



YENİ BİR SENOMORFİK İLAÇ ADAYI OLARAK HİDROKLOROTİYAZİD

HYDROCHLOROTHIAZIDE AS A NEW SENOMORPHIC DRUG CANDIDATE

Yaprak Dilber ŞİMAY DEMİR^{1*} , Senem AKGÜL²

¹Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, 06330, Ankara, Türkiye

²Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, 06330, Ankara, Türkiye

ÖZ

Amaç: Konvansiyonel kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötiklerin hem kanser hem de kanser olmayan hücrelerde hücre senesensi indüklediği bilinmektedir. Senesent hücrelerin önemli özellikleri, hücre morfolojilerinde belirgin değişikliklerin olması ve bu hücrelerden senesens ilişkili sekretuar fenotip (SASP) olarak adlandırılan çeşitli sitokin, kemokin, büyüme faktörü ve matris metalloproteinazların salgılanmasıdır. SASP faktörlerinin parakrin etki ile tümör mikroçevresinde kemoterapötik ilaç direncine, kanser hücre proliferasyonuna ve migrasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, seçici olarak senesent hücre sekresyonunu baskılayan senomorfik etkili ilaçların geliştirilmesi, kanser tedavisinde yeni bir adjuvan tedavi olarak önem kazanmıştır. Rho kinaz enzim inhibisyonunun senesent hücrelerin sekretuar aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Yakın zamanlı bir çalışmada ise hipertansiyon tedavisinde kullanılan diüretik ilaçlardan biri olan hidroklorotiyazidin Rho kinaz enzim inhibisyonu yaptığı gösterilmiştir. Bu çalışmamızda Rho kinaz inhibisyonu yaptığı gösterilen hidroklorotiyazidin yeni bir senomorfik ilaç olma potansiyelinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Önceki çalışmalarımızda senesensi indüklediği belirlenen bir kemoterapötik olan doksorubisin ile HeLa hücrelerinde senesens indüklenmiştir. Daha sonra hidroklorotiyazid içeren ve içermeyen gruplarda senesent hücre sekretomu toplanarak bu sekretomlarda en belirgin SASP faktörlerinden biri olan IL-6'nın ölçülmesi ile senomorfik etkinlik değerlendirilmiştir.

Sonuç ve Tartışma: Bu çalışmamızda elde ettiğimiz veriler hidroklorotiyazidin, doksorubisin ile indüklenen senesent HeLa kanser hücrelerinin hem hücre boyutunu hem de sekrete edilen IL-6 düzeyini azalttığını göstermektedir. Bu verilerimiz hidroklorotiyazidin senomorfik etkiye sahip olduğuna işaret etmektedir. Kemoterapötiklerin yanında onların istenmeyen etkilerini engelleyebilecek adjuvan tedavi olarak senomorfik ilaçların kullanılması, daha efektif bir kanser tedavisi sağlanması açısından önemlidir.

Anahtar Kelimeler: Hidroklorotiyazid, ilaç yeniden konumlandırma, kanser, senesens, senomorfik ilaç

ABSTRACT

Objective: It is known that chemotherapeutics used in conventional cancer treatment induce cellular senescence in both cancer and non-cancerous cells. Important features of senescent cells include prominent changes in cell morphology and the secretion of various cytokines, chemokines, growth factors, and matrix metalloproteinases from these cells, called senescence-associated secretory phenotype (SASP). It has been shown that SASP factors cause chemotherapeutic drug

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Yaprak Dilber Şimay Demir
e-posta / e-mail: yapraksimay@gazi.edu.tr, Tel. / Phone: +903122023126

Gönderilme / Submitted : 21.03.2024

Kabul / Accepted : 21.01.2025

Yayınlanma / Published : erken görünüm

resistance, cancer cell proliferation, and migration in the tumor microenvironment through a paracrine effect. Therefore, developing senomorphic drugs that selectively suppress senescent cell secretion has gained importance as a new adjuvant therapy in cancer treatment. Rho kinase enzyme inhibition has been shown to inhibit the secretory activity of senescent cells. A recent study showed that hydrochlorothiazide, one of the diuretic drugs used to treat hypertension, inhibits the Rho kinase enzyme. In this study, we aimed to evaluate the potential of hydrochlorothiazide, which has been shown to inhibit Rho kinase, as a new senomorphic drug.

Material and Method: Senescence was induced in HeLa cells with doxorubicin, a chemotherapeutic that was determined to induce senescence in our previous studies. Then, senescent cell secretomes were collected in groups with and without hydrochlorothiazide, and senomorphic activity was evaluated by measuring IL-6, one of the most prominent SASP factors in these secretomes.

Result and Discussion: The data obtained in this study show that hydrochlorothiazide reduces both cell size and secreted IL-6 levels in doxorubicin-induced senescent HeLa cancer cells. These data indicate that hydrochlorothiazide has a senomorphic effect. The use of senomorphic drugs as adjuvant therapy to prevent their undesirable effects is important for providing more effective cancer treatment.

Keywords: Cancer, drug repositioning, hydrochlorothiazide, senescence, senomorphic drug

GİRİŞ

Hücrel senesens, hücrelerin kalıcı olarak hücre siklusundan çıkması olarak tanımlanmaktadır [1]. Çoğalma yeteneklerini kaybeden bu hücreler (senesent hücre), metabolik ve transkripsiyonel olarak aktiftir. Hücrel senesens hücrelerin replikatif ömürlerinin sonunda ortaya çıktığı gibi çeşitli stres faktörleri ile de indüklenebilmektedir. Bu stres faktörlerine, radyasyon, oksidatif stres, onkogen aktivasyonu ve ilaç tedavisi örnek olarak verilebilir [2-5]. Senesens indükleyici etkene göre farklı senesens sınıflandırmaları ve adlandırmaları yer almaktadır. Örneğin; tedavi-ile indüklenen senesens çeşitli ilaç uygulamalarına bağlı olarak hücrede meydana gelen senesens yanıtı olarak tanımlanabilir. Senesent hücrelerin ayırıcı özellikleri arasında genişlemiş ve düzleşmiş hücre morfolojisi, artmış lizozomal senesens ilişkili beta galaktozidaz (SA- β -Gal) aktivitesi ve senesens-ilişkili sekretuar fenotip olarak adlandırılan SASP'ın gelişimi yer almaktadır [6]. SASP, çok sayıda sitokin, kemokin, büyüme faktörü ve matriks metalloproteinazlar gibi güçlü parakrin etkilere yol açan biyoaktif bileşenler içermektedir. Yapılan çalışmalarla SASP'ın hücre tipine ve senesens indükleyici etkene bağlı olarak farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir [7]. Farklı hücre tipi ve farklı etkenlerle indüklenen senesent hücreler için SASPAtlas adı verilen online platform oluşturulmuştur [7]. Böylece senesent hücrelerden sekrete edilen faktörlerle ilgili daha ayrıntılı bilgiler elde edilmiştir. Senesent hücreler sekrete ettikleri SASP aracılığıyla çevresindeki hücrelerde proliferatif/antiproliferatif/migratuvar etkiler oluşturmaktadırlar [6,8,9]. Yapılan çalışmalar yaşlanma-ile ilişkili birçok patolojinin (kardiyovasküler hastalık, demans, osteoporoz, kanser, Tip 2 diyabet, idiyopatik pulmoner fibroz ve glomom gibi) hücrel senesens ve SASP ile ilişkili olduğunu göstermiştir [10-15].

Klinikte kullanılmakta olan farklı kemoterapötik ajanların hücrel senesensi tetiklediği ve senesens sekretomunun (SASP) gelişimine neden oldukları gösterilmiştir [7]. Kemoterapötik ilaçlarla indüklenen senesent hücre sekretomunun, mikroçevrede yer alan hücrelerde tümör gelişimini indükledikleri ve/veya kemoterapötik ilaçlara karşı direnç gelişimine neden oldukları gösterilmiştir [16,17]. Bu nedenle SASP'ı baskılayan adjuvan tedavilerle daha etkin bir kanser tedavisi sağlanabileceği düşünülmektedir.

Senesensi temel alan tedaviye senoterapi denmektedir. Senoterapi iki temel bakış açısıyla alt dallara ayrılmaktadır. Bunlardan ilki senolitiklerdir. Senolitikler, seçici olarak senesent hücrenin ortadan kaldırılmasını amaçlamaktadır. Diğer yaklaşım olan senomorfikler ise senesent hücrelerden sekrete edilen SASP'ı hedefleyen tedavi yaklaşımıdır. Yakın zamanda yapılan çalışmalar yeni senolitik ve senomorfik ilaç adaylarını bulmayı amaçlamaktadır [18]. Özellikle kanser tedavisinde kemoterapötiklerle birlikte kullanılabilecek SASP'ın zararlı etkilerini önleyebilecek yeni adjuvan senomorfiklerin keşfedilmesi klinik öneme sahiptir. Metformin, glukokortikoidler, apigenin, simvastatin, rapamisin gibi birçok senomorfik ilaç adayı belirlenmiştir [19-24]. Daha önce yapmış

olduğumuz bir çalışmada Rho kinaz enzim inhibitörlerinin de senomorfik etkinliğe sahip olduğunu gösterdik [25]. Diğer taraftan Mondaca-Ruff ve arkadaşları ise tiyazid grubu bir diüretik olan hidroklorotiyazidin Rho kinaz enzimini inhibe ettiğini göstermişlerdir [26]. Bu iki çalışma birlikte değerlendirildiğinde hidroklorotiyazidin senomorfik etkinliğinin olabileceğini düşündürmektedir.

İlacın yeniden konumlandırılması ruhsatlı ilaçlar için yeni bir endikasyon belirleyerek daha az maliyet ve süre ile ilacın piyasaya sürülmesini içeren bir süreçtir. Bu nedenle günümüzde hipertansiyon tedavisinde sıklıkla kullanılan ve terapötik penceresi dar olmayan hidroklorotiyazidin yeni bir senomorfik ilaç adayı olabilmesi yeniden konumlandırma ile kanser tedavisinde adjuvan olarak kullanılabileceğine işaret edecektir. Literatürde hidroklorotiyazidin senomorfik etkinliğini değerlendiren bir çalışma yer almamaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hücre Kültürü ve Senesens İndüksiyonu

Çalışmamızda serviks kanser hücre dizisi olan HeLa hücreleri kullanılmıştır. Daha önceki çalışmamızda HeLa hücrelerinde doksorubisin ile senesens indüksiyonu ve SASP gelişimini gerçekleştirdiğimiz deneysel şartları optimize ettiğimiz için mevcut çalışmamızda da bu hücre hattı ile çalışılmıştır [25]. Hücreler %10 fetal sıgır serumu ve 100 U/ml penisilin-streptomisin içeren DMEM'li besiyerinde kültüre edilmiştir. Deneysel çalışmalarımızda hücreler, hücre kültür kabının zeminini %70-80 dolduruncaya kadar 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde (Sanyo) çoğaltılmıştır.

Kemoterapi ile indüklenen senesens modelini oluşturmak için, daha önce grubumuz tarafından çalışılmış olan doksorubisin-ile senesens indüksiyonu gerçekleştirilmiştir [25]. Bu çalışma modelinde %70-80 konfluensiye ulaşmış HeLa hücrelerine 300 nM doksorubisin uygulanmış ve hücreler 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. 72 saatlik inkübasyon sonrasında hücrelerde senesens gelişimi, oluşan morfoloji ve SA-β-gal boyaması ile doğrulanmıştır.

SA-β-Gal Boyaması

Hücrel senesens gelişiminin belirlenmesi için, senesent hücrenin en yaygın kullanılan belirteci olan SA-β-Gal boyaması yapılmıştır. Bu amaçla Senesens β-Galaktosidaz Boyama Kiti (*Cellular signaling*, 9860) kullanılmıştır. Doksorubisin ile 72 saatlik inkübasyon sonrasında hücrelerin besiyeri uzaklaştırılmış ve hücreler 1 kez fosfat tamponu ile yıkanmıştır. Daha sonra kit içerisinde yer alan fiksasyon çözeltisi eklenmiş ve 10 dk oda sıcaklığında beklenmiştir. Hücrelerin üzerindeki fiksasyon çözeltisi uzaklaştırılmış ve 1 kez fosfat tamponuyla yıkanmıştır. pH'sı 6.0'a ayarlanmış beta-galaktosidaz boyama çözeltisi ilave edilmiş ve hücreler CO₂'siz kuru inkübatörde (JSL, JSSI-100C) yaklaşık 16 saat boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra hücrelerin görüntüleri ışık mikroskopu (*Leica, DFC 420C*) yardımıyla elde edilmiştir ve her bir görüntüdeki SA-β-Gal boyaması pozitif olan ve olmayan hücreler sayılmıştır. % SA-β-Gal pozitif hücre sayısı hesaplanarak gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirilmiştir.

Senesent Hücrelerin Faz Kontrast ve Holografik Mikroskopi ile Değerlendirilmesi

İlaç inkübasyonu sonrası hücrelerde meydana gelen morfolojik değişiklikler iki boyutlu olarak faz kontrast mikroskopu (*Leica, DMI8*) ve üç boyutlu olarak da holografik mikroskop (*HoloMonitor M4*) ile incelenmiştir. Holografik mikroskop görüntüleri üzerinden *HStudio M4 2.7* yazılımı kullanılarak hücre alanı, hücre hacmi, ortalama ve maksimum hücre kalınlığı gibi morfolojik parametreler hesaplanmıştır [25]. Her iki mikroskopta da elde edilen görüntüler ve analizler 4 ayrı biyolojik tekrar ile elde edilmiştir. Yapılan ölçümler üzerinden gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Hücre Canlılığının Belirlenmesi ve Hidroklorotiyazid Konsantrasyonu Seçimi

Hidroklorotiyazidin olası senomorfik etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla öncelikle hücre ölümüne yol açmayan en yüksek HCTZ konsantrasyonu belirlenmiştir. Bu amaçla hücre proliferasyonunun ve canlılığının biyokimyasal olarak belirlenmesinde, esas mitokondriyal dehidrojenaz enzim aktivitesi ölçümüne dayanan WST-1 Hücre Proliferasyon Testi Reaktif (Cell

biolabs, CBA-253) kullanılmıştır [26]. 96 çukurlu plakaların her bir çukuruna 10.000 HeLa hücresi ekilmiş ve 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra HCTZ logaritmik olarak artan konsantrasyonlarda (3, 10, 30, 100 ve 300 µM) hücrelere uygulanmış ve 48 saat inkübe edilmiştir. Senomorfik etki değerlendirmesinde optimize ettiğimiz deneysel şartlarda HCTZ'in 48 saatlik etkisi değerlendirileceği için hücre canlılığı deneyleri de 48 saatlik süre ile gerçekleştirilmiştir [27]. İnkübasyondan sonra, her bir kuyucuğa 10 µg WST-1 reaktifi ilave edilmiş ve 4 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Son olarak plakaların 450 nm'deki absorbans değerleri okunarak her bir konsantrasyon için % hücre canlılığı parametresi hesaplanmış ve bu parametre üzerinden gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Senesent Hücre Sekretomunun Toplanması ve IL-6 Ölçümü

Doksorubisin ile senesens indüksiyonu sonrasında senesent hücre sekretomunun elde edilmesi amacıyla 72 saatlik doksorubisin uygulaması sonrasında hücrelerin besiyeri uzaklaştırılmış ve hücreler 2 kez fosfat tamponu ile yıkanmıştır. Daha sonra hücrelere serumsuz ve fenol kırmızısı içermeyen besiyeri ilave edilmiştir. 48 saatlik inkübasyon sonrasında hücrelerin üzerindeki besiyeri mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır. Besiyeri içeren bu tüpler 10 dk 800 x g'de +4°C'de santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant 0.22 µm'lik steril filtrelerden geçirilmiş ve böylece senesent hücre sekretomu (SASP) elde edilmiştir [25,28].

Ayrıca sekretomu toplanan hücreler tripsinize edilerek hücre kültür kaplarından toplanmış ve hücre sayım cihazı (*Invitrogen, TALI*) kullanılarak her bir gruptaki hücre sayıları belirlenmiştir. Böylece sekretomların toplamda kaç hücreden sekrete edildiği tespit edilmiştir. Toplanan sekretomlar hücre sayısına göre normalize edilmiştir. SASP'ın oluşup oluşmadığı sekretomda IL-6 ölçümü ile değerlendirilmiştir [28].

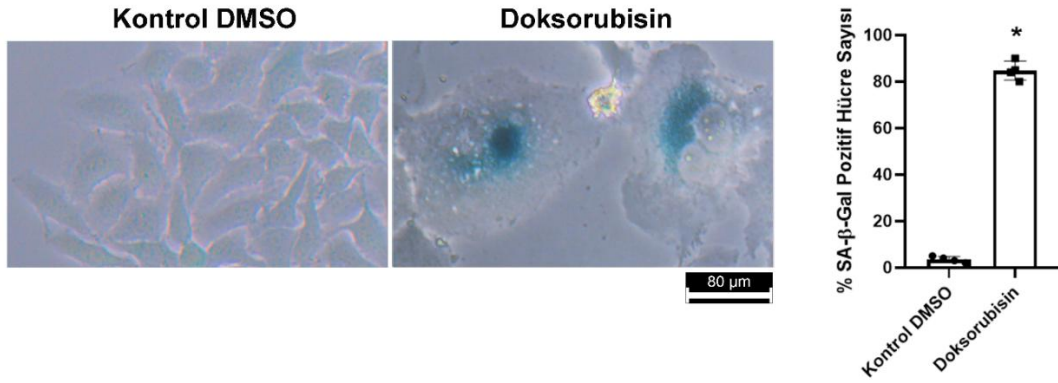
Sekretomda IL-6 ölçümü için insan IL-6 elisa kiti (*Thermo Scientific, KHC0061*) kullanılmış ve ölçüm kitin kullanma kılavuzuna uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Kit içerisinde yer alan 96 çukurlu plakanın her bir çukuruna 50 µl biyotinli antikor solüsyonu ve 100 µl hücre sayısına göre normalize edilmiş sekretom eklenmiştir. Oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakılan plaka 3 kez yıkama çözeltisiyle yıkanmış ve her bir çukura 100 µl streptavidin-HRP çözeltisi eklenmiştir. 30 dk oda sıcaklığında inkübasyon sonrasında plaka 3 kez yıkama çözeltisiyle yıkanmış ve her bir çukura 100 µl substrat çözeltisi eklenmiştir. 30 dk karanlık ortamda inkübasyon sonrasında çukurlara kit içerisindeki reaksiyonu durdurucu çözeltiden 100 µl ilave edilmiştir. Daha sonra plaka okuyucu (*SpectraMax i3x*) kullanılarak 450 nm'deki absorbans değerleri ölçülmüştür.

İstatistiksel Analiz

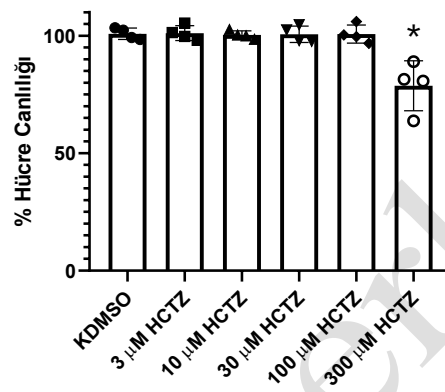
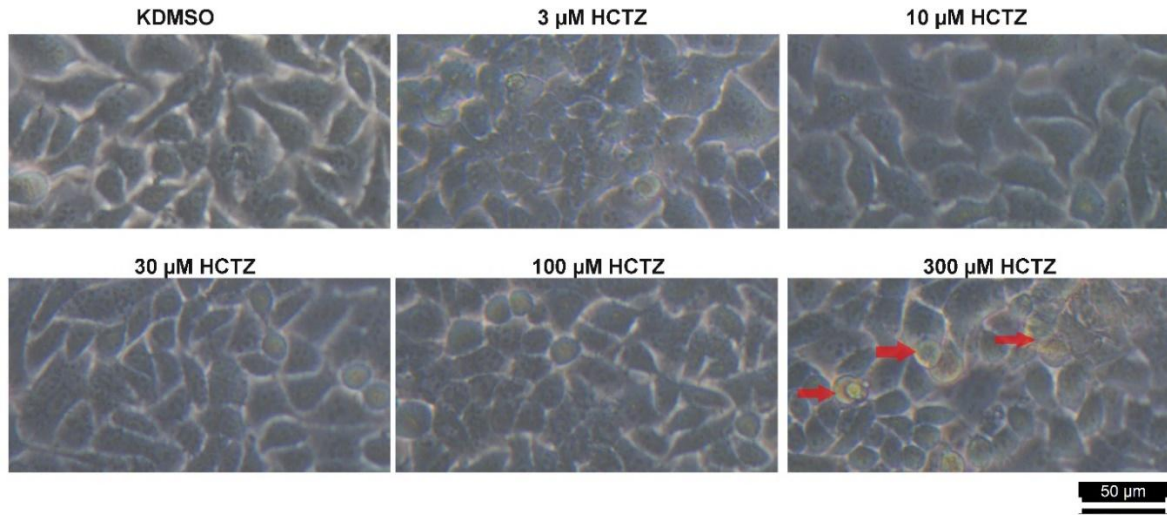
Deney sonucunda elde edilen verilerde, gruplar arasındaki farkın değerlendirilmesi için tek yönlü varyans analizi ve *post hoc Tukey* kullanılmıştır. Analizler *GraphPad Prism Version 8.0.1* programı ile gerçekleştirilmiştir. P<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Hücrel senesensin indüklenmesi amacıyla, HeLa hücre hattında 72 saatlik 300 nM doksorubisin uygulaması gerçekleştirilmiştir [25]. Çalışmamızda doksorubisin uygulanan grupta SA-beta gal pozitif boyaması kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır (Şekil 1). Bu sonucumuz daha önceki çalışmalarımızla tutarlı olarak belirlenen konsantrasyon ve sürede doksorubisin ile senesens indüksiyonunun gerçekleştiğini göstermektedir [25].



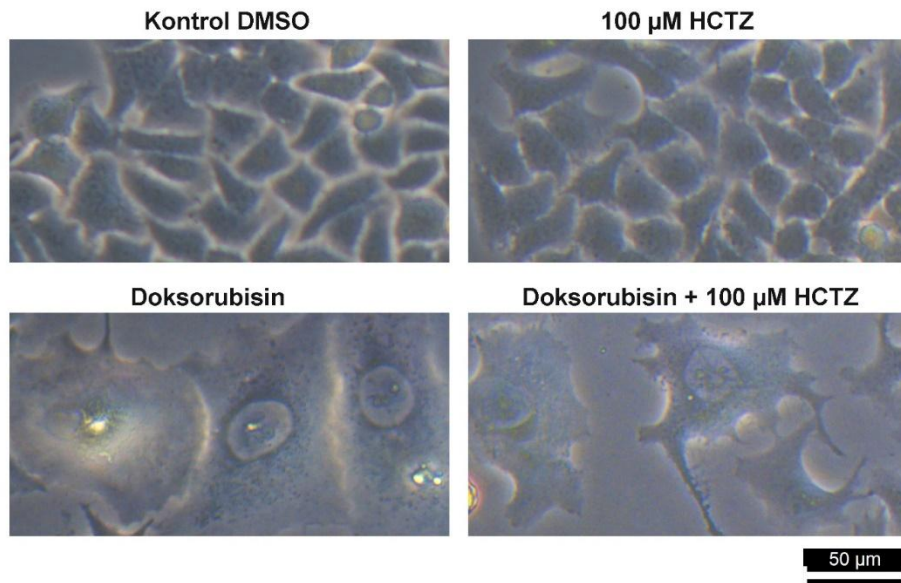
Şekil 1. Doksorubisin ile indüklenen senesensin SA-beta gal boyaması ile doğrulanması. Skala Bar: 80 µm. *: Kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir, n=4



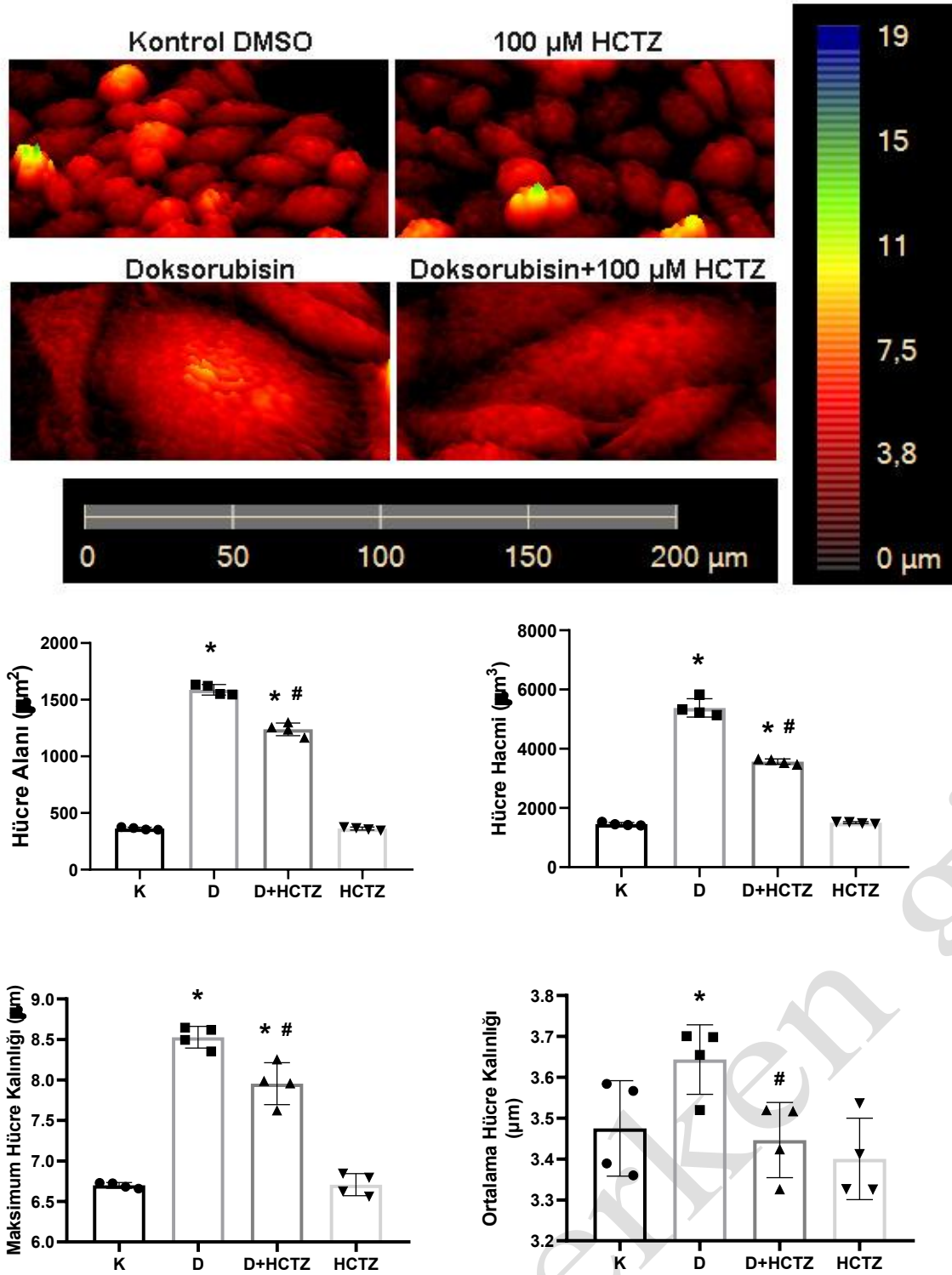
Şekil 2. HeLa hücre dizisine artan konsantrasyonlarda HCTZ uygulaması sonucu elde edilen faz kontrast görüntüleri ve WST-1 proliferasyon sonuçlarının istatistiksel analizi, KDMSO: Kontrol DMSO, HCTZ: hidroklorotiyazid. Kırmızı ok: ölü hücreleri (hücre kültür zemininden ayrılan ve küreselleşmiş hücreler) göstermektedir. *: Kontrol DMSO grubundan istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir, n=4. Skala Bar: 50 µm

Hidroklorotiyazidin senomorfik etkisinin değerlendirilmesi amacıyla öncelikle konsantrasyon seçimi yapılmıştır. Bunun için HeLa hücrelerine logaritmik olarak artan konsantrasyonlarda hidroklorotiyazid (HCTZ) uygulanmış ve hücreler 48 saat inkübe edilmiştir. Deney bitiminde hücre ölümü, mikroskopik olarak faz kontrast görüntüleme ile, biyokimyasal olarak ise WST-1 testi ile değerlendirilmiştir (Şekil 2). Çalışmamızda kullandığımız HeLa hücreleri tutunarak çoğalan aderent hücrelerdir. Bu nedenle mikroskopik olarak hücre kültür kabının zemininden ayrılan ve küreselleşen hücreler ölü hücre olarak değerlendirilmiştir (Şekil 2). Diğer taraftan WST-1 testi ile elde edilen veriler, mikroskopik gözlemlerimiz ile tutarlı olarak, en yüksek konsantrasyon olarak seçilen 300 μ M HCTZ'nin hücrelerde hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığını göstermektedir (Şekil 2). Bu nedenle sekretom çalışmalarında kullanılmak üzere hücre ölümünü tetiklemeyen en yüksek konsantrasyon olan 100 μ M HCTZ seçilmiştir.

HCTZ'in sekretom üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla, senesent ve senesent olmayan hücrelere 100 μ M HCTZ uygulanmıştır. 48 saatlik HCTZ inkübasyonu sonrasında hücrelerin hem faz kontrast hem de holografik görüntüleri elde edilmiştir (Şekil 3 ve Şekil 4). Holografik görüntülerden elde edilen görüntülerden hesaplanan morfolojik parametrelere göre, doksorubisin ile indüklenen senesent hücrelerde artan hücre alanı, hücre hacmi, maksimum hücre kalınlığı ve ortalama hücre kalınlığı hidroklorotiyazid uygulaması ile azalmıştır. Hidroklorotiyazidin senesent hücre morfolojisinde oluşturduğu bu değişiklikler daha önceki Rho/ROCK yolağı inhibisyonu ile elde ettiğimiz verilerle benzerlik göstermektedir [25].



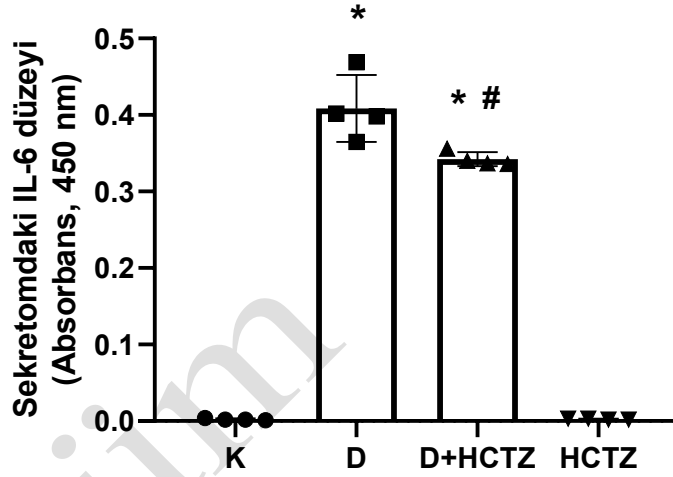
Şekil 3. Senesent ve senesent olmayan HeLa hücrelerinin morfolojisinde HCTZ'in etkisinin faz kontrast mikroskopisi ile incelenmesi. KDMSO: Kontrol DMSO, HCTZ: hidroklorotiyazid. Skala Bar: 50 μ m



Şekil 4. Senesent ve senesent olmayan HeLa hücrelerinin morfolojisinde HCTZ'in etkisinin holografik mikroskopi ile incelenmesi. K: kontrol, D: 300 nM Doksorubisin, D+HCTZ: 300 nM Doksorubisin + 100 µM hidroklorotiyazid, HCTZ: 100 µM hidroklorotiyazid. *: Kontrol grubundan, #: doksorubisin grubundan istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir, n=4

Hidroklorotiyazidin doksorubisin ile indüklenen senesent hücre sekretomu üzerindeki etkinliğini değerlendirmek için hücrelerin üzerindeki sekretom toplanmış ve bu sekretomda en yaygın kullanılan

SASP belirteci olan IL-6 ölçümü gerçekleştirilmiştir. Elde ettiğimiz veriler doksorubisin ile indüklenen senesent hücrelerin sekretomundaki IL-6 düzeylerinin anlamlı olarak arttığını ve hidroklorotiyazid uygulamasının ise bu artışı istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde azalttığını göstermektedir (Şekil 5).



Şekil 5. Senesent ve senesent olmayan HeLa hücrelerinin sekretomunda HCTZ'in etkisinin IL-6 ölçümü ile değerlendirilmesi. K: kontrol, D: 300 nM Doksorubisin, D+HCTZ: 300 nM Doksorubisin + 100 µM hidroklorotiyazid, HCTZ: 100 µM hidroklorotiyazid. *: Kontrol grubundan, #: doksorubisin grubundan istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir, n=4

Sonuç olarak elde ettiğimiz veriler HCTZ'nin HeLa kanser hücre hattında doksorubisin ile indüklenen senesent hücre morfolojisini ve sekretomunu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değiştirdiğini göstermiştir. Senesent sekretomunun en yaygın olarak kullanılan belirteci olan IL-6 sekresyonunun HCTZ ile azalması, HCTZ'in senomorfik etki potansiyelini göstermektedir [29,30]. HCTZ'in bu etkilerinin daha önceki çalışmalarımızda Rho/ROCK yolağının inhibisyonunun senesent hücre morfolojisi ve sekretomunda ortaya çıkardığı etkilere benzer olduğu görülmektedir [25,31]. Mondaca-Ruff ve arkadaşları gerçekleştirdikleri çalışmada hidroklorotiyazidin Rho kinaz enzim aktivasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir [27]. Bu çalışma ve mevcut verilerimiz birlikte değerlendirildiğinde HCTZ'nin senomorfik etkinliğinin altında yatan mekanizmanın ROCK inhibisyonu olabileceğine işaret etmektedir. Bununla birlikte; Aloud ve arkadaşları HCTZ ile tedavi edilen spontan hipertansif ratların daha düşük konsantrasyonlarda TNFα ve IFNγ ürettiklerini belirlemişlerdir [32]. Diğer taraftan Mitini-Nkhoma ve arkadaşları HCTZ, diazoksit, digoksin gibi iyon taşıyıcı modölatörlerinin immünbaskılayıcı etkinliklerinin olduğunu göstermiştir [33]. Bu çalışmalar HCTZ'in senomorfik etkisinin, ROCK inhibisyonundan bağımsız olarak doğrudan sitokin üretimini azaltması ile de ilişkili olabileceğine işaret etmektedir. Daha ileri çalışmalarla hidroklorotiyazidin senomorfik özelliğinin altında yatan mekanizmaların aydınlatılması ve bu özelliğin kanser mikroçevresindeki öneminin belirlenmesi senoterapötik olma potansiyelini gösterecektir.

Senomorfik etkiye sahip olan ilaç adaylarının klinikte kullanımları, SASP'ın sürekli olarak baskılanmasını sağlamak için kronik kullanımı gerektirmektedir. Bu nedenle senomorfik ilaç adaylarının iyi güvenlik profillerine sahip olmaları gerekmektedir [34]. Bu durum, yıllardır kullanılan ve güvenliliği bilinen hidroklorotiyazidin yeniden konumlandırma ile senomorfik kullanım potansiyelini güçlendirmektedir. Diğer taraftan SASP bileşenlerinin heterojenitesi dikkate alındığında, senomorfik etkili bir ilaç adayının farklı tipteki senesent hücrelerde senomorfik etkinlik göstermeme ihtimalini de ortaya çıkarmaktadır. Bu nedenle daha ileri çalışmalarla hidroklorotiyazidin senomorfik kullanımının ayrıntılı bir şekilde değerlendirilmesi gerekmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma 1919B012205805 başvuru nolu TÜBİTAK 2209A projesi tarafından desteklenmiştir. Hidroklorotiyazid etkin maddesinin temininde yardımcı olan İLKO ilaç firmasına teşekkür ederim. Araştırma süreci boyunca verdikleri destek ve geri bildirimleri için Prof. Dr. Mustafa ARK ve Prof. Dr. Aysun ÖZDEMİR'e teşekkür ederim.

YAZAR KATKILARI

Kavram: Y.D.Ş.D., S.A.; Tasarım Y.D.Ş.D.; Denetim: Y.D.Ş.D., S.A.; Kaynaklar: Y.D.Ş.D., S.A.; Malzemeler: Y.D.Ş.D., S.A.; Veri Toplama ve/veya İşleme: Y.D.Ş.D., S.A.; Analiz ve/veya Yorumlama: Y.D.Ş.D.; Literatür Taraması: Y.D.Ş.D., S.A.; Makalenin Yazılması: Y.D.Ş.D.; Kritik İnceleme: Y.D.Ş.D., S.A.; Diğer: -

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

ETİK KURUL ONAYI

Yazarlar bu çalışma için etik kurul onayının zorunlu olmadığını beyan etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Hayflick, L., Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25, 585-621. [\[CrossRef\]](#)
2. Chen, Q., Fischer, A., Reagan, J.D., Yan, L.J., Ames, B.N. (1995). Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(10), 4337-4341. [\[CrossRef\]](#)
3. Fripiat, C., Chen, Q.M., Zdanov, S., Magalhaes, J.P., Remacle, J., Toussaint, O. (2001). Subcytotoxic H₂O₂ stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(4), 2531-2537. [\[CrossRef\]](#)
4. Robles, S.J., Adami, G.R. (1998). Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene*, 16(9), 1113-1123. [\[CrossRef\]](#)
5. Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 88(5), 593-602. [\[CrossRef\]](#)
6. Coppé, J.P., Patil, C.K., Rodier, F., Krtolica, A., Beauséjour, C.M., Parrinello, S., Hodgson, J.G., Chin, K., Desprez, P.Y., Campisi, J. (2010). A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. *PloS One*, 5(2), e9188. [\[CrossRef\]](#)
7. Basisty, N., Kale, A., Jeon, O.H., Kuehnemann, C., Payne, T., Rao, C., Holtz, A., Shah, S., Sharma, V., Ferrucci, L., Campisi, J., Schilling, B. (2020). A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development. *PLoS Biology*, 18(1), e3000599. [\[CrossRef\]](#)
8. Kuilman, T., Peeper, D.S. (2009). Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nature Reviews Cancer*, 9(2), 81-94. [\[CrossRef\]](#)
9. Acosta, J.C., Gil, J. (2012). Senescence: A new weapon for cancer therapy. *Trends in Cell Biology*, 22(4), 211-219. [\[CrossRef\]](#)
10. Hu, C., Zhang, X., Teng, T., Ma, Z.G., Tang, Q. Z. (2022). Cellular Senescence in cardiovascular diseases: A systematic review. *Aging and Disease*, 13(1), 103-128. [\[CrossRef\]](#)
11. Liu R.M. (2022). Aging, cellular senescence, and Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 1989. [\[CrossRef\]](#)
12. Föger-Samwald, U., Kersch-Schindl, K., Butylina, M., Pietschmann, P. (2022). Age related osteoporosis: Targeting cellular senescence. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2701. [\[CrossRef\]](#)
13. Narasimhan, A., Flores, R.R., Robbins, P.D., Niedernhofer, L.J. (2021). Role of cellular senescence in type II diabetes. *Endocrinology*, 162(10), bqab136. [\[CrossRef\]](#)

14. Schafer, M.J., White, T.A., Iijima, K., Haak, A.J., Ligresti, G., Atkinson, E.J., Oberg, A.L., Birch, J., Salmonowicz, H., Zhu, Y., Mazula, D.L., Brooks, R.W., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Pirtskhalava, T., Prakash, Y.S., Tchkonja, T., Robbins, P.D., Aubry, M.C., Passos, J.F., Kirkland, J.L., Tschumperlin, D.J., Kita, H., LeBrasseur, N. K. (2017). Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nature Communications*, 8, 14532. [\[CrossRef\]](#)
15. Zhang, Y., Huang, S., Xie, B., Zhong, Y. (2024). Aging, cellular senescence, and glaucoma. *Aging and Disease*, 15(2), 546-564. [\[CrossRef\]](#)
16. Gilbert, L.A., Hemann, M.T. (2010). DNA damage-mediated induction of a chemoresistant niche. *Cell*, 143(3), 355-366. [\[CrossRef\]](#)
17. Gordon, R.R., Nelson, P.S. (2012). Cellular senescence and cancer chemotherapy resistance. *Drug Resistance Updates*, 15(1-2), 123-131. [\[CrossRef\]](#)
18. Myrianthopoulos, V., Evangelou, K., Vasileiou, P.V.S., Cooks, T., Vassilakopoulos, T.P., Pangalis, G.A., Kouloukoussa, M., Kittas, C., Georgakilas, A.G., Gorgoulis, V.G. (2019). Senescence and senotherapeutics: a new field in cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, 193, 31-49. [\[CrossRef\]](#)
19. Moiseeva, O., Deschênes-Simard, X., St-Germain, E., Igelmann, S., Huot, G., Cadar, A.E., Bourdeau, V., Pollak, M.N., Ferbeyre, G. (2013). Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF- κ B activation. *Aging Cell*, 12(3), 489-498. [\[CrossRef\]](#)
20. Liu, S., Uppal, H., Demaria, M., Desprez, P.Y., Campisi, J., Kapahi, P. (2015). Simvastatin suppresses breast cancer cell proliferation induced by senescent cells. *Scientific Reports*, 5, 17895. [\[CrossRef\]](#)
21. Laberge, R.M., Zhou, L., Sarantos, M.R., Rodier, F., Freund, A., de Keizer, P. L., Liu, S., Demaria, M., Cong, Y.S., Kapahi, P., Desprez, P.Y., Hughes, R.E., Campisi, J. (2012). Glucocorticoids suppress selected components of the senescence-associated secretory phenotype. *Aging Cell*, 11(4), 569-578. [\[CrossRef\]](#)
22. Laberge, R.M., Sun, Y., Orjalo, A.V., Patil, C.K., Freund, A., Zhou, L., Curran, S.C., Davalos, A.R., Wilson-Edell, K.A., Liu, S., Limbad, C., Demaria, M., Li, P., Hubbard, G.B., Ikeno, Y., Javors, M., Desprez, P.Y., Benz, C.C., Kapahi, P., Nelson, P.S., Campisi, J. (2015). MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nature Cell Biology*, 17(8), 1049-1061. [\[CrossRef\]](#)
23. Lim, H., Park, H., Kim, H.P. (2015). Effects of flavonoids on senescence-associated secretory phenotype formation from bleomycin-induced senescence in BJ fibroblasts. *Biochemical Pharmacology*, 96(4), 337-348. [\[CrossRef\]](#)
24. Özdemir, A., Şimay Demir, Y.D., Yeşilyurt, Z.E., 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. [\[CrossRef\]](#)
25. Şimay Demir, Y.D., Özdemir, A., Sucularlı, C., Benhür, E., 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. [\[CrossRef\]](#)
26. Yokota, K., Tanaka, Y., Harada, H., Kaida, T., Nakamoto, S., Soeno, T., Fujiyama, Y., Yokota, M., Kojo, K., Miura, H., Yamanashi, T., Sato, T., Nakamura, T., Watanabe, M., Yamashita, K. (2019). Wnt/PCP/ASCL2/c-Myc axis characteristics of colon cancer with differentiated histology at young onset and essential for cell viability. *Annals of Surgical Oncology*, 26(13), 4826-4834. [\[CrossRef\]](#)
27. Mondaca-Ruff, D., Araos, P., Yañez, C.E., Novoa, U.F., Mora, I.G., Ocaranza, M.P., Jalil, J.E. (2021). Hydrochlorothiazide reduces cardiac hypertrophy, fibrosis and rho-kinase activation in DOCA-salt induced hypertension. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 26(6), 724-735. [\[CrossRef\]](#)
28. Rodier F. (2013). Detection of the senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 965, 165-173. [\[CrossRef\]](#)
29. Partridge, L., Fuentealba, M., Kennedy, B.K. (2020). The quest to slow ageing through drug discovery. *Nature reviews. Drug discovery*, 19(8), 513-532. [\[CrossRef\]](#)
30. Rolt, A., Nair, A., Cox, L.S. (2019). Optimisation of a screening platform for determining IL-6 inflammatory signalling in the senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Biogerontology*, 20(3), 359-371. [\[CrossRef\]](#)
31. Şimay, Y.D., Özdemir, A., İbişoğlu, B., Ark, M. (2018). The connection between the cardiac glycoside-induced senescent cell morphology and Rho/Rho kinase pathway. *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)*, 75(11), 461-471. [\[CrossRef\]](#)
32. Aloud, B.M., Petkau, J.C., Yu, L., McCallum, J., Kirby, C., Netticadan, T., Blewett, H. (2020). Effects of cyanidin 3-O-glucoside and hydrochlorothiazide on T-cell phenotypes and function in spontaneously hypertensive rats. *Food & Function*, 11(10), 8560-8572. [\[CrossRef\]](#)

33. Mitini-Nkhoma, S.C., Fernando, N., Ishaka, G.K.D., Handunnetti, S.M., Pathirana, S.L. (2021). Ion transport modulators differentially modulate inflammatory responses in THP-1-derived macrophages. *Journal of Immunology Research*, 2021, 8832586. [\[CrossRef\]](#)
34. Romashkan, S., Chang, H., Hadley, E.C. (2021). National institute on aging workshop: Repurposing drugs or dietary supplements for their senolytic or senomorphic effects: Considerations for clinical trials. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 76(6), 1144-1152. [\[CrossRef\]](#)

erken görünüm