



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

**YÜKSEK
LİSANS
TEZİ**

**A549 KANSER HÜCRELERİNDE
KEMOTERAPÖTİKLERLE İNDÜKLENEN
SENESENTE TEOFİLİNİN SEKRETOM
GELİŞİMİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

ESİN KARGIOĞLU

FARMAKOLOJİ (ECZ.) ANABİLİM DALI

OCAK 2022



**A549 KANSER HÜCRELERİNDE KEMOTERAPÖTİKLERLE
İNDÜKLENEN SENESENSTE TEOFİLİNİN SEKRETOM GELİŞİMİ
ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

Esin KARGIOĞLU

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
FARMAKOLOJİ (ECZ.) ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2022

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.

Esin KARGIOĞLU
TARİH

A549 KANSER HÜCRELERİNDE KEMOTERAPÖTİKLERLE İNDÜKLENEN SENESENSTE TEOFİLİNİN SEKROTOM GELİŞİMİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Esin KARGIOĞLU

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2022

ÖZET

Hücrel senesens; çeşitli stres faktörlerine maruz kalan hücrelerin geri dönüşsüz olarak proliferasyonunun durması halidir. Hücrel senesensin altında yatan mekanizmaların kansere karşı korunmada önemli olduğu düşünülmektedir. Sitotoksik etkili kemoterapötik ajanlar, kanser hücrelerini ortadan kaldırmak için yüksek konsantrasyonlarda kullanılırlar. Aynı ajanların düşük konsantrasyonları kanser hücrelerinde senesensi indüklediği bilinmektedir. Senesens hale gelen kanser hücreleri kanser mikroçevresine çeşitli faktörler salgılar. Mikroçevreye salgıladıkları bu faktörlere senesens ile ilişkili sekretom (SASP) denilmektedir. Terapi ile indüklenen senesent hücre sekretomunun kanser hücresinde tümörigenezi artırdığı, kanser hücrelerinin invazyonuna ve metastaz yapmasına neden olduğu bilinmektedir. Bu sebeple kanser hücrelerinde senesensin oluşum mekanizmasının ve senesent hücrelerin sekretomunun çevre hücreler üzerindeki etkilerinin ortaya çıkartılması kanser tedavisi açısından önem taşımaktadır. Bu amaçla kanser tedavisinde adjuvan tedavi şekli olarak senoterapötik ajanların (senesent hücreleri seçici olarak öldüren senolitik etkili ve senesens hücre sekretomunu inhibe eden senomorfik etkili) keşfi üzerine yoğun çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Teofilin terapötik konsantrasyonlarda bronkodilatör, antiinflamatuvar, immünomodülatör etkiler gösteren, çok uzun yıllardır, astım ve obstrüktif solunum yolu hastalarında kullanılan bir ilaçtır. Terapötik konsantrasyondan daha düşük konsantrasyonlarda ise teofilinin HDAC'ın (histon deasetilaz) aktivasyonunu indüklediği ve inflamatuvar genlerin ekspresyonunu baskılayarak makrofajlardan interlökin sekresyonunu inhibe ettiği bilinmektedir. Bu tez çalışmasında, A549 kanser hücrelerinde kemoterapötik ajan olan doksorubisin ile indüklenen senesens, teofilinin sekretom gelişimi üzerindeki olası etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bulgularımız teofilinin, 300 nM doksorubisin ile indüklenen senesens gelişiminde etkisinin olmadığını göstermiştir. Teofilinin senesens kanser hücre sekresyonuna etkisini incelemek için, kanser hücrelerinde ilk olarak senesens indüklenmiş, indüksiyon sonrası hücrelere teofilin uygulanmıştır. Toplanan hücre sekretomunda IL-6 ölçümü gerçekleştirilmiş ve teofilinin, senesent hücre sekresyonundaki IL-6 sitokinini azalttığı bulunmuştur. Sonuç olarak, bulgularımız teofilinin senomorfik bir ajan olduğunu göstermiştir. Fakat teofilinin SASP üzerindeki bu etkisinin fonksiyonel sonucunun anlaşılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Bilim Kodu : 1018.1
Anahtar Kelimeler : A549, kanser, SASP, senesent, teofilin
Sayfa Adedi : 57
Danışman : Doç. Dr. Aysun ÖZDEMİR

EFFECT OF THEOPHYLLINE ON SECRETOME DEVELOPMENT IN
SENESCENCE A549 CANCER CELLS INDUCED BY CHEMOTHERAPEUTICS

(M. Sc. Thesis)

Esin KARGIOGLU

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

January 2022

ABSTRACT

Cellular senescence is the state of irreversible cessation of proliferation of cells exposed to various stress factors. The mechanisms underlying cellular senescence are thought to be important in protecting against cancer. Cytotoxic chemotherapeutic agents are used in high concentrations to eliminate cancer cells. Low concentrations of the same agents are known to induce senescence in cancer cells. Senescent cancer cells secrete various factors into the cancer microenvironment. These factors that they secrete into the microenvironment are called senescence-associated secretome (SASP). It is known that therapy-induced senescent cell secretome increases tumorigenesis in cancer cells and causes invasion and metastasis of cancer cells. For this reason, it is important for cancer treatment to reveal the mechanism of senescence formation in cancer cells and the effects of the secretome of senescent cells on surrounding cells. For this purpose, intensive studies are carried out on the discovery of senotherapeutic agents (senolytic effect that selectively kills senescent cells and senomorphic effect that inhibits senescence cell secretome) as an adjuvant treatment modality in cancer treatment. Theophylline is a drug that shows bronchodilator, anti-inflammatory and immunomodulatory effects at therapeutic concentrations and has been used for many years in asthma and obstructive respiratory patients. It is known that at concentrations that are lower than the therapeutic concentration, theophylline induces the activation of HDAC (histone deacetylase) and inhibits interleukin secretion from macrophages by suppressing the expression of inflammatory genes. In this thesis, it was aimed to investigate the possible effect of theophylline on the secretoma development in chemotherapeutic agent doxorubicin induced senescence in A549 cancer cells. Our findings showed that theophylline had no effect on doxorubicin (300 nM) induced senescence. To investigate the effect of theophylline on senescence cancer cell secretion, firstly, senescence was induced in cancer cells, and the cells were treated by theophylline after induction. IL-6 measurement was performed in the collected cell secretome and it was found that theophylline decreased the IL-6 cytokine in senescent cell secretion. In conclusion, our findings showed that theophylline is a senomorphic agent. However, more studies are needed to understand the functional outcome of this effect of theophylline on SASP.

Science Code : 1018.1

Keywords : A549, Cancer, SASP, Senescence, Theophylline

Page Number : 57

Supervisor : Assoc. Prof. Aysun OZDEMİR

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın hazırlanması, değerlendirilmesi ve çalışmalarım sırasında değerli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, her sorun yaşadığımda yakından ilgilenen ve yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetinden beni mahrum bırakamayan saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Aysun ÖZDEMİR'e tüm içtenliğimle teşekkürlerimi ve minnetlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında destek ve yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Mustafa ARK hocama teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında beni yalnız bırakmayan, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Dr. Öğr. Üyesi Yaprak Dilber Şimay Demir,

Bana her anlamda destek olan, beni yalnız bırakmayan çok değerli laboratuvar arkadaşım Arş. Gör. Zeynep Elif Yeşilyurt,

Deneylerde kullandığım teofilini bana sağlayan Prof. Dr. Serap Gür hocama,

Yüksek lisans süresince ve hayatımın her evresinde bana destek olan canım ailem, eşime ve Semih Yağcı'ya,

Saygılarımı ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından 02/2020-07 proje numarası ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	x
RESİMLERİN LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser.....	3
2.1.1. Kanser hücrelerinin özellikleri	3
2.1.2. Kanser tedavisi	5
2.2. Senesens	9
2.2.1. Hücresel senesens çeşitleri	10
2.2.2. Kemoterapiye bağlı senesens	11
2.2.3. Hücresel senesensin belirlenmesi	12
2.2.4. Senesens sekretomu.....	13
2.2.5. Senesens ve kanser	16
2.3. Senoterapötikler	20
2.3.1. Senolitikler	20
2.3.2. Senomorfikler	22
2.4. Teofilin	24
2.4.1. Teofilin etki mekanizması	25

	Sayfa
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. Gereç	29
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	29
3.1.2. Kullanılan aletler	29
3.2. Yöntemler.....	30
3.2.1. Hücre kültürü	30
3.2.2. SA- β -Gal boyaması	30
3.2.3. Faz kontrast mikroskopi	31
3.2.4. Sekretom toplanılması	31
3.2.5. IL-6 ölçümü	31
3.2.6. İstatistiksel analiz	32
4. BULGULAR	33
4.1. Doksorubisin İle İndüklenen Senesent A549 Hücrelerinde Teofilin Preinkübasyonun Senesens Oluşumuna Etkisinin Değerlendirilmesi	33
4.2. Teofilinin senesent A549 Hücresinin sekretuvar aktivitesine etkisinin değerlendirilmesi.....	36
5. TARTIŞMA	39
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	41
KAYNAKLAR	43
ÖZGEÇMİŞ	57

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Kanser hücrelerinde yapılan in vivo çalışmalarla senesensi indüklediği bilinen doksorubisin konsantrasyonları.....	18



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Senesens gelişimi, SASP'ın etkileri ve SASP üzerine etkili olan senoterapötik ilaçların şematik gösterimi. (IL: interlökin, CXCL: kemokin ligand, HGF: Hepatosit büyüme faktörü, AREG: amfiregülin, EREG: epiregülin, MMP: matriks metalloproteinaz, VEGF: vasküler endotelial büyüme faktörü, ANGPTL: Anjiyopoietin benzeri protein).....	24
Şekil 4.1. SA-β-gal pozitif hücre sayısının total hücre sayısına oranı. (K: Kontrol; D: 300nM Doksorubisin. Teo: Teofilin) (*) kontrol grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir. (n=3, tek yönlü varyans analizi ANOVA, p<0,05).	35
Şekil 4.2. Teofilin preinkübasyonun, doksorubisinin indüklediği senesense etkisinin hücre alan ölçümü ile değerlendirilmesi. (K: Kontrol; D: 300nM Doksorubisin. Teo: Teofilin) (*) kontrol grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir. (n=3, tek yönlü varyans analizi ANOVA, p<0,05).	36
Şekil 4.3. Teofilinin doksorubisin ile indüklenen senesent hücrelerden IL-6 sekresyonunun etkisinin belirlenmesi. (K: Kontrol; D: 300nM Doksorubisin. Teo: Teofilin) *: kontrol grubuna göre, #: doksorubisin grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir (n=, tek yönlü varyans analizi ANOVA, p<0,05).	37
Şekil 6.1. Teofilinin SASP üzerine etkisinin şematik gösterimi.....	42

RESİMLERİN LİSTESİ**Resim****Sayfa**

- Resim 4.1. A549 hücrelerinde; teofilin preinkübasyonun, doksorubisinin indüklediği senesense etkisinin SA- β -gal boyaması ile mikroskopik analizi. (K: Kontrol; D: 300nM Doksorubisin. Teo: Teofilin). skala bar: 50 μ m..... 34



SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler

mM	Milimolar
nM	Nanomolar
μM	Mikromolar

Kısaltmalar

Açıklama

ANGPTL	Anjiyopietin Benzeri Protein
AREG	Amfiregülin
ATM	Ataksi Telenjektazi Mutant Kinaz
ATR	Ataksi Telenjektazi- ve Rad3-İlişkili
Cdk	Siklin Bağımlı Kinaz
CXCL	Kemokin Ligand
DDR	DNA Hasar Cevabı
ECM	Hücre Dışı Matris
EREG	Epiregülin
FOXO4	Forkhead Box Protein O4
HDAC	Histon Deasetilaz
HGF	Hepatosit Büyüme Faktörü
HSP90	Isı Şoku Proteini 90
HUVEC	İnsan Umbilikal Ven Epitel Hücreleri
IKK	Ikb Kinaz
IL	İnterlökin
MEF	Fare Embriyonik Fibroblastlar
MMP	Matriks Metalloproteinaz
NF	Nükleer Faktör
PI3K	Fosfoinozitol-3 Kinaz
ROS	Reaktif Oksijen Türleri

Kısaltmalar	Açıklama
SAHF	Senesens İle İlişkili Heterokromatin Odakları
SASP	Senesensle-İlişkili Salgılayıcı Fenotip
SA-B-Gal	Senesensle-İlişkili B-Galaktosidaz
SDF	DNA Hasar Odakları
TIS	Terapi İle İndüklenen Senesens
UPR	Katlanmamış Protein Yanıtı
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü



1. GİRİŞ

Hücrel senesens; çeşitli stres faktörlerine maruz kalan hücrelerin geri dönüşümsüz olarak proliferasyonunun durması halidir. Her ne kadar hücre siklusu senesent hücrelerde durmuş olsa da senesent hücreler metabolik olarak aktiflerdir ve büyümüş, yassılaştırmış, büyük ve çok çekirdekli bir morfolojiye sahiptir. Bu hücrelerin en önemli özelliklerinden birisi ekstraselüler çevreye salgıladıkları SASP (senesens ile ilişkili sekretuar fenotip) (*senescence-associated secretory phenotype*) olarak bilinen hücre sekretomudur. SASP, sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri, proteazlar içermektedir. Kanser tedavisinde geleneksel olarak yüksek konsantrasyonda sitotoksik etkili kemoterapötik ajanlar kullanılmaktadır. Düşük konsantrasyonda kemoterapötik ajanların kanser hücrelerinde senesensi indüklediği de bilinmektedir [3]. Terapi ile indüklenen senesent hücre sekretomunun ilaç direnci gelişmesinde rolü olduğu ve ayrıca protümörejenik, invazyon ve metastaz indükleyici etkilerinin olduğu bilinmektedir [4–7]. Kemoterapi ile indüklenen senesens hücrenin SASP’ından kaynaklanan istenmeyen bu parakrin etkileri önlemek amacıyla kanser tedavisinde senoterapötiklerin yani senesent hücreleri seçici olarak öldüren senolitik ve senesens hücrelerin sekretuar aktivitesini inhibe eden senomorfik etkili ilaçların keşfi önemli araştırma alanı olmuştur.

Teofilin ise, fosfodiesteraz, adenoazin ve prostaglandin inhibisyonu, katekolamin salınımını artırıcı, kalp debisinin artırıcı, diüretik ve antiinflamatuvar etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Teofilin terapötik konsantrasyonlarda (50-100µM) bu etkileri göstermektedir. Tuccitto ve arkadaşları terapötik konsantrasyon altındaki teofilin konsantrasyonunun HDAC aktivitesini artırdığı ve böylece inflamatuvar genlerin ekspresyonunu baskıladığını göstermiştir [8]. Yapılan bu çalışmalarda, inflamatuvar genlerin ekspresyonunu baskılanması sonucu, teofilinin sitokin ve kemokinlerin (IL-5, IL-6, IL-1β, IP-10, MCP-1, MIP-1α; MIP-1β; CCL5) sekresyonunu azalttığı gösterilmiştir [8–10].

Bu veriler, teofilinin terapi ile indüklenen senesens sekretomunu da azaltabileceğini ve senesent kanser hücre sekretomunun istenmeyen parakrin etkilerini inhibe edebileceğini düşündürmektedir. Bu tez araştırmasında kemoterapötik ajan olan doksorubisin ile indüklenen senesent A549 kanser hücrelerinde, teofilinin hem senesens hem de sekretom

gelişimindeki olası etkisinin incelemesi ve teofilinin senesent kanser hücrelerinde potansiyel bir senomorfik ilaç olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser dünya çapında ölümcül bir hastalıktır. Tümör, yararlı olmayan ve komşu hücrelere veya organlara ve vücudun diğer kısımlarına yayılma özelliği gösteren hücrelerin anormal büyümesidir. Tümörler, ortaya çıktıkları hücre tipine göre sınıflandırılır. Kanseri üç ana gruba ayrılır: karsinomlar, sarkomlar ve lösemiler veya lenfomalar. İnsan kanserlerinin yaklaşık %90'ını içeren karsinomlar, epitel hücrelerinin malignitesidir. İnsanlarda nadir görülen sarkomlar, kas, kemik, kıkırdak ve fibröz doku gibi bağ dokularının katı tümörleridir. İnsan kanserlerinin yaklaşık %8'ini oluşturan lösemiler ve lenfomalar, sırasıyla kan oluşturan hücrelerden ve bağışıklık sisteminin hücrelerinden kaynaklanır. Tümörler ayrıca kaynak dokuya (örneğin akciğer veya göğüs karsinomları) ve ilgili hücre tipine göre sınıflandırılır. Örneğin fibrosarkomlar, fibroblastlardan ve eritroid lösemiler, eritrositlerin öncülerinden (kırmızı kan hücreleri) kaynaklanır. Tüm kanser vakalarının yarısından fazlasını oluşturan en yaygın dört kanser, meme, prostat, akciğer ve kolon / rektum kanseridir. Spesifik olarak, çoğu kanser, hücrelerin daha hızlı bölünmelerini, bölünmeyi düzenleyen iç ve dış kontrollerden ve programlanmış hücre ölümünden kaçmalarını sağlayan bir dizi mutasyon (DNA'daki değişiklikler) ile ortaya çıkar [11].

2.1.1. Kanseri hücrelerinin özellikleri

Malign hücreler, hücre döngüsünün hızlanması, genetik değişiklikler, istilacı büyüme, artan hücre hareketliliği, kemotaksis, hücre yüzeydeki değişiklikler, litik faktörlerin salgılanması vb. özelliklere sahiptir. Morfolojik olarak kanserli hücre, düzensiz şekile sahip büyük bir çekirdek ve belirgin nükleoli sahiptir [12]. Sitoplazma miktarları azdır ve yoğun renklidir veya tam tersine soluktur [12]. Sitoplazmasında yeni yapılar ortaya çıkar veya normal yapılar kaybolur [12]. Sitoplazmasında, ribozomal ve haberci RNA'nın birikmesiyle bazofilik haldedir [12]. Kötü huylu hücreler, sıklıkla vakuollerle birlikte küçük bir sitoplazmik miktara sahiptir [12]. Kötü huylu hücrelerin yüzeyinde, son derece aktif enzimatik özelliğe sahip atipik mikrovilluslar, yalancı ayaklar ve veziküller oluşur [13]. Tümörlerin merkezindeki ve çevresindeki hücreler arasında farklılıklar bulunmuştur. Tümörün

merkezindeki hücre popülasyonu, dezmozomların ve bağlantı komplekslerinin bulunmasıyla normal hücreler arası bağlantılara sahipken, bunlar çevrede yoktur veya azalmıştır [14].

Klonal orijin: Çoğu kanser hücresi anormal hücreden meydana gelir. Bazı kanserler çok sayıda malign klonlardan oluşabilir [15]. Bu klonlar ya bir alan hasarı sonucu (dokunun birden fazla sayıda hücresinin karsinojene maruz kalmasıyla) ya da bazı genlerdeki kalıtsal hasarlar sonucu meydana gelir [15].

İmmortalite: Normal hücrelerin birçoğunun bölünme sayısı sınırlıdır. Kanser hücreleri ise sınırsız sayıda bölünebilirler. İmmortalitenin mekanizmalarından biri kromozom uçları olan telomerlerdir. Normal hücre bölünmesinde telomerler gittikçe kısalır. Fakat, kanser hücrelerinde ve stem hücrelerde telomerler telomeraz enziminin etkisiyle yenilenirler [16]. Bu enzim normal olarak hücreler bölünürken bir taraftan programlı bir şekilde gittikçe azalır. Bölünmesi tamamlanmış bir hücre dinlenme durumuna girer ve sonunda çoğalma kapasitesini yitirdiği için ölür [16]. Fakat, birçok kanser türünde telomeraz etkinliği devam eder veya aktive edilir [16]. Sonuçta, telomerlerin uzunluğu değişmez ve hücre sınırsız sayıda çoğalır [16].

Genetik instabilite: Bu durum, DNA tamirindeki ve DNA uyumsuzluklarını tanımadaki hasarlardan kaynaklanır ve kanser hücrelerinin heterojen olmasına neden olur. Hücre proliferasyon kontrol mekanizmalarına gittikçe daha az yanıt oluşturan klonlar meydana gelir. Ayrıca, bu klonların farklı ortamlarda yaşama yeteneği de gittikçe artar ve bu yüzden metastaz yaparlar [16].

Kontakt İnhibisyonun Kaybı: Kültür ortamında normal hücreler yapıştığı alt tabakaya yapışamazlarsa bölünemezler. Normal hücreler bölünüp tüm yüzeyi tek tabaka halinde kapladıklarında da bölünme özelliklerini kaybederler. Besiyerleri gerekli tüm büyüme faktörleri ve diğer besin elemanlarını içerse dahi bölünmezler. Kanser hücreleri ise, bir besiyerinde alt tabakaya yapışmaya gereksinim duymadan bağımsız olarak bölünmeyi sürdürebilir. Ayrıca, hücre kültürlerinde birden fazla tabaka oluşmuş olsa dahi büyümeye devam edebilirler [17].

Hücre Proliferasyonunun Devamlı Artışı: Kültürdeki kanser hücrelerinin bir özelliğidir. Kanser hücreleri beslenmeleri için gerekli besin faktörlerini tüketseler bile büyümeye devam ederler, bu yüzden aslında kendi kendilerini öldürmektedirler [17].

Metastaz: Benign tümörler ve normal hücreler metastaz özelliği göstermezler. Metastaz, ekstrasellüler matrikse yapışmadan sorumlu hücrel proteinlerin kaybı ya da anormalliklerinden, hücrelerin bazal membrana tutunmalarındaki anormalliklerden, hücreler arası interaksiyonun bozukluğundan, bazal membranın üretimindeki anormalliklerden, metaloproteaz gibi bazı enzimlerle bazal membranın yıkılması sonucu meydana gelir. Malign hücrelerde bazal membranı yok eden litik faktörler vardır [14]. Bazal membran kaybı, iyi huylu ve kötü huylu tümörler arasındaki morfolojik ve biyolojik farklılaşmanın temel bir kriteri olarak kabul edilir [18]. Kötü huylu hücrelerdeki bazal membran, yapısını ve çeşitli bileşenler arasındaki oranları değiştirir, örneğin: tip IV kollajen, laminin, heparan sülfat proteoglikan ve fibronektin. Neoplastik hücreler, tip IV kollajeni yok eden tip IV kollajenaz salgılar ve bu da kan ve lenfatik damarlardan bazal membranların parçalanması yoluyla metastazı kolaylaştırır. Böylece kötü huylu hücreler metastaz yaparlar [17].

2.1.2. Kanser tedavisi

Kanserin türüne ve evresine bağlı olarak birçok tedavi yöntemi vardır. Cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, hormon tedavisi, immünoterapi dahil hedefe yönelik kanser tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Bazı durumlarda tedavi için maksimum etkiye sahip olmak için tedavi yöntemlerinin kombinasyonu kullanılabilir [19]. Birçok kanser tedavisinde, kanserli hücelere zarar vermek hedeflenirken, vücudun sağlıklı hücreleri de zarar görmektedir. Bu yüzden, kanser tedavisinde sağlıklı dokulara verilen zararı azaltmak ve kanser hücrelerine verilen zararı maksimuma çıkartmak için yeni tedavi yöntemleri denenmektedir.

Cerrahi: Kanserinin cerrahi tedavisi, hematolojik olmayan kanserler için yaygın olarak kullanılmaktadır. Cerrahi tedavi, kansere tam veya kısmi bir tedavi sağlayabilir. Lokalize ve tümör boyutu küçük olan kanserlere cerrahi işlemle kanser tedavisi yapılabilir. Kanser vücudun diğer bölgelerine metastaz yapmışsa, kanserinin cerrahi işlemle tamamen çıkarılması mümkün değildir [19]. Cerrahide amaç, lokal olarak büyüyen tümörü çıkarmak veya organa tamamen yayılmışsa tüm organı çıkarmaktır. Meme kanserinde mastektomi, nöroşirürji ile beyin tümörünün çıkarılması, prostat kanseri için prostatektomi, böbrek kanseri, akciğer

kanseri, karaciğer kanseri gibi hastalıkların tedavisinde cerrahi işlem uygulanmaktadır [19]. Kemoterapi gibi diğer tedavi yöntemleri, cerrahi işlem önce veya sonra yapılabilir.

Radyoterapi: Radyoterapi, kanserli hücreleri iyonizan radyasyon kullanarak öldürmeye dayanan bir tedavi yöntemidir. Bu tedavi, tümörlerin boyutunu küçültmek veya çıkarmak için genellikle ameliyatla birlikte kullanılır. Radyasyon tedavisi beyin, meme, serviks, larenks, karaciğer, akciğer, pankreas, prostat, deri, mide, rahim vb. kanser türlerinin çoğunu tedavi etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Radyasyon terapisi, tümör hücrelerini ya doğrudan DNA'larına zarar vererek ya da hücrelerde DNA'ya zarar verebilecek serbest radikaller oluşturarak öldürür. Bu tedavi, x-ışınları gibi yüksek enerjili iyonlaştırıcı radyasyon kullanır [19].

İmmünoterapi: Bağışıklık sisteminin kanserle savaşmasına yardımcı olan bir kanser tedavi yöntemidir. Kanseri immünoterapi ile tedavi etmek için kanser hücrelerine bağlanarak spesifik protein fonksiyonunu bloke eden, bağışıklık sistemini kanser hücrelerini tanıması ve onlara saldırması için eğiten monoklonal antikolar kullanılmaktadır ve günden güne bu konuda yeni araştırmalar yapılmaktadır. Bu tedavi yöntemi güvenlidir ve herhangi bir önemli yan etkisi yoktur [19].

Hormon tedavisi: Büyümesi ve yayılması hormonlara bağlı olan belirli kanser türlerini tedavi etmek için vücuttaki hormon miktarını değiştirerek etki gösteren kanser tedavi yöntemidir. Bu tedavi yöntemi meme, üreme sistemi ve prostat kanserlerinin tedavisinde kullanılmaktadır [19].

Kemoterapi: Kanseri öldürmek veya yok etmek için genellikle antikanser ilaçların kullanıldığı kanser tedavi yöntemidir. Kemoterapi öncesinde veya sonrasında radyoterapi veya cerrahi işlemler uygulanabilir. Cerrahi işlem veya radyoterapi öncesinde kemoterapi uygulanmasına “neoadjuvan kemoterapi” denir. Cerrahi işlem veya radyoterapi sonrasında kemoterapi uygulanmasına “adjuvan kemoterapi” denir. Etkili bir yöntem olmasının yanında kanser hücrelerini öldürürken sağlık hücrelere de zarar verdiği için çok fazla yan etkisi vardır. Kemoterapinin neden olduğu yan etkiler, kanserin türüne, antikanser ilaçlara ve kişinin kemoterapi tedavisine verdiği yanıtı bağlıdır.

Alkilleyici ajanlar: Alkilleyici ajanlar, sitotoksik etkilerini, alkil gruplarının çeşitli hücresel bileşenlere aktarılması yoluyla gösterirler. Çekirdek içindeki DNA alkilasyonu hücre ölümüne yol açar. Bu ilaçlar, diğer hücresel nükleofillerin sülfhidril, amino, hidroksil, karboksil ve fosfat grupları ile kimyasal olarak reaksiyona girer. Bu ilaçların genel etki mekanizması, doğrudan veya bir karbonyum iyonu oluşumu yoluyla bir alkil grubunu bir hücresel bileşene aktarabilen bir etilenimonyum iyonu oluşturmak için molekül içi siklizasyonu içerir. Alkilasyona ek olarak, nitrosüreler ile ortaya çıkan ikincil bir mekanizma, izosiyanatların oluşumu yoluyla proteinlerin lizin kalıntılarının karbamoilasyonunu içerir. DNA içindeki başlıca alkilasyon bölgesi guaninin N7 pozisyonudur; bununla birlikte, adenin N1 ve N3'ü, sitozinin N3'ü ve guaninin O6'sı ve ayrıca DNA ile bağlantılı fosfat atomları ve proteinler dahil olmak üzere diğer bazlar da daha düşük derecelerde de alkillenir. Bu etkileşimler, çapraz bağlanma yoluyla tek bir sarmalda veya her iki DNA sarmalında meydana gelebilir, çünkü çoğu ana alkilleyici ajan iki reaktif grupla iki işlevlidir. İkinci etki, DNA'nın şeker-fosfat omurgasının kesilmesi yoluyla DNA ipliğinin kırılmasına yol açar. DNA'nın çapraz bağlanması, alkilleyici ajanların sitotoksik etkisi için büyük önem taşıyor gibi görünmektedir ve replike hücreler, bu ilaçlara en çok duyarlıdır. Bu nedenle, alkilleyici ajanlar hücre döngüsüne özgü olmamasına rağmen, kanser hücreleri, hücre döngüsünün son G1 ve S fazlarında bu ilaç sınıfına en çok duyarlıdır. Alkilleyici ajanlarla ilişkili yan etkiler genellikle doza bağlıdır ve öncelikle kemik iliği (miyelosupresyon), gastrointestinal sistem (ishal) ve üreme sistemi gibi hızla büyüyen dokularda ortaya çıkar. Bulantı ve kusma da bu ajanların birçoğunda ciddi bir sorun olabilir. Doğaları gereği kanserojendir ve özellikle akut miyelojenöz lösemi olmak üzere sekonder malignite riskinde artış vardır. Siklofosfamid, en yaygın olarak kullanılan alkilleyici ajanlardan biridir. Bu bileşiğin önemli bir avantajı, yüksek oral biyoyararlanımı ile ilgilidir. Sonuç olarak, eşit klinik etkinlik ile oral ve intravenöz yollarla uygulanabilir. Ana formunda inaktiftir ve karaciğer mikrozomal enzimleri tarafından sitotoksik metabolitlere aktive edilir [20]. Karboplatin, sisplatin, prokarbazin, busulfan, klorambusil bu grupta ilaçlara örnektir.

Antimetabolitler: Antimetabolit ilaçlar, DNA replikasyonunu ve normal hücresel metabolik süreçleri farklı mekanizmalarla durdurmak için tasarlanmıştır. Dihidrofolat redüktaz, dihidrofolatın tetrahidrofolata ve 10-formil tetrahidrofolata dönüştürülmesinden sorumludur. Dihidrofolat redüktaz inhibitörleri (metotreksat) hücre içi indirgenmiş folat havuzlarının tükenmesine ve nihayetinde pürin ve pirimidin sentezinin azalmasına neden olur. Bir floropirimidin ve nükleosit analogları olarak bilinen ajanlar sınıfının bir üyesi 5-

florourasil (5-FU) doğal olarak oluşan substratlara benzerliklerinden dolayı bir veya daha fazla normal hücre fonksiyonundaki nükleositleri değiştirerek işlev görür. Timidilat sentaz, deoksiüridin monofosfattan (dUMP) deoksitimidin monofosfatın (dTMP) sentezi için gereklidir. Bu işlem, hücrede tek dTMP kaynağıdır ve inhibisyonu, hücresel timidinin tükenmesine yol açar [21]. Doğal Antikanser İlaçlar: Vinka alkaloidleri (vinblastin, vinkristin), özellikle mikrotübüllerin birleşmesini bozan tübülün polimerizasyonu sürecini engeller. Bu inhibe edici etki, metafazda mitotik durmaya neden olarak hücre bölünmesini durdurur ve bu da hücre ölümüne yol açar. Böylece, vinka alkaloidleri hücre döngüsünün M fazında etkilidir. Paklitaksel, Pasifik porsukundan (*Taxus brevifolia*) ve Avrupa porsuğundan (*Taxus baccata*) türetilen bir alkaloid esterdir. Paklitaksel, tübülün polimerizasyonunu artırarak mikrotübüllere yüksek afinite bağlanarak mitotik iğ zehiri olarak işlev görür ve mitoz ve hücre bölünmesinin engellenmesine neden olur. Bu nedenle, paklitaksel ve diğer taksanlar hücre döngüsünün M fazında çalışır. Epipodofilotoksinler (etoposid), çift sarmallı DNA'nın kesilmesi ve yeniden bağlanmasından sorumlu olan enzim (topoizomeraz II) inhibe eder ve DNA sentezinin inhibisyonuna neden olur. Kampoteinler (topotekan, irinotekan) Kamptotesinler, *Camptotheca acuminata* ağacından elde edilen doğal ürünlerdir; tek DNA ipliklerini kesip yeniden yerleştirmekten sorumlu anahtar enzim olan topoizomeraz I'in aktivitesini inhibe ederler. Bu enzimin inhibisyonu, DNA hasarına neden olur [20].

Antitümör antibiyotikler: Bu antibiyotiklerin çoğu, spesifik bazlar arasındaki interkalasyon yoluyla DNA'ya bağlanır ve RNA, DNA veya her ikisinin sentezini bloke eder; bunlar arasında antrasiklinler, bleomisin ve mitomisin bulunur. *Streptomyces peucetius* var *caesius*'tan izole edilen antrasiklin antibiyotikler, en yaygın kullanılan sitotoksik antikanser ilaçları arasındadır. Antrasiklinler, sitotoksik etkilerini dört ana mekanizma yoluyla gösterir: (1) topoizomeraz II'nin inhibisyonu; (2) demir bağımlı enzim aracılı bir indirgeyici işlem yoluyla yarıkinonlu serbest radikallerin ve oksijensiz radikallerin oluşturulması; (3) DNA ve RNA sentezinin ve DNA iplikliğinin kesilmesinin sonucu olarak bloke edilmesiyle birlikte, interkalasyon yoluyla DNA'ya yüksek afiniteli bağlanma ve (4) akışkanlığı ve transportunu değiştirmek için hücresel zarlara bağlanma. Antrasiklinler intravenöz yolla verilir [20]. Doksorubisin, yumuşak doku sarkomlarında, nöroblastom, Ewing sarkomu, osteosarkom ve rabdomiyosarkom dahil olmak üzere birçok çocukluk çağı kanserinde, meme, endometriyum, yumurtalık, testis, tiroid, mide, mesane, karaciğer ve akciğer kanserlerinde başlıca klinik aktiviteye sahip en önemli antikanser ilaçlarından biridir. Aynı

zamanda akut lenfoblastik lösemi, multipl miyelom ve Hodgkin ve Hodgkin olmayan lenfomalar dahil hematolojik malignitelerde klinik aktiviteye sahiptir. Genellikle diğer anti-kanser ajanları (örn., Siklofosfamid, cisplatin ve 5-FU) ile kombinasyon halinde kullanılır [20]. Daunorubisin, idarubicin, epirubisin, mitoksantron diğer antrasiklin türevi antikanser ilaçlar arasındadır. Mitomisin (mitomisin C), *Streptomyces caespitosus*'tan izole edilen bir antibiyotiktir. DNA'yı çapraz bağlayan bir alkilleyici ajan oluşturmak için enzim aracılı bir indirgeme yoluyla metabolik aktivasyona uğrar. Klinik kullanımı esas olarak 5-FU ve radyasyon terapisi ile kombinasyon halinde anüsün skuamöz hücreli kanserinin tedavisi ile sınırlıdır [20]. Bleomisin, molekülün zıt uçlarında bir DNA bağlama bölgesi ve bir demir bağlama alanı içeren küçük bir peptittir. DNA'ya bağlanarak etki eder, bu da serbest radikal oluşumunu takiben tek ve çift iplikli kırılmalara ve DNA biyosentezinin inhibisyonuna neden olur. DNA parçalanması, bir DNA-bleomisin-Fe (II) kompleksinin oksidasyonundan kaynaklanır ve kromozomal sapmalara yol açar. Bleomisin, hücre döngüsünün G2 fazında hücrelerin birikmesine neden olan, hücre döngüsüne özgü bir ilaçtır. Bleomisin, Hodgkin ve Hodgkin dışı lenfomaların, germ hücreli tümörün, baş ve boyun kanserinin ve deri, serviks ve vulvanın skuamöz hücreli kanserinin tedavisi için endikedir. Pulmoner toksisite, bleomisin için doz sınırlayıcıdır ve genellikle öksürük, nefes darlığı, pnömonit olarak ortaya çıkar [20].

2.2. Senesens

Leonard Hayflick ve arkadaşları, "hücrel senesens" kavramını primer insan fibroblastlarda geri dönüşümsüz olarak hücre proliferasyonunun durması olarak tanımlamıştır. Yaklaşık 40 yıl önce, Leonard Hayflick, kültüre normal insan fibroblastlarının sınırlı sayıda bölündüğünü ve daha sonra senesent duruma geçtiklerini keşfetmiş ve bu sınırlı sayıda bölünme "Hayflick limiti" olarak bilinmektedir [22]. Senesensin durumu karmaşık ve tam olarak hala anlaşılmamıştır. Reaktif oksijen türleri, yaşlanmadan dolayı oluşan DNA hasarı, radyasyon, genotoksik maddeler (kemoterapötikler), yaşla ilgili telomer kısalması, olumsuz büyüme koşulları, tümör süpresör genlerin aktivasyonu, onkogenik aktivite gibi birçok faktör hücrel senesensi indüklemektedir. DNA hasarı, p53/p21CIP1 ve p16INK4a/RB tümör baskılayıcı yolların aktivasyonu ile hücre proliferasyonunun durmasına yol açar [23]. p21CIP1 ve p16^{INK4a}'nın aktivasyonu, hücre döngüsü ilerlemesini desteklemek için gerekli olan sikline bağımlı kinazlar CDK4, CDK6'yı (ve p21CIP1 durumunda CDK2) inhibe eder [24]. Bu sinyal yollarının bir sonucu olarak, senesent hücreler, genişlemiş ve daha

düzleştirilmiş morfolojiye, plazma zarının değiştirilmiş bileşimine, lizozom ve mitokondri birikiminden ve nükleer değişikliklerden yapısal farklılıklar gösterir [25]. Senesent hücreler, ayrıca ekstraselüler çevrelerine senesens-ilişkili sekretuar fenotip (SASP) olarak bilinen sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri, proteazlar dahil olmak üzere çeşitli faktörler sekrete ederler.

2.2.1. Hücresel senesens çeşitleri

Replikatif senesens

Hücreler sınırlı bir replikasyona sahiptir. (HAYFLICK LİMİT). Hücreler belirli sayıda replikasyon geçirdikten sonra, bölünemeyen ancak metabolik olarak aktif, canlı senesent durumuna girerler. Bu replikasyon sınırının nedenlerinden biri telomer kısalmasıdır. Telomerler, her bir hücre bölünmesi sonucu aşamalı olarak kaybolan ve tüm kromozomların sonunda bulunan TTAGGG nükleotidinin ardışık tekrarıdır [26].

Hücresel senesens, hücre siklusu ile ilişkilidir. Gap One (G1) fazı, sentetik (S) faza veya reversibl olarak uyku durumuna (G0) ilerleyebilir veya çeşitli hücre siklus düzenleyici proteinlerin aktivasyonuna bağlı olarak senesens (genellikle, her zaman değil, irreversibl hücre siklusu durması) durumuna girebilir [27]. Telomerler kısalarak kritik bir uzunluğa geldiğinde, hücre siklusunun G1'den S fazına kadar kontrol noktalarını düzenleyen p53/siklin E/CDK2/RB pathwayı aracılığıyla hücre proliferasyonun durmasına neden olan DNA hasar cevabını (DDR) indükler. Telomer kısalması normal hücrelerde irreversibl ve onarılmaz olduğu için, bu geçici hücre proliferasyon durmasından ziyade senesensi indükler [27].

Onkojene bağlı senesens

Senesens aktivasyonu için başka bir düzenleyici yol, CDK4/6 ve siklin 2'yi inhibe eden ve böylece RB proteini aracılığıyla hücre döngüsü ilerlemesini bloke eden düzenleyici bir protein olan kinaz 4(INK4)'ün p16 inhibitörü aracılığıyla [27]. Bu yol, tümör süpresör fonksiyon kaybı, onkojen aktivasyonu, epigenetik değişiklikler (gen ekspresyonunu değiştirebilen DNA metilasyonu) veya mitotik iplikleri oluşturan mikrotübüllerin hasar görmesi (vinka alkaloidleri ve taksanlar gibi bazı kemoterapi ajanlarının etki mekanizması)

ile stimüle olabilir [27]. Az stimölasyon senesensi indüklerken, şiddetli stimölasyon hücre ölümüne neden olur [27].

Strese bağı senesens

BRAF onkogeni (genellikle melanomda mutasyona uğrar) gibi bazı onkogenler hücre siklusu ilerlemesini düzenleyen mitokondriyal pürüvat kinaz metabolizması yoluyla senesensi indükleyebilir [27]. Metabolik stres de senesensi indükleyebilir ve ayrıca katlanmamış protein yanıtını (UPR) uyarabilir [27]. Kötü çevresel koşullardan dolayı hücrelerin yanlış katlanmış proteinlerini dışa aktarmasını önlemek için tasarlanan bu yol, hipoksi, asidoz veya diğer metabolik stresler gibi çeşitli hücre stresörü tarafından aktive edilir [27]. Hücre uzun süre stresöre maruz kalırsa, hücre siklus durması ve senesens indüklenir [27]. UPR, anormal mikrosirkülasyonları (hücrel hipoksi ve asidoza yol açar) ve tümörlerin yüksek glukoz ihtiyaçları (Warberg etkisi) nedeniyle birçok kanserde aktive olur ve sonuçta metabolik stres ortaya çıkar [25].

Epigenetik olarak indüklenen senesens

DNA metilazların (5-aza-20-deoksisitidin) veya histon deasetilazların (suberoilanilid hidroksamik asit ve sodyum butirat) inhibitörlerinin de senesense neden olduğu bilinmektedir [29].

Mitokondriyal disfonksiyonla ilişkili yaşlanma (MiDAS)

Yakın zamanda mitokondriyal disfonksiyonun indüklenmesinin de senesense yol açtığı bildirilmiştir ve özellikle SASP, bu tip senesensin özelliği gibi görünmektedir [30].

2.2.2. Kemoterapiye bağı senesens

Çoğu antikanser ilaçlar senesense neden olabilir. Bazıları (bleomisin veya doksorubisin gibi) DNA hasarını indüklerken diğerleri CDK'lerin inhibisyonu gibi farklı mekanizmalar yoluyla hareket edebilir (abemaciclib ve palbociclib) [29]. Kemoterapötiklerle tedavi, sitotoksiste olmaksızın p21'in upregölasyonu ve hücre proliferasyonun durmasıyla sonuçlanır [31]. Doksorubisin, irinotekan, metotreksat, 5-florourasil, oksaliptatin veya paklitaksel, çeşitli

kanser hücre dizilerinde (A549, SH-SY-5Y, HCT116, MDA-MB-231 ve MCF-7) senesensi indüklediği gösterilmiştir [31]. Doksorubisin, irinotekan ve metotreksat en güçlü senesens indükleyicileri iken; paklitaksel orta etkiye sahiptir ve oksaliptatin ve 5-florourasil senesense neden olmamıştır [31]. Doksorubisin, uzun zamandır kanser tedavisinde kullanılan antrasiklin türevi bir ilaçtır. Fakat doksorubisinin etki mekanizması tam olarak hala tam olarak bilinmemektedir. Doksorubisinin bilinen etki mekanizmaları: (1) DNA'ya interkalasyon; (2) DNA hasarına ve/veya lipid peroksidasyonuna yol açan serbest radikallerin üretimi (ROS); (3) DNA'ya bağlanma ve DNA alkilasyonu; (4) DNA'ya çapraz bağlanması; (5) DNA sarmal yapısının bozması; (6) doğrudan zar etkileri; (7) topoizomerez II'nin inhibisyonu yoluyla DNA hasarının başlatılması; (8) apoptozun uyarılması [32]. Doksorubisinin antitümör aktivitesi, DNA hasarının indüklenmesine ve ROS üretimine bağlıdır [33]. Genotoksik stres miktarı ve toplam ROS üretimi, hücre ölümü, G1 ve/veya G2 hücre döngüsü durması ve senesens gibi olası sonuçları belirlediği gösterilmiştir [34].

2.2.3. Hücresel senesensin belirlenmesi

Senesent hücrelerde büyümüş, yassılaştırmış, çok çekirdekli bir morfoloji, plazma zarının bileşiminde değişme ve çekirdeğinin büyümesi dahil olmak üzere çeşitli morfolojik ve yapısal değişiklikler meydana gelmektedir [35]. Hücredeki bu karmaşık değişiklikler, büyümenin durması ve SASP sekretomunun gelişimi gibi senesensin çeşitli özelliklerine neden olmaktadır [36]. Senesent hücreler ayrıca, lizozomal sindirim yoluyla oluşan, histolojik olarak görüntülenebilen veya Sudan Black B gibi histokimyasal boyalar kullanılarak vurgulanabilen sarı-kahverengi lipid içeren bir kalıntı olan lipofuscin'i de biriktirir [37]. Senesensin belirlenmesi için en iyi tanımlanmış ve en çok kullanılan yöntem senesens ile ilişkili β -galaktosidaz (SA- β -gal) aktivitesinin ölçümüdür [38]. Son olarak, senesent hücrelerde değişen protein ekspresyonu, western blot, nicel gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu veya immünohistokimya dahil olmak üzere çeşitli teknikler kullanılarak belirlenebilmektedir. Çift zincirli DNA kırılmaları, hem replikatif hem de stres kaynaklı hücresel senesense gH2AX veya 53BP1 işaretlenmesi ile tanımlanabilir [39]. DNA hasar yanıt yolunun aktivasyonunu takiben, erken senesent hücreler, p53 ve p21'in nükleer ekspresyonunu arttırırken, geç senesens hücreler en iyi yüksek p16 ile karakterize edilir [40]. Bu yolların aktivasyonu, hücre döngüsü durmasını ve DAPI boyama, trimetillenmiş H3K9 veya heterokromatin protein 1 ile tanımlanan senesens ile ilişkili heterokromatin odaklarının

(SAHF'ler) oluşumunu indükler. Bu SAHF'ler, hücresel proliferasyonla ilişkili genleri baskılayarak hücresel senesensin stabilitesine katkıda bulunur [41].

2.2.4. Senesens sekretomu

Senesent hücreler, senesens-ilişkili sekretuvar fenotip (SASP) olarak bilinen proinflamatuvar sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri, proteazlar dahil olmak üzere çeşitli faktörler sekrete ederler. Buna senesens sekretomu da denir. SASP, interlökin 1 ve 6 (proinflamatuvar sitokinler), interlökin 8 (nötrofilleri dokuya çeker ve inflamasyon sürecini başlatır) ve matriks metalloproteinazlar (kollajen gibi hücre dışı matriksin çeşitli bileşenlerini parçalar) içermektedir [27]. SASP'ın hem normal hemde kanser senesent hücrelerden salgılanabileceği ve tümör mikroçevresini otokrin ve parakrin olarak etkilediği gösterilmiştir [42]. Bazı durumlarda SASP yararlı bir etki oluşturabilir. Örneğin, embriyogenez sırasında senesens, bazı proseslerin fizyolojik olarak durdurabileceği bir mekanizma olduğu gösterilmiştir. [43]. Diğer yandan, senesent hücrelerden salgılanan SASP faktörlerinin, tümör çevresinde makrofaj fonksiyonunu ve lenfosit infiltrasyonunu etkilediği ve böylelikle senesent hücrelerinin, bağışıklık sistemi tarafından ortadan kaldırılmasını indükleyerek antitümör etkisi bulunduğu gösterilmiştir [44]. Farklı dokulardaki senesent hücrelerden salgılanan SASP faktörleri değişkenlik gösterdiği için senesent hücrelerin kanser oluşmasında pozitif veya negatif etkisi olabilmektedir [45]. Senesent insan fibroblastlarına maruz kalan epitel hücrelerinin farklılaşma özelliklerini kalıcı olarak kaybettiği, invazif hale geldiği, neoplastik transformasyona uğradığı ve tümör vaskülarizasyonunu uyardığı gösterilmiştir [46–48]. SASP, komşu hücrelerin inflamasyonunu, fibrozunu ve apoptozunu indüklediği gösterilmiştir [47]. Senesent fibroblastlardan salgılanan SASP'ın, insan meme tümör hücrelerinin tümörigenezini artırdığı gösterilmiştir [47]. Bu çalışmalardan, SASP faktörlerini protümörijenik olduğu sonucu düşünülmektedir. SASP faktörleri; çözünür sinyal faktörleri (interlökinler, kemokinler ve büyüme faktörleri), proteazlar ve çözünmeyen proteinler/hücre dışı matris (ECM) bileşenleri olarak kategorilere ayrılabilir.

Çözünür Sinyal Faktörleri: Senesent hücreler, komşu hücreleri etkileyecek interlökinler, inflamatuvar sitokinler ve büyüme faktörleri salgılar [49].

IL-6: SASP'nin en belirgin pleiotropik proinflamatuvar sitokini interlekin-6'dır (IL-6) [3]. IL-6'nın, fare ve insan keratinositlerinin, melanositlerinin, monositlerinin, fibroblastlarının ve epitel hücrelerinin DNA hasarı ve onkojenik stresin neden olduğu senesens ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [50–53]. IL-6 salgılanması, p53 yolundan bağımsız olarak kalıcı DNA hasar sinyalleme (ATM ve CHK2) tarafından doğrudan kontrol edildiği gösterilmiştir [54]. IL-6 ekspresyonu yoluyla, senesent hücreler, yüzeylerinde IL-6R (gp80) ve gp130 sinyal kompleksini eksprese eden çeşitli fonksiyonlara ve kökenlere sahip epitel ve endotelial hücreleri doğrudan etkilemektedir [49]. Meme kanserinde, senesent fibroblastlardan yüksek seviyede salgılanan IL-6, tümör invazivliğinin artırılmasından sorumlu olduğu gösterilmiştir [55].

IL-1: Hem IL-1 α hem de - β aşırı eksprese edilir ve senesent endotelial hücreler, fibroblastlar ve kemoterapi indüklü senesent epitel hücreleri tarafından salgılanır [56–59]. Bu sitokinler, birincil olarak nükleer faktör kappa B'yi indükleyen ve protein 1 yollarını aktive eden hücre yüzeyi reseptörleri (IL-1 reseptörü / Toll benzeri reseptör süper ailesi) aracılığıyla komşu hücreleri etkileyebilir [60].

Kemokinler (CXCL ve CCL): Senesent hücrelerin çoğu, GRO α ve GRO β (CXCL-1 ve -2; murin CXCL-1, KC olarak adlandırılır) ile birlikte IL-8'i (CXCL-8) aşırı eksprese eder [53,61,62]. Genellikle senesent hücrelerde upregüle edilen CCL ailesi üyeleri arasında MCP-2, -4 ve -1 (CCL-8, -13 ve -2); HCC-4 (CCL-16); eotaksin-3 (CCL-26); ve makrofaj inflamatuvar protein (MIP) -3 α ve -1 α (CCL-20, -3) yer alır. MCP-3 (CCL-7), senesent karaciğer yıldız hücreleri ve prostat ve deri fibroblastları tarafından aşırı eksprese edilir. Onkojenik RAS ile senesensin indüklendiği fibroblastlar, yüksek seviyelerde MCP-3 ve I-309 (CCL-1) salgılar. Ek olarak, hem RAS tarafından senesense indüklenen fibroblastlar hem de karaciğer hasarıyla senesense neden olan yıldız hücreleri, CXCL ailesinin diğer iki üyesi olan GCP-2 (CXCL-6) ve ENA-78'in (CXCL-5) yüksek seviyelerini salgılar [49]. Senesent prostat fibroblastlarında aşırı PF-4 (CXCL-4) ve SDF-1 (CXCL-12) ekspresyonu gözlemlendi [63,64]. Son zamanlarda, onkogen indüklü senesens geçiren hücrelerin çoklu CXCR-2 (IL-8RB) -bağlayıcı kemokin salgıladığı gösterilmiştir [25].

IGF Yolu: İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF) / IGF reseptör ağı ayrıca senesent hücrelerin mikro çevrelerine uyguladıkları etkiye katkıda bulunur [49]. Senesent endotel, epitel ve fibroblast hücreleri, IGFBP-2, -3, -4, -5 ve -6 ve bunların düzenleyicileri dahil

olmak üzere hemen hemen tüm IGF bağlayıcı proteinleri ('ler) yüksek seviyelerde eksprese ederler [51,65–68] Son zamanlarda, primer fibroblastlarda BRAF onkogeninin aktivasyonunun, komşu hücrelerde senesens ve apoptozu indüklemek için otokrin / parakrin yollarla yoluyla etki eden IGFBP-7'nin salgılanmasına yol açtığı gösterilmiştir [69].

Diğer: Ek olarak, tümör nekroz faktör alfa için salgılanan bir tuzak reseptörü olan osteoprotegerin, senesent fibroblastların hücre dışı ortamında yüksek seviyelerde mevcuttur. Senesens sırasında upregüle edilen diğer moleküller arasında prostaglandin E2 (PGE2) ve PGE2 ve diğer prostaglandinlerin üretiminden sorumlu enzim olan Cox-2 bulunur [49,52,70].

Ekstraselüler proteazlar: Çözünür sinyal sitokinlerinin ve büyüme faktörlerinin salgılanmasına ek olarak, senesent hücreler ayrıca matris metaloproteinazlar (MMP'ler) gibi proteazlar da salgılar [49].

MMP ailesi: Replikatif veya stres indüklü senesens geçiren insan ve fare fibroblastlarında sürekli olarak upregüle edilen MMP ailesi üyeleri, stromelisin-1 ve -2 (sırasıyla MMP-3 ve -10) ve kolajenaz-1 (MMP-1) [71,72]. Senesent hücreden sekrete edilen SASP'da bulunan MMP'lerin, hücre migrasyonunu ve invazyonunu indüklediği gösterilmiştir [5,49,73]. Ayrıca senesent fibroblastlardan MMP salgılanması, çoklu epitel hücre tiplerinin invazyonunu artırabildiği ve senesent stromal hücreler, kanser hücrelerinin metastaz yapmasına neden olan EMT'yi uyarabildiği gösterilmiştir [5–7].

Serin Proteazlar ve inhibitörleri: Karsinogenezde yer alan ve SASP'de bulunan bir başka proteaz ailesi, serin proteazlar ve plazminojen aktivasyon yolunun düzenleyicileridir [49]. Bu ailenin üyeleri arasında ürokinaz veya doku tipi plazminojen aktivatörleri (sırasıyla uPA veya tPA), uPA reseptörü (uPAR) ve bu serin proteazların (PAI-1 ve -2) inhibitörleri bulunur [74].

Hücre Dışı Çözünmeyen Moleküller: Fibronektin, bağ dokusunda, hücre yüzeylerinde, plazma ve diğer vücut sıvılarında bulunan büyük bir glikoproteindir. Hücre yüzeyi reseptörleri, hücre iskeletinin bileşenleri ve diğer ECM molekülleri dahil olmak üzere çeşitli makromoleküllerle etkileşime girer. Fibronektin, başta integrinler olmak üzere hücre yüzeyi reseptörleriyle olan etkileşimleri sayesinde hücre adhezyonunu, canlılığının devamını,

büyümesini ve göçünü etkileyebilir [49]. Erken yaşlanan Werner sendromu fibroblastlarında fibronektin üretimi upregüle edilir [75]. Dahası, kültürde ve in vivoda senesens geçiren hücreler fibronektin ekspresyonunu artmıştır [76].

Protein olmayan salgılar: Bu salgılar, Reaktif oksijen türleri ve iyonlardır. Örneğin, senesent hücrelerin, indüklenebilir nitrik oksit sentaz, endotelial nitrik oksit sentaz ve süperoksit-dismutaz aktivitelerindeki değişiklikler nedeniyle nitrik oksit ve reaktif oksijen türlerini serbest bıraktığı gösterilmiştir [77,78]. Senesent fibroblastlardan salgılanan MMP'lerin mitojenik ve kemotaktik sinyalleri kolaylaştırdığı için, meme epitel hücrelerinin tümörijenitesini artırmaktan sorumlu olduğu gösterilmiştir [47,49,72,79]. İnsan prostat bezinden gelen senesent fibroblastların, prostat epitel hücrelerinin hiperproliferasyonuna neden olan mikroçevre oluşturduğu gösterilmiştir [64]. Bu çalışmalar, SASP'ın, neoplastik transformasyonu ve vaskülarizasyonu artırarak kanser oluşmasına neden olarak olumsuz etki gösterdiği düşünülmektedir.

2.2.5. Senesens ve kanser

Son çalışmalar, senesent hücrelerden salgılanan SASP'da bulunan büyüme faktörleri, sitokinler ve proteazların karsinogenezi destekleyebileceğini göstermektedir. SASP faktörlerinin farelerde tümör proliferasyonunu uyarmasının yanı sıra, kültürde epitel hücrelerden mezenkimal hücrelere transformasyon gibi premalign olan metaplaziyi uyardığı gösterilmiştir [6]. Bu transformasyon, değişmiş hücrelerin dokulara göçü ve yayılmasına neden olur ve metastatik kanserin oluşmasında önemlidir [6]. Bu bağlamda, senesent hücrelerin kanserin oluşması ve gelişmesi için mikroçevre oluşturduğu düşünülebilir. Kanser hücrelerinde senesense uğradığı birçok çalışmada gösterilmiştir [80–83]. DNA'ya zarar veren radyasyon veya kemoterapötik ajanlara yanıt olarak senesent kanser hücreleri, komşu tümör hücrelerini aynı kemoterapötik ajanlara karşı koruyan faktörler salgıladığı gösterilmiştir [84,85]. Senesent tümör hücrelerinde salgılanan SASP ile senesent normal hücrelerden salgılanan SPS içeriklerinde farklılıklar ve benzerlikler bulunmaktadır [35,49]. Örneğin; IL-6 ve IL-8 sitokinlerinin hem senesent tümör hücrelerinde hemde senesent normal hücrelerde sekresyonu artarken, kemokin ve proteaz sekresyonunda farklılıklar olduğu gösterilmiştir [49,83,86]. Senesent hücrelerin, IL-6 ve IL-8 salgılanmasıyla premalign epitel hücrelerinde ve agresif olmayan kanser hücrelerinde epitelden mezenkime transformasyonu indüklediği gösterilmiştir [7,47,51]. Ekstrasellüler

matriks bileşenlerini yıkıma uğratan, matris metalloproteinaz (MMP), senesent kanser hücrelerin sekretomunda belirgin şekilde arttığı gösterilmiştir [49,83]. SASP bileşenlerinden MMP3 (stromelisin) , tümör kaynaklı anjiogenezi uyaran VEGF, amfiregulinin tümör hücrelerinin yayılmasını artırdığı gösterilmiştir [48,64,72]. CXCL12, senesent fibroblastlardan salgılanmadığı, ancak senesent kanser hücrelerinden salgılandığı gösterilmiştir [83,86]. Salgılanan CXCL12'n, nonsenesent kanser hücreleri oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir [83,87]. Senesent kanser hücreleri, nonsenesent kanser hücreleri ile etkileşime girerek kanser hücresi migrasyonunu ve metastazı ile ilişkili olduğu bilinen CXCL12 salgıladığı gösterilmiştir [83]. Ek olarak, senesent tümör hücreleri, lenfatik damarlarda anoik hücre ölümünü önleyerek, tümör hücrelerinin hayatta kalmasına ve hedef organlara metastaz yapmasına neden olduğu gösterilmiştir [83]. Bütün bu çalışmalardan, senesent hücrelerden salgılanan SASP faktörlerinin kansere neden olduğu düşünülmektedir.

Kanser tedavi yanıtında senesensin rolü

Yaygın olarak kullanılan kanser tedavileri, ya tümörlü ya da tümör olmayan hücre ve dokularda hücresel senesensi indüklenmesi ile ilişkilendirilmiştir [88]. Bu senesense neden olan kanser tedavileri beş gruba ayrılabilir: kemoterapi, radyoterapi, CDK4/6 inhibitörleri, epigenetik modülatörler ve immünoterapi [88].

Kemoterapi:

Kemoterapi apoptoz yoluyla kanser hücresinin ölümüne neden olduğu bilinmektedir. Pek çok kemoterapi DNA hasarına (DNA ipliği kırılmaları veya çapraz bağlanma) neden olur; bu DNA hasar cevabı hücre ölümüne neden olabilir veya uyarının derecesi ve şiddetine bağlı olarak ölümcül olmayan bir DDR'yi indükleyerek akut veya kronik senesense neden olabileceği gösterilmiştir [3]. Hücre ölümü veya senesens durumu hücrede bulunan p53 veya p16INK4A gibi tümör supresör genlere bağlıdır [89]. Yüksek dozlarda kemoterapi hücre ölümüyle sonuçlanırken, orta düzey dozlarda hücresel senesens ile sonuçlanabileceği gösterilmiştir [90]. Kemoterapi türleri DNA'ya farklı yollardan hasar verirler. Doksorubisin en yaygın topoizomerez inhibitörüdür ve akciğer, meme, lenfoma ve akut lenfositik lösemi gibi çeşitli kanserleri tedavi etmek için kullanılmaktadır [91]. Doksorubisinin, topoizomerez 2'yi inhibe ederek DNS çift sarmalının kapanmasını önlediği, DDR'yi indüklediği ve

böylece hücrel senesense neden olduğu gösterilmiştir [90]. Yine bir çalışmada orta dozda doksorubisin, farklı kanser hücresi dizilerinde senesensi indüklediği gösterilmiştir [1].(Çizelge 1) Etoposid ve kamptotesin, kanser tedavisinde kullanılan diğer topoizomera inhibitörleridir. Etoposid (900nM) HT1080 hücrelerinde senesensi indüklediği gösterilmiştir [1]. Sisplatin ve temozolomid, hücrel senesensi indükleyebilen tipik alkilleyici ajanlardır ve sisplatin (2.2 µM) HT1080 hücrelerinde senesensi indüklediği gösterilmiştir [1]. Paklitakselin, MCF7 hücreleri ve endotel hücreleri, kemik iliği mononükleer hücreleri, insan ve fare fibroblast hücre dizilerinde senesense neden olduğu gösterilmiştir [92–94]. Neoadjuvanla tedavi edilen meme kanseri hücrelerinin %41'i, tedavi edilmemiş vakalarında %10'u senesens belirteciyle boyandığı gösterilmiştir ve böylece senesensin CAF (siklofosamid, adriamisin, flurourasil) kemoterapisi ile indüklendiği sonucuna varılmıştır [89]. Küçük hücreli akciğer kanseri hastaları taksan ve karboplatin ile tedavi edildiğinde senesens biyobelirteçlerinin arttığı görülmüş [95]. Fakat, apoptoz geçiren kanser hücreleri kalıcı olarak uzaklaşırken, senesent hücreleri metabolik olarak yaşamaya devam eder ve olumlu/olumsuz etki gösteren SASP faktörleri salgılar [60]. İn vitro çalışmalarda ve insan kanser hücrelerinde senesent hücrelerin varlığının kemoterapi direnci geliştirmede önemli olduğu gösterilmiştir [4]. Bu nedenlerden dolayı kemoterapiye yanıt olarak senesens karmaşık bir durumdur.

Çizelge 2.1. Kanser hücrelerinde yapılan in vivo çalışmalarla senesensi indüklediği bilinen doksorubisin konsantrasyonları [1].

Hücre dizisi	Tümör tipi	Doksorubisin Konsantrasyonu
HT1080	Fibrosarkom	20–30 nM
HCT116	Kolon kanseri	50 nM
MCF-7	Meme kanseri	12–50 nM
HepG2	Hepatosellüler karsinom	250–500 nM
A2780	Yumurtalık kanseri	20–50 nM
LNCaP	Prostat karsinomu	100–500 nM
HeLa	Rahim ağzı kanseri	400–800 nM
HEp-2	Larinks karsinomu	50–100 nM
DLD1	Kolon kanseri	100–500 nM
SW480	Kolon kanseri	100–150 nM
U251	Glioma	200 nM
MDA-MB-231	Meme kanseri	50 nM
PC3	Prostat karsinomu	100 nM
Saos2 ^g	Osteosarkom	50–60 nM

Radyoterapi:

Kanser tedavisinde kullanılan radyoterapi direkt olarak DNA hasarı yapar ve kanser hücreleri üzerinde geniş etkilere sahiptir. Radyoterapi uygulanan kanser hücrelerinde DNA onarımı mümkün değilse; DNA hasar cevabı tetiklenir; hasarın şiddeti fazla ise hücre ölümü ve hasarın şiddeti az ise hücresel senesensin meydana geldiği gösterilmiştir [96].

CDK4/6 İnhibitörleri

CDK4 ve CDK6, G1'den S fazına hücre döngüsü geçişi için kritik faktörlerdir [97]. CDK4/6 inhibitörleri, p16'nın etki mekanizmasını taklit ettiğinden, hücresel senesensi indüklemesi, tedavinin olası bir sonucu olarak kabul edilmiştir [98]. Palbociclib'in meme ve mide kanseri, melanom, liposarkom ve hepatosellüler karsinomda hücresel senesensi indüklediği gösterilmiştir [93,99–102].

Epigenetik Modülatörler

5-Aza-2'-deoksisitidin (5-aza), DNA metiltransferazın (DNMT) bir inhibitörüdür [103] 5-aza uygulanması, osteosarkom hücrelerinde (U2OS) p16 upregülasyonu ve büyümenin durmasını indüklediği ve akciğer mezotelyoma hücrelerinde (H28) SA-β galaktosidaz aktivitesini ve DDR'yi arttırdığı gösterilmiştir [104] . Vorinostat olarak da bilinen suberoylanilid hidroksamik asit (SAHA), kutanöz T hücre lenfomasını tedavi etmek için ABD FDA tarafından onaylanmış bir histon deasetilaz (HDAC) inhibitörüdür [105]. SAHA'nın kolon kanseri hücrelerinde (HCT116) çeşitli senesens fenotiplerini ve insan lösemi hücre dizilerinde (MOLM-7, HL-60 ve JURL-MK1) ve ürotelyal karsinom hücrelerinde senesens benzeri büyüme durmasını indüklediği gösterilmiştir [106–108].

İmmünoterapi

Riuximab, lösemi ve lenfoma tedavisinde kullanılan bir CD20 hedefleyen antikordur. Riuximab, B hücreli lenfoma hatlarında senesensi indüklediği gösterilmiştir [109].

2.3. Senoterapötikler

Senesensin, başlarda doku onarımı, yara iyileşmesi, embriyonik gelişim gibi yararlı etkileri biliniyordu. Zamanla senesensin, yaşa bağlı ciddi patolojik durumların başlamasına ve ilerlemesine neden olduğu da gösterilmiştir [3]. Senesent hücreler; nörodejeneratif ve metabolik hastalıklar, kanser, kardiyovasküler anormallikler, karaciğer, kemik, deri ve enfeksiyöz hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir [110]. Senoterapötikler; senesens sürecini engelleyerek ve geciktirerek yaşa bağlı bozukluklar üzerinde terapötik bir etki oluşturan yeni bir ilaç grubudur. Senesent hücreleri seçici olarak öldürülmesi (senolitik) ve SASP blokajı (senomorfik) olmak üzere iki grupta incelenir.

2.3.1. Senolitikler

Senolitikler, senesent hücreleri seçici olarak ortadan kaldıran ilaç sınıfıdır. Senesent hücreler, apoptoza dirençlidir ve kendi inflamatuvar senesens ile ilişkili salgı fenotipine (SASP) karşı koruyan ve komşu hücreleri öldürmelerine rağmen hayatta kalabilen anti-apoptotik yollara sahiptir. Senolitikler, senesens hücre anti-apoptotik yolu (SCAP) devre dışı bırakarak, senesent hücrelerin SASP ile apoptozisine neden olur [111]. Senesent hücrelerin yeniden birikmesi haftalar aldığı için, senolitikler aralıklı olarak uygulanabilir. Klinik öncesi modellerde, senolitikler, kanserleri ve kardiyovasküler, nöropsikiyatrik, karaciğer, böbrek, kas-iskelet sistemi, akciğer, göz, hematolojik, metabolik ve cilt bozukluklarının yanı sıra organ nakli, radyasyon ve kanser tedavisinin komplikasyonlarını geciktirir, önler veya hafiflettiği gösterilmiştir [111]. 2015 yılında, dasatinib (kinaz inhibitörü) ve bir flavonoid olan quercetin ilk bulunan senolitiklerdendir [112]. Şimdiye kadar, kinaz inhibitörleri, Bcl-2 ailesi inhibitörleri, doğal bileşikler, p53 bağlanma inhibitörü, ısı şoku proteini 90 (HSP90) inhibitörleri, UBX0101 ve histon deasetilaz (HDAC) inhibitörü dahil olmak üzere yedi sınıf senolitik bulunmuştur [113]. Dasatinib ve quercetin kombinasyonu yaşlanmış, radyasyona maruz kalan ve Ercc1- Δ / -progeroid farelerde senesent hücrelerin yükünü azalttığını ve bunun da yaşam süresinin uzamasına ve yaşa bağlı patolojilerin azalmasına neden olduğunu gösterilmiştir [112]. Dasatinib ve quercetin'in kombine uygulaması ile dokulardaki senesent hücrelerin temizlenmesi, kardiyak yaşlanma, ateroskleroz, osteoporoz, pulmoner fibroz, hepatik steatoz ve Alzheimer hastalığı dahil olmak üzere çeşitli yaşa bağlı patolojilerini iyileştirdiği gösterilmiştir [112,114–118]. Son zamanlarda, dasatinib ve kersetin kombinasyonunun yaşlı farelerde fiziksel işlevi

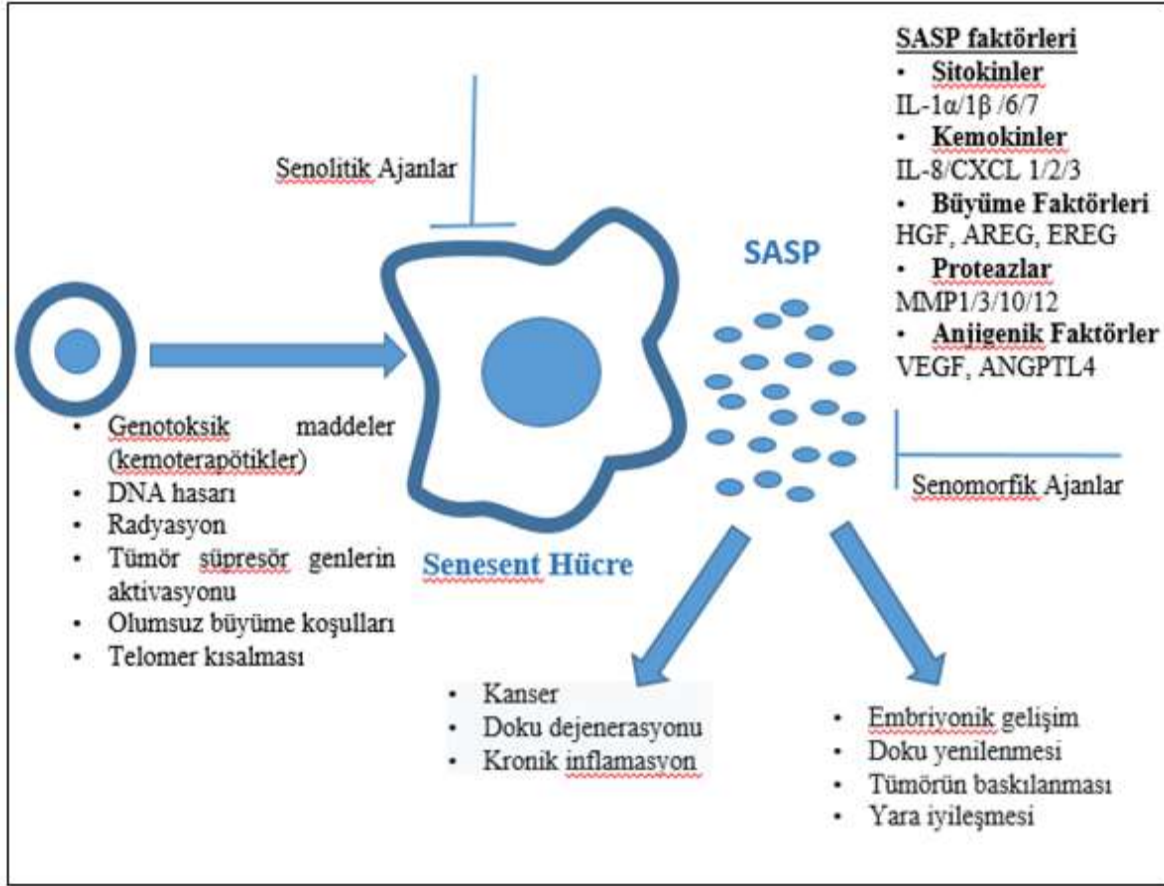
iyileştirdiği ve sağlık süresini ve ömrünü uzattığı bildirildi [119]. ABT-263, ABT-737, A1331852 ve A1155463, in vitro ve in vivo modellerde senolitik adaylar olarak rapor edilmiştir [2]. Anti-apoptotik Bcl-2, Bcl-xL ve Bcl-W'nin inhibitör alanına bağlanan ABT-263, ışınlanmış veya normal yaşlanmış farelerde senesent hücrelerini, senesent kemik iliği hematopoetik kök hücrelerini (HSC'ler) ve senesens kas kök hücrelerini (MuSC'ler) etkili bir şekilde ortadan kaldırdığı gösterilmiştir [120]. ABT-263, senesent insan umbilikal ven epitel hücreleri (HUVEC'ler), senesent IMR90 insan akciğer fibroblastları ve senesent murin embriyonik fibroblastların (MEF'ler) canlılığını seçici olarak azalttığı gösterilmiştir [121]. ABT-737, etoposid, H-Ras aktivasyonu ve in vitro replikasyon ile indüklenen senesent IMR90 hücrelerini seçici olarak öldürmüştür [122]. ABT-737 uygulanması aynı zamanda ışınlanmış farelerin senesent akciğer epitel hücrelerini ve p14ARF transgenik farelerin senesent epidermal hücrelerini ortadan kaldırıldığı gösterilmiştir [122]. A1331852 ve A1155463, seçici Bcl-xL inhibitörleri, radyasyona bağlı senesent HUVEC'lerin ve IMR90 hücrelerinin apoptozunu indüklediği gösterilmiştir [123]. HSP90 inhibitörleri, 17-N-alilamino-17-demetoksi geldanamisin (17-AAG) ve geldanamisin, oksidatif stres kaynaklı senesent Ercc1 γ^{Δ} fare embriyonik fibroblastlarında (MEF'ler) 97 otofaji düzenleyicinin taranmasından yeni bir senolitik aday sınıfı olarak önerilmiştir [124]. Bu HSP90 inhibitörleri, in vitro oksidatif stres, radyasyon veya replikasyon ile indüklenen senesent MEF'lerin, senesent murin mezenkimal kök hücrelerin (MSC'ler), senesent IMR-90, senesent HUVEC'lerin ve senesent WI-38 hücrelerinin apoptozunu indüklediği gösterilmiştir [124]. P16Ink4a pozitif hücreleri seçici olarak elimine ettiği ve böylece yaşla ilişkili çeşitli semptomların başlamasını geciktirdiği ve sonuçta Ercc1 γ^{Δ} - progeroid farelerin yaşam süresinin uzadığı gösterilmiştir [124]. İn vitro deneylerde quercetin'e ek olarak doğal fitokimyasallar, piperlongumine (PL) ve fisetin'in senolitik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir [2]. Fisetin, IR kaynaklı senesent HUVEC'leri seçici olarak öldürmüştür [123]. UBX0101'in eklem içi enjeksiyonu, eklem kıkırdağında ve sinovyumda biriken senesent hücreleri ortadan kaldırmış ve yaşlı farelerde travma sonrası osteoartrit (OA) gelişiminde zayıflama ile sonuçlanmıştır [125]. Primer hücrelere ek olarak, kanser hücrelerini hedefleyen senolitikler de önerilmiştir. FDA onaylı HDAC inhibitörü panobinostat, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom hücre dizilerinde kemoterapi ile indüklenen senesens de senolitik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir [126]. Standart kemoterapi sırasında, kanser hücrelerinde histon asetilasyonunda azalma, Bcl-2 familyası proteinlerinde artış ve SASP üretimi gibi senesens ile ilişkili olaylar meydana geldiği gösterilmiştir [83,127]. Kemoterapiye indüklediği

senesensin, tiroid kanserinde epitelyalden mezenkimal geçişe bağlı olarak kanser hücrelerinin artan invazyonunda ve ayrıca B hücreli lenfomada kök hücre ile ilgili özelliklerin kazanılmasında rol oynadığı gösterilmiştir [83,127]. Bu nedenle, senesent kanser hücrelerini hedefleyen senolitikler, kanser metastazı ve kanser kökü tedavisi için yeni bir strateji olabilir [2]. Forkhead box protein O4 (FOXO4), senesens hücrelerin canlılığında rol oynayan önemli bir protein olarak bilinmektedir. IR indüklü senesent IMR90 hücrelerinden RNA sekans verilerinin biyoinformatik analizini kullanarak, FOXO4-D-retro-inverso-(FOXO4-DRI) peptidinin yeni bir senolitik aday sınıfı olduğu gösterilmiştir. FOXO4-DRI peptidi, senesens hücrelerde FOXO4 ve p53'n etkileşimini blloke ederek, senesent IMR90 hücreleri ve HUVEC'lerin apoptozunu indüklediği gösterilmiştir [128]. Peptitin uygulanması, hem XpdTTD/TTD-progeroid hem de doğal olarak yaşlanan farelerde böbrek fonksiyonlarını ve sa yoğunluğunu iyileştirildiği gösterilmiştir [128]. Senolitik ilaçlar üzerindeki çalışmalar devam etmektedir. Çoğu senolitik p53, HSP90,Bcl-2,Bcl-Xl gibi bilinen proteinleri hedeflediği gösterilmiştir ve senolitik ajanların daha da geliştirilmesi için hcreysel senesense özgü yeni hedeflerin açıklanması gerekmektedir [2].

2.3.2. Senomorfikler

Apoptozu indklemeden senesens belirteçlerini ve salgılama fenotipini baskılayan ilaç sınıfıdır. Senomorfikler arasında, telomerez aktivatörü, CRM'ler, kalorik kısıtlama diyetleri, sirtuin aktivatörleri, mTOR inhibitörleri, antioksidanlar, senoinflamasyonu veya inflamasyonu hedefleyen inflamatuvar ajanlar, otofaji aktivatörleri ve proteazom aktivatörleri gibi senesens karşıtı veya antisenesens bileşikleri bulunduğu gösterilmiştir [129]. Senoinflamasyon veya inflamasyon, senesens ile karakterize edilen kronik, steril, düşük dereceli ve çözülmemiş inflamasyon demektir [2]. Yaşlanma ve yaşa bağlı hastalıklarda aktive olan nükleer faktör-kappa B (NF-κB), senoinflamasyon veya inflamasyona aracılık eden anahtar bir transkripsiyon faktörüdür ve aktivasyonu, insülin/insülin benzeri büyüme faktörü (IGF)-1, FOXO, SIRT, mTOR ve DNA hasarı gibi yaşlanma sürecinin bilinen düzenleyicileri ile bağlantılıdır [130]. Bu nedenle, NF-κB'nin inhibisyonu, senomorfiklerin potansiyel bir hedefi olarak önerilmiştir [130]. IKK'nın bir peptit inhibitörü, NF-κB -aktive edici kinaz, in vitro ve in vivo hcreysel senesensi azalttı ve Ercc1-Δ -progeroid farelerin yaşa bağlı semptomlarını ve patolojilerini geciktirdi [131]. SASP, Janus kinaz (JAK)/STAT yolu tarafından düzenlenir ve senesent hücrelerde JAK'ın farmakolojik inhibitörleri, yaşlı farelerde senoinflamasyonu baskıladığı, yaşa bağlı doku fonksiyon bozukluğunu hafiflettiği

ve fiziksel olarak fonksiyonu arttırdığı gösterilmiştir [132]. Ataksi-telanjektazi mutasyona uğramış (ATM) kinaz, DNA çift sarmal kopmaları ile aktive edilen bir serin/treonin protein kinaz, hücrel senesensin düzenlenmesinde yer alır [133]. Bu nedenle ATM kinaz inhibitörü KU-60019, potansiyel bir senomorfik aday olarak tanımlanmıştır. KU-60019, mitokondriyal fonksiyonel iyileşme ve metabolik yeniden programlama ile birlikte lizozom/otofaji sisteminin fonksiyonel iyileşmesini indüklemiştir [134]. Hutchison-Gilford progeria sendromunda (HGPS) yer alan kesilmiş bir lamin A proteini olan progerin, normal insan fibroblastlarının hücrel senesensi sırasında ilerleyici telomer kısalması ile birikir [135]. Progerin ve lamin A/C'nin bağlanmasını engelleyen küçük bir molekül olan JH4, senomorfik bir aday olduğu gösterilmiştir [135]. JH4, HGPS ve yaşlı hücrelerde nükleer deformasyonu hafifletti ve büyüme durması ve SA- β -G aktivitesi gibi senesens belirteçlerini tersine çevirdiği gösterilmiştir [136]. JH4'ün uygulanması, HGPS-progeroid farelerde yaşa bağlı birkaç patolojiyi ve uzun yaşam süresini belirgin şekilde hafifletti [136]. Juglanin, quercetin 3-O- β -D-glucuronide, (-)-loliolide ve quercetagenin 3,4'-dimetil eter dahil olmak üzere bitkilerden elde edilen doğal bileşikler, senesent HDF'ler ve HUVEC'lerde SA- β -G ve p53 seviyelerini düşürdüklerinde senomorfik adaylar olarak tanımlanmıştır [2,137–140]. Rapamisin, hücre proliferasyonu ve hayatta kalma ile ilgili önemli işlevlere sahip molekül olan mTOR kinazın seçici bir inhibitörüdür. Rapamisin, mTOR için allosterik bir ligand görevi gören doğal bir makrolidir ve esas olarak klinik uygulamada bir immünosupresan olarak kullanılmaktadır [141]. Rapamisin, SASP'yi azaltarak senomorfik olarak etki göstermektedir [142]. Fisetin, bazı hücre tipleri üzerinde senomorfik etkilere sahipken, diğerleri üzerinde senolitik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir [123].



Şekil 2.1. Senesens gelişimi, SASP'ın etkileri ve SASP üzerine etkili olan senoterapötik ilaçların şematik gösterimi. (IL: interlökin, CXCL: kemokin ligand, HGF: Hepatosit büyüme faktörü, AREG: amfiregülin, EREG: epiregülin, MMP: matriks metalloproteinaz, VEGF: vasküler endotelial büyüme faktörü, ANGPTL: Anjiyopoietin benzeri protein)

2.4. Teofilin

Teofilin, astım ve kronik obstrüktif akciğer hastalığının (KOAH) tedavisi için hala en yaygın olarak kullanılan ilaçlardan biridir. Teofilin (dimetilksantin), çay ve kakao çekirdeklerinde eser miktarda bulunur. Yaygın kullanılmasına rağmen, teofilin, kötü kontrollü hastalığı olan hastalarda ek tedavi olarak üçüncü basamak bir tedavi haline gelmiştir, çünkü inhale β 2-agonistler bronkodilatör olarak çok daha etkilidir ve inhale kortikosteroidler daha büyük bir antiinflamatuvar etkiye sahiptirler. Teofilin için çeşitli etki mekanizmaları ileri sürülmektedir, ancak bunların çoğu klinik olarak kullanılan konsantrasyonlardan daha yüksek konsantrasyonlarda (10^{-5} M) meydana geldiği gösterilmiştir [143]. Teofilinin terapötik konsantrasyonu için serum düzeyi 8-12 μ g/ml (44,4 μ M-66,6 μ M) kabul edilir, son yıllarda 5-10 μ g/ml'de (27,7 μ M-55 μ M) antiinflamatuvar etkisi anlaşılmıştır. 10 μ g/ml (55 μ M)

üzerinde serum düzeyi arttıkça bronkodilatör etkisi buna paralel artmaktadır. Serum düzeyi $>20 \mu\text{g/ml}$ ($111,11 \mu\text{M}$) olduğunda yan etkiler ortaya çıkmaya başlamaktadır [144]. Astımlı hastalarda düşük doz teofilin, solunan bir alerjen tarafından indüklenen eozinofiliyi inhibe eder ve interlökin-5 ve interlökin-6 sitokinlerin ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir [9,145,146].

2.4.1. Teofilin etki mekanizması

Fosfodiesteraz (PDE) inhibitörü

PDE, hücrede siklik nükleotidleri parçalayan, böylece hücre içi cAMP ve siklik guanozin 3,5-monofosfat konsantrasyonlarında bir artışa yol açan bir enzimdir. Teofilin PDE'lerin zayıf ve seçici olmayan bir inhibitörüdür [144]. Teofilinin, PDE aktivitesini (PDE3, PDE4 ve PDE5) inhibe ederek hava yolu düz kasını gevşettiğine dair in vitro kanıtlar vardır, fakat maksimum etki için yüksek konsantrasyonlara ihtiyaç vardır [147]. PDE inhibisyonu, plazma konsantrasyonu arttıkça teofilinin mide bulantısı ve baş ağrısı gibi yaygın yan etkileri için önemli olabilir.

Adenozin reseptör antagonizması

Teofilin, A3 reseptörlerine karşı daha az etkili olmasına rağmen, A1- ve A2-reseptörlerinin antagonizmi ile terapötik konsantrasyonlarda adenosin reseptörlerinin güçlü bir inhibitörüdür [148]. Adenosin, normal insan hava yolu düz kası üzerinde in vitro çok az etkiye sahip olmasına rağmen, histamin ve lökotrien salımı yoluyla astımlı hastaların hava yollarını daraltarak adenozinin duyarlılaştırılmış mast hücrelerinden aracılığıyla salındığını düşündürür [149]. İnhal edilen adenozin monofosfat astımı olan kişilerde bronkokonstriksiyona neden olur ve bu teofilinin terapötik konsantrasyonları ile önlenir [150].

İnterlökin-10 salgılanması

İnterlökin-10, geniş bir antiinflamatuvar etki yelpazesine sahiptir ve astımda salgılanmasının azaldığına dair kanıtlar vardır [151]. İnterlökin-10 salınımı teofilin tarafından artırılır ve bu

etki, astımda etkili olan düşük dozlarda görülmemiş olmasına rağmen, PDE inhibisyonu yoluyla aracılık edilebilir [152].

Transkripsiyon üzerindeki etkisi

Teofilin, proinflamatuvar transkripsiyon faktörü nükleer faktör-B'nin nükleusa translokasyonunu önler, böylece potansiyel olarak astım ve KOAH'da inflamatuvar genlerin ekspresyonunu azaltır. Bu etki yüksek konsantrasyonlarda görülmektedir [153].

Hücre yaşamı üzerine etkisi

Teofilin, in vitro antiapoptotik protein Bcl-2'yi azaltarak nötrofillerde apoptozu indüklemektedir. Teofilin ayrıca T lenfositlerin apoptozunu indükler, böylece hayatta kalmalarını azaltır ve bu etkiye PDE inhibisyonu aracılık ettiği düşünülmektedir [154]. Teofilin ayrıca oksidatif stres tarafından aktive edilen ve NAD düzeylerinde azalmaya yol açan poli(ADPribose)polimeraz-1 (PARP-1) enzimini de inhibe ederek hücre ölümüne yol açan bir enerji krizine neden olur [155].

Histon deasetilaz (HDAC) aktivasyonu

Düşük terapötik konsantrasyonlarda (~5 mg/L) teofilin, özellikle oksidatif stres altında, histon deasetilazları aktive eder [156]. HDAC2 aktivitesinin ve ekspresyonunun azaldığı KOAH hücrelerinde, teofilin (10^{-6} M), HDAC2 aktivitesini normale döndürür ve bu hücrelerdeki kortikosteroid direncini tersine çevirir [157]. Teofilinin bu etkisi, PDE inhibisyonu ve adenosin reseptör antagonizmasından bağımsızdır, ancak oksidatif stres tarafından aktive edilen ve fosforilasyon yoluyla HDAC2 aktivitesinin inhibisyonunda yer alan fosfoinositid-3-kinaz- δ 'nin (PI3K- δ) seçici inhibisyonundan kaynaklanmaktadır. [158] Artan reaktif oksijen türleri ve indüklenebilir nitrik oksit sentazın artan ekspresyonundan kaynaklanan nitrik oksit, HDAC2'deki tirozin kalıntılarını nitratlayarak etkisizleşmesine ve bozulmasına neden olan peroksinitrit radikallerinin oluşumuna neden olur [159]. Teofilin, peroksinitrit oluşumunu azaltır, böylece astım ve KOAH'ta HDAC2 fonksiyonunu artırmak için başka bir mekanizma sağlar [160]. Histon deasetilaz 2 (HDAC2), hücre siklusu, senesens, çoğalma, farklılaşma, gelişme, apoptoz ve inflamatuvar yanıtı inhibe etmede glukokortikoid işlevi gibi çeşitli hücresel süreçleri düzenleyen bir sınıf I histon deasetilazdır.

Son alışmalarda, HDAC2'nin HDAC1 ile birlikte DNA hasar cevabını (DDR) ve hücre sel senesensi epigenetik bir mekanizma yoluyla düzenlediği gösterilmiştir [161,162].





3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

DMEM (Gibco)

DMEM-Fenol kırmızı olmayan (Capricorn)

DMSO (Merck)

Doksorubusin (Tocris)

Fetal Sığır Serum (Capricorn)

PBS (Gibco)

Penisilin-Streptomisin (Capricorn)

Senescence β -galactosidase staining kit (Cell Signaling 9860S)

Teofilin (Sigma)

İnsan IL-6 elisa kiti (İnvitrogen, BMS213-2)

Trypsin-EDTA (Capricorn)

3.1.2. Kullanılan aletler

Hassas terazi (Shimadzu)

Mikropipet (Eppendorf Research)

Vortex (Firlabo)

Santrifüj (Nüve)

Su banyosu (Nüve)

Laminar Akımlı Kabin

CO₂ Etüvü (Sanyo)

Faz Kontrast - Floresan Mikroskop (Leica)

Mikroskop Kamerası (Leica DFC 420 C)

Plaka okuyucu (Molecular Devices)

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hücre kültürü

Deneylerde A549 (küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre dizisi) hücre dizisi kullanıldı. Hücreler %1 penisilin-streptomisin, %10 serum içeren DMEM'li besiyerinde 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde çoğaltıldı. Deneye başlamadan önce tripan mavisi metodu ile hücreler sayıldı. Bu yöntemde hücreler tutundukları alanı %70-80 oranında kaplayıncaya laminar akımlı kabin altında besiyeri uzaklaştırılır ve hücrelere PBS (phosphate buffered saline- fosfat ile doyurulmuş tuz) ile yıkama işleminden sonra 37°C'de % 0.25'lik TripsinEDTA çözeltisi eklenildi. 4-5 dk inkübe edildi. Hücrelerin zeminden ayrıldığı görüldükten sonra, hücrelerin üzerine 7-8 ml besiyeri eklendi ve içerik flakona alındı, 10dk 400g (1500 rpm), 25°C'de santrifüj edildi. Resüspande olan hücrelerden 20 µl alındı ve üzerinde 20 µl tripan mavisi eklendi. İçerikten 15 µl alındı ve Neubauer lam ile lamelin arasına yavaşça bırakıldı. Neubauer lamı mikroskopta bakıldı, mavi ile boyanmamış yani canlı hücreler sayıldı. Aşağıdaki formül ile hücre sayısı hesaplandı. Sonra gerekli hücre sayısı hesaplanarak kültür kaplarına ekildi.

$$\text{Hücre/ml} = \frac{\text{Sayılan toplam canlı hücre} \times 2 \times 10^4}{\text{Sayılan kare sayısı}}$$

3.2.2. SA-β-Gal boyaması

Çalışmalarda teofilinin HDAC aktivatörü olduğu ve bu etkiyle birlikte IL-5 ve IL-6 inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu amaçla A549 hücre dizisine doksorubisin uyguladıktan sonra hücrelerin senesens hale gelip gelmediklerini ve ayrıca teofilinin preinkübasyonunun oluşan doksorubisin ile indüklenmiş senesense etkisini incelenmek istenilmiştir. Deney SA-β-Gal boyaması Senescence β-galactosidase staining kit (Cell Signaling 9860S)'in kullanım talimatlarına göre gerçekleştirildi. Hücreler % 70-80 oranında tutundukları alanı kapladıklarında 3 µM, 10 µM, 56 µM teofilin ile 30 dk preinkübe edildi. Daha sonra hücrelere 300 nM doksorubisin uyguladı. 4 gün sonunda hücreler 37°C sıcaklıktaki PBS ile yıkandı. Kit içinde bulunan fiksasyon çözeltisi ilavesi sonrası 10-15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Hücreler PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildikten sonra kit içerisindeki β-Galaktozidaz Boyama çözeltisi ile 37°C'de 16 saat inkübe edildi. Ertesi gün hücreler faz

kontrast mikroskobu ile incelendi. Mavi renk ile boyanmış hücreler, SA- β -gal pozitif hücrelerdir. SA- β -gal pozitif hücre sayısının total hücre sayısına oranı hesaplandı ve istatistiksel analizi GraphPad Prism 5 programı üzerinden yapıldı.

3.2.3. Faz kontrast mikroskobi

Senesent kanser hücrelerin morfolojisinde meydana gelen değişiklikler sekretuvar aktivitesini de etkileyebileceği çalışmalarda gösterilmiştir [163,164]. Teofilin preinkübasyonun doksorubisinin indüklediği senesent kanser hücrelerinde morfolojik değişiklikler meydana getirip getirmediğini anlamak için hücrelerin faz kontrast mikroskobu altında x20 büyütme objektifle çekilen görüntülerinden imaga J programı ile hücre alanları hesaplandı ve alanlardan GraphPad Prism 5 programı istatistiki analizi yapıldı.

3.2.4. Sekretom toplanılması

Hücelere 300 nM doksorubisin uygulandıktan sonra 4 gün bekletildi ve 4 gün sonunda serumlu besiyeri uzaklaştırıldı. Hücreler PBS ile iki kez yıkandı. Hücrelerin besiyeri serumsuz besiyeri ile değiştirildi. Hücelere (1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M, 56 μ M, 100 μ M) teofilin uygulandı. 2 gün sonunda faz kontrast mikroskobu ile hücre morfolojilerinin görüntüler kaydedildi. Hücrelerin üzerindeki serumsuz besiyeri tüplere toplandı ve tüpler sırasıyla 10 dk 3400 rpm ve 10 dk 10000 rpm +4°C’de santrifüj edildi. Süpernatant (yani sekretom) ayrı tüpe alındı. Ayrıca sekretomu alınan hücreler tripan mavisi metodu ile sayıldı. Sekretomların ne kadar hücreden sekrete edildiği hesaplandı. Sekretom hücre sayısına göre normalize edildi.

3.2.5. IL-6 ölçümü

Doksorubisin ile indüklenen senesent kanser hücrelerinin sekretuvar aktivitesini ölçmek ve teofilinin olası bu sekretuvar aktiviteye etkisini incelemek için IL-6 ölçümü yapıldı. Hücre sekretomunda IL-6 ölçümü için insan IL-6 elisa kiti (invitrogen, BMS213-2)’in kullanım talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir. Hücreler % 70-80 oranında tutundukları alanı kapladıklarında hücelere 300 nM doksorubisin uygulandı ve 4 gün sonunda hücrelerin besiyeri serumsuz besi yeri ile değiştirildi. Daha sonra hücelere 3 μ M, 10 μ M, 56 μ M teofilin uygulandı. 2 gün sonunda hücre sayımı (tripan mavisi metodu ile) yapıldı. Hücrelerin

üzerindeki serumsuz besiyeri (sekretom) tüplere toplandı. Hücre sekretomu hücre sayısına göre normalize edildi. Ölçüm için gerekli çukur sayısı belirlenerek kit içinde bulunan önceden IL-6 antikoru ile kaplanmış ELISA plakası alındı ve çerçeveye yerleştirildi. Bütün çukurla iki kez kit içinde bulunan yıkama çözeltisi ile yıkandı. Daha sonra bütün çukurlara kit içinde bulunan assay buffer solüsyonunda eklendi. Daha sonra çukurlara 50 µl hücre sayısına göre normalize edilmiş hücre sekretom eklendi. Sonra tüm çukurlara kit içinde bulunan biotin-konjugatı eklendi ve oda sıcaklığında 400 rpm mikrolaka çalkalayıcı üzerinde 2 saat inkübe edildi. Daha sonra plaka 4 kez kit içinde bulunan yıkama çözeltisi ile yıkandı ve tüm çukurlara kit içinde bulunan 100 µl streptavidin-HRP çözeltisi eklendi ve oda sıcaklığında 400 rpm mikrolaka çalkalayıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında plaka 4 kez yıkama çözeltisi ile yıkandı ve tüm çukurlara kit içinde bulunan 100 µl TMB substratı eklendi. Plakaları yoğun ışığa maruz bırakmadan oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. 10 dk sonunda plakada renk değişimi gözlemlendi. Daha sonra tüm çukurlara kit içinde bulunan reaksiyon durdurucu çözeltiden 100 µl eklendi. 450 nm'deki absorbans değerleri ölçüldü.

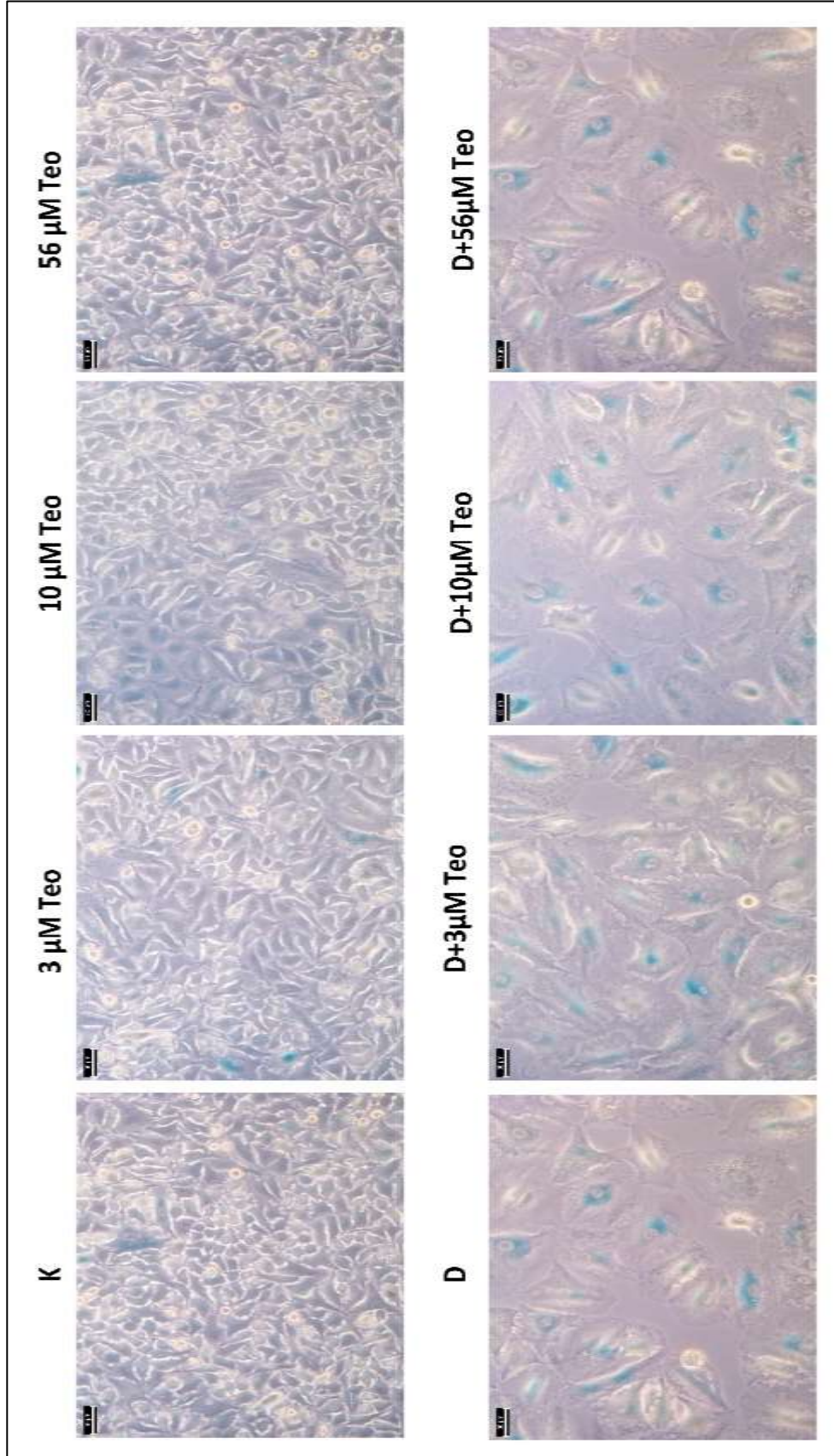
3.2.6. İstatistiksel analiz

Deney sonucu elde edilen veriler için istatistiksel analizde tekyönlü varyans analizi (ANOVA) ve post hoc test olarak Tukey kullanılmıştır. 0.05'ten küçük p değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

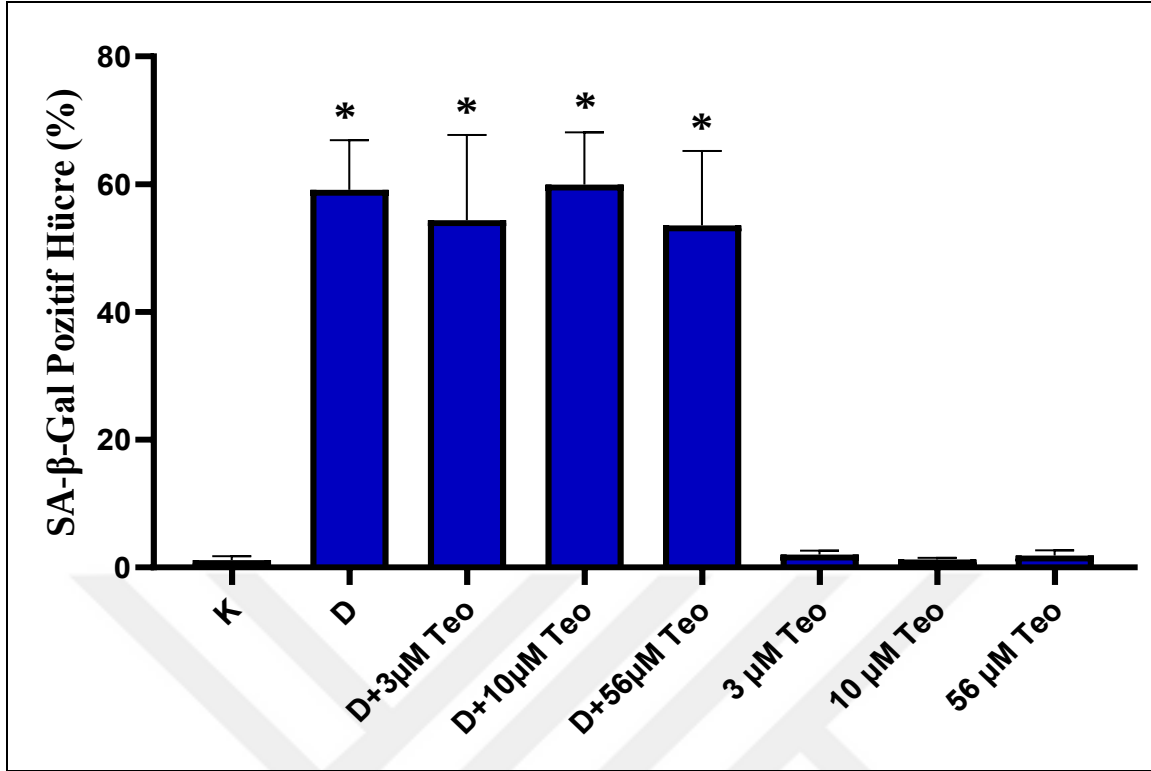
4. BULGULAR

4.1. Doksorubisin İle İndüklenen Senesent A549 Hücrelerinde Teofilin Preinkübasyonun Senesens Oluşumuna Etkisinin Değerlendirilmesi

Senesent hücrelerin artmış β -galaktosidaz aktivitesinden dolayı SA- β -Gal Boyaması mavi renk oluşturduğu bilinmektedir. Hücreler 3 μ M, 10 μ M, 56 μ M teofilin ile 30 dk preinkübasyonunda sonra hücrelere 300 nM doksorubisin uyguladı. 4 gün sonunda hücreler Senescence β -galactosidase staining kit (Cell Signaling 9860S)'in kullanım talimatlarına göre β -Galaktozidaz Boyama çözeltisi ile boyandı. Ertesi gün hücreler faz kontrast mikroskobu ile incelendi. Mavi renk ile boyanmış hücreler, SA- β -gal pozitif hücrelerdir. Bulgularımız, kontrol grubuna göre doksorubisin uyguladığımız A549 hücrelerde SA- β -Gal pozitif hücre sayısı anlamı olarak arttığını göstermiştir. (Şekil 4.1. Resim 4.1). Dolayısıyla hücreleri, doksorubisin uygulaması senesens hale getirilmiştir. 3 μ M, 10 μ M, 56 μ M teofilin preinkübasyonu, doksorubisinin indüklediği senesenste bir değişikliğe neden olmamıştır.



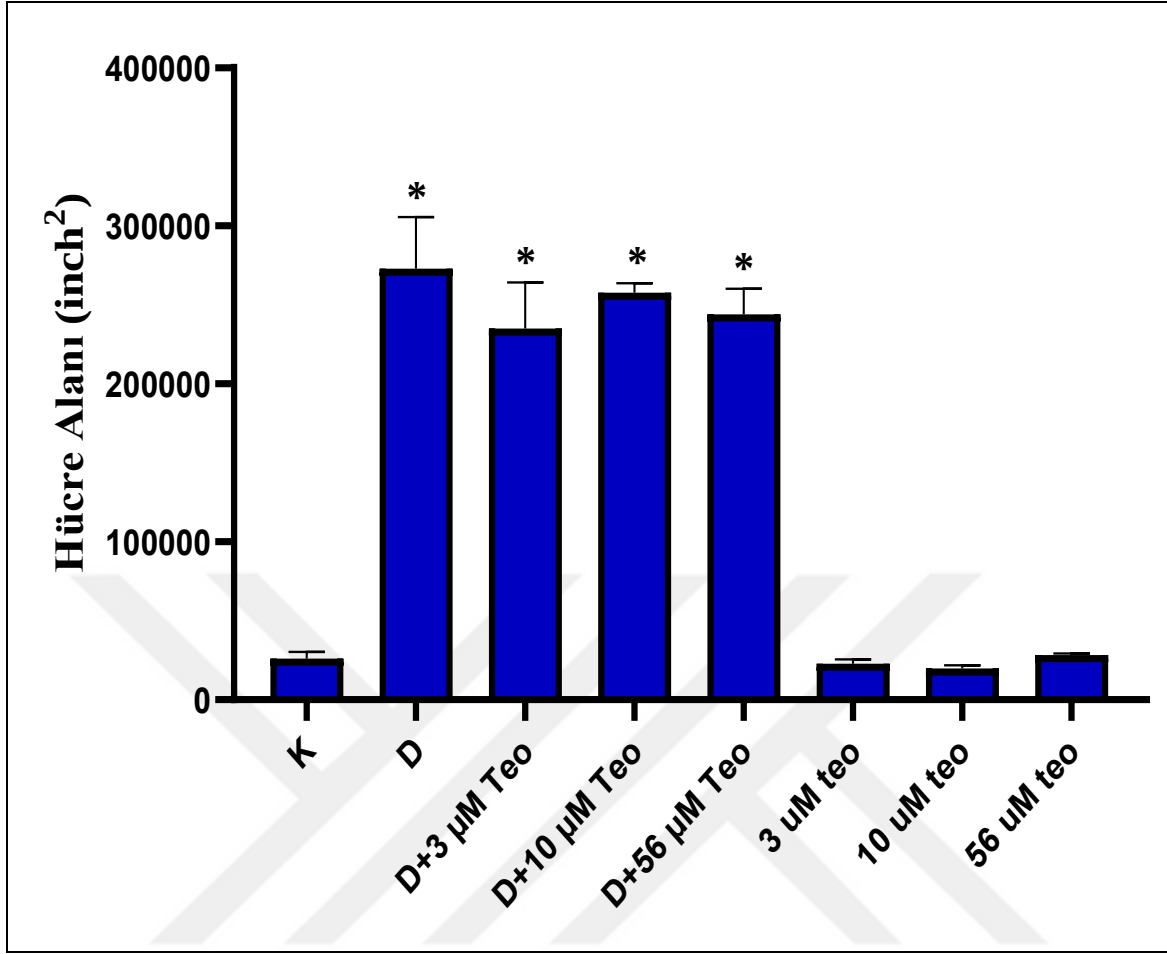
Resim 4.1. A549 hücrelerinde; teofilin preinkübasyonun, doksorubisinin indüklediği senesense etkisinin SA-β-gal boyaması ile mikroskopik analizi. (K: Kontrol; D: 300nM Doksorubisin. Teo: Teofilin). skala bar: 50 μm



Şekil 4.1. SA-β-gal pozitif hücre sayısının total hücre sayısına oranı. (K: Kontrol; D: 300nM Doksorubisin. Teo: Teofilin) (*) kontrol grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir. (n=3, tek yönlü varyans analizi ANOVA, p<0,05).

A549 Hücre Dizisinde, Senesent Hücre Morfolojisinin Faz Kontrast Mikroskopisi ile Değerlendirilmesi

A549 hücrelerinde, senesent hücre morfolojisi ve bu morfolojiye teofilin preinkübasyonun etkisi faz kontrast mikroskobu ile değerlendirilmiştir. Hücreler 3 μM, 10 μM, 56 μM teofilin ile 30 dk preinkübasyonunda sonra hücrelere 300 nM doksorubisin uyguladı. 4 gün sonunda hücreler faz kontrast mikroskobu ile incelendi. Elde edilen görüntülerde bütün hücrelerin alanları image j programı ile ölçülmüştür. Ölçümler sonucunda; doksorubisin uygulamasıyla A549 hücrelerinin hücre alanlarının arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.2). 3 μM, 10 μM, 56 μM teofilin preinkübasyonu, doksorubisinin indüklediği senesens hücre alanındaki artışı istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır.

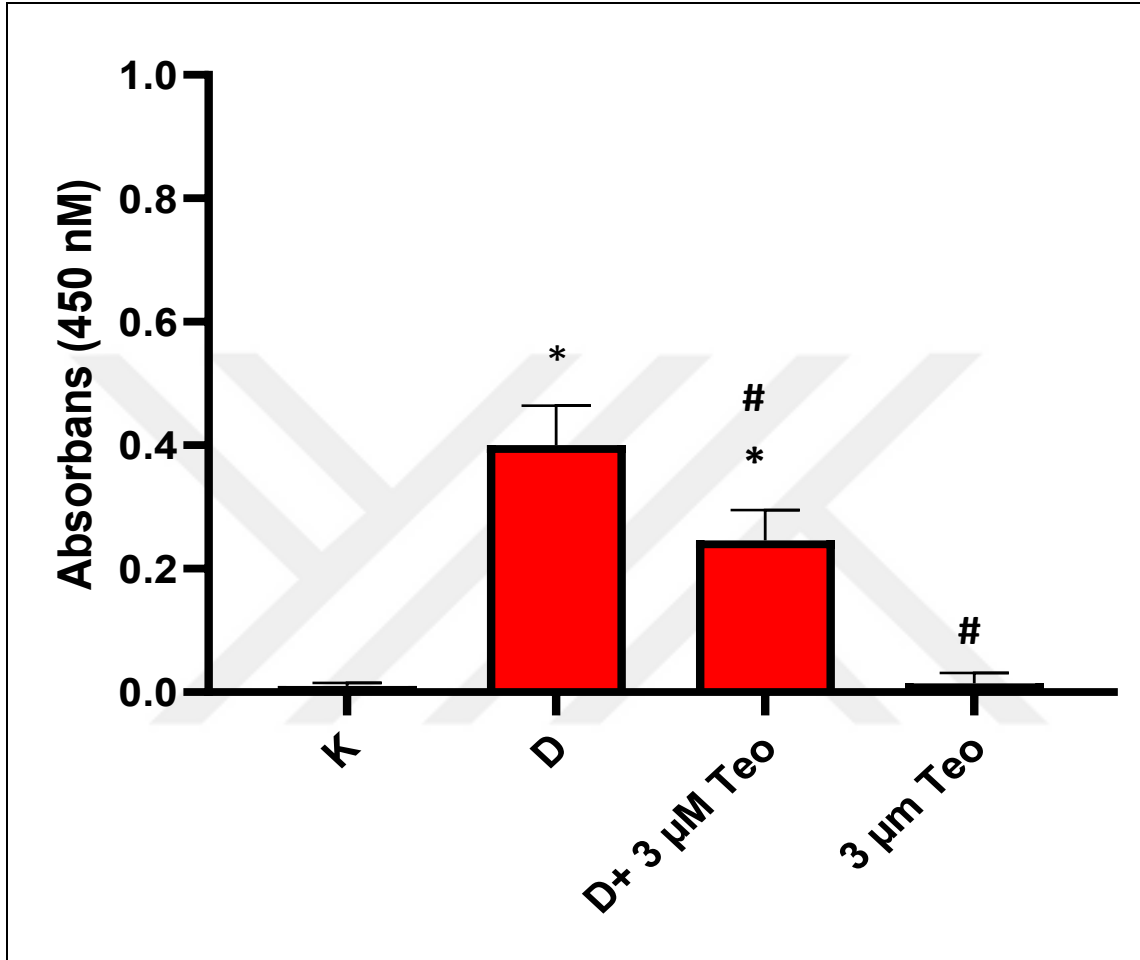


Şekil 4.2. Teofilin preinkübasyonun, doksorubisinin indüklediği senesense etkisinin hücre alan ölçümü ile değerlendirilmesi. (K: Kontrol; D: 300nM Doksorubisin. Teo: Teofilin) (*) kontrol grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir. (n=3, tek yönlü varyans analizi ANOVA, $p<0,05$).

4.2. Teofilinin senesent A549 Hücresinin sekretuvar aktivitesine etkisinin değerlendirilmesi

Senesent kanser hücrelerin sekretuvar aktivitesi olduğu bilinmektedir. Bu sekretuvar aktiviteyi değerlendirmek için sekretomdaki IL-6 miktarı ölçülmüştür. Hücelere 300 nM doksorubisin uygulandı ve 4 gün sonununda hücrelerin besiyeri serumsuz besi yeri ile değiştirildi. Daha sonra hücelere 3 µM teofilin uygulandı. 2 gün sonunda hücrelerin üzerindeki serumsuz besiyeri (sekretom) tüplere toplandı. Hücre sekretomu hücre sayısına göre normalize edildi. İnsan IL-6 elisa kiti (invitrogen, BMS213-2)'in kullanım talimatlarına göre hücre sekretomunda IL-6 ölçümü gerçekleştirildi. Sonucumuza göre doksorubisin uyguladığımız A549 hücrelerinin IL-6 sekresyonunun kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır (Şekil 4.3). 3 µM teofilin inkübasyonu ise, doksorubisinin indüklediği senesent

A549 hücrelerinin IL-6 sekresyonunun anlamlı olarak azaltmıştır. Bu durum A549 hücrelerine teofilin (3 μ M,) uygulanması, doksorubisin ile indüklenen senesent hücre sekretomunun (SASP) oluşumunu azalttığını göstermektedir.



Şekil 4.3. Teofilinin doksorubisin ile indüklenen senesent hücrelerden IL-6 sekresyonunun etkisinin belirlenmesi. (K: Kontrol; D: 300nM Doksorubisin. Teo: Teofilin) *: kontrol grubuna göre, #: doksorubisin grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir (n=, tek yönlü varyans analizi ANOVA, $p<0,05$).



5. TARTIŞMA

Hücresel senesens, geri dönüşümsüz olarak hücre proliferasyonunun durması olarak bilinmektedir. Senesent hücreler mikroçevresine çeşitli faktörler salgılamaktadır. Bu salgıladıkları faktörlere SASP (senesens ile ilişkili sekretom) denilmektedir ve SASP'ın komşu hücrelerde tümörjenez, inflamasyonu, fibrozu ve apoptozu indükleyen istenmeyen parakrin etkileri vardır [47]. Bu nedenle kanser tedavisinde senesent hücrelerin salgıladıkları SASP'ı inhibe eden ajanların kullanılması önem kazanmıştır.

Yapılan bir çalışmada, terapötik konsantrasyonlardan daha düşük konsantrasyonlarda teofilinin histon deasetilazları (HDAC) aktive ettiği ve interleükin ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir [156]. Bu nedenle bu tez kapsamında teofilinin olası senomorfik etkisi araştırılmıştır. Bulgularımız teofilinin doksorubisinin indüklediği senesens oluşumuna etkisinin olmadığını göstermektedir. Literatürde teofilinin senesens oluşumuna etkisini inceleyen bir çalışma belirlenmiştir. Bu çalışmada meme kanseri hücresi MCF7 hücrelerine 24 saat 1mM, 5mM, 10 mM teofilin uygulamasının hücresel senesensi indüklediği gösterilmiştir [165]. Bu etki de DNA onarımı, RNA *splicing* (kesip birleştirme), RNA translasyonu gibi işlevleri olan SRSFS3 (serin/arginin açısından zengin ekleme faktörlü 3) supresyonuna dayandırılmaktadır. Bu çalışmada yüksek konsantrasyonda teofilin kullanılmıştır ve yüksek konsantrasyonlarda teofilinin hücrelerde stres oluşturduğu ve stresin hücrelerde senesensi indüklediğini düşünmekteyiz.

Senesent hücre morfolijisinde meydana gelen değişiklikler hücrenin sekretuar aktivitesini etkinliğinde hücre morfolojisi önemli bir role sahiptir. Şimay demir ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada hücre iskeletinin düzenlenmesinde role sahip olan RHO/RHO kinaz yolağının inhibisyonunun doksorubisin ile indüklenen senesent hücre alanındaki artışın istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir [163,164]. Bizde teofilinin senesent hücre morfolojisine olan etkisini inceledik ve teofilin senesent hücre morfolojisinde bir değişikliğe neden olmadığını belirledik.

SASP içeriğinde sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri, proteazlar dahil olmak üzere çeşitli proteinler bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar kemoterapötik ajanlara maruz kalan kanser hücrelerinde hücresel senesensin ve SASP'ın indüklediği gösterilmiştir

[90]. Sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri, proteazlar dahil olmak üzere çeşitli proteinleri içeren bu SASP faktörleri kanser mikroçevresinde bulunan hücreler üzerinde protümörijenik etkileri olduğu gösterilmiştir [47]. Her ne kadar tanımlandığı ilk yıllarda hücrel senesens tümör baskılayıcı mekanizma olarak kanser tedavisinde etkin olabileceği düşünülmüş olsa da, SASP faktörlerinin oluşturduğu istenmeyen etkilerden dolayı, SASP'ın farmakolojik inhibisyonunun, kanser tedavisinde adjuvan tedavi şekli olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Bulgularımız teofilinin senesens sekretomunu inhibe ettiğini gösterdiği için teofilinin de kanser tedavisinde adjuvan tedavi olabileceğini düşündürmektedir.

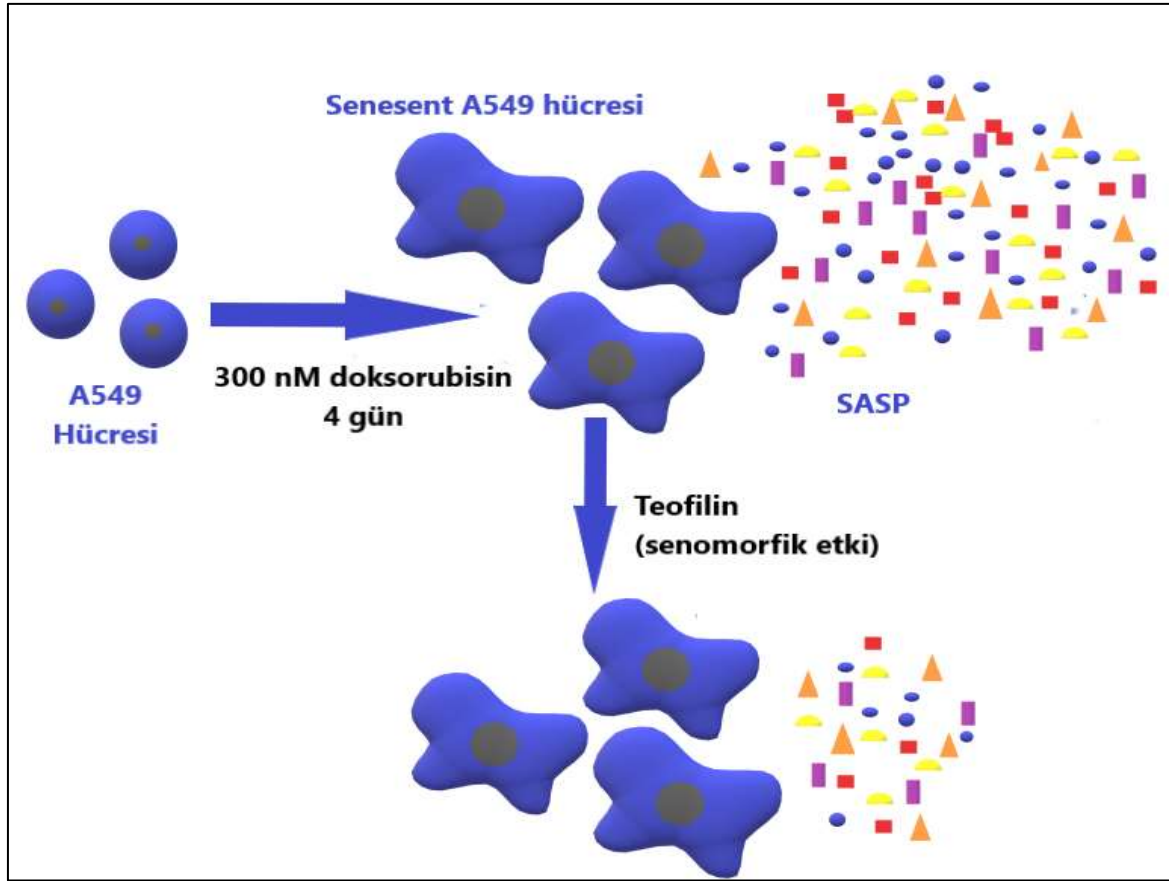
Literatürde yapılan bir çalışmada, teofilin terapötik konsantrasyondan daha düşük konsantrasyonda makrofajlardan HDAC inhibisyonuna neden olduğu böylece interlökin sekresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [156]. Böylece bizim çalışmamızda teofilin senesent A549 hücrelerinde HDAC aktivasyonuna neden olmuş ve doksorubisin ile artan interlökin sekresyonunu azaltmış olabilir.

Bu tez kapsamında elde ettiğimiz veriler, teofilinin kemoterapötik ilaçlar ile kombine kullanılarak kanser tedavisinde etkili olabilecek yeni bir tedavi yaklaşımını düşündürmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kemoterapötiklerin kanser hücrelerini senesens duruma getirdiği bilinmektedir. Biz de bu tez kapsamında doksorubisin uygulanan akciğer kanser hücrelerinin senesens hale gelip gelmediklerini ve teofilin preinkübasyonun bu olası duruma etkisini incelemeyi amaçladık. Ayrıca, teofilin uygulanmasının doksorubisin ile indüklenen olası senesent kanser hücrelerinin sekretuvar aktivitesine etkisi incelenmiştir. Teofilin preinkübasyonunun doksorubisinin indüklediği senesens duruma bir etkisinin olmadığını gösterdik. Senesens hücrenin morfolojisinde meydana gelen değişiklikler hücrenin sekretuvar aktivitesini etkilediği için teofilin preinkübasyonu ile doksorubisinin indüklediği senesens hücre alanlarını ölçtük ve hücre alanlarında anlamlı farklılık gözlemlemedik. Senesent hücrelerin sekretomların IL-6 varlığı bilinmektedir. Doksorubisin ile indüklenen senesent kanser hücrelerinin sekretuvar aktivitesini ölçmek ve teofilinin olası bu sekretuvar aktiviteye etkisini incelemek için IL-6 ölçümü yapıldı. Beklenildiği üzere doksorubisin uygulaması IL-6 sekresyonunu arttırdı ve doksorubisin ile indüklenen senesent A549 hücrelerine teofilin (3 μ M) uygulanması senesent kanser hücrelerinin IL-6 sekresyonunu azalttı (Şekil 6.1).

Elde ettiğimiz tüm bu bulgular, senomorfik etkinliğinden dolayı teofilinin, kanser tedavisinde kemoterapötiklerle kombine kullanılarak kanser tedavisinde yeni bir tedavi yaklaşımını olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 6.1. Teofilinin SASP üzerine etkisinin şematik gösterimi

KAYNAKLAR

1. Chang, B. D., Broude, E. V., Dokmanovic, M., Zhu, H., Ruth, A., Xuan, Y., and Roninson, I. B. (1999). A Senescence-like Phenotype Distinguishes Tumor Cells That Undergo Terminal Proliferation Arrest after Exposure to Anticancer Agents. *Cancer Research*, 59(15), 3761–3767.
2. Kim, E. C. and Kim, J. R. (2019) Senotherapeutics: Emerging Strategy for Healthy Aging and Age-Related Disease. *BMB Reports*, 52(1), 47.
3. Van Deursen, J. M. (2014) The Role of Senescent Cells in Ageing. *Nature*, 509(7501), 439–446.
4. Guillon, J., Petit, C., Toutain, B., Guette, C., Lelievre, E. and Coqueret, O. (2019) Chemotherapy-Induced Senescence, an Adaptive Mechanism Driving Resistance and Tumor Heterogeneity. *Cell Cycle*, 18(19), 2385–2397.
5. Hornebeck, W. and Maquart, F. X. (2003) Proteolyzed Matrix as a Template for the Regulation of Tumor Progression. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57(5-6), 223–230.
6. Smit, M. A. and Peeper, D. S. (2010) Epithelial-Mesenchymal Transition and Senescence: Two Cancer-Related Processes Are Crossing Paths. *Aging (Albany NY)*, 2(10), 735.
7. Laberge, R.-M., Awad, P., Campisi, J. and Desprez, P.-Y. (2012) Epithelial-Mesenchymal Transition Induced by Senescent Fibroblasts. *Cancer Microenvironment*, 5(1), 39–44.
8. Tuccitto, A., Tazzari, M., Beretta, V., Rini, F., Miranda, C., Greco, A., Santinami, M., Patuzzo, R., Vergani, B. and Villa, A. (2016) Immunomodulatory Factors Control the Fate of Melanoma Tumor Initiating Cells. *Stem Cells*, 34(10), 2449–2460.
9. Finnerty, J., Lee, C., Wilson, S., Madden, J., Djukanovic, R. and Holgate, S. (1996) Effects of Theophylline on Inflammatory Cells and Cytokines in Asthmatic Subjects: A Placebo-Controlled Parallel Group Study. *European Respiratory Journal*, 9(8), 1672–1677.
10. Sullivan, P., Jaffar, Z., Page, C., Costello, J., Bekir, S. and Jeffery, P. (1994) Anti-Inflammatory Effects of Low-Dose Oral Theophylline in Atopic Asthma. *The Lancet*, 343(8904), 1006–1008.
11. Vogelstein, B. and Kinzler, K. W. (2004) Cancer Genes and the Pathways They Control. *Nature Medicine*, 10(8), 789–799.
12. Baba, A. I. and Cătoi, C. (2007). *Tumor cell morphology*. Comparative Oncology, The Publishing House of the Romanian Academy, Chapter 3, 2-4.
13. Mareel, M. M. and De Mets, M. (1984). Effect of Microtubule Inhibitors on Invasion and on Related Activities of Tumor Cells. *International Review of Cytology*, 90, 125–168.

14. Gabbert, H. (1984) Invasionsmechanismen Maligner Tumoren. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie*, 68, 18–32.
15. Gutierrez, L. G. and Ju, Z. (2008). Telomere Shortening Induces Cell Intrinsic Checkpoints and Environmental Alterations Limiting Adult Stem Cell Function. *Telomeres and Telomerase in Ageing, Disease, and Cancer*, Springer, 161–180.
16. Bignold, L. P., Coghlan, B. and Jersmann, H. (2006) Cancer Morphology, Carcinogenesis and Genetic Instability: A Background. *Cancer: Cell Structures, Carcinogens and Genomic Instability*, 1–24.
17. Beyzadeoglu, M. M. and Ebruli, C. C. (2008). *Temel Radyasyon Onkolojisi*. Ankara: Gülhane Askeri Tıp Akademisi Basımevi, 81.
18. Liotta, L. A., Rao, C. and Barsky, S. H. (1983) Tumor Invasion and the Extracellular Matrix. *Laboratory investigation*, 49(6), 636–649.
19. Wang, J., Lei, K. and Han, F. (2018) Tumor Microenvironment: Recent Advances in Various Cancer Treatments. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 22(12), 3855–3864.
20. Chu, E. and Sartorelli, A. (2004). Cancer Chemotherapy. *Basic & Clinical Pharmacology*, 9, 898–930.
21. Kaye, S. B. (1998). New Antimetabolites in Cancer Chemotherapy and Their Clinical Impact. *British Journal of Cancer*, 78(3), 1–7.
22. Shay, J. W. and Wright, W. E. (2000). Hayflick, His Limit, and Cellular Ageing. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 1(1), 72–76.
23. McHugh, D. and Gil, J. (2018). Senescence and Aging: Causes, Consequences, and Therapeutic Avenues. *Journal of Cell Biology*, 217(1), 65–77.
24. Birch, J. and Gil, J. (2020). Senescence and the SASP: Many Therapeutic Avenues. *Genes & Development*, 34(23-24), 1565–1576.
25. Hernandez-Segura, A., Nehme, J. and Demaria, M. (2018). Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends in Cell Biology*, 28(6), 436–453.
26. Hemann, M. T. and Greider, C. W. (1999). G-Strand Overhangs on Telomeres in Telomerase-Deficient Mouse Cells. *Nucleic Acids Research*, 27(20), 3964–3969.
27. Wyld, L., Bellantuono, I., Tchkonja, T., Morgan, J., Turner, O., Foss, F., George, J., Danson, S. and Kirkland, J. L. (2020). Senescence and Cancer: A Review of Clinical Implications of Senescence and Senotherapies. *Cancers*, 12(8), 2134.
28. Scriven, P., Brown, N. J., Pockley, A. G. and Wyld, L. (2007). The Unfolded Protein Response and Cancer: A Brighter Future Unfolding? *Journal of Molecular Medicine*, 85(4), 331–341.
29. Petrova, N. V., Velichko, A. K., Razin, S. V. and Kantidze, O. L. (2016). Small Molecule Compounds That Induce Cellular Senescence. *Aging Cell*, 15(6), 999–1017.

30. Wiley, C. D., Velarde, M. C., Lecot, P., Liu, S., Sarnoski, E. A., Freund, A., Shirakawa, K., Lim, H. W., Davis, S. S. and Ramanathan, A. (2016). Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. *Cell Metabolism*, 23(2), 303–314.
31. Bojko, A., Czarnecka-Herok, J., Charzynska, A., Dabrowski, M. and Sikora, E. (2019). Diversity of the Senescence Phenotype of Cancer Cells Treated with Chemotherapeutic Agents. *Cells*, 8(12), 1501.
32. Sliwinska, M. A., Mosieniak, G., Wolanin, K., Babik, A., Piwocka, K., Magalska, A., Szczepanowska, J., Fronk, J. and Sikora, E. (2009). Induction of Senescence with Doxorubicin Leads to Increased Genomic Instability of HCT116 Cells. *Mechanisms of Ageing and Development*, 130(1-2), 24–32.
33. Gewirtz, D. (1999). A Critical Evaluation of the Mechanisms of Action Proposed for the Antitumor Effects of the Anthracycline Antibiotics Adriamycin and Daunorubicin. *Biochemical Pharmacology*, 57(7), 727–741.
34. Lu, T. and Finkel, T. (2008). Free Radicals and Senescence. *Experimental Cell Research*, 314(9), 1918–1922.
35. Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J. and Peeper, D. S. (2010). The Essence of Senescence. *Genes & Development*, 24(22), 2463–2479.
36. Kumari, R. and Jat, P. (2021). Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 485.
37. Salmonowicz, H. and Passos, J. F. (2017). Detecting Senescence: A New Method for an Old Pigment. *Aging Cell*, 16(3), 432–434.
38. Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J. D., Campisi, J. and Toussaint, O. (2009). Protocols to Detect Senescence-Associated Beta-Galactosidase (SA-Bgal) Activity, a Biomarker of Senescent Cells in Culture and in Vivo. *Nature Protocols*, 4(12), 1798–1806.
39. Stein, G. H., Drullinger, L. F., Evans, M. (2017). Techniques to Induce and Quantify Cellular Senescence. *Journal of Visualized Experiments: Jove*, (123), e55533.
40. Soulard, A. and Dulić, V. (1999). Differential Roles for Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors P21 and P16 in the Mechanisms of Senescence and Differentiation in Human Fibroblasts. *Molecular and Cellular Biology*, 19(3), 2109–2117.
41. Narita, M., Nuñez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A. W., Hearn, S. A., Spector, D. L., Hannon, G. J. and Lowe, S. W. (2003). Rb-Mediated Heterochromatin Formation and Silencing of E2F Target Genes during Cellular Senescence. *Cell*, 113(6), 703–716.
42. Lee, M. and Lee, J.-S. (2014). Exploiting Tumor Cell Senescence in Anticancer Therapy. *BMB Reports*, 47(2), 51.

43. Davaapil, H., Brockes, J. P. and Yun, M. H. (2017). Conserved and Novel Functions of Programmed Cellular Senescence during Vertebrate Development. *Development*, 144(1), 106–114.
44. Sagiv, A. and Krizhanovsky, V. (2013). Immunosurveillance of Senescent Cells: The Bright Side of the Senescence Program. *Biogerontology*, 14(6), 617–628.
45. Gonzalez, L. C., Ghadaouia, S., Martinez, A. and Rodier, F. (2016). Premature Aging/Senescence in Cancer Cells Facing Therapy: Good or Bad? *Biogerontology*, 17(1), 71–87.
46. Pazolli, E., Luo, X., Brehm, S., Carbery, K., Chung, J.-J., Prior, J. L., Doherty, J., Demehri, S., Salavaggione, L. and Piwnica-Worms, D. (2009). Senescent Stromal-Derived Osteopontin Promotes Preneoplastic Cell Growth. *Cancer Research*, 69(3), 1230–1239.
47. Parrinello, S., Coppe, J.-P., Krtolica, A. and Campisi, J. (2005). Stromal-Epithelial Interactions in Aging and Cancer: Senescent Fibroblasts Alter Epithelial Cell Differentiation. *Journal of Cell Science*, 118(3), 485–496.
48. Coppé, J.-P., Kauser, K., Campisi, J. and Beauséjour, C. M. (2006). Secretion of Vascular Endothelial Growth Factor by Primary Human Fibroblasts at Senescence. *Journal of Biological Chemistry*, 281(40), 29568–29574.
49. Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A. and Campisi, J. (2010). The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 5, 99–118.
50. Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L. C., Douma, S., van Doorn, R., Desmet, C. J., Aarden, L. A., Mooi, W. J. and Peeper, D. S. (2008). Oncogene-Induced Senescence Relayed by an Interleukin-Dependent Inflammatory Network. *Cell*, 133(6), 1019–1031.
51. Coppé, J.-P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D. P., Goldstein, J., Nelson, P. S., Desprez, P.-Y. and Campisi, J. (2008). Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the P53 Tumor Suppressor. *Plos Biology*, 6(12), e301.
52. Lu, S.-Y., Chang, K.-W., Liu, C.-J., Tseng, Y.-H., Lu, H.-H., Lee, S.-Y. and Lin, S.-C. (2006). Ripe Areca Nut Extract Induces G 1 Phase Arrests and Senescence-Associated Phenotypes in Normal Human Oral Keratinocyte. *Carcinogenesis*, 27(6), 1273–1284.
53. Sarkar, D., Lebedeva, I. V., Emdad, L., Kang, D., Baldwin, A. S. and Fisher, P. B. (2004). Human Polynucleotide Phosphorylase (HPNPaseold-35): A Potential Link between Aging and Inflammation. *Cancer Research*, 64(20), 7473–7478.
54. Rodier, F., Coppé, J.-P., Patil, C. K., Hoeijmakers, W. A., Muñoz, D. P., Raza, S. R., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A. R. and Campisi, J. (2009). Persistent DNA Damage Signalling Triggers Senescence-Associated Inflammatory Cytokine Secretion. *Nature Cell Biology*, 11(8), 973–979.

55. Studebaker, A. W., Storci, G., Werbeck, J. L., Sansone, P., Sasser, A. K., Tavolari, S., Huang, T., Chan, M. W., Marini, F. C. and Rosol, T. J. (2008). Fibroblasts Isolated from Common Sites of Breast Cancer Metastasis Enhance Cancer Cell Growth Rates and Invasiveness in an Interleukin-6-Dependent Manner. *Cancer Research*, 68(21), 9087–9095.
56. Maier, J., Voulalas, P., Roeder, D. and Maciag, T. (1990). Extension of the Life-Span of Human Endothelial Cells by an Interleukin-1 Alpha Antisense Oligomer. *Science*, 249(4976), 1570–1574.
57. Kumar, S., Millis, A. and Baglioni, C. (1992). Expression of Interleukin 1-Inducible Genes and Production of Interleukin 1 by Aging Human Fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(10), 4683–4687.
58. Palmieri, D., Watson, J. M. and Rinehart, C. A. (1999). Age-Related Expression of PEDF/EPC-1 in Human Endometrial Stromal Fibroblasts: Implications for Interactive Senescence. *Experimental Cell Research*, 247(1), 142–147.
59. te Poele, R. H., Okorokov, A. L., Jardine, L., Cummings, J. and Joel, S. P. (2002). DNA Damage Is Able to Induce Senescence in Tumor Cells in Vitro and in Vivo. *Cancer Research*, 62(6), 1876–1883.
60. Mantovani, A., Locati, M., Vecchi, A., Sozzani, S. and Allavena, P. (2001). Decoy Receptors: A Strategy to Regulate Inflammatory Cytokines and Chemokines. *Trends in Immunology*, 22(6), 328–336.
61. Castro, P., Giri, D., Lamb, D. and Ittmann, M. (2003). Cellular Senescence in the Pathogenesis of Benign Prostatic Hyperplasia. *The Prostate*, 55(1), 30–38.
62. Pazolli, E., Alspach, E., Milczarek, A., Prior, J., Piwnica-Worms, D. and Stewart, S. A. (2012). Chromatin Remodeling Underlies the Senescence-Associated Secretory Phenotype of Tumor Stromal Fibroblasts That Supports Cancer Progression. *Cancer Research*, 72(9), 2251–2261.
63. Begley, L., Monteleon, C., Shah, R. B., MacDonald, J. W. and Macoska, J. A. (2005). CXCL12 Overexpression and Secretion by Aging Fibroblasts Enhance Human Prostate Epithelial Proliferation in Vitro. *Aging cell*, 4(6), 291–298.
64. Bavik, C., Coleman, I., Dean, J. P., Knudsen, B., Plymate, S. and Nelson, P. S. (2006). The Gene Expression Program of Prostate Fibroblast Senescence Modulates Neoplastic Epithelial Cell Proliferation through Paracrine Mechanisms. *Cancer Research*, 66(22), 794–802.
65. López-Bermejo, A., Buckway, C. K., Devi, G. R., Hwa, V., Plymate, S. R., Oh, Y. and Rosenfeld, R. G. (2000). Characterization of Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-Related Proteins (IGFBP-RPs) 1, 2, and 3 in Human Prostate Epithelial Cells: Potential Roles for IGFBP-RP1 and 2 in Senescence of the Prostatic Epithelium. *Endocrinology*, 141(11), 4072–4080.

66. Kim, K.-H., Park, G.-T., Lim, Y.-B., Rue, S.-W., Jung, J.-C., Sonn, J.-K., Bae, Y.-S., Park, J.-W. and Lee, Y.-S. (2004). Expression of Connective Tissue Growth Factor, a Biomarker in Senescence of Human Diploid Fibroblasts, Is up-Regulated by a Transforming Growth Factor- β -Mediated Signaling Pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 318(4), 819–825.
67. Grillari, J., Hohenwarter, O., Grabherr, R. M. and Katinger, H. (2000). Subtractive Hybridization of mRNA from Early Passage and Senescent Endothelial Cells. *Experimental Gerontology*, 35(2), 187–197.
68. Wang, S., Moerman, E. J., Jones, R. A., Thweatt, R. and Goldstein, S. (1996). Characterization of IGFBP-3, PAI-1 and SPARC mRNA Expression in Senescent Fibroblasts. *Mechanisms of Ageing and Development*, 92(2-3), 121–132.
69. Wajapeyee, N., Serra, R. W., Zhu, X., Mahalingam, M. and Green, M. R. (2008). Oncogenic BRAF Induces Senescence and Apoptosis through Pathways Mediated by the Secreted Protein IGFBP7. *Cell*, 132(3), 363–374..
70. Huang, N. N., Wang, D. J. and Heppel, L. A. (1993). Stimulation of Aged Human Lung Fibroblasts by Extracellular ATP via Suppression of Arachidonate Metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 268(15), 10789–10795.
71. West, M. D., Pereira-Smith, O. M. and Smith, J. R. (1989). Replicative Senescence of Human Skin Fibroblasts Correlates with a Loss of Regulation and Overexpression of Collagenase Activity. *Experimental Cell Research*, 184(1), 138–147.
72. Liu, D. and Hornsby, P. J. (2007). Senescent Human Fibroblasts Increase the Early Growth of Xenograft Tumors via Matrix Metalloproteinase Secretion. *Cancer Research*, 67(7), 3117–3126.
73. Chaturvedi, S. and Hass, R. (2011). Extracellular Signals in Young and Aging Breast Epithelial Cells and Possible Connections to Age-Associated Breast Cancer Development. *Mechanisms of Ageing and Development*, 132(5), 213–219.
74. Blasi, F. and Carmeliet, P. (2002). UPAR: A Versatile Signalling Orchestrator. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(12), 932–943.
75. Rasoamanantena, P., Thweatt, R., Labat-Robert, J. and Goldstein, S. (1994). Altered Regulation of Fibronectin Gene Expression in Werner Syndrome Fibroblasts. *Experimental Cell Research*, 213(1), 121–127.
76. Kumazaki, T., Kobayashi, M. and Mitsui, Y. (1993). Enhanced Expression of Fibronectin during in Vivo Cellular Aging of Human Vascular Endothelial Cells and Skin Fibroblasts. *Experimental Cell Research*, 205(2), 396–402.
77. Sato, I., Morita, I., Kaji, K., Ikeda, M., Nagao, M. and Murota, S. (1993). Reduction of Nitric Oxide Producing Activity Associated with in Vitro Aging in Cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cell. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 195(2), 1070–1076.

78. Xin, M.-G., Zhang, J., Block, E. R. and Patel, J. M. (2003). Senescence-Enhanced Oxidative Stress Is Associated with Deficiency of Mitochondrial Cytochrome c Oxidase in Vascular Endothelial Cells. *Mechanisms of Ageing and Development*, 124(8-9), 911–919.
79. Tsai, K. K., Chuang, E. Y.-Y., Little, J. B. and Yuan, Z.-M. (2005). Cellular Mechanisms for Low-Dose Ionizing Radiation-Induced Perturbation of the Breast Tissue Microenvironment. *Cancer Research*, 65(15), 6734–6744.
80. Haugstetter, A., Loddenkemper, C., Lenze, D., Gröne, J., Standfuss, C., Petersen, I., Dörken, B. and Schmitt, C. (2010) Cellular Senescence Predicts Treatment Outcome in Metastasised Colorectal Cancer. *British Journal of Cancer*, 103(4), 505–509.
81. Reimann, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Dörr, J. R., Tabor, V., Aichele, P., Stein, H., Dörken, B., Jenuwein, T. and Schmitt, C. A. (2010). Tumor Stroma-Derived TGF- β Limits Myc-Driven Lymphomagenesis via Suv39h1-Dependent Senescence. *Cancer Cell*, 17(3), 262–272.
82. Vizioli, M. G., Possik, P. A., Tarantino, E., Meissl, K., Borrello, M. G., Miranda, C., Anania, M. C., Pagliardini, S., Seregini, E. and Pierotti, M. A. (2011). Evidence of Oncogene-Induced Senescence in Thyroid Carcinogenesis. *Endocrine Related Cancer*, 18(6), 743.
83. Kim, Y. H., Choi, Y. W., Lee, J., Soh, E. Y., Kim, J.-H. and Park, T. J. (2017). Senescent Tumor Cells Lead the Collective Invasion in Thyroid Cancer. *Nature Communications*, 8(1), 1–14.
84. Gilbert, L. A. and Hemann, M. T. (2010). DNA Damage-Mediated Induction of a Chemoresistant Niche. *Cell*, 143(3), 355–366.
85. Sun, Y., Campisi, J., Higano, C., Beer, T. M., Porter, P., Coleman, I., True, L. and Nelson, P. S. (2012). Treatment-Induced Damage to the Tumor Microenvironment Promotes Prostate Cancer Therapy Resistance through WNT16B. *Nature Medicine*, 18(9), 1359–1368.
86. Yoon, J. E., Kim, Y., Kwon, S., Kim, M., Kim, Y. H., Kim, J.-H., Park, T. J. and Kang, H. Y. (2018). Senescent Fibroblasts Drive Ageing Pigmentation: A Potential Therapeutic Target for Senile Lentigo. *Theranostics*, 8(17), 4620.
87. Ho, I. A., Yulyana, Y., Sia, K. C., Newman, J. P., Guo, C. M., Hui, K. M. and Lam, P. Y. (2014). Matrix Metalloproteinase-1-mediated Mesenchymal Stem Cell Tumor Tropism Is Dependent on Crosstalk with Stromal Derived Growth Factor 1/C-X-C Chemokine Receptor 4 Axis. *The Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB) Journal*, 28(10), 4359–4368.
88. Wang, B., Kohli, J. and Demaria, M. (2020). Senescent Cells in Cancer Therapy: Friends or Foes? *Trends in Cancer*, 6(10), 838–857.
89. Chang, B.-D., Swift, M. E., Shen, M., Fang, J., Broude, E. V. and Roninson, I. B. (2002). Molecular Determinants of Terminal Growth Arrest Induced in Tumor Cells by a Chemotherapeutic Agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(1), 389–394.

90. Roninson, I. B. (2003). Tumor Cell Senescence in Cancer Treatment. *Cancer Research*, 63(11), 2705–2715.
91. Thorn, C. F., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T.E. and Altman, R. B. (2011). Doxorubicin Pathways: Pharmacodynamics and Adverse Effects. *Pharmacogenetics and Genomics*, 21(7), 440.
92. Ota, H., Eto, M., Ako, J., Ogawa, S., Iijima, K., Akishita, M. and Ouchi, Y. (2009). Sirolimus and Everolimus Induce Endothelial Cellular Senescence via Sirtuin 1 Down-Regulation: Therapeutic Implication of Cilostazol after Drug-Eluting Stent Implantation. *Journal of the American College of Cardiology*, 53(24), 2298–2305.
93. Hu, W., Sung, T., Jessen, B. A., Thibault, S., Finkelstein, M. B., Khan, N. K. and Sacaan, A. I. (2016). Mechanistic Investigation of Bone Marrow Suppression Associated with Palbociclib and Its Differentiation from Cytotoxic Chemotherapies. *Clinical Cancer Research*, 22(8), 2000–2008.
94. Demaria, M., O’Leary, M. N., Chang, J., Shao, L., Liu, S., Alimirah, F., Koenig, K., Le, C., Mitin, N. and Deal, A. M. (2017). Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse. *Cancer Discovery*, 7(2), 165–176.
95. Roberson, R. S., Kussick, S. J., Vallieres, E., Chen, S.-Y. J. and Wu, D. Y. (2005). Escape from Therapy-Induced Accelerated Cellular Senescence in P53-Null Lung Cancer Cells and in Human Lung Cancers. *Cancer Research*, 65(7), 2795–2803.
96. Tsolou, A., Lamprou, I., Fortosi, A.-O., Lioucia, M., Giatromanolaki, A. and Koukourakis, M. I. (2019). ‘Stemness’ and ‘Senescence’ Related Escape Pathways Are Dose Dependent in Lung Cancer Cells Surviving Post Irradiation. *Life Sciences*, 232, 116562.
97. Malumbres, M. and Barbacid, M. (2009) Cell Cycle, CDKs and Cancer: A Changing Paradigm. *Nature Reviews Cancer*, 9(3), 153–166.
98. Coppé, J.-P., Rodier, F., Patil, C. K., Freund, A., Desprez, P.-Y. and Campisi, J. (2011). Tumor Suppressor and Aging Biomarker P16INK4a Induces Cellular Senescence without the Associated Inflammatory Secretory Phenotype. *Journal of Biological Chemistry*, 286(42), 36396–36403.
99. Leontieva, O. V. and Blagosklonny, M. V. (2013). CDK4/6-Inhibiting Drug Substitutes for P21 and P16 in Senescence: Duration of Cell Cycle Arrest and MTOR Activity Determine Geroconversion. *Cell Cycle*, 12(18), 3063–3069.
100. Kovatcheva, M., Liu, D. D., Dickson, M. A., Klein, M. E., O’Connor, R., Wilder, F. O., Socci, N. D., Tap, W. D., Schwartz, G. K. and Singer, S. (2015). MDM2 Turnover and Expression of ATRX Determine the Choice between Quiescence and Senescence in Response to CDK4 Inhibition. *Oncotarget*, 6(10), 8226.
101. Valenzuela, C. A., Vargas, L., Martinez, V., Bravo, S. and Brown, N. E. (2017). Palbociclib-Induced Autophagy and Senescence in Gastric Cancer Cells. *Experimental Cell Research*, 360(2), 390–396.

102. Bollard, J., Miguela, V., De Galarreta, M. R., Venkatesh, A., Bian, C. B., Roberto, M. P., Tovar, V., Sia, D., Molina-Sánchez, P. and Nguyen, C. B. (2017). Palbociclib (PD-0332991), a Selective CDK4/6 Inhibitor, Restricts Tumour Growth in Preclinical Models of Hepatocellular Carcinoma. *Gut*, 66(7), 1286–1296.
103. Widodo, N., Deocaris, C. C., Kaur, K., Hasan, K., Yaguchi, T., Yamasaki, K., Sugihara, T., Ishii, T., Wadhwa, R. and Kaul, S. C. (2007). Stress Chaperones, Mortalin, and Pex19p Mediate 5-Aza-2' Deoxycytidine-Induced Senescence of Cancer Cells by DNA Methylation-Independent Pathway. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 62(3), 246–255.
104. Amatori, S., Bagaloni, I., Viti, D. and Fanelli, M. (2011). Premature Senescence Induced by DNA Demethylating Agent (Decitabine) as Therapeutic Option for Malignant Pleural Mesothelioma. *Lung Cancer*, 71(1), 113–115.
105. Almeida, L. O., Guimarães, D. M., Martins, M. D., Martins, M. A., Warner, K. A., Nör, J. E., Castilho, R. M. and Squarize, C. H. (2017). Unlocking the Chromatin of Adenoid Cystic Carcinomas Using HDAC Inhibitors Sensitize Cancer Stem Cells to Cisplatin and Induces Tumor Senescence. *Stem Cell Research*, 21, 94–105.
106. Xu, W.-S., Perez, G., Ngo, L., Gui, C.-Y. and Marks, P. A. (2005). Induction of Polyploidy by Histone Deacetylase Inhibitor: A Pathway for Antitumor Effects. *Cancer Research*, 65(17), 7832–7839.
107. Elknerova, K., Myslivcova, D., Lacinova, Z., Marinov, I., Uherkova, L. and Stöckbauer, P. (2011). Epigenetic Modulation of Gene Expression of Human Leukemia Cell Lines-Induction of Cell Death and Senescence. *Neoplasma*, 58(1), 35–44.
108. Kaletsch, A., Pinkerneil, M., Hoffmann, M. J., Vasudevan, A. A. J., Wang, C., Hansen, F. K., Wiek, C., Hanenberg, H., Gertzen, C. and Gohlke, H. (2018). Effects of Novel HDAC Inhibitors on Urothelial Carcinoma Cells. *Clinical Epigenetics*, 10(1), 1–18.
109. Däbritz, J. H. M., Yu, Y., Milanovic, M., Schönlein, M., Rosenfeldt, M. T., Dörr, J. R., Kaufmann, A. M., Dörken, B. and Schmitt, C. A. (2016). CD20-Targeting Immunotherapy Promotes Cellular Senescence in B-Cell Lymphoma. *Molecular Cancer Therapeutics*, 15(5), 1074–1081.
110. Kirkland, J. L. and Tchkonja, T. (2015). Clinical Strategies and Animal Models for Developing Senolytic Agents. *Experimental Gerontology*, 68, 19–25.
111. Kirkland, J. L. and Tchkonja, T. (2020). Senolytic Drugs: From Discovery to Translation. *Journal of Internal Medicine*, 288(5), 518–536.
112. Zhu, Y., Tchkonja, T., Pirtskhalava, T., Gower, A. C., Ding, H., Giorgadze, N., Palmer, A. K., Ikeno, Y., Hubbard, G. B. and Lenburg, M. (2015). The Achilles' Heel of Senescent Cells: From Transcriptome to Senolytic Drugs. *Aging Cell*, 14(4), 644–658.
113. Niedernhofer, L. J. and Robbins, P. D. (2018). Senotherapeutics for Healthy Ageing. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(5), 377–377.

114. Roos, C. M., Zhang, B., Palmer, A. K., Ogrodnik, M. B., Pirtskhalava, T., Thalji, N. M., Hagler, M., Jurk, D., Smith, L. A. and Casacang-Verzosa, G. (2016). Chronic Senolytic Treatment Alleviates Established Vasomotor Dysfunction in Aged or Atherosclerotic Mice. *Aging Cell*, 15(5), 973–977.
115. Farr, J. N., Xu, M., Weivoda, M. M., Monroe, D. G., Fraser, D. G., Onken, J. L., Negley, B. A., Sfeir, J. G., Ogrodnik, M. B. and Hachfeld, C. M. (2017). Targeting Cellular Senescence Prevents Age-Related Bone Loss in Mice. *Nature Medicine*, 23(9), 1072.
116. Schafer, M. J., White, T. A., Iijima, K., Haak, A. J., Ligresti, G., Atkinson, E. J., Oberg, A. L., Birch, J., Salmonowicz, H. and Zhu, Y. (2017). Cellular Senescence Mediates Fibrotic Pulmonary Disease. *Nature Communications*, 8(1), 1–11.
117. Ogrodnik, M., Miwa, S., Tchkonja, T., Tiniakos, D., Wilson, C. L., Lahat, A., Day, C. P., Burt, A., Palmer, A. and Anstee, Q. M. (2017). Cellular Senescence Drives Age-Dependent Hepatic Steatosis. *Nature Communications*, 8(1), 1–12.
118. Bussian, T. J., Aziz, A., Meyer, C. F., Swenson, B. L., van Deursen, J. M. and Baker, D. J. (2018). Clearance of Senescent Glial Cells Prevents Tau-Dependent Pathology and Cognitive Decline. *Nature*, 562(7728), 578–582.
119. Xu, M., Pirtskhalava, T., Farr, J. N., Weigand, B. M., Palmer, A. K., Weivoda, M. M., Inman, C. L., Ogrodnik, M. B., Hachfeld, C. M. and Fraser, D. G. (2018). Senolytics Improve Physical Function and Increase Lifespan in Old Age. *Nature Medicine*, 24(8), 1246–1256.
120. Chang, J., Wang, Y., Shao, L., Laberge, R.-M., Demaria, M., Campisi, J., Janakiraman, K., Sharpless, N. E., Ding, S. and Feng, W. (2016). Clearance of Senescent Cells by ABT263 Rejuvenates Aged Hematopoietic Stem Cells in Mice. *Nature Medicine*, 22(1), 78–83.
121. Zhu, Y., Tchkonja, T., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Dai, H. M., Ling, Y. Y., Stout, M. B., Pirtskhalava, T., Giorgadze, N., Johnson, K. O. and Giles, C. B. (2016). Identification of a Novel Senolytic Agent, Navitoclax, Targeting the Bcl-2 Family of Anti-apoptotic Factors. *Aging Cell*, 15(3), 428–435.
122. Yosef, R., Pilpel, N., Tokarsky-Amiel, R., Biran, A., Ovadya, Y., Cohen, S., Vadai, E., Dassa, L., Shahr, E. and Condiotti, R. (2016). Directed Elimination of Senescent Cells by Inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nature Communications*, 7(1), 1–11.
123. Zhu, Y., Dornebal, E. J., Pirtskhalava, T., Giorgadze, N., Wentworth, M., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Niedernhofer, L. J., Robbins, P. D., Tchkonja, T. and Kirkland, J. L. (2017). New Agents That Target Senescent Cells: The Flavone, Fisetin, and the BCL-XL Inhibitors, A1331852 and A1155463. *Aging (Albany NY)*, 9(3), 955.
124. Fuhrmann-Stroissnigg, H., Ling, Y. Y., Zhao, J., McGowan, S. J., Zhu, Y., Brooks, R. W., Grassi, D., Gregg, S. Q., Stripay, J. L. and Dorronsoro, A. (2017). Identification of HSP90 Inhibitors as a Novel Class of Senolytics. *Nature Communications*, 8(1), 1–14.

125. Jeon, O. H., Kim, C., Laberge, R.-M., Demaria, M., Rathod, S., Vasserot, A. P., Chung, J. W., Kim, D. H., Poon, Y. and David, N. (2017). Local Clearance of Senescent Cells Attenuates the Development of Post-Traumatic Osteoarthritis and Creates a pro-Regenerative Environment. *Nature Medicine*, 23(6), 775.
126. Samaraweera, L., Adomako, A., Rodriguez-Gabin, A. and McDaid, H. M. (2017). A Novel Indication for Panobinostat as a Senolytic Drug in NSCLC and HNSCC. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11.
127. Milanovic, M., Fan, D. N., Belenki, D., Däbritz, J. H. M., Zhao, Z., Yu, Y., Dörr, J. R., Dimitrova, L., Lenze, D. and Barbosa, I. A. M. (2018). Senescence-Associated Reprogramming Promotes Cancer Stemness. *Nature*, 553(7686), 96–100.
128. Baar, M. P., Brandt, R. M. C., Putavet, D. A., Klein, J. D. D., Derks, K. W. J., Bourgeois, B. R. M., Stryeck, S., Rijksen, Y., van Willigenburg, H., Feijtel, D. A., van der Pluijm, I., Essers, J., van Cappellen, W. A., van IJcken, W. F., Houtsmuller, A. B., Pothof, J., de Bruin, R. W. F., Madl, T., Hoeijmakers, J. H. J., Campisi, J. and de Keizer, P. L. J. (2017). Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell*, 169(1), 132-147
129. Liu, P., Zhao, H. and Luo, Y. (2017). Anti-Aging Implications of Astragalus Membranaceus (Huangqi): A Well-Known Chinese Tonic. *Aging and Disease*, 8(6), 868.
130. Tilstra, J. S., Clauson, C. L., Niedernhofer, L. J. and Robbins, P. D. (2011). NF-KB in Aging and Disease. *Aging and Disease*, 2(6) 449.
131. Tilstra, J. S., Robinson, A. R., Wang, J., Gregg, S. Q., Clauson, C. L., Reay, D. P., Nasto, L. A., St Croix, C. M., Usas, A. and Vo, N. (2012). NF-KB Inhibition Delays DNA Damage–Induced Senescence and Aging in Mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(7), 2601–2612.
132. Xu, M., Tchkonja, T., Ding, H., Ogrodnik, M., Lubbers, E. R., Pirtskhalava, T., White, T. A., Johnson, K. O., Stout, M. B. and Mezera, V. (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.
133. Campisi, J. (2013). Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annual Review of Physiology*, 75, 685–705.
134. Kang, H. T., Park, J. T., Choi, K., Kim, Y., Choi, H. J. C., Jung, C. W., Lee, Y.-S. and Park, S. C. (2017). Chemical Screening Identifies ATM as a Target for Alleviating Senescence. *Nature Chemical Biology*, 13(6), 616–623.
135. Cao, K., Blair, C. D., Faddah, D. A., Kieckhaefer, J. E., Olive, M., Erdos, M. R., Nabel, E. G. and Collins, F. S. (2011). Progerin and Telomere Dysfunction Collaborate to Trigger Cellular Senescence in Normal Human Fibroblasts. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(7), 2833–2844.

136. Lee, S.-J., Jung, Y.-S., Yoon, M.-H., Kang, S., Oh, A.-Y., Lee, J.-H., Jun, S.-Y., Woo, T.-G., Chun, H.-Y. and Kim, S. K. (2016). Interruption of Progerin–Lamin A/C Binding Ameliorates Hutchinson–Gilford Progeria Syndrome Phenotype. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(10), 3879–3893.
137. Yang, H. H., Hwangbo, K., Zheng, M. S., Son, J.-K., Kim, H. Y., Baek, S. H., Choi, H. C., Park, S. Y. and Kim, J.-R. (2014). Inhibitory Effects of Juglanin on Cellular Senescence in Human Dermal Fibroblasts. *Journal of Natural Medicines*, 68(3), 473–480.
138. Yang, H. H., Hwangbo, K., Zheng, M. S., Cho, J. H., Son, J.-K., Kim, H. Y., Baek, S. H., Choi, H. C., Park, S. Y. and Kim, J.-R. (2014). Quercetin-3-O- β -D-Glucuronide Isolated from Polygonum Aviculare Inhibits Cellular Senescence in Human Primary Cells. *Archives of Pharmacal Research*, 7(9), 1219–1233.
139. Yang, H. H., Hwangbo, K., Zheng, M. S., Cho, J. H., Son, J.-K., Kim, H. Y., Baek, S. H., Choi, H. C., Park, S. Y. and Kim, J.-R. (2015). Inhibitory Effects of (–)-Loliolide on Cellular Senescence in Human Dermal Fibroblasts. *Archives of Pharmacal Research*, 38(5), 876–884.
140. Yang, H. H., Zhang, H., Son, J.-K. and Kim, J.-R. (2015). Inhibitory Effects of Quercetagenin 3, 4'-Dimethyl Ether Purified from Inula Japonica on Cellular Senescence in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Archives of Pharmacal Research*, 38(10), 1857–1864.
141. Li, J., Kim, S. G. and Blenis, J. (2014). Rapamycin: One Drug, Many Effects. *Cell Metabolism*, 19(3), 373–379.
142. Wang, R., Yu, Z., Sunchu, B., Shoaf, J., Dang, I., Zhao, S., Caples, K., Bradley, L., Beaver, L. M., Ho, E., Löhr, C. V. and Perez, V. I. (2017). Rapamycin Inhibits the Secretory Phenotype of Senescent Cells by a Nrf2-Independent Mechanism. *Aging Cell*, 16(3), 564–574.
143. Barnes, P. J. (2013). Theophylline. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 188(8), 901–906.
144. Barnes, P. J. (2003). Theophylline: New Perspectives for an Old Drug. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 167(6), 813–818.
145. Lim, S., Tomita, K., Carramori, G., Jatakanon, A., Oliver, B., Keller, A., Adcock, I., Chung, K. F. and Barnes, P. J. (2001). Low-Dose Theophylline Reduces Eosinophilic Inflammation but Not Exhaled Nitric Oxide in Mild Asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 164(2), 273–276.
146. Sullivan, P., Jaffar, Z., Page, C., Costello, J., Bekir, S. and Jeffery, P. (1994). Anti-Inflammatory Effects of Low-Dose Oral Theophylline in Atopic Asthma. *The Lancet*, 343(8904), 1006–1008.
147. Rabe, K., Magnussen, H. and Dent, G. (1995). Theophylline and Selective PDE Inhibitors as Bronchodilators and Smooth Muscle Relaxants. *European Respiratory Journal*, 8(4), 637–642.

148. Pauwels, R. and Joos, G. (1995). Characterization of the Adenosine Receptors in the Airways. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*, 329(1), 151–160.
149. Björck, T., Gustafsson, L. E. and Dahlén, S.-E. (1992). Isolated Bronchi from Asthmatics Are Hyperresponsive to Adenosine, Which Apparently Acts Indirectly by Liberation of Leukotrienes and Histamine. *American Review of Respiratory Disease*, 145(5), 1087–1091.
150. Cushley, M., Tattersfield, A. and Holgate, S. (1984). Adenosine-Induced Bronchoconstriction in Asthma: Antagonism by Inhaled Theophylline. *American Review of Respiratory Disease*, 129(3), 380–384.
151. Barnes, P. J. (2001). IL-10: a key regulator of allergic disease. *Clinical & Experimental Allergy*, 31(5), 667–669.
152. Cvietusa, P., Mascali, J. J., Negri, J. and Borish, L. (1996). Anti-Inflammatory Effects of Theophylline: Modulation of Cytokine Production. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 77(1), 34–38.
153. Tomita, K., Chikumi, H., Tokuyasu, H., Yajima, H., Hitsuda, Y., Matsumoto, Y. and Sasaki, T. (1999). Functional Assay of NF-KB Translocation into Nuclei by Laser Scanning Cytometry: Inhibitory Effect by Dexamethasone or Theophylline. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 359(4), 249–255.
154. Ohta, K. and Yamashita, N. (1999). Apoptosis of Eosinophils and Lymphocytes in Allergic Inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 104(1), 14–21.
155. Moonen, H. J., Geraets, L., Vaarhorst, A., Bast, A., Wouters, E. F. and Hageman, G. J. (2005). Theophylline Prevents NAD⁺ Depletion via PARP-1 Inhibition in Human Pulmonary Epithelial Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(4), 1805–1810.
156. Ito, K., Lim, S., Caramori, G., Cosio, B., Chung, K. F., Adcock, I. M. and Barnes, P. J. (2002). A Molecular Mechanism of Action of Theophylline: Induction of Histone Deacetylase Activity to Decrease Inflammatory Gene Expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(13), 8921–8926.
157. Cosio, B. G., Tsaprouni, L., Ito, K., Jazrawi, E., Adcock, I. M. and Barnes, P. J. (2004). Theophylline Restores Histone Deacetylase Activity and Steroid Responses in COPD Macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*, 200(5), 689–695.
158. To, Y., Ito, K., Kizawa, Y., Failla, M., Ito, M., Kusama, T., Elliott, W. M., Hogg, J. C., Adcock, I. M. and Barnes, P. J. (2010). Targeting Phosphoinositide-3-Kinase- δ with Theophylline Reverses Corticosteroid Insensitivity in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 182(7), 897–904.
159. Osoata, G. O., Yamamura, S., Ito, M., Vuppusetty, C., Adcock, I. M., Barnes, P. J. and Ito, K. (2009). Nitration of Distinct Tyrosine Residues Causes Inactivation of Histone Deacetylase 2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 384(3), 366–371.

160. Hirano, T., Yamagata, T., Gohda, M., Yamagata, Y., Ichikawa, T., Yanagisawa, S., Ueshima, K., Akamatsu, K., Nakanishi, M. and Matsunaga, K. (2006). Inhibition of Reactive Nitrogen Species Production in COPD Airways: Comparison of Inhaled Corticosteroid and Oral Theophylline. *Thorax*, 61(9), 761–766.
161. Miller, K. M., Tjeertes, J. V., Coates, J., Legube, G., Polo, S. E., Britton, S. and Jackson, S. P. (2010). Human HDAC1 and HDAC2 Function in the DNA-Damage Response to Promote DNA Nonhomologous End-Joining. *Nature structural & Molecular Biology*, 17(9), 1144–1151.
162. Wagner, M., Brosch, G., Zwerschke, W., Seto, E., Loidl, P. and Jansen-Dürr, P. (2001). Histone Deacetylases in Replicative Senescence: Evidence for a Senescence-Specific Form of HDAC-2. *Federation of European Biochemical Societies (FEBS) letters*, 499(1-2), 101–106.
163. 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.
164. Şimay, Y. D., Özdemir, A., İbişoğlu, B., and Ark, M. (2018). The connection between the cardiac glycoside-induced senescent cell morphology and Rho/Rho kinase pathway. *Cytoskeleton*, 75(11), 461-471.
165. Chang, Y. L., Hsu, Y. J., Chen, Y., Wang, Y. W., and Huang, S. M. (2017). Theophylline exhibits anti-cancer activity via suppressing SRSF3 in cervical and breast cancer cell lines. *Oncotarget*, 8(60), 101461.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : KARGIOĞLU, Esin

Uyruğu : T.C.

Eğitim

Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji A.B.D.	Devam ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2018
Lise	Samsun Anadolu Lisesi	2011

İş Deneyimi

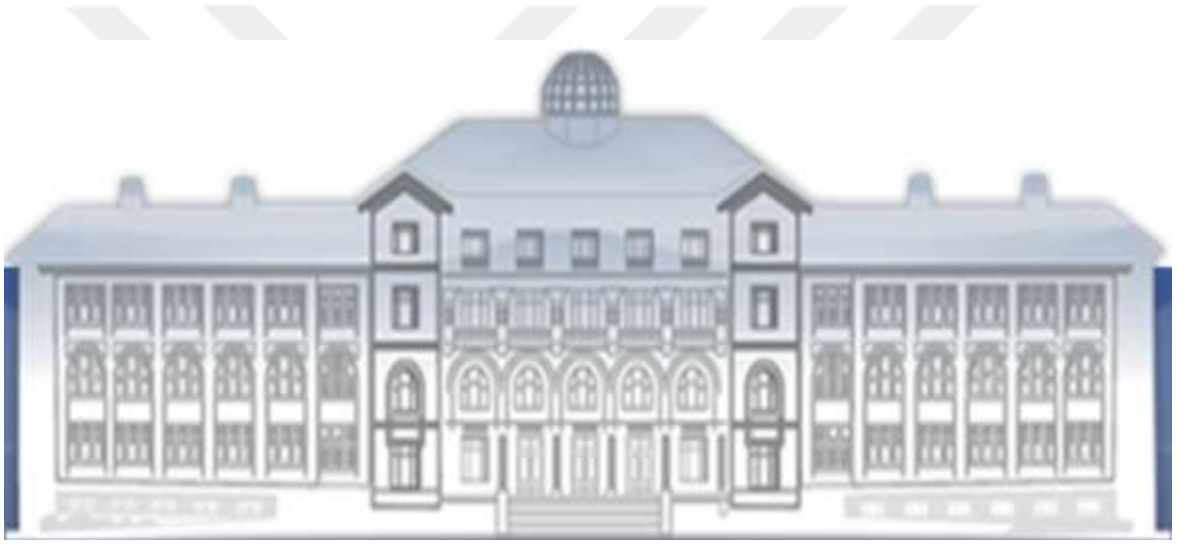
Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2019-devam ediyor	Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu	Eczacı

Yabancı Dili

İngilizce

Yayınlar

1. Şahinoğlu, E., Ark, M., and Özdemir, A. (2021). A Potential Senotherapeutic Drug: Theophylline Restores The Doxorubicin-Induced Senescent Cell Morphology In A549 Cells. *3rd International Gazi Pharma Symposium Series*, Ankara, Türkiye, 8 - 10 Eylül 2021.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

