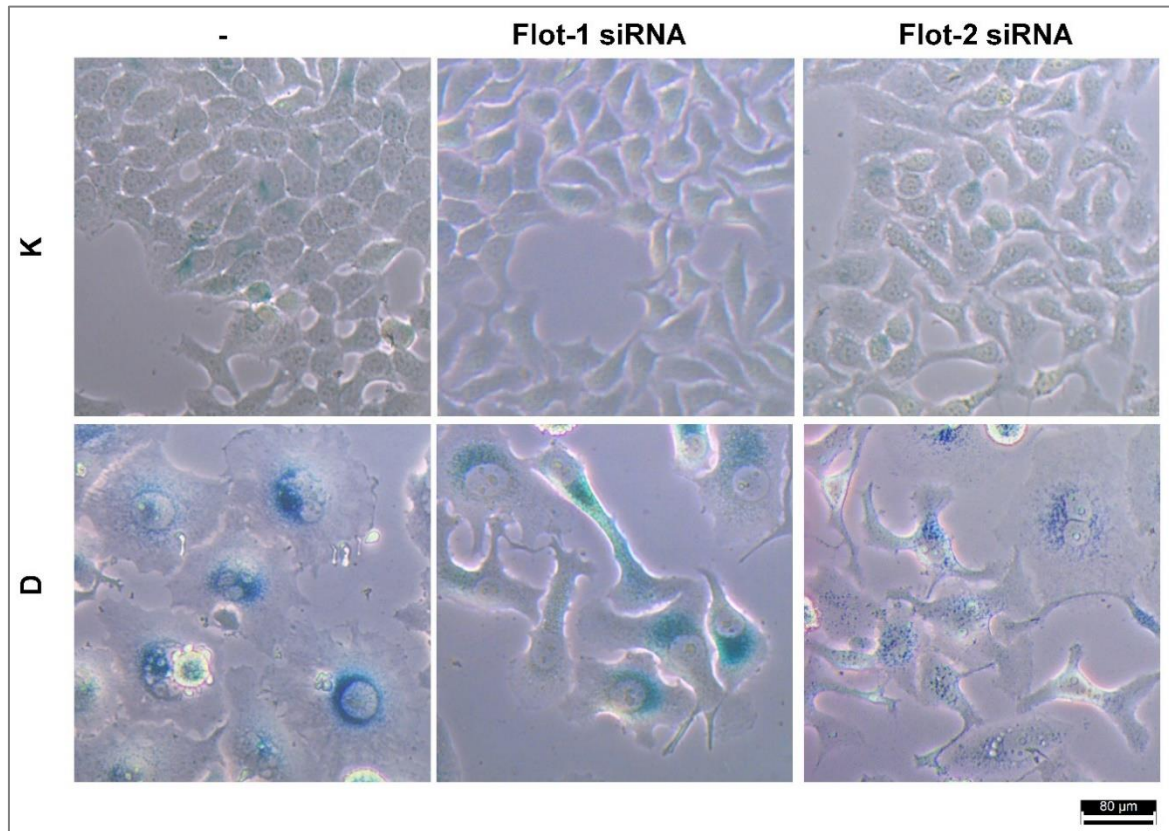
3.4. İstatistiksel Analiz

Bütün istatistiksel analizler çoklu karşılaştırmalar olduğu için analizlerin tamamında tek-yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post hoc test olarak Tukey kullanıldı. 0,05'ten küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

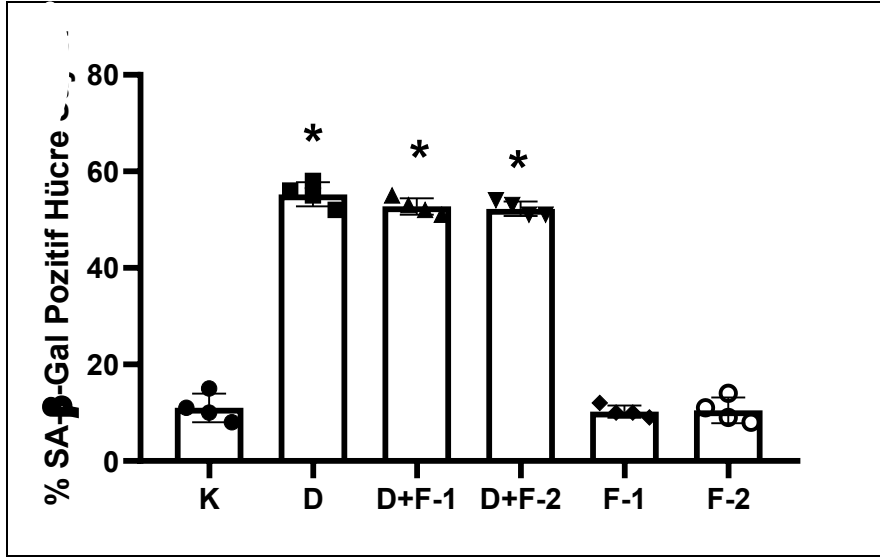
4. BULGULAR

Flotillin-1, Flotillin-2 proteinlerine özgü siRNA'lar kullanılarak bu proteinlerin *knockdown*'u gerçekleştirilmiştir. Sonrasında bu hücrelere daha önce senesensi indüklediği bilinen 300nM doksorubisin uygulanmıştır [79]. Böylece HeLa hücresinde doksorubisin ile senesent indüksiyonu gerçekleştirilmiştir ve lipid raft deplesyonunun (lipid raft proteinlerinin *knockdown*'u ile) senesens gelişimini etkileyip etkilemediği SA- β -Gal boyaması ile değerlendirilmiştir [80].

Verilerimiz doksorubisin ile HeLa hücrelerinde SA- β -Gal pozitif hücre sayısının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığını göstermektedir (Resim 4.1-Şekil 4.1). Buna ek olarak lipid raft deplesyonu (lipid raft proteinlerinin *knockdown*'u ile) doksorubisin ile artan SA- β -Gal pozitif hücre sayısını değiştirmemiştir. Bu verilerimiz senesens oluşumunda lipid raftlarının bir rolünün olmadığını göstermektedir (Resim 4.1-Şekil 4.1).

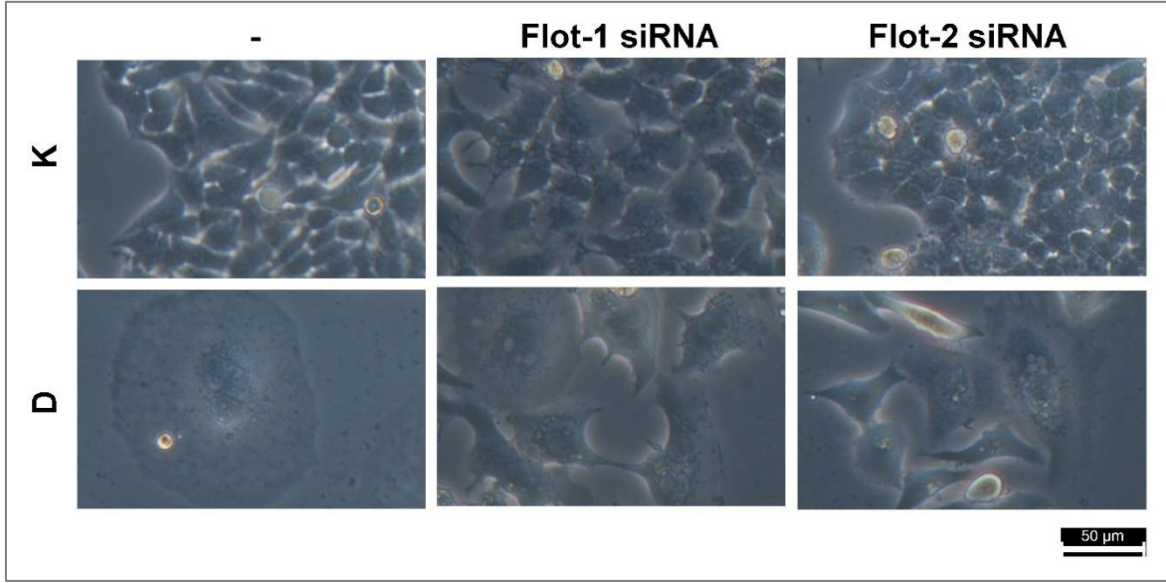


Resim 4.1. HeLa hücrelerinde doksorubisin ile indüklenen senesens gelişiminde lipid raft deplesyonunun olası etkisinin değerlendirildiği SA- β -Gal boyaması görüntüleri. K: kontrol, D: 300 nM Doksorubisin, Flot-1: Flotillin-1, Flot-2: Flotillin-2. Skala:80 μ m.

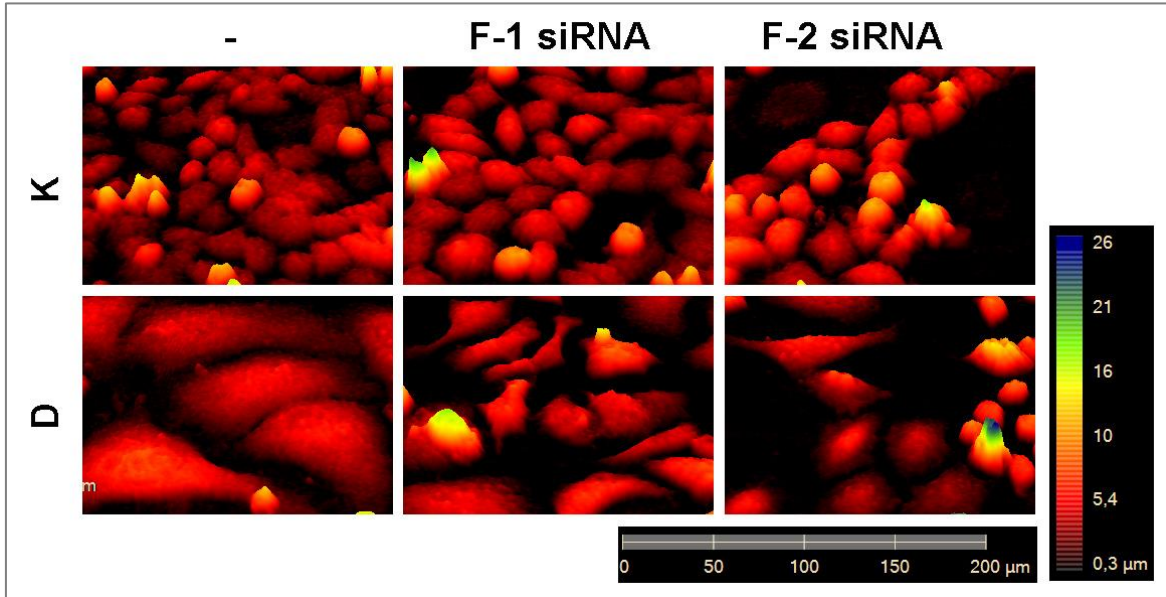


Şekil 4.1. % SA-β-Gal pozitif hücre yüzdesinin istatistiksel analizi. HeLa hücrelerinde dokсорubisin ile indüklenen senesens gelişiminde lipit raft depleksyonunun olası etkisinin değerlendirildiği % SA-β-Gal pozitif hücre yüzdesinin istatistiksel analizi. *:kontrol grubundan anlamlı farklılığı, ifade etmektedir (one-way ANOVA, Tukey, $p < 0,05$, $n=4$). K: Kontrol, D: 300 nM Dokсорubisin. F-1: Flotillin-1, F-2: Flotillin-2.

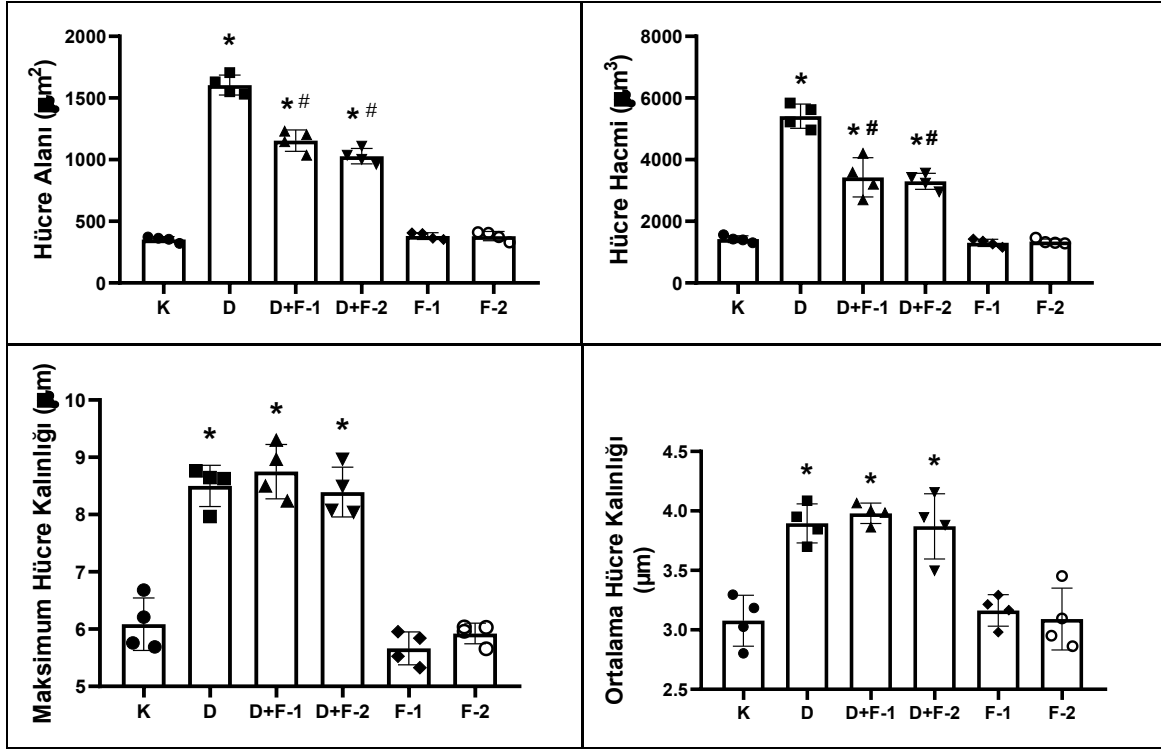
Diğer bir çalışmada ise dokсорubisin ile indüklenen senesent hücre morfolojisinde lipit raft depleksyonunun (lipit raft proteinlerinin *knockdown*'u ile) olası etkilerinin hücre alanı, hücre hacmi, hücre kalınlığı gibi çeşitli morfolojik parametreler yönünden değerlendirilmiştir. Bu morfolojik parametreler hem faz kontrast mikroskop ile 2D (Resim 4.2), hem de holografik mikroskop ile 3D (Resim 4.3, Şekil 4.2) olarak değerlendirilmiştir. HeLa hücrelerinde, senesent hücre morfolojisi ve bu morfoloji üzerinde lipit raft depleksyonunun olası faz kontrast mikroskobu ve holografik mikroskop ile değerlendirildi. Lipit raft depleksyonu sonrasında 72 saatlik 300 nM dokсорubisin inkübasyonu sonrasında tüm grupların faz kontrast ve holografik görüntüleri çekilmiştir (Resim 4.2-4.3). Holografik mikroskop (HOLOMONITOR M4) kullanılarak elde edilen üç boyutlu görüntülerden cihazın yazılımı kullanılarak; hücre alanı, hücre hacmi, maksimum hücre kalınlığı ve ortalama hücre kalınlığı olmak üzere 4 parametre incelenmiştir. Verilerimiz HeLa hücrelerinde dokсорubisin ile indüklenen artmış senesent hücre alanı ve hücre hacminin bütün lipit raft proteinlerinin depleksyonu ile de azaldığını göstermektedir. Ayrıca dokсорubisin ile indüklenen senesent hücrelerde ortalama kalınlığın ve maksimum kalınlığın arttığı ve bu artışın lipit raft proteinlerinin depleksyonu ile değişmediği gözlemlenmiştir (Şekil 4.2).



Resim 4.2. HeLa hücrelerinde dokсорubisin ve/veya lipid deplesyonu sonrası faz kontrast mikroskobu görüntüleri. K: kontrol, D: 300 nM Dokсорubisin. Flot-1: Flotillin-1, Flot-2: Flotillin-2. Skala:50 μm .

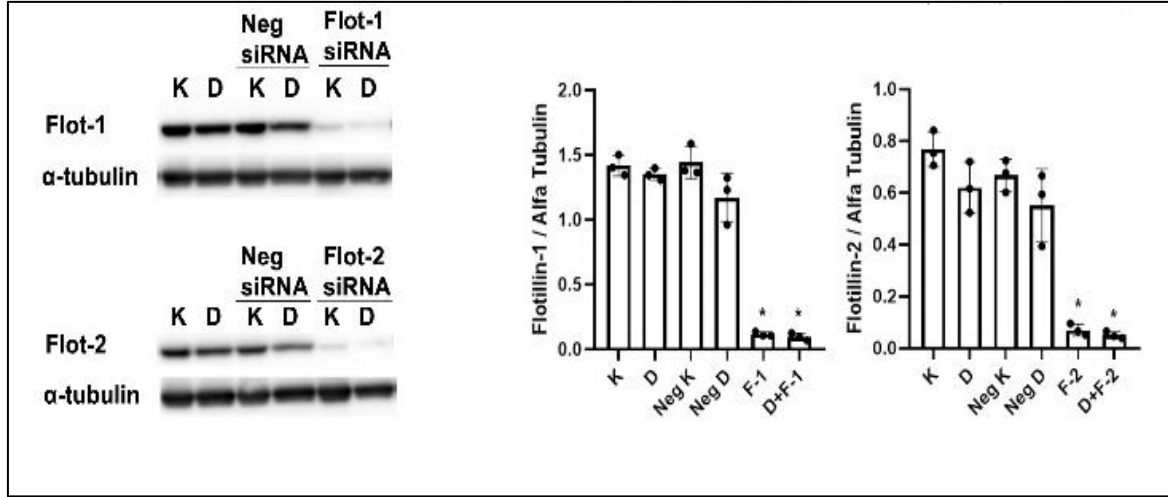


Resim 4.3. HeLa hücrelerinde dokсорubisin ve/veya lipid deplesyonu sonrası holografik görüntüleri. K: kontrol, D: 300 nM Dokсорubisin. F-1: Flotillin-1, F-2: Flotillin-2.



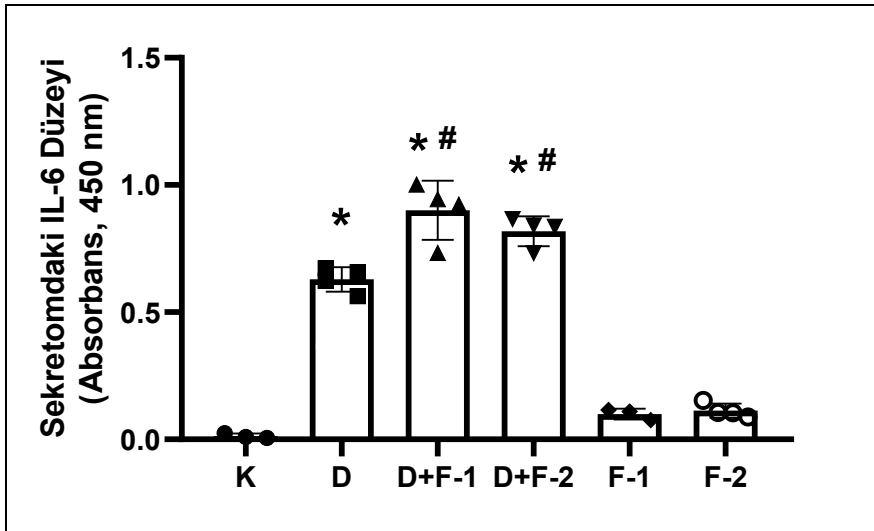
Şekil 4.2. HeLa hücrelerinde holografik görüntülerden elde edilen morfolojik parametrelerin istatistiksel analizi. *: kontrol grubundan anlamlı farklılığı, #: dokсорubisin grubundan anlamlı farklılığı ifade etmektedir (one-way ANOVA, Tukey, $p < 0,05$, $n=4$). K: Kontrol, D: 300 nM Dokсорubisin, F-1: Flotillin-1, F-2: Flotillin-2.

Lipit raft deplesyonunun doğrulanması için ilgili proteinlerin ekspresyonları western blotlama ile doğrulanmıştır. Kaveolar-olmayan lipit raftlarına özgü olan Flotillin-1, Flotillin-2 proteinlerine özgü siRNA'lar 30 pmol olarak HeLa hücrelerine uygulanmış ve deney sonrasında hücreler homojenize edilerek western blotlama tekniği kullanılmıştır. Çalışmamızda eş zamanlı olarak hedeflenmemiş (*non-target*) siRNA kullanılmış ve bu grup negatif kontrol grubu olarak verilerimizde yer almaktadır. Her bir proteinin deneysel koşullarımızda *knockdown* olduğu görülmektedir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. HeLa hücre hattında siRNA uygulamalarının western blot yöntemi ile doğrulanması. A. Western blot bantları. B. İstatistiksel Analiz. *: kontrol grubundan anlamlı farklılığı ifade etmektedir (one-way ANOVA, Tukey, $p < 0,05$, $n = 3$). K: Kontrol, D: 300 nM Dokсорubisin. Flot-1: Flotillin-1, Flot-2: Flotillin-2.

HeLa hücrelerinde yapılan IL-6 ölçüm sonuçları lipit raft proteinlerinin (Flotillin-1, Flotillin-2) depleksiyonunun senesent hücrelerden sekrete edilen IL-6 düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırdığını göstermektedir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Hela hücrelerinden elde edilen sekretomlardaki IL-6 düzeylerinin istatistiksel analizi. *: kontrol grubu #: dokсорubisin grubundan anlamlı farklılığı ifade etmektedir (one-way ANOVA, Tukey, $p < 0,05$, $n = 4$). K: Kontrol, D: 300 nM Dokсорubisin. F-1: Flotillin-1, F-2: Flotillin-2.

5. TARTIŞMA

Hücrel senesens, kalıcı bir hücre döngüsü durması sonucunda ortaya çıkan ve SASP olarak adlandırılan biyoaktif bir sekretomun üretimi gibi derin fenotipik değişiklikleri tetikleyen bir stres tepkisidir. Akut senesens indüksiyonu kansere karşı koruma sağlar ve fibrozisi sınırlar, ancak kalıcı olarak senesent hala gelmiş hücreler yaşa bağlı bozukluklara neden olur. Bu nedenle, senesensi geciktirmek ve işlev bozukluklarını sınırlamak için senesent hücreleri hedef alan ve "senoterapi" olarak bilinen uygulama önem kazanmaktadır [30]. Senoterapötikler, senesens sürecini geciktiren, önleyen veya tersine çeviren senolitikler ile SASP'ı inhibe eden senomorfiklerden oluşur [49]. Senesent hücrelerin tümör teşvik edici ve kemotoksisite teşvik edici fonksiyonlarının çoğunluğunun SASP ile nedensel olarak ilişkili görüldüğü göz önüne alındığında, senomorfik SASP inhibitörleri, senolitiklere etkili alternatifler olarak kullanılabilir, böylece özellikle kanser hücresi senesensi bağlamında SASP'a bağımlı pro-immünojenik fonksiyonların azalmasını sağlayabilir. Ancak SASP inhibitörleri uzun süreli uygulama gerektirebilir çünkü etkilerinin çoğu ilacın kesilmesiyle ortadan kalkacaktır. NF- κ B aracılı sinyalleşme, SASP'ın proinflamatuvar rolünün ana düzenleyicisidir [44]. Senomorfik ilaçlar; NF- κ B'nin aktivitesi bloke edilerek [82], translayon düzeyinde proinflamatuvar SASP'yi baskılayarak [83], mTOR aktivasyonunu zayıflatarak çeşitli SASP faktörlerinin ekspresyonuna müdahale edilerek [84], P38 yolunun inhibitörleriyle SASP'ın baskılanarak [85], JAK sinyal yolunun inhibe edilerek [86], IL-1 β 'yi inhibe eden antikorlarla [87] ve CDK4/6 inhibe edilmek suretiyle [88] etki göstermektedirler.

Senesent hücre morfolojisi senesent hücrelerin en belirgin özelliklerinden biridir. Yapılan çalışmalar bu morfolojinin senesent hücreler için fonksiyonel öneme sahip olabileceğine işaret etmektedir. Şimay Demir ve arkadaşları hücre aktin iskeletinin düzenlenmesinde rol alan Rho/Rho kinaz yolağının inhibisyonunun/siRNA ile baskılanmasının doksorubisin ile indüklenen senesent hücre morfolojini değiştirdiğini göstermişlerdir. Bu çalışmada ayrıca morfolojik değişikliğin bir sonucu olarak da doksorubisin ile indüklenen SASP'ın baskılandığı gösterilmiştir [79].

Patojenik veya zararlı sinyallere yanıt olarak sitokin salgılayan ilk hücreler arasında, güçlü bağışıklık ve fizyolojik yanıtları başlatan epitelyal ve endotelyal hücreler yer alır. Bu hücreler doğuştan gelen çeşitli bağışıklık hücrelerine sinyal verir ve bunları yaralanma veya

enfeksiyon bölgelerine çeker. Sitokinlerin epitelyal hücrelerden taşınmasının mekanizmaları henüz anlaşılamamıştır, ancak bunun yapısal ekzositotik yolları kullanması muhtemeldir ve epitelyal hücrelerde polarize protein alışverişinin farklı SNARE kümeleri gerektirdiği gösterilmiştir [66]. Son zamanlarda yapılan birkaç çalışma, bu proteinlerin kısmen lipit raftlarında, sfingolipidlerle zenginleştirilmiş plazma zarı alanlarında ve kolesterolde lokalize olduğunu göstermiştir. Raftların SNARE fonksiyonunu ve ekzositozu düzenlediğine ve SNAP25/23'ün sistein açısından zengin merkezi bölgesini önemli bir düzenleyici alan olarak tanımladığına dair kanıt sağlar [69].

PC12, 3T3-L1 adipositler, RBL mast hücreleri, HeLa hücreleri ve beyin sinaptozomları gibi birçok hücre tipinde SNARE proteinlerinin özellikle lipit raftlarında lokalize olduğu ve lipit raft proteinleri ile doğrudan etkileşim içerisinde oldukları gösterilmiştir [89-96]. Bu çalışmalar lipit raft bütünlüğünün konstitütif ekzositoz için önemli olduğunu ortaya çıkarmakla birlikte, SASP'ın düzenlenmesinde lipit raftlarını hedef haline getirmektedir. Lipit raftları ile hücre sekresyon mekanizması arasındaki ilişkiyi değerlendiren çalışmalar incelendiğinde; MBCD veya lovastatin ile kolesterol deplesyonu sonucunda PC12 hücrelerindeki (rat adrenal medullasından elde edilen bir feokromastoma hücresi) ekzositozun azaldığı ve bu nedenle lipit raftlarının ekzositozun düzenlenmesinde önemli rol oynadığı belirlenmiştir [93, 94]. Sıçan beyin sinaptozomları üzerinde yapılan bir çalışmada ise, kalsiyum bağımlı glutamat salınımının MBCD uygulamasıyla güçlü bir şekilde azaldığı gösterilmiştir [95], diğer bir çalışmada ise makrofajlarda MBCD uygulamasının sitokin sekresyonunu azalttığı gösterilmiştir [96].

Bu tez kapsamında elde ettiğimiz veriler flotillin-1 ve flotillin-2 proteinlerinin doksorubisin ile indüklenen senesens gelişimini değiştirmede, ancak senesent hücre morfolojisini baskıladığını göstermiştir. Senesent hücre morfolojisinin fonksiyonel öneme sahip olması ve literatürde flotillinlerin sitokin sekresyonunda rol alması durumu bir arada düşünüldüğünde Flotillin proteinlerinin senomorfik etki için bir hedef olabileceği ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle Flotillin ekspresyonu baskılanmış gruplarda SASP miktarları sekreтомda IL-6 ölçümü ile değerlendirilmiştir. Bu verilerimiz ise Flotillin proteinlerinin baskılanması ile SASP'ın istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde arttığını göstermiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Flotillin-1 ve Flotillin-2 proteinlerinin knockdown'u sonrasında doksorubisin uygulanarak senesens hale getirilmiş ve lipit raft deplesyonunun senesens gelişimini etkileyip etkilemediği SA- β -gal boyaması ile değerlendirilmiştir. Sonuçlarımız doksorubisin uygulanmış HeLa hücrelerinde artan SA- β -Gal pozitif hücre sayısının lipit raft deplesyonu ile değişmediğini, dolayısıyla senesens oluşumunda lipit raftlarının bir etkisinin olmadığını göstermektedir.

Diğer çalışmamızda; doksorubisin ile indüklenen senesent HeLa hücre morfolojisinde lipit raft deplesyonunun hücre morfolojisi üzerindeki etkileri faz kontrast mikroskopi ile 2D ve holografik mikroskop ile 3D olarak değerlendirilmiştir. Doksorubisin ile indüklenen senesent hücrelerde senesent hücre alanı ve hücre hacminin arttığı, ortalama kalınlığın ve maksimum kalınlığın arttığı; lipit raft deplesyonu ile hücre alanı ve hücre hacminin azaldığı, ortalama kalınlığın ve maksimum kalınlığın değişmediği gözlenmiştir.

Lipit raft deplesyonu doğrulanması için western blotlama tekniği kullanılarak yapılan çalışmamızda, protein ekspresyonlarının siRNA uygulamasıyla baskılandığı anlaşılmıştır.

HeLa hücrelerinde ve doksorubisin uygulanmış hücrelerinde lipit raft deplesyonu ile IL-6 ölçümü gerçekleştirilen çalışmamızda ise; kontrol grubuna göre senesent hücrelerde IL-6 artmıştır. Aynı zamanda lipit raft deplesyonu da senesent hücrelerde IL-6 düzeyini artırmıştır.

Sonuç olarak yaptığımız çalışmalarımızda; Doksorubisinle indüklenen senesent HeLa hücrelerinde Flotillin-1 ve Flotillin-2 lipit raft proteinlerinin ekspresyonlarının baskılanması hücrenin bazı morfolojik özelliklerinde değişikliklere neden olduğu, IL-6 düzeylerinin artırdığı, SA- β -Gal pozitif hücre sayısını değiştirmedeği görülmüştür.

Bu tez kapsamında elde ettiğimiz bulgular, yeni senomorfik ilaç keşfi açısından flotillin-1 ve flotillin-2 proteinlerinin bir hedef olabileceğine işaret etmektedir. Bu nedenle, ileri çalışmalar ile Flotillin proteinlerinin SASP'ı artırmasının altında yatan mekanizmanın aydınlatılması ve bu proteinleri hedefleyen yeni ilaç adaylarının senomorfik etkinliklerinin değerlendirilmesi önemli olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Van Deursen, J. M. (2014). The role of senescent cells in ageing. *Nature*, 509(7501), 439-446.
2. Childs, B. G., Gluscevic, M., Baker, D. J., Laberge, R. M., Marquess, D., Dananberg, J., and Van Deursen, J. M. (2017). Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(10), 718-735.
3. Grosse, L., Wagner, N., Emelyanov, A., Molina, C., Lacas-Gervais, S., Wagner, K. D., and Bulavin, D. V. (2020). Defined p16^{High} senescent cell types are indispensable for mouse healthspan. *Cell Metabolism*, 32(1), 87-99.
4. Biran, A., Zada, L., Abou Karam, P., Vadai, E., Roitman, L., Ovadya, Y., Porat, Z., and Krizhanovsky, V. (2017). Quantitative identification of senescent cells in aging and disease. *Aging Cell*, 16(4), 661-671.
5. Cuollo, L., Antonangeli, F., Santoni, A., and Soriani, A. (2020). The senescence-associated secretory phenotype (SASP) in the challenging future of cancer therapy and age-related diseases. *Biology*, 9(12), 485.
6. Ohtani, N. (2022). The roles and mechanisms of senescence-associated secretory phenotype (SASP): can it be controlled by senolysis? *Inflammation and Regeneration*, 42(1), 11.
7. Lopes-Paciencia, S., Saint-Germain, E., Rowell, M. C., Ruiz, A. F., Kalegari, P., and Ferbeyre, G. (2019). The senescence-associated secretory phenotype and its regulation. *Cytokine*, 117, 15-22.
8. Al Mamun, A., Sufian, M. A., Uddin, M. S., Sumsuzzman, D. M., Jeandet, P., Islam, M. S., Zhang, H. J., Kong, A. N., and Sarwar, M. S. (2022). Exploring the role of senescence inducers and senotherapeutics as targets for anticancer natural products. *European Journal of Pharmacology*, 928, 174991.
9. Liao, C., Xiao, Y., and Liu, L. (2020). The dynamic process and its dual effects on tumors of therapy-induced senescence. *Cancer Management and Research*, 12, 13553-13566.
10. Lewińska, A., Przybylski, P., Adamczyk-Grochala, J., Błoniarz, D., Litwinienko, G., and Wnuk, M. (2022). Senolysis-based elimination of chemotherapy-induced senescent breast cancer cells by quercetin derivative with blocked hydroxy groups. *Cancers*, 14(3), 605.
11. Lagoumtzi, S. M., and Chondrogianni, N. (2021). Senolytics and senomorphics: Natural and synthetic therapeutics in the treatment of aging and chronic diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, 171, 169-190.
12. Raffaele, M., and Vinciguerra, M. (2022). The costs and benefits of senotherapeutics for human health. *The Lancet Healthy Longevity*, 3(1), 67-77.

13. Lingwood, D., and Simons, K. (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, 327(5961), 46-50.
14. Banning, A., Tomasovic, A., and Tikkanen, R. (2011). Functional aspects of membrane association of reggie/flotillin proteins. *Current Protein and Peptide Science*, 12(8), 725-735.
15. Zielińska, A., Savietto, A., de Sousa Borges, A., Martinez, D., Berbon, M., Roelofsen, J. R., Hartman, A. M., de Boer, R. der Klei, I. J. V., Hirsch, A. K. H., Habenstein, B., Bramkamp, M., and Scheffers, D. J. (2020). Flotillin-mediated membrane fluidity controls peptidoglycan synthesis and MreB movement. *Elife*, 9, 57179.
16. Babuke, T., and Tikkanen, R. (2007). Dissecting the molecular function of reggie/flotillin proteins. *European Journal of Cell Biology*, 86(9), 525-532.
17. Gauthier-Rouvière, C., Bodin, S., Comunale, F., and Planchon, D. (2020). Flotillin membrane domains in cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 39, 361-374.
18. Braumüller, H., Mauerer, B., Andris, J., Berlin, C., Wieder, T., and Kesselring, R. (2022). The cytokine network in colorectal cancer: Implications for new treatment strategies. *Cells*, 12(1), 138.
19. Mehralizadeh, H., Nazari, A., Oruji, F., Roostaie, M., Hosseiniozari, G., Yazdani, O., Esbati, R., and Roudini, K. (2023). Cytokine sustained delivery for cancer therapy; special focus on stem cell-and biomaterial-based delivery methods. *Pathology-Research and Practice*, 247, 154528.
20. Maddaly, R., Subramaniyan, A., and Balasubramanian, H. (2017). Cancer cytokines and the relevance of 3D cultures for studying those implicated in human cancers. *Journal of Cellular Biochemistry*, 118(9), 2544-2558.
21. Giri, B., Dixit, V. D., Ghosh, M. C., Collins, G. D., Khan, I. U., Madara, K., ... & Taub, D. D. (2007). CXCL12-induced partitioning of flotillin-1 with lipid rafts plays a role in CXCR4 function. *European Journal of Immunology*, 37(8), 2104-2116.
22. Özdemir, A., Demir, Y. D. Ş., Yeşilyurt, Z. E., and Ark, M. (2023). Senescent cells and SASP in cancer microenvironment: New approaches in cancer therapy. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 133, 115-158.
23. Regulski, M. J. (2017). Cellular senescence: what, why, and how. *Wounds: A Compendium of Clinical Research and Practice*, 29(6), 168-174.
24. Calcinotto, A., Kohli, J., Zagato, E., Pellegrini, L., Demaria, M., and Alimonti, A. (2019). Cellular senescence: aging, cancer, and injury. *Physiological Reviews*, 99(2), 1047-1078.
25. Hernandez-Segura, A., Nehme, J., & Demaria, M. (2018). Hallmarks of cellular senescence. *Trends in Cell Biology*, 28(6), 436-453.
26. Yang, N., and Sen, P. (2018). The senescent cell epigenome. *Aging*, 10(11), 3590-3609.

27. Behmoaras, J., and Gil, J. (2020). Similarities and interplay between senescent cells and macrophages. *Journal of Cell Biology*, 220(2), 202010162.
28. Salama, R., Sadaie, M., Hoare, M., and Narita, M. (2014). Cellular senescence and its effector programs. *Genes & Development*, 28(2), 99-114.
29. Roger, L., Tomas, F., and Gire, V. (2021). Mechanisms and regulation of cellular senescence. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 13173.
30. Birch, J., and Gil, J. (2020). Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. *Genes & Development*, 34(23-24), 1565-1576.
31. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2023). Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell*, 186(2), 243-278.
32. Sánchez-Díaz, L., Espinosa-Sánchez, A., Blanco, J. R., and Carnero, A. (2022). Senotherapeutics in Cancer and HIV. *Cells*, 11(7), 1222.
33. Demaria, M., O'Leary, M. N., Chang, J., Shao, L., Liu, S. U., Alimirah, F., Koenig, K., Le, C., Mitin, N., Deal, A. M., Alston, S., Academia, E. C., Kilmarx, S., Valdovinos, A., Wang, B., de Bruin, A., Kennedy, B. K., Melov, S., Zhou, D., Sharpless, N. E., Muss, H., and Campisi, J. (2017). Cellular senescence promotes adverse effects of chemotherapy and cancer relapse. *Cancer Discovery*, 7(2), 165-176.
34. Shamooin, L., Espitia-Corredor, J. A., Dongil, P., Menéndez-Ribes, M., Romero, A., Valencia, I., Díaz-Araya, G., Sánchez-Ferrer, C. F., and Peiró, C. (2022). Resolvin E1 attenuates doxorubicin-induced endothelial senescence by modulating NLRP3 inflammasome activation. *Biochemical Pharmacology*, 201, 115078.
35. Zanotti, S., Decaestecker, B., Vanhauwaert, S., De Wilde, B., De Vos, W. H., and Speleman, F. (2022). Cellular senescence in neuroblastoma. *British Journal of Cancer*, 126(11), 1529-1538.
36. Morales-Valencia, J., Lau, L., Martí-Nin, T., Ozerdem, U., & David, G. (2022). Therapy-induced senescence promotes breast cancer cells plasticity by inducing Lipocalin-2 expression. *Oncogene*, 41(38), 4361-4370.
37. Liu, P., Lu, Z., Wu, Y., Shang, D., Zhao, Z., Shen, Y., Zhang, Y., Zhu, F., Liu, H., and Tu, Z. (2019). Cellular senescence-inducing small molecules for cancer treatment. Current cancer drug targets, 19(2), 109-119.
38. Du, D., Tang, X., Li, Y., Gao, Y., Chen, R., Chen, Q., Wen, J., Wu, T., Zhang, Y., Lu, H., Zhang, J. and Wang, S. (2022). Senotherapy protects against cisplatin-induced ovarian injury by removing senescent cells and alleviating DNA damage. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 9144644.
39. Seara, F. A., Kasai-Brunswick, T. H., Nascimento, J. H., and Campos-de-Carvalho, A. C. (2022). Anthracycline-induced cardiotoxicity and cell senescence: new therapeutic option?. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79(11), 568.
40. Pardella, E., Pranzini, E., Nesi, I., Parri, M., Spatafora, P., Torre, E., Muccilli, A., Castiglione, F., Fambrini, M., Sorbi, F., Cirri, P., Caselli, A., Puhr, M., Klocker, H.,

- Serni, S. Rauei, G., Magherini, F., and Taddei, M. L. (2022). Therapy-induced stromal senescence promoting aggressiveness of prostate and ovarian cancer. *Cells*, 11(24), 4026.
41. Myrianthopoulos, V., Evangelou, K., Vasileiou, P. V., Cooks, T., Vassilakopoulos, T. P., Pangalis, G. A., Kouloukoussa, M., Kittas, C., Georgakilas, A. G., and Gorgoulis, V. G. (2019). Senescence and senotherapeutics: a new field in cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, 193, 31-49.
 42. Huang, W., Hickson, L. J., Eirin, A., Kirkland, J. L., and Lerman, L. O. (2022). Cellular senescence: the good, the bad and the unknown. *Nature Reviews Nephrology*, 18(10), 611-627.
 43. Gökbilen, S. Ö., Becer, E., and Vatansever, H. S. (2022). Senescence-mediated anticancer effects of quercetin. *Nutrition Research*, 104, 82-90.
 44. Schmitt, C. A., Wang, B., and Demaria, M. (2022). Senescence and cancer—role and therapeutic opportunities. *Nature reviews Clinical Oncology*, 19(10), 619-636.
 45. Park, J., and Shin, D. W. (2022). Senotherapeutics and their molecular mechanism for improving aging. *Biomolecules & Therapeutics*, 30(6), 490-500.
 46. Saleh, T., and Carpenter, V. J. (2021). Potential use of senolytics for pharmacological targeting of precancerous lesions. *Molecular Pharmacology*, 100(6), 580-587.
 47. Sikora, E., Bielak-Zmijewska, A., and Mosieniak, G. (2019). Targeting normal and cancer senescent cells as a strategy of senotherapy. *Ageing Research Reviews*, 55, 100941.
 48. Chaib, S., Tchkonja, T., and Kirkland, J. L. (2022). Cellular senescence and senolytics: the path to the clinic. *Nature Medicine*, 28(8), 1556-1568.
 49. Luís, C., Maduro, A. T., Pereira, P., Mendes, J. J., Soares, R., and Ramalho, R. (2022). Nutritional senolytics and senomorphics: Implications to immune cells metabolism and aging—from theory to practice. *Frontiers in Nutrition*, 9, 958563.
 50. Olascoaga-Del Angel, K. S., Gutierrez, H., Königsberg, M., Pérez-Villanueva, J., and López-Diazguerrero, N. E. (2022). Exploring the fuzzy border between senolytics and senomorphics with chemoinformatics and systems pharmacology. *Biogerontology*, 23(4), 453-471.
 51. Farr, J. N., and Khosla, S. (2019). Cellular senescence in bone. *Bone*, 121, 121-133.
 52. Robbins, P. D., Jurk, D., Khosla, S., Kirkland, J. L., LeBrasseur, N. K., Miller, J. D., Passos, J. F., Pignolo, R. J., Tchkonja, T., and Niedernhofer, L. J. (2021). Senolytic drugs: reducing senescent cell viability to extend health span. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 61, 779-803.
 53. Zhang, L., Pitcher, L. E., Prahalad, V., Niedernhofer, L. J., and Robbins, P. D. (2023). Targeting cellular senescence with senotherapeutics: senolytics and senomorphics. *The Febs Journal*, 290(5), 1362-1383.

54. Martel, J., Ojcius, D. M., Wu, C. Y., Peng, H. H., Voisin, L., Perfettini, J. L., Ko, Y. F., and Young, J. D. (2020). Emerging use of senolytics and senomorphics against aging and chronic diseases. *Medicinal Research Reviews*, 40(6), 2114-2131.
55. Smith, U., Li, Q., Rydén, M., and Spalding, K. L. (2021). Cellular senescence and its role in white adipose tissue. *International Journal of Obesity*, 45(5), 934-943.
56. Gerdes, E. O. W., Misra, A., Netto, J. M. E., Tchkonja, T., and Kirkland, J. L. (2021). Strategies for late phase preclinical and early clinical trials of senolytics. *Mechanisms of Ageing and Development*, 200, 111591.
57. Palmer, A. K., Tchkonja, T., and Kirkland, J. L. (2022). Targeting cellular senescence in metabolic disease. *Molecular Metabolism*, 66, 101601.
58. Gasek, N. S., Kuchel, G. A., Kirkland, J. L., and Xu, M. (2021). Strategies for targeting senescent cells in human disease. *Nature Aging*, 1(10), 870-879.
59. Liu, X. X., Liu, W. D., Wang, L., Zhu, B., Shi, X., Peng, Z. X., Zhu, H. C., Liu, X. D., Zhong, M. Z., Xie, D., Zeng, M. S., and Ren, C. P. (2018). Roles of flotillins in tumors. *Journal of Zhejiang University Science. B*, 19(3), 171-182.
60. Ishitsuka, R., Sato, S. B., and Kobayashi, T. (2005). Imaging lipid rafts. *Journal of Biochemistry*, 137(3), 249-254.
61. Langhorst, M. F., Reuter, A., and Stuermer, C. A. O. (2005). Scaffolding microdomains and beyond: the function of reggie/flotillin proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 2228-2240.
62. Kwiatkowska, K., Matveichuk, O. V., Fronk, J., and Ciesielska, A. (2020). Flotillins: at the intersection of protein S-palmitoylation and lipid-mediated signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2283.
63. Gomes, L., Sorgine, M., Passos, C. L. A., Ferreira, C., de Andrade, I. R., Silva, J. L., Atella, G. C., Mermelstein, C. S., and Fialho, E. (2019). Increase in fatty acids and flotillins upon resveratrol treatment of human breast cancer cells. *Scientific Reports*, 9(1), 13960.
64. Wei, J., Wang, R., Lu, Y., He, S., and Ding, Y. (2022). Flotillin-1 promotes progression and dampens chemosensitivity to cisplatin in gastric cancer via ERK and AKT signaling pathways. *European Journal of Pharmacology*, 916, 174631.
65. Huang, Y., Guo, Y., Xu, Y., Liu, F., and Dai, S. (2022). Flotillin-1 promotes EMT of gastric cancer via stabilizing Snail. *PeerJ*, 10, 13901.
66. Stanley, A. C., and Lacy, P. (2010). Pathways for cytokine secretion. *Physiology*, 25(4), 218-229.
67. Salaün, C., James, D. J., and Chamberlain, L. H. (2004). Lipid rafts and the regulation of exocytosis. *Traffic*, 5(4), 255-264.

68. Chamberlain, L. H., Burgoyne, R. D., and Gould, G. W. (2001). SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(10), 5619-5624.
69. Salaün, C., Gould, G. W., and Chamberlain, L. H. (2005). Lipid raft association of SNARE proteins regulates exocytosis in PC12 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(20), 19449-19453.
70. McGuinn, K. P., and Mahoney, M. G. (2014). Lipid rafts and detergent-resistant membranes in epithelial keratinocytes. *Epidermal Cells: Methods and Protocols*, 1195, 133-144.
71. Liu, C., Chu, D., Kalantar-Zadeh, K., George, J., Young, H. A., and Liu, G. (2021). Cytokines: from clinical significance to quantification. *Advanced Science*, 8(15), 2004433.
72. Yan, L., Anderson, G. M., DeWitte, M., and Nakada, M. T. (2006). Therapeutic potential of cytokine and chemokine antagonists in cancer therapy. *European Journal of Cancer*, 42(6), 793-802.
73. Lan, T., Chen, L., and Wei, X. (2021). Inflammatory cytokines in cancer: comprehensive understanding and clinical progress in gene therapy. *Cells*, 10(1), 100.
74. Atretkhany, K. S. N., and Drutskaya, M. S. (2016). Myeloid-derived suppressor cells and proinflammatory cytokines as targets for cancer therapy. *Biochemistry (Moscow)*, 81, 1274-1283.
75. Yoo, S. Y., Lee, S. Y., and Yoo, N. C. (2009). Cytokine expression and cancer detection. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 15(3), 49-56.
76. Saxton, R. A., Glassman, C. R., and Garcia, K. C. (2023). Emerging principles of cytokine pharmacology and therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 22(1), 21-37.
77. Holder, P. G., Lim, S. A., Huang, C. S., Sharma, P., Dagdas, Y. S., Bulutoglu, B., and Sockolosky, J. T. (2022). Engineering interferons and interleukins for cancer immunotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 182, 114112.
78. Wysocki, P. J., Karczewska-Dzionk, A., Mackiewicz-Wysocka, M., and Mackiewicz, A. (2004). Human cancer gene therapy with cytokine gene-modified cells. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 4(10), 1595-1607.
79. Demir, Y. D. Ş., Özdemir, A., Sucularlı, C., Benhür, E., and Ark, M. (2021). The implication of ROCK 2 as a potential senotherapeutic target via the suppression of the harmful effects of the SASP: Do senescent cancer cells really engulf the other cells? *Cellular signalling*, 84, 110007.
80. Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J. D., Campisi, J., and Toussaint, O. (2009). Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nature Protocols*, 4(12), 1798-1806.

81. Rodier, F. (2013). Detection of the senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Cell Senescence: Methods and Protocols*, 965, 165-173.
82. Moiseeva, O., Deschênes-Simard, X., St-Germain, E., Igelmann, S., Huot, G., Cadar, A. E., Bourdeau, V., Pollak, M. N., and Ferbeyre, G. (2013). Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF- κ B activation. *Aging Cell*, 12(3), 489-498.
83. Laberge, R. M., Sun, Y. U., Orjalo, A. V., Patil, C. K., Freund, A., Zhou, L., Curran, S. C., Davalos, A. R., Wilson-Edell, K. A., Liu, S., Limbad, C., Demaria, M., Li, P., Hubbard, G. B., Ikeno, Y., Javors, M., Desprez, P. Y., Benz, C. C., Kapahi, P., Nelson, P. S., and Campisi, J. (2015). MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nature Cell Biology*, 17(8), 1049-1061.
84. van Vliet, T., Varela-Eirin, M., Wang, B., Borghesan, M., Brandenburg, S. M., Franzin, R., Evangelou, K., Seelen, M., Gorgoulis, V., and Demaria, M. (2021). Physiological hypoxia restrains the senescence-associated secretory phenotype via AMPK-mediated mTOR suppression. *Molecular Cell*, 81(9), 2041-2052.
85. Yao, Z., Murali, B., Ren, Q., Luo, X., Faget, D. V., Cole, T., Ricci, B., Thotala, D., Monahan, J., van Deursen, J. M., Baker, D., Faccio, R., Schwarz, J. K., and Stewart, S. A. (2020). Therapy-induced senescence drives bone loss. *Cancer Research*, 80(5), 1171-1182.
86. Xu, M., Tchkonina, T., Ding, H., Ogrodnik, M., Lubbers, E. R., Pirtskhalava, T., White, T. A., Johnson, K. O., Stout, M. B., Mezera, V., Giorgadze, N., Jensen, M. D., LeBrasseur, N. K., and Kirkland, J. L. (2015). JAK inhibition alleviates the cellular senescence-associated secretory phenotype and frailty in old age. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(46), E6301-E6310.
87. Chen, R., and Chen, B. (2015). Siltuximab (CNTO 328): a promising option for human malignancies. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, 3455-3458.
88. Wang, B., Varela-Eirin, M., Brandenburg, S. M., Hernandez-Segura, A., van Vliet, T., Jongbloed, E. M., Wilting, S. M., Ohtani, N., Jager, A., and Demaria, M. (2022). Pharmacological CDK4/6 inhibition reveals a p53-dependent senescent state with restricted toxicity. *The Embo Journal*, 41(6), 108946.
89. Chamberlain, L. H., and Gould, G. W. (2002). The vesicle-and target-SNARE proteins that mediate Glut4 vesicle fusion are localized in detergent-insoluble lipid rafts present on distinct intracellular membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 277(51), 49750-49754.
90. Pombo, I., Rivera, J., & Blank, U. (2003). Munc18-2/syntaxin3 complexes are spatially separated from syntaxin3-containing SNARE complexes. *Febs Letters*, 550(1-3), 144-148.
91. Foster, L. J., De Hoog, C. L., and Mann, M. (2003). Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(10), 5813-5818.

92. Taverna, E., Saba, E., Rowe, J., Francolini, M., Clementi, F., and Rosa, P. (2004). Role of lipid microdomains in P/Q-type calcium channel (Cav2. 1) clustering and function in presynaptic membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 279(7), 5127-5134.
93. Chamberlain, L. H., Burgoyne, R. D., and Gould, G. W. (2001). SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(10), 5619-5624.
94. Lang, T., Bruns, D., Wenzel, D., Riedel, D., Holroyd, P., Thiele, C., and Jahn, R. (2001). SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *The Embo journal*, 20(9), 2202-2213.
95. Gil, C., Soler-Jover, A., Blasi, J., and Aguilera, J. (2005). Synaptic proteins and SNARE complexes are localized in lipid rafts from rat brain synaptosomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 329(1), 117-124.
96. Kay, J. G., Murray, R. Z., Pagan, J. K., and Stow, J. L. (2006). Cytokine secretion via cholesterol-rich lipid raft-associated SNAREs at the phagocytic cup. *Journal of Biological Chemistry*, 281(17), 11949-11954.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ÖZDEK, Esra
Uyruğu : T.C.

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı	Devam ediyor
Lisans	Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2013
Lise	Çorum Anadolu Lisesi	2007

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2014-Devam ediyor	Çorum İl Sağlık Müdürlüğü	Eczacı

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Han, S., ve Özdek, E. (2022, 23 - 25 Kasım). *Endoplazmik retikulum stresi inhibisyonunun sıçan beyinde inflamasyon ve otofaji üzerindeki etkilerinin yaşlanmaya ve cinsiyete bağlı incelenmesi*. 5th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2022), Ankara, Türkiye.
2. Şimay Demir, Y., Özdek, E., Yeşilyurt, Z., Özdemir, A., ve Ark, M. (2023, 23 - 26 Kasım). *Kemoterapi ile indüklenen senesent hücre sekretomunun modülasyonu için yeni bir hedef olarak lipid raftlarının değerlendirilmesi*. 2. Uluslararası 27. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Antalya, Türkiye.

Hobiler

Kitap okumak



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..