



**KARDİYOTROFİN-1 (CTF-1)'İN DOKSORUBİSİN İLE İNDÜKLENEN
SENESENT KANSER HÜCRELERİNDE EKSPRESYON VE
SEKRESYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Tuğçe TAYYAR

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

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

MAYIS 2024

ETİK BEYAN

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

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

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

Tuğçe TAYYAR
05/06/2024

KARDİYOTROFİN-1 (CTF-1)'İN DOKSORUBİSİN İLE İNDÜKLENEN SENESENT
KANSER HÜCRELERİNDE EKSPRESYON VE SEKRESYONUNUN
DEĞERLENDİRİLMESİ
(Yüksek Lisans Tezi)

Tuğçe TAYYAR

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Mayıs 2024

ÖZET

Hücrel senesens, geri dönüşümsüz hücre döngüsü durması ile karakterize bir durumdur. Hücre döngüsünden çıkmalarına rağmen metabolik olarak aktif kalırlar. Replikatif senesensin yanı sıra, çeşitli intrinsik ve ekstrinsik stres faktörlerine bağlı olarak gelişen “stresle indüklenen prematür senesens” (stress-induced premature senescence) olarak adlandırılan farklı senesens türleri tanımlanmıştır. Senesent hücreler, büyümüş, yassılaştı ve çok çekirdekli bir morfolojiye sahiptir. Senesent hücreler, senesens ile ilişkili sekretuar fenotip (SASP) adı verilen, çeşitli sitokinleri, kemokinleri, proteazları ve büyüme faktörlerini içeren bir dizi proinflamatuvar faktör salgılar. SASP faktörleri, tümör oluşumunun çeşitli yönlerini güçlendirebilen proinflamatuvar ve immün modüle edici moleküller içerir. Kardiyotrofin-1 (CTF-1), IL-6 ailesine ait bir sitokin olarak, meme kanserinden izole edilen karsinomla ilişkili fibroblastlarda (CAF'ler) yeni bir otofaji aktivatörü olarak belirlenmiştir. Östrojen reseptörü pozitif MCF-7 ve T47D meme kanseri hücrelerinden sekrete edilen CTF-1'in fibroblastlarda otofajiyi indüklediğini göstermişlerdir. Bu tez çalışmasında, standart kemoterapötik bir ajan olan doksorubisin (300 nM) ile indüklenen üç farklı kanser hücresinde (meme adenokarsinom MCF7 hücre hattı, serviks adenokarsinom HeLa hücre hattı, akciğer adenokarsinom A549 hücre hattı) senesens sonrası sekrete edilen IL-6 ve CTF-1 seviyeleri ölçülüp hücreler arası farklılıkların incelenmesi amaçlanmıştır. Bulgularımızda, 300 nM doksorubisin ile indüklenen senesent MCF7 hücre sekretomunda IL-6 sekresyonu görülmezken, CTF-1 sekresyonunda anlamlı bir artış görülmüştür. Buna karşın HeLa ve A549 hücre sekretomlarında IL-6 sekresyonunda anlamlı bir artış gözlemlenirken, CTF-1 sekresyonu görülmemektedir. Bu veriler, çeşitli kanser hücrelerinin sekretuar aktivitesindeki farklılıkları ve hücre-spesifik tedavi şekli geliştirmenin önemini göstermektedir. Ayrıca CTF-1'in hücre spesifik bir hücrel senesens biyobelirteci olabileceğini düşündürmektedir.

Bilim Kodu : 1018.1
Anahtar Kelimeler : A549, MCF7, HeLa, CTF-1, Kanser, SASP, Senesens
Sayfa Adedi : 57
Danışman : Prof. Dr. Aysun ÖZDEMİR

ASSESSMENT OF EXPRESSION AND SECRETION OF CARDIOTROPHIN-1 (CTF-1)
IN DOXORUBICIN-INDUCED SENESCENT CANCER CELLS

(M.Sc. Thesis)

Tuğçe TAYYAR

GAZI UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

May 2024

ABSTRACT

Cellular senescence is a condition characterized by irreversible cell cycle arrest. Although they exit the cell cycle, they remain metabolically active. In addition to replicative senescence, different types of senescence have been described, termed “stress-induced premature senescence”, which develops due to various intrinsic and extrinsic stress factors. Senescent cells have an enlarged, flattened and multinucleated morphology. Senescent cells secrete a set of proinflammatory factors called senescence-associated secretory phenotype (SASP), which includes various cytokines, chemokines, proteases and growth factors. SASP factors contain proinflammatory and immune-modulating molecules that can potentiate various aspects of tumorigenesis. Cardiotrophin-1 (CTF-1), a cytokine belonging to the IL-6 family, was identified as a novel autophagy activator in carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) isolated from breast cancer. They showed that CTF-1 secreted from estrogen receptor positive MCF-7 and T47D breast cancer cells induced autophagy in fibroblasts. In this thesis, we aimed to measure the levels of IL-6 and CTF-1 secreted after senescence in three different cancer cells (breast adenocarcinoma MCF7 cell line, cervical adenocarcinoma HeLa cell line, lung adenocarcinoma A549 cell line) induced by doxorubicin (300 nM), a standard chemotherapeutic agent, and to examine the differences between cells. In our findings, no IL-6 secretion was observed in 300 nM doxorubicin-induced senescent MCF7 cell secretome, whereas a significant increase in CTF-1 secretion was observed. In contrast, HeLa and A549 cell secretomes showed a significant increase in IL-6 secretion, but not CTF-1 secretion. These data demonstrate the differences in the secretory activity of various cancer cells and the importance of developing cell-specific therapies. They also suggest that CTF-1 may be a cell-specific biomarker of cellular senescence.

Science Code : 1018.1
Keywords : A549, MCF7, HeLa, CTF-1, Cancer, SASP, Senescence
Page Number : 57
Supervisor : Prof. Aysun OZDEMIR

TEŞEKKÜR

Öncelikle, bu süreç boyunca bana yol gösteren, bilgilerini benimle cömertçe paylaşan ve her adımda güler yüzü ve sabrıyla bana destek olan değerli danışmanım Prof. Dr. Aysun Özdemir'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezime dair bilgi ve önerileriyle bana yön gösteren saygıdeğer hocam Prof. Dr. Mustafa Ark'a da içten teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, bana maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili aileme teşekkür ederim. Onların sevgisi, anlayışı ve desteği bu süreci daha kolay ve anlamlı kıldı.

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından TYL-2023-8901 proje numarası ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Hücresel Senesens	3
2.1.1. Senesens çeşitleri	3
2.1.2. Senesent hücrelerin morfolojik ve fonksiyonel özellikleri	9
2.1.3. Senesens ile ilişkili sekretuvar fenotip (SASP).....	10
2.1.4. İnterlökin (IL)-6 ailesi sitokinleri.....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Gereç	23
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler.....	23
3.1.2. Kullanılan aletler	23
3.2. Yöntemler.....	24
3.2.1. Hücre kültürü ve senesens indüksiyonu	24
3.2.2. SA-β-Gal boyaması.....	24
3.2.3. Üç boyutlu holografik mikroskopi	25
3.2.4. Sekretom toplanması	25
3.2.5. Senesent hücre sekretomunda IL-6 ölçümü	26
3.2.6. Protein miktar tayini.....	26
3.2.7. Senesent hücre sekretomunda CTF-1 ölçümü.....	27
3.2.8. Senesent hücrelerde CTF1 ekspresyonunun ölçümü	28
3.2.9. İstatistiksel analiz	28

Sayfa

4. BULGULAR	31
4.1. MCF-7, A549 ve HeLa Hücrelerinde Doksorubisinin Senesens Oluşumuna Etkisinin Değerlendirilmesi	31
4.1.1. SA- β -galaktozidaz boyaması	31
4.1.2. Senesent hücre morfolojisinin holografik mikroskop ile değerlendirilmesi.....	33
4.2. Senesent MCF-7, A549 ve HeLa Hücre Sekretomlarında IL-6 Sekresyonunun Değerlendirilmesi	37
4.3. Senesent MCF-7, A549 ve HeLa Hücre Sekretomlarında CTF-1 Sekresyonunun Değerlendirilmesi	38
4.4. Senesent MCF-7, A549 ve HeLa Hücrelerinde CTF-1 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	39
5. TARTIŞMA.....	41
6. SONUÇ	45
KAYNAKLAR.....	47
ÖZGEÇMİŞ.....	57

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Senesens çeşitlerinin şematik gösterimi	5



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Hücre döngüsü durması şematik gösterimi.....	5
Şekil 2.2. SASP faktörlerinin pozitif ve negatif etkileri. SASP: Senesens ile ilişkili sekretuar fenotip.....	14
Şekil 2.3. Tedaviyle indüklenen senesent hücrelerde SASP'ın hücre dışı otonom sinyali.....	18
Şekil 3.1. Bu tez çalışmasında kullanılan yöntemlerin şematik gösterimi.	29
Şekil 4.1. MCF-7, A549 ve HeLa hücrelerine sırasıyla 3 gün, 4 gün ve 2 gün doksorubisin uygulaması sonrası yapılan SA- β -Gal boyamasının ardından elde edilen ışık mikroskopu görüntülerinden sayılan SA- β -gal pozitif hücre yüzdesinin istatistiksel analizi	33
Şekil 4.2. MCF-7 hücrelerine 3 gün doksorubisin uygulaması sonrası çekilen holografik görüntüleri üzerinden elde edilen hücre alanı, hücre hacmi, maksimum kalınlık, ortalama kalınlık parametrelerinin ölçümleri.....	35
Şekil 4.3. A549 hücrelerine 4 gün doksorubisin uygulaması sonrası çekilen holografik görüntüleri üzerinden elde edilen hücre alanı, hücre hacmi, maksimum kalınlık, ortalama kalınlık parametrelerinin ölçümleri.....	36
Şekil 4.4. HeLa hücrelerine 2 gün doksorubisin uygulaması sonrası çekilen holografik görüntüleri üzerinden elde edilen hücre alanı, hücre hacmi, maksimum kalınlık, ortalama kalınlık parametrelerinin ölçümleri.....	37
Şekil 4.5. Senesent MCF-7, A549 ve HeLa hücrelerinde IL-6 sekresyonunun belirlenmesi.....	38
Şekil 4.6. Senesent MCF-7, A549 ve HeLa hücrelerinde CTF-1 sekresyonunun belirlenmesi.....	39
Şekil 4.7. Senesent MCF-7, A549 ve HeLa hücrelerinde CTF-1 ekspresyonunun belirlenmesi.....	40

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. MCF-7, A549 ve HeLa hücrelerine sırasıyla 3 gün, 4 gün ve 2 gün doksorubisin uygulaması sonrası yapılan SA- β -Gal boyamasının ardından hücrelerin ışık mikroskobu ile elde edilen görüntüleri	32
Resim 4.2. MCF-7, A549 ve HeLa hücrelerine sırasıyla 3 gün, 4 gün ve 2 gün doksorubisin uygulaması sonrası holografik mikroskop ile elde edilen morfolojik görüntüleri.....	34



SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler

Açıklamalar

nM

Nanomolar

Kısaltmalar

Açıklamalar

53BP1	p53 bağlayıcı protein 1
A549	Akciğer adenokarsinom a549 hücre hattı
AMP	Adenozin monofosfat
ARF	ADP-ribozilasyon faktörü
ATM	Mutasyona uğramış-ataksi telenjektazi DNA hasarı kinazları
ATP	Adenozin trifosfat
ATR	Rad3 ile ilişkili ataksi telenjektazi
BMI1	Polikomb kompleks protein
BSA	Bisikoninik asit
C/EBPβ	CCAAT/arttırıcı bağlayıcı protein-B
CAF	Karsinomla ilişkili fibroblastlar
CCL8	CC motif kemokin ligandı 8
CHK1/2	Kontrol noktası kinaz 1/2 protein
CLC	Kardiyotrofin benzeri sitokin
CNE1	Nazofarenks karsinom hücre hattı
CNTF	Siliyer nörotrofik faktör
CTF-1	Kardiyotrofin-1
CXCL1	Kemokin ligandı 1
DAMP	Hasarla ilişkili moleküler modeller
DDR	DNA hasar tepkisi
DMEM	Dulbecco'nun modifiye eagle ortamı
DNA-SCARS	Senesensi güçlendiren kromatin değişikliklerine sahip DNA segmentleri

Kısaltmalar**Açıklamalar**

DNMT	DNA metiltransferaz
DSB	DNA çift sarmal kırıkları
EGF	Epidermal büyüme faktörü
ER	Endoplazmik retikulum
eSASP	Eksozomal SASP
ETC	Elektron transport zinciri
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
GATA4	GATA bağlayıcı protein 4
G-CSF	Granülosit koloni stimüle edici faktör
GFP-LC3	Yeşil floresan protein-LC3
g-H2AX	H2AX histon varyantının fosforile formu
HEK293T	İnsan embriyonik böbrek hücre hattı
HeLa	Serviks adenokarsinom hela hücre hattı
Huh7	Karaciğer karsinomu hücre hattı
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL-6	İnterlökin-6
IL6R	İnterlökin-6 reseptörü
JAK/STAT	Janus kinaz/sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü
LC3	Hafif zincir 3 geni
LIF	Lösemi inhibitör faktör
MCF7	Meme adenokarsinom MCF7 hücre hattı
MCP	Membran kofaktör proteinleri
MDA-MB-231	Meme adenokarsinomu hücre hattı
MDC1	DNA hasarı kontrol noktası proteini 1 aracısı
MIP	Makrofaj inflamatuvar proteinleri
MiDAS	Mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna bağlı senesens
MMP	Matriks metalloproteinazlar
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotit
NBS1	Nibrin
NF- κB	Nükleer faktör kappa B
OIS	Onkojen aktivasyonu ile indüklenen senesens

Kısaltmalar**Açıklamalar**

OSM	Onkostatin M
p16	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A
p21	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1
p38MAPK	p38 mitojen-aktif edici protein kinaz
P53	Tümör protein 53
PBS	Fosfat tampon salin
PC3	Prostat adenokarsinomu hücre hattı
pRB	Retinoblastoma protein
PRC	Polikomb baskılayıcı kompleks
ROS	Reaktif oksijen türleri
SAHF	Senesens ile ilişkili heterokromatin odakları
SASP	Senesens ile ilişkili sekreter fenotip
SA-β-gal	Senesens ilişkili- β -galaktosidaz
SIPS	Stresle indüklenen prematür senesens
SMS	Senesens mesaj salgısı
T47D	Meme karsinomu hücre hattı
TIF	Telomer disfonksiyonuna bağlı odaklar
TIS	Terapiyle indüklenen senesens
TLR9	Toll benzeri reseptör-9
tPA	Doku plazminojen aktivatörü
uPR	Katlanmamış protein yanıtının

1. GİRİŞ

Hücrel senesens çeşitli stres faktörlerine maruziyet sonrasında geri dönüşümsüz olarak hücre döngüsünün durması ile karakterize bir durumdur. Bu hücreler hücre siklusundan çıkmış olsalar bile yüksek metabolik aktivite sergiler ve canlılıklarını sürdürürler. Senesent hücreler, büyümüş, yassılaştırmış, büyük ve çok çekirdekli bir morfolojiye sahiptir [1]. Hücrel senesensin ayırt edici özellikleri; hücre döngüsünün uzun süreli olarak durması, transkripsiyonel değişiklikler, makromoleküler hasar ve düzensiz metabolizma gibi faktörlerdir [2]. Senesent hücrelerin en önemli özelliklerinden biri de senesens ile ilişkili sekreteruar fenotip (*senescence-associated secretory phenotype, SASP*) olarak adlandırılan aşırı sekreteruar aktiviteye sahip olmalarıdır [3]. SASP, otokrin ve parakrin etkilere aracılık eden sitokin, kemokin, proteazlar, büyüme faktörleri gibi çeşitli mediyatörleri içermektedir. SASP'ın dahil olduğu fizyolojik ve patolojik ve süreçleri anlamak için SASP içeriğinin belirlenmesi önemlidir.

Replikatif senesens, hücrel senesensin ilk tanımlanan alt tipidir [4]. Bu süreç, temelde telomerlerin erozyonu ve bu nedenle DNA lezyonlarının artışından kaynaklanır. Ayrıca senesens oksidatif hasar, metabolik işlev bozuklukları, sitokinler, onkogen aktivasyonu ve kemoterapi ajanları gibi bir dizi intrinsik ve ekstrinsik etken tarafından tetiklenebilir. Tüm bu faktörlerin, normal ve kanser hücrelerinde DNA hasarına sebep olduğu ve senesensi indüklediği gösterilmiştir [2, 5]. Normal ve kanser hücrelerinde radyasyon ve/veya bazı kemoterapötik ajanlara maruziyet sonrasında, DNA çift sarmal kırıklarının (DSB'ler) indüklenmesi nedeniyle terapiyle indüklenen senesens (*therapy-induced senescence, TIS*) meydana gelmektedir [6].

Kanser hücrelerinde senesens ilk tanımlandığında, senesens indüksiyonun kanser tedavisinde kullanılabilecek yeni bir yaklaşım olduğu kabul edilmiştir. Fakat daha sonra yapılan çalışmalarda, senesent hücrelerin kronik olarak birikimi, kanser nüksüne ve metastazına aracılık ettiği belirlenmiştir. Bu istenmeyen etkilerin SASP faktörleri ile ilişkili olduğu görülmüştür [5]. Bu nedenle son yıllarda, senesent hücreleri hedef alan yeni tedavi mekanizmalarının belirlenmesi ve kanser tedavisi sonrasında gelişen senesent hücre birikiminin zararlı sonuçlarının önlenmesine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır.

Kardiyotrofin-1 (*CTF-1*), başlangıçta hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak miyositlerinin hipertrofisini indükleyen bir faktör olarak keşfedilen IL-6 sitokin ailesinin bir üyesidir. Daha sonra, CTF-1'in, hem kalp hem de nöronal hücrelerin hayatta kalmasını uyarma yeteneği de dahil olmak üzere, kalp ve kalp dışı hücreler üzerinde çok çeşitli farklı etkilere sahip olduğu gösterilmiştir [7]. Son yıllarda yapılan bir çalışmada CTF-1, fibroblastlarda güçlü bir otofaji aktivatörü olarak tanımlanmıştır. Akkoc ve ark., östrojen reseptörü pozitif MCF-7 ve T47D meme kanseri hücrelerinden sekrete edilen CTF-1'in fibroblast otofajisinin ve CAF (karsinomla ilişkili fibroblastlar) farklılaşmasının güçlü bir düzenleyicisi olduğunu açıklamışlardır [8]. Ayrıca aynı çalışmada, kanser hastalarından alınan meme tümörü örneklerinde CTF1 ekspresyonunun, stromal otofaji ve lenf nodu metastazı ile önemli ölçüde korele olduğu, bu nedenle CTF1'in, tümör-stroma etkileşimlerinin önemli bir bileşeni olduğu vurgulanmıştır [8].

Yaygın olarak, senesens hücreleri belirlemek için hücrelerdeki morfolojik değişikliklerin gözlemlenmesi, lizozomal enzim aktivitesinin ve sekretuvar aktivitenin ölçülmesi gibi çeşitli klasik yöntemler kullanılmaktadır. Normal hücrelerde indüklenen senesensde, IL-6 ekspresyonunun arttığı bilindiğinden, senesent hücrelerin sekretuvar aktivitesinin belirlenmesinde IL-6 klasik bir SASP belirteci olarak kabul edilmiştir.

Bu tez çalışmasında standart kemoterapötik ajan olan doksorubisin ile üç farklı kanser hücresinde (meme adenokarsinom MCF7 hücre hattı, serviks adenokarsinom HeLa hücre hattı, akciğer adenokarsinom A549 hücre hattı) senesens indükleneyecektir. Daha sonra bu üç senesent kanser hücresinde sekrete edilen IL-6 ve CTF1 miktarları ölçülüp, hücreler arası olası farklılıklar incelenecektir. Ayrıca, bu hücrelerde CTF-1 ekspresyonları da değerlendirilecektir.

Bahsedildiği gibi, son yıllarda SASP kanser gibi çeşitli patolojik durumlar için itici bir güç olarak kabul edilmekte ve bu hastalıkların tedavisinde umut verici bir terapötik hedef olarak ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle farklı hücrelerdeki SASP içeriğinin farklarının belirlenmesi hücre-spesifik tedavi şekli geliştirmek için önemli bir basamaktır. Bu tez çalışmasında sekrete edilen CTF1 düzeylerinde senesent hücreler arası bir fark bulunması ve hücre-spesifik yeni bir biyobelirteç belirlenmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hücresel Senesens

Hücresel senesens, diploid hücrelerde meydana gelen ve hücrelerin proliferatif yaşam sürelerini sınırlayan geri dönüşsüz bir hücre döngüsü durmasıdır. Hücresel senesensin ilk tanımı, 1960'ların başlarında Hayflick ve Moorhead tarafından yapılan gözlemlere dayanmaktadır. Bu gözlemlerde, insan diploid fibroblastlarının kültürlerinde maksimum hücre bölünmesine ulaşabildikleri noktada hücre büyümesinin durduğu görülmüştür [4]. Bu biyolojik saat, genellikle "Hayflick limiti" olarak adlandırılır ve her hücre bölünmesi sırasında telomerlerin kademeli olarak kısalmasından kaynaklanır. Bu süreç, genomik istikrarsızlığı ve dolayısıyla DNA hasarının birikmesini önlemek için bir fizyolojik yanıtı temsil eder. Bu olgu şu anda replikatif senesens olarak tanımlanmaktadır. [4, 9]. Senesens, tespit edilebilir herhangi bir telomer kaybı veya işlev bozukluğu olmaksızın da çeşitli koşullar tarafından tetiklenebilir. Hücrelerin; iyonize radyasyon, oksidatif stres, onkogenik aktivasyon ve kemoterapötik ilaçlara maruziyet gibi DNA hasarına yol açan çeşitli stres tiplerine cevap olarak hücresel senesense uğradığı ortaya konmuştur. Bu tür senesens oluşumu, telomer kısalması ile indüklendiği aşamadan önce ortaya çıktığı için “stresle indüklenen prematür senesens (*stress-induced premature senescence*)” olarak adlandırılmıştır [10].

2.1.1. Senesens çeşitleri

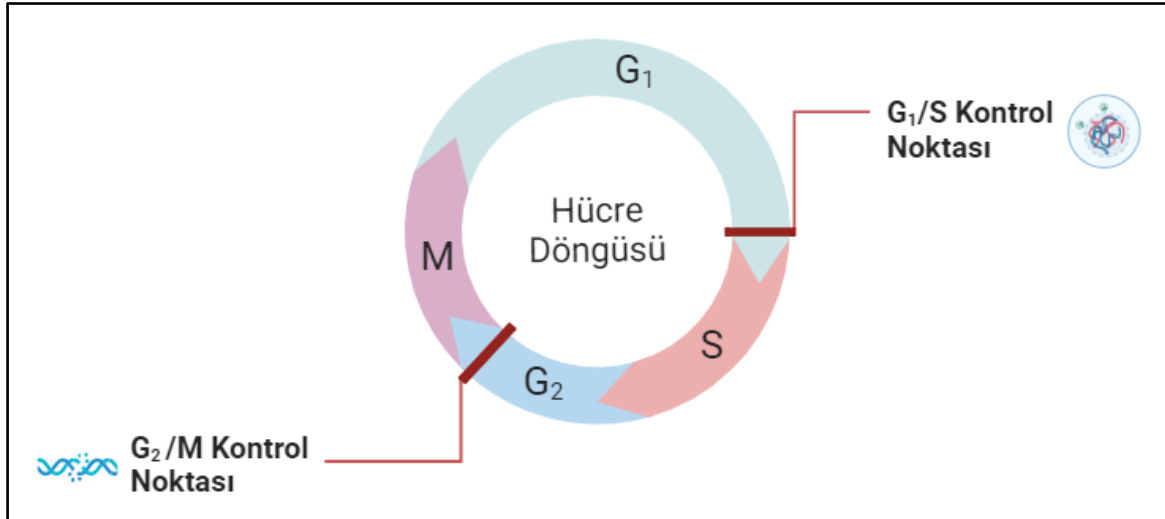
Replikatif senesens

İnsan dokusundan kültürlen primer hücrelerle ilgili yapılan ilk gözlemlerden biri, bu hücrelerin sonsuza kadar çoğalmadığı, aksine "ölümlü" olduklarıdır. Aslında, hücreler kültür edildikten sonra çoğalma kapasiteleri tutarlı bir şekilde üç faz gösterir: Kültürün yerleştiği süre boyunca çok az çoğalma dönemine karşılık gelen faz I; hızlı hücre çoğalmasıyla karakterize edilen faz II; ve çoğalmanın kademeli olarak tamamen durduğu faz III [4]. Faz III'e geçişin olası nedenleri hakkında yorum yapan Hayflick (1965), "Diploid hücre suşlarının in vitro ortamdaki sınırlı ömrünün, hücresel düzeyde senesens veya senesensin bir ifadesi olabileceği" hipotezini ortaya atmıştır. Bu nedenle hücresel senesens terimi, canlılığın ve metabolik aktivitenin devam etmesine rağmen proliferatif kapasitenin istikrarlı

ve uzun süreli kaybını ifade eder [11]. Hayflick'in önerisiyle tutarlı olarak, insan hücrelerinin kültürde çoğalmasıyla birlikte telomerlerin (koruyucu kromozom uçları) giderek kısaldığını ve nihayetinde hücrelerin "Hayflick sınırına" ulaşmasına neden olduğunu artık biliyoruz. Bu, replikatif (hücresel) senesens olarak adlandırılmıştır. Telomerler, DNA polimerazın geride kalan iplikçikleri tamamen replike edememesi nedeniyle yıpranmaya maruz kalır. 1970'lerin başında, Olovnikov (1971) ve Watson (1972), telomer kısalmasına katkıda bulunan bu "son replikasyon problemi"ni tanımlamışlardır [12, 13]. Telomerler kritik bir minimum uzunluğa ulaştığında, koruyucu yapıları bozulur. Bu durum, g-H2AX (H2AX histon varyantının fosforile formu) ve DDR proteinleri p53 bağlayıcı protein 1 (*p53 binding protein*, 53BP1), nibrin (NBS1) ve DNA hasarı kontrol noktası proteini 1 aracısı (*Mediator of DNA damage checkpoint protein 1*, MDC1)) için pozitif boyanan odakların ortaya çıkmasıyla ilişkili bir DNA hasar tepkisini (DDR) tetikler. Ayrıca, Mutasyona Uğramış-Ataksi Telenjipektazi DNA hasarı kinazları (*Protein kinase ataxia-telangiectasia mutated* (ATM)) ve Rad3 ile ilişkili Ataksi Telenjipektazi (ATR) senesent hücrelerde aktive edilir [14]. DDR sinyalinin amplifikasyonundan sonra, bu kinazlar kontrol noktası kinaz 1 (*Checkpoint Kinase 1 Protein*, CHK1) ve kontrol noktası kinaz 2 (*Checkpoint Kinase 2 Protein*, CHK2) kinazlarını aktive eder. DDR ile ilişkili faktörler ve hücre döngüsü mekanizması arasındaki iletişim, CDC25 (bir fosfataz ailesi) ve tümör protein 53 (p53) gibi birkaç hücre döngüsü proteininin fosforilasyonu ve aktivasyonu ile sağlanır. Ayrıca, p53 izoformlarının diferansiyel ifadesi replikatif senesens ile ilişkilendirilmiştir [15]. Bu değişiklikler bir arada, hücre hasarının onarılmasına olanak tanıyarak geçici bir proliferasyon durmasına neden olabilir. Ancak, DNA hasarı belirli bir eşiği aştığında, hücreler ya apoptozise ya da senesense girmeye mahkumdur. Bu farklı sonuçları ortaya çıkaran faktörler büyük ölçüde anlaşılamamıştır, ancak hücre tipi, sinyalin yoğunluğu ve süresinin, hasarın doğasının muhtemel belirleyicileri olduğu düşünülmektedir [16].

Stresle indüklenen prematür senesens (*stress-induced premature senescence*, SIPS)

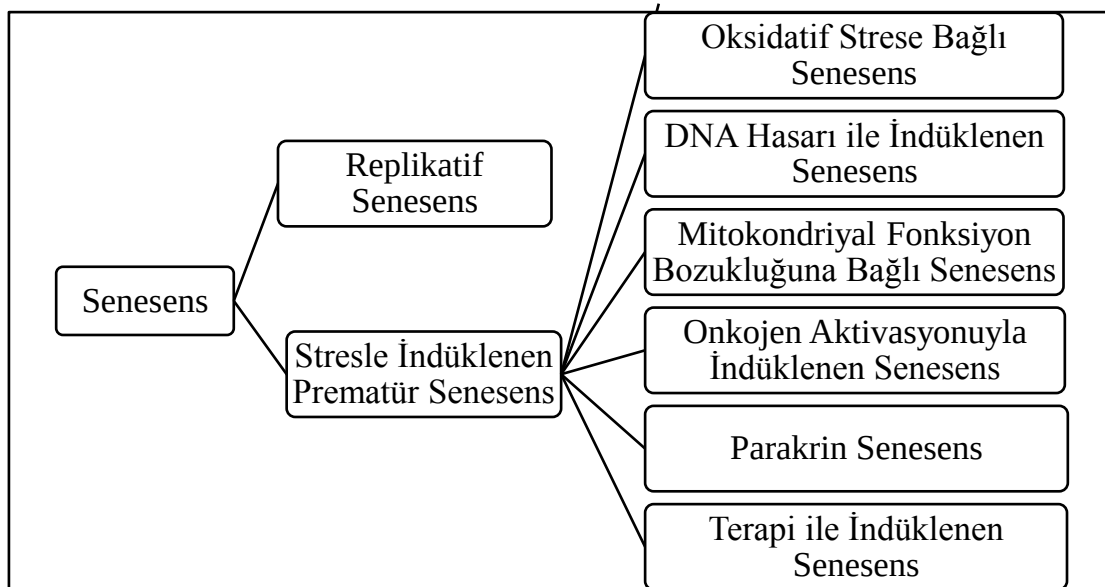
Hücrelerde senesens fenotipinin ortaya çıkışını hızlandırabilen her türlü sub-sitotoksik stres, SIPS'in tetikleyicisi olarak kabul edilir. Replikatif ve stresle indüklenen senesensin kökenleri farklı olsa da, her iki süreç de DNA hasar yanıtının aktivasyonu, tümör baskılayıcı işlevlerin up-regülasyonu ve G1/S veya G2/M kontrol noktalarında kalıcı büyüme durması açısından güçlü benzerlikler gösterir [17, 18], (Şekil 2.1.) ve bu nedenle her ikisi de senesensin moleküler temelini anlamak için uygun model sistemler olarak kullanılmıştır.



Şekil 2.1. Hücre döngüsü durması şematik gösterimi

SIPS olarak bilinen intrinsik ve ekstrinsik stres faktörlerine bağlı olarak farklı senesens türleri tanımlanmıştır. Bunlara DNA hasarı ile indüklenen senesens (*DNA damage-induced senescence*), onkojen aktivasyonu ile indüklenen senesens (*oncogene-induced senescence*, OIS), oksidatif strese bağlı senesens (*oxidative stress-induced senescence*), terapi ile indüklenen senesens (*therapy-induced senescence*, TIS), mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna bağlı senesens (*mitochondrial dysfunction-associated senescence*, MiDAS)) ve parakrin senesens (*paracrine senescence*) denir [19] (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.1. Senesens çeşitlerinin şematik gösterimi



Oksidatif strese bağlı senesens (oxidative stress-induced senescence)

Oksijen, hidrojen peroksit ve tert-butilhidroperoksitin neden olduğu oksidatif stresin insan ve fare hücrelerinde senesensi indüklediği bilinmektedir. Bu reaktifler ve H-RasV12 gibi aktive onkogenler de dahil olmak üzere diğer stres faktörleri reaktif oksijen türleri (ROS) üretir, bu da DNA hasar yanıtına ve hücrel senesensin indüklenmesine yol açar [20]. ROS ile indüklenen senesens, mitokondriyal ve mitokondriyal olmayan yollarla ilerler ve muhtemelen p53, retinoblastoma protein (pRB), siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A (p16) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1 (p21) gibi hücrel senesensin bilinen molekülleri ile etkileşir. P53 ve p21'in indüksiyonu öncelikle DDR ile ilişkiliyken, p16'nın up-regülasyonu ve ardından pRB'nin hipo-fosforile durumundaki artış, polikomb grubu proteinlerinin, özellikle de polikomb baskılayıcı kompleks (PRC) aracılı histon modifikasyonları yoluyla p16^{INK4a} lokusunu epigenetik olarak susturduğu bilinen BMI1'in epigenetik düzensizliği ile ilişkili olabilir. İlginç bir şekilde, polikomb kompleks protein (BMI1)'in ROS'u inhibe ettiği ve DNA onarım işlevine katıldığı bilinmektedir. Ayrıca mitokondriye lokalize olduğu ve mitokondriyal fonksiyonu düzenlediği gösterilmiştir. Dolayısıyla, senesens sırasında BMI1'in down-regülasyonu, hücrel senesensin ROS aracılı indüksiyonuna daha fazla katkıda bulunabilir [21]. Son çalışmalar, ROS kaynaklı senesensin senesens sinyallerini güçlendiren ve daha da artıran pozitif geri besleme döngüleri içerdiğini göstermektedir. Örneğin, SASP faktörleri otokrin ve parakrin mekanizmalar yoluyla ROS üretimini ve senesensi teşvik eder ve ROS daha fazla mitokondriyal mutasyon ve ROS üretir, bu da hücre içi ROS, DDR ve nihayetinde senesens fenotipini daha da artırabilir [20].

DNA hasarı ile indüklenen senesens (DNA damage-induced senescence)

Kısa telomerler ve onkogen kaynaklı hiper replikasyon, DNA hasar yanıtını ortaya çıkararak hücrel senesensin indüksiyonunu tetikler. Düşük doz radyasyona yanıt olarak, normal insan diploid fibroblast hücreleri senesense benzeyen uzun süreli bir duraklama durumuna girer. DNA ipliği kırıcı ajan bleomisin veya aktinomisin D'ye kısa süre maruz kalındığında, hücreler p53, p21 ve p16^{INK4a} birikimini içeren tipik senesens özellikleri gösterir. DNA'ya zarar veren sisplatin ile tedavinin ardından, CNE1 nazofarenks karsinom hücreleri doza bağlı bir şekilde hücrel senesens benzeri büyüme durmasına uğrar. Apoptoz ve senesens arasındaki hücrel karar hücre tipine, yoğunluğuna ve DNA hasarının süresine bağlı olsa da, kesin mekanizmalar hala belirsizdir [22].

Mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna bağlı senesens (mitochondrial dysfunction-associated senescence, MiDAS)

Senesens hücreler, homeostatik mekanizmalarındaki bir dizi farklı değişiklikle karakterize edilebilir; özellikle mitokondriyal biyogenez şiddetlenir, mitofaji azalır ve mitokondriyal ağlar hiperf ze olur. Metabolik olarak elektron transport zinciri (ETC) bozulur, bu da AMP/ATP oranında değişikliklere ve ROS  retiminde artışa yol açar. ROS mitokondriye zarar verebilir ve hücre döngüsünün durmasını sağlamak için pozitif bir geri besleme döngüsünde hareket eden nükleer DNA hasarını indükleyebilir. Ayrıca, Rapamisin memeli hedefi (mTOR) - peroksizom proliferatör-aktif reseptör gama, koaktivatör 1 beta aracılı bir mekanizma yoluyla mitokondriyal biyogenezi teşvik edebilir. Buna ek olarak, metabolik değişiklikler NAD⁺/NADH oranında dengesizliğe yol açar. Senesent hücrelerdeki mitokondri, mtDNA gibi hasarla ilişkili moleküler modeller (DAMP) de salıyor olabilir (ancak bu henüz araştırılmamıştır). mtDNA, özellikle toll benzeri reseptör-9 (TLR9), NLRP3 inflamazom ve cGAS-STING eksenini gibi bir dizi doğuştan gelen bağışıklık yolu aracılığıyla Senesens ile ilişkili Sekretuar Fenotipi (SASP) teşvik edebilecek bir imm nostim lat r moleküldür [23].

Onkojen aktivasyonuyla indüklenen senesens (oncogene-induced senescence, OIS)

Onkojen kaynaklı senesens ilk olarak insan fibroblastlarında RAS'ın onkogenik bir formu ifade edildiğinde gözlenmiştir. Benzer şekilde, tümör baskılayıcıların kaybı da senesensi tetikleyebilir. Daha da önemlisi, onkojene bağlı senesensin in vivo olarak gerçekleştiği ve tümör oluşumunun erken aşamalarında bir fren işlevi gördüğü iyi bir şekilde gösterilmiştir. Onkojen kaynaklı senesensin genel bir özelliği sikline bağımlı kinaz inhibitörü 2A (CDKN2A) lokusunun derepresyonudur. Buna ek olarak, bu tür senesens, anormal DNA replikasyonunun ve/veya ROS'un neden olduğu DNA hasarı nedeniyle güçlü bir DDR'yi de tetikleyebilir. Bu mekanizmaların (p16, ARF veya DDR ile indüklenen p53) göreceli önemi hücre tiplerine göre değişir. Örneğin, farelerde ADP-ribozilasyon faktörü (ARF)-p53 yolu onkogen kaynaklı senesensin önemli bir aktivatörüdür, insanlarda ise DDR-p53 yolu ARF-p53 yolundan daha önemli bir role sahip gibi görünmektedir [24].

Parakrin senesens (paracrine senescence)

Son araştırmalar, SASP parakrin sinyalinin, malign fenotipleri arttırmak ve tümör başlangıcını teşvik etmek gibi çeşitli pro-tümörijenik etkilere aracılık edebileceğini göstermiştir. Senesent hücrelerin parakrin aktivitelerine bağlı tümör hücrelerinin büyümesi ve çoğalması, tümör anjiyogenezi, invazyon ve metastaz, hücreyel yeniden programlama ve tümör başlatıcı hücrelerin ortaya çıkması ve tümörün yerel bağışıklık ortamıyla etkileşimleri üzerindeki doğrudan etkileri yoluyla tümörigenezde rolleri vardır [24].

Terapiyle indüklenen senesens (therapy-induced senescence, TIS)

Her ne kadar tümör hücreleri tanım gereği ölümsüz olsalar da, ki bu büyük ölçüde telomerazın yeniden ifade edilmesinden kaynaklanmaktadır, telomer kısalması veya işlev bozukluğu ile ilgisi olmayan senesensin kanser kemoterapötik ilaçları ve radyasyon tarafından indüklenebileceği iyi bir şekilde tespit edilmiştir. Tümör hücrelerinde senesensi indüklediği gösterilen ilk kemoterapötikler sisplatin ve doksorubisin gibi genotoksik ajanlardır. Bu ilaçlar tümör hücrelerinde Senesens İlişkili- β -galaktosidaz (SA- β -gal) ekspresyonunun artması, uzun süreli büyüme durması ve poliploidi dahil olmak üzere senesensin ayırt edici özelliklerinin çoğunu oluşturur. Önemli olarak, doksorubisin ile indüklenen senesent hasta tümör örneklerinde de gösterilmiştir, bu da tümör hücrelerinin tedaviye yanıt olarak senesens geçirme yeteneğinin deneysel ortama özel olmadığını göstermektedir [25].

Tedaviye ile indüklenen senesens artık hem konvansiyonel hem de hedefe yönelik çok çeşitli kemoterapötik ajanlara karşı yerleşik bir yanıttır ve kanser tedavisi için bir hedef olarak belirlenmiştir [26]. Senesense neden olan birçok ilaç, tek ve çift iplikçik kırıkları üretmek için DNA hasarı oluşturarak senesens ve genomik stres arasındaki yakın ilişkiyi indükler [27]. Düşük doz doksorubisin ile teşvik edilen TIS, Mutasyona Uğramış-Ataksi Telenjiektazi (ATM) ve Rad3 ile ilişkili Ataksi Telenjiektazi (ATR) yolağının ve p53 sinyalinin aktivasyonu nedeniyle artan Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ile ilişkilidir. Epigenetik mekanizmalar da senesens ve apoptoz arasındaki kararda rol oynayabilir. DNA metiltransferaz DNMT3a'nın aşırı ekspresyonu, p21 ifadesinin inhibisyonu yoluyla aksi takdirde senesensi indükleyen doksorubisin dozlarında kanser hücrelerinin ölümüne yol açabilir [26]. Apoptoz ve senesens arasındaki hücreyel karar, kısmen kanser hücrelerinin

maruz kaldığı stresin büyüklüğüne bağlıdır. Daha düşük hasar seviyeleri, hücreyi apoptoza sürükleyen kaspaz aktivitesi kaskadlarını aktive etmeden senesensle ilişkili antiproliferatif tepkileri tetikleyebilir [27].

2.1.2. Senesent hücrelerin morfolojik ve fonksiyonel özellikleri

Kalıcı olan büyüme durmasına ek olarak, senesent hücreleri tanımlamak için çeşitli özellikler ve moleküler belirteçler kullanılır. Ancak, büyümenin durması gibi, tek bir özellik senesens durumuna özel değildir. Aynı şekilde, tüm senesent hücreler şimdiye kadar tanımlanmış olan tüm senesens belirteçlerini göstermez. Bu nedenle, senesent hücreler genellikle bir dizi özellik ile tanımlanır [28]. Senesent hücrelerin değişen plazma membran içeriği ile birlikte genişlemiş, daha yassılaşmış ve çok çekirdekli hücre morfolojisine sahip olduğu kabul edilmektedir. Spesifik hücre morfolojisine ek olarak, senesent hücrelerin vakuolaritesi de artar. Vakuol oluşumuna endoplazmik retikulum (ER) stresine ilişkili katlanmamış protein yanıtının (UPR) aracılık ettiğine dair kanıtlar vardır [19]. *Senesensle ilişkili β -galaktosidaz (SA-Bgal)* için histokimyasal boyama, senesent hücreler için yaygın olarak kullanılan bir belirteçtir. Bu aktivite asidik lizozomal β -galaktosidazdan kaynaklanır; senesent hücrelerde, aşırı eksprese edildiği için nötre yakın bir pH'da tespit edilebilir. SA-Bgal, senesent hücrelerin dokularda in situ tespit edilmesine izin veren ilk belirteçtir ve senesent hücrelerin in vivo yaşla birlikte gerçekten arttığını göstermiştir. Hem kültürde hem de çeşitli omurgalı dokularında senesent hücreleri tanımlamak için hala yaygın olarak kullanılmaktadır [28].

Kültür ve dokulardaki senesent hücreleri tanımlamak için artık düzenli olarak kullanılan bir diğer belirteç de p16^{INK4a} tümör baskılayıcı proteindir. p16^{INK4a} ekspresyonu çoğu normal hücre ve dokuda düşüktür veya tespit edilemez, ancak birçok uyarı ile senesens indüklenen hücrelerde kolayca tespit edilebilir. p16^{INK4a} ekspresyonu ayrıca çok sayıda omurgalı dokusunda yaşla birlikte düzenli olarak artar. Yukarıda belirtildiği gibi, birçok senesens indükleyicisi genomik hasara neden olarak kalıcı DNA hasar odaklarına ve DDR sinyaline yol açar. Kalıcı odaklar, telomerlerde mevcut olduğunda telomer disfonksiyonuna bağlı odaklar (TIF) veya daha genel olarak DNA-SCARS (senesensi güçlendiren kromatin değişikliklerine sahip DNA segmentleri) olarak adlandırılır. Kalıcı DNA hasar odakları genotoksik stres yaşayan dokularda ve senesent fare ve primat dokularında bulunur [28].

Senesent hücreler, pro-enflamatuar sitokinler ve kemokinler, büyüme modulatorleri, anjiyojenik faktörler ve matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) dahil olmak üzere, senesens ile ilişkili sekretuar fenotipi (SASP) veya senesens mesaj salgısı (*senescence-messaging secretome*, SMS) olarak adlandırılan çok sayıda faktör salgılar. SASP, senesent hücrelerin ayırt edici bir özelliğini oluşturur ve pato-fizyolojik etkilerinin çoğuna aracılık eder. Senesent hücre döngüsünün durması p53 ve p16^{INK4A}/Rb tümör baskılayıcı yolları tarafından düzenlenirken, SASP güçlendirici yeniden modelleme (enhancer remodeling) ve nükleer faktör kappa b (NF-κB), CCAAT/arttırıcı bağlayıcı protein-β (C/EBPβ), GATA bağlayıcı protein 4 (GATA4), rapamisin memeli hedefi (mTOR) ve p38 mitojen-aktif edici protein kinaz (p38MAPK) sinyal yolları gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile kontrol edilir [29].

Bazı senesent hücreler senesens ile ilişkili heterokromatin odakları (SAHF) içerir: belirli proliferatif genleri de içeren (ve muhtemelen susturan) sitolojik olarak tespit edilebilir heterokromatin alanları. Bu odaklar senesent insan hücrelerinin hepsinde olmasa da bazılarında bulunur [28].

2.1.3. Senesens ile ilişkili sekretuar fenotip (SASP)

Senesent hücreler, mikroçevrelerindeki diğer hücrelerle doğrudan bağlantı kurarak veya farklı boyut ve özelliklerde veziküler yapılar salgılayarak iletişim kurabilirler. Senesent hücrelerin yakındaki hücrelerle iletişim kurmasının ilk yolu SASP, diğer bir deyişle senesens-mesajlaşma salgısıdır (SMS) [30, 31]. SASP, senesent hücreler tarafından çeşitli sitokinlerin, kemokinlerin, büyüme faktörlerinin, proteazların ve lipidlerin salgılanmasını tanımlar. Bu özel sekretomun bileşimi değişkendir ve senesens indükleyicisine bağlıdır. SASP, çift yönlü etkilere sahiptir: Bir yandan bağışıklık sisteminin premalign lezyonlara müdahale etmesine olanak sağlar [32-34], diğer yandan hasar görmüş dokuların iyileşmesini teşvik eder [35-37]. Ancak, IL-6, IL-8, membran kofaktör proteinleri (MCP'ler) ve makrofaj inflammatuar proteinleri (MIP'ler) [38] gibi birçok pro-inflamatuar faktörün salınması, hem otokrin hem de parakrin yollarla proliferasyonu [39, 40], anjiyogenezi [41] ve inflamasyonu [38] teşvik etmek gibi zararlı etkilere yol açabilir. SASP, kalıcı bir DNA hasarı sinyali ile ilişkilendirilmiştir [42]. Tümör hücrelerinde, sitotoksik kemoterapi bazen tam bir senesens fenotipi gelişmeden bir SASP yanıtını tetikleyebilir. Bu terapi kaynaklı SASP kemorezistans ile ilişkilendirilmiştir [43, 44].

SASP nedenleri

SASP öncelikle genomik hasar veya epigenomik pertürbasyon nedeniyle veya bunların eşlik ettiği senesent hücrelerin bir özelliğidir. Bu nedenle, sadece p21 veya p16^{INK4a}'nın ektopik aşırı ekspresyonu nedeniyle senesent normal hücreler, senesens büyümesinin durmasına ve senesent hücrelerin diğer bazı özelliklerini sergilemelerine rağmen bir SASP ifade etmezler. Buna karşılık, DNA hasarı, işlevsiz telomerler, epigenomik bozulma, mitojenik sinyaller, oksidatif stres ve diğer senesense neden olan uyaranlar nedeniyle senesent hücreler, değişen nitelik ve dayanıklılıkta bir SASP geliştirir [38].

SASP'ın düzenlenmesi

SASP, DDR proteinleri ATM, NBS1 ve CHK2 tarafından pozitif düzenlenir. Bu proteinler, p53'ün upstream'inde bulunurlar ve SASP'ı hızlı DDR'den sonra değil, kalıcı DDR sinyali oluşturulduktan sonra tetiklerler. Bu süreç, birkaç gün boyunca yavaşça gelişir ve DNA-SCARS ve TIF gibi nükleer yapılar tarafından desteklenir [42, 45, 46].

SASP ayrıca NF- κ B ve C/EBP- β gibi transkripsiyon faktörleri tarafından da pozitif düzenlenir. Bu faktörler, özellikle immün hücrelerde enflamatuvar sitokin gen ifadesini kontrol eden sinyal kaskadlarının downstream'inde yer alır. Özellikle onkogenler tarafından indüklenen senesensde, bu sitokinler senesens büyüme durmasını sürdürmeye yardımcı olur [46-49].

Ancak, p53 SASP'ı negatif bir şekilde düzenler ve kısıtlar. Normal senesent hücrelerde p53'ün inaktivasyonu, SASP faktörlerinin salınımında belirgin bir artışa neden olur. Bu tür hücreler, SASP'ın yanı sıra komşu hücrelerde malignite gibi senesens fenotiplerini tetikleyebilirler[42, 45].

SASP bileşenleri

SASP faktörleri literatürde farklı şekillerde sınıflandırılmıştır. İlk olarak, Coppé ve ark. tarafından SASP faktörleri, i. Çözünür sinyal faktörleri (interlökinler, kemokinler ve büyüme faktörleri), ii. Salgılanan proteazlar (matris metaloproteinazlar, serin proteazlar), iii. Salgılanan çözünmeyen proteinler/ekstrasellüler matris (ECM) bileşenleri, iv. protein olmayan bileşenler olarak sınıflandırılmıştır [50]. Öte yandan Byun ve ark. SASP

faktörlerini 3 farklı kategoriye ayırmıştır; i. Reseptör gerektiren SASP faktörleri (sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörleri), ii. Doğrudan etki eden SASP faktörleri [stromelisin-1 (MMP-3), stromelisin-2 (MMP-10) ve kollajenaz-1 (MMP-1)], iii. düzenleyici faktörler (TIMP'ler, PAI'ler ve IGFBP'ler) [51]. Son olarak Basisty ve ark. SASP bileşenlerini çözünebilir SASP (sSASP) ve eksozom/ekstrasellüler veziküler SASP (eSASP) olarak iki farklı grupta ele almıştır [52].

Çözünebilir SASP faktörleri (sSASP)

Senesent hücreler çok sayıda interlekin, enflamatuar sitokin ve büyüme faktörü salgılar. SASP'de bu faktörler arasında en öne çıkan sitokinler IL-6 ve IL-1a'dır. IL-6 salgılayan senesent hücreler, mikroçevrelerinde IL-6 reseptörleri bulunan komşu epitelyal veya endotelyal hücreleri etkileyebilir [50]. IL-1a'nın da SASP'nin transkripsiyonel düzenleyicilerinden biri olan nükleer faktör-kappa B'nin (NF-kB) aktivasyonuna yol açtığı ve böylece IL-6 ve IL-8 gibi önemli SASP faktörlerinin pozitif düzenleyicisi olarak işlev gördüğü bulunmuştur [53].

Salgılanan çözünebilir SASP faktörlerinin önemli bir alt grubu da kemokinlerdir. CXCL1, CXCL2, CXCL8 ve CCL2, CCL8, CCL13, CCL16 gibi kemokinler, SASP'deki ana kemokinlerdir [50]. Bunlar, kemokin spesifik G proteinine bağlı reseptörler içeren çevredeki hücreleri etkileyebilir. Bunların yanı sıra, senesent hücreler tarafından salgılanan ve çözünebilir SASP faktörleri arasında yer alan büyüme faktörleri, komşu hücrelerde de parakrin etki gösterir. En dikkat çeken büyüme faktörü insülin benzeri büyüme faktörleridir (IGF'ler) [45, 54, 55].

Senesent hücrelerin salgıladığı önemli proteazlar arasında matriks metalloproteazlar (MMP-1, MMP-3, MMP-10) ve serin proteazlar (uPA, tPA) bulunmaktadır. Bu proteazlar genellikle hücre dışı ortamı yeniden şekillendirir ve enflamatuar süreçleri düzenlerler [56].

TIMP, PAI-1 ve IGFBP gibi faktörler, SASP bileşimindeki faktörlerin aktivitelerini düzenlerler. TIMP'ler çoğu MMP ile kompleks oluşturur ve onların proteolitik aktivitelerini inhibe eder. PAI-1, tPA ve uPA'ya karşı inhibitör özellik gösterir [57, 58].

DAMP'ler, SASP bileşenleri arasında yer alır ve steril enflamasyonun araçlarıdır. Bu moleküllerin, önemli SASP bileşenlerinin salgılanmasında rol oynadığı gösterilmiştir [59].

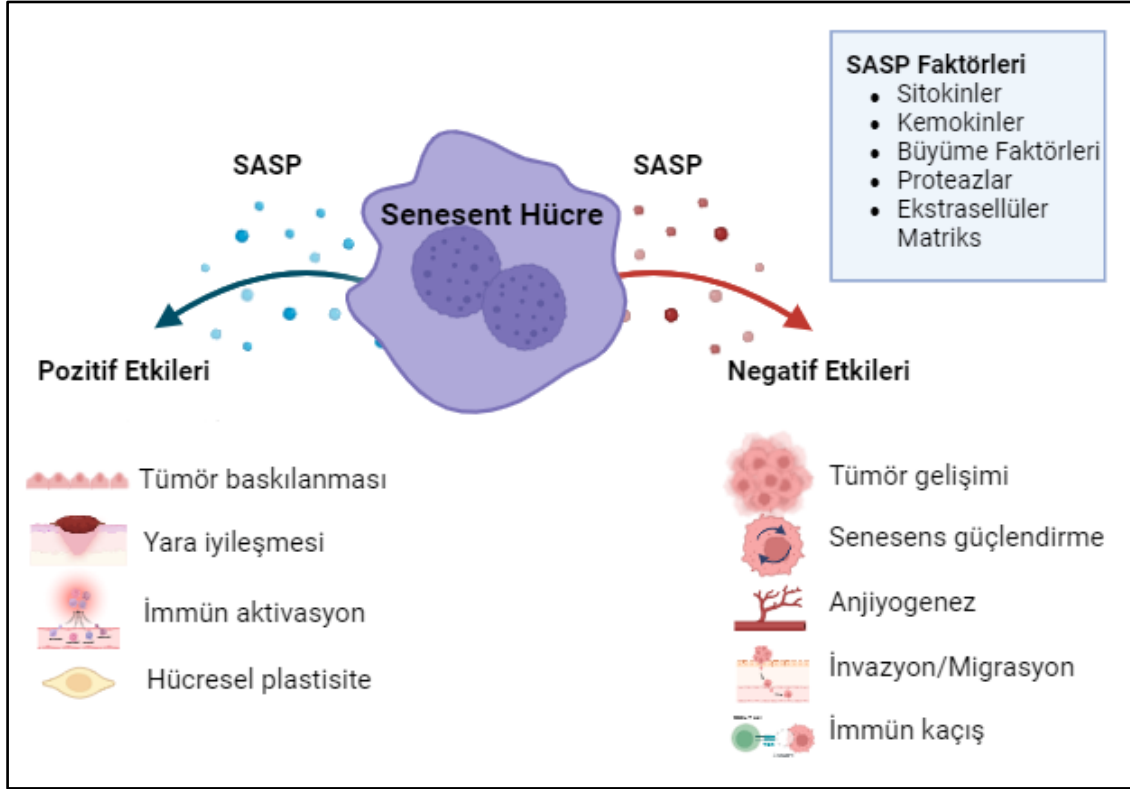
Eksozomal SASP faktörleri (eSASP)

Senesent hücreler, çözünür SASP faktörlerine ek olarak miRNA ve protein taşıyan biyoaktif eksozomlar da salgılar [60-62]. Yapılan bir çalışmada, senesent hücrelerin senesent olmayanlara göre hücre başına yaklaşık %36 daha fazla eksozom salgıladığı ancak boyutlarının %2 daha küçük olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, senesent ve senesent olmayan hücrelerden salgılanan eksozomların içeriklerinde önemli farklılıklar bulunmuştur [52]. Eksozomlardaki proteinler arasında hücre zarı proteinlerinin yanı sıra G-protein sinyalizasyonu ve prostaglandin sentezi ve regülasyonundan sorumlu proteinler de bulunmaktadır [52]. Bu durum, eSASP'ın işlevsel önemini güçlendirmektedir. Eksozomal SASP'nin işlevsel önemini araştıran çalışmalar, senesent hücreler tarafından salgılanan eksozomların kanser hücrelerinin çoğalmasını arttırdığını, antitümör bağışıklığını indüklediğini ve senesensesi tetiklediğini göstermektedir [60, 61].

SASP'ın etkileri

Terapi ile indüklenen senesent hücreler tedaviden sonra da varlığını sürdürebilir ve kemoterapinin olumsuz etkilerine ve SASP yoluyla kanserin nüksetmesine katkıda bulunabilir [80-84]. Salgılanan faktörlerin etkisi hedef hücreye ve doku mikro çevresine bağlı olduğundan, tümör ortamında senesent hücrelerin hücre otonom olmayan işlevi oldukça karmaşık olmaya devam etmektedir. Bazı SASP faktörlerinin (örneğin; IL-6, IL-8, TNF- α) birikimi, senesensle ilişkili hücre döngüsü durmasının otokrin olarak güçlenmesine ve parakrin olarak yayılmasına sebep olur. Böylece tümör büyümesi ve anjiyogeneze gibi tümörigenez için kilit adımları sınırlar. Bununla birlikte, aynı bileşenler enflamatuar yanıtların dengesini etkileyerek tümör ilerlemesini destekleyebilir. Dahası, diğer SASP faktörleri (örneğin; VEGF, EGF, FGF) paradoksal olarak çevre dokuda proliferasyonu ve anjiyogenezi teşvik edebilir (Şekil 2.2.). Dolayısıyla, TIS oluşturma gerçeği sonucu, salgılanan bileşenlerin miktarı ve bunların down-stream'i gibi birden fazla faktörün yanı sıra, bağışıklık sisteminin biriken senesent hücreleri ortadan kaldırmada başarısız olması durumunda daha da kötüleşebilecek olan SASP bileşenlerindeki zamana bağlı farklılıklar tarafından belirlenebilir [6]. Kalıcı hücresel senesensin ve SASP'ın zararlı etkileri yaygın

olarak belgelenmesine rağmen, bu sistemler embriyogenez, yara iyileşmesi ve fibrozis gibi normal fizyolojik süreçlerde önemli rol oynamaktadır [63] (Şekil 2.3.).



Şekil 2.2. SASP faktörlerinin pozitif ve negatif etkileri. SASP: Senesens ile ilişkili sekretuar fenotip.

IL-6 / IL-8

Hücreden bağımsız bir şekilde, İnterlökin 6'nın (IL-6) insan fibroblastlarında IL-6R/CD126'ya bağlanarak transforme olmamış hücrelerin hücre döngüsü durmasını güçlendirdiği düşünülmektedir [53]. Sitokinin reseptörüne ve adaptör protein GP130'a bağlanması, Janus kinaz/sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (JAK/STAT) sinyalizasyonuna ve IL-6 ve IL-8 dahil olmak üzere çok sayıda proinflamatuvar faktörün protein translasyonunun artmasına neden olarak pozitif bir geri besleme döngüsüne yol açar [49, 64]. IL-6 reseptörünün ekspresyonunun, bu sitokinin hücre otonom ve hücre otonom olmayan etkilerine aracılık etmede çok önemli olduğu düşünülmektedir, çünkü IL-6R'nin ekspresyonu çoğunlukla immün hücre alt kümeleriyle (monositler, megakaryositler, lökositler ve belirli T hücreleri alt popülasyonları) sınırlıdır, endotel hücreleri ve fibroblastlar ise IL-6R'yi eksprese etmez. Bununla birlikte, IL-6R senesent yanıtında; onkogen aktivasyonunda, stres kaynaklı ve sitokin kaynaklı prematür senesensde de up-

regüle edilir [10, 65, 66]. Buna karşılık, IL6-R'nin adaptör proteini olan Glikoprotein 130 (GP130) hücre tipleri arasında yaygın olarak ifade edilir. Bu nedenle, hücreden bağımsız bir şekilde IL-6 parakrin senesensi güçlendirebilir. Bununla birlikte, IL-6R çeşitli inflamatuvar koşullarda çözünür bir formda bulunduğundan, IL-6-STAT3 sinyali senesens fenotipinin yayılmasına yardımcı olarak stromal hücrelerde prematür senesense neden olabilir [67]. Onkojenik bağlamlarda, IL-6 bu nedenle seyirci (bystander) kanser hücrelerinin çoğalmasını durdurarak olumlu bir etkiye sahip olabilir [6].

IL-6'ya benzer şekilde IL-8'in (CXCL8 olarak da bilinir) de IL-8R/CXCR2/CD181'e bağlanarak hücre otonom bir şekilde transforme olmamış hücrelerin hücre döngüsü durmasını güçlendirdiği düşünülmektedir [53]. Bununla birlikte, hem IL-6 hem de daha belirgin olarak IL-8, hücre otonom olmayan bir şekilde kemokin olarak da rol oynar, böylece immün hücre infiltrasyonunu kolaylaştırır ve inflamatuvar bir yanıtı teşvik eder. Bu sonuç, immün hücre aracılı tümör temizliğini kolaylaştırarak preneoplastik lezyonlarda faydalı olabilir, ancak sürekli inflamasyon çözülmezse olumsuz sonuçlar doğurabilir. Destekleyici kanıtlar arasında, senesent deri modelinde tümör ilerlemesine yol açan immünosupresif bir mikro çevre oluşturduğu gösterilen senesent stromal hücre kaynaklı IL-6 yer almaktadır [68]. Ayrıca, senesent stromal hücrelerden p38/MAPK kaynaklı IL-6 ve IL-8 salınımı, komşu hücrelerde doğal öldürücü (*natural killer*, NK) hücre inhibitör ligandı insan lökosit antijeni E'nin (HLA-E) up-regülasyonunu indükleyebilir ve bu da senesent insan deri dokusunda da gözlemlenen bir fenomen olan immün kaçınma ile sonuçlanabilir [69].

TNF- α / IFN- γ

TNF- α , güçlü bir pro-inflamatuvar sitokindir. Adından da anlaşılacağı üzere, ilk olarak çeşitli tümöral dokularda gözlenen güçlü anti-kanser etkileri nedeniyle tanımlanmıştır [70]. Daha sonra yapılan çalışmalar TNF- α 'nın akut inflamatuvar yanıtlarda rol oynadığını ve IL-1 α , lipopolisakkaritler ve diğer bakteriyel ürünlere yanıt olarak büyük miktarlarda salındığını göstermiştir. Hücreden bağımsız bir şekilde, TNF- α sinyali STAT'a bağlı bir pozitif geri besleme döngüsü başlatarak sürekli interferon sinyaline, DNA hasarına ve sitokin salgılanmasına yol açar [71]. Bu nedenle, TNF- α , IL-1 α 'ya benzer şekilde ve IL-6, IL-8 ve IFN- γ gibi diğer sitokinlerden önce SASP'nin erken bir bileşeni olabilir. Hücre otonom olmayan bir şekilde, TNF- α 'nın en azından insan endotel hücrelerinde ROS'a bağımlı bir

şekilde parakrin senesensin bir indükleyicisi olduğu düşünülebilir [71-73], çünkü ROS temizleyicilerinin kullanımı senesens indüksiyonunu etkili bir şekilde inhibe etmiştir. Bu nedenle, TNF- α tümörisidal aktivitesine ek olarak, tümör bağlamında endotel hücrelerinin çoğalmasını durdurarak anjiyogenezi de önleyebilir.

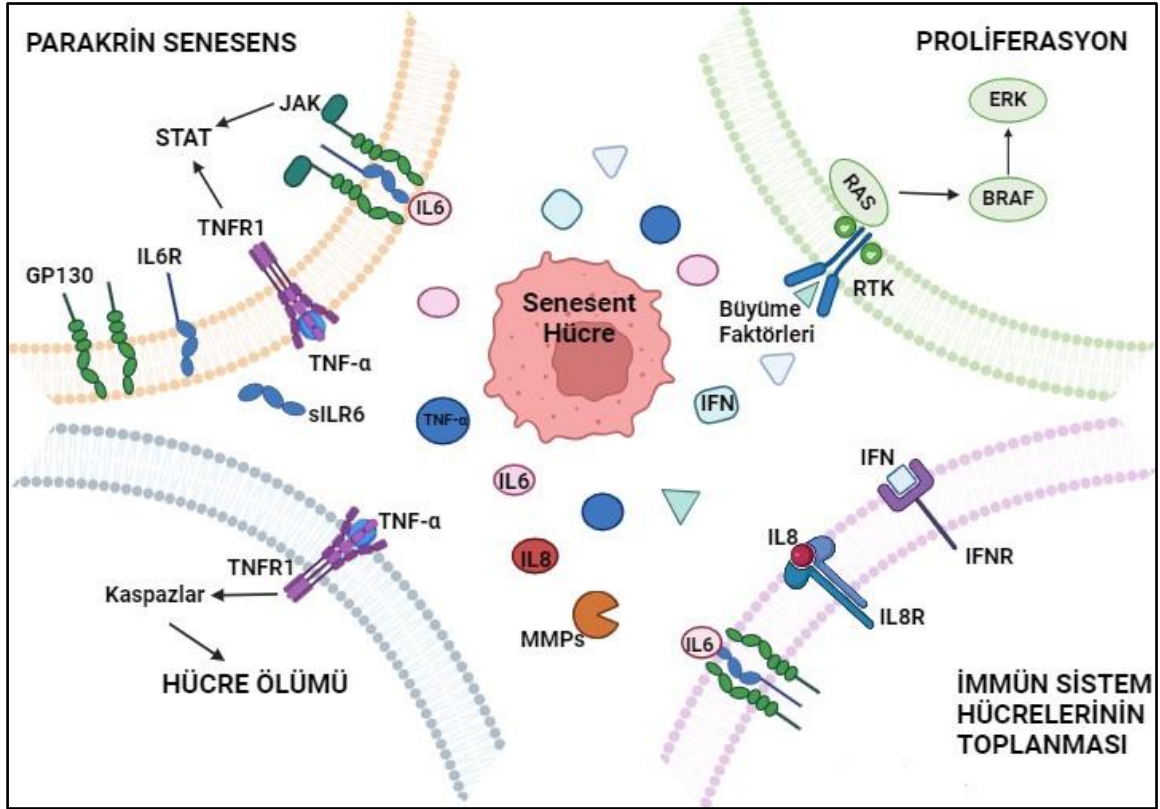
Benzer şekilde, IFN- γ 'nın da insan endotel hücrelerinde p53'e bağlı DNA hasarı sinyali yoluyla hücrel senesensi indüklediği gösterilmiştir [74], IFN- β gibi diğer tip I interferonlar ise DNA hasarına yanıt olarak salınır, senesensi teşvik eder ve hematopoetik kök hücre işlevini inhibe eder [75]. Ayrıca, TNF- α ve IFN- γ 'nın immün hücre alt kümeleriyle etkileşim yoluyla hücre-otonom olmayan rolleri yaygın olarak tanımlanmaktadır. Son zamanlarda, TNF- α ile indüklenen yaşlanma ve IFN- γ 'nın rolünün, Bağışıklık Kontrol Noktası Blokajından kurtulan pankreas ve B lenfoma kanser hücrelerinin immün temizlenmesi için gerekli olduğu gösterilmiştir [76]. Bununla birlikte, TNF- α 'nın bir anti-kanser molekülü olarak geçici kullanımına rağmen, klinikte kullanımı şimdiye kadar güçlü hepatotoksitesi nedeniyle engellenmiştir [77], IFN- γ ise bazı ülkelerde yetişkin T hücreli lösemi tedavisi için onaylanmıştır [77] ve aşılar ve kanser immünoterapilerinde bir adjuvan olarak incelenmeye devam etmektedir [6].

Büyüme faktörleri

Epidermal büyüme faktörü reseptör ailesi (EGF, TGF- α , amphiregulin), fibroblast büyüme faktörü ailesi (FGF) veya vasküler endotelial büyüme faktörü ailesi (VEGF) gibi çeşitli ailelerin büyüme faktörlerinin ifadesi, TIS hücrelerinin salgı fenotipinde yaygın olarak belgelenmiştir [3]. Hücre otonom bir şekilde, bu büyüme faktörleri PI3K/Akt/mTOR yolu aracılığıyla terapi ile indüklenen senesent hücrelere geri sinyal gönderebilir [78, 79] ve böylece hayatta kalmalarını artırabilir. Ayrıca, hücre otonom olmayan bir şekilde, RAS/BRAF/ERK sinyalizasyonu yoluyla proliferatif etkiler gösterebilir ve ilgili reseptörleri ifade eden seyirci hücrelerin çoğalmasını körükleyebilirler. Bu etkilerin her ikisi de onkojenik bağlamlarda zararlı olarak kabul edilir ve bu nedenle genellikle kemoterapi veya ışınlama ile birlikte kullanılan çok sayıda hedefe yönelik anti-kanser ilacının hedefidir (örneğin, EGFR inhibitörleri: erlotinib, gefitinib, lapatinib ve VEGF inhibitörleri: sorafenib, sunitinib, bevacizumab) [6].

Matriks metalloproteinazlar (MMP)

Matriks metalloproteinazlar, enzimatik aktivitesi kolajenler, lamininler ve proteoglikanlar gibi hücre dışı matriks (ECM) bileşenlerine yönelik olan çinko bağımlı proteaz ailesidir. Normal bağlamlarda, MMP'ler ECM'nin bozulması yoluyla mikro çevrenin yeniden şekillenmesine yardımcı olarak doku yeniden şekillenmesini ve yara iyileşme olaylarını kolaylaştırır. Bununla birlikte, onkojenik bağlamlarda, MMP'ler hücre istilasının önündeki fiziksel engelleri kaldırarak ve hücre-hücre yapışmasını azaltarak metastazı kolaylaştırabilir [80]. DNA'ya zarar veren bleomisine maruz kalındığında, senesent stromal fibroblastlar bitişik kılcal damarların geçirgenliğini artırarak yeni ortaya çıkan kanser hücrelerini MMP'ye bağlı bir şekilde artan mitojen, sitokin ve diğer plazma ürünlerine maruz bırakır [81]. Ayrıca, MMP'ler inaktif öncüller olarak salınan proteinleri aktive edebilir. Oral kanserlerde, MMP-2'nin yaşlanan fibroblastlardan salınması, MMP-2 de dahil olmak üzere MMP'lerin yukarı regülasyonu yoluyla doku onarımını ve fibrozisi destekleyen bir sitokin olan Transforming growth factor beta'nın (TGF- β) bölünmesi ve aktivasyonu yoluyla pro-invazif işlevlere aracılık eder ve böylece pozitif bir geri besleme döngüsü ile sonuçlanır [80]. Ek olarak, MMP'ler membran reseptörlerini de parçalayabilir ve IL-6R gibi çözünür reseptörlerin salınmasına yol açarak stromal hücrelerde parakrin senesensi teşvik edebilir [67]. Son olarak, hasarlı hücrelerin yüzeyinde bulunan immün düzenleyici ligandların parçalanması yoluyla immün yanıtların oluşturulmasında da zararlı etkileri olabilir. Hücre-otonom bir şekilde immün hücre tanınmasını önlemenin yanı sıra, çözünmüş ligandlar ilgili immün hücre tiplerindeki reseptörleri işgal edebilir ve aşabilir [6].



Şekil 2.3. Tedaviyle indüklenen senesent hücrelerde SASP'ın hücre dışı otonom sinyali

Şekil 2.3'te, SASP bileşenleri, seyirci (bystander) hücrelerin reseptörüne bağlanarak parakrin etkiler gösterebilir. Her bir faktörün etkisi hedef hücreye de bağlı olacaktır. Bu şekilde, salgılanan büyüme faktörleri komşu hücrelerin çoğalmasını indükleyebilir. SASP faktörleri ayrıca sitokin ve kemokin salınımı (IL-6, IL-8, IFN- γ), parakrin senesens (IL6, TNF- α) veya hücre ölümü (TNF- α) yoluyla immün sistem hücrelerinin toplanmasını teşvik edebilir. JAK/STAT, Janus kinaz/sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü proteini; IL, İnterlökin; IL6R, İnterlökin 6 Reseptörü; IL8R, İnterlökin 8 Reseptörü; sILR6, Çözünür İnterlökin 6 Reseptörü; RTK, Reseptör tirozin kinaz; TNF- α , Tümör Nekroz Faktörü α ; TNFR1, Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü 1; GP130, Glikoprotein 130; IFN, İnterferon; IFNR, İnterferon Reseptörü; MMPs, Matriks metalloproteazlar; BRAF, V-Raf murin sarkoma viral onkojen homolog B1; ERK, Ekstrasellüler sinyal ile düzenlenen kinaz (Şekil 2.3).

2.1.4. İnterlökin (IL)-6 ailesi sitokinleri

IL-6 tipi aile sitokinleri IL-6, IL-11, kardiyotrofin-1 (CTF-1), siliyer nörotrofik faktör (CNTF), kardiyotrofin benzeri sitokin (CLC), granülosit koloni stimüle edici faktör (G-

CSF), lösemi inhibitör faktör (LIF) ve onkostatın M (OSM)'dir [82]. Bu sitokin ailesinin tanımlayıcı bir özelliği, ortak sitokin reseptör alt birimlerinin kullanılmasıdır. Tüm üyeler dört sarmallı bir demet yapısı içerir ve ilgili reseptörlerinin varlığında membran glikoprotein 130 (gp130; IL-6R β olarak da bilinir) ile birleşir. IL-6 ve IL-11 sinyalleri gp130 homodimeri tarafından iletilirken, diğer aile üyeleri sinyallerini gp130 ve alternatif bir β alt birimi aracılığıyla iletir. IL-27, IL-35 ve IL-39, yakın zamanda aileye eklenmiştir [83, 84].

Tüm sitokin aileleri arasında, sağlık ve hastalıkla ilgili yanıtları ortaya çıkarmada tartışmasız en yüksek derecede işlevsel pleiotropi gösterir [85]. Bu ailenin üyeleri kronik enflamasyon, otoimmünite, bulaşıcı hastalıklar ve kanserde önemli roller oynar ve genellikle hastalık aktivitesinin ve tedaviye yanıtın tanısallık veya prognostik göstergeleri olarak hareket ederler. Dahası, IL-6 ailesi sitokinleri artık klinik müdahale için önemli terapötik hedefler olarak görülmektedir [82].

IL-6 ailesi sitokinleri ile ilişkili işlevsel çeşitlilik ve fazlalık, kısmen her yerde ifade edilen ortak gp130 sinyal ileten reseptörün varlığı ile açıklanmaktadır. Ortak gp130 reseptör alt biriminin kullanımı, IL-6 ailesi sitokinleri tarafından kontrol edilen çok çeşitli örtüşen faaliyetlerin düzenlenmesine katkıda bulunur [82].

Düzensiz IL-6 ailesi sitokin ekspresyonu ve down-stream reseptör sinyalizasyonu kanserde sık görülen olaylardır ve genellikle kötü klinik sonuçlarla ilişkilidir. Bu bağlamda, IL-6 sitokin ailesi üyelerinin pro-tümörjenik etkileri, hem kanser hücreleri faaliyetleri (örneğin, hücre çoğalması, hayatta kalma, göç, istila ve metastaz) üzerindeki doğrudan içsel etkiler hem de yerel tümör mikroçevresini şekillendiren inflamasyon, immünosupresyon ve anjiyogenezin modülasyonu gibi stromal hücre kompartmanı üzerindeki dolaylı etkiler yoluyla ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, bu sitokinler ve kanser arasındaki bağlantı, bazı aile üyelerinin (örneğin IL-6) tümör büyümesinin başlaması ve ilerlemesinin ayırt edici bir özelliği olarak kabul edilen enerji metabolizmasının önemli düzenleyicileri olduğuna dair son kanıtlara kadar uzanmaktadır [82].

Kardiyotrofin-1 (CTF-1)

Kardiyotrofin-1 (CTF-1), başlangıçta hem in vitro hem de in vivo olarak kalp miyositlerinin hipertrofisini indükleyebilen bir faktör olarak keşfedilen IL-6 sitokin ailesinin bir

üyesidir. Daha sonra, CTF-1'in, hem kalp hem de nöronal hücrelerin hayatta kalmasını uyarma yeteneği de dahil olmak üzere, kalp ve kalp dışı hücreler üzerinde çok çeşitli farklı etkilere sahip olduğu gösterilmiştir [7].

1995 yılında Pennica ve ark., farklılaşmış embriyoid cisimlerden elde edilen sekretomun, neonatal kardiyak miyositlerde hipertrofik bir tepkiyi tetiklediğini gözlemledi. Bu tepki, miyosit büyümesi, miyozin hafif zincirinin sarkomerik birimlere organizasyonu ve atriyal natriüretik peptid (ANP) salgısı ile değerlendirildi. Bu biyolojik özelliklere dayanarak, fare embriyoid cisimlerinden elde edilen bir cDNA kütüphanesinde yeni bir protein olan Kardiyotrofin-1 (CTF-1) tanımlandı. CTF-1, 21.5 kDa ağırlığında ve 203 amino asitten oluşan bir proteindir. Amino asit dizisi, lösemi inhibitör faktör (LIF) ile %24 ve siliary nörotrofik faktör (CNTF) ile %19 benzerlik gösterse de, yapısal olarak CTF-1'in interlökin (IL)-6 ailesinin yeni bir üyesi olduğu belirlendi [86]. IL-6 ailesinin diğer üyeleri gibi CTF-1 de dört helikal demet sitokin ailesine aittir, ancak CTF-1, CNTF gibi, hidrofobik bir N-terminal salgı sinyal dizisine sahip değildir. Yine de, kültürlenmiş miyotüplerle yapılan deneyler, bu hücreler tarafından üretilen CTF-1'in önemli bir kısmının kültür ortamında bulunduğunu gösterdi [87], bu da faktörün çevredeki duyarlı hücrelere ulaşmak için alışılmadık bir mekanizma ile salındığını düşündürmektedir [88].

CTF-1 reseptörleri ve sinyal iletimi, gp130 ve LIFR (lösemi inhibitör faktör reseptörü) kombinasyonu üzerinden gerçekleşir. CTF-1, LIFR ile düşük afiniteli bağlanır ve gp130 ile yüksek afiniteli bir kompleks oluşturur. Bu kompleks, JAK-STAT, Ras-Raf MAPK (MEK/ERK) ve PI3K/AKT olmak üzere üç ana yolla sinyal iletimini sağlar. CTF-1, IL-6 ailesi sitokinlerle benzer biyolojik aktiviteler gösterse de, bazı farklı biyolojik etkiler de sergiler. Sinyal iletimi sırasında, gp130'un sitoplazmik domainindeki tirozin kalıntıları fosforlanır ve bu fosforlanmış bölgeler, STAT proteinlerini ve diğer SH2 domain içeren proteinleri (örneğin; PI3K, Shc, SHP2) bağlar. Bu etkileşimler, gen ekspresyonunu düzenleyen STAT proteinlerinin çekirdeğe geçişini ve diğer hücre içi sinyal yollarının aktivasyonunu sağlar [88].

Kardiyotrofin-1'in (CTF-1) biyolojik etkileri

Gp130 reseptörü, CTF-1'in kardiyovasküler etkilerinde önemli bir rol oynar. Gp130, kardiyomiyosit hayatta kalmasını destekler, kompansatuar hipertrofiyi indükler ve kalp

fonksiyonunu korur [89]. CTF-1'in kardiyak miyositler üzerindeki koruyucu etkileri, anti-apoptotik MAPK ve ERK1/2 yolları üzerinden gerçekleşir. CTF-1, kalp yetmezliği ve hipertansiyon gibi durumlarda artar ve kardiyak hipertrofi ile ilişkilidir. CTF-1'in in vivo etkileri karmaşık olup, kardiyak hücrelerin hayatta kalmasını teşvik eder, ancak kontraktıl disfonksiyon üzerindeki katkıları belirsizdir. Gp130/LIFR sinyal yolunun kaybı, kalp yetmezliği ve miyosit apoptozu ile ilişkilidir [88, 90].

CTF-1, sinir dokusu gelişiminde ve olgun sinir sisteminin çeşitli yaralanmalara ve işlev bozukluklarına karşı korunmasında önemli bir rol oynar [88]. CTF-1, sempatik nöronların transmitter fenotipini düzenler ve dopaminerjik nöronların hayatta kalmasını teşvik eder. Fetal beyin ve koroid pleksus hücrelerinde CTF-1 ifadesi tespit edilmiştir [86]. CTF-1, astrogenezde ve motor nöronların embriyonik gelişiminde hayati bir faktördür [91]. Ayrıca, CTF-1 çeşitli nörodejeneratif hastalık modellerinde motor nöron hücre ölümünü önler ve nöromusküler fonksiyonları iyileştirir. Alzheimer hastalığı gibi bilişsel bozukluklarda da potansiyel terapötik bir rol oynayabilir [92].

CTF-1, karaciğer hücrelerinde akut faz tepkisinin tetikleyici güçlü bir faktördür ve karaciğeri çeşitli hasarlara karşı korur. CTF-1 eksikliği farelerin karaciğer hasarına daha duyarlı olduğunu gösterir [93, 94]. CTF-1 tedavisi, karaciğer rejenerasyonunu teşvik eder ve karaciğer transplantasyonunda hasarı azaltır [95]. Ayrıca, CTF-1 alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığını iyileştirebilir ve yağ depolamasını azaltabilir [96, 97]. CTF-1, vücut ağırlığı ve metabolizmanın düzenlenmesinde önemli bir rol oynar, obeziteyi azaltabilir ve enerji harcamasını artırabilir. CTF-1 ayrıca glikoz metabolizmasını düzenler ve insülin duyarlılığını artırabilir [96]. Obezite ve metabolik sendromda artan CTF-1 seviyeleri, metabolik bozukluklarla mücadelede telafi edici bir mekanizma olarak görülebilir [98].

CTF-1'in vücut ağırlığı üzerindeki etkisi iki önemli gözlemle belirginleşmiştir: (1) CTF-1 eksikliği olan farelerde yetişkin başlangıçlı obezite gelişimi; [96] (2) kronik rCTF-1 uygulamasının diyetle ve genetik olarak obez farelerde vücut ağırlığını ve yağ birikimini azaltması [96, 97]. CTF-1'in enerji harcaması üzerindeki etkisi, CTF-1 uygulamasının bütün vücut oksijen tüketimini artırması ile gözlemlenmiştir [96]. CTF-1'in yağ dokusunu yeniden yapılandırarak [96], yağ kütlesini azaltması ve beyaz yağ dokusunun kahverengileşmesini teşvik etmesi de obezite karşıtı etkilerine katkıda bulunabilir [99]. Ayrıca, CTF-1'in glikoz metabolizması üzerinde de önemli etkileri vardır; obez farelerde kronik CTF-1 uygulaması,

hiperglisemi ve hiperinsülinemi azaltmış, insülin toleransını iyileştirmiştir [96]. Bu bulgular, CTF-1'in obezite ve ilgili metabolik bozuklukların gelişimini dengelemek için yağ oksidasyonunu teşvik eden ve metabolik rahatsızlıkları önlemeye çalışan bir fenomen olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir [88].

IL-6 ailesinden sitokinlerin neden olduğu hücre sinyal yollarının, TNF-a ve IL-1b gibi pro-enflamatuvar sitokinler tarafından aktive edilen yollarla kesiştiği ve CTF-1'in enflamasyon modülasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir [100]. CTF-1'in, endotoksemi [101], karaciğer nakli [94], obez fareler [95] ve renal iskemik/reperfüzyon hasarı gibi çeşitli doku hasarı modellerinde pro-enflamatuvar sitokinlerin ifadesini azalttığı bulunmuştur [102]. Ayrıca, CTF-1 böbrek toksisitesini ve miyokard depresyonunu önlemiştir [103]. Ancak, bazı çalışmalar CTF-1'in TNF-a seviyelerini artırdığını ve enflamatuvar sürece katkıda bulunduğunu göstermektedir [104]. CTF-1'in etkileri doza ve süreye bağlı olarak değişebilir. NFkB aktivasyonu ile CTF-1, kardiyomiyositler ve böbreklerde koruyucu aktivite gösterirken, NFkB'nin hem pro-enflamatuvar hem de anti-enflamatuvar etkileri olabilir. NFkB'nin etkileri, zamanlaması ve biyolojik bağlama göre değişir [102, 105].

Son yıllarda yapılan bir çalışmada CTF1 fibroblastlarda güçlü bir otofaji aktivatörü olarak tanımlanmıştır. Akkoc ve ark., ilk kez meme kanserinden türetilen CTF1'in, fibroblast otofajisinin güçlü bir düzenleyicisi olduğunu açıklamıştır. CTF1'in otofajiyle ilişkili kanser hücresi migrasyon ve invazyonunda önemli bir aracı olduğuna dair bulgular sunmuşlardır. Ayrıca, kanserli hastalardan alınan meme tümörü örneklerinde CTF1 ekspresyonunun, stromal otofaji ve lenf nodu metastazı ile önemli ölçüde korele olduğunu öne sürmüşlerdir. Araştırmacılar fibroblast hücrelerinin MCF7 (meme adenokarsinom hücre hattı), T47D (meme karsinom hücre hattı), MDA-MB-231 (meme adenokarsinom hücre hattı), Huh7 (karaciğer karsinom hücre hattı) ve PC3 (prostat adenokarsinom hücre hattı) kanser hücrelerinden elde edilen sekretomlar ile kültüre edilmesi sonucunda fibroblast hücrelerinde otofajinin indüklendiğini göstermişlerdir. Bu sonuçları daha fazla doğrulamak için fibroblastları östrojen reseptörü pozitif MCF7 ve T47D meme kanseri hücreleri ile birlikte kültürlenmişlerdir. Bu ortak kültür koşulları altında da fibroblastlarda otofajinin indüklendiği bulunmuşlardır [8].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Bu tez çalışmasında, kullanılan gereçler ve kimyasalların seçiminde deneylerin doğruluğunu ve tekrarlanabilirliğini sağlamak amacıyla kaliteli ve güvenilir malzemeler tercih edilmiştir.

3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

- DMEM (Gibco)
- DMEM-Fenol kırmızı olmayan (Gibco)
- Tripsin-EDTA (Gibco)
- Penisilin-Streptomisin (Gibco)
- DMSO (Merck)
- PBS (Gibco)
- Doksorubusin (Tocris)
- Fetal Sığır Serum (Gibco)
- Senescence β -galactosidase staining kit (Cell Signaling 9960S)
- İnsan kardiyotrofin-1 (CTF-1) Elisa Kiti (Nephente (NE06S156701))
- İnsan IL-6 Elisa Kiti (İnvitrogen KHC0061)

3.1.2. Kullanılan aletler

- Plaka okuyucu (Molecular Devices)
- Faz Kontrast - Floresan Mikroskop (Leica)
- Mikroskop Kamerası (Leica DFC 420 C)
- Laminar Akımlı Kabin
- CO2 Etüvü (Sanyo)
- Hassas terazi (Shimadzu)
- Mikropipet (Eppendorf Research)
- Vortex (Firlabo)
- Santrifüj (Nüve)
- Su banyosu (Nüve)

3.2. Yöntemler

Bu bölümde, çalışmamızda kullanılan deneysel yöntemler detaylı bir şekilde açıklanacaktır. Bu yöntemlerin seçimi, araştırma sorularımızı yanıtlamak ve hipotezlerimizi test etmek amacıyla yapılmıştır.

3.2.1. Hücre kültürü ve senesens indüksiyonu

Deneyler MCF-7 (insan meme kanseri hücre dizisi), A549 (küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre dizisi) ve HeLa (insan serviks kanseri hücre dizisi) hücre dizileri kullanılarak yapıldı. Hücreler %10 serum, %1 Penisilin-Streptomisin içeren DMEM'li besiyerinde ve %5 CO₂ içeren 37 °C inkübatörde inkübe edildi. Hücreler bulundukları hücre kültürü kabını %70-80 kapladıklarında hücreler sayılarak kültür kaplarına ekildi. Bu yöntemde önce laminar flow (hava akım kabini) altında hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı. Hücreler 5 mL PBS (fosfat tamponu salin) ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra % 0.25'lik Trypsin-EDTA çözeltisi eklendi ve 4-5 dk 37 °C inkübatörde inkübe edildi. Hücreler zeminden ayrıldıktan sonra üzerine 5 mL besiyeri eklenerek tripsin inhibe edildi. İçerik falkona alındı ve 5 dk, 400g (1500 rpm), 25°C'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı üzerine tekrardan besiyeri eklendi. Hücreler resüspande edildi. İçerisinden 10 µL alınarak Neubauer lamı ile lameli arasına yavaşça bırakıldı. Mikroskopta lam üzerindeki 4x4 karelerin 3'ünün içerisindeki hücreler sayılarak ortalaması alındı ve aşağıdaki formüle göre hacim hesabı yapılarak hücreler kültür kaplarına ekildi.

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

3.2.2. SA-β-Gal boyaması

MCF-7, A549 ve HeLa hücre dizilerine doksorubisin uyguladıktan sonra hücrelerin senesent hale gelip gelmedikleri incelenmek için yapıldı. Deney SA-β-Gal boyaması Senescence β-galactosidase staining kit'in kullanım talimatlarına göre gerçekleştirildi. Hücreler bulundukları hücre kültürü kabını % 70-80 kapladıklarında hücreler sayılarak kültür kaplarına ekildi ve 24 saat beklendi. Üzerindeki besiyeri değiştirilerek 300 nM doksorubisin verildi. MCF-7 hücre dizisi için 3 gün, HeLa hücre dizisi için 2 gün, A549 hücre dizisi için 4 gün beklendi. 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. Üç boyutlu holografik mikroskopi

Holomonitor M4, hücreleri gözlemlemek için holografik mikroskopi teknolojisini kullanır. Bu teknolojiye, hücrelerden yansıyan ve saçılan ışık dalgaları, referans bir ışık dalgası ile karıştırılarak bir hologram oluşturulur. Cihaz, lazer ışığını hücrelere yönlendirir ve hücrelerden yansıyan ışık dalgalarını toplar. Bu yansıyan ışık dalgaları, referans ışık dalgası ile birleştirilerek bir girişim deseni (hologram) oluşturur. Oluşturulan hologram, cihazın kamerası tarafından yakalanır ve dijital olarak kaydedilir. Bu dijital hologram, hücrelerin üç boyutlu yapısını ve özelliklerini içeren bir veri seti sağlar. Kayıt edilen dijital hologram, bilgisayar yazılımı tarafından analiz edilir ve hücrelerin üç boyutlu görüntüsü yeniden oluşturulur. Bu görüntüleme, hücrelerin şekli, büyüklüğü ve hareketi gibi özelliklerin detaylı bir şekilde incelenmesine olanak tanır. Holomonitor M4, hücreleri gözlemlemek için herhangi bir kimyasal veya floresan etiketleme gerektirmez. Bu sayede, hücrelerin doğal halleriyle gözlemlenmesi ve uzun süreli izlenmesi mümkündür. Cihaz, hücrelerin büyüme, morfoloji değişiklikleri, bölünme ve hareket gibi dinamik özelliklerini kantitatif olarak ölçebilir ve analiz edebilir. Bu veriler, hücrelerin davranışlarını anlamak için kullanılır.

Cihaz inkübatörün içerisine yerleştirildi ve tablası üzerine hücre kültür plakaları konularak, MCF-7, A549 ve HeLa hücrelerinin holografik hücre görüntüleri alındı. Daha sonra ortalama hücre alanları, ortalama hücre hacimleri, ortalama ve maksimum hücre kalınlıkları olmak üzere dört morfolojik parametre cihazın yazılımı kullanılarak değerlendirildi.

3.2.4. Sekretom toplanması

Kültür kaplarına belirli sayıda hücreler ekildikten sonra 24 saat beklendi. Üzerindeki besiyeri değiştirilerek 300 nM doksorubusin verildi. MCF-7 hücre dizisi için 3 gün, HeLa hücre dizisi için 2 gün, A549 hücre dizisi için 4 gün beklendi ve hücreler senesent hale geldi.

Bir gün önceden belirli sayıda kontrol hücreleri de hücre kültürü kabına ekildi. Daha sonra hücrelerin üzerindeki serumlu besiyeri uzaklaştırıldı. 2 kez 1 mL PBS ile iyice yıkanarak serum uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine serumsuz, %1 penisilin-streptomisin içeren, fenol kırmızısı içermeyen DMEM'li besiyeri eklenerek 2 gün inkübasyon gerçekleştirildi. 2 günün sonunda faz kontrast mikroskobu ile hücre morfolojilerinin görüntüleri kaydedildi. Hücrelerin üzerindeki serumsuz besiyeri (sekretom) deney tüplerine alındı. Tüpler sırasıyla 10 dk 1150g ve 10 dk 10000g +4°C'de santrifüj edildi. Süpernatant alındı. Sekretomlar, hem CTF-1 ölçümü hem de IL-6 ölçümü için -20 °C'de saklandı. Eş zamanlı olarak hücreler % 0.25'lik Tripsin-EDTA ile bulundukları zeminden kaldırıldı. Eşit miktarda serumlu besiyeri ile yıkanarak deney tüplerine alındı. Hücreler sayıldı.

3.2.5. Senesent hücre sekretomunda IL-6 ölçümü

IL-6, doksorubisin ile indüklenen senesent kanser hücrelerinde sekretuvar aktivitenin değişimini ölçmek için kullanılan bir mediyatördür. Hücre sekretomunda IL-6 ölçümü, insan IL-6 Elisa Kiti'nin kullanım talimatlarına göre gerçekleştirildi. MCF-7, A549 ve HeLa hücre dizilerinin toplanan sekretomları hücre sayılarına göre normalize edildi. Deney için gereken strip sayısı belirlendi. Stripler kullanmak için çerçevelere yerleştirildi. Çukurlara 100 µL standart ve örneklerden eklendi. Blank dışındaki tüm çukurların üzerine 50 µL IL-6 Biyotin Konjugatı eklendi. Plate'in kapağı kapatıldı ve 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyonun ardından çukurlar 4 kez 1X yıkama tamponu ile yıkandı. Blank hariç tüm çukurlara 100 µL 1X Streptavidin-HRP Solüsyonu eklendi. Kapağı kapatılarak 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından çukurlar 4 defa 1X yıkama tamponu ile yıkandı. Her bir çukura 100 µL Stabilize Kromojen eklendi. Substrat solüsyonun rengi maviye dönmeye başladı. Karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Sonra her bir çukura 100 µL durdurma solüsyonu eklendi. Renk maivden sarıya döndü. Durdurma solüsyonu ekledikten sonra 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropilaka okuyucu kullanarak her kuyucuğun optik dansitesi (OD değeri) belirlendi.

3.2.6. Protein miktar tayini

Kaldırılan hücreler 10 dk 1150g +4°C'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pellet üzerine 150 µL homojenizasyon tamponu ilave edilerek resüspande edildi. 10 saniye ultrasonik homojenizatörde homojenize edildi. Ardından 10000 x g 10 dk 4 °C'de santrifüj edildi.

Süpernatantlar alındı. Daha sonra protein miktar tayinine geçildi. Protein miktar tayini bisikoninik asit yöntemi (BSA) kullanılarak yapıldı. 96 çukurlu plakanın ilk 2 çukuruna distile su diğer 2 çukuruna homojenizasyon tamponu blank olarak eklendi. Plakanın diğer çukurlarına üçerli olacak şekilde her bir konsantrasyondan 4'er μL uygulandı. Sonra her bir çukura 150 μL bisikoninik asit çözeltisi ilave edildi. Plaka, 37 °C'de 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası spektrofotometrede 562 nm'de standartların ve homojenatların absorbansları okundu.

3.2.7. Senesent hücre sekretomunda CTF-1 ölçümü

Hücre sekretomunda CTF-1 ölçümü hem protein miktarına göre hem de hücre sayısına göre normalize edilerek yapıldı. Protein miktarı hesaplandıktan sonra, MCF-7, A549 ve HeLa hücre dizilerinin toplanan sekretomları protein miktarlarına göre normalize edildi. CTF-1 ölçümü için NEPENTHE İnsan CTF1 (Kardiyotrofin 1) ELISA Kiti (NE06S156701) kullanıldı. Kullanmadan önce tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Analiz, oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Test için gereken strip sayısı belirlendi. Stripler kullanmak için çerçevelere yerleştirildi. Standart kuyucuklara 100 μL standart eklendi. Blank kuyucuğa 100 μL standart dilue edici tampon eklendi. Örnek kuyucuklarına 100 μL örnek eklendi. Plate adhesiv film ile kaplandı. 37°C'de 80 dakika inkübe edildi. Plate 3 kez yıkama tamponu ile yıkandı. Her kuyucuğa 100 μL 1X biyotinlenmiş konjugat eklendi. İyice karıştırıldı ve sağlanan adhesiv filmlerle kaplandı. 37°C'de 50 dakika inkübe edildi. Plaka 3 kez yıkama tamponu ile yıkandı. Her kuyucuğa 100 μL 1X Streptavidin-HRP eklendi. Sağlanan adhesiv filmlerle kaplandı. 37°C'de 50 dakika inkübe edildi. Plaka 5 kez yıkama tamponu ile yıkandı. Her kuyucuğa 90 μL TMB substrat solüsyonu eklendi. 37°C'de 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresince plaka karanlıkta tutuldu. Her kuyucuğa 50 μL durdurma solüsyonu eklendikten hemen sonra mavi renk sarıya döndü. Durdurma solüsyonu ekledikten sonra 10 dakika içinde 450 nm'ye ayarlanmış bir mikroparka okuyucu kullanarak her kuyucuğun optik dansitesi (OD değeri) belirlendi.

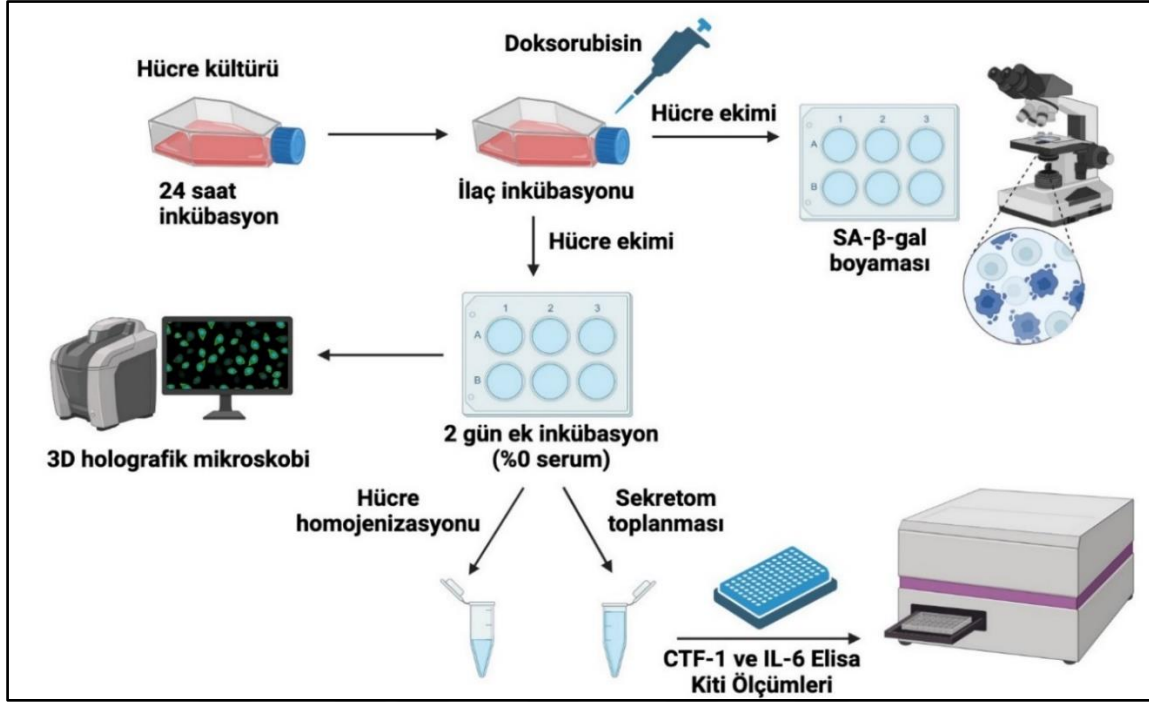
Aynı şekilde, MCF-7, A549 ve HeLa hücre dizilerinin toplanan sekretomları hücre sayılarına göre normalize edildi. Daha sonra CTF-1 ölçümü hücre sayısına göre de gerçekleştirildi.

3.2.8. Senesent hücrelerde CTF1 ekspresyonunun ölçümü

Hücreler homojenize edilip protein miktarı hesaplandıktan sonra, MCF-7, A549 ve HeLa hücre homojenatları protein miktarlarına göre normalize edildi. CTF-1 ölçümü için NEPENTHE İnsan CTF1 (Kardiyotrofin 1) ELISA Kiti kullanıldı. Kullanmadan önce tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Analiz, oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Test için gereken strip sayısı belirlendi. Stripler kullanmak için çerçevelere yerleştirildi. Standart kuyucuklara 100 µL standart eklendi. Blank kuyucuğa 100 µL standart dilue edici tampon eklendi. Örnek kuyucuklarına 100 µl örnek eklendi. Plate adhesiv film ile kaplandı. 37°C'de 80 dakika inkübe edildi. Plate 3 kez yıkama tamponu ile yıkandı. Her kuyucuğa 100 µl 1X biyotinlenmiş konjugat eklendi. İyice karıştırıldı ve sağlanan adhesiv filmlerle kaplandı. 37°C'de 50 dakika inkübe edildi. Plaka 3 kez yıkama tamponu ile yıkandı. Her kuyucuğa 100 µl 1X Streptavidin-HRP eklendi. Sağlanan adhesiv filmlerle kaplandı. 37°C'de 50 dakika inkübe edildi. Plaka 5 kez yıkama tamponu ile yıkandı. Her kuyucuğa 90 µL TMB substrat solüsyonu eklendi. 37°C'de 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresince plaka karanlıkta tutuldu. Her kuyucuğa 50 µl durdurma solüsyonu eklendikten hemen sonra mavi renk sarıya döndü. Durdurma solüsyonu ekledikten sonra 10 dakika içinde 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropilaka okuyucu kullanarak her kuyucuğun optik dansitesi (OD değeri) belirlendi.

3.2.9. İstatistiksel analiz

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



Şekil 3.1. Bu tez çalışmasında kullanılan yöntemlerin şematik gösterimi.



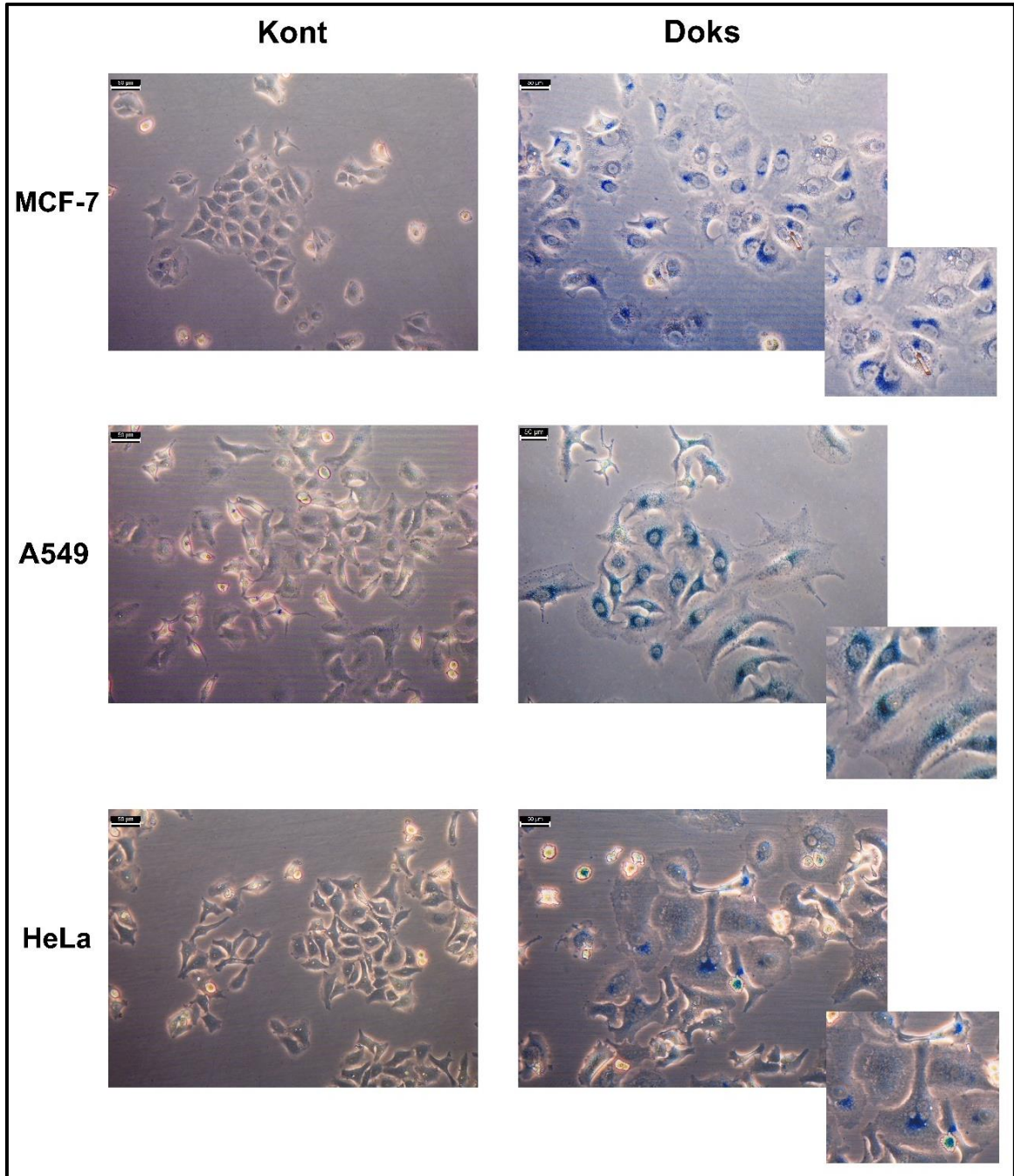
4. BULGULAR

4.1. MCF-7, A549 ve HeLa Hücrelerinde Doksorubisinin Senesens Oluşumuna Etkisinin Değerlendirilmesi

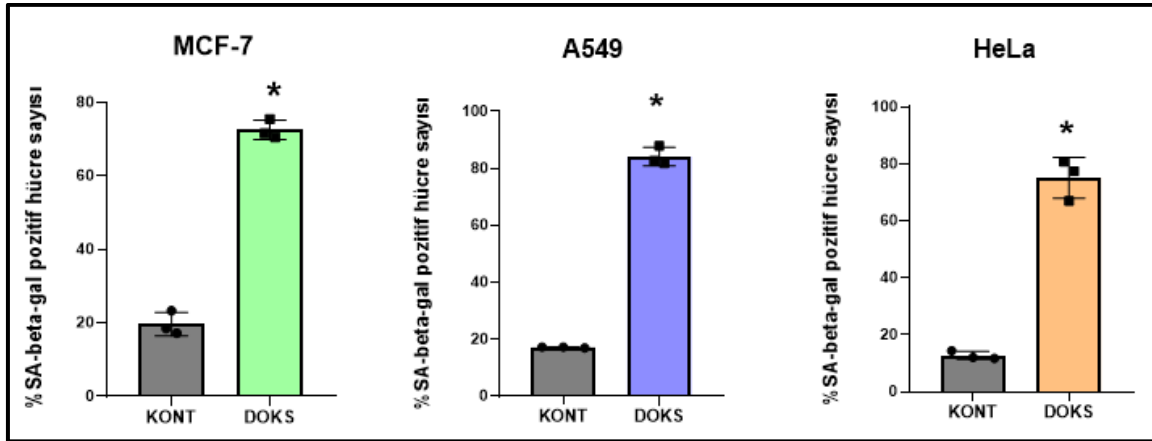
Bu bölümde, MCF-7, A549 ve HeLa hücrelerinde doksorubisin tedavisinin senesens oluşumuna etkisi, SA- β -gal boyaması ve holografik mikroskopi yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

4.1.1. SA- β -galaktozidaz boyaması

Senesent hücrelerin artmış lizozomal β -galaktosidaz aktivitesinden dolayı pH 6'da SA- β -Gal Boyamasının senesent hücrelerde mavi renk oluşturduğu bilinmektedir. Hücelere 300 nM doksorubisin uygulamasından sonra MCF-7 hücreleri için 3 gün, A549 hücreleri için 4 gün ve HeLa hücreleri için 2 gün beklenmiştir. Daha sonra hücreler Senescence β -galactosidase staining kit'in kullanım talimatlarına göre β -galaktozidaz boyama çözeltisi ile boyanmıştır. 16 saatin sonunda hücreler faz kontrast mikroskobu ile incelenmiştir. Mavi renk ile boyanmış hücreler, SA- β -gal pozitif hücrelerdir. Bulgularımız, kontrol grubuna göre doksorubisin uyguladığımız MCF-7, A549 ve HeLa hücrelerinde SA- β -Gal pozitif hücre sayısının anlamlı olarak arttığını göstermiştir (Resim 4.1., Şekil 4.1.). Elde edilen veriler doksorubisin uygulamasının her üç kanser hücre dizisinde senesens indüksiyonuna neden olduğunu göstermiştir.



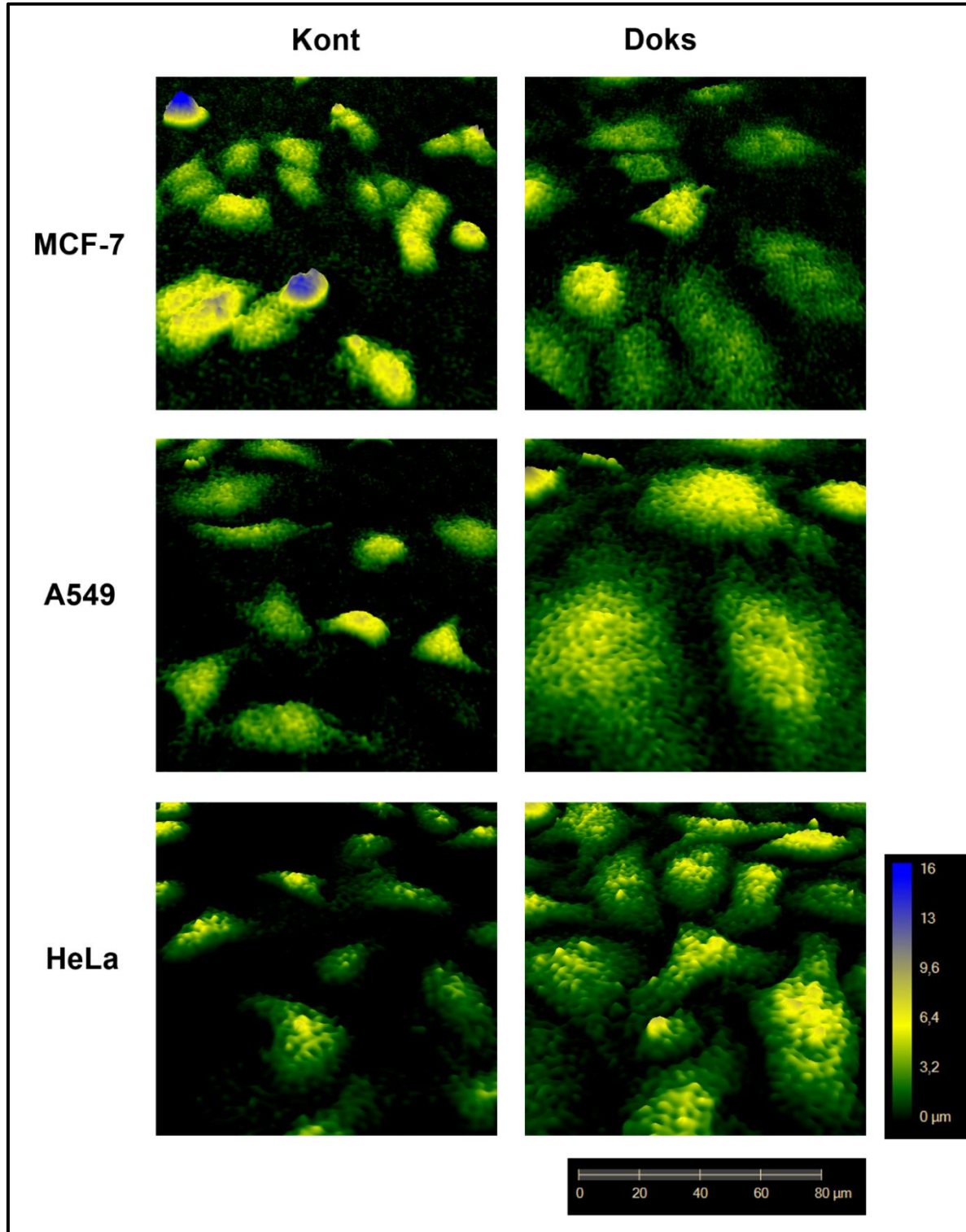
Resim 4.1. MCF-7, A549 ve HeLa hücrelerine sırasıyla 3 gün, 4 gün ve 2 gün doksorubisin uygulaması sonrası yapılan SA-β-Gal boyamasının ardından hücrelerin ışık mikroskobu ile elde edilen görüntüleri. Kont: kontrol, Doks: 300 nM doksorubisin, Skala bar: 50 μm



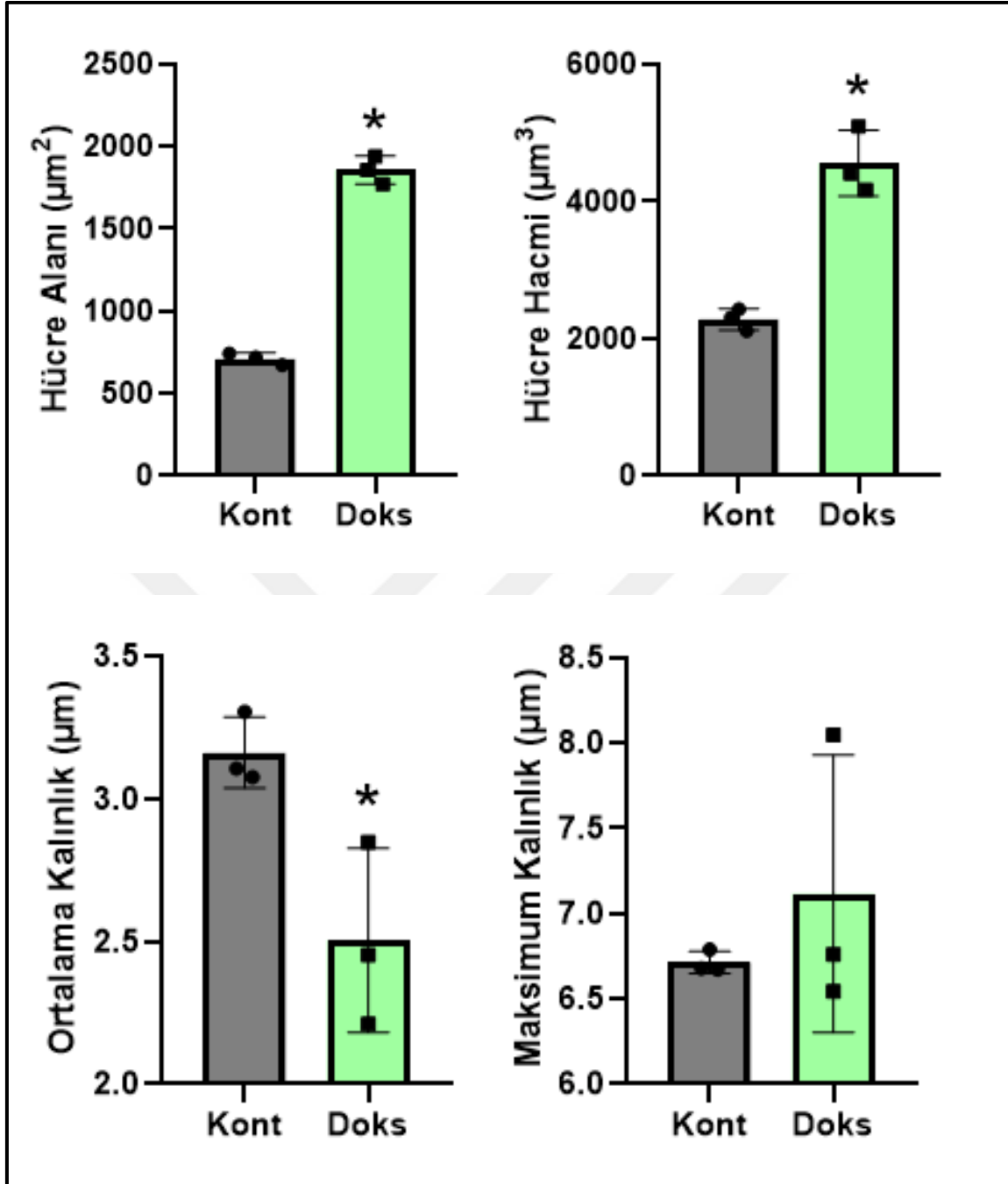
Şekil 4.1. MCF-7, A549 ve HeLa hücrelerine sırasıyla 3 gün, 4 gün ve 2 gün doksorubisin uygulaması sonrası yapılan SA- β -Gal boyamasının ardından elde edilen ışık mikroskopu görüntülerinden sayılan SA- β -gal pozitif hücre yüzdesinin istatistiksel analizi. *: kontrol grubundan anlamlı farklılığı göstermektedir (one-way ANOVA, Tukey, $p < 0,05$, $n=3$). Kont: kontrol, Doks: 300 nM doksorubisin.

4.1.2. Senesent hücre morfolojisinin holografik mikroskop ile değerlendirilmesi

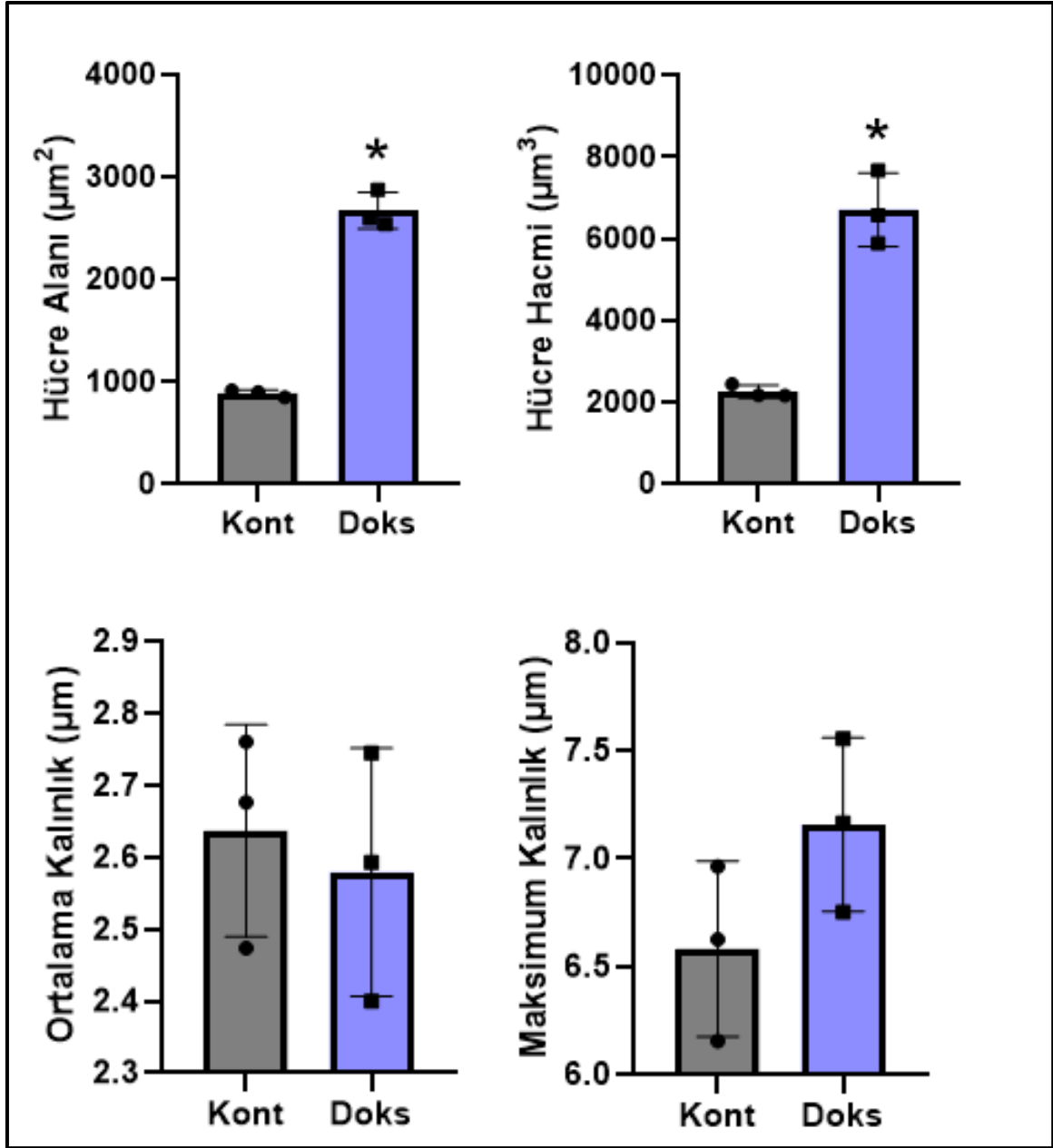
MCF-7, A549 ve HeLa hücrelerinde, senesent hücre morfolojisi holografik mikroskop ile değerlendirildi. Sırasıyla 3 gün, 4 gün ve 2 gün doksorubisin uygulanması sonrasında tüm grupların holografik görüntüleri çekildi. Holografik mikroskop (HOLOMONITOR M4) kullanılarak elde edilen üç boyutlu görüntülerden; hücre hacmi, hücre alanı, maksimum kalınlık, ortalama kalınlık olmak üzere 4 parametre incelenmiştir. Elde edilen görüntülerden cihazın programı kullanılarak morfolojik parametreler hesaplandı (her bir hücre grubu için $n=3$ olacak şekilde ilaçlı gruplardan ve kontrol gruplarından birer görüntü alınarak hesap yapılmıştır). Hesaplamalar sonucunda doksorubisin ile indüklenen senesent MCF-7, A549 ve HeLa hücrelerinin alan ve hacimlerinde artış gözlenirken, ortalama ve maksimum kalınlıkta MCF-7 hücrelerinde bir azalış gözlenmiştir. Fakat A549 ve HeLa hücrelerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (Resim 4.2., Şekil 4.2., Şekil 4.3., Şekil 4.4.).



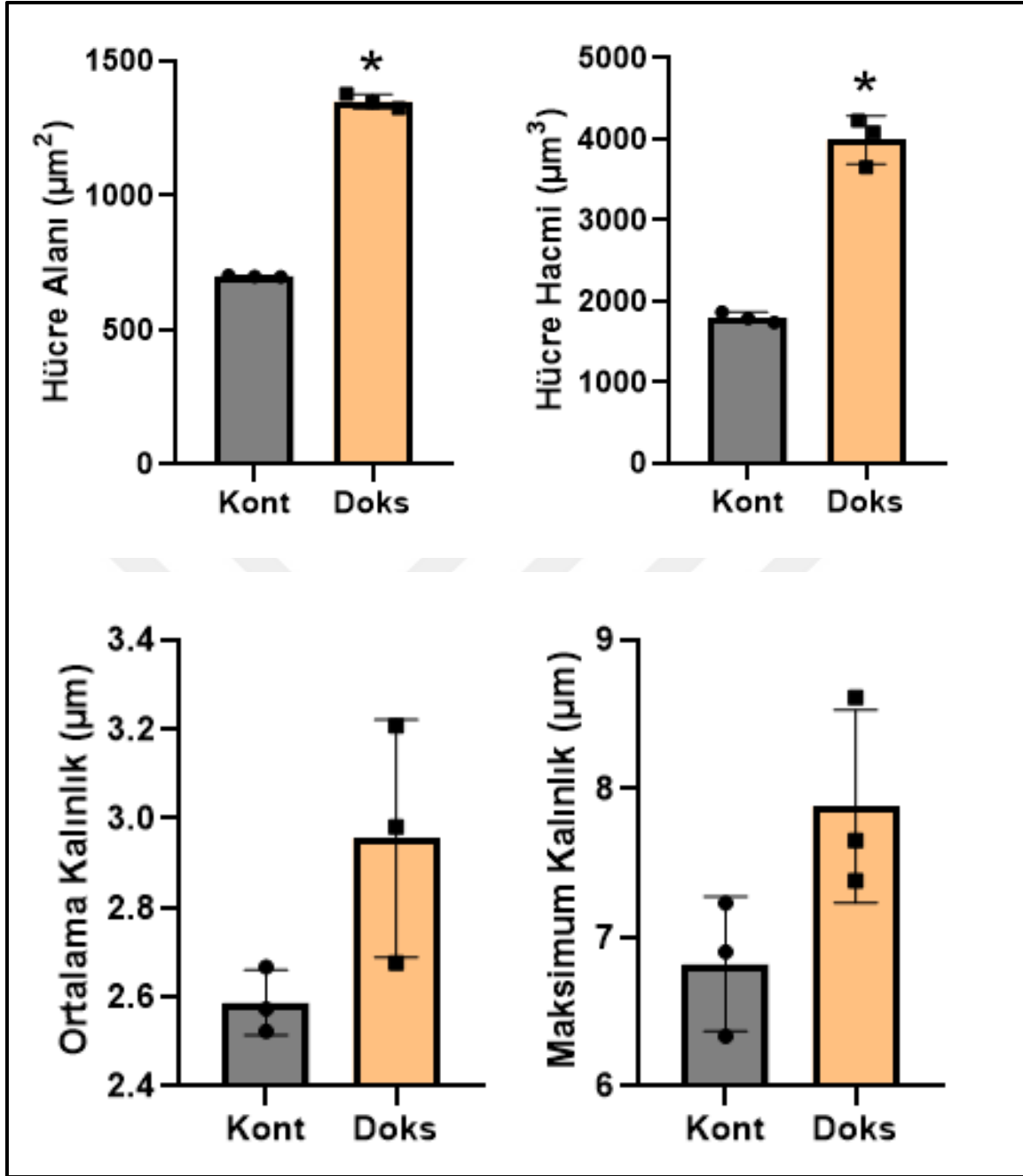
Resim 4.2. MCF-7, A549 ve HeLa hücrelerine sırasıyla 3 gün, 4 gün ve 2 gün doksorubisin uygulaması sonrası holografik mikroskop ile elde edilen morfolojik görüntüleri. Kont: kontrol, Doks: 300 nM doksorubisin.



Şekil 4.2. MCF-7 hücrelerine 3 gün dokсорubisin uygulaması sonrası çekilen holografik görüntüleri üzerinden elde edilen hücre alanı, hücre hacmi, maksimum kalınlık, ortalama kalınlık parametrelerinin ölçümleri. *: Kontrol grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir (one-way ANOVA, Tukey, $p < 0,05$, $n=3$). Kont: kontrol, Doks: 300 nM dokсорubisin.



Şekil 4.3. A549 hüresine 4 gün doksorubisin uygulaması sonrası çekilen holografik görüntüleri üzerinden elde edilen hücre alanı, hücre hacmi, maksimum kalınlık, ortalama kalınlık parametrelerinin ölçümleri. *: Kontrol grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir (one-way ANOVA, Tukey, $p < 0,05$, $n=3$). Kont: kontrol, Doks: 300 nM doksorubisin.

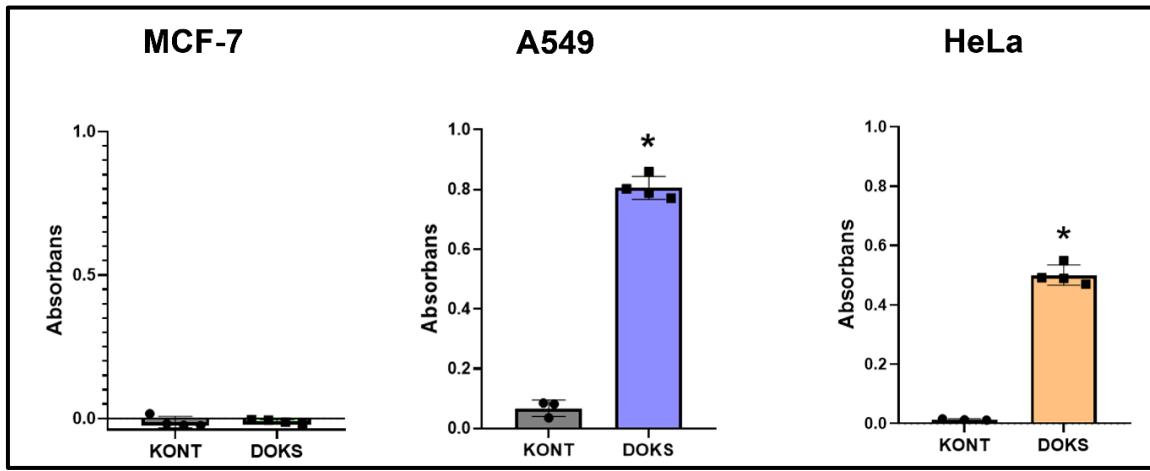


Şekil 4.4. HeLa hücrelerine 2 gün doksorubisin uygulaması sonrası çekilen holografik görüntüleri üzerinden elde edilen hücre alanı, hücre hacmi, maksimum kalınlık, ortalama kalınlık parametrelerinin ölçümleri. *: Kontrol grubuna göre anlamlı farklılığı göstermektedir (one-way ANOVA, Tukey, $p < 0,05$, $n=3$). Kont: kontrol, Doks: 300 nM doksorubisin.

4.2. Senesent MCF-7, A549 ve HeLa Hücre Sekretomlarında IL-6 Sekresyonunun Değerlendirilmesi

Senesent MCF-7, A549 ve HeLa hücreleri için 2 gün serumsuz besiyerinde beklendikten sonra sekretomlar toplanmıştır. Daha sonra hücre sekretomlarında İnvitrogen İnsan IL-6

Elisa Kiti'nin kullanım talimatlarına göre IL-6 ölçümü gerçekleştirilmiştir. Bulgularımız, kontrol grubuna göre doksorubisin uyguladığımız A549 ve HeLa hücre sekretomlarındaki IL-6 sekresyonunda anlamlı bir artış olduğunu göstermektedir. Fakat MCF-7 hücre sekretomlarında hem kontrol hem de doksorubisin uyguladığımız gruplarda IL-6 sekresyonu görülmemektedir (Şekil 4.6.). İnterlökin-6 (IL-6) ölçümü, birçok hücre hattında senesens biyobelirteci olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Fakat bu veriler bize IL-6'nın MCF-7 hücrelerinde bir senesens biyobelirteci olarak kullanılamayacağını ve SASP içeriğinin hücreye spesifik olduğunu göstermektedir.

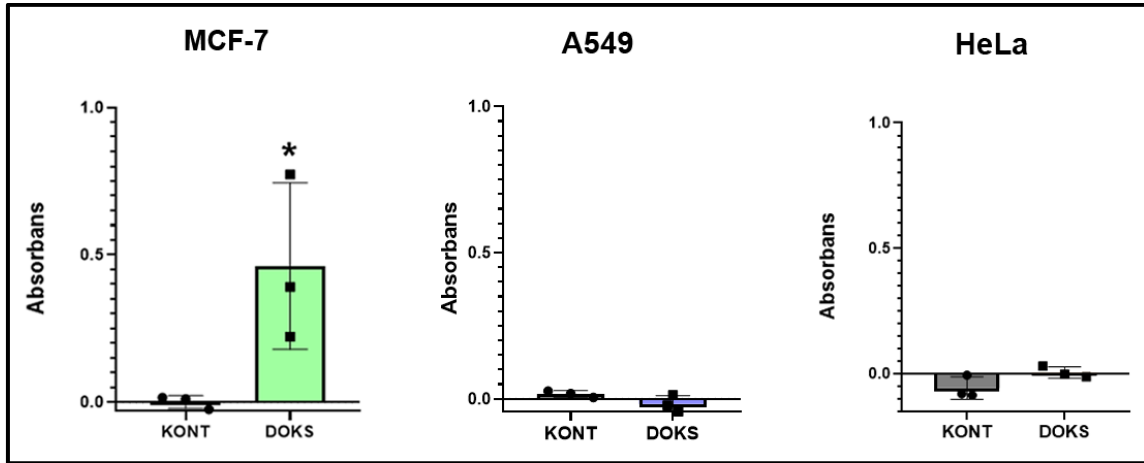


Şekil 4.5. Senesent MCF-7, A549 ve HeLa hücrelerinde IL-6 sekresyonunun belirlenmesi.

*: kontrol grubundan anlamlı farklılığı göstermektedir (one-way ANOVA, Tukey, $p < 0,05$, MCF-7 hücresi kontrol grubu $n=4$ ve doksorubisinli grup $n=4$, A549 kontrol grubu $n=3$ ve doksorubisinli grup $n=4$, HeLa hücresi kontrol grubu $n=3$ ve doksorubisinli grup $n=4$). Kont: kontrol, Doks: 300 nM doksorubisin.

4.3. Senesent MCF-7, A549 ve HeLa Hücre Sekretomlarında CTF-1 Sekresyonunun Değerlendirilmesi

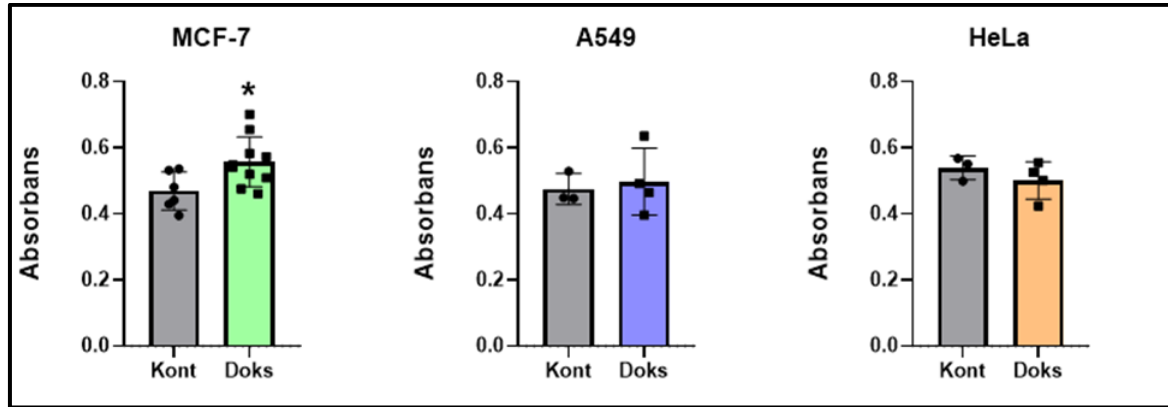
Senesent MCF-7, A549 ve HeLa hücreleri için 2 gün serumsuz besiyerinde beklendikten sonra sekretomlar toplanmıştır. Daha sonra hücre sekretomlarında NEPENTHE İnsan CTF1 (Kardiyotrofin 1) ELISA Kiti (NE06S156701)'nin kullanım talimatlarına göre CTF-1 ölçümü gerçekleştirilmiştir. Bulgularımız, kontrol grubuna göre doksorubisin uyguladığımız MCF-7 hücre sekretomlarındaki CTF-1 sekresyonunda anlamlı bir artış olduğunu göstermektedir. Fakat A549 ve HeLa hücre sekretomlarında hem kontrol hem de doksorubisin uyguladığımız gruplarda CTF-1 sekresyonu görülmemektedir (Şekil 4.5.). Bu veriler bize CTF-1'in hücre spesifik bir senesens biyobelirteci olabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.6. Senesent MCF-7, A549 ve HeLa hücrelerinde CTF-1 sekresyonunun belirlenmesi. *: kontrol grubundan anlamlı farklılığı göstermektedir (one-way ANOVA, Tukey, $p < 0,05$, $n=3$). Kont: kontrol, Doks: 300 nM doksorubisin.

4.4. Senesent MCF-7, A549 ve HeLa Hücrelerinde CTF-1 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

Senesent MCF-7, A549 ve HeLa hücreleri homojenize edilip protein miktarlarına göre normalize edilmiştir. Daha sonra hücre homojenatlarında NEPENTHE İnsan CTF1 (Kardiyotrofin 1) ELISA Kiti (NE06S156701)'nin kullanım talimatlarına göre CTF-1 ölçümü gerçekleştirilmiştir. Bulgularımız, kontrol grubuna göre doksorubisin uyguladığımız MCF-7 hücre sekretomlarındaki CTF-1 ekspresyonunda anlamlı bir artış olduğunu göstermektedir. Fakat A549 ve HeLa hücrelerinde kontrol grubuna göre doksorubisin uyguladığımız gruplarda CTF-1 ekspresyonunda anlamlı bir artış görülmemektedir (Şekil 4.5.). Bu veriler, MCF-7 hücrelerinde CTF-1 sekresyonundaki artışın CTF-1 ekspresyonundaki artışa bağlı olabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.7. Senesent MCF-7, A549 ve HeLa hücrelerinde CTF-1 ekspresyonunun belirlenmesi. *: kontrol grubundan anlamlı farklılığı göstermektedir (one-way ANOVA, Tukey, $p < 0,05$, MCF-7 hücresi kontrol grubu $n=6$ ve doksorubisinli grup $n=9$, A549 hücresi kontrol grubu $n=3$ ve doksorubisinli grup $n=4$, HeLa hücresi kontrol grubu $n=3$ ve doksorubisinli grup $n=4$). Kont: kontrol, Doks: 300 nM doksorubisin.

5. TARTIŞMA

Hücrel senesens hücrelerin prolifer olma kapasitesini geri dönüşümsüz olarak kaybettiği strese karşı oluşan karmaşık bir tepkidir. Senesent hücreler büyümüş, yassılaştı ve çok çekirdekli bir morfolojiye sahiptir [106]. Bölünme özelliklerini kaybetse bile metabolik olarak aktif kalırlar. Bu hücreler kendi mikroçevrelerini etkileyen senesens ile ilişkili sekreter fenotip olarak (SASP) olarak adlandırılan çeşitli proinflatuvar sitokin ve kemokinleri salgırlar. Bu SASP faktörlerinin çeşitli otokrin ve parakrin etkilere aracılık ettiği gösterilmiştir. Kanser tedavisinde kullanılan birçok kemoterapötik ajanın senesensi indüklediği bilinmektedir. Bu şekilde oluşan senesens terapi ile indüklenen senesens olarak adlandırılmıştır. Tedavi sonrası senesent hücrelerin birikimi SASP'ın olumsuz etkilerini güçlendirmektedir. Senesent hücrelerin bu sekreter aktivitesinin kanser metastazı, migrasyon ve invazyonunun indüklenmesi gibi çeşitli olumsuz etkilere aracılık ettiği bilinmektedir. Aynı zamanda SASP faktörlerinin tedavi sonrası inflamasyon, kanser nüksünde ve kemoterapötiklere oluşan dirençte önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir [107]. Bu nedenle senesent hücrelerden salgılanan faktörlerin tanımlanması ve karakterizasyonu kanser tedavisinde yeni yaklaşımlar geliştirilmesi için önem arz etmektedir. SASP içeriğinin, çeşitli kanser hücrelerinde farklılıklar gösterdiği bilinmektedir. Bu nedenle çeşitli kanser hücrelerinin SASP içeriğinin bilinmesi, hücre spesifik tedavi geliştirilmesi için önemlidir.

Bu tez çalışmasında, MCF-7, A549, HeLa kanser hücrelerine sırasıyla 3,4 ve 2 gün doksorubisin uygulanmış ve senesens indüksiyonu gerçekleştirilmiştir. Laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmalarda A549 ve HeLa hücrelerinde doksorubisin ile senesens indüklendiği gösterilmiştir [108, 109]. Buna ek olarak bu çalışmada MCF-7 hücrelerinde 3 günde senesens oluştuğu görülmüştür.

Kullandığımız üç farklı kanser hücre hattında senesens indüklendikten sonra bu hücrelerde oluşan morfolojik değişimleri ve hücreler arasındaki farklılıkları belirlemek için hücreler üç boyutlu holografik mikroskopi ile incelenmiştir. Aynı zamanda bu yöntemle, hücreler arasında görülen morfolojik farklılıkların senesent hücrelerin metabolik aktivitesine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bulgularımızda, MCF-7, A549 ve HeLa kanser hücrelerinde doksorubisin uygulanmış grupların kontrol gruplarına göre hücre alanlarının ve hacimlerinin anlamlı olarak arttığı görülmüştür. Bu veriler daha önce laboratuvarımızda yapılan çalışmalarla uyumluluk göstermektedir [108]. Literatürde senesent hücreler için

“düzleşmiş/incelmiş tanımlaması” yaygın olarak kullanılmaktadır. Buna karşın, verilerimiz MCF-7 hücrelerinde kontrol gruplarına göre ilaçlı grupta ortalama hücre kalınlığının azaldığı ve maksimum kalınlığın değişmediğini göstermektedir. A549 ve HeLa hücrelerinde ise gruplar arası anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Bu veriler kullanılan bu ifadenin yaygın bir ifade olmayabileceğine işaret etmektedir.

Hücrelerde senesens oluşumunun belirlenmesi için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Normalde literatürde birçok farklı senesent hücrede IL-6 sekresyon ve ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir [45]. Bu nedenle IL-6, hücrelerde senesens biyobelirteci olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bulgularımızda, A549 ve HeLa senesent hücre sekretomunda IL-6 sekresyonunun arttığı görülürken, buna zıt olarak MCF-7 kontrol hücrelerinde ve hücre sekretomunda IL-6 sekresyonu detekte edilememiştir. Literatür taraması yapıldığında, Sasser ve ark., östrojen reseptörü pozitif MCF-7 ve T47D hücrelerinde IL-6 ekspresyonunun olmadığını göstermişlerdir [110]. MCF-7 hücrelerinde IL-6 sekresyonunun görülmemesi, bu sonuçlar ile uyumluluk göstermektedir. Bu veriler, IL-6'nın senesent hücrelerde ortak kullanılabilecek bir sensens biyobelirteci olamayacağını göstermektedir. Diğer bir çalışmada, 2 farklı kemoterapötik ajan olan alisertip ve etoposid ile 13 farklı kanser hücresinde senesens indüklenmiş ve bir dizi SASP faktörünün sekresyonu incelenmiştir [111]. Bu çalışmada östrojen reseptörü pozitif MCF-7 ve T47D hücrelerinde IL-6 sekresyonunun olmadığı gösterilmiştir. Her iki çalışma da bizim bulgularımızı desteklemektedir.

Akkoc ve ark., östrojen reseptörü pozitif MCF-7 ve T47D hücrelerinden salınan CTF-1'in kanser metastaz, migrasyon ve invazyonu gibi istenmeyen etkilere aracılık ettiğini göstermişlerdir. Bu nedenle biz bu çalışmada, IL-6 ailesinin bir üyesi olan CTF-1'in senesent hücrelerdeki ekspresyon ve sekresyonlarını değerlendirdik. Bulgularımızda, senesent MCF-7 hücrelerinde kontrol gruplarına göre CTF-1 sekresyon ve ekspresyonunda anlamlı bir artış görülmüştür. A549 ve HeLa hücrelerinde ise, hem kontrol hem de doksorubisinli gruplarda CTF-1 sekresyonu detekte edilememiş ve CTF-1 ekspresyonlarında anlamlı bir artış gözlenmemiştir. Bu veriler bize, MCF-7 hücrelerinde CTF-1'in bir senesens biyobelirteci olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızın sonuçları, farklı kanser hücre hatlarında senesens ile ilişkili sekresyon profillerinin belirgin farklılıklar gösterdiğini ortaya koymaktadır. MCF-7 hücrelerinde,

senesens sonrası CTF-1'in belirgin bir şekilde arttığı ve IL-6'nın saptanmadığı gözlemlenmiştir. Bu bulgu, östrojen reseptörü pozitif meme kanseri hücrelerinde IL-6'nın uygun bir senesens biyobelirteci olmadığını, ancak CTF-1'in potansiyel bir biyobelirteç olabileceğini düşündürmektedir. Diğer yandan, A549 ve HeLa hücrelerinde IL-6 sekresyonunda anlamlı bir artış gözlenirken, CTF-1 sekresyonu görülmemektedir. Bu durum, kanser hücre hatlarının senesens sonrası sekresyon profillerinin büyük ölçüde hücre tipine bağlı olduğunu ve tek bir biyobelirteç kullanılarak senesensin ortak olarak tespit edilmesinin zor olabileceğini göstermektedir.

Bu bulgular, farklı kanser türlerine yönelik tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde önemli çıkarımlara sahiptir. Özellikle, kanser tedavisinde senesensi hedefleyen stratejilerin, her bir kanser tipi için özgün sekresyon profillerini dikkate alması gerektiğini ortaya koymaktadır. SASP faktörlerinin karakterize edilmesi, hem tedavi sonrası yan etkilerin azaltılması hem de kanser nüksünün azaltılması açısından kritik öneme sahiptir. Ayrıca, spesifik SASP faktörlerinin tanımlanması, senesens hücrelerinin neden olduğu inflamasyon ve kemoterapi direncinin önlenmesinde yeni tedavi hedeflerinin belirlenmesine yardımcı olabilir. Bu doğrultuda, MCF-7 hücrelerinde CTF-1'in senesens biyobelirteci olarak kullanılması, östrojen reseptörü pozitif meme kanserinde tedaviye yönelik yeni yaklaşımlar geliştirilmesine olanak tanıyabilir. Gelecekte yapılacak çalışmalar, farklı kanser hücre hatlarındaki SASP faktörlerinin daha geniş kapsamlı analizini ve bu faktörlerin biyolojik etkilerinin daha detaylı incelenmesini içermelidir. Bu sayede, kanser tedavisinde daha etkili ve kişiselleştirilmiş stratejiler geliştirilebilir.



6. SONUÇ

Yapmış olduğumuz in vitro deneysel çalışmalarımızda bir kemoterapötik ajan olan doksorubisin ile MCF-7 hücrelerinde indüklenen senesenste, senesent MCF-7 hücrelerinden IL-6 sekresyonunun gerçekleşmediğini fakat CTF-1 sekresyonunun arttığını belirledik. Bu nedenle CTF-1'in senesent MCF-7 hücresinde yeni bir SASP biyobelirteci olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz.





KAYNAKLAR

1. Dörr, J. R., Yu, Y., Milanovic, M., Beuster, G., Zasada, C., Däbritz, J. H., Lisec, J., Lenze, D., Gerhardt, A., Schleicher, K., Kratzat, S., Purfürst, B., Walenta, S., Mueller-Klieser, W., Gräler, M., Hummel, M., Keller, U., Buck, A. K., Dörken, B., Willmitzer, L., and Schmitt, C. A. (2013). Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature*, 501(7467), 421-425.
2. Roger, L., Tomas, F. and Gire, V. (2021). Mechanisms and regulation of cellular senescence. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 13173.
3. Lopes-Paciencia, S., Saint-Germain, E., Rowell, M. C., Ruiz, A. F., Kalegari, P. and Ferbeyre, G. (2019). The senescence-associated secretory phenotype and its regulation. *Cytokine*, 117, 15-22.
4. Hayflick, L. (1996). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Nephrol Dial Transplant*, 11, 1822-1824.
5. Prasanna, P. G., Citrin, D. E., Hildesheim, J., Ahmed, M. M., Venkatachalam, S., Riscuta, G., and Coleman, C. N. (2021). Therapy-induced senescence: opportunities to improve anticancer therapy. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 113(10), 1285-1298.
6. Fitsiou, E., Soto-Gamez, A. and Demaria, M. (2022, June). Biological functions of therapy-induced senescence in cancer. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 81, pp. 5-13). Academic Press.
7. Latchman, D. S. (1999). Cardiotrophin-1 (CT-1): a novel hypertrophic and cardioprotective agent. *International journal of experimental pathology*, 80(4), 189-196.
8. Akkoc, Y., Dalci, K., Karakas, H. E., Erbil-Bilir, S., Yalav, O., Sakman, G., and Gozuacik, D. (2023). Tumor-derived CTF1 (cardiotrophin 1) is a critical mediator of stroma-assisted and autophagy-dependent breast cancer cell migration, invasion and metastasis. *Autophagy*, 19(1), 306-323.
9. Calcinotto, A., Kohli, J., Zagato, E., Pellegrini, L., Demaria, M. and Alimonti, A. (2019). Cellular senescence: aging, cancer, and injury. *Physiological Reviews*, 99(2), 1047-1078.
10. Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J. and Peeper, D. S. (2010). The essence of senescence. 548. *Genes Dev*, 24(2463-2479), 549.
11. Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental cell research*, 37(3), 614-636.
12. Olovnikov, A. M. (1971). Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides. In *Dokl Biochem* (Vol. 201, pp. 394-397).
13. Watson, J. D. (1972). Origin of concatemeric T7DNA. *Nature New Biology*, 239(94), 197-201.

14. Fagagna, F. D. A. D., Reaper, P. M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., and Jackson, S. P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*, 426(6963), 194-198.
15. Fujita, K., Mondal, A. M., Horikawa, I., Nguyen, G. H., Kumamoto, K., Sohn, J. J., and Harris, C. C. (2009). p53 isoforms $\Delta 133p53$ and p53 β are endogenous regulators of replicative cellular senescence. *Nature cell biology*, 11(9), 1135-1142.
16. D'adda Di Fagagna, F. (2008). Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nature Reviews Cancer*, 8(7), 512-522.
17. Horn, H. F. and Vousden, K. H. (2007). Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene*, 26(9), 1306-1316.
18. Halazonetis, T. D., Gorgoulis, V. G. and Bartek, J. (2008). An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *science*, 319(5868), 1352-1355.
19. Özdemir, A., Demir, Y. D. Ş., Yeşilyurt, Z. E. and Ark, M. (2023). Senescent cells and SASP in cancer microenvironment: New approaches in cancer therapy. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 133, 115-158.
20. Pole, A., Dimri, M. and Dimri, G. P. (2016). Oxidative stress, cellular senescence and ageing. *AIMS molecular science*, 3(3).
21. Dimri, M., Kang, M. and Dimri, G. P. (2016). A miR-200c/141-BMI1 autoregulatory loop regulates oncogenic activity of BMI1 in cancer cells. *Oncotarget*, 7(24), 36220.
22. Nakayama, Y. and Yamaguchi, N. (2013). Role of cyclin B1 levels in DNA damage and DNA damage-induced senescence. *International review of cell and molecular biology*, 305, 303-337.
23. Chapman, J., Fielder, E. and Passos, J. F. (2019). Mitochondrial dysfunction and cell senescence: deciphering a complex relationship. *FEBS letters*, 593(13), 1566-1579.
24. Muñoz-Espín, D. and Serrano, M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(7), 482-496.
25. Saleh, T., Bloukh, S., Carpenter, V. J., Alwohoush, E., Bakeer, J., Darwish, S., and Gewirtz, D. A. (2020). Therapy-induced senescence: an “old” friend becomes the enemy. *Cancers*, 12(4), 822.
26. Fitsiou, E., Soto-Gamez, A. and Demaria, M. (2022, June). Biological functions of therapy-induced senescence in cancer. In *Seminars in cancer biology* (Vol. 81, pp. 5-13). Academic Press.
27. Ewald, J. A., Desotelle, J. A., Wilding, G. and Jarrard, D. F. (2010). Therapy-induced senescence in cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 102(20), 1536-1546.
28. Campisi, J. (2013). Aging, cellular senescence, and cancer. *Annual review of physiology*, 75, 685-705.

29. Gorgoulis, V., Adams, P. D., Alimonti, A., Bennett, D. C., Bischof, O., Bishop, C., and Demaria, M. (2019). Cellular senescence: defining a path forward. *Cell*, 179(4), 813-827.
30. Coppé, J. P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y. U., Muñoz, D. P., Goldstein, J., 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.
31. Kuilman, T. and Peeper, D. S. (2009). Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nature reviews cancer*, 9(2), 81-94.
32. Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R. A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., and Lowe, S. W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*, 445(7128), 656-660.
33. Chien, Y., Scuoppo, C., Wang, X., Fang, X., Balgley, B., Bolden, J. E., and Lowe, S. W. (2011). Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- κ B promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes & development*, 25(20), 2125-2136.
34. Kang, T.W. (2011). Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature*, 479, 547-551.
35. Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S. A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J. R., and Campisi, J. (2014). An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Developmental cell*, 31(6), 722-733.
36. Jun, J. I. and Lau, L. F. (2010). The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nature cell biology*, 12(7), 676-685.
37. Baker, D. J., Childs, B. G., Durik, M., Wijers, M. E., Sieben, C. J., Zhong, J., and Van Deursen, J. M. (2016). Naturally occurring p16Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*, 530(7589), 184-189.
38. Campisi, J. (2013). Aging, cellular senescence, and cancer. *Annual review of physiology*, 75, 685-705.
39. Bavik, C., Bavik, C., Coleman, I., Dean, J. P., Knudsen, B., Plymate, S., and Nelson, P. S. *The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms*. *Cancer research*, 2006. 66(2), 794-802.
40. 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(2), 794-802.
41. 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.

42. Rodier, F., Coppé, J. P., Patil, C. K., Hoeijmakers, W. A., Muñoz, D. P., Raza, S. R., and Campisi, J. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nature cell biology*, 11(8), 973-979.
43. Sun, Y., Campisi, J., Higano, C., Beer, T. M., Porter, P., Coleman, I., 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.
44. Gilbert, L. A. and Hemann, M. T. (2010). DNA damage-mediated induction of a chemoresistant niche. *Cell*, 143(3), 355-366.
45. 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.
46. 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.
47. Freund, A., Patil, C. K. and Campisi, J. (2011). p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *The EMBO journal*, 30(8), 1536-1548.
48. Acosta, J. C., O'Loghlen, A., Banito, A., Guijarro, M. V., Augert, A., Raguz, S., and Gil, J. (2008). Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *cell*, 133(6), 1006-1018.
49. Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L. C., Douma, S., van Doorn, R., Desmet, C. J., and Peeper, D. S. (2008). Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell*, 133(6), 1019-1031.
50. 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.
51. Byun, H. O., Lee, Y. K., Kim, J. M. and Yoon, G. (2015). From cell senescence to age-related diseases: differential mechanisms of action of senescence-associated secretory phenotypes. *BMB reports*, 48(10), 549.
52. Basisty, N., Kale, A., Jeon, O. H., Kuehnemann, C., Payne, T., Rao, C., and Schilling, B. (2020). A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development. *PLoS biology*, 18(1), e3000599.
53. Orjalo, A. V., Bhaumik, D., Gengler, B. K., Scott, G. K. and Campisi, J. (2009). Cell surface-bound IL-1 α is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(40), 17031-17036.

54. 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.
55. Mercurio, L., Lulli, D., Mascia, F., Dellambra, E., Scarponi, C., Morelli, M., and Madonna, S. (2020). Intracellular Insulin-like growth factor binding protein 2 (IGFBP2) contributes to the senescence of keratinocytes in psoriasis by stabilizing cytoplasmic p21. *Aging (Albany NY)*, 12(8), 6823.
56. McQuibban, G. A., Gong, J. H., Wong, J. P., Wallace, J. L., Clark-Lewis, I. and Overall, C. M. (2002). Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 100(4), 1160-1167.
57. Bode, W., Fernandez-Catalan, C., Grams, F., Gomis-Rüth, F. X., Nagase, H., Tschesche, H., and Maskos, K. (1999). Insights into MMP-TIMP interactions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 878(1), 73-91.
58. Schneiderman, J. and Loskutoff, D. J. (1991). Plasminogen activator inhibitors. *Trends in cardiovascular medicine*, 1(3), 99-102.
59. Davalos, A. R., Kawahara, M., Malhotra, G. K., Schaum, N., Huang, J., Ved, U., and Campisi, J. (2013). p53-dependent release of Alarmin HMGB1 is a central mediator of senescent phenotypes. *Journal of Cell Biology*, 201(4), 613-629.
60. Takasugi, M., Okada, R., Takahashi, A., Virya Chen, D., Watanabe, S. and Hara, E. (2017). Small extracellular vesicles secreted from senescent cells promote cancer cell proliferation through EphA2. *Nature communications*, 8(1), 15729.
61. Borghesan, M., Fafián-Labora, J., Eleftheriadou, O., Carpintero-Fernández, P., Paez-Ribes, M., Vizcay-Barrena, G., and O’Loghlen, A. (2019). Small extracellular vesicles are key regulators of non-cell autonomous intercellular communication in senescence via the interferon protein IFITM3. *Cell Reports*, 27(13), 3956-3971.
62. Lehmann, B. D., Paine, M. S., Brooks, A. M., McCubrey, J. A., Renegar, R. H., Wang, R., and Terrian, D. M. (2008). Senescence-associated exosome release from human prostate cancer cells. *Cancer research*, 68(19), 7864-7871.
63. Khalil, R., Diab-Assaf, M., and Lemaitre, J. M. (2023). Emerging Therapeutic Approaches to Target the Dark Side of Senescent Cells: New Hopes to Treat Aging as a Disease and to Delay Age-Related Pathologies. *Cells*, 12(6), 915.
64. Sapochnik, M., Haedo, M. R., Fuertes, M., Ajler, P., Carrizo, G., Cervio, A., and Arzt, E. (2017). Autocrine IL-6 mediates pituitary tumor senescence. *Oncotarget*, 8(3), 4690.
65. Garbers, C., Kuck, F., Aparicio-Siegmund, S., Konzak, K., Kessenbrock, M., Sommerfeld, A., and Scheller, J. (2013). Cellular senescence or EGFR signaling induces Interleukin 6 (IL-6) receptor expression controlled by mammalian target of rapamycin (mTOR). *Cell Cycle*, 12(21), 3421-3432.

66. Kojima, H., Kunimoto, H., Inoue, T., and Nakajima, K. (2012). The STAT3-IGFBP5 axis is critical for IL-6/gp130-induced premature senescence in human fibroblasts. *Cell Cycle*, 11(4), 730-739.
67. Kojima, H., Inoue, T., Kunimoto, H., and Nakajima, K. (2013). IL-6-STAT3 signaling and premature senescence. *Jak-stat*, 2(4), e25763.
68. Ruhland, M. K., Loza, A. J., Capietto, A. H., Luo, X., Knolhoff, B. L., Flanagan, K. C., and Stewart, S. A. (2016). Stromal senescence establishes an immunosuppressive microenvironment that drives tumorigenesis. *Nature communications*, 7(1), 11762.
69. Pereira, B. I., Devine, O. P., Vukmanovic-Stejić, M., Chambers, E. S., Subramanian, P., Patel, N., and Akbar, A. N. (2019). Senescent cells evade immune clearance via HLA-E-mediated NK and CD8⁺ T cell inhibition. *Nature communications*, 10(1), 2387.
70. Carswell, E., et al. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(9), 3666-3670.
71. Kandhaya-Pillai, R., Miro-Mur, F., Alijotas-Reig, J., Tchkonja, T., Kirkland, J. L., and Schwartz Jr, S. (2017). TNF α -senescence initiates a STAT-dependent positive feedback loop, leading to a sustained interferon signature, DNA damage, and cytokine secretion. *Aging*, 9(11), 2411.
72. Guo, F., Wu, R., and Xu, J. (2019). Salicin prevents TNF- α -induced cellular senescence in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47(1), 2618-2623.
73. Khan, S. Y., Awad, E. M., Oszwald, A., Mayr, M., Yin, X., Waltenberger, B., and Breuss, J. M. (2017). Premature senescence of endothelial cells upon chronic exposure to TNF α can be prevented by N-acetyl cysteine and plumericin. *Scientific Reports*, 7(1), 39501.
74. Kim, K. S., Kang, K. W., Seu, Y. B., Baek, S. H., and Kim, J. R. (2009). Interferon- γ induces cellular senescence through p53-dependent DNA damage signaling in human endothelial cells. *Mechanisms of ageing and development*, 130(3), 179-188.
75. Yu, Q., Katlinskaya, Y. V., Carbone, C. J., Zhao, B., Katlinski, K. V., Zheng, H., and Fuchs, S. Y. (2015). DNA-damage-induced type I interferon promotes senescence and inhibits stem cell function. *Cell reports*, 11(5), 785-797.
76. Brenner, E., Schörg, B. F., Ahmetlić, F., Wieder, T., Hilke, F. J., Simon, N., and Röcken, M. (2020). Cancer immune control needs senescence induction by interferon-dependent cell cycle regulator pathways in tumours. *Nature Communications*, 11(1), 1335.
77. Zhao, S., Jiang, J., Jing, Y., Liu, W., Yang, X., Hou, X., and Wei, L. (2020). The concentration of tumor necrosis factor- α determines its protective or damaging effect on liver injury by regulating Yap activity. *Cell death & disease*, 11(1), 70.

78. Bent, E. H., Gilbert, L. A., and Hemann, M. T. (2016). A senescence secretory switch mediated by PI3K/AKT/mTOR activation controls chemoprotective endothelial secretory responses. *Genes & development*, 30(16), 1811-1821.
79. Zhu, Y. I., Tchkonina, T., Pirtskhalava, T., Gower, A. C., Ding, H., Giorgadze, N., and Kirkland, J. L. (2015). The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging cell*, 14(4), 644-658.
80. Hassona, Y., Cirillo, N., Heesom, K., Parkinson, E. K., and Prime, S. S. (2014). Senescent cancer-associated fibroblasts secrete active MMP-2 that promotes keratinocyte dis-cohesion and invasion. *British journal of cancer*, 111(6), 1230-1237.
81. 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.
82. Jones, S. A., and Jenkins, B. J. (2018). Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer. *Nature reviews immunology*, 18(12), 773-789.
83. Wang, X., Wei, Y., Xiao, H., Liu, X., Zhang, Y., Han, G., and Wang, R. (2016). A novel IL-23p19/Ebi3 (IL-39) cytokine mediates inflammation in Lupus-like mice. *European journal of immunology*, 46(6), 1343-1350.
84. Collison, L. W., Delgoffe, G. M., Guy, C. S., Vignali, K. M., Chaturvedi, V., Fairweather, D., and Vignali, D. A. (2012). The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional. *Nature immunology*, 13(3), 290-299.
85. Garbers, C., Hermanns, H. M., Schaper, F., Müller-Newen, G., Grötzinger, J., Rose-John, S., and Scheller, J. (2012). Plasticity and cross-talk of interleukin 6-type cytokines. *Cytokine & growth factor reviews*, 23(3), 85-97.
86. Pennica, D., King, K. L., SHAw, K. J., Luis, E., Rullamas, J., LuOH, S. M., and Chien, K. R. (1995). Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(4), 1142-1146.
87. Pennica, D., Arce, V., Swanson, T. A., Vejsada, R., Pollock, R. A., Armanini, M., and Henderson, C. E. (1996). Cardiotrophin-1, a cytokine present in embryonic muscle, supports long-term survival of spinal motoneurons. *Neuron*, 17(1), 63-74.
88. López-Yoldi, M., Moreno-Aliaga, M. J., and Bustos, M. (2015). Cardiotrophin-1: a multifaceted cytokine. *Cytokine & growth factor reviews*, 26(5), 523-532.
89. Hirota, H., Chen, J., Betz, U. A., Rajewsky, K., Gu, Y., Ross, J., and Chien, K. R. (1999). Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress. *Cell*, 97(2), 189-198.
90. Sheng, Z., Pennica, D., Wood, W. I., and Chien, K. R. (1996). Cardiotrophin-1 displays early expression in the murine heart tube and promotes cardiac myocyte survivals. *Development*, 122(2), 419-428.

91. Barnabé-Heider, F., WasylInka, J. A., Fernandes, K. J., Porsche, C., Sendtner, M., Kaplan, D. R., and Miller, F. D. (2005). Evidence that embryonic neurons regulate the onset of cortical gliogenesis via cardiotrophin-1. *Neuron*, 48(2), 253-265.
92. Wang, D., Li, X., Gao, K., Lu, D., Zhang, X., Ma, C., and Zhang, L. (2013). Cardiotrophin-1 (CTF1) ameliorates glucose-uptake defects and improves memory and learning deficits in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 107, 48-57.
93. Yang, Z. F., Lau, C. K., Ngai, P., Lam, S. P., Ho, D. W., Poon, R. T. P., and Fan, S. T. (2008). Cardiotrophin-1 enhances regeneration of cirrhotic liver remnant after hepatectomy through promotion of angiogenesis and cell proliferation. *Liver International*, 28(5), 622-631.
94. Aguilar-Melero, P., Luque, A., Machuca, M. M., de Obanos, M. P. P., Navarrete, R., Rodríguez-García, I. C., and López-Cillero, P. (2013). Cardiotrophin-1 reduces ischemia/reperfusion injury during liver transplant. *journal of surgical research*, 181(2), e83-e91.
95. Castaño, D., Larequi, E., Belza, I., Astudillo, A. M., Martínez-Ansó, E., Balsinde, J., and Bustos, M. (2014). Cardiotrophin-1 eliminates hepatic steatosis in obese mice by mechanisms involving AMPK activation. *Journal of hepatology*, 60(5), 1017-1025.
96. Moreno-Aliaga, M. J., Pérez-Echarri, N., Marcos-Gómez, B., Larequi, E., Gil-Bea, F. J., Viollet, B., and Bustos, M. (2011). Cardiotrophin-1 is a key regulator of glucose and lipid metabolism. *Cell metabolism*, 14(2), 242-253.
97. Wang, D., Liu, L., Yan, J., Wu, W., Zhu, X., and Wang, Y. (2015). Cardiotrophin-1 (CT-1) improves high fat diet-induced cognitive deficits in mice. *Neurochemical Research*, 40, 843-853.
98. Lutz, S.Z., Franck, O., Böhm, A., Machann, J., Schick, F., Machicao, F., Fritsche, A., Häring, H. U., and Staiger, H. (2014). Common genetic variation in the human CTF1 locus, encoding cardiotrophin-1, determines insulin sensitivity. *PloS one*, 2014. 9(7): p. e100391.
99. Bartelt, A., and Heeren, J. (2014). Adipose tissue browning and metabolic health. *Nature Reviews Endocrinology*, 10(1), 24-36.
100. Ehrling, C., Lai, W. S., Schaper, F., Brenndörfer, E. D., Matthes, R. J., Heinrich, P. C., and Bode, J. G. (2007). Regulation of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) mRNA stability by TNF- α involves activation of the MKK6/p38MAPK/MK2 cascade. *The Journal of Immunology*, 178(5), 2813-2826.
101. Benigni, F., Sacco, S., Pennica, D., and Ghezzi, P. (1996). Cardiotrophin-1 inhibits tumor necrosis factor production in the heart and serum of lipopolysaccharide-treated mice and in vitro in mouse blood cells. *The American journal of pathology*, 149(6), 1847.

102. Garcia-Cenador, M. B., Lorenzo-Gomez, M. F., Herrero-Payo, J. J., Ruiz, J., de Obanos, M. P. P., Pascual, J., and Garcia-Criado, F. J. (2013). Cardiotoxin-1 administration protects from ischemia-reperfusion renal injury and inflammation. *Transplantation*, 96(12), 1034-1042.
103. Hishinuma, S., Funamoto, M., Fujio, Y., Kunisada, K., and Yamauchi-Takahara, K. (1999). Hypoxic stress induces cardiotoxin-1 expression in cardiac myocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 264(2), 436-440.
104. Ichiki, T., Jougasaki, M., Setoguchi, M., Imamura, J., Nakashima, H., Matsuoka, T., and Tei, C. (2008). Cardiotoxin-1 stimulates intercellular adhesion molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in human aortic endothelial cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 294(2), H750-H763. Ichiki, T., Jougasaki, M., Setoguchi, M., Imamura, J., Nakashima, H., Matsuoka, T., and Tei, C. (2008). Cardiotoxin-1 stimulates intercellular adhesion molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in human aortic endothelial cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 294(2), H750-H763.
105. Craig, R., Larkin, A., Mingo, A. M., Thuermer, D. J., Andrews, C., McDonough, P. M., and Glembotski, C. C. (2000). p38 MAPK and NF- κ B collaborate to induce interleukin-6 gene expression and release: evidence for a cytoprotective autocrine signaling pathway in a cardiac myocyte model system. *Journal of Biological Chemistry*, 275(31), 23814-23824.
106. Özdemir, A., Demir, Y. D. Ş., Yeşilyurt, Z. E., and Ark, M. (2023). Senescent cells and SASP in cancer microenvironment: New approaches in cancer therapy. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 133, 115-158.
107. Demaria, M., O'Leary, M. N., Chang, J., Shao, L., Liu, S. U., Alimirah, F., and Campisi, J. (2017). Cellular senescence promotes adverse effects of chemotherapy and cancer relapse. *Cancer discovery*, 7(2), 165-176.
108. 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.
109. 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.
110. Sasser, A. K., Sullivan, N. J., Studebaker, A. W., Hendey, L. F., Axel, A. E., and Hall, B. M. (2007). Interleukin-6 is a potent growth factor for ER- α -positive human breast cancer. *The FASEB Journal*, 21(13), 3763-3770.
111. Jochems, F., Thijssen, B., De Conti, G., Jansen, R., Pogacar, Z., Groot, K., and Bernards, R. (2021). The Cancer SENESCopedia: A delineation of cancer cell senescence. *Cell reports*, 36(4).



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Tayyar, Tuğçe
Uyruğu : T.C.

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi /Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Ana Bilim Dalı	Devam ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi	2022
Lise	Beşgen Temel Lisesi	2017

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2024-Halen	Gazi Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

-

Hobiler

Yüzme, Doğa sporları



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..