

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Esra TANYEL AKÇİT

DOKTORA TEZİ

2024-ANTALYA

FENİRAMİN HİDROJEN MALEAT'IN ANTİKANSER
ETKİLERİNİN İLAÇ YENİDEN KONUMLANDIRMA
KAPSAMINDA AKCİĞER KANSERİ MODELİ
ÜZERİNDEN *İN VİTRO* VE *İN SİLİKO*
DEĞERLENDİRİLMESİ

Esra TANYEL AKÇİT

DOKTORA TEZİ

2024-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

FENİRAMİN HİDROJEN MALEAT'IN ANTİKANSER
ETKİLERİNİN İLAÇ YENİDEN KONUMLANDIRMA
KAPSAMINDA AKCİĞER KANSERİ MODELİ
ÜZERİNDEN *İN VİTRO* VE *İN SİLİKO*
DEĞERLENDİRİLMESİ

Esra TANYEL AKÇİT

DOKTORA TEZİ

Doç. Dr. Ece ŞİMŞEK

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2023-6458 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2024-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoteknoloji Anabilim Dalı Doktora Programında tezi olarak kabul edilmiştir. .../...../.....

İmza

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Ece ŞİMŞEK
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Gamze TANRIÖVER
Akdeniz Üniversitesi

Üye :Doç. Dr. Nilüfer İMİR
Akdeniz Üniversitesi

Üye :Prof. Dr. Nevgün SEPİN ÖZEN
Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Tıp Fakültesi

Üye : Prof. Dr.Duygu YAŞAR ŞİRİN
Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Esra TANYEL AKÇİT

İmza

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Ece ŞİMŞEK

İmza

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın ortaya çıkmasında bana desteği, morali, emeği, sevgisi ile yön veren sevgili danışman hocam, canım hocam Doç. Dr. Ece ŞİMŞEK'e (Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü), doktora sürecimin ve tezimin her aşamasında yanımda olan Dr.Orhan KOÇAK'a (Antalya Belek Üniversitesi MYO), tezimin çalışmalarını tamamladığım Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Araştırma Laboratuvarı'nın kurulmasını sağlayan, tecrübesiyle her zaman yol gösteren ve desteğini hep hissettiğimiz Prof.Dr.Ahmet Yılmaz ÇOBAN'a (Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü), doktora başlamama vesile olan sevgili arkadaşım ve hocam Öğr.Gör.Dr.Kübra YILDIRIM'a (Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü) ve laboratuvar ekibine, birlikte aynı laboratuvar da çalışmayı çok sevdiğim, tüm çalışmalarım da yanımda olan Cemilenur ATAŞ'a (Akdeniz Üniversitesi Tıbbi Biyoteknoloji Doktora Programı), tezimin tamamlanmasında katkısı olan Aykut KURUOĞLU'na (Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir Uluslararası Biyotıp Ve Genom Enstitüsü) teşekkürlerimi sunuyorum. Ayrıca tez çalışmalarım boyunca bana güven veren ve yanımda olan sevgili aileme, canım kızım ve eşime ve hep desteğini arkamda hissettiğim canım anneme çok teşekkür ederim.

ÖZET

Amaç: Tezin amacı, yeni ilaçların geliştirilmesinde maliyet ve zamanı önemli ölçüde azaltan ilaç yeniden konumlandırma yöntemiyle belirlenmiş, halihazırda alerji tedavisinde sıklıkla kullanılmakta olan H1 reseptör antagonisti Feniramin Hidrojen Maleat'ın (FHM) anti-kanser potansiyelini *in siliko* ve *in vitro* deneylerle açığa çıkarmaktır.

Yöntem: FHM'nin tedavide kullanılan ilaçlar ile benzerlikleri DrugCentral 2023 web server ile analiz edilmiştir. Apoptoz dışsal yolağında bulunan FasL Reseptörü ile etkileşimi *in siliko* olarak ligand/protein moleküler docking yöntemiyle incelenmiştir (BIOVIA Discovery Studio Visualizer). FHM'nin sitotoksik etkileri İnsan akciğer kanseri hücre hattı A549 hücreleri üzerinde *in vitro* olarak araştırılmıştır.

Bulgular: Drug Central 2023 web serverda yer alan L1000 gen profil benzerlik analizine göre RMSD (Root Mean Square Deviation) değeri 1'in altında olan 213'ü antikanser etkili toplam 13106 ilacın FHM'ye benzer olduğu görülmüştür. Moleküler docking analizine göre feniramin, reseptör proteininin 3. aktif bölgesine bağlanarak üç boyutlu konformasyonunu değiştirebilme potansiyelinde olup dışsal kaynaklı apoptoz sinyalini başlatma potansiyelindedir. FHM'nin hücre canlılığı üzerindeki etkisi MTT yöntemi ile araştırılmıştır. İlacın koloni oluşumunu ve hücre göçünü engellediği görülmüştür. ELISA sonuçlarımıza göre 24. saatte 100 ve 50 µg/ml dozlarda kaspaz-7 miktarı artmış ancak bu artış western blot ile doğrulanamamıştır. 48. saatteki artış ise western blot sonuçlarımız ile uyumlu olarak A549 hücrelerini apoptozla öldürmektedir.

Sonuç: FHM, kanser tedavisinde kullanılan 213 ilaca yapısal olarak benzerdir. Moleküler doking analizine göre dışsal kaynaklı apoptoz sinyalini başlatabilme potansiyelindedir. A549 üzerine sitotoksik etkileri vardır ve hücre ölümünün içsel apoptoz kaynaklı olduğu kaspaz 7 enzimi üzerinden ELISA ve westen blot yöntemleri ile doğrulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Akciğer kanseri, Apoptoz, Feniramin Hidrojen Maleat, İlaç Yeniden Konumlandırma, Moleküler Docking

ABSTRACT

Objective: The aim of this thesis is to unveil the anti-cancer potential of Pheniramine Hydrogen Maleate (PHM), an H1 receptor antagonist commonly used in allergy treatment, through *in silico* and *in vitro* experiments. This approach utilizes drug repositioning, a method known to significantly reduce the costs and time required for the development of new drugs.

Methods: Similarities between PHM and other therapeutic drugs were analyzed using the DrugCentral 2023 web server. The interaction with the FasL receptor, which is involved in the extrinsic apoptotic pathway, was examined *in silico* through ligand/protein molecular docking (using BIOVIA Discovery Studio Visualizer). The cytotoxic effects of PHM were investigated *in vitro* using A549 human lung cancer cells.

Results: According to the L1000 gene profile similarity analysis on the DrugCentral 2023 web server, PHM showed similarities to a total of 13,106 drugs, with 213 of them being known for their anti-cancer effects, exhibiting a Root Mean Square Deviation (RMSD) value below 1. Molecular docking analysis indicated that PHM has the potential to bind to the third active site of the receptor protein, thereby altering its three-dimensional conformation and initiating extrinsic apoptotic signaling. The effects of PHM on cell viability were assessed using the MTT assay, revealing that it inhibits colony formation and cell migration. According to our ELISA results, caspase-7 levels increased at 100 and 50 µg/ml doses at the 24-hour mark, but this increase could not be confirmed by western blot analysis. However, at 48 hours, an increase in caspase-7 was consistent with western blot findings, indicating apoptosis-induced cell death in A549 cells.

Conclusion: PHM exhibits structural similarity to 213 drugs used in cancer treatment. Molecular docking analysis suggests that it has the potential to initiate extrinsic apoptotic signaling. It demonstrates cytotoxic effects on A549 cells, and apoptosis is confirmed to be mediated via caspase-7 through ELISA and western blot methods.

Key words: Lung cancer, Apoptosis, Pheniramine Hydrogen Maleate, Drug Repositioning, Molecular Docking



İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	
2.1. İlaç yeniden konumlandırma	4
2.2. İlaç yeniden konumlandırma süreci ve avantajları	5
2.3. Kanser ve ilaç yeniden konumlandırma	8
2.4. Akciğer Kanseri ve ilaç yeniden konumlandırma	11
2.5. Katyonik Amfifilik ilaçlar, ilaç yeniden konumlandırma ve KHDAK	17
2.6. Kanser ve antihistaminikler	19
2.7. Feniramin Hidrojen Maleat(FHM)	23
2.8. Feniramin Hidrojen Maleat ve İlaç Yeniden Konumlandırma	25
2.9. DrugCentral 2023	26
2.10. Moleküler Docking(Kenetlenme)	27
2.11. Apoptozis	31

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. IN SİLİCO YÖNTEMLER	35
3.1.1. İlaç yeniden konumlandırma kapsamında Drug Central2023.org web server analizleri	35
3.1.2. Fas Ligand Reseptör ve Feniramin maleat arasındaki etkileşimin moleküler docking yöntemi ile belirlenmesi	35
3.2. IN VITRO ÇALIŞMALAR	36
3.2.1. Hücre kültürü çalışmaları	36
3.2.2. Besiyerlerinin Hazırlanması	36
3.2.3. Feniramin Maleatın Hazırlanması	37
3.2.4. Hücrelerin Deneyler İçin Bölünmesi	37
3.2.5. İlacın Bölünen Hücrelere Uygulanması	38
3.2.6. MTT (Metiltiazol Difenil Tetrazolyum) Testi	38
3.2.7. Koloni oluşumu deneyi	39
3.2.8. Migrasyon deneyi	40
3.2.9. FHM'nin Kaspaz 7 Enzim Miktarı üzerine Etkisinin ELISA ve Western blot yöntemi ile belirlenmesi	40

4. BULGULAR	
4.1. İN SİLİKO ÇALIŞMALAR	48
4.1.1. İlaç yeniden konumlandırma kapsamında Drug Central2023.org web server analizleri	49
4.1.2. Fas Ligand Reseptör ve Feniramin maleat arasındaki etkileşimin moleküler docking yöntemi ile belirlenmesi	70
4.2. İN VİTRO ÇALIŞMALAR	74
4.2.1. Sitotoksisite sonuçları	74
4.2.2. Koloni oluşumu deneyleri	85
4.2.3. Migrasyon deneyi	87
4.2.4. Apoptozla ilişkili kaspaz-7 protein miktarının ELIZA ve Western Blot yöntemleri ile gösterilmesi	89
5. TARTIŞMA	94
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	98
KAYNAKLAR	99
ÖZGEÇMİŞ	107

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1.	En sık kullanılan H1, H2, H3 ve H4 antihistaminikler	20
Tablo 4.1.	DrugCentral web analiz sonuçlarına göre FHM'ye benzeyen ilaçların listesi	49
Tablo 4.2.	DrugCentral'a göre FHM'ye benzeyen kanser ilaçlarının listesi	69



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	İlaç Keşif Süreci	6
Şekil 2.2.	Hücre Ölüm Yolakları	10
Şekil 2.3.	Histamin Reseptörleri ve Kanser	22
Şekil 2.4.	Feniramin Hidrojen Maleatın Kimyasal Yapısı	24
Şekil 2.5.	DrugCentral Giriş Sayfası	26
Şekil 2.6.	Arama Algoritma Mekanizmalarının Sınıflandırılması	28
Şekil 2.7.	Puanlama Fonksiyon Mekanizmalarının Sınıflandırılması	29
Şekil 2.8.	İçsel (Mitokondriyal) Ve Dışsal (Ölüm Reseptörleri Yolağı) Apoptotik Yolaklar	32
Şekil 3.1.	Protein Konsantrasyonlarının Standart Grafiği	43
Şekil 4.1.	Feniramin Hidrojen Maleatın üç boyutlu yapısı PubChem ID: 4761	71
Şekil 4.2.	Fas Ligand Reseptörünün üç boyutlu yapısı PDB kod:1DDF	71
Şekil 4.3	Fas Ligand Reseptörü Ve Feniramin Hidrojen Maleat Arasındaki Etkileşimin görüntüsü	72
Şekil 4.4.	Fas Ligand Reseptörü Ve Feniramin Hidrojen Maleat Arasındaki Kimyasal Etkileşim	73
Şekil 4.5.	Fas Ligand Reseptörü Ve Feniramin Hidrojen Maleat Arasındaki Atom yüklerine Göre Etkileşim	73
Şekil 4.6	Set 1 24 Saat Sitotoksosite Sonuçları	74
Şekil 4.7.	Set 1 48 Saat Sitotoksosite Sonuçları	75

Şekil 4.8.	Set 1 72 Saat Sitotoksisite Sonuçları	75
Şekil 4.9.	Set 2 24 Saat Sitotoksisite Sonuçları	76
Şekil 4.10.	Set 2 48 Saat Sitotoksisite Sonuçları	77
Şekil 4.11.	Set 2 72 Saat Sitotoksisite Sonuçları	77
Şekil 4.12.	Set 3 24 Saat Sitotoksisite Sonuçları	78
Şekil 4.13.	Set 3 48 Saat Sitotoksisite Sonuçları	79
Şekil 4.14.	Set 3 72 Saat Sitotoksisite Sonuçları	79
Şekil 4.15.	Feniramin Hidrojen Maleat'ın IC ₅₀ Değeri	80
Şekil 4.16.	Set 1. Kombine Tedavinin 24. Saat Sitotoksisite Sonuçları	81
Şekil 4.17.	Set 1 Kombine Tedavinin 48. Saat Sitotoksisite Sonuçları	81
Şekil 4.18.	Set 1 Kombine Tedavinin 72. Saat Sitotoksisite Sonuçları	82
Şekil 4.19.	Set 2 Kombine Tedavinin 24. Saat Sitotoksisite Sonuçları	83
Şekil 4.20.	Set 2 Kombine Tedavinin 48. Saat Sitotoksisite Sonuçları	83
Şekil 4.21.	Set 2 Kombine Tedavinin 72. Saat Sitotoksisite Sonuçları	84
Şekil 4.22.	Feniramin Hidrojen Maleat Tek Başına ve 5-Fluorourasil (5-FU) ile Kombine Koloni Oluşum Sonuçlarının Görüntüsü	85
Şekil 4.23.	Feniramin Hidrojen Maleat Tek Başına Koloni Oluşum Sonuçları	86
Şekil 4.24.	Feniramin Hidrojen Maleat Ve 5-Fluorourasil (5-FU) ile Kombine Koloni Oluşum Sonuçları	86
Şekil 4.25.	Feniramin Hidrojen Maleat Tek Başına Migrasyon Sonuçları	87

Şekil 4.26.	Feniramin Hidrojen Maleat Ve <i>5-Fluorourasil</i> (5-FU) ile Kombine Tedavinin Hücrelerin Migrasyon Yetenekleri Üzerine Etkileri	88
Şekil 4.27.	Feniramin Hidrojen Maleat ELISA 24. Saat Sonuçları	89
Şekil 4.28.	Feniramin Hidrojen Maleat ELISA 48. Saat Sonuçları	89
Şekil 4.29.	Eliza 24 Saat FHM Ve <i>5-Fluorourasil</i> Kombine Tedavinin A549 Hücreleri Üzerine Etkisi	90
Şekil 4.30.	Eliza 48 Saat FHM Ve <i>5-Fluorourasil</i> Kombine Tedavinin A549 Hücreleri Üzerine Etkisi	90
Şekil 4.31.	Feniramin Hidrojen Maleat Kaspaz-7 24-48 Saat Artış Miktarları	91
Şekil 4.32.	Feniramin Hidrojen Maleat Kesilmiş Kaspaz-7 24-48 Saat Artış Miktarları	93
Şekil 4.33.	Feniramin hidrojen maleat tek başına ve 5-fluorourasil (5-FU) ile kombine A549 hücrelerinde iki farklı inkübasyon süreleri sonunda kaspaz-7 ve kesilmiş kaspaz-7 enzim miktarlarındaki değişimin bant görüntüsü	92

SİMGELER ve KISALTMALAR

ACEI	: Anjiyotensin I dönüştürücü enzim inhibitörleri
AMPK	: 5'-adenosine monophosphate (AMP)- ile aktive edilmiş protein kinaz
ARB	: Anjiyotensin II reseptör blokerleri
ATCC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
BAK	: BCL-2 antagonist katili
BAX	: BCL-2 antagonist katili
COX	: Siklooksijenaz
FHM	: Feniramin Hidrojen Maleat
GPCR	: G proteinine bağlı reseptörler
HRH1	: Histamin Reseptörü 1
HRH2	: Histamin Reseptörü 2
HRH3	: Histamin Reseptörü 3
HRH4	: Histamin Reseptörü 4
HMG-CoA	: β -hidroksi β -metilglutaril-CoA
IND	: İndometasin
KHDAK	: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
MAPK	: Mitojen aktif protein kinaz
MOMP	: Mitokondriyal dış zar geçirgenliği

MTT : [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid]

NSAID : Steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar

PPAR γ : Peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör γ

TKI : Tirozin Kinaz İnhibitörü

VEGF : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü



:



1. GİRİŞ

Histamin ve histamin reseptörleri (HRH1-HRH4), çeşitli alerjik hastalıkların gelişiminde çok önemli bir rol oynamaktadır (Thangam ve ark., 2018). Mast hücreleri, vücuttaki ana histamin üreticisi olan, çok işlevli, kemik iliğinden türetilen hücrelerdir. HRH1, mast hücreleri de dahil olmak üzere birçok hücrede eksprese edilir ve Tip 1 aşırı duyarlılık reaksiyonlarında rol oynar (Thangam ve ark., 2018; Park ve ark., 2023). Ayrıca HRH1'in birçok kanser hücre hattında ve kanser dokusunda yüksek oranda eksprese edilen ana histamin reseptörü olduğu saptanmıştır (Park ve ark., 2023). Akciğer, meme, endometriyal, kolorektal ve melanom cilt kanserlerinde, histamin üretiminden sorumlu bir enzim olan histidin dekarboksilaz ve histamin düzeylerinde artış görülmektedir (Garcia-Caballero ve ark., 1988). Histaminin etkilerini engelleyen ilaçlara antihistaminikler denir. Histamin tedavisinin, histamin konsantrasyonlarına ve histamin reseptörlerinin tiplerine bağlı olarak, kanser hücrelerinin çoğalması, hayatta kalması ve göçünde rol oynadığı öne sürülmektedir. Ancak literatürde sonuçları birbiriyle çelişkili çalışmalar vardır (Leurs ve ark., 2002; Cianchi ve ark., 2008; Thangam ve ark., 2018; Zhao ve ark., 2020).

Feniramin Hidrojen Maleat (FHM), H1 reseptörlerine bağlanan ve damar genişletici özelliklere sahip bir antihistaminiktir. Yan etkileri düşüktür, kolay ulaşılabilir ve ucuzdur (Venugopal ve ark., 2014; Kim ve ark., 2023; Knox ve ark., 2024). Bu nedenle en yaygın kullanılan sınıftır. Feniramin hidrojen maleat, klorfeniramin maleat ve bromfeniramin maleat kimyasal yapısındaki değişken grupta bulunan hidrojen, klor ve brom atomları dolayısıyla birbirinden ayrılan ve benzer özelliklere sahip üç antihistaminiktir (Jancinová ve ark., 1995; Medina ve ark., 1995; Gómez-Fabre ve ark., 1997; Kim ve ark., 2023; Rizvi ve ark., 2024).

Tez Çalışmamızın amacı ilaç yeniden konumlandırma kapsamında halihazırda alerji tedavisinde sıklıkla kullanılmakta olan H1 reseptör antagonisti olan FHM'nin anti-kanser potansiyelini *in siliko* ve *in vitro* deneylerle açığa çıkarmaktır. İlaç yeniden konumlandırma ile temelde yapılmak istenilen yan etkileri ve metabolik profilleri belli

olan ilaçların farklı hastalıkların tedavisinde kullanılabilme potansiyellerinin belirlenmesidir (Doumat ve ark., 2023).

Yeni ilaç keşiflerinin yüksek maliyeti, süreçlerin yavaş ilerlemesi ve yüksek hata oranları birçok araştırmacıyı ilaç yeniden konumlandırma olarak da bilinen ilacın farklı alanda yeniden kullanılmasına yönlendirmektedir (Pushpakom ve ark., 2019; Doumat ve ark., 2023). İlaç yeniden konumlandırmada amaç, ilacın ilk endikasyonunun farklı yeni bir tıbbi durumu tedavi etmek için kullanılmasıdır (Talevi ve ark., 2020).

Kanser açısından pek çok farklı ilaç, yeniden konumlandırma kapsamında yeniden değerlendirilmektedir. Literatür taramaları sonucunda anti alerjik bazı ilaçların anti-kanser potansiyellerinin olduğu çalışmalar tespit edilmiştir (Doumat ve ark., 2023). Klorfeniramin maleat insan meme kanseri, kolon kanseri ve göğüs kanseri hücre hatlarında çalışılmış ve sitotoksik etkileri gösterilmiştir (Medina ve ark., 1995; Gómez-Fabre ve ark., 1997). Ayrıca klorfeniramin maleat yeniden ilaç konumlandırma kapsamında Parkinson hastalığı tedavisinde kullanılmak üzere araştırılmış, iyi bilinen antikolinergik özelliklerine dayanarak, bu antihistaminin kullanımının, özellikle titreme en belirgin semptom olduğunda, erken evrelerinde bile faydalı olabileceği sonucuna varılmıştır (Karamanakos ve ark., 2008). Ancak bugüne kadar FHM için yeniden ilaç konumlandırma kapsamında herhangi bir çalışma yapılmadığı gibi akciğer ve diğer kanserler üzerine etkisi de araştırılmamıştır.

Akciğer kanseri, en sık görülen ikinci kanser türüdür ve kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerindendir (Siegel ve ark., 2022). Akciğer kanseri vakalarının çoğunluğu (%80) küçük hücreli dışı akciğer karsinomu (KHDAK) alt tipine aittir. Tedaviye yönelik çabalara rağmen, metastatik KHDAK'nin ortalama beş yıllık sağ kalımı yaklaşık %3 gibi düşük bir seviyede kalmaktadır. KHDAK için yaygın tedavi yaklaşımları arasında cerrahi müdahale, multimodal kemoterapi ve eş zamanlı radyo- ve kemoterapi yer alır. KHDAK, heterojenliği ve kanser kök hücrelerinin plastisitesi nedeniyle tedaviye yüksek oranda direnç gösterir (Jones ve ark., 2018; Siegel ve ark., 2022; Doumat ve ark., 2023).

Bu nedenle çalışmamızda FHM'nin, KHDAK'ı tedavisinde kullanılabilme potansiyelini ilaç yeniden konumlandırma kapsamında test edebilmek için öncelikle, DrugCentral 2023

web serverda yer alan L1000 gen profil benzerlik analizi yapılmış ve mevcut kemoterapötiklere benzerlik oranları RMSD değerleri kullanılarak saptanmıştır. DrugCentral.org, isme, kimyasal yapıya veya hedefe göre tarama yapılabilen 20.000'den fazla ilacı içeren bir veritabanını kullanmaktadır. (Ursu ve ark., 2017; Halip ve ark., 2023). Server analiz sonuçlarına göre, veritabanındaki ilaçlar arasında FHM'ye benzer 13216 bulunmuş ve tablo olarak sonuçlar kısmında sunulmuştur. Daha sonra bu listeden ikinci bir tarama yapılarak ilaçların endikasyonları tek tek incelenmiş, 13216 ilacın 213'nün anti-kanser ilaçlar olduğu belirlenmiştir.

İn siliko çalışmamızın diğer aşamasında ilacın, apoptoz dışsal yolağında yer alan ölüm reseptörlerinden FasL Reseptörü ile etkileşimi moleküler docking yöntemi ile araştırılmıştır. FHM'nin, FasL reseptör proteinine bağlanma potansiyelinde olduğu gösterilmiştir. Bu bağlanma, proteinin üç boyutlu konformasyonunu değiştirerek hücre içinde dışsal kaynaklı apoptoz sinyalini başlatabilme potansiyeline yönelik önemli bir veri sağlamaktadır.

Tez Çalışmamızın ikinci aşaması *in vitro* olarak gerçekleştirilmiştir. Öncelikle FHM'nin A549 akciğer kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid] yöntemi ile belirlenmiştir. Ayrıca, FHM'nin koloni formasyon ve hücre göçü üzerine etkileri de araştırılmıştır. Sitotoksisite deneylerinde gözlenen hücre ölümünün apoptoz kaynaklı olup olmadığının belirlenmesi içinde, apoptozun içsel yolağında yer alan kaspaz-7 enzim miktarı Elisa ve Western blot yöntemleri ile değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 İlaç Yeniden Konumlandırma

Yeni bir ilacın keşfi, büyük miktarlarda para ve zamana mal olan zor bir süreçtir. Süreç içerisinde çok sayıda aday ilaç, yan etkileri nedeniyle başarıya ulaşamaz ve ilaç pazarında yeralamaz. Bu sorunu çözmek için araştırmacılar aday ilacın toksisitesini önceden tahmin etmeye yönelik birçok yaklaşım ortaya koymuşlardır (Zhou ve ark., 2015). Zaman ve maddi tasarruf sağlayacak bu yaklaşımda, aday ilacın insanlara zararlı olduğunun öngörülmesi durumunda, klinik denemelere geçilmeden önce ilaç geliştirme sürecinden çıkarılabilecektir.. Bununla birlikte, ilaç toksisitesi tahmini ile ilgili hala çözülmemiş birçok sorun bulunmaktadır. Pek çok bilim insanı halihazırda piyasaya sürülen ilaçların genel olarak güvenli olmasında/veya etkilerinin biliniyor olması nedeniyle mevcut ilaçların yeni endikasyonlara göre yeniden tasarlanmasını önermektedir (Cavalla, 2013; Zhou ve ark., 2015). İlacın yeniden kullanılması amacına yönelik önerilen bu yöntemler arasında özellikle ilaçlar arasındaki ilişkileri kurmak için ilaç benzerliğini kullanmak oldukça ilgi çekmektedir (Kuhn ve ark., 2008). İki ilaç arasındaki benzerliğin bulunmasına yönelik bu tür çalışmalarda temel varsayım, iki ilacın bir şekilde yeterince benzer olması durumunda, muhtemelen aynı hedefleri ve fizyolojik etkileri paylaşacakları ve dolayısıyla aynı hastalıkları tedavi etme potansiyeline sahip olacakları yönündedir. İki ilaç arasındaki ilaç benzerliği birçok açıdan ve birçok ölçümle değerlendirilebilir (Kuhn ve ark., 2008; Keiser ve ark., 2009).

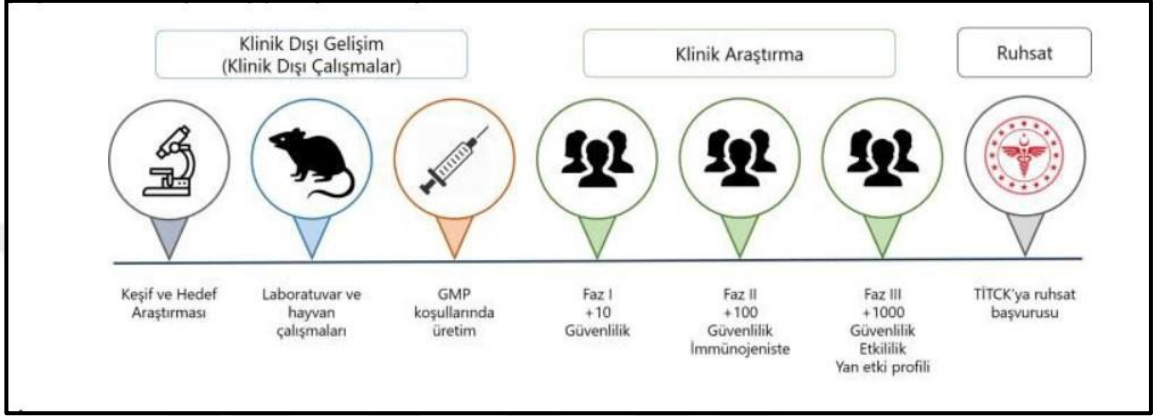
Deneyssel ve hesaplamalı olmak üzere iki genel ilaç yeniden konumlandırma yaklaşımı vardır: Duloksetin, sildenafil ve talidomid, klinik başarıya ulaşmış ilk ilaç yeniden konumlandırma deneyssel örneklerinden bazılarıdır (Schulz, 2001; Cuvitoglu ve ark., 2023). Bir ilacın yeniden konumlandırılması konusunda deneyssel yaklaşımlar çok başarılı olabilir. Bir ilaç için deney yapıldıktan sonra yeniden konumlandırılıp konumlandırılmayacağı sonucu kesindir, ancak FDA onaylı ilaç sayısının çokluğu ve olası hastalık durumları, tüm ilaç-hastalık kombinasyonlarının deneyssel yöntemlerle test edilmesini imkansız hale getirmektedir. Bu aşamada hesaplamalı yöntemler potansiyeli en yüksek ilaç-hastalık ikililerini bize sunabilir. Hesaplamalı yöntemlerdeki son son dönem gelişmelerle birlikte pek çok yöntem geliştirilmiştir ve geliştirilmeye devam

edilmektedir. Bu yöntemler; veri madenciliği tabanlı, makine öğrenmesi tabanlı, ağ tabanlı vb. şeklinde temelde kullanılan metoda göre sınıflandırılabilir. COVID-19 pandemisi sırasında farklı yöntemlere dayalı hesaplamalı ilaç yeniden konumlandırma çalışmaları başarıyla kullanılmıştır (Yang ve ark., 2022). Örneğin; fenoksibenzamin, sulkonazon (topikal antifungal) ve vinburnin (damar genişletici), hesaplamalı yöntemlerle tanımlanan başarılı çalışmalardan bazılarıdır (Chang M. ve ark., 2010; Cuvitoglu ve ark., 2023).

2.2. . İlaç yeniden konumlandırma (drug repurposing) süreci ve avantajları

İlacın yeniden kullanılması (aynı zamanda ilacın yeniden konumlandırılması, yeniden profillenmesi veya yeniden görevlendirilmesi olarak da adlandırılır), orijinal tıbbi endikasyon kapsamı dışında kalan onaylanmış veya araştırma aşamasındaki ilaçlar için yeni kullanımların belirlenmesine yönelik bir stratejiye sahiptir . Bu strateji, belirli bir endikasyon için tamamen yeni bir ilacın geliştirilmesine göre bir takım avantajlar sağlar. Bu avantajlardan birincisi ve belki de en önemlisi, ilaç yeniden konumlandırma yönteminin önerdiği ilacın klinik uygulamada başarısızlık riski yeni ilaç geliştirme yöntemine oranla daha düşüktür. Yeniden konumlama çalışması ile kullanılma potansiyeli değerlendirilen ilacın klinik öncesi modellerde ve insanlarda zaten yeterince güvenli olduğu bulunmuş olduğundan, erken aşama denemeleri tamamlanırsa, sonraki etkinlik denemelerinde en azından güvenlik açısından başarısız olma olasılığı daha düşük olacaktır. İkinci önemli avantajı, klinik öncesi testlerin, güvenlik değerlendirmesinin ve bazı durumlarda formülasyon oluşturma'nın çoğu zaten tamamlanmış olacağından ilaç geliştirme için gereken zaman kısaltılabilir. Üçüncü avantaj ise ilaç yeniden konumlandırma içindaha az yatırıma ihtiyaç duyulur ancak bu durum ilaç adayının gelişim aşamasına ve sürecine bağlı olarak değişiklik gösterebilir (Breckenridge ve ark., 2019; Pushpakom ve ark., 2019). Faz III ve sonrasında gerçekleştirilecek süreçlerin maliyetleri, aynı endikasyonun tedavisi için geliştirilecek yeni bir ilaç keşfinde olduğu gibi benzer olabilir ama klinik öncesi ve faz I ve II maliyetlerinde önemli tasarruflar sağlama potansiyeli oldukça yüksektir (Şekil 2.1). Bu avantajların hepsi birlikte değerlendirildiğinde, ilaç yeniden konumlandırma yöntemi ile uygun ilaçların geliştirilmesinde yatırım daha az riskli ve daha hızlı geri dönüşünü sağlama potansiyeline

sahiptir; başarısızlıklar hesaba katılsa da maliyetlerin daha düşük olacağı öngörülebilir sonuçlanır (aslında, yeniden kullanıma uygun bir ilacı pazara sunmanın maliyetleri daha düşüktür). Sonuç olarak, ilaç yeniden konumlandırma ile etkinlik potansiyeli yüksek olan ilaçlar, alternatif tedavi seçenekleri açığa çıkarabilir (Breckenridge ve ark., 2019).



Şekil 2.1 İlaç Keşif Süreci (Hazal, 2022)

İlaç yeniden konumlandırma süreci mevcut ilaçların yeni terapötik kullanım alanlarını keşfetmek amacıyla gerçekleştirilen çeşitli aşamaları içermektedir. Şekil 2.3. bu sürecin, geleneksel ilaç geliştirme yöntemlerine kıyasla daha düşük maliyetli, daha kısa süreli ve daha az riskli bir yatırım sunduğu açıktır (Breckenridge ve ark., 2019; Hobbs ve ark., 2019).

Geleneksel olarak ilaç geliştirme üç aşamada gerçekleşir: keşif, klinik öncesi denemeler ve klinik denemeler (Hobbs ve ark., 2019). İlk adım genellikle ilaç hedefinin tanımlanmasını, doğrulanmasını ve optimizasyonunu içerir. Klinik öncesi deneme hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmaları kapsar ve ilacın etkinliği, toksisitesi, farmakokinetiği ve farmakodinamik özellikleri hakkında bilgi sağlar. Son olarak, klinik deneme aşamasında ilaç, bireyleri nasıl etkilediğini görmek için bireyler üzerinde bir dizi teste tabi tutulur (Sleire ve ark., 2017). Yeni ilacın piyasaya sürülmesi yaklaşık 10-15 yıl sürdüğünden geleneksel ilaç geliştirme süreci zaman alıcıdır (Parvathaneni ve ark., 2019). Yüksek maliyetleri ve araştırılan farmasötiklerin yalnızca %25'inden azının pazara sunulduğu göz önüne alındığında, geleneksel yöntem mali açıdan sorunludur. Bu nedenle, daha hızlı bir şekilde ilaç onay alma sürecine ulaştıracak alternatifler arasında olan ilaç

yeniden konumlandırma büyük ilgi görmektedir ve kullanıma sunulma aşamaları her ilaca göre farklılık gösterse de yeni ilaç geliştirme çalışmalarına göre çok daha az zaman almaktadır (Sleire ve ark., 2017; Parvathaneni ve ark., 2019).

Yeniden konumlandırma kapsamında değerlendirilecek ilaçlar çeşitli sınıflara ayrılır; Birincisi, toksisite veya yan etkiler nedeniyle artık kullanılmayan ancak daha düşük dozlarda veya farklı bir popülasyonda kullanıldığında toksik olmayan ilaçlardır (Nowak-Sliwinska ve ark., 2019). Bu sınıftan mükemmel bir örnek, sabah bulantısı için kullanıldığında hamile kadınlarda teratojenik etkiye neden olması nedeni ile piyasadan toplatılan ve kullanımı yasaklanan ancak daha sonra sahip olduğu antianjiyogenik etkisi nedeni ile dirençli multipl miyelomun tedavisinde güvenli ve etkili olduğu bulunan talidomiddir. İkinci ilaç sınıfı, aslında anti-anjinal ilaç olarak geliştirilen ancak günümüzde erektil disfonksiyonu tedavi etmek için kullanılan sildenafil gibi, hedef dışı yan etkilerinin birincil istenen sonuç haline geldiği ilaçlardır. Diğer bir sınıf ise, birden fazla etiyolojinin tedavisinde etkili olan ancak yalnızca birini tedavi etmek için kullanılan ilaçları kapsar. Tirozin kinaz inhibitörleri (TKI) bu tür ilaçlara iyi bir örnektir. Güçlü bir seçiciliğe sahip olacak şekilde geliştirilmiş olmalarına rağmen, birçoğunun diğer kinazlar üzerinde ve hedef ailelerinin ötesinde ek etkileri vardır. Son ilaç sınıfı ise sinerjik etki olarak bilinen geleneksel ilaç rejimiyle birleştirildiğinde daha iyi etkiler sergileyen ilaçları içermektedir (Nowak-Sliwinska ve ark., 2019; Doumat ve ark., 2023).

İlaç yeniden konumlandırma ile potansiyeli açığa çıkarılan ilaçlar, iyi belgelenmiş toksisite, farmakoloji ve ilaç-ilac etkileşimi parametrelerine sahiptir. Dahası, bir endikasyonda başarısız olan ilaçların yeniden konumlanması, potansiyel bir ilaç adayını hedefine ulaştırabilir (Nowak-Sliwinska ve ark., 2019). Ancak, ilaçları yeniden kullanmanın bazı dezavantajları da olabilir. Örneğin piyasada mevcut ve kullanılan bir ilacı yeni bir kullanıma yönlendirmek yine de yüksek riskli bir yatırımdır çünkü yeni tedavi yönü planlandığı kadar başarılı olmayabilir. Ek olarak, yeniden konumlandırılan bazı ilaçlar, yeni popülasyonda güvenliklerinin tekrar sağlanması için zaman ve maliyet açısından yeni ilaçlarla benzer süreçlerden geçebilir (Pushpakom ve ark., 2019; Doumat ve ark., 2023).

2.3. Kanser ve ilaç yeniden konumlandırma

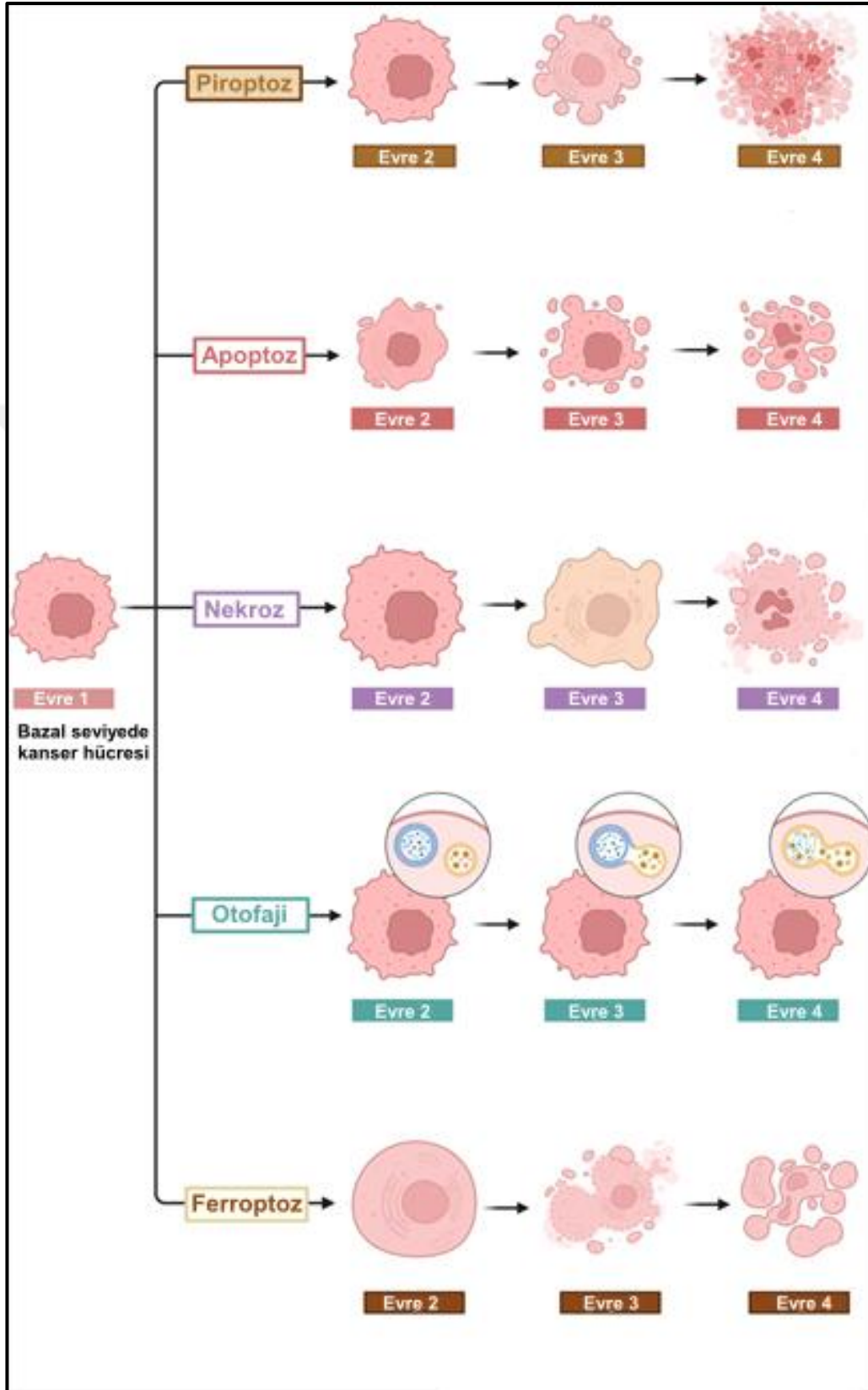
Kanser, görülme sıklığı ve ölüm oranı giderek artan ciddi bir küresel sağlık tehdididir. Kanser risk faktörleri; sıklıkve dağılımları, yaşlanma, çevre kirliliği ve tütün tüketimi de dahil olmak üzere çok sayıda parametreye bağlıdır, çok yönlüdür ve sosyoekonomik gelişim durumuyla da yakından bağlantılıdır (Sleire ve ark., 2017; Turabi ve ark., 2022)

Kanser tedavisinde en sık kullanılan yöntemler; cerrahi müdahale, kemoterapi, radyoterapi, hedefe yönelik tedavi ve immünoterapidir. Tüm solid kanserlerin birincil tedavi seçeneği cerrahi müdahaledir. Cerrahi müdahale sıklıkla, primer tümörün yeri, derecesi ve metastaz durumuna bağlı olarak Kemoterapi ve/veya Radyoterapi ile kombine edilir. Tümör hücrelerini yok etmek için radyasyon terapisinde X ışınları, gama radyasyonu ve yüklü parçacıklar gibi yüksek frekanslı radyasyon uygulanır. Cerrahi ve radyasyon tedavisinin ana dezavantajı, yalnızca belirli bir bölgeyle sınırlı olan tümörü tedavi edebilmeleridir. Teknoloji ve bilimin ilerlemesiyle birlikte kemoterapi ve hedefe yönelik tedavi, vücutta uzak bölgelere göç eden metastatik tümör hücrelerini öldürmek için de kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda ortaya çıkan ilaca direnç ve ilacın yüksek toksik yan etkiler nedeniyle kanser tedavisinde önemli zorluklarla karşı karşıya kalmıştır (Barzaman ve ark., 2020).

Kanser tedavisi için birçok ilaç mevcut olmasına rağmen, kanser hücreleri bu ilaçlara karşı direnç geliştirmektedir, bu da tedavinin başarısız olmasına ve kanserin tekrarlamasına neden olmaktadır (Mansoori ve ark., 2017). Kemoterapi amaçlı kullanılan ilaçların ilaç direncinin yanı sıra hastalarda birçok olumsuz yan etkisi de bulunmaktadır. Kanser insidansı arttıkça, güvenlik profili iyileştirilmiş yeni ilaçların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bununla birlikte, diğer hastalıkların tedavisi için geliştirilen ilaçlarla karşılaştırıldığında, klinik deneylerde başarılı olan ilaçların sayısı nispeten daha az olduğundan, yeni antikanser etkili ilaçların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır(Pantziarka ve ark., 2014). Yeni ilaçlar için denemeler, güvenlik değerlendirmesi, müteakip inceleme ve onay için harcanan zaman çok fazladır ve küresel kanser yönetiminin zayıflığını daha da artırmaktadır. Bu nedenle kanser tedavileri için daha hızlı bir ilaç onay sürecine yönelik bir alternatife ihtiyaç olduğu açıktır.

Tarihsel olarak, onkolojide ilaç yeniden konumlandırma büyük ölçüde hastalığa neden olan moleküler mekanizmaların anlaşılmasını takiben veya tesadüfen ortaya çıkmıştır (Moffat ve ark., 2014; Rabben ve ark., 2021). Onkoloji tedavisinde kullanılmayan ancak ilaç yeniden konumlandırma kapsamında değerlendirilen aday ilaçlar, proliferatif sinyalleri sürdürme, büyüme baskılayıcılardan kaçınma, hücre ölümüne direnme, replikatif ölümsüzlüğü sağlama, anjiyogenezi başlatma, istila ve metastazı aktive etme, tümör destekleyici inflamasyonu azaltma, enerji metabolizmasını yeniden programlama, bağışıklık yanıtlarından kaçınma, fenotipik esnekliği açığa çıkarma ve mutasyona uğramamış epigenetik düzenleme gibi farklı kanser belirtilerini hedefleyerek kansere karşı büyük bir umut olmuştur (Xia ve ark., 2024).

Hücre ölümü, biyolojik sistemlerde yalnızca doğru fizyolojik gelişimin ve doku homeostazının sürdürülmesi için değil, aynı zamanda tümör oluşumuna karşı doğal bir savunma mekanizması olarak da görev yapan kritik bir süreçtir. Günümüzde hücre ölümü; programlı olmayan hücre ölümü ve programlanmış hücre ölümü olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. Genellikle kontrolsüz bir süreç olan programlanmamış hücre ölümünün aksine, programlanmış hücre ölümü daha organize ve stabil bir iç ortamı korumaya yardımcı olan genetik olarak kodlanmış moleküler mekanizmaları içerir (Zeng ve ark., 2022). Programlanmış hücre ölümü Apoptoz, Otofaji, Ferroptosis gibi farklı kategorilere ayrılır (Peng ve ark., 2022). Hücresel düzenlemede temel bir rol oynayan ve tümör oluşumuna karşı bir bariyer görevi görebilen programlı hücre ölüm yollarının hedeflenmesi, ilaçların yeniden konumlandırılması kapsamında tümörlerin gelişimini ve ilerlemesini engellemek için umut verici bir strateji olabilir. Araştırmalar, tümör büyümesini kısıtlamak için ilaç yeniden konumlandırma yönteminin önemini göstermektedir. Bu kapsamda ilaç yeniden konumlandırma ile seçilen ilaçların apoptoz, nekroptoz, piroptoz, otofaji, ferroptoz ve kuproptoz da dahil olmak üzere çeşitli hücre ölüm yollarını aktive ettiği gösterilmiştir (Şekil 2.2) (Xia ve ark., 2024).



Şekil 2.2 Hücre Ölüm Yolakları (Xia ve ark., 2024)

2.4. Akciğer Kanseri ve yeniden ilaç konumlandırma

Akciğer kanseri, tüm kanserler arasında ikinci en yüksek insidans oranına sahip olup, kadınlarda meme kanseri ve erkeklerde prostat kanserinden sonra ölüme neden olan hastalıklar arasında ikinci sırada yer almaktadır . Sigara içmek, akciğer kanserinden kaynaklanan ölümlerin %81'ine doğrudan neden olduğundan, akciğer kanserinin primer nedeni olarak kabul edilmektedir (Doumat ve ark., 2023).

Akciğer kanseri genel olarak küçük hücreli akciğer karsinomu (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer karsinomu (KHDAK) olarak sınıflandırılır.KHAK tüm akciğer vakaların %80'ini oluşturur. KHDAK akciğer adenokarsinomunda en sık görülen alt tiptir ve bu vakaların %60'ını oluşturur. Diğer KHDAK'ler arasında skuamöz hücreli, büyük hücreli, adenoskuamöz, pleomorfik, iç hücreli ve dev hücreli karsinomlar yer alır (Zheng, 2016).

Tümör büyümesini ve ilerlemesini yönlendiren tümör hücrelerinin altında yatan alt popülasyonlar olan kanser kök hücreleri (CSC'ler), KHDAK 'nin heterojen bir tümör olmasına neden olur (Sosa Iglesias ve ark., 2018). Kanser kök hücreleri, tedavi direncinden ve nüksetmeden sorumlu olduğuna inanılan, tümör kitlesi içinde yer alan hücrelerin bir alt popülasyonudur (Bahmad ve ark., 2020; Bahmad ve ark., 2021; Doumat ve ark., 2023). Bu heterojenlik, KHDAK'de ilaç direncini tetikleyerek terapötik başarısızlığa yol açar (Sosa Iglesias ve ark., 2018) KHDAK'deki CSC'lerin plastisitesi, onların farklı hücre tiplerine dönüşmelerine olanak tanır (Liu W. J. ve ark., 2020). CSC'ler, çoklu ilaç ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcılarını serbest bırakarak çoklu kemoterapi ajanlarına karşı direncin artırılmasında önemli bir rol oynar (Ho ve ark., 2007).

KHDAK tedavisinde, her ne kadar ilerleme kaydedilse de, tedaviye direnç, tümörün plastisitesi ve heterojenliği tedavinin zorlaşmasına neden olmaktadır. Bu nedenle, KHDAK'yi tedavi etmek için yeni ajanlar keşfetmeye ek olarak, agresif hastalıkla mücadelede yardımcı olmak için mevcut ilaçların ilaç yeniden konumlandırma kapsamında değerlendirilmesi üzerinde daha çok çalışılmaktadır. Bunlardan bazıları aşağıda başlıklar halinde sunulmuştur.

Anti-Hipertansifler ve Anti-Aritmik İlaçlar

Beta-blokerler, kardiyovasküler hastalıklar, hipertiroidizm, migren ve glokomun tedavisinde yararlı olduğu bilinen bir ilaç sınıfıdır. İlaç yeniden konumlandırma çalışmalarının popülaritesinin artmasıyla birlikte, beta adreno-blokerlerin antikanser etkilerini araştıran çalışmaların sayısı da hızla artmıştır ancak etki mekanizması hala bilinmemektedir. Beta blokerlerin KHDAK'nin canlılığı ve hücre kolonisi oluşumu üzerindeki etkileri Sidorova ve arkadaşları tarafından araştırılmıştır. Bu çalışmada, propranolol ve betaksolol'ün akciğer kanseri hücrelerinin koloni oluşumunu %90 oranında inhibe ettikleri gösterilmiştir (Sidorova ve ark., 2022). Aynı çalışmada, beta blokerlerin KHDAK hücre apoptozu üzerindeki etkileri *in vitro* olarak araştırılmış ancak seçici ve seçici olmayan beta blokerler arasında apoptoz açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır. Oh ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir diğer çalışmada; immün kontrol noktası inhibitörleri ve beta-blokerlerle tedavi edilen hastaların sağkalım oranlarının arttığını göstermişlerdir (Oh ve ark., 2021). Bununla birlikte, akciğer kanserinde tek başına beta-bloker kullanımı ile genel sağkalımın iyileşmesi arasında bir ilişki bulunamamıştır (Lei ve ark., 2021). (Sidorova ve ark., 2022)

Yaşamı uzatıcı etkileri olduğu bilinen anjiyotensin I dönüştürücü enzim inhibitörleri (ACEI'ler) ve anjiyotensin II reseptör blokerleri (ARB'ler), hipertansiyon ve kalp yetmezliği de dahil olmak üzere çok sayıda hastalığın tedavisinde sıklıkla kullanılan ilaçlardır (El Zarif ve ark., 2022). Renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi, bu güne kadar kanserin birçok özelliğiyle ilişkilendirilmiştir; bu durum, ARB'lerin ve ACEI'lerin KHDAK'yi tedavi etmek için ilaç yeniden konumlandırma kapsamında değerlendirilme potansiyelinin yüksek olduğunu göstermektedir. Anjiyotensin II /anjiyotensin II reseptör 1 arasındaki etkileşim, vasküler düz kas hücrelerini, tümör anjiyogenezine yardımcı olan VEGF'yi üretmeleri için uyarır (Egami ve ark., 2003). Örneğin, Telmisartan, klinik olarak hipertansiyon tedavisi için endike olan bir ARB'dir ve ayrıca tümör metastazlarını durduran anti-kanser etkilerine sahip olduğu kanıtlanmıştır (Oh ve ark., 2021).

NSAID'ler, Antiinflamatuvar İlaçlar

Steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar (NSAID'ler), siklooksijenaz (COX) enzimlerini inhibe ederek antiinflamatuvar, analjezik ve antipiretik özellik gösterirler (Bacchi ve ark., 2012). COX-2, invaziv tümör büyümesi ve metastaz için gerekli olan artan hücre proliferasyonu ve azalmış apoptoz ile ilişkilidir. Bu nedenle kanser tedavisi açısından COX-2 inhibisyonu önemli bir hedeftir (Sarvepalli ve ark., 2022). İnsan akciğer adenokarsinomu lezyonlarında COX-2 proteinlerinin aşırı ekspresyonu kötü prognoza işaret etmektedir ve bu anlamda ilaç yeniden konumlandırma çalışmalarında değerlendirilmesi gerekmektedir (Baigent ve ark., 2005). Örneğin bir çalışmada osteoartrit ve romatoid artrit ağrısı için anti-analjezik olarak yaygın şekilde kullanılan COX-2'nin spesifik inhibitörü Selekoksib, anti-kanser etkileri açısından araştırılmıştır. Selekoksibin anti-kanser etkilerinin, NF-kB, kaspaz-9, BAX ve BCL-xL'nin aşağı regülasyonu ile ilişkili çeşitli içsel ve dışsal yollar yoluyla gerçekleştiği gösterilmiştir (Liu R. ve ark., 2015).

Literatürdeki bir diğer çalışmada, Sarvepalli ve ark. Indometasin (IND)'in antikanser etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada IND'nin lipozomal bir formülasyonu da kullanılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre, IND ile tedavi edilen tüm gruplarda COX-2'nin anlamlı inhibisyonu ve kaspazın indüksiyonu gözlenmiştir. Sarvepalli ve ark. KHDAK'nin tedavisinde lipozomların serbest IND'ye kıyasla daha etkili olduğu sonucuna varmışlardır (Sarvepalli ve ark., 2022). Ancak bu tedaviyi doğrulamak için ek klinik çalışmalara ve *in vivo* deneylere ihtiyaç vardır.

Anti-Hiperlipidemik İlaçlar

Statinler kandaki yüksek kolesterol seviyelerini tedavi etmek için tercih edilen ilaçlardır (Baigent ve ark., 2005). Bir çok çalışmada, statinlerin anti-neoplastik etkileri gösterilmiştir (Bahmad ve ark., 2022). Bu noktadan hareketle, ilaç yeniden konumlandırma kapsamında statinlerin kanser tedavisinde endikasyon dışı ilaç olarak kullanılmasına da odaklanmıştır (Nielsen ve ark., 2012). Statinler, kolesterol sentezi için gerekli bir enzim olan β -hidroksi β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA) redüktazı inhibe ederek, proliferasyon, apoptoz ve farklılaşma gibi birçok büyüme düzenleyici süreç için

gerekli olan mevalonat türevlerinin üretimini azaltır (Hammoud ve ark., 2020; Doumat ve ark., 2023). Atorvastatin, Akt/mTOR'u inhibe eden ve MAPK yolunu aktive ederek antitümör etki gösteren bir statindir. Atorvastatin, hücre büyümesini uyaran proteinler Ras, Rac ve Rho'nun işlevi için gerekli olan izoprenoid kaynaklı büyüme proteinlerini parçalayarak tümör hücrelerinin apoptozunu indükler. Ek olarak atorvastatin, aşırı demir yükü ve lipid reaktif oksijen türlerinin birikmesiyle ilişkili programlanmış hücre ölüm yollarındanotofajiyi ve ferroptozu uyarak, anti-tümör etki gösterir (Kang M. ve ark., 2014b; Doumat ve ark., 2023). Hosseinimehr ve ark. Atorvastatinin akciğer kanseri hücreleri üzerindeki etkilerini araştırdığı çalışmalarında önce dört saat boyunca 10 µM konsantrasyonda ilaçla muamele edilmiş ve ardından radyasyona maruz bırakılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre, A-549 hücrelerinde görülen apoptotik hücrelerin oranı tek başına radyoterapi alan gruba oranladaha yüksek bulunmuştur. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan bu fark, KHDAK'ın ROS üretimindeki rolü ile ilişkilendirilmiştir(Hosseinimehr ve ark., 2020).

Lovastatin, hipolipidemik etki gösteren statin grubu ilaçlardan birisidir. Lovastatin ayrıca hücre proliferasyonunu inhibe ederek ve kanser sinyal yollarını düzenleyerek apoptozu indükler. KHDAK'de lovastatinin antikanser etkinliğiWalther ve ark.tarafından araştırılmıştır. Çalışmada lovastatinin COX2 ekspresyonunu arttırdığı ve akciğer kanseri hücrelerinin sitotoksitesini indükleyen PPAR-γ 'yi aktive ettiği gösterilmiştir (Walther ve ark., 2016).

Simvastatin, KHDAK tedavisinde yeniden konumlandırma kapsamında değerlendirilen bir başka anti-hiperlipidemik ilaçtır. Yapılan bir faz II çalışmasında, KHDAK tedavisinde tek başına gefitinib yerine gefitinib'in simvastatin ile kombine kullanımının daha yüksek yanıt oranı ve uzun süreli sağkalım ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Han ve ark., 2011).

Buna benzer birçok araştırmada statinlerin akciğer kanserinin tedavi sonuçlarını iyileştirme rolü olduğu gösterilmiş olsa da, statinlerin KHDAK tedavisinde etkinliğinin ve etki mekanizmalarının netleştirilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır..

Anti-Diyabetik İlaçlar

Biguanidler ve tiazolidinedionlar diyabet tedavisinde kullanılan ilaçlardır. Biguanid grubu ilaçlardan metformin doğrudan ve dolaylı mekanizmalarla antidiyabetik etki gösteren bir ilaçtır. Metformin, mitokondriyal ETC/OxPhos'u ve buna bağlı olarak da AMPK'nin aktivasyonunu inhibe ederek doğrudan etki eder. Ayrıca, hepatik glukoneogenezi inhibe ederek sistemik insülin seviyelerini düşürür. (Hardie ve ark., 2012; Wagner ve ark., 2018). Metforminin akciğer kanseri tedavisindeki etkisini incelemek için yapılan çalışmalarda, metforminin tolere edildiği ancak herhangi bir onkolojik fayda sağlamadığı sonucuna varılmıştır. Diyabet tedavisinde kullanılan diğer bir ilaç grubu da tiazolidinedionlardır (TZD). Akciğer kanseri üzerinde yapılan çalışmalar, TZD'lerin KHDAK hücrelerinin büyümesini önlediğini *in vitro* olarak göstermiştir (Wick ve ark., 2002). Ancak tiazolidinedionların KHDAK tedavisindeki rolü ve moleküler mekanizmasına ilişkin kanıtlar yetersizdir ve daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Anti-Mikrobiyal Anti-fungal İlaçlar

Tüberküloza karşı bir ilaç olarak FDA tarafından onaylanan Bedaquilin, umut verici anti-kanser etkileri olduğu gösterilmiştir. Patil ve ark. bedaquilinin sulu formda inhalasyon yoluyla verilmesinin, ilacın akciğerlerdeki zayıf çözünürlük sorununu ortadan kaldırarak anti-KHDAK aktivitesini arttığını göstermişlerdir (Patil ve ark., 2021). Benzer olarak, bedaquilin'in solunabilir bir siklodekstrin kompleksi olarak yeniden kullanılmasının KHDAK tedavisi açısından umut verici olabileceği Parvathaneni ve ark. tarafından da gösterilmiştir (Parvathaneni ve ark., 2021). Başka bir antimikrobiyal ilaç olan Tigesiklin'in, KHDAK alt tiplerinden yüksek proliferatif ve invaziv profile sahip hücrelerin apoptozunu ve koloni oluşumunu doza bağlı olarak inhibe ettiği gösterilmiştir. Tigesiklinin Mitokondriyal fonksiyonun inhibisyonu yoluyla, etki göstermesi, KHDAK tedavisinde Tigesiklinin kullanılabilirliğine işaret etmektedir (Jia ve ark., 2016).

İtrakonazol ise endotel hücrelerinin proliferasyonunu, migrasyonunu ve tüp oluşumunu inhibe ettiği gösterilen bir antifungaldir (Rudin ve ark., 2013). İlerlemiş akciğer kanseri hastalarıyla yapılan faz I çalışmasında itrakonazolün, pemetrekset ile kombine halde kullanıldığında iyi tolere edildiği gösterilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, genel ortalama

progresyonsuz sağkalım, itrakonazol alan hastalarda kontrol grubundakilere oranla daha uzun bulunmuştur.. Bir antineoplastik olarak itrakonazolün etki mekanizması henüz açık olmasa da, daha çok çalışma yapılması ile etkili sonuçlar alınabileceği ileri sürölmektedir (Rudin ve ark., 2013).

Anti-Helmintik İlaçlar

Tübölin polimerizasyonunu bloke ederek mikrotüböl sentezini inhibe eden bir anti-helmintik olan mebendazolün, KHDAK hücre hatları A549, H1299 ve H460 üzerinde sitotoksik bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Mukhopadhyay ve ark., 2002). Mebendazole küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücrelerinde tübölünü depolimerize ederek mitozun durmasını ve apoptozu indükleyebilir (Sasaki ve ark., 2002) . Ivermektin, KHDAK tedavisinde etkili olabilecek başka bir anti-helmintiktir. (Armando ve ark., 2020)

Anti-Retroviral İlaçlar

Bir proteaz inhibitörü olan Lopinavir, Ritonavir ile kombine halde kullanılan ve HIV tedavisine yönelik FDA onayı almış bir antiretroviral ilaçtır (Cvetkovic ve ark., 2003). Bu combine tedavi akciğer kanseri tedavisinde denenmiştir. Lopinavir ve Ritonavire kombine tedavi, akciğer kanseri hücrelerinde hücre döngüsünün durmasına, hücre canlılığının azalmasına ve hücrelerde apoptoza neden olduğu gösterilmiştir (Marima ve ark., 2020). Efavirenz, viral ters transkriptazı bağlayarak viral DNA sentezini azaltan başka bir antiretroviral ilaçtır. Efavirenz, yalnızca akciğer kanserinin ilerlemesini engellemekle kalmayıp, aynı zamanda radyasyon tedavisi ile kombine halde sinerjik bir etkiye de sahip olduğu için yeniden konumlandırma kapsamında potansiyeli yüksek bir adaydır (Hecht ve ark., 2018).

Sıtma İlaçları

Oksijenli solunum yollarını inhibe ettiği bilinen bir antimalaryal ilaç olan Atovaquone'un, KHDAK hastalarında tümör hipoksisini azalttđı gösterilmiştir (Skwarski ve ark., 2021). Tümör hipoksisinin radyasyon, kemoterapi ve immünoterapide yaygın bir bariyer olduğu göz önüne alındığında Atovakuonun kullanılması, , KHDAK hastalarında tedavi amaçlı kullanımı, radyasyon maruziyetinin neden olduğu sonuçları iyileştiren yeni

bir radyosensitizer etki sağlayabilir (Skwarski ve ark., 2021). Sıtma tedavisinde kullanılan Dihidroartemisinin, glukoz metabolizma modülasyonu yoluyla, özellikle NF-κB yolunu inhibe ederek, KHDAK metastazının inhibisyonuna yol açabilirken(Jiang J. ve ark., 2016)Kinakrin, TKI (tirozin kinaz inhibitörü) direncinde rol oynayabilen FACT kompleksini inhibe etme özelliği nedeniyle alternatif bir ilaç yeniden konumlandırma adayı olabilir. Yapılan bir Faz I kçalışmasında erlotinib ve kinakrin kombinasyonunun iyi tolere edildiğigösterilmiştir ancak ileri KHDAK'de bu kombine tedavinin etkinliği minimumdur (Bhateja ve ark., 2018).

Diğer İlaçlar

FDA onaylı bir antidepresan olan Sertralinin, LC3-II birikimi ve otolizozom oluşumuyla doğrulanan otofajik akışı indükleyerek KHDAK'yi erlotinib'e karşı duyarlı hale getirdiği bulunmuştur (Jiang X. ve ark., 2018). Sertralin ve erlotinibin kombine etkisi, KHDAK hücrelerinde AMPK/mTOR yolunun düzenlenmesinden kaynaklanmaktadır (Jiang X. ve ark., 2018).

Nitrogliserin, anjini tedavi etmek için kullanılan bir nitrik oksit (NO) vericisidir; bununla birlikte nitrogliserin aynı zamanda apoptozu indükleyebilir ve anjiyogenezi inhibe edebilir (Maeda, 2010). Yapılan bir faz II çalışmasında, nitrogliserinin tolere edilebilir toksisite ile vinorelbin'e yanıt oranını artırabildiğini göstermiştir. Aynı çalışma, vinorelbin ve sisplatinin nitrogliserinle kombine edilmesinin, tedavi edilmemiş evre IIIB/IV yassı hücreli dışı akciğer kanseri tanılı hastaların hayatta kalma oranını iyileştirdiğini göstermiştir (Yasuda ve ark., 2006).

2.5. Katyonik Amfifilik ilaçlar, ilaç yeniden konumlandırma ve KHDAK

Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK), dünya çapında en yaygın kanserlerden biridir ve kansere bağlı ölümlerin önde gelen tiplerindendir (Siegel ve ark., 2022).Tanı, çoğu zaman tümörün primer olarak oluştuğu bölgeden farklı bir bölgeyeyayılmasından sonra koyulmuştur. Genellikle, platin bazlı ilaçlarla mikrotübül bozucu ilaçların kombine kullanıldığı sistemik kemoterapi, bu hastaların tedavisinin temelini oluşturur. Çoğu ileri evre kanserlerde olduğu gibi, apoptozdan kaçış ve tedaviye direnç, KHDAK'nin

tedavisinde de büyük zorluklar doğurmaktadır (Chang A., 2011). Kanser oluşumu sürecinde hücrelerde, başlangıçta dönüşüm sürecinin kendisi tarafından, daha sonra tümörün mikroçevresi tarafından ve son olarak da uygulanan tedavi tarafından indüklenen apoptozdan kaçmak için çok sayıda genetik ve epigenetik değişiklik biriktirir (Groth-Pedersen ve ark., 2013; Ellegaard ve ark., 2016). Kemoterapiyle tedavi, kanser hücrelerinde sıklıkla, ATP bağlayıcı kaset taşıyıcı ailesinin çoklu ilaç direnci (MDR) ile ilişkili P-glikoproteinlerinin ekspresyonu artar böylece hücreler kemoterapötik ilaçları dışarı çıkarma yeteneği kazanır (Ellegaard ve ark., 2016). Daha da önemlisi tedaviye dirençli kanser hücrelerinde bile işlevsel kalan alternatif hücre ölümü yolları aktiftir (Fulda, 2014). Bu yollar arasında özellikle ilgi çekici olan lizozomal hücre ölüm yolağıdır. Kanser metastazının ilerlemesi, artan lizozomal biyogenez ve asitleşme ile kendini gösteren lizozomal kompartımandaki aktivasyona bağlıdır (Kallunki ve ark., 2013; Ellegaard ve ark., 2016). Kanser hücresi lizozomlarının bu zayıflığı, asidik lizozomlarda biriken ve kanser hücrelerinde lizozomal hasara neden olan çeşitli katyonik amfifilik ilaçlar (KAH'ler) tarafından hedeflenebilir (Sukhai ve ark., 2013; Ellegaard ve ark., 2016). KAH'lar, psikiyatrik bozukluklar, alerjiler, kalp hastalıkları ve enfeksiyonlar gibi geniş bir yelpazedeki yaygın hastalıkları tedavi etmek için kullanılan yüzlerce farmakolojik ajanı içerir (Ellegaard ve ark., 2016). KAH'lar hidrofobik halka yapısı ve katyonik amin grubuna sahip hidrofilik yan zincir ile karakterize edilirler. Asidik ortamda, bazik amin grupları protonlanır ve bu protonlanma sayesinde asidik lizozomlarda 1000 kata kadar ilaç birikebilir (Trapp ve ark., 2008). KAH'lerin lizozomal lümendeki membranlara yerleşmesi, negatif membran yükünü nötralize eder ve böylece asit sfingomiyelinaz da dahil olmak üzere birçok lizozomal lipazın fonksiyonunu inhibe eder. Kanser hücreleri özellikle sfingomiyelin birikimine karşı hassastır, bu da etkili asit sfingomiyelinaz inhibitörleri olan KAH'lerin neden kansere karşı seçici sitotoksosite gösterdiğini açıklayabilir (Sukhai ve ark., 2013; Ellegaard ve ark., 2016).

İyi karakterize edilmiş ve iyi tolere edilen ilaçların kanser tedavisi için ilaç yeniden konumlandırılma kapsamında değerlendirilmesi, uzun ve maliyetli bir ilaç geliştirme süreci için önemli bir alternatif olabilir. Çeşitli KAH'lerin doğru tanımlanmış anti-kanser aktivitesi ile ilgili çalışmalardan yola çıkılarak yapılan bir kohort çalışmasında A549 KHDAK hücrelerine karşı sitotoksosite açısından bir KAH kütüphanesini taranmış,

en yüksek anti-KHDAK potansiyeline sahip KAH'leri sistematik olarak araştırılmış ve standart kanser kemoterapi rejimine klinik olarak uygun dozlarda iyi tolere edilen KAH antihistaminiklerinin eklenmesinin kanser prognozunu iyileştirdiği gösterilmiştir (Ellegaard ve ark., 2016).

2.6. Kanser ve antihistaminikler

Histamin, alerjik uyaranlara yanıt olarak doku mast hücreleri tarafından üretilen biyolojik bir amindir (Thangam ve ark., 2018; Park ve ark., 2023). Histamin, histamin reseptörü H1 (HRH1), HRH2, HRH3 ve HRH4 olarak adlandırılan dört tip G proteinine bağlı reseptörler (GPCR'ler) aracılığıyla vazodilatasyon, artmış vasküler geçirgenlik, bronkokonstriksiyon ve gastrik asit sekresyonu gibi alerjik reaksiyonları tetikler. HRH1 her hücrede ifade edilir ve klasik alerjik reaksiyonlardan sorumludur. HRH2, bağışıklık hücrelerinde ve sindirim organlarında yüksek oranda ifade edilir ve bağışıklık fonksiyonları ve mide asidi salgılanması için önemlidir. HRH3, yalnızca nöronlarda ifade edilirken HRH4 esas olarak bağışıklık hücrelerinde ifade edilir. Histidin dekarboksilazın yani histamin üretiminden sorumlu tek enzimin moleküler yapısının açıklığa kavuşturulmasından sonra kanser ve histamin arasındaki bağlantılara ilişkin bilgilerde de ilerleme kaydedilmiştir. Histidin dekarboksilaz enziminin aşırı ekspresyonunda çeşitli insan tümörlerinin büyümesi arasında doğrudan bir ilişkiye işaret edilmektedir (Cianchi ve ark., 2008). Histidin dekarboksilaz enziminin hem mRNA hem de protein seviyelerinde aşırı ekspresyonu ve artan histamin seviyeleri, melanoma, küçük hücreli akciğer karsinomu, meme karsinomu ve endometriyal kanserde gösterilmiştir (Garcia-Caballero ve ark., 1988). Bununla birlikte, histamin tedavisinin, uygulanan histaminin konsantrasyonuna ve histamin reseptörlerinin tiplerine bağlı olarak, kanser hücrelerinin çoğalması, hayatta kalması ve göçünde rol oynadığı öne sürülmektedir. Ancak literatürde sonuçları birbiriyle çelişkili çalışmalar vardır (Leurs ve ark., 2002; Cianchi ve ark., 2008; Thangam ve ark., 2018; Zhao ve ark., 2020).

Histaminin etkilerini engelleyen ilaçlara antihistaminik ilaçlar (antihistaminikler) denir. Antihistaminik terimi daha çok anti-alerjik ilaçlar için kullanılır. Antihistaminik ilaçlar salınan histaminin reseptörle etkileşmesini engelleyerek veya histamin salınımını engelleyerek etki gösterirler. Antihistaminiklerden en sık kullanılanları tablo 2.1'de

verilmiştir. HRH1'ler bağışıklık cevabının düzenlenmesi ve anafilaktik inflamasyonda önemli rol oynar (Leurs ve ark., 2002; Thangam ve ark., 2018). Günümüzde H1 ve H2 antihistaminikler klinik uygulamada yaygın olarak kullanılmaktadır. H1-antihistaminikler, histaminlerin sinirlerde, düz kaslarda, endotelde ve mast hücrelerinde bulunan histamin reseptörlerine bağlanmasını rekabetçi bir şekilde engeller. Histaminler vazodilatasyona neden olduğundan ve kılcal damarlardan çevre dokulara sıvı sızmasına neden olan damar geçirgenliğini artırdığından, H1-antihistaminikler bu etkileri engelleyecek ve iltihabı ve diğer alerji semptomlarını durduracaktır. H1-antihistaminikler ayrıca antijen sunumunu, proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu ve hücre adezyon moleküllerini azaltarak anti-alerjik etki gösterirler. Antihistaminikler ayrıca, transkripsiyon faktörü nükleer faktör-kB aracılığıyla konsantrasyona bağlı bir şekilde mast hücre aktivasyonunu ve histamin salınımını inhibe ederler. Alerjik rinit, ürtiker ve diğer alerjik hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Leurs ve ark., 2002; Venugopal ve ark., 2014).

Tablo 2.1 En sık kullanılan H1, H2, H3 ve H4 antihistaminikler (Handley ve ark., 1998; Eseverri, 2000; Repka-Ramirez, 2003; Blaiss, 2004; Simons, 2004; Golightly ve ark., 2005; del Cuillo ve ark., 2006; Carson ve ark., 2010; Faustino-Rocha ve ark., 2017)

H1 antihistaminikler	Birinci nesil	Alkilaminler	Bromfeniramin; Klorfeniramin; Deksibromfeniramin; Deksklorfeniramin; Dimetinden; Feniramin; Triprolidin
		Etanolaminler	Bromazin; Karbinoksamin; Klemastin; Dimenhidrinat; Difenhidramin; Doksilamin; Ofenadrin; Feniltoksamin
		etilendiaminler	Antazolin; Mepiramin; Pirilamin; Tripelenamin
		Fenotiyazinler	Metdilazin; Prometazin; Trimeprazin
		Piperazinler	Buklizin; Klorsiklizin; Siklizin; Hidroksizin; Mebhidrolin; Meklizin; Oksatomid

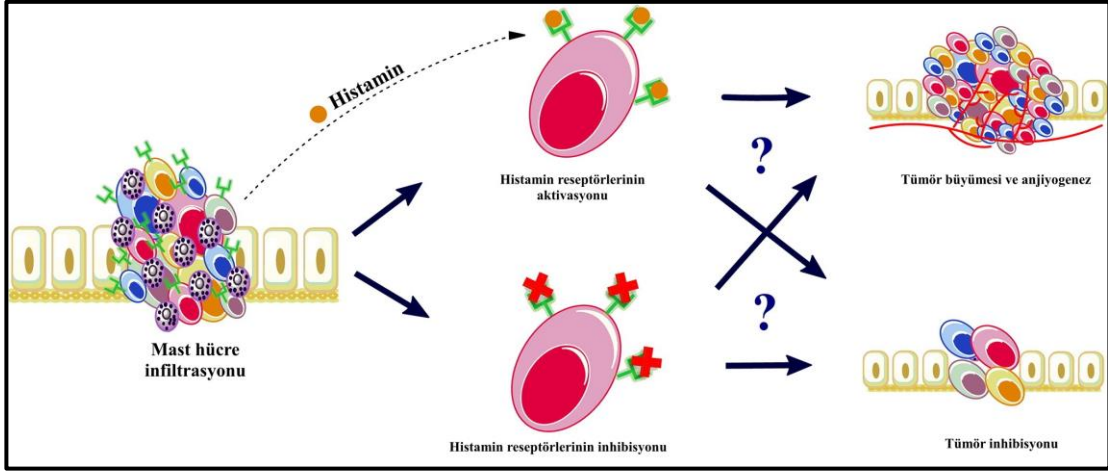
Tablo 2.1'in devamı

	İkinci nesil	Alkilaminler	Akrivastin
		Piperazinler	Setirizin; Levosetirizin
		Piperidinler	Astemizol; Bilastin; Desloratadin; Ebastin; Feksofenadin; Ketotifen; Levokabastin; Loratadin; Mizolastin; Olopatadin; Terfenadin; Rupatadin
H2 antihistaminikler		Burimamid; Simetidin; Dimaprid; Famotidin; Lafutidin; Nizatidin; Pibutidin; Ranitidin; Zolantidin	
H3 antihistaminikler		Siproksifan; İmoproksifan; İmpromidin	
H4 antihistaminikler		Alobenpropit; Klobenpropit; Tioperamid	

Tümör gelişimi sırasında mast hücresi öncülleri tümöre göç eder ve ana stromal hücre popülasyonlarından birini oluşturur (Ribatti ve ark., 2010). Bazı çalışmalar, mast hücreleri tarafından salgılanan medyatörlerin konakçı için hem zararlı (tümör büyümesini, neovaskülarizasyonu, immünoşüpresyonu ve tümör invazyonunu teşvik eder) hem de yararlı (tümörü inhibe eder, apoptozu indükler, inflamasyonu uyarır, metastazı inhibe eder) etkilere sahip olduğunu ileri sürmektedir. Bu nedenle, mast hücrelerinin tümör başlangıcında ve ilerlemesinde rolü henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Faustino-Rocha ve ark., 2017). Bazı araştırmacılar mast hücre sayısındaki artışın insan melanoma, oral skuamöz karsinoma ve prostat kanserinde kötü prognozla korele olduğunu gözlemlediler. (Ribatti ve ark., 2010). Mast hücre yoğunluğu ile mikro damar yoğunluğu arasındaki pozitif korelasyon, özofageal skuamöz hücreli karsinom, gastrik kanser, kolorektal kanser, hepatosellüler karsinom, pankreas adenokarsinomu, renal hücreli karsinom, melanom ve oral skuamöz hücreli karsinom vakalarında da gözlemlenmiştir (Crivellato ve ark., 2008).

Histamin, mast hücreleri tarafından sentezlenen ve salınan, alerjiler ve konjunktivit gibi çeşitli patolojik süreçlerde vazodilatör görevi gören bir biyojenik amindir. Kanser

üzerindeki rolü tam olarak anlaşılmamıştır. Yüksek histamin düzeyleri, çeşitli tümörlerin (servikal, over, vajinal, uterus, vulvar, kolorektal kanser ve melanom) düzenlenmesinde tümör büyümesini teşvik etmek veya engellemek olmak üzere iki yönlü davranışla ilişkilendirilmiştir. . Histamin reseptörleri tümör hücreleri de dahil olmak üzere çok sayıda hücrede eksprese edilir ve bu hücrelerihistamin varyasyonlarına duyarlı hale getirir. Mast hücrelerinin ve histaminin kanser gelişimi üzerindeki rolünün ve bu hastalığın klinik yönetiminde antihistaminiklerin kullanım olasılığının değerlendirilmesi gereklidir (Şekil 2.3). Bunun için de öncelikle *in vitro* ve *in vivo* daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Faustino-Rocha ve ark., 2017).



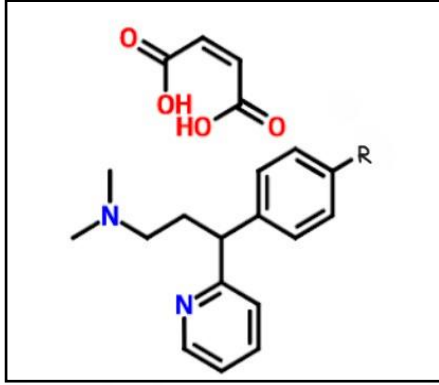
Şekil 2.3 Histamin Reseptörleri ve Kanser (Faustino-Rocha ve ark., 2017).

Kanseri tamamen ortadan kaldırmak için tek bir tedavi yöntemi yeterli olmadığından, genellikle kanserin tedavisinde birden fazla yöntem kombine olarak uygulanmaktadır. Antihistaminiklerin toksisitesinin kanser tedavisinde kullanılan ajanlarla karşılaştırıldığında daha düşük olduğu göz önüne alındığında, bunların geleneksel tedavi için ilaç yeniden konumlandırma kapsamında kullanımının araştırılması gerekmektedir. Ancak, antihistaminiklerin yeni kanser ajanları olarak kullanımını önermeden önce, farklı tümör tiplerindeki histamin reseptörlerinin tam seviyesini ve her bir reseptörün aktivasyonunun kanser büyümesi üzerindeki etkilerini açıklığa kavuşturmak, bunları *in vitro* ve *in vivo* değerlendirmek gerekmektedir (Carson ve ark., 2010).

Örnek vermek gerekirse meme kanseri dünya çapında en sık görülen ikinci kanser türü olup kadınlarda kansere bağlı ölümlerinin önde gelen nedenidir. Birkaç çalışma histaminin meme kanseri gelişimi ve ilerlemesindeki kritik rolünün altını çizmiştir. Histamin üretiminde rol oynayan enzim olan histidin dekarboksilazın aktivitesindeki artış nedeniyle meme kanseri dokularındaki histamin konsantrasyonunun sağlıklı kontrol bireylerinin normal dokularına göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Farklı deneysel modellerde ve insan biyopsilerinde H4R ekspresyonu, ilişkili biyolojik tepkiler ve deneysel tümörlerin H4R ligandları ile *in vivo* tedavisi araştırılmıştır. Bugüne kadar yapılan çalışmaların sonuçlarına göre, H4R'nin meme kanserinde hücre çoğalması, yaşlanma ve apoptozis gibi histamin aracılı biyolojik süreçlerde önemli bir rol oynadığını gösterilmiştir (Martinel Lamas ve ark., 2015).

2.7. Feniramin Hidrojen Maleat (FHM)

Feniramin Hidrojen Maleat (FHM), H1-antihistaminik ve damar genişletici özelliklere sahip bir alkilamin türevidir (Şekil 2.3)(Knox ve ark., 2024). Klorfeniramin maleat ile feniramin hidrojen maleat ile arasındaki fark kimyasal yapısındaki değişken grupta hidrojen yerine klor bulunmasıdır. Aynı durum bromfeniramin maleat için (hidrojen yerine brom bulunur) geçerlidir. Feniramin hidrojen maleat, klorfeniramin maleat ve bromfeniramin maleat H1 reseptör antagonistleridir (Jancinová ve ark., 1995; Medina ve ark., 1995; Gómez-Fabre ve ark., 1997; Kim ve ark., 2023; Rizvi ve ark., 2024). Bu antihistaminiklerin yan etkileri (antikolinerjik etki gibi) oldukça düşüktür. Bu nedenle en yaygın kullanılan sınıftır. Histamin H1 reseptörlerine bağlanırlar ve nitrik oksit üretimini inhibe ederler. Terapötik dozlarda güvenli bir ilaçtır. Tolere edilen maksimum doz günde 3 mg/kg'dır (Venugopal ve ark., 2014; Knox ve ark., 2024). Bazı diğer H1 antagonistlerine göre uyuşukluk yaratmaya daha az eğilimli ve gündüz kullanımı için daha uygun bir ilaçtır. Olumsuz etkilerin çoğu antimuskarinik etkisinden kaynaklanmaktadır. Sınırlı yan etkileri arasında halüsinasyonlar, heyecan, atetoz, ataksi, koordinasyon bozukluğu ve konvülsiyonları, gözbebeklerinin genişlemesi, yüz kızarması, sinüs taşikardisi, idrar retansiyonu, ağız kuruluğu ve ateş yer almaktadır (Venugopal ve ark., 2014).



Şekil 2.4. Feniramin Maleatın Kimyasal Yapısı: Kimyasal formülü $C_{16}H_{20}N_2$,

R=H Feniramin Hidrojen Maleat (Feniramin maleat),

R=Cl Klorfeniramin Maleat

R=Br Bromfeniramin Maleat

Feniramin hidrojen maleat (FHM) kimyasal yapısı nedeniyle kısmen amfifilik özellikler gösterebilir (Venugopal ve ark., 2014; Kim ve ark., 2023). Feniramin, bir etanolamin türevidir ve organik bir bileşiktir. Amfifilik Bileşikler, hidrofilik (su seven) ve hidrofobik (su sevmeyen) kısımlara sahip moleküllerdir. Bu tür bileşikler su ve yağ fazları arasında yerleşerek yüzey aktif özellikler gösterir. Feniraminin moleküler yapısında hidrofilik gruplar (örneğin, amin grubu) ve hidrofobik aromatik halkalar bulunur (Venugopal ve ark., 2014; Kim ve ark., 2023; Knox ve ark., 2024). Şekil 2.4. de FHM'nin üç boyutlu yapısı görülmektedir (Kim ve ark., 2023). Katyonik amfifilik bileşiklerin kanser tedavisinde lizozomal hücre ölümüne sebep olduğu için etkili olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Kallunki ve ark., 2013; Sukhai ve ark., 2013).

2.8. Feniramin Hidrojen Maleat ve İlaç Yeniden Konumlandırma

Feniramin hidrojen maleat daha önceki bölümlerde de bahsedildiği gibi yani moleküler yapısında hidrofilik gruplar (örneğin, amin grubu) ve hidrofobik aromatik halkalar bulunduğu için (Venugopal ve ark., 2014; Kim ve ark., 2023; Knox ve ark., 2024) amfifilik özellik gösterebilir (Venugopal ve ark., 2014; Kim ve ark., 2023). Buna rağmen FHM, daha önce ilaç yeniden konumlandırma kapsamında hiçbir çalışmada kullanılmamıştır ancak, klorfeniramin maleat insan meme kanseri, kolon kanseri ve göğüs kanseri hücre hatlarında çalışılmış ve sitotoksik etkileri gösterilmiştir (Medina ve ark., 1995; Gómez-Fabre ve ark., 1997). Klorfeniramin maleat ile feniramin hidrojen maleat ile arasındaki fark kimyasal yapısındaki değişken grupta hidrojen yerine klor bulunmasıdır, başka bir deyişle feniraminin klorlanmış türevi olup, daha güçlü bir H1 reseptör antagonistidir. (Şekil 2.1). (Jancinová ve ark., 1995; Medina ve ark., 1995; Gómez-Fabre ve ark., 1997; Kim ve ark., 2023; Rizvi ve ark., 2024). Klorfeniramin meme kanseri hücrelerinde belirgin sitotoksik etkilere yol açmıştır. Bu etkiler, hücre canlılığında azalma ve apoptoz (programlanmış hücre ölümü) oranlarında artış olarak gözlemlenmiştir (Gómez-Fabre ve ark., 1997). Klorfeniramin, ornitin dekarboksilaz sentezini inhibe ederek insan meme kanseri hücre hatlarında hücre proliferasyonunu azaltma potansiyeline sahip bir ajan olarak değerlendirilmiştir. Bu sonuçlar, klorfeniraminin meme kanseri tedavisinde kullanılabilecek potansiyel bir terapötik ajan olduğunu göstermektedir. (Medina ve ark., 1995; Gómez-Fabre ve ark., 1997). Klorfeniramin, geleneksel kullanımlarının ötesinde çeşitli yeni klinik uygulamalara sahip potansiyel bir ilaçtır. Yeniden ilaç konumlandırma kapsamında parkinson hastalığı tedavisinde kullanılmak üzere araştırılmış, iyi bilinen antikolinergik özelliklerine dayanarak, bu antihistaminin kullanımının, özellikle titreme en belirgin semptom olduğunda, erken evrelerinde bile faydalı olabileceği sonucuna varılmıştır (Karamanakos ve ark., 2008). Kanser, nörolojik bozukluklar, inflamatuvar ve otoimmün hastalıklar, psikiyatrik durumlar gibi geniş bir yelpazede potansiyel faydaları bulunan klorfeniraminin ve benzer şekilde bromfeniramin ve feniramin hidrojen maleatın da bu alanlardaki etkinliğinin ve güvenliğinin daha fazla *in vitro*, *in siliko* çalışmalar ve klinik araştırmalar ile doğrulanması gerekmektedir (Jancinová ve ark., 1995; Medina ve ark., 1995; Gómez-Fabre ve ark., 1997; Rizvi ve ark., 2024).

2.9. DrugCentral 2023

DrugCentral, aktif farmasötik bileşenler (API'ler), bileşenlere ait genel bilgiler, biyoaktivite profilleri, ilacın etki mekanizması (MoA), farmakolojik etki, farmasötik ürünler ve endikasyonlarla ilgili bilgilerin birleştirilmesiyle geliştirilen farmasötik bir veri bankasıdır. Verilerin çoğunluğu, literatürün ve ilaç etiketi bilgilerinin manuel olarak derlenmesiyle birlikte çevrimiçi kamu kaynaklarından toplanıp bir araya getirilir (Ursu ve ark., 2017). <https://drugcentral.org> adresinden erişilebilen DrugCentral, açık erişimli bir çevrimiçi ilaç veri bankasıdır. İlaç keşfini, geliştirilmesini ve yeniden konumlandırılmasını desteklemek için yapısal, fizikokimyasal ve farmakolojik ayrıntıları içeren 4950'den fazla ilacı kapsar. Platform yaklaşık 20.000 biyoaktivite verisi içermektedir (Halip ve ark., 2023). DrugCentral, FDA ve diğer düzenleyici kurumlar tarafından onaylanan aktif farmasötik bileşenlere ilişkin yapıyı, biyoaktiviteyi, düzenleyici, farmakolojik eylemleri ve endikasyonları entegre eder. Yeni ilaç onayları için düzenleyici kurumların izlenmesi de, kaynağın güncel olmasını sağlar. DrugCentral, aktif bileşenlere ilişkin içeriği farmasötik formülasyonlar, indeksleme ilaçları ve ilaç etiketi ek açıklamalarıyla birleştirir ve diğer çevrimiçi kaynaklarla tamamlayıcılığı, dış kaynaklara çapraz referans verilmesiyle kolaylaştırılır. Moleküler düzeyde ise DrugCentral, ilaç-hedef etkileşimleri ile farmakolojik etki ve endikasyonlar arasında köprü kurar. İlaçların benzerlikleri Drug Central2023 web serverda yer alan L1000 gen profil benzerlik analizi ile belirlenir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. DrugCentral Giriş Sayfası

2.10. Moleküler Docking (Kenetlenme)

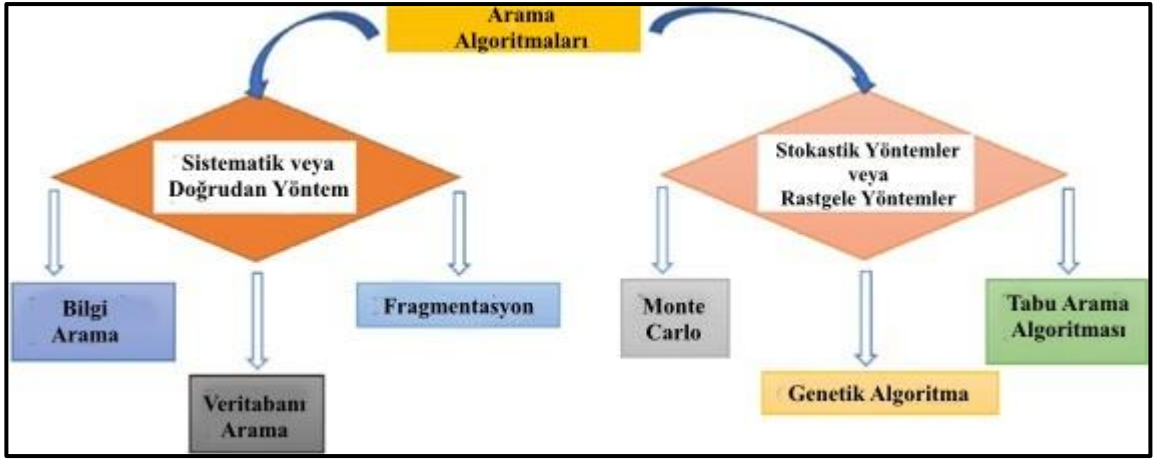
Moleküler Yerleştirme, son yıllarda in-silico ilaç geliştirmenin önemli bir aracı haline gelmiştir. Bu teknik, küçük bir molekül ile bir protein arasındaki etkileşimin atomik düzeyde etkileşiminin tahmin edilmesine dayanır (Sahoo ve ark., 2022). Bu nedenle yöntem, araştırmacıların nutrasötikler gibi küçük moleküllerin bir hedef proteinin bağlanma bölgesindeki davranışlarını incelemelerine ve bu etkileşimin altında yatan temel biyokimyasal ve moleküler süreçleri anlamalarına olanak tanır (Meng ve ark., 2011). Moleküler docking proteinlerin üç boyutlu yapısı ile ligantların kimyasal yapılarını kullanır. Proteinlerin üç boyutlu yapıları, X-ışını kristalografisi, Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi veya Kriyo-Elektron Mikroskopisi gibi deneysel tekniklerle yada alphafold gibi bilgisayarlı modelleme verileri ile elde edilebilir (Smyth ve ark., 2000; Sugiki ve ark., 2017; Nakane ve ark., 2020).

Moleküler kenetlenme teknikleri için hem ticari hem de ücretsiz çeşitli hesaplama araçları ve algoritmalar mevcuttur. Moleküler docking günümüzde ilaç araştırmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Agu ve ark., 2023).

Moleküler docking, ligand-reseptör kompleksini bilgisayar tabanlı yöntemlerle tahmin etmeyi amaçlamaktadır. Kenetlenme süreci, ligandın örneklenmesi ve bir puanlama fonksiyonunun kullanılmasını içeren iki ana adımı içerir. Örnekleme algoritmaları, bağlanma modlarını dikkate alarak, proteinin aktif bölgesi içindeki ligandın enerjetik olarak en uygun konformasyonlarını belirlemeye yardımcı olur. Elde edilen veriler daha sonra bir puanlama fonksiyonu kullanılarak sıralanır (Kitchen ve ark., 2004; Das ve ark., 2020).

Arama algoritmaları

Arama algoritmasının temel hedefi, ligand ile birlikte proteinin akla gelebilecek her yönünü ve konformasyonunu bulmaktır. Arama algoritmaları Şekil 2.6 'da gösterildiğı gibi sınıflandırılır.



Şekil 2.6. Arama algoritma mekanizmalarının sınıflandırılması (Agu ve ark., 2023)

i. Sistematik veya doğrudan yöntem: Sistematik yöntemlerin üç alt türü vardır;

Konformasyonel arama: Bu aramada, ligandın yapısal parametresinin torsiyonel (dihedral), translasyonel ve rotasyonel serbestlik dereceleri kademeli olarak değiştirilir.

Fragmentasyon: Bu aramada, moleküler yerleştirme işlemi sırasında protein ve ligand aralarında oluşabilecek bağları tespit edebilmek için birden fazla parçaya ayrılarak denenebilir veya parçalardan herbiri ayrı ayrı sabit tutularak sonraki parçalar bu ilk bağlı konuma eklenerek denemelere devam edilir.

Veri tabanı Arama: Bu tekniği kullanarak, veri tabanında kayıtlı olan her küçük molekülünün farklı konformasyonları ile hedef protein arasındaki etkileşimleri belirlemek mümkündür (Sousa ve ark., 2006).

ii. Stokastik yöntemler veya Rastgele yöntemler: Stokastik yöntemlerin üç alt türü vardır;

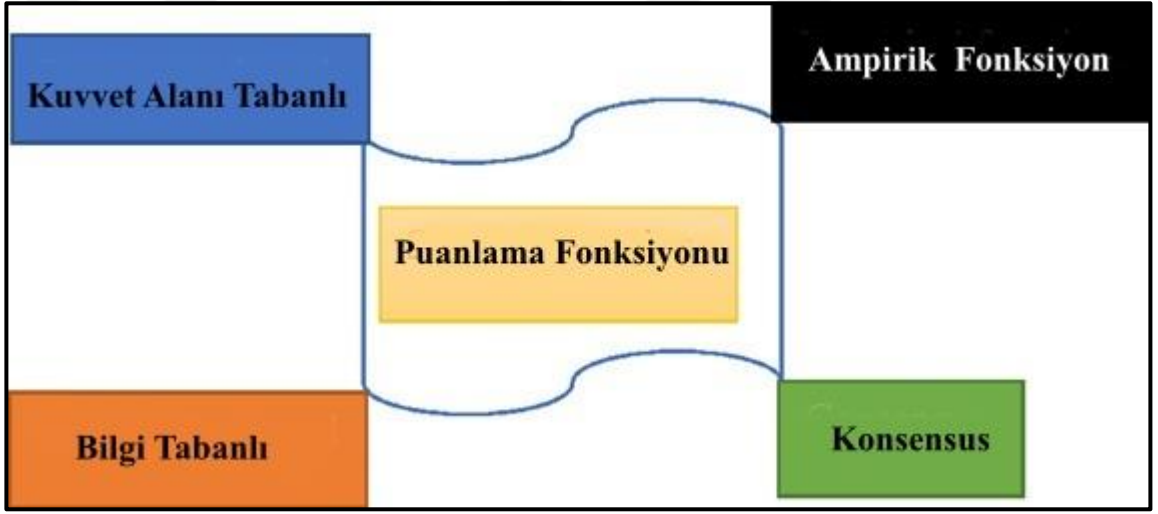
Monte Carlo: Bu yaklaşım, ligandların reseptör bağlanma bölgesine rastgele yerleştirilmesini, puanlanmasını ve ardından yeni bir konfigürasyon oluşturulmasını içerir.

Genetik algoritma: Reseptörle ilgili konfigürasyon ve konumun “gen” tarafından tanımlandığı ve skorun “uygunluk” olduğu bir duruş popülasyonu ile başlar (Brooijmans ve ark., 2003).

Tabu arama: Ligandların konformasyonel uzayının tek sefer değerlendirilmesi ile yeni bir konfigürasyonun araştırılmasını kolaylaştıran bir arama yöntemidir (Agu ve ark., 2023).

Puanlama fonksiyonları

Sanal tarama uygulanarak, ligandlar protein bağlanma afinitelerine göre değerlendirilir. Bu yöntemde reseptör (protein) ile ilgili olarak hangi ligand yapısının ve rotasyonunun en avantajlı bağlanmaya sahip olduğunun değerlendirilmesine yardımcı olur. Şekil 2.7' de şemazite edildiği gibi, dört ana grup puanlama fonksiyonunu oluşturmaktadır. (Das ve ark., 2020).



Şekil 2.7 Puanlama fonksiyon mekanizmalarının sınıflandırılması (Agu ve ark., 2023).

i. *Kuvvet alanı tabanlı:* Bu yöntemin en önemli avantajı, bağlanma afinitesini belirlemek için van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağı ve Columbic elektrostatik etkileşimlerin yanı sıra olası bağların açıları ve burulma sapmaları da dahil olmak üzere hesaplamalara bağ dışı etkileşimlerin katkısını da eklemesidir (Taylor ve ark., 2000).

ii. *Ampirik işlev:* Bu yöntemde, bağlanma afiniteleri bilinen fonksiyonel gruplar ve protein-ligand kompleksleri kullanılarak hazırlanmış bir dizi kompleks yapının doğrusal nüks analizi kullanılır (Li Y. ve ark., 2013).

iii. *Bilgi tabanlı*: Karmaşık yapılardan oluşan bir etkileşimi istatistiksel olarak değerlendirerek, elementleri, atomları ve fonksiyonel grupları ayırma imkanı sağlar (Voruganti ve ark., 2018) .

iv. *Konsensüs*: Temel olarak, birden fazla değerlendirme yöntemiyle elde edilen verileri birleştirir (Das ve ark., 2020).

Yukarıda verilen bilgiler ışığında, tez kapsamında antihistaminik bir ilaç olan ve yaygın kullanılan Feniramin hidrojen maleatın ilaç yeniden konumlandırma çalışmaları kapsamında, kanser tedavisinde kullanım potansiyelinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda, öncelikle, FHM'nin DrugCentral L1000 gen profil benzerlik analizi kullanılarak hangi ilaçlara benzediği tespit edilmiş ve bu ilaçlar listelenmiştir. Daha sonra oluşturulan listelerden hangilerinin kanser tedavisinde kullanıldığı belirlenmiş ve ayrı bir liste olarak sunulmuştur.

Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlara benzerlikleri olan FHM'nin olası anti-kanser etkileri İnsan Akciğer kanseri hücre hattı A549 üzerinde *in vitro* olarak değerlendirilmiştir. *In vitro* deneylerde gözlenen hücre ölümü apoptoz içsel yolak üzerinden araştırılmış, FHM'nin apoptoz dışsal yolak üzerine olası etkisi ise *in siliko* olarak değerlendirilmiştir.

2.11. Apoptozis

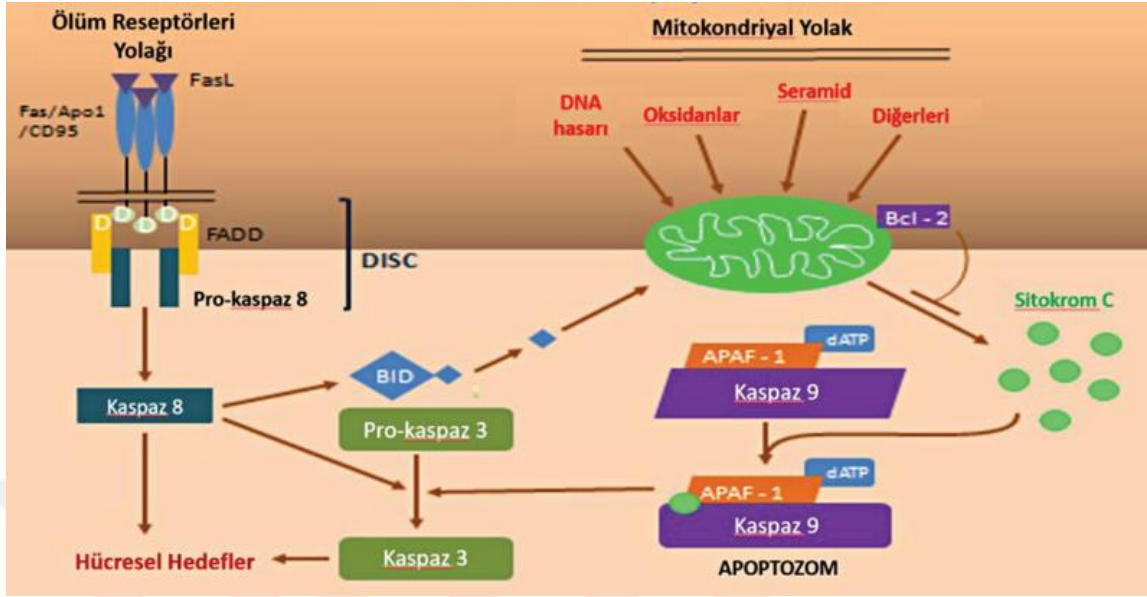
Normal fizyolojik şartlarda, hasarlı veya yaşlı hücreler apoptoz olarak adlandırılan ve genetik olarak düzenlenen bir hücre ölüm programıyla kendi kendilerini öldürür. Apoptoz bir çok fizyolojik ve patolojik süreçte rol oynar (Pistritto ve ark., 2016). Apoptozis, genotoksik stres gibi hücre içinden gelen sinyaller veya ligandların hücre yüzeyi ölüm reseptörlerine bağlanması gibi dışsal sinyaller tarafından tetiklenebilir (Wong, 2011).

Genel olarak, apoptozda üç ana tipte biyokimyasal değişiklik gözlemlenebilir (Wong, 2011):

- 1) Kaspazların aktivasyonu,
- 2) DNA ve protein parçalanması

3) Membran değişiklikleri ve fagositik hücreler tarafından tanınma.

Apoptozis kaspazlar adı verilen sistein proteaz ailesine ait bir grup enzimin aktivasyonu ile gerçekleşir. Aktifleştirilmiş kaspazlar birçok hayati hücresel proteini keser. Ayrıca nükleer DNA'yı daha da parçalayan DNAazı da aktive ederler (Lavrik ve ark., 2005). Kaspazlar hem başlatıcı hem de infazcı oldukları için apoptozis mekanizmasının merkezinde yer alırlar. Kaspazların aktive edilebileceği en yaygın olarak bilinen iki başlatma yolu, apoptozisin içsel (veya mitokondriyal) ve dışsal (veya ölüm reseptörü) yollarıdır (Şekil 2.8). Daha az bilinen üçüncü bir başlatma yolu, içsel endoplazmik retikulum yoludur (Li J. ve ark., 2008; Wong, 2011). Bunların dışında DNA hasarı üzerine p53 ile aktive olan kaspaz 2 bağımlı yolak, kaspazın doğrudan aktivasyonu ile granzim-B yolağı ve DNA fragmentasyonu ile başlayan granzim-A yolağı ile de apoptoz gerçekleşebilir (Grilo ve ark., 2019). Hem başlatıcı (kaspaz-2, -8, -9 ve -10 apoptotik yolun başlangıcından sorumludur) hem de cellat kaspazlar (kaspaz-3, -6 ve -7) olarak adlandırılan kaspazlar apoptozis mekanizmasının merkezinde yer alırlar (Thornberry ve ark., 1998). İnaktif proteinler (zimogenler veya pro-kaspazlar) olarak üretildikten sonra, başlatıcı kaspazlar, spesifik adaptör molekülleriyle etkileşimleri sonucu aktive olurlar (Nicholson, 1999). Başlatıcı kaspazlar, cellat kaspazları (kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7) aktive eder. Bu aktif kaspazlar, hücre içindeki çok sayıda hedef proteini parçalayan ve apoptoz sürecini yürüten enzimlerdir. Kaspaz kaskadı olarak adlandırılan bu süreçte hücresel homeostazi ve organizmalardaki doku bütünlüğü korunarak hasarlı veya gereksiz hücreler kontrollü bir şekilde ortadan kaldırılır. Herhangi bir aksama veya kontrolsüz aktivasyon, çeşitli hastalıkların (örneğin, kanser veya otoimmün hastalıklar) gelişimine yol açabilir. (Degterev ve ark., 2003)



Şekil 2.8.. İçsel (mitokondriyal) ve dışsal (Ölüm reseptörleri yolu) apoptotik yollar (Celepli ve ark., 2020).

İçsel (veya mitokondriyal) yolak

Apoptozisin içsel yolu (intrinsik yol), hücre içinde meydana gelen stres, DNA hasarı, oksidatif stres gibi faktörlere yanıt olarak tetiklenen ve mitokondriler aracılığıyla yürütülen programlanmış hücre ölümü mekanizmasıdır. Bu yol, hücre içindeki olaylara bağlı olarak başlar ve mitokondrilerin merkezi rol oynadığı süreçler içerir. İyonlaştırıcı radyasyonun neden olduğu genotoksik hasar, mitokondriyal hasar, endoplazmik retikulum stresi, aşırı mutajenik stimülasyon, onkojene bağlı hücre ölümü gibi sebepler ile içsel yolak aktive olur (Singh ve ark., 2019). BCL-2 ailesi hem proapoptotik hem de antiapoptotik fonksiyonlara sahiptir ve içsel yolaktaki düzenleyici proteinlerdir. Bugüne kadar 25 BCL-2 üyesi belirlenmiştir (Cimmino ve ark., 2005). Her bir BCL-2 proteini homoloji alanları (BH1, BH2, BH3 ve BH4) ve alfa sarmalını içerir. Apoptozisten temel sorumlu BCL-2 ailesi üyeleri spesifik BH3 alanı içerir (Shamas-Din ve ark., 2013). Bu BCL-2 üyesi proteinleri doğrudan mitokondriyal BAX (BCL-2 protein ailesi apoptozisi indükleyen BCL-2 ilişkili X apoptoz regülatörü) ve/veya BAK (BCL-2 antagonist katili) ile etkileşime girerek yapısal değişikliklere neden olurlar. Bu proteinlerin varlığı mitokondriyal dış zar geçirgenliği (mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP)) için gereklidir (Kale ve ark., 2018). Proapoptotik efektör proteinler olan BAX

ve BAD (BCL-2 ile ilişkili hücre ölüm proteini agonisti) proteinleri eksprese olur ve Apaf-1 (Apoptotik peptidaz aktive edici faktör 1 (Apoptotic protease activating factor 1)) molekülüne bağlanır. Hücrede internal hasar olduğunda Apaf-1 serbestleşir ve mitokondriyal dış zar geçirgenliği (MOMP) artar. MOMP'ın artması ile sitokrom C sitozole salınır ve Apaf-1 ile kaspaz-9 molekülüne bağlanır. Sitokrom C, Apaf-1, kaspaz-9 ve ATP'den oluşan komplekse apoptozom denilir. Apoptozom'un oluşması ile birlikte kaspaz kaskadı başlatılmış olur (Peña-Blanco ve ark., 2018) İçsel yolak, özellikle hasar gören veya anormal hücrelerin eliminasyonunda rol oynar ve bu yolda meydana gelebilecek aksaklıklar, çeşitli hastalıklara yol açabilir, örneğin kanser veya nörodejeneratif hastalıklar.

Dışsal (veya ölüm reseptörü) yolağı

Apoptozisin dışsal yolak (ekstrinsik yol) mekanizması, hücre dışı sinyallerle başlatılan ve hücre yüzeyinde bulunan "ölüm reseptörleri" aracılığıyla tetiklenen bir apoptoz yoludur. Bu yolak, hücrenin dışarıdan gelen ölüm sinyallerine yanıt olarak kontrollü bir şekilde yok olmasını sağlar. Dışsal yolak, hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerinin (örneğin, Fas reseptörü veya TNF (Tümör Nekroz Faktörü) reseptörü) ligandlar tarafından bağlanmasıyla başlar(Elmore, 2007). Bu reseptörler, genellikle bağışıklık sistemi hücrelerinden gelen sinyaller yoluyla aktif hale gelir. Fas ve tümör nekroz faktör (tumor necrosis factor (TNF)) reseptörü integral proteinlerdir. Ölüm reseptörlerinin aktive edilmesiyle birlikte, hücre içi bölgedeki proteinler toplanarak DISC (Death-Inducing Signaling Complex) adı verilen bir kompleks oluşur. DISC, başlatıcı kaspaz-8 veya kaspaz-10'u bağlayarak aktif hale getirir. DISC kompleksinde kaspaz-8 veya kaspaz-10'un aktifleşmesi, bu başlatıcı kaspazların cellat kaspazları (kaspaz-3, kaspaz-6, kaspaz-7) aktive etmesine yol açar. Aktive olmuş bu kaspazlar, hücredeki proteinleri parçalayarak hücre yapısının kontrollü bir şekilde bozulmasına ve apoptoz yoluyla hücre ölümüne neden olur. Dışsal yolak genellikle immün sistem hücreleri tarafından enfekte olmuş veya hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılması için kullanılır(Harmon ve ark., 1997; Elmore, 2007; Pistritto ve ark., 2016). Bu yolda herhangi bir bozulma, aşırı hücre ölümü (otoimmün hastalıklar) veya kanser gibi sorunlara yol açabilir.

Kanser hücrelerinde apoptotik hücre ölüm mekanizmasında düzensizlik mevcuttur. Apoptozis mekanizmasındaki bu değişiklikler yalnızca tümör gelişimi ve ilerlemesinden değil, aynı zamanda tümörün tedavilere direncinden de sorumludur. Klinik onkolojide şu anda kullanılan çoğu antikanser ilaç, kanser hücresi ölümünü tetiklemek için bozulmamış apoptotik sinyal yollarını kullanır. Bu nedenle, ölüm yollarındaki kusurlar ilaç direncine neden olabilir ve bu da tedavilerin etkinliğini sınırlar (Hanahan ve ark., 2011; Wong, 2011; Pistrutto ve ark., 2016). Bu nedenle, apoptotik hücre ölümü sinyal yollarının daha iyi anlaşılması kanser tedavisinin etkinliğini artırabilir.

Çalışmamızda FHM'nin içsel yolak üzerine olası etkisi apoptozda anahtar rol oynayan kaspazlardan biri olan Kaspaz-7 miktarına *in vitro* yöntemler ile bakılarak değerlendirilmiştir. Kaspaz seviyesinde gözlenen artış, Feniramin Hidrojen Maleatın A549 hücrelerini apoptoz yolu ile öldürdüğünü göstermektedir.

FHM'nin apoptoz dışsal yolak üzerine olası etkisi ise *in siliko* yöntemlerle incelenmiştir. Apoptoz dışsal yolağında yer alan Fas ligand reseptörü ve feniramin hidrojen maleat arasındaki olası etkileşim BIOVIA Discovery Studio Visualizer programında analiz edilerek *in siliko* olarak değerlendirilmiştir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 *IN SİLİKO* YÖNTEMLER

3.1.1. İlaç yeniden konumlandırma kapsamında Drug Central2023.org web server analizleri:

Feniramin hidrojen maleatın diğer kemoteröpatiklere benzerlikleri Drug Central 2023 web serverda yer alan L1000 gen profil benzerlik analizi ile belirlenmiştir. DrugCentral.org, ilaçlar ve etkileşimleri hakkında kapsamlı bilgi sağlayan çevrimiçi bir kaynaktır. Feniramin Maleatın ilaçlara ne kadar benzediğini tahmin etmek için RMSD ([Root Mean Square Deviation](#)) değeri 1'in altında) olup olmadığına bakılmıştır. İlaç yeniden konumlandırma kapsamında ilaç benzerliklerinin tespitinde sıkça kullanılan RMSD değerinin 1'in altında olması gerekmektedir. Bu şekilde RMSD değeri 1'in altında olan ilaçların yer aldığı tablolar oluşturularak FHM'nin hangi ilaçlara benzer olduğu ve bu ilaçların hangi hastalıklar için kullanıldığına dair bilgiler elde edilmiştir.

DrugCentral.org web sitesinde tarama:

Server üzerinde arama sekmesi kullanarak FHM'nin kimyasal yapıya ve/veya hedefe göre taraması yapılmıştır. Feniramin maleat için potansiyel ilaç-hedef etkileşim veri tabanı kullanılmış olup, potansiyel ilaç etkileşimlerini değerlendirmek için de ilaç-ilaç etkileşim bölümünden yararlanılmıştır. Bu analizde ilacın benzerlik değerini belirlemek için RMSD (Root Mean Square Deviation) değerleri kullanılmıştır. RMSD değeri 1'in altında olan ilaçlar ve bunların arasından antikanser ilaçlar belirlenmiş ve tablolar hazırlanmıştır

3.1.2.Fas Ligand Reseptör ve Feniramin maleat arasındaki etkileşimin moleküler docking yöntemi ile belirlenmesi

Ligand Yapısının Hazırlanması

Tez projesi kapsamında etkisi araştırılacak olan feniramin maleat'ın molekül yapısına PubChem'den erişim sağlandı.

Reseptör Proteinin Moleküler Docking İçin Hazırlanması

FHM ile olası etkileşimi araştırılacak olan reseptör proteininin (Fas ligand reseptörü) moleküler yapısı Protein Data Bank veritabanından elde edildi .

FHM/ Fas Ligand Reseptör Moleküler Docking Çalışması

Apoptoz dışsal yolağında yer alan Fas ligand reseptörü ve feniramin hidrojen maleat arasındaki olası ekileşim AutoDock Vina yazılımı kullanılarak belirlendi. Elde edilen veriler arasında en iyi bağlanma pozisyonu bağlanma afinitesi (kcal/mol)’ne göre seçilip kaydedildi. Fas ligand reseptörü ve feniramin hidrojen maleat arasındaki etkileşim BIOVIA Discovery Studio Visualizer programında analiz edilip görselleştirildi.

3.2. IN VITRO ÇALIŞMALAR

3.2.1. Hücre kültürü çalışmaları

Tez çalışmasında kullanılan İnsan KHD AK Akciğer Kanseri Hücre hattı A549 hücreleri satın alınmıştır (ATCC CCL-185). Hücreler teslim alındıktan hemen sonra, , DMEM (ATCC Kat No: 30-2002), (%10 FBS, Fetal Bovine Serum, Kat no:10270106 1000ml LIFE TECH) ve %1 antibiyotik (Kat no:G-400-10 Gentamisin 5gr GOLDBIO)) besiyeri içeren petri kaplarına açılarak %5 CO₂ ve 37 °C’ de inkübe edildi. Hücreler yeterince pasajlanıp stokları alındı ve stoklar -86 °C derin dondurucuda saklandı.

3.2.2. Besiyerlerinin Hazırlanması

%10’luk FBS içeren DMEM besiyerinin hazırlanması

%10’luk FBS içeren DMEM besiyeri hazırlamak için 500 mL’lik besiyeri içerisine 50 mL FBS (Fetal Sığır Serum), 5 mL esansiyel olmayan amino asit solüsyonu (Kat no: 11140-050 Non Essential Amino Acids Solution (100X) LIFE TECH), 2,5 mL sodyum pirüvat (11360-070 Sodium Pyruvate (100 mM) LIFE TECH) ve 1 mL antibiyotik çözeltisi ilave edilerek iyice karıştırıldı. Hazırlanan besiyerlerinin ağzı parafilmle sarılarak tarih atılarak kullanılıncaya kadar +4°C’ye kaldırıldı. Hücrelerle muamele edilmeden önce her kullanımda besiyerleri 37 °C’de ısıtıldı.

%1'lik FBS içeren DMEM besiyerinin hazırlanması

%1'lik FBS içeren DMEM besiyeri hazırlamak için 500 mL'lik besiyeri içerisine 5 mL FBS (Fetal Sığır Serum), 5 mL esansiyel olmayan amino asit solüsyonu, 2,5 mL sodyum piruvat ve 1 mL antibiyotik çözeltisi ilave edilerek iyice karıştırıldı. Hazırlanan besiyerlerinin ağzı parafilmle sarılarak tarih atılıp kullanılıncaya kadar +4°C'ye kaldırıldı. Hücrelerle muamele edilmeden önce her kullanımda besiyerleri 37 °C'de ısıtıldı.

Dondurma besiyerinin hazırlanması

Dondurma besiyeri için 95 mL FBS'nin içine 5 mL DMSO (Dimetil sülfoksit, Kat no: sc-358801 SANTACRUZ) sıvısı eklenerek karıştırıldı ve +4°C'de muhafaza edildi.

3.2.3. Feniramin Maleatın Hazırlanması

FHM, ticari olarak satın alındı (AVİL ampul IM/IV 45.5 mg/2 mL.Firma:Sandoz, ATC Kodu: R06AB05) Enjeksiyonluk formda satışta olan bu ürün etken madde olarak Feniramin Hidrojen Maleat (45,5 mg/2ml) ve steril su içermektedir. Bu nedenle, deneylerde her hangi bir çözücü kontrol kullanılmadı. Feniramin maleatın dozları literatüre göre belirlenerek hazırlandı İlacın, besiyerindeki proteinlerle etkileşimini en aza indirebilmek için %1 serum içeren besi yerinde, en yüksek dozu 100 µg/mL olacak şekilde, her seferinde ½ kez seyreltme yapılarak seri dilüsyon halinde 100, 50, 25, 12.5, 6.25 µg/ml olacak şekilde hazırlandı ve hemen hücrelere uygulandı. Ayrıca FHM 10, 1 ve 0.1 µg/ml olacak şekilde 10 kat sulandırılarak da hazırlandı ve hücrelere uygulandı. Böylece feniramin maleat 8 farklı konsantrasyonda hücrelere uygulanmış oldu.

3.2.4. Hücrelerin Deneyler İçin Bölünmesi

Hücrelerin tripsinasyonu

En az %70 confluence olan petrilerdeki tüm besiyeri pipetörle çekilerek uzaklaştırıldı.Hücrelerin üzerine %0,25 tripsin, %0,03 EDTA (Kat no:25200056 Trypsin 0.25% EDTA Life Tech) karışımından 2 mL eklendi ve inkübatörde yaklaşık 5dk inkübe edildi Mikroskop ile kontrol edilerek tüm hücrelerin kalkmaları beklendi. Kalkan hücreler %10'luk FBS içeren DMEM besiyeri ile falkon tüplere alındı ve 1000 rpm'de 5 dakika

santrifüj ile çökmesi sağlandı. Santrifüj sonrası üst kısımdaki süpernatant atıldı. Falcon tüpünün dibinde kalan hücre peleti ile çalışmalara devam edildi.

Hücrelerin proliferasyon deneyleri için 96-Kuyucuklu Plate'lere bölünmesi

Bir önceki basamaktan elde edilen falkon tüpünün dibindeki hücrelerin üzerine 10 mL %10'luk FBS içeren DMEM besiyeri eklenerek iyice karıştırıldı. Karıştırma işlemi sonrası 100 µL alınarak ependorf tüpün içerisine 900 µL %10'luk DMEM besiyeri koyularak 10 kat sulandırıldı. Sulandırma sonrası örnek Thoma lamında sayıldı. Dört tane 16 karenin bulunduğu Thoma lamında alanlardaki hücrelerin sayısının ortalaması alındı. Bu ortalama değer sulandırma katsayısı ve 10^4 ile çarpılarak mL'deki hücre sayısı elde edildi. Hücreler 96 kuyucuklu plaklara her kuyucuk başına 5×10^3 hücre olacak şekilde bölündü. Thoma lamında sayım sonucu $A \times SF \times 10.000$ formülü ile elde edildi. Burada A = 16 büyük karede sayılan hücre adedi (16 karenin ortalaması), SF ise seyreltme faktörüdür. 10.000 ise 0,1 mm³'deki sayım sonucunu 1 ml'deki sayıya dönüştürmek ve standart sonuç elde etmek için kullanılan bir değişmezdir ($1 \text{ mi} = 1 \text{ cc} = 1 \text{ cm}^3 = 10,000 \times 0,1 \text{ mm}^3$).

3.2.5. İlacın Bölünen Hücrelere Uygulanması

5.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu steril plaklara bölünen hücreler, yapışmaları için 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerin besiyerleri çekilerek her bir kuyucuğa farklı konsantrasyonlardaki (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 10, 1, 0,1 µg/ml) FHM 100 µl/kuyucuk olacak şekilde uygulandı. Konsantrasyon hesaplamalarında $M1 \times V1 = M2 \times V2$ formülü kullanıldı. M1: İlacın ana stok konsantrasyonu, V1: İlacın ana stoğundan alınacak hacim miktarı, M2: İlacın istenilen konsantrasyonu, V2: Uygulanacak toplam ilaç hacmi.

3.2.6. MTT (Metiltiazol Difenil Tetrazolyum) Testi ile Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

İlacın kanser hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisi olup olmadığı MTT (Kat no:PR-G3580 Promega celltiter 96 aqueous one solution cell proliferation kit) yöntemi ile belirlendi. MTT'nin canlı hücreler içerisine girmesiyle boyanın indirgenmesi sonucu mor renkli formazan tuzları meydana gelir ve bu sayede kolorimetrik ölçümlerle hücre canlılığı

belirlenmektedir. Metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı hücre proliferasyon testlerinde yaygın olarak MTT gibi tetrazolyum tuzları kullanılmaktadır. Temel olarak proliferasyona uğrayan hücrelerin artan süksinat dehidrojenaz enzim aktivitesi ile tetrazolyumu kullanarak formazan (mor) boya üretmesi sonucu görülen renk değişiminin absorbans olarak ELISA okuyucu ya da spektrofotometre ile ölçülmesine dayalıdır.

İlaç uygulamasının hemen arkasından, başlangıçtaki hücre sayısını belirlemek için başlangıç zamanı (Time Zero (T0)) okuması yapıldı. Bunun için T0 olarak belirlenen kuyucuklara MTT uygulandı. 4 saatlik inkübasyon süresi sonunda kuyucukların içindeki tüm besiyerleri pipet ile uzaklaştırılıp, her kuyucuğa 100 µl DMSO eklenerek 5 dakika karanlıkta bekletildi. 96 kuyucuklu plaka ELISA okuyucu ile 373 nm dalga boyunda okundu., Deneyler üç tekrarlı olacak şekilde yapıldı.

Bu okumanın ardından hücreler 24, 48 ve 72 saatlik periyotlarda inkübe edildi. Her bir inkübasyon süresi sonunda deneyler T0 okumasındaki gibi sonlandırıldı. Her biri kendi içinde 8 tekrarlı olmak üzere birbirinden bağımsız 3 farklı deney seti çalışıldı. Kombinasyon deneyleri için de her biri kendi içinde 8 tekrarlı olmak üzere birbirinden bağımsız 2 farklı deney seti çalışıldı.

Bu deney sonuçları GraphPad 8.0 istatistik programında tek yönlü ANOVA Testi ve Dunnett Testi ile değerlendirilip, kontrol grubu (ilaç uygulanmamış grup) ile karşılaştırılarak yorumlandı. IC₅₀ değeri GraphPad 8.0 istatistik programında nonlinear regresyon analizi ile belirlendi.

Doz taramaları sonrasında IC₅₀ dozu belirlendi. IC₅₀, ½ IC₅₀ ve 2xIC₅₀ dozlarında feniramin maleat ve pozitif kontrol olarak da 5-fluorourasil 5-FU (1.3 mg/ml) A-549 hücrelerine uygulandı. Ayrıca belirlenmiş bu IC₅₀ dozları 5FU ile kombine olarak da uygulandı.

3.2.7. Koloni oluşumu deneyi

Uygulanan ilaçların, hücreler üzerindeki metastatik etkisinin ve hücreler tek başına bırakıldığındaki davranışlarını belirlemek için koloni oluşum deneyi yapıldı. Her kuyucukta 2ml ortam içerisine 2000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara

A549 hücrelerinin ekimi yapıp, hücrelerin yapışması beklendi. MTT testi ile belirlenen IC_{50} , $\frac{1}{2} IC_{50}$ ve $2xIC_{50}$ değerlerinde feniramin hidrojen maleat tek başına ve her üç doz için 5-fluorourasil (IC_{50} 1.3 mg/ml) ile kombine olarak ilaçlar uygulandı ve inkübasyona bırakıldı. ve iki hafta boyunca hücrelerin büyümesi takip edildi. 14 gün sonunda hücreler metanol asetik asit fiksatif (3:1) ile 5 dakika süreyle fikse edildi. Hücreler %0,5'lik kristal viyole ile 20 dakika muamele edildikten sonra yıkanıp morfolojik görüntüleri elde edildi ve resimlendi. Her birine 1 ml %10 asetik asit eklendi ve iyice karıştırıldı. Oda sıcaklığında 1 saat çalkalayıcıda inkübe edildi. 595nm Elısa okuyucuda okundu. Kontrol olarak %10 asetik asit boş olarak okundu. Bu deney sonuçları GraphPad 8.0 istatistik programında tek yönlü ANOVA Testi ve Dunnett Testi ile değerlendirilip, kontrol grubu (ilaç uygulanmamış grup) ile karşılaştırılarak yorumlandı ve grafik haline getirildi.

3.2.8. Migrasyon deneyi

Uygulanan ilaçların lateral hücre göçü ve hücre-hücre etkileşimlerinin üzerine etkileri migrasyon deneyi ile belirlendi. A549 hücrelerinin her kuyucukta 5×10^4 hücre olacak şekilde 12 kuyucuklu plaklara ekimleri yapıldı ve hücrelerin yapışması beklendi. Hücreler confluent olduktan sonra besi yerleri uzaklaştırıldı ve üzerine PBS eklenerek, steril pipet ucuyla yara oluşturuldu. Yıkama sonrası belirlenen IC_{50} , $\frac{1}{2} IC_{50}$ ve $2xIC_{50}$ konsantrasyonlarda FHM, 5-fluorourasil ve bunların kombinasyonları uygulandı. 0, 24, 48. saatlerde hücrelerin mikroskop görüntüleri kaydedildi. ImageJ programında analiz edildi.

3.2.9. FHM'nin Kaspaz 7 Enzim Miktarı Üzerine Etkisinin ELISA ve Western Blot Yöntemi İle Belirlenmesi

Eliza yöntemi

Hücreler 12 well- plate'lere 5×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde bölünüp üzerine IC_{50} , $\frac{1}{2} IC_{50}$ ve $2xIC_{50}$ konsantrasyonlarda feniramin hidrojen maleat, 5-fluorourasil ve bunların kombinasyonları uygulandı. 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda deneyler sonlandırıldı, besi yerleri uzaklaştırıldı ve hücreler liziz edildikten sonra kit protokolüne uygun şekilde çalışıldı. Lizis protokolüne göre her bir inkübasyon süresi sonunda kontrol

ve ilaç gruplarındaki hücrelerin besi yerleri atıldı. Tripsin ile muamele edilen hücreler ependorf tüplere aktarıldı ve 20 dk boyunca 3000 RPM’de santrifüj edildi. Süpernatantlar atıldı ve hücre peletleri 1mL PBS ile çözüldü. Bu aşamada hücreler tekrarlayan soğuksıcak döngüleri ile parçalandı. Hücreler 5 dk buz içerisinde bırakıldı. Bu sürenin sonunda 5dk oda sıcaklığında bekletildi. Bu döngü 5 kez tekrarlandı. Hücreler tekrar 20 dk 3000 rpm’de santrifüj edildi. Süpernatantlar ya hemen çalışıldı ya da çalışılincaya kadar -80°C ‘de saklandı.

FHM’nin hücrelerdeki Kaspaz 7 enziminin miktarı üzerine etkilerini belirlemek için ELISA (Kat no: EK710398 Human Caspase 7(Casp-7)) kit kullanıldı. Bu kit bir Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Testidir (ELISA). Kit içindeki ELISA plate, insan kaspaz 7’ye özgü bir antikor ile önceden kaplanmıştır. Kaspaz-7 testinin her biri için standart kuyucuklara 50 µl standart solüsyonundan eklendi.

Solüsyon biyotinlenmiş antikor içerdiğinden standart kuyucuğa antikor eklenmedi. Örnek kuyucuklarına 50 µl kontrol ve lizatlardan eklendi ve ardından 10 µl İnsan Kaspaz-7 antikorunu koyuldu. Boş kontrol kuyucuğu hariç diğer tüm kuyucuklara 50 µl streptavidin-HRP eklendi. Pipetaj yapıldı. Üzeri kapatılarak, 37°C’de 60 dakika inkübe edildi. Süre sonunda yıkama tamponuyla 5 kez yıkandı. Her yıkama için kuyucuklara 300 µl yıkama tamponu koyuldu ve 1 dakika bekletildi. Plaka kurutucu kağıt üzerinde kurulandı. Her bir kuyucuğa 50 µl substrat çözeltisi A ve ardından her bir kuyucuğa 50 µl substrat çözeltisi B eklendi. Karanlıkta 37°C’de 10 dakika inkübe edildi. Süre sonunda her bir kuyucuğa 50 µl durdurma solüsyonu koyularak mavi rengin sarıya dönüşmesi gözlemlendi ve 10 dakika içinde 450 nm’de mikropilaka okuyucu kullanarak analiz edildi.

Western Blot Yöntemi

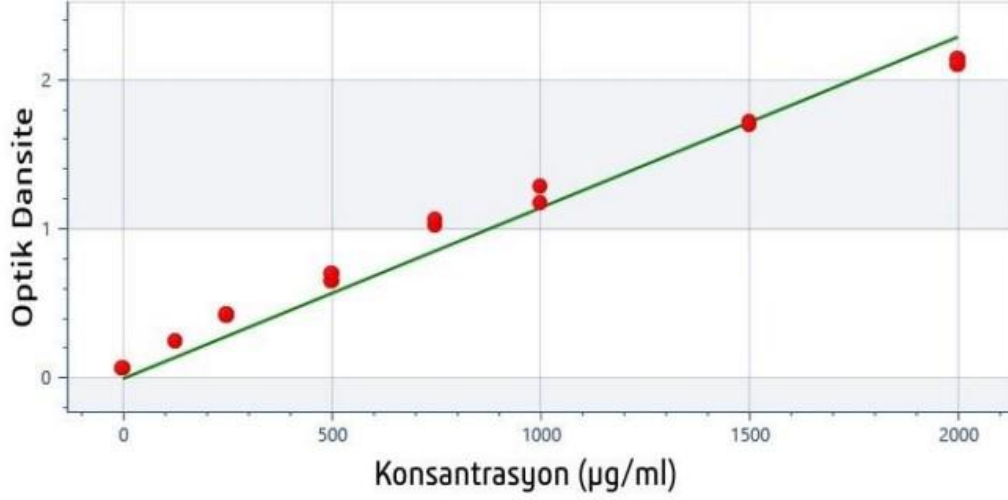
Hücre lizatı hazırlama:

Eliza test sonuçları doğrulamak ve gözlenen hücre ölümünün apoptoz kaynaklı olup olmadığını protein seviyesinde göstermek için, kaspaz-7 protein miktarı western blot yöntemi ile çalışılmıştır. A549 hücreleri 6 kuyucuklu plakalara her bir well başına 10^6 hücre olacak şekilde bölündü ve yapışmaları için 24 saat inkübe edildi. Daha sonra IC_{50} ,

$\frac{1}{2}$ IC₅₀ ve 2xIC₅₀ konsantrasyonlarda ilaçlar uygulanarak 24 ve 48 saat inkübe edildi. Kaspaz-7 enzim proteini sitoplazmik bir proteindir. Bu sebeple hücreler lizis tamponu (Tris-HCl (20mM, pH: 7.5)) kullanılarak lizis edildi. İnkübasyon süreleri sonunda besiyerleri uzaklaştırıldı ve kuyucuklara lizis tampon eklenerek hücre kazıyıcı yardımıyla kaldırılıp ependorf tüplere alındı. Lizis tampon içerisindeki hücreler ultrasonik homojenizatör yardımı ile 9000 rpm'de 10 saniye sonifike edildikten sonra +4°C'de 12500 rpm hızda 25 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısımları western blot analizinde kullanıldı.

Örneklerdeki protein miktar tayini

Örneklerdeki protein miktarı bikinkoninik asit (Kat no:23225 Pierce BCA Protein Assay, 1000mL, Thermo Scientific) test kiti ile belirlendi. Bu kitin içerisinde konsantrasyonu bilinen BSA standart solüsyonu ve çalışma solüsyonu bulunmaktadır. BSA standart solüsyonları 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125 µg/ml olacak şekilde dilüye edildi. Standartlar ve örnekler; 24 saatlik; kontrol, 2X IC₅₀, IC₅₀, 1/2X IC₅₀ ve 48 saatlik; IC₅₀, 1/2X IC₅₀ olmak üzere ELISA testinde anlamlı bulunan konsantrasyonlar uygulandı. İstatistiksel olarak anlamlı olmayan 48 saat inkübasyon süresin grubunda kombine kontrol, IC₅₀ ve 1/2X IC₅₀ konsantrasyonla da ayrıca denenmiştir.. Örneklerden 96 kuyucuklu plakalara iki tekrarlı olmak üzere 25 µl eklendi. Daha sonra kuyucuklara çalışma solüsyonundan 200 µl koyulup, plate 37 °C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 562 nm dalga boyunda eliza okuyucuda okunup veriler grafik olarak sunulmuştur.



Şekil 3.1 Protein - Standart Grafiği

Dikey elektroforez jeli için solüsyonların hazırlanması

- Ayrışma jeli solüsyonu (1.5 M Tris pH: 8.8)
18.17 g Tris (T-095-1 Tris 1kg GOLDBIO) tartılıp 40 ml distile suda çözüldükten sonra pH'ı HCl ile 8.8'e ayarlandı ve son hacim 100 ml olacak şekilde distile su eklendi.
- Yükleme jeli solüsyonu (0.5 M Tris pH: 6.8)
6.05 g Tris 60 ml distile suda çözülerek pH'ı HCl ile 6.8 olacak şekilde ayarlandı ve distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.
- Akrilamid-Bisakrilamid solüsyonu
Kullanıma hazır %30 akrilamid bisakrilamid (1610158 30% Acrylamide/Bis Solution, BIORAD) solüsyonu ile çalışıldı.
- Sodyum Dodesil Sülfat (SDS %10)
10 g SDS (M817034.1000 SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) MERCK) 100 ml distile suda çözüldü.

e. Amonyum Persülfat (APS %10)

0.1 g APS (A3678-25G Ammonium Persulfate SIGMA) 1 ml distile suda çözülüp, 200 µl küçük ependorf tüplere alikotlanarak -20 °C'ye kaldırıldı.

f. TEMED (N,N,N,N-Tetrametil Etilendiamin)

Akrilamid-bisakrilamid polimerizasyonu için kullanıma hazır solüsyon ile çalışıldı. (1610801 TEMED (50 ml) BIORAD)

Ayrışma (resolving) ve yükleme (stacking) jelinin hazırlanması

%10 Ayrışma jeli için 4 ml distile su, 3.3 ml % 30 akrilamid-bisakrilamid solüsyonu, 2.5 ml 1.5 M Tris (pH: 8.8), 100 µl %10 SDS, 100 µl %10 APS, 4 µl TEMED karıştırılarak hazır hale getirildi.

%5 Yükleme jeli için 3.4 ml distile su, 830 µl % 30 akrilamid-bisakrilamid solüsyonu, 630 µl 0.5 M Tris (pH: 6.8), 50 µl %10 SDS, 500 µl %10 APS, 5 µl TEMED dikkatlice karıştırılarak hazır duruma getirildi.

Ayrışma ve yükleme jelini hazırlamadan önce temizlenen camlar (%70'lik alkol ile) aparatları yardımı ile sabitlenerek jel dökme tankına dikkatlice yerleştirildi. % 10 ayrışma jeli hazırlanıp az bir süre vortekslenildi. İki cam arasına 5 ml ayrışma jeli eklenip, üzerine izopropanol ilave edilerek donması beklendi. Daha sonra izopropanol uzaklaştırıldı. Yükleme jeli hazırlandıktan sonra ayrışma jelinin üzerine yavaşça 2 ml döküldü ve 10 taraklı plastik aparat yerleştirilerek donması için beklendi.

SDS PAGE jel elektroforezi

Örneklerin hazırlanması

Protein konsantrasyonu belirlenen numunelerden kuyucuk başına 6.5 µg protein olacak şekilde alındı. Üzerine 3X DTT (ditiyotritol)'li leamli solüsyondan 3:1 oranında sulandırılacak şekilde 10 µl ilave edilerek her kuyucuk için toplam 25 µl hacim olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra bu örnekler 95 °C'de 5 dakika denatüre edildi.

Elektroforez işlemi

Hazırlanan jel donduktan sonra elektroforez tankına aktarıldı. Camların olduğu bölüm ve tank Running solüsyon (1X) ile dolduruldu. 10X Running solüsyonu elde etmek için 30 g Tris base, 144 g glisin ve 10 g SDS tartıldı ve 900 ml distile suda iyice karıştırılarak çözüldü. pH'sı HCl yardımı ile 8.3'e ayarlanıp, distile su ile 1 L'ye tamamlandı. Solüsyon elektroforez için 1:10 oranında seyreltilerek 1X şeklinde hazırlandı. Yükleme jelindeki taraklar çıkarıldı ve örnekler mikropipet yardımı ile kuyucuklara yüklendi. Boş bırakılan ilk kuyucuğa moleküler ağırlıkları bilinen ladder yüklendi. Anot ve katot işaretleri dikkate alınarak elektroforez kapağı kapatıldı ve güç kaynağına bağlandı. 15 mA güçte çalıştırılarak numunelerin yükleme jelini geçip ayrışması beklendi. Bu aşamadan sonra elektroforez 18 mA güce alındı. 2 saat kadar süreç devam etti. Leamlı solüsyonu ile işaretlenmiş olan örnekler jelin en altınageline elektroforez işlemi durduruldu.

Transfer İşlemi

Transfer işlemi için 10X transfer solüsyonu hazırlandı ve 1:10 oranında seyreltilti. 24.2 gr Tris, 112.5 gr Glisin 1L distile su yardımıyla çözüldü. Transfer solüsyonu 1X'e seyreltilirken %20 metanol eklendi. Jel transfer için hazırlanmadan önce büyük bir kap 1X transfer solüsyon ile dolduruldu. Transfer kasedi, süngerler ve filtre kağıtları transfer solüsyonu içine koyuldu. 2 dakika süresince PVDF membran metanol ile muamele edilip, transfer solüsyonu içine cımbız ile aktarıldı. Transfer kasetinin negatif tarafı aşağı gelecek şekilde transfer solüsyonuna yatırıldı. Sandviç sünger-iki adet filtre kağıdı-PVDF membran-jel-iki adet filtre kağıdı-sünger olacak şekilde dikkatlice yerleştirildi. Hava kabarcıkları silindir veya serolojik pipet yardımıyla giderildi. Transfer kaseti uygun şekilde sıkıştırılarak tankın içine yerleştirildi ve güç kaynağına bağlandı ve 4°C'de 250 mA güçte 2 saat transfere bırakıldı.

İmmünblotlama işlemi

İmmünblotlama işlemi için gerekli solüsyonlar TBS, TBST ve bloklama solüsyonlarıdır. 10X TBS solüsyonu için 24.23 gr Tris-HCl ve 80.06 gr NaCl 900 ml distile su yardımıyla çözüldü. pH'sı 7.6 ve son hacim 1L olacak şekilde ayarlandı. TBST hazırlamak için 10X TBS solüsyonundan 100 ml alındı ve 899 ml distile su ilave edildi. Daha sonra 1ml

Tween-20 ilave edilerek son hacim 1L'ye ayarlandı. Bloklama solüsyonu yağsız süt tozu veya BSA (Bovin Serum Albumin) ile hazırlanmaktadır. Bizim çalışmamızda kullanılan antikor için bloklama ve primer antikor seyreltme aşamalarında BSA önerilmiştir. Transfer sonrası ladder kontrol edildi. Protein transferinin başarılı olduğunu doğrulamak ve protein bantlarını görselleştirmek için membran 30 saniye boyunca Ponceau S (geri dönüşümlü bir protein boyası) ile boyandı ve protein bantları gözlemlendi. Membran berraklaşana kadar 1x TBST içinde yıkandı. %5 Bloklama solüsyonu hazırlamak için 1 gr BSA 20 ml TBST içinde çözüldü. Membran 1 saat süresince oda sıcaklığında %5 bloklama solüsyonu ile rotator cihazında inkübasyona bırakıldı. Bloklama antikorun membrana spesifik olmayan bir şekilde bağlanmasını önler. Bloklama sonrası membran TBST solüsyonu ile rotator cihazında 10 dakika-10 dakika-5 dakika aralıklarla üç kez yıkandı. Bloklamadan sonra membran, primer antikoru içeren bir çözeltide inkübe edildi. Satın alınan markanın önerisine göre antikor %5 BSA'lı TBST solüsyonu içinde 1:1000 seyreltme olacak şekilde hazırlandı (5 ml içinde 5 µl antikor). Birincil antikor, ilgili proteinin epitopunu veya spesifik amino-asit dizisini tanır ve bağlar. Membran primer antikor ile +4°C'de gece boyunca rotator cihazında inkübe edildi. Inkübasyon sonrası membran TBST solüsyonu ile üç kez yıkandı. Bu aşama sonrasında membran TBST ile hazırlanmış HRP (Horse-Radish Peroxidase) konjuge rabbit sekonder antikor (1:200000 seyreltme) ile 2 saat oda sıcaklığında rotator cihazında inkübe edildi. Sekonder antikor primer antikoru tanır.

Tespit işlemi (kemilüminesans)

TBST solüsyonu içinden alınan membran görüntüleme sisteminin kapağına yerleştirildi. ECL solüsyonu membrana damlatıldı ve 1 dk dakika beklendi. Membran üzerindeki fazla ECL substratı bir peçete ile emdirildi. Membran, ChemiDoc kemilüminesans görüntüleme sistemi ile görüntülenerek fotoğrafları alındı. Bantlar ImageJ programı kullanılarak analiz edildi.

Membran stripleme ve beta aktin antikor işaretleme

Stripleme, beta aktin gibi yükleme kontrol proteinlerinin değerlendirilmesi için kullanılan bir yöntemdir. Öncelikle stripping solüsyonu hazırlandı. Stripping solüsyon için 6.25 ml 1 M Tris HCl (pH:6.8), 10 ml %20 SDS ve 700 µl beta merkaptotanol toplam hacim 100 ml olacak şekilde distile suda hazırlandı. Membranın rotator cihazında 1 saat inkübasyona bırakılması ile primer ve sekonder antikorlar membrandan uzaklaştırıldı. Bloklama işleminden kemilüminesans görüntüleme işlemine kadar aynı aşamalar tekrar uygulandı.

İstatistiksel analizler

Deneylerden elde edilen verilerin değerlendirilmesi ve grafiklendirilmesi için GraphPad Prism 8.0 programı kullanılmıştır. Grup içi değerlendirmeler için Dunnett's Multiple Comparison post-test ve tek yönlü ANOVA, IC₅₀ değerlerinin hesaplanması için lineer olmayan regresyon analizi kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. *IN SİLİKO* ÇALIŞMALAR

4.1.1. İlaç yeniden konumlandırma kapsamında Drug Central2023.org web server analizleri:

Feniramin hidrojen maleatın diğer kemoteröpatiklere benzerlikleri Drug Central 2023 web serverda yer alan L1000 gen profil benzerlik analizi ile belirlendi. Feniramin Maleat benzerlik analizinde RMSD ([Root Mean Square Deviation](#)) değeri 1'in altında olan 13106 ilaç tablo haline getirildi. Bunların içinden RMSD değeri 1'e en yakın olanlar (213 ilaç) seçildi. 213 ilacın hangi hastalıklarda kullanıldıkları araştırılıp tablo oluşturuldu. Bu tablodan faydalanılarak feniramin hidrojen maleata benzerlik oranı yüksek olan (RMSD değeri 1'e en yakın) antikanser ilaçların bulunduğu bir başka veri tablosu oluşturuldu.

Tablo 4.1. DrugCentral web analiz sitesine göre FHM'ye benzeyen ilaçların listesi (Ursu ve ark., 2017)

İlaç 1	İlaç 2	Hücre_Hattı	RMSD <1	HASTALIK
Feniramin	Acadesine	HT29 (İnsan Kolorektaladenokarsinom Hücre Hattı)	0,9638203199 11241	Kardiyoloji
Feniramin	Acamprosate	HT29 (İnsan Kolorektaladenokarsinom Hücre Hattı)	0,9277635563 26971	Alkol Tedavisi
Feniramin	Acepromazine	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9122440527 05288	Yatıştırıcı (Kedi Ve Köpeklerde)
Feniramin	Acitretin	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9353925908 59814	Sedef Hastalığı
Feniramin	Amantadine	PHH (Birincil İnsan Hepatositleri)	0,9195654175 35444	Parkinson Hastalığı
Feniramin	Amantadine	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9839018239 9772	Parkinson Hastalığı
Feniramin	Diflorasone	HT29 (İnsan Kolorektaladenokarsinom Hücre Hattı)	0,9284005437 48483	Eksama Tedavisi (Krem)
Feniramin	Diflorasone	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,8543448344 00255	Eksama Tedavisi (Krem)
Feniramin	Cyproterone	HT29 (İnsan Kolorektaladenokarsinom Hücre Hattı)	0,9612247524 26759	Prostat Kanseri
Feniramin	Cyproterone	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9005625815 99442	Prostat Kanseri

Tablo 4.1'in Devamı

İlaç 1	İlaç 2	Hücre_Id	RMSD <1	HASTALIK
Feniramin	Amoxapine	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9320555628 18658	Antidepresan
Feniramin	Amperozide	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9944566148 78384	Antidepresan
Feniramin	Anagrelide	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9346028042 56589	Trombositemi Tedavisinde
Feniramin	Aprepitant	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9912551931 46871	Kemoterapiye Bağlı Bulantı Ve Kusma
Feniramin	Beclometasone Dipropionate	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9805652847 97261	Saman Nezlesi
Feniramin	Diphenidol	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,8979053099 54721	Vertigo
Feniramin	Bifemelane	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9391170956 73908	Glokom Tedavisi
Feniramin	Brinzolamide	A375 (Insan Melanoma Hücre Hattı)	0,9595514442 98766	Glokom Tedavisi
Feniramin	Bromhexine	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9919473406 60171	Bronşit
Feniramin	Bromfeniramin	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9965296808 95028	Antihistaminik
Feniramin	Budesonide	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9099339325 96511	Astım
Feniramin	Calcifediol	HT29 (Insan Kolonrektaladenokarsinom Hücre Hattı)	0,9943223351 21046	Raşitizm

Tablo 4.1'in Devamı

İlaç 1	İlaç 2	Hücre_Id	RMSD <1	HASTALIK
Feniramin	Calcifediol	PHH (Primer İnsan Hepatosit)	0,8762930805 82817	Raşitizm
Feniramin	Potassium Canrenoate	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9552510824 72298	Antimineralokort ikoid
Feniramin	Captopril	A375 (İnsan Melanoma Hücre Hattı)	0,8864179256 72091	Hipertansiyon
Feniramin	Carprofen	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9069490679 76907	Ağrı Kesici
Feniramin	Cefixime	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9665442521 65879	Antibiyotik
Feniramin	Chlortalidone	ASC (İnsan Adipoz-Kökenli Mezenkimal Stromal Hücreleri)	0,9740875726 25822	Hipertansiyon
Feniramin	Cianidanol	NPC (Nazofarengeal Karsinoma)	0,9722460709 99782	Antioksidan
Feniramin	Cyclacillin	A375 (İnsan Melanoma Hücre Hattı)	0,9736741965 93785	Antibiyotik
Feniramin	Cyclacillin	NPC (Nazofarengeal Karsinoma)	0,9802110219 26477	Antibiyotik
Feniramin	Cinalukast	A375 (İnsan Melanoma Hücre Hattı)	0,9871372632 78188	Anti-Tussif
Feniramin	Clomipramine	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9448439694 70393	Antidepresan
Feniramin	Cortisoneacetate	HT29 (İnsan Kolorektaladenokarsinom Hücre Hattı)	0,9526297380 19276	Alerji, Astım

Tablo 4.1'in Devamı

İlaç 1	İlaç 2	Hücre_Id	RMSD <1	HASTALIK
Feniramin	Dantrolene	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9616945460 89914	Kas Gevşetici
Feniramin	Decitabine	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,8243887785 12362	Akut Myeloblastik Lösemi
Feniramin	Dexbromfeniramin	HT29 (Insan Kolorektaladenokarsinom Hücre Hattı)	0,9629357494 51523	Antihistaminik
Feniramin	Dexrazoxane	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9734395848 70013	Kardiyomyopati
Feniramin	Dibenzepin	PHH (Primer İnsan Hepatosit)	0,9943233499 86455	Antidepresan
Feniramin	Dibenzepin	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9709251226 51809	Antidepresan
Feniramin	Dienestrol	NPC (Nazofarengeal Karsinoma)	0,9934903988 59377	Vajinit Tedavisi(Krem)
Feniramin	Diethylcarbamazın	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9790588022 1001	Anthelmintik
Feniramin	Diethylstilbestrol	PHH (Primer İnsan Hepatosit)	0,9540886648 78072	Meme Kanseri
Feniramin	Diflunisal	PHH (Primer İnsan Hepatosit)	0,9469123642 38691	Antiinflatuar
Feniramin	Dihydroergotamin	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9566747997 54249	Migren Tedavisi
Feniramin	Hydroquinidine	NPC (Nazofarengeal Karsinoma)	0,9812387305 01147	Antiaritmik

Tablo 4.1'in Devamı

İlaç 1	İlaç 2	Hücre_Id	RMSD <1	HASTALIK
Feniramin	Diloxanidefuroate	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9646873409 86471	Parazit Tedavisinde
Feniramin	Dipyridamole	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9995990756 09962	Kardiyoloji
Feniramin	Domperidone	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9575267533 97385	Bulantı Ve Kusma
Feniramin	Doxylamine	PHH (Primer Insan Hepatosit)	0,9667131128 27767	Antihistaminik
Feniramin	Enalapril	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9072074457 41154	Hipertansiyon
Feniramin	Entecavir	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,8521637975 53335	Antiviral
Feniramin	Epirizole	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9874196098 39175	Antiinflamatuvar
Feniramin	Ergometrine	PHH (Primer Insan Hepatosit)	0,9792669012 43717	Rahim Kanaması
Feniramin	Erlotinib	PHH (Primer Insan Hepatosit)	0,9663478176 86741	Akciğer Kanseri
Feniramin	Erlotinib	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9220573322 35376	Akciğer Kanseri

Tablo 4.1'in Devamı

İlaç 1	İlaç 2	Hücre_Id	RMSD <1	HASTALIK
Feniramin	Erythromycin	PHH (Primer İnsan Hepatosit)	0,9968060113 93324	Antibiyotik
Feniramin	Etamivan	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9505012000 16335	Susuz Kalma (Aynı Zamanda Doping)
Feniramin	Etomidate	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9548673446 51868	Genel Anestetik
Feniramin	Febuxostat	ASC (İnsan Adipoz-Kökenli Mezenkimalstromal Hücreleri)	0,9799894729 68449	Gut Hastalığı
Feniramin	Febuxostat	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9681983612 33013	Gut Hastalığı
Feniramin	Fenbufen	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9794716093 05622	Non-Steroida
Feniramin	Fenoldopam	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9715260388 10391	Hipertansiyon
Feniramin	Flavoxate	PHH (Primer İnsan Hepatosit)	0,9417094417 49173	Üriner Sistem Enf
Feniramin	Fluconazole	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9093158837 2935	Mantar Tedavisi

Tablo 4.1'in Devamı

İlaç 1	İlaç 2	Hücre_Id	RMSD <1	HASTALIK
Feniramin	Fluocinonide	A375 (İnsan Melanoma Hücre Hattı)	0,9702148146 57418	Antibiyotik (Krem)
Feniramin	Flupentixol	ASC (İnsan Adipoz-Kökenli Mezenkimalstromal Hücreleri)	0,9675129403 26787	Antipsikotik
Feniramin	Gamolenicacid	HT29 (İnsan Kolorektaladenokarsinom Hücre Hattı)	0,8960280747 64903	Otoimmün Hastalıkların Tedavisi
Feniramin	Gamolenicacid	PHH (Primer İnsan Hepatosit)	0,9498769286 83009	Otoimmün Hastalıkların Tedavisi
Feniramin	Glipizide	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9939393541 82189	Antidiyabetik
Feniramin	Gliquidone	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9699398187 24588	Antidiyabetik
Feniramin	Glibenclamide	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9983348711 72216	Antidiyabetik
Feniramin	Hexylcaine	ASC (İnsan Adipoz-Kökenli Mezenkimalstromal Hücreler)	0,9974233029 22626	Lokal Anestezik
Feniramin	Hexylcaine	HT29 (İnsan Kolorektaladenokarsinom Hücre Hattı)	0,9357985891 73157	Lokal Anestezik
Feniramin	Hexylcaine	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,8427839264 22538	Lokal Anestezik
Feniramin	Hydralazine	A375 (İnsan Melanoma Hücre Hattı)	0,9833481226 03697	Hipertansiyon

Tablo 4.1'in Devamı

İlaç 1	İlaç 2	Hücre_Id	RMSD <1	HASTALIK
Feniramin	Iloprost	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9973665483 33309	Kardiyoloji
Feniramin	Imatinib	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9323539325 69442	Kronik Miyeloid Lösemi (KML) Gastrointestinalst romal Tümörlerin (GİST) Tedavisi
Feniramin	Iobenguane	A375 (Insan Melanoma Hücre Hattı)	0,9951688521 41928	Böbrek Üstü Bezi Ve Tiroid Bezi Tümörlerinin Tedavisinde
Feniramin	Adipiodone	HT29 (Insan Kolorektaladenokarsinom Hücre Hattı)	0,9880903001 64754	Radyokontrast Madde
Feniramin	Ipratropium	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9780954202 38455	Antikolinergikler
Feniramin	Iproniazid	HT29 (Insan Kolorektaladenokarsinom Hücre Hattı)	0,9115988315 65507	TBC/Antidepres an
Feniramin	Isocarboxazid	A375 (Insan Melanoma Hücre Hattı)	0,9972116828 18826	Antidepresan
Feniramin	Ketoprofen	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9465366899 57589	Antiinflamatuvar
Feniramin	Ketotifen	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9126479625 22652	Konjonktivit,Ale rjik Rinit

Tablo 4.1'in Devamı

İlaç 1	İlaç 2	Hücre_Id	RMSD <1	HASTALIK
Feniramin	Lamotrigine	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,8919743007 7901	Epilepsi
Feniramin	Lidocaine	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9672087649 26106	Antialerjik
Feniramin	Lopinavir	PHH (Primer İnsan Hepatosit)	0,9913933304 40707	Antiviral
Feniramin	Lovastatin	PHH (Primer İnsan Hepatosit)	0,9941445346 87665	Hiperkolesterole mi, Antihiperlipidem ik
Feniramin	Mebendazole	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9267342116 77001	Antihelmintik
Feniramin	Mebeverine	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9214585090 00701	Anti-Spazmodik
Feniramin	Mefenamicacid	HT29 (Insan Kolorektaladenokarsinom Hücre Hattı)	0,9072667981 21157	NSAII (Non- Steroid Anti- Inflamatuvar)
Feniramin	Meptazinol	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9447682708 4766	Opioid Analjezik
Feniramin	Mesna	HT29 (Insan Kolorektaladenokarsinom Hücre Hattı)	0,9762337902 08727	Akrolein Toksitesine Karşı Koruyucu (Anti-Hemorajik Etki)
Feniramin	Methocarbamol	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9589107579 55399	Myorelaxan

Tablo 4.1'devamı

İlaç 1	İlaç 2	Hücre_Id	RMSD <1	HASTALIK
Feniramin	Levomepromazine	HT29 (Insan Kolorektaladenokarsinom Hücre Hattı)	0,9805980740 6431	Antipsikotik
Feniramin	Levomepromazine	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9818245100 22927	Antipsikotik
Feniramin	Naltrexone	PHH (Primer Insan Hepatosit)	0,9698044365 85295	Opioid Kullanım Bozukluğu Tedavisi, Endorfin Yükseltici Etki
Feniramin	Metoclopramide	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9621529034 20139	Anti-emetik
Feniramin	Metolazone	PHH (Primer Insan Hepatosit)	0,9625149775 21194	Antihipertansif
Feniramin	Metolazone	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9792986028 93975	Antihipertansif
Feniramin	Milrinone	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,8836609002 174	Kalp Yetmezliği Tedavisi, Pulmoner Vazodilatatör
Feniramin	Minoxidil	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,8168673883 15864	Vazodilatatör, Kellik (Alopesi) Tedavisi
Feniramin	Moexipril	PHH	0,9457353844 0688	Anti-Hipertansif
Feniramin	Mofezolac	HT29 (Insan Kolorektaladenokarsinom Hücre Hattı)	0,9970527699 10245	NSAII (Non-Steroid Anti-Inflamatuvar)

Tablo 4.1'in Devamı

İlaç 1	İlaç 2	Hücre_Id	RMSD <1	HASTALIK
Feniramin	Mofezolac	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9144686796 72862	NSAII (Non-Steroid Anti-Inflamatuvar)
Feniramin	Moxifloxacin	PHH (Primer İnsan Hepatosit)	0,9995872052 70273	Antibiyotik
Feniramin	Moxifloxacin	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9540197753 79673	Antibiyotik
Feniramin	Moxonidine	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9833598778 94116	Antihipertansif
Feniramin	Mycophenolate Mofetil	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9503879077 41471	Transplantasyon Sonrası Kullanılan Inozine Monofosfat Dehidrogenaz İnhibitörü
Feniramin	Naftifine	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9876926624 89018	Antifungal
Feniramin	Nalbuphine	PHH (Primer İnsan Hepatosit)	0,8757663040 28576	Opioid Analjezik
Feniramin	Nemonapride	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9425831474 44197	Antipsikotik
Feniramin	Niflumicacid	A375	0,8951268884 07559	Ağrı Kesici
Feniramin	Nilutamide	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,8648863146 1131	Non Steroid Antiandrojen (NSAA), Prostat Tedavisi

Tablo 4.1'in Devamı

İlaç 1	İlaç 2	Hücre_Id	RMSD <1	HASTALIK
Feniramin	Nitrendipine	PHH (Primer İnsan Hepatosit)	0,9476905019 57742	Antihipertansif
Feniramin	Nitrendipine	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9171053456 45007	Antihipertansif
Feniramin	Nomegestrol Acetate	PHH (Primer İnsan Hepatosit)	0,9504523894 75907	Progestin İlacı, Hormon Tedavisi
Feniramin	Nomegestrol Acetate	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9851970920 66234	Progestin İlacı, Hormon Tedavisi
Feniramin	Nomifensine	A375 (İnsan Melanoma Hücre Hattı)	0,9288913562 76715	Antidepresan
Feniramin	Norepinephrine	A375 (İnsan Melanoma Hücre Hattı)	0,9853247874 54125	Katekolamin, Kardiyak Stimulan
Feniramin	Norethisterone	PHH (Primer İnsan Hepatosit)	0,9050948399 71219	Progestin İlacı, Hormon Tedavisi
Feniramin	Nortriptyline	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9038722601 64674	Antidepresan
Feniramin	Olmesartan Medoxomil	PHH (Primer İnsan Hepatosit)	0,9504558911 50867	Antihipertansif
Feniramin	Oxyphenonium	HT29 (İnsan Kolorektaladenokarsinom Hücre Hattı)	0,9487086116 94995	Antihipertansif
Feniramin	Ozagrel	ASC (İnsan Adipoz-Kökenli Mezenkimalstromal Hücreleri)	0,9933425548 41721	Antihipertansif

Tablo 4.1'in Devamı

İlaç 1	İlaç 2	Hücre_Id	RMSD <1	HASTALIK
Feniramin	Ozagrel	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9767201035 86533	Antihipertansif
Feniramin	Papaverine	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9530406407 46795	Opioid Alkaloid, Vazodilatatör
Feniramin	Pargyline	HT29 (Insan Kolorektaladenokarsinom Hücre Hattı)	0,9006499101 38837	MAO İnhibitör, Antihipertansif, Antikanser
Feniramin	Pargyline	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,8834242838 1051	MAO İnhibitör, Antihipertansif, Antikanser
Feniramin	Benzylpenicillin	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9401691753 91692	Antibiyotik
Feniramin	Pergolide	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9758839502 1652	Parkinson, Dopamin Reseptör Agonisti
Feniramin	Perindopril	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9224919753 39191	Antihipertansif, ACE İnhibitör
Feniramin	Phenolphthalein	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9663220380 68337	Asit-Baz İndikatörü
Feniramin	Phenprobamate	A375 (Insan Melanom Hücre Hattı)	0,9509960835 18006	Kas Gevşetici
Feniramin	Phenylbutazone	HEPG2 (Insan Hepatoblastoma Hücre Hattı)	0,9743971020 80652	NSAII (Non- Steroid Anti- İnflamatuvar)
Feniramin	Phenylbutazone	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9000227708 91639	NSAII (Non- Steroid Anti- İnflamatuvar)

Tablo 4.1'in Devamı

İlaç 1	İlaç 2	Hücre_Id	RMSD <1	HASTALIK
Feniramin	Pioglitazone	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9783421016 17962	Antidiyabetik
Feniramin	Piretanide	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9169926945 91943	Diüretik, Antihipertansif
Feniramin	Piroxicam	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9498022267 82579	NSAII (Non- Steroid Anti- Inflamatuvar)
Feniramin	Pivmecillinam	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9982527712 42736	Antibiyotik
Feniramin	Prilocaine	A375	0,9211659134 06514	Lokal Anestezik
Feniramin	Procarbazine	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9316283155 34727	Kemoterapötik
Feniramin	Prochlorperazine	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9064084081 25889	Antipsikotik, Antiemetik
Feniramin	Progesterone	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9109867285 8592	Steroid Hormon
Feniramin	Proguanil	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9858231544 86065	Sıtma Hastalığı Tedavisi
Feniramin	Propantheline	A375 (Insan Melanoma Hücre Hattı)	0,9745930467 72754	Antikolinerjik
Feniramin	Proparacaine	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9379309451 26989	Topikal Anestezik
Feniramin	Raltegravir	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,8887407610 37932	Antiretroviral İlaç

Tablo 4.1'in Devamı

İlaç 1	İlaç 2	Hücre_Id	RMSD <1	HASTALIK
Feniramin	Ranolazine	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,8850818725 97479	Anjina Pektoris Tedavisi
Feniramin	Rescinnamine	A375 (İnsan Melanoma Hücre Hattı)	0,9521592963 70914	Antihipertansif, ACE İnhibitör
Feniramin	Retinol Acetate	ASC (İnsan Adipoz-Kökenli Mezenkimalstromal Hücreleri)	0,9859655002 20748	Vitamin A Türevi
Feniramin	Rifabutin	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9232812602 98338	Antibiyotik
Feniramin	Rifampicin	ASC (İnsan Adipoz-Kökenli Mezenkimalstromal Hücreleri)	0,9714247270 82056	Antibiyotik
Feniramin	Rifampicin	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9910598820 89887	Antibiyotik
Feniramin	Rilmenidine	PHH (Primer İnsan Hepatosit)	0,9676477815 42643	Antihipertansif
Feniramin	Rilmenidine	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9742246016 77978	Antihipertansif
Feniramin	Riluzole	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,8600773792 01122	Nöroprotektif, Amiyotrofik Lateral Skleroz Tedavisi
Feniramin	Spectinomycin	A375 (İnsan Melanoma Hücre Hattı)	0,8342260452 88244	Antibiyotik
Feniramin	Spectinomycin	HT29 (İnsan Kolorektaladenokarsinom Hücre Hattı)	0,9447169793 41433	Antibiyotik

Tablo 4.1'in Devamı

İlaç 1	İlaç 2	Hücre_Id	RMSD <1	HASTALIK
Feniramin	Succimer	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9143300913 07863	Ağır Metal Şelatörü, Zehirlenme Tedavisi
Feniramin	Talipexole	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,8558804974 23026	Dopamin Reseptör Agonisti, Parkinson Tedavisi
Feniramin	Telmisartan	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9027377493 94558	Antihipertansif, Ang II Reseptör Antagonisti
Feniramin	Tenoxicam	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9966781515 92948	NSAII (Non- Steroid Anti- Inflamatuvar)
Feniramin	Terguride	PHH (Primer Insan Hepatosit)	0,9904773759 89701	Dopamin Reseptör Agonisti, Parkinson Tedavisi
Feniramin	Tetracycline	A375 (Insan Melanoma Hücre Hattı)	0,8860341869 55506	Antibiyotik
Feniramin	Tetracycline	HT29 (Insan Kolorektaladenokarsinom Hücre Hattı)	0,8939703757 81807	Antibiyotik
Feniramin	Sapropterin	HT29 (Insan Kolorektaladenokarsinom Hücre Hattı)	0,9987779536 48322	Fenilketonüri Tedavisi
Feniramin	Thalidomide	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9768142628 00346	İmmüsupressif
Feniramin	Tolazamide	PHH (Primer Insan Hepatosit)	0,9230987916 56448	Antidiyabetik

Tablo 4.1'in Devamı

İlaç 1	İlaç 2	Hücre_Id	RMSD <1	HASTALIK
Feniramin	Tolazamide	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,8477387212 91961	Antidiyabetik
Feniramin	Tolmetin	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,8642556897 68057	NSAII (Non-Steroid Anti-Inflamatuvar)
Feniramin	Tranilast	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9722455631 10113	Antihistaminik, Antiallerjik
Feniramin	Trazodone	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9526506020 03599	Antidepresan
Feniramin	Triamterene	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9956240124 78616	Antihipertansif, Diüretik
Feniramin	Trimetho Benzamide	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9997282474 68265	Antiemetik
Feniramin	Tropisetron	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9298585821 60402	Antiemetik, Serotonin Geri Alım İnhibitörü
Feniramin	Vardenafil	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9201740052 95001	PDE5 İnhibitörü, Cinsel İşlev Bozukluğu Tedavisi
Feniramin	Vecuronium	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,8964254407 5679	Nöromusküler Blokör, Genel Anestezi
Feniramin	Venlafaxine	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9443482529 38032	Antidepresan, Serotonin Geri Alım İnhibitörü
Feniramin	Phytomenadione	A375 (Insan Melanoma Hücre Hattı)	0,9351141521 82444	Vitamin K1
Feniramin	Warfarin	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,8327449747 15946	Antikoagülan, Kalp Ve Damar Hastalıkları

Tablo 4.1'in Devamı

İlaç 1	İlaç 2	Hücre_Id	RMSD <1	HASTALIK
Feniramin	Zoxazolamine	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9765550562 43225	Kas Gevşetici, Spazm Çözücü
Feniramin	Zuclopenthixol	ASC (İnsan Adipoz-Kökenli Mezenkimalstromal Hücreleri)	0,9705370729 49127	Antipsikotik
Feniramin	Teicoplanin	HT29 (İnsan Kolorektaladenokarsinom Hücre Hattı)	0,9853258615 85251	Antibiyotik
Feniramin	Cholicacid	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9923812382 51878	Safra Asidi
Feniramin	Dantron	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9983644033 53832	Genotoksik, Oral Kavite Hastalıkları
Feniramin	Diiodotyrosine	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,8751732103 21952	Tiroid Hastalıkları
Feniramin	Dioxybenzone	PHH (Primer İnsan Hepatosit)	0,9201997235 43189	UV Bariyer (Güneş Kremi)
Feniramin	Lenalidomide	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9368484533 78204	Multiple Myelom Tedavisi
Feniramin	Meclocycline	HT29 (İnsan Kolorektaladenokarsinom Hücre Hattı)	0,9943338581 92347	Antibiyotik
Feniramin	Meclocycline	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9674769504 17854	Antibiyotik

Tablo 4.1'in Devamı

İlaç 1	İlaç 2	Hücre_Id	RMSD <1	HASTALIK
Feniramin	Naphazoline	PHH (Primer İnsan Hepatosit)	0,9808230181 94509	Dekonjestan
Feniramin	Pentetrazol	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9643811146 38805	Proton Pompa Inh. Mide Ülser Tedavisi Vs
Feniramin	Roquinimex	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9665326713 28956	İmmun Stimulan
Feniramin	Tamibarotene	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9918508514 44739	Akut Promyelositik Lösemi Tedavisi
Feniramin	Vincamine	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9915584605 5223	Kanser, Alzheimer Vs Tedavisi
Feniramin	Benidipine	A375 (İnsan Melanoma Hücre Hattı)	0,9771004671 18912	Anti Hipertansif Kalsiyum Kanal Blokörü
Feniramin	Oxantel	NPC (Nazofarengeal Karsinoma)	0,9855265644 05556	Anti Helmintik, Anti Paraziter
Feniramin	Oxantel	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9735128121 64931	Anti Helmintik, Antiparaziter
Feniramin	Pazopanib	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9762523000 56045	Kemoterapötik, Proteaz Kinaz İnhibitörü
Feniramin	Rivaroxaban	SKB (İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9667172105 9777	Anti Trombotik, Kan Sulandırıcı
Feniramin	Doconexent	ASC (İnsan Adipoz-Kökenli Mezenkimalstromal Hücreleri)	0,9919121437 21403	Omega 3 Yağ Asidi

Tablo 4.1'in Devamı

İlaç 1	İlaç 2	Hücre_Id	RMSD <1	HASTALIK
Feniramin	Chenodiol	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9900160347 50319	Antilitik. Safra İlacı
Feniramin	Diethyltolua mide	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9413184720 34739	İnsektisit Kovucu
Feniramin	Fenbendazole	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9509887786 04334	Antiparaziter (Antolotik)
Feniramin	Clocortolone Pivalate	A375 (Insan Melanoma Hücre Hattı)	0,9544206137 54358	Kortikosteroid
Feniramin	Polydatin	A375 (Insan Melanoma Hücre Hattı)	0,9545654685 91877	Antioksidan
Feniramin	Polydatin	HT29 (Insan Kolorektaladenokarsinom Hücre Hattı)	0,8817598944 44649	Antioksidan
Feniramin	Alfadoloneac etate	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,9078810093 55645	Genel Anestezik

Tablo 4.2. DrugCentral'a göre FHM'ye benzeyen kanser ilaçlarının listesi

İlaç 1	İlaç 2	Hücre_Id	RMSD <1	HASTALIK
Feniramin	Siproteron	HT29 (Insan Kolorektal Adenokarsinom Hücre Hattı)	0,961224752426 759	Prostat Kanseri
Feniramin	Aprepitant	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,991255193146 871	Kemoterapiye Bağlı Bulantı Ve Kusma
Feniramin	Decitabine	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,824388778512 362	Akut Myeloblastik Lösemi
Feniramin	Diethylstilbestrol	PHH (Primer İnsan Hepatosit)	0,954088664878 072	Meme Kanseri
Feniramin	Erlotinib	PHH (Primer İnsan Hepatosit)	0,966347817686 741	Akciğer Kanseri
Feniramin	Imatinib	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,932353932569 442	Kronik Miyeloid Lösemi (KML) Gastrointestinalstomal Tümörlerin (GİST) Tedavisi
Feniramin	Iobenguane	A375 (Insan Melanoma Hücre Hattı)	0,995168852141 928	Böbrek Üstü Bezi Ve Tiroid Bezi Tümörlerinin Tedavisinde
Feniramin	Lenalidomide	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,936848453378 204	Multiple Myelom Tedavisi
Feniramin	Tamibarotene	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,991850851444 739	Akut Promyelositik Lösemi Tedavisi
Feniramin	Vincamine	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,991558460552 23	Kanser, Alzheimer Vs Tedavisi
Feniramin	Vemurafenib	SKB (Insan Meme Kanseri Hücre Hattı)	0,981854185931 702	Melanom Tedavisi, B-Raf Enzim İnhibitörü

Tezin hedefleri arasında olan;

1) Feniramin Maleat Günümüzde kullanılan diğer ilaçlara benzer mi?

2) Bu benzerlik ilacın yeniden konumlandırma açısından başka hangi hastalıklarda kullanımı için potansiyel olabilir?

Sorularının cevaplarına Tablo 1 ve Tablo 2 sonuçları ile ulaşıldı. Tablo 2 de elde edilen sonuçlardan da yola çıkarak feniramin hidrojen maleatın akciğer kanseri tedavisinde kullanılabilirliğini araştırmak için bir diğer aşama olan apoptoz dışsal yolağında yer alan ölüm reseptörlerinden FasL Reseptörü ile etkileşimi *in siliko* olarak moleküler docking yöntemi ile gösterildi.

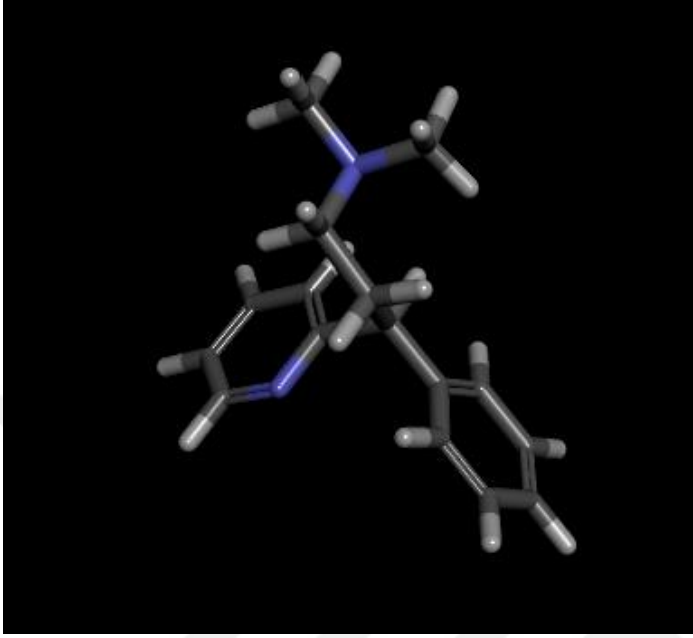
4.1.2. Fas Ligand Reseptör ve Feniramin maleat arasındaki etkileşimin Ligand/ Protein moleküler docking yöntemi ile belirlenmesi

Ligand Yapısının Hazırlanması

Tez projesi kapsamında etkisi araştırılacak olan feniramin maleat'ın molekül yapısına PubChem'den erişim sağlandı (Şekil 4.1)

Docking analizi öncesi, FHM'nin uygun başlangıç pozisyonunda olması için molekül enerji minimizasyonuna tabi tutuldu. Enerji minimizasyonu için Force Field (kuvvet alanı) hesaplama yöntemlerinden mmff94 kullanıldı. Optimizasyon algoritması için ise Conjugate Gradients kullanıldı.

Fas ligand reseptör proteini Protein Data Bank'tan ilgili PDB kodu ile indirildikten sonra (Şekil 4.2) Chimera 1.17.1 programında docking çalışması öncesi hazırlandı. Hazırlık çalışmalarında; Protein heteroatomlarından ve su moleküllerinden arındırıldı, proteinin PDB dosyasında hidrojen atomları eksik olduğu için hidrojen atomları eklendi ve Atomların net yükü AM1-BCC algoritması kullanarak hesaplandı.



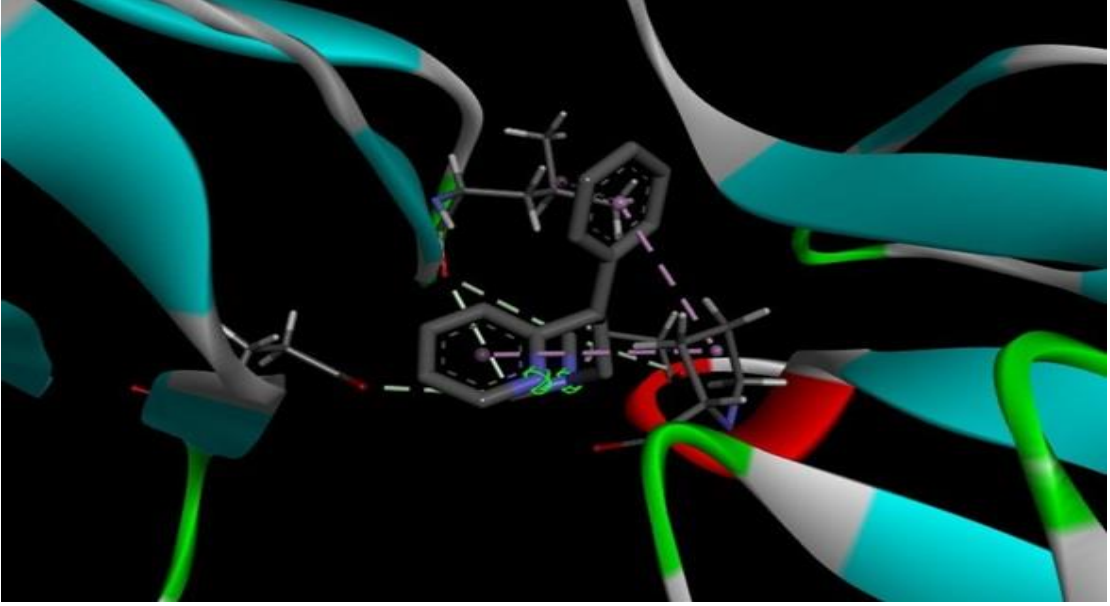
Şekil 4.1. Feniramin Hidrojen Maleat'ın üç boyutlu görüntüsü PubChem ID: 4761



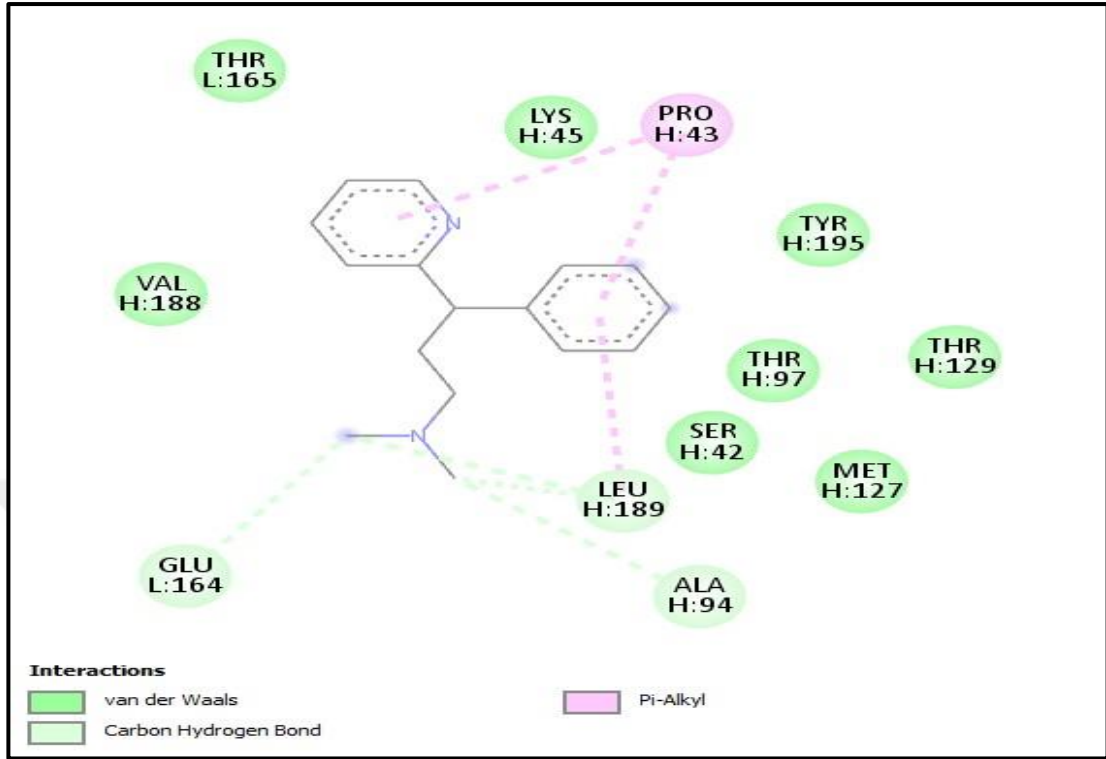
Şekil 4.2. Fas Ligand Reseptörünün Üç Boyutlu Yapısı, PDB kod:1DDF

Ligand/Protein Moleküler Docking Çalışması

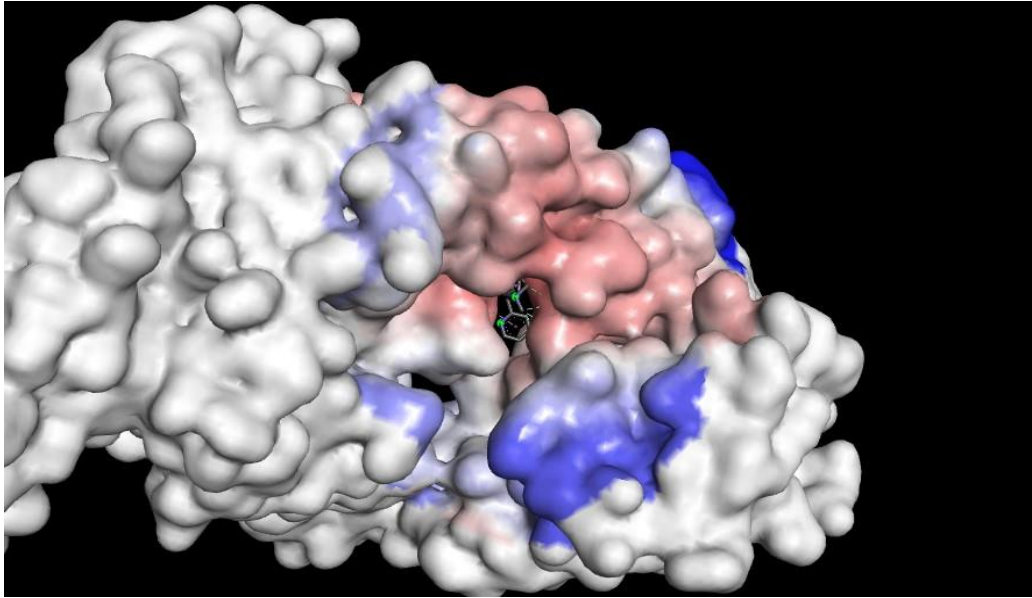
Apoptoz dışsal yolağında yer alan Fas ligand reseptörü ve feniramin hidrojen maleat etkileşim AutoDock Vina yazılımı kullanılarak araştırıldı. En iyi bağlanma pozisyonu bağlanma afinitesi (kcal/mol)'ne göre seçilip kaydedildi. Fas ligand reseptörü ve feniramin maleat arasındaki etkileşim BIOVIA Discovery Studio Visualizer programında analiz edilip görselleştirildi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Fas Ligand Reseptörü Ve Feniramin Hidrojen Maleat Arasındaki Etkileşim



Şekil 4.4. Fas Ligand Reseptörü Ve Feniramin Maleat Arasındaki Kimyasal Etkileşimler



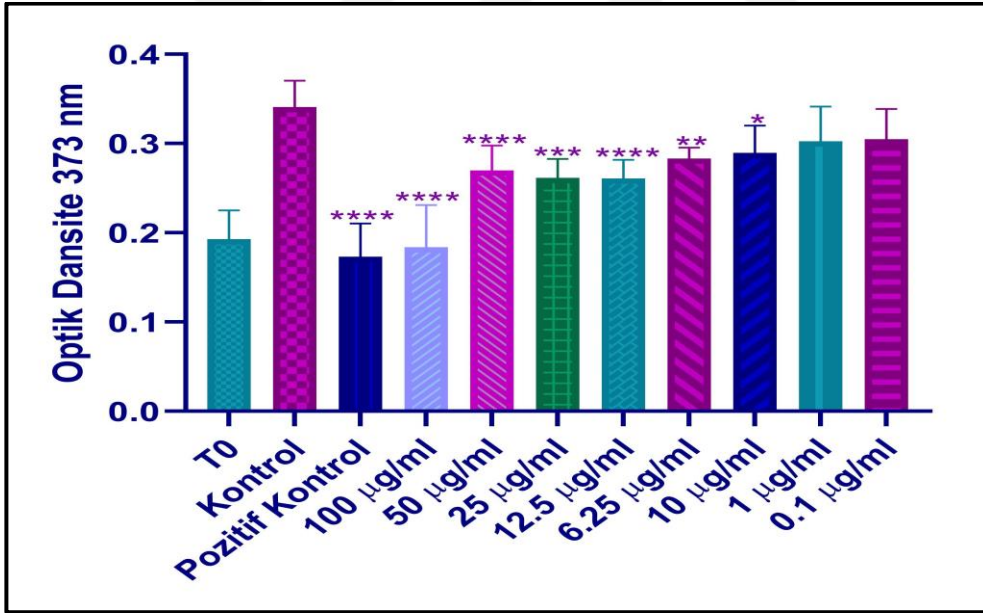
Şekil 4.5. Fas Ligand Reseptörü Ve Feniramin Maleat Arasındaki Etkileşimin Atom Yüklerine Göre Görüntüsü

Fas ligand reseptörü ve feniramin maleat'ın arasındaki etkileşim için 10 farklı bağlanma pozundan en iyi bağlanma afinitesine sahip olan docking pozu (-6,2 kcal/mol) seçilerek analiz çalışmaları yapılmıştır. Moleküler docking sonuçlarının analizine göre üç farklı kimyasal etkileşim bulunmaktadır (Şekil 4.4). Bunlar van der Waals, pi-alkil ve hidrojen bağlarıdır. Feniramin'in reseptör proteininin 3. aktif bölgesine bağlanmaktadır. Bu da proteinin üç boyutlu konformasyonunu değiştirerek hücre içinde dışsal kaynaklı apoptoz sinyalini başlatabilir. Şekil 4.5 'de Fas Ligand Reseptörü Ve Feniramin Maleat Arasındaki Etkileşimin Atom Yüklerine Göre Görüntüsü verilmiştir.

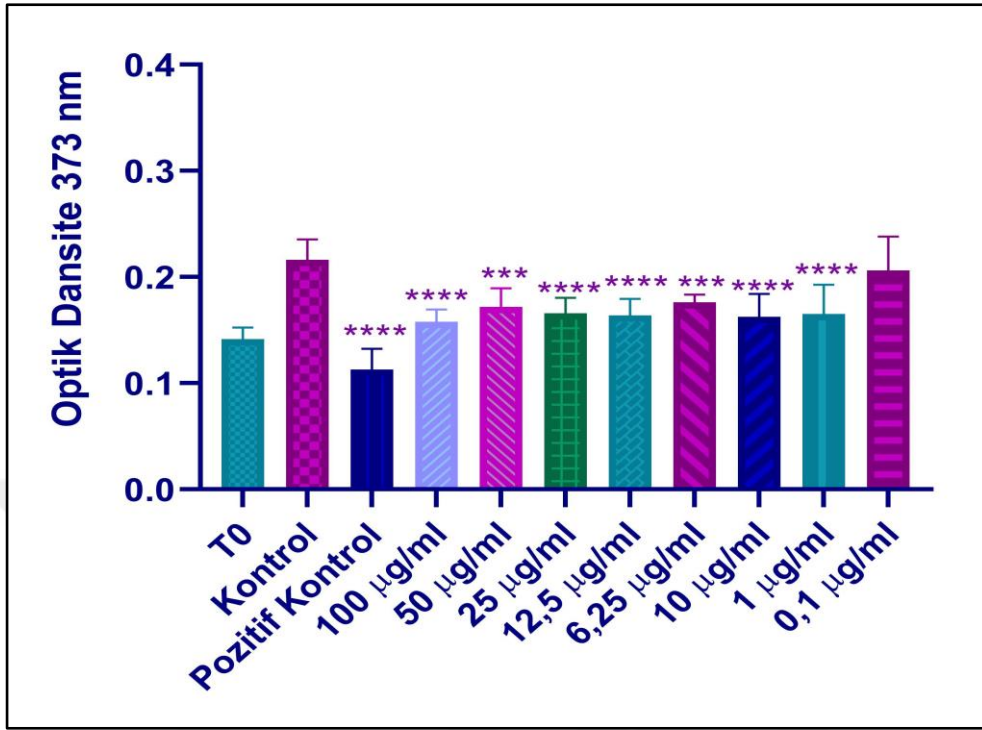
4.2. *İN VİTRO* ÇALIŞMALAR

4.2.1. Sitotoksosite sonuçları

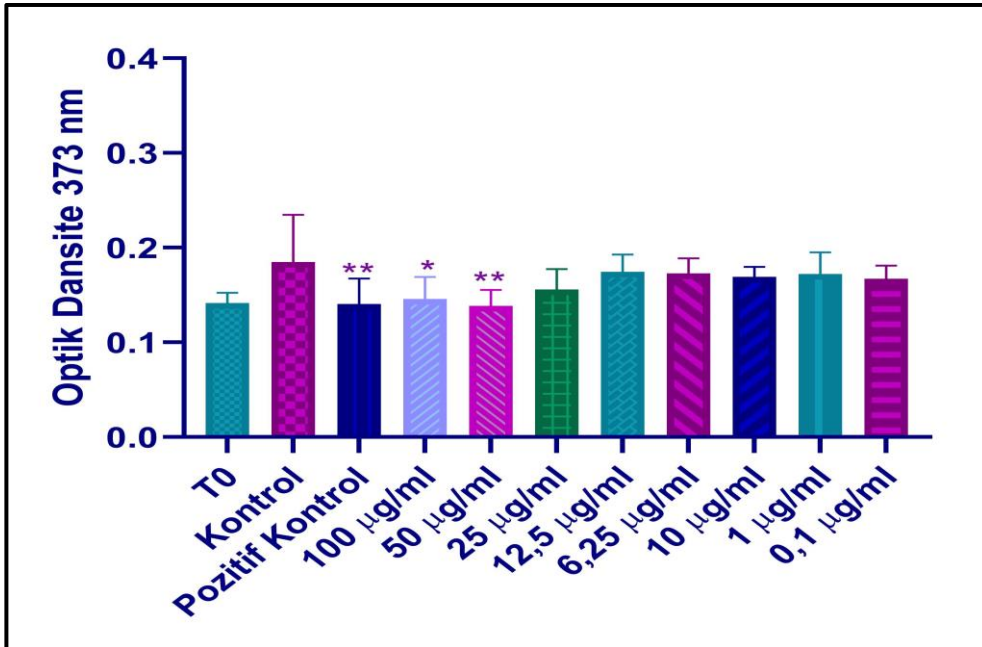
Feniramin hidrojen maleatın tek başına uygulanan sitotoksosite sonuçları



Şekil 4.6. Set 1 24 Saat Sitotoksosite Sonuçları



Şekil 4.7. Set 1 48 Saat Sitotoksiste Sonuçları

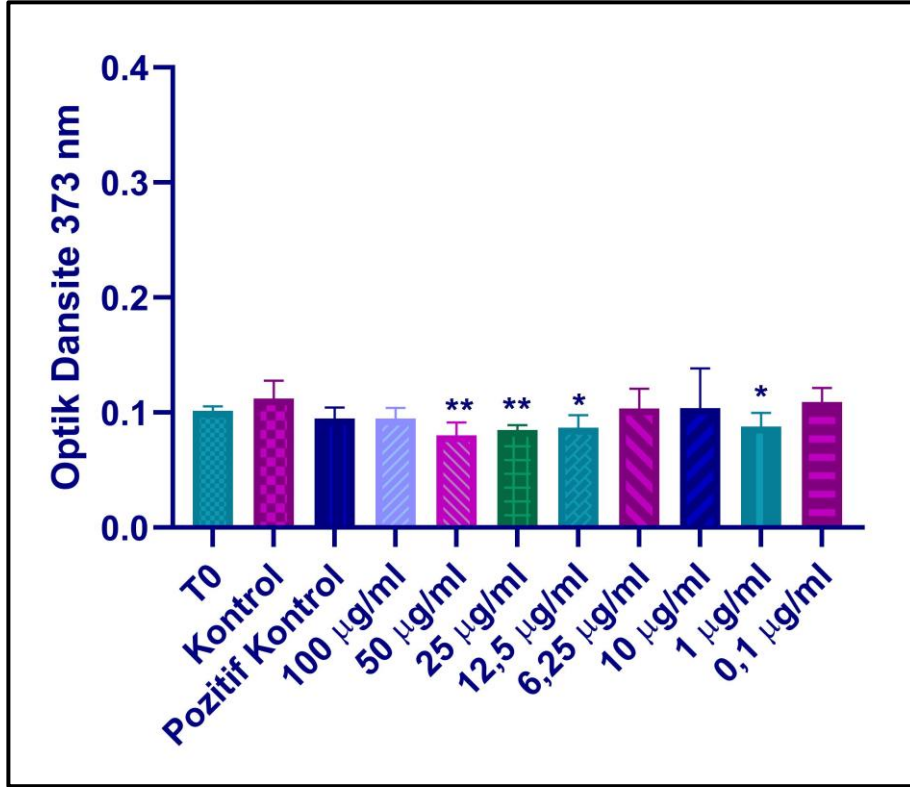


Şekil 4.8 Set 1 72 Saat Sitotoksiste Sonuçları

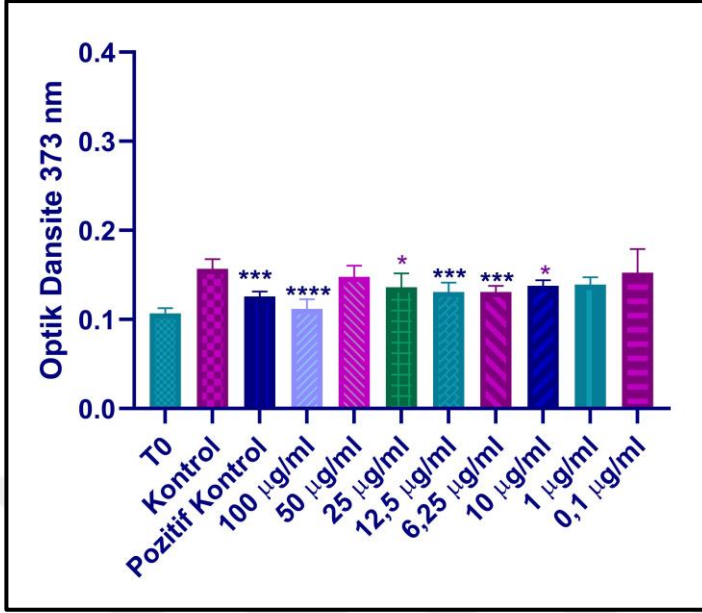
SET1 sonuçlarına göre ilk 24 saatte 1 ve 0.1 µg/ml'lik dozlar hariç diğer tüm dozlarda istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etki görülmüştür (Şekil 4.6) ****, $p \leq 0.00001$; ***, $p \leq 0.001$; **, $p \leq 0.01$; *, $p \leq 0.05$; kontrole kıyasla).

48. Saatte 0.1 µg/ml doz haricinde diğer tüm dozlarda istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etki görülmüştür (Şekil 4.7) (****, $p \leq 0.00001$; ***, $p \leq 0.001$; kontrole kıyasla).

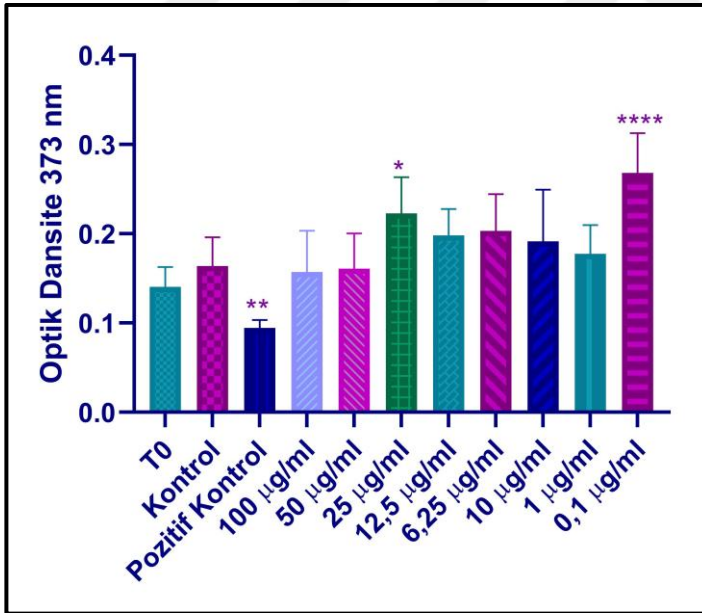
72. saatte 50 µg/ml'lik dozda anlamlı bir azalış görülmüştür (**, $p \leq 0.01$; kontrole kıyasla). İlk set sonuçlarına göre feniramin maleat 48 saat süresince A549 hücrelerinde etkili olmuştur. Ancak bu etki 72 saat itibariyle azalmaya başlamıştır(Şekil 4.8).



Şekil 4.9 Set 2 24 Saat Sitotoksosite Sonuçları



Şekil 4.10 Set 2 48 Saat Sitotoksosite Sonuçları



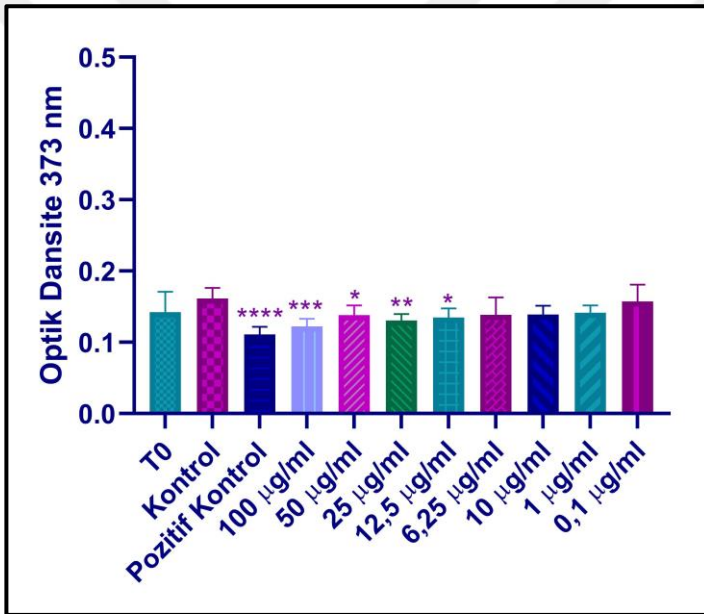
Şekil 4.11 Set 2 72 Saat Sitotoksosite Sonuçları

SET 2 sonuçlarına göre ilk 24 saatte 50 ve 25 µg/ml’lik dozlarda istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etki görülmüştür (Şekil 4.9) (**, $p \leq 0.01$; kontrole kıyasla). 12.5 ve 1 µg/ml’lik dozlarda da istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etki görülmüştür (*, $p \leq 0.05$; kontrole kıyasla).

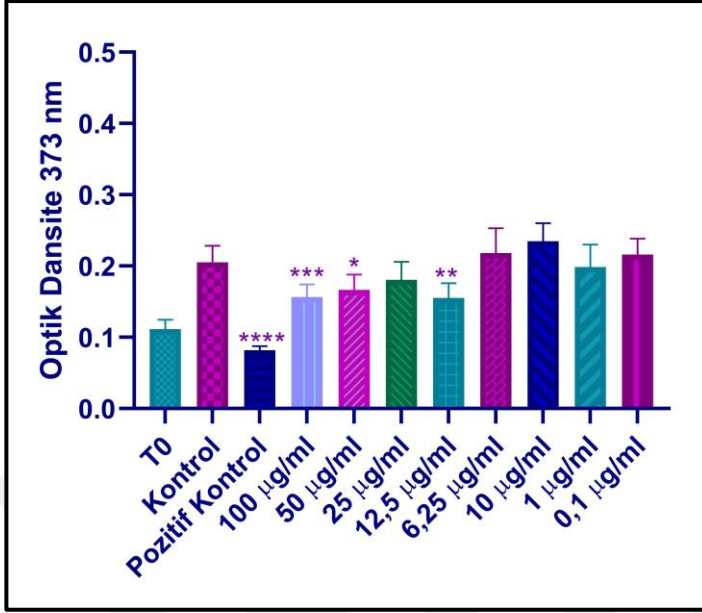
48. Saatte 50, 1 ve 0.1 µg/ml doz haricinde diğer tüm dozlarda istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etki görülmüştür (Şekil 4.10) (****, $p \leq 0.00001$; ***, $p \leq 0.001$; *, $p \leq 0.05$; kontrole kıyasla).

72. saatte 25 ve 0.1 µg/ml dozlarda istatistiksel olarak anlamlı azalış görülmektedir (****, $p \leq 0.00001$, *, $p \leq 0.05$; kontrole kıyasla).

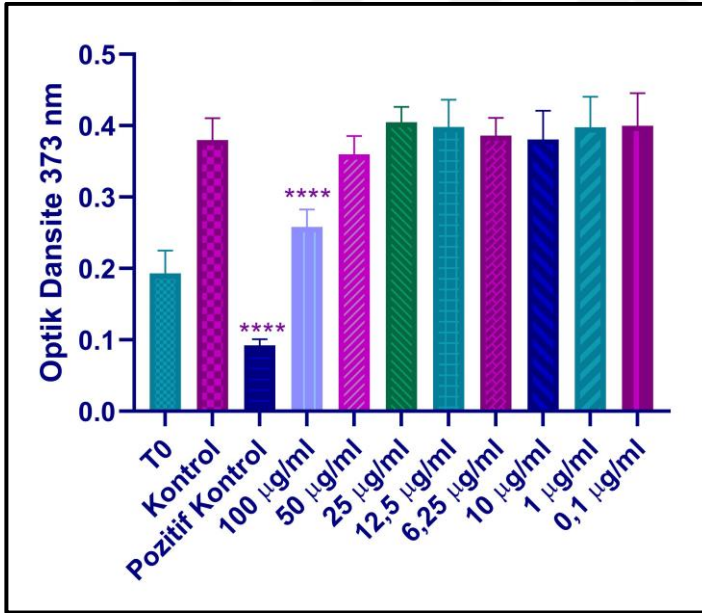
2. set sonuçlarına göre feniramin maleat 48 saat süresince A549 hücrelerinde daha etkili olmuştur. Bu etki 72 saat itibariyle etki azalmaktadır (Şekil 4.11).



Şekil 4.12. Set 3 24 Saat Sitotoksiste Sonuçları



Şekil 4.13. Set 3 48 Saat Sitotoksiste Sonuçları



Şekil 4.14. Set 3 72 Saat Sitotoksiste Sonuçları

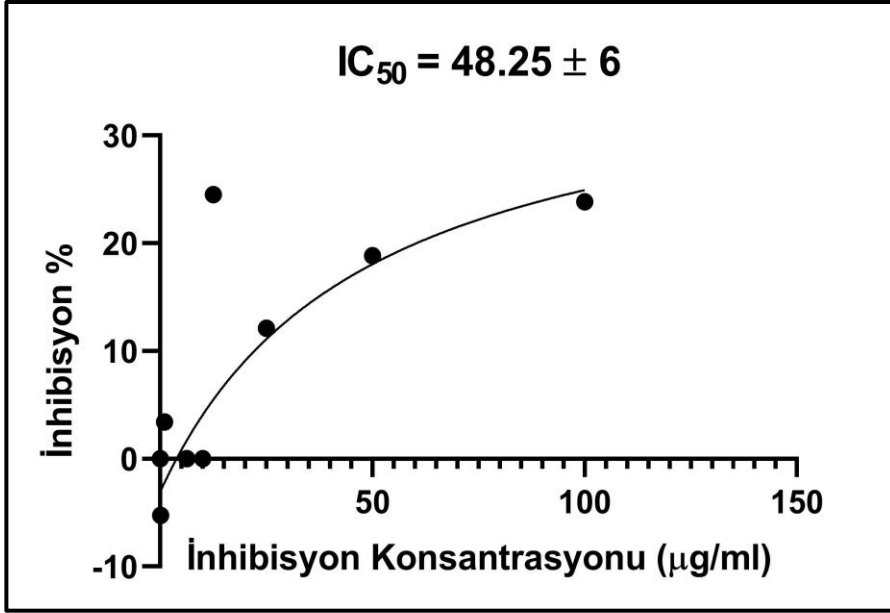
SET3 sonuçlarına göre ilk 24 saatte 100, 50, 25 ve 12.5µg/ml’lik dozlarda istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etki görülmüştür (Şekil 4.12) ($p \leq 0.001$; **, $p \leq 0.01$, *, $p \leq 0.05$; kontrole kıyasla).

48. Saatte 100, 50 ve 12.5 µg/ml dozlarda istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etki görülmüştür (Şekil 4.13) (***, $p \leq 0.001$; **, $p \leq 0.01$ *, $p \leq 0.05$; kontrole kıyasla).

72. saatte 100 µg/ml dozlarda istatistiksel olarak anlamlı azalış görülmektedir (****, $p \leq 0.00001$, kontrole kıyasla)

3. set sonuçlarına göre feniramin maleat 48 saat süresince A549 hücrelerinde daha etkili olmuştur. Bu etki 72 saat itibariyle etki azalmaktadır (Şekil 4.14).

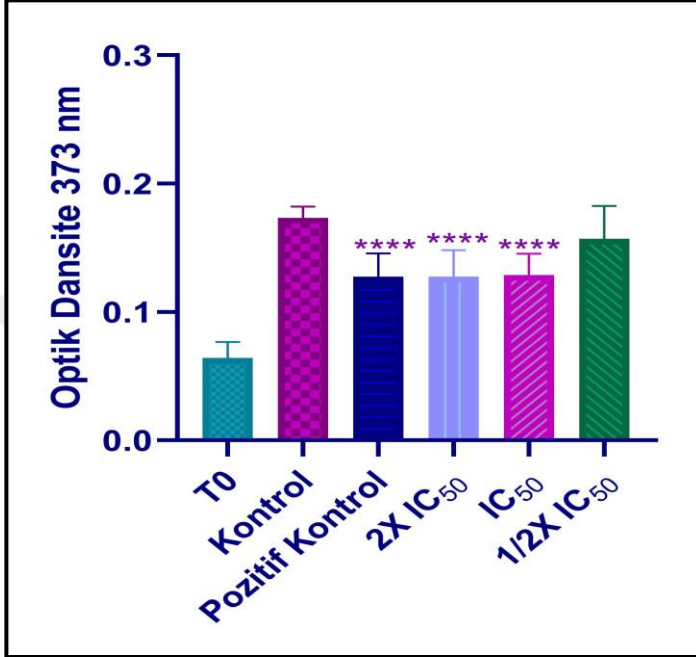
Tüm set sonuçları göz önüne alındığında feniramin maleat 48 saat süresince A549 hücrelerinde sitotoksik etki sergilemiştir. Bu etki 72. saatten sonra azalma eğilimi göstermektedir.



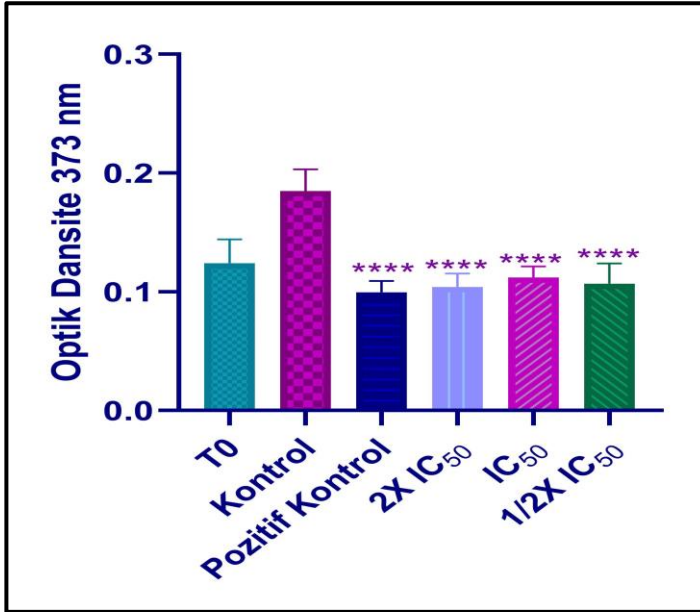
Şekil 4.15. Feniramin Hidrojen Maleatın IC₅₀ Değeri

Doz tarama sonuçları baz alınarak feniramin maleatın IC₅₀ değeri 48.25 µg/ml olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.15). Bu değer kombinasyon deneyleri için ± değeri de hesaba katılarak 50 µg/ml kabul edilerek çalışmalara devam edilmiştir.

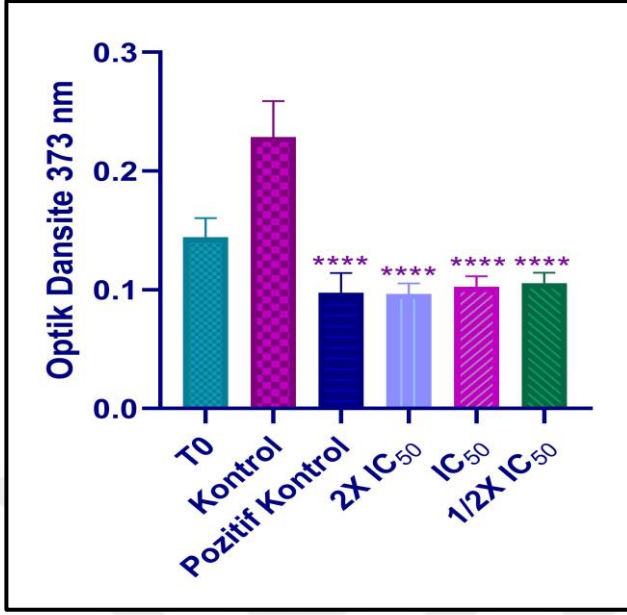
Feniramin hidrojen maleatın 5-fluorourasil 5-FU (1.3 mg/ml) ile kombine uygulanan sitotoksosite dozları



Şekil 4.16. Set 1 Kombine Tedavinin 24 Saat Sitotoksosite Sonuçları



Şekil 4.17. Set 1 Kombine Tedavinin 48 Saat Sitotoksosite Sonuçları



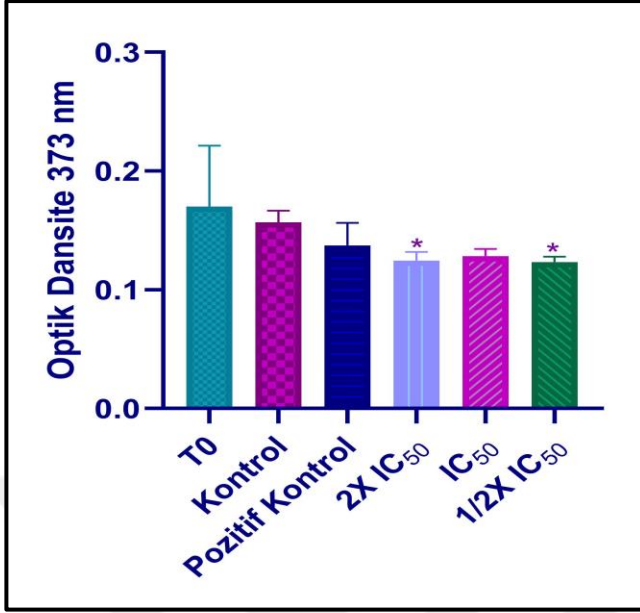
Şekil 4.18. Set 1 Kombine Tedavinin 72 Saat Sitotoksikite Sonuçları

SET1 kombinasyon sonuçlarına göre ilk 24 saatte 2X IC₅₀ ve IC₅₀ dozlarında istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etki görülmüştür (Şekil 4.16) (****, $p \leq 0.00001$, kontrole kıyasla).

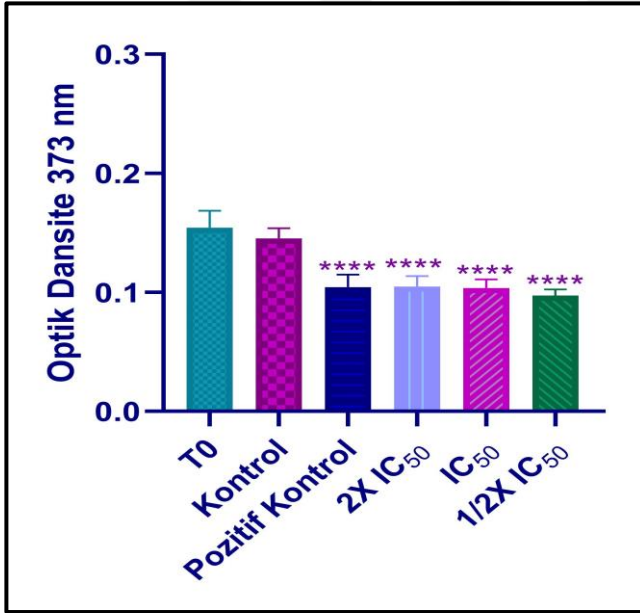
48. Saatte 2X IC₅₀, IC₅₀ ve 1/2X IC₅₀ dozlarında istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etki görülmüştür (Şekil 4.17) (****, $p \leq 0.00001$, kontrole kıyasla)

72. Saatte 2X IC₅₀, IC₅₀ ve 1/2X IC₅₀ dozlarında istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etki görülmüştür (Şekil 4.18). (****, $p \leq 0.00001$, kontrole kıyasla)

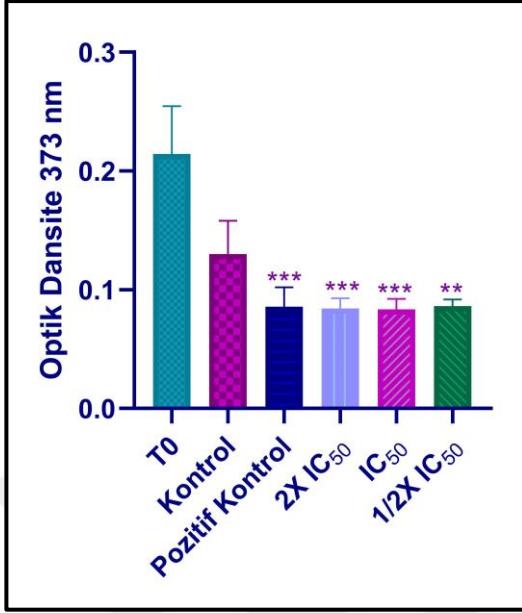
İlk kombine set sonuçlarına göre feniramin maleat ve 5-fluorourasil (5-FU) 48 ve 72. saatlerde A549 hücrelerinde 24 saate göre daha etkili olmuştur.



Şekil 4.19. Set 2 Kombine Tedavinin 24 Saat Sitotoksosite Sonuçları



Şekil 4.20. Set 2 Kombine Tedavinin 48 Saat Sitotoksosite Sonuçları



Şekil 4.21. Set 2 Kombine Tedavinin 72 Saat Sitotoksosite Sonuçları

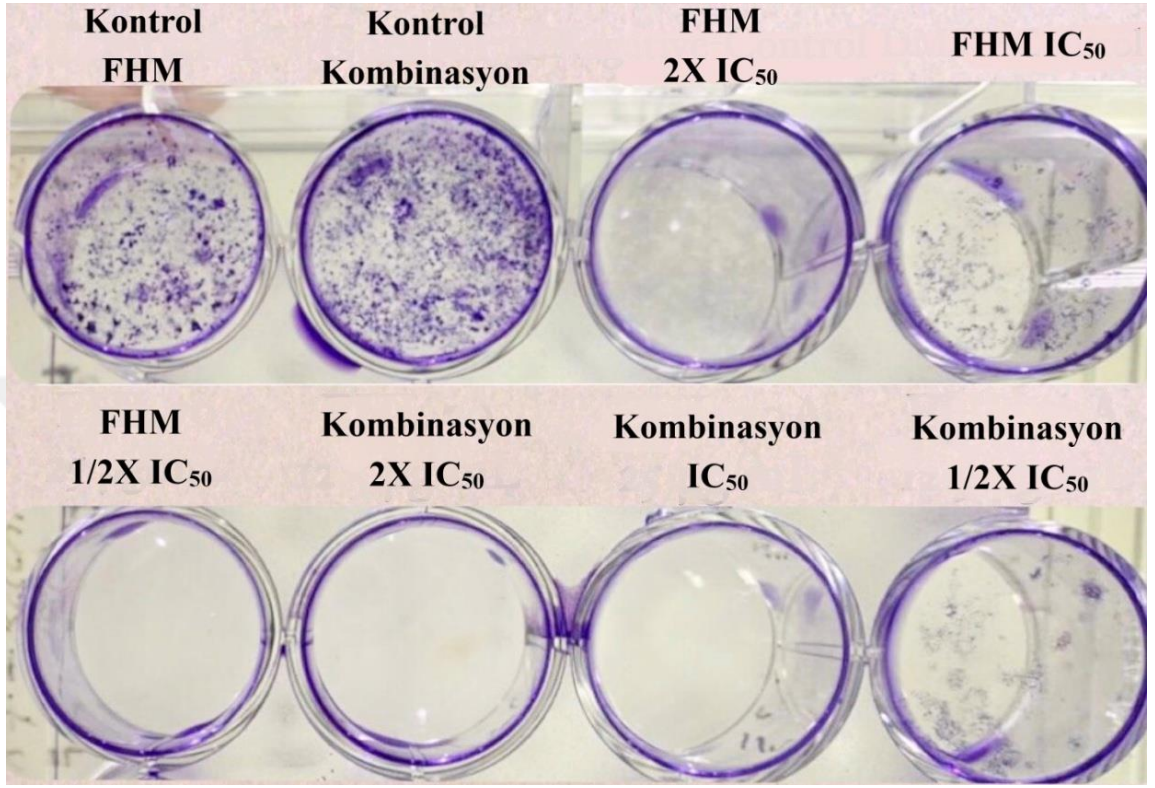
SET2 kombinasyon sonuçlarına göre ilk 24 saatte 2X IC₅₀ ve 1/2X IC₅₀ dozlarında istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etki görülmüştür (*, $p \leq 0.05$ kontrole kıyasla).

48. Saatte 2X IC₅₀, IC₅₀ ve 1/2X IC₅₀ dozlarında istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etki görülmüştür (Şekil 4.20) (****, $p \leq 0.00001$, kontrole kıyasla)72. Saatte 2X IC₅₀, IC₅₀ ve 1/2X IC₅₀ dozlarında istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik etki görülmüştür(Şekil 4.21) (Şekil 4.19) (***, $p \leq 0.001$, kontrole kıyasla).

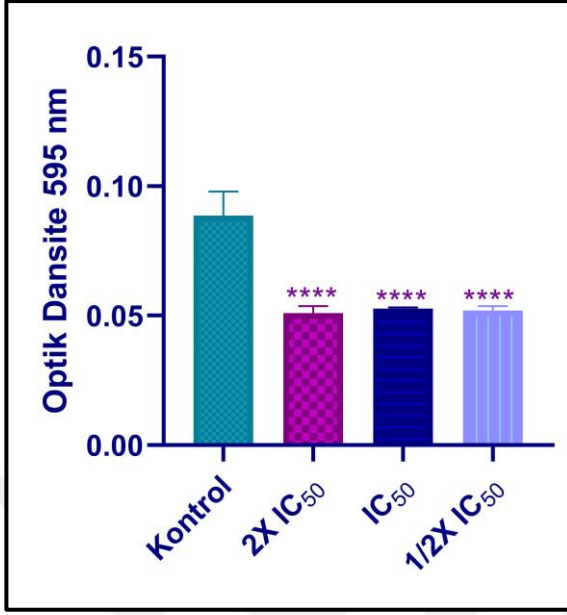
2.kombine set sonuçlarına göre de feniramin maleat ve 5-fluorourasil (5-FU) 48 ve 72. saatlerde A549 hücrelerinde 24 saate göre daha etkili olmuştur.

Doz tarama sonuçlarına göre feniramin maleatın 72. saatten itibaren A459 hücreleri üzerindeki etkisi azalırken, feniramin maleat ve 5-fluorourasil (5-FU) kombinasyonu 48. Ve 72. Saatlerde A549 hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir sitotoksik etki göstermiştir. Bu etki iki ilacın birbirleri üzerine olan etkilerini arttırdıklarına dair bir gösterge olabilir.

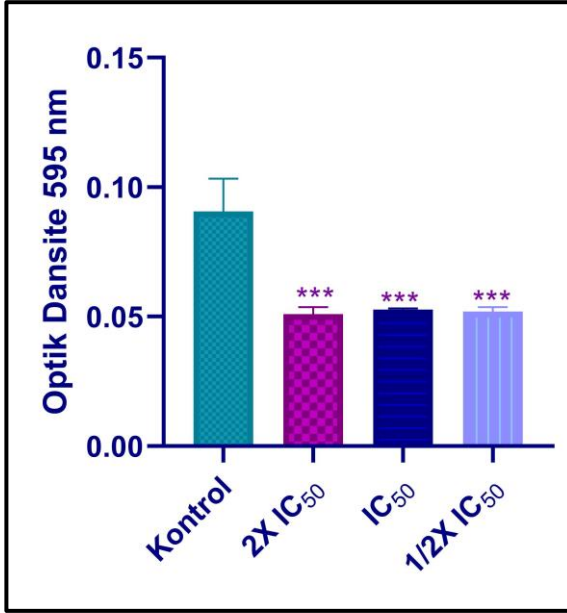
4.2.2. Koloni oluşumu deneyleri



şekil 4.22 Feniramin Hidrojen Maleat (FHM) Tek Başına ve 5-*Fluorourasil* (5-FU) İle Kombine Koloni Oluşum Deney Sonuçlarının Görüntüsü



Şekil 4.23. Feniramin Hidrojen Maleat Koloni Oluşum Sonuçları

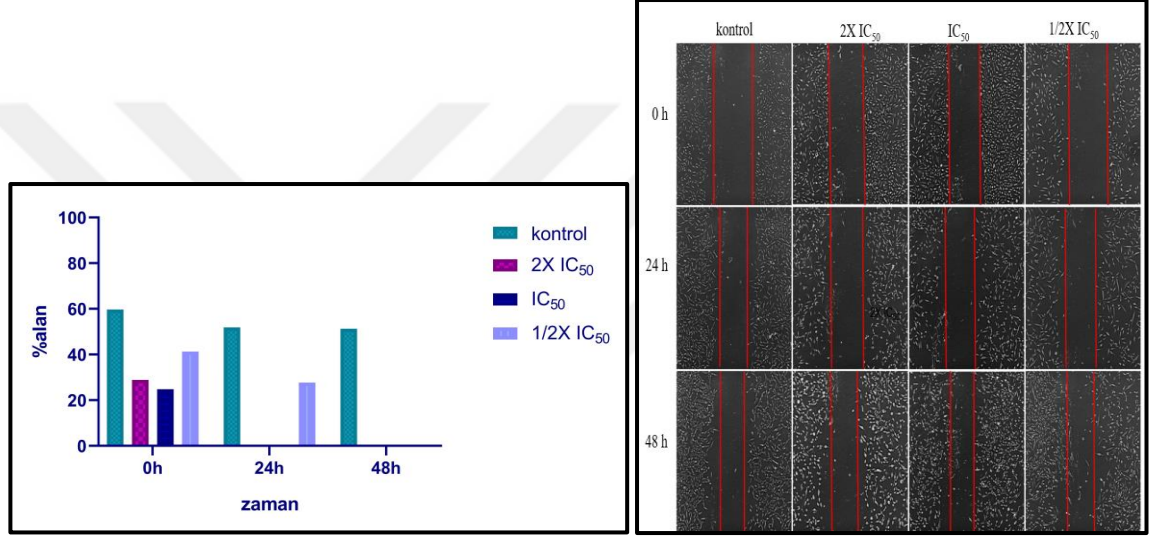


Şekil 4.24. Feniramin Hidrojen Maleat ve 5-Fluorourasil (5-FU) Kombine Koloni Oluşum Sonuçları

Koloni oluşum deneyi sonuçlarına göre; hiç ilaç uygulanmayan kontrol grubunda kolonilerin oluştuğu gözlenmiş, ancak feniramin hidrojen maleatın tek başına ve 5-fluorourasil (5-FU) ile kombine olarak verilen kuyucuklarda hücrelerin öldüğü gözlenmiştir (Şekil 4.22). Grafik sonuçlarına göre de feniramin hidrojen maleat tek başına (Şekil 4.23) ve her üç doz için 5-fluorourasil (IC₅₀ 1.3 mg/ml) ile kombine olarak

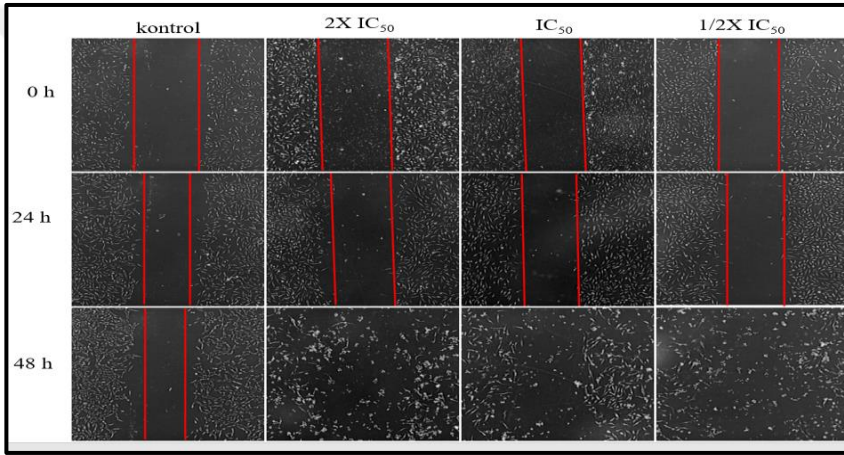
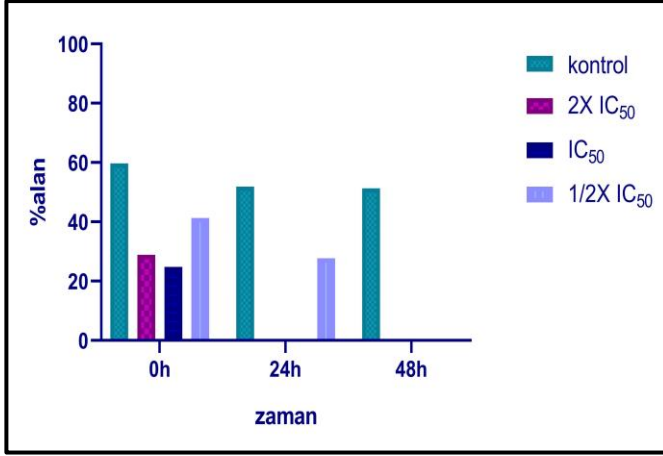
verilen ilaçlar hücrelerin metabolik faaliyetlerinde önemli ölçüde istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olduğu görülmüştür (Şekil 4.24) (****, $p \leq 0.00001$, ***, $p \leq 0.001$ kontrole kıyasla).

4.2.3. Migrasyon deneyi



Şekil 4.25. Feniramin Hidrojen Maleatın Tek Başına Hücrelerin Migrasyon Yetenekleri Üzerine Etkileri

Hücrelerin migrasyon kapasiteleri değerlendirmek için yapılan assay çalışmaları sonrasında A549 hücrelerine uygulanan feniramin hidrojen maleat, hücrelerin göç kapasitesinde ilk 24 saatte belirgin azalışa neden olmuştur. 48 saatte ise 24 saate göre daha fazla göç olduğu görülmüştür (Şekil 4.25).

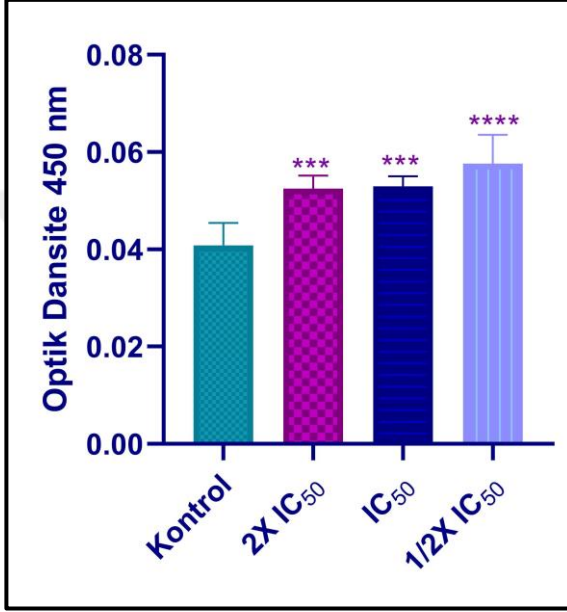


Şeki 4.26. Feniramin Hidrojen Maleat Ve 5-Fluorourasil (5-FU) Kombine Tedavinin Hücrelerin Migrasyon Yetenekleri Üzerine Etkileri

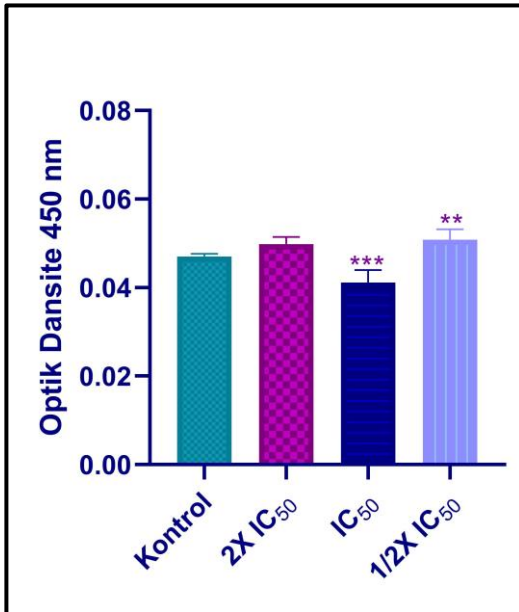
Hücrelerin migrasyon kapasiteleri değerlendirmek için yapılan assay çalışmaları sonrasında Feniramin Hidrojen Maleat ve 5-fluorourasil kombinasyonu uygulanan A-549 hücrelerinde ilk 24 saatte belirgin azalış olduğu saptanmıştır. 48 saatte ise hücrelerin parçalandığı gözlenmiştir (Şekil 4.26).

4.2.4. Apoptozla ilişkili kaspaz-7 protein miktarının ELIZA ve Western Blot yöntemleri ile gösterilmesi

ELIZA sonuçları

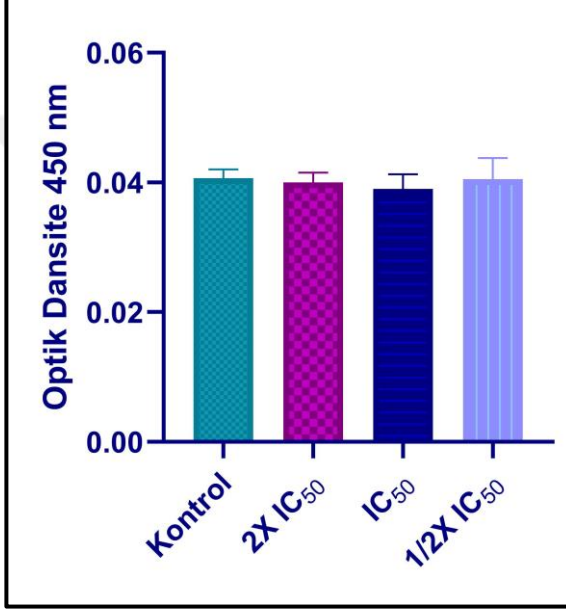


Şekil 4.27 Feniramin Hidrojen Maleat Eliza 24 Saat Sonuçları

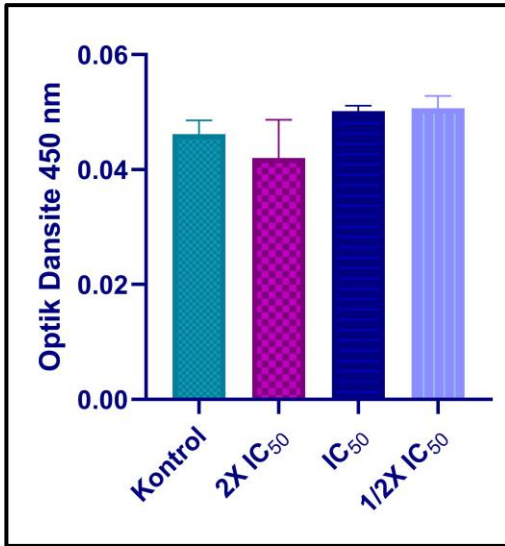


Şekil 4.28 Feniramin Hidrojen Maleat Eliza 48 Saat Sonuçları

Feniramin Hidrojen Maleat ile 24. saat inkübasyon sonuçlarına göre kontrol grubu ile kıyaslandığında tüm dozlarda istatistiksel olarak anlamlı bir kaspaz-7 protein artışı görülmüştür (Şekil 4.27) (****, $p \leq 0.00001$, ***, $p \leq 0.001$, kontrole kıyasla). 48. saat inkübasyon sonuçlarına göre ise $2XIC_{50}$ dozu hariç diğer IC_{50} ve $1/2 IC_{50}$ dozlarında istatistiksel olarak anlamlı bir protein artışı vardır (Şekil 4.28) (***, $p \leq 0.001$; **, $p \leq 0.01$; kontrole kıyasla).



Şekil 4.29 Eliza 24 Saat FHM Ve 5-Fluorourasil Kombine Tedavinin A549 Hücreleri Üzerine Etkisi

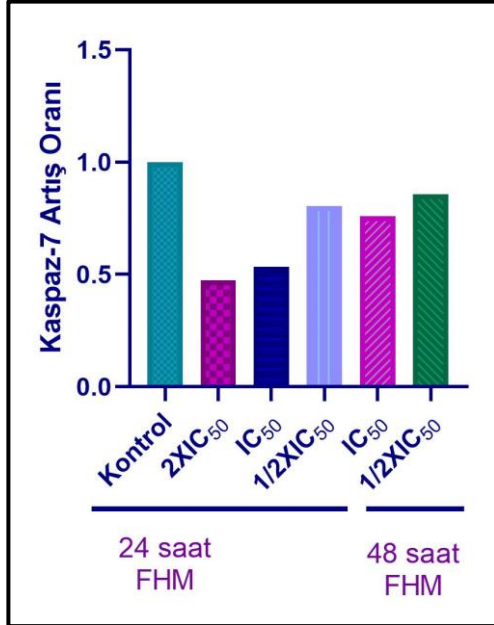


Şekil 4.30 Eliza 48 Saat FHM ve 5-fluorourasil Kombine Tedavinin A549 Hücreleri Üzerine Etkisi

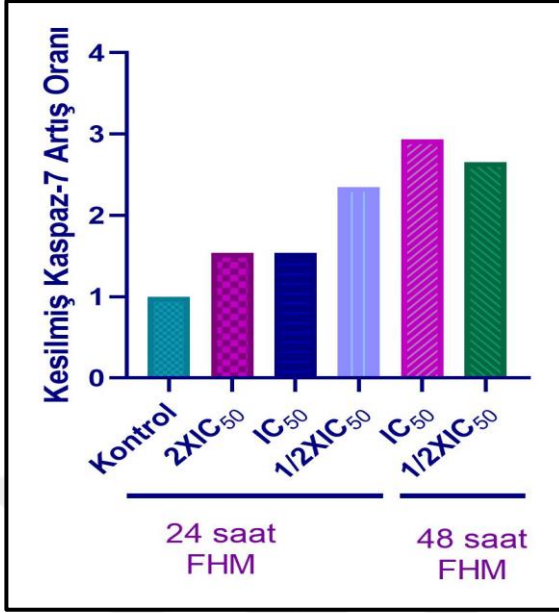
Feniramin Hidrojen Maleat ile *5-fluorourasil* combine tedavinin 24 ve 48.saat inkübasyon süresi sonuçlarına göre kontrol grubu ile kıyaslandığında tüm dozlarda kaspaz-7 protein miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış yoktur. (Şekil 4.29,Şekil 4.30)

ELISA test sonuçlarına göre Feniramin Hidrojen Maleat A549 hücrelerinin canlılığını apoptozun içsel yolağını tetikleyerek başarıyor gibi görünmektedir. Kaspaz-7, apoptozda anahtar rol oynayan kaspazlardan birisidir. Kaspaz seviyesinin de gözlenen bu artış, Feniramin Hidrojen Maleatın A549 hücrelerini apoptoz yolu ile öldürdüğüne işaret etmektedir. Ancak Feniramin Hidrojen Maleat ile *5-fluorourasil* kombinasyonu ile yapılan ELISA sonuçlarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir sonuca ulaşılamamıştır. Bunun sebebi olarak kombine olarak kullanılan ilaçların arasında antagonist bir etkileşim olabileceği düşünülebilir.

Elisa sonuçlarının Western blot yöntemi ile doğrulanması

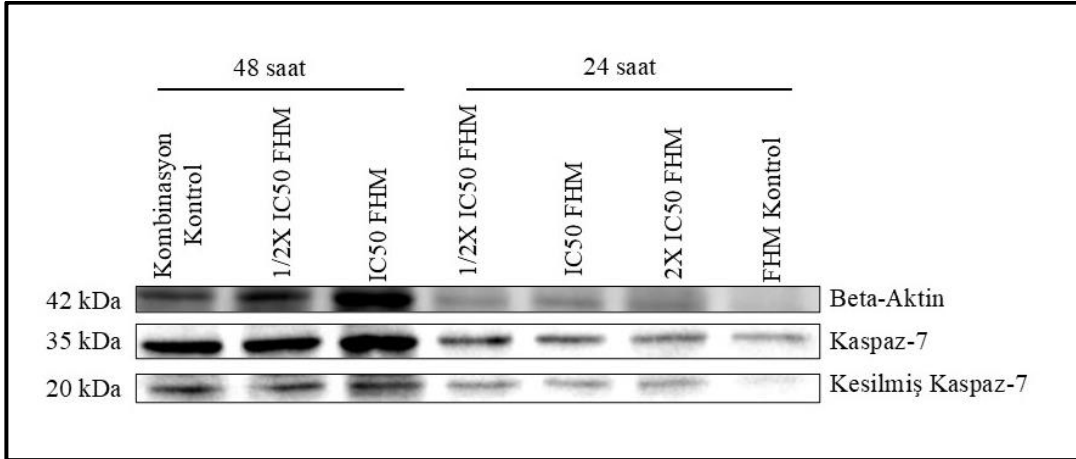


Şekil 4.31 Feniramin Hidrojen Maleat Kaspaz-7 24-48 Saat Artış Miktarları



Şekil 4.32 Feniramin Hidrojen Maleat Kesilmiş Kaspaz-7 24-48 Saat Artış Miktarları

Belirlenen ilaç dozlarının A549 hücrelerinde 24. ve 48. saat inkübasyon süreleri sonunda kaspaz-7 ve kesilmiş kaspaz-7 enzim miktarı seviyesinde değişimler sırasıyla Şekil 4.31 ve Şekil 4.32de gösterilmiştir.



Şekil 4.33. Feniramin hidrojen maleat tek başına ve 5-fluorourasil (5-FU) ile kombine halde A549 hücrelerinde iki farklı inkübasyon süresi sonunda kaspaz-7 ve kesilmiş kaspaz-7 enzim miktarlarındaki değişimin bant görüntüsü

Feniramin hidrojen maleatın A549 hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda kaspas-7 enzim miktarı kontrole göre 2X IC₅₀ dozunda 0.6 kat az, IC₅₀ dozu 0.5 kat ve 1/2X IC₅₀ dozunda ise 0.2 kat azalmıştır. Kontrole kıyasla 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda ise kaspaz-7 enzim miktarı, IC₅₀ dozunda 0.3 kat ve 1/2X IC₅₀ dozunda 0.2 kat azalmıştır. Bununla birlikte kesilmiş kaspaz-7 enzim miktarı 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda 2X IC₅₀ ve IC₅₀ dozunda 1.5 kat ve 1/2X IC₅₀ dozunda 2.3 kat artmıştır. 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda ise IC₅₀ dozunda 2.9 kat ve 1/2X IC₅₀ dozunda 2.6 kat artmıştır. 48 saatlik inkübasyon süresinde IC₅₀ dozunda kesilmiş kaspaz-7 miktarı en yüksek orana sahiptir. ELISA sonuçlarımıza göre 24 saatte ilk iki dozda kaspaz-7 miktarındaki artış western blot sonuçları ile farklılık göstermektedir (Şekil 4.33). 48 saateki artış western sonuçları ile uyumludur. Kesilmiş kaspaz-7 miktarındaki artış ise bütün saat ve dozlarda belirgindir. Ancak kombine dozlarının Eliza testinde istatistiksel olarak anlamsız olması ve western blot sonuçlarında ortaya çıkmaması hücrelerin ölümünün farklı bir kaspaz üzerinden gerçekleşebildiğine işaret etmektedir. 5-FU feniraminle kombine edildiğinde hücredeki sitotoksik etkisini farklı bir mekanizma üzerinden gerçekleştiriyor gibi görünmektedir.

5. TARTIŞMA

Kanser dünya çapında önemli bir sağlık sorunudur ve kanserin küresel yükünün önümüzdeki yıllarda artması beklenmektedir. Mevcut tedavilerin sınırlı başarısı ilaç geliştirmeye büyük yatırımlar yapılmasına neden olsa da, 1990'lardan bu yana FDA onayı alan ortalama yıllık ilaç sayısı azalmıştır. Daha etkili anti-kanser ilaçlarına duyulan bu acil ihtiyaç, ilaç yeniden konumlandırmaya, yani kanseri tedavi etmek için başka endikasyonlar için onaylanmış ilaçların kullanılmasına yönelik ilgi de artışa yol açmıştır. Bu nedenle, hem klinik öncesi deneylerden, hem klinik deneylerden hem de gözlemsel çalışmalardan elde edilen veriler göz önüne alınarak, kanser dışındaki çok çeşitli ilaç sınıflarındaki bileşiklerin anti-tümör etkinlikleri çalışılmaya başlanmıştır. Bunlardan bazıları kanser hücrelerinin ölümüne veya davranışlarının değişmesine neden olurken diğerleri kanser gelişimini önleyebilir (Sleire ve ark., 2017).

Monoterapi genellikle kanseri tamamen ortadan kaldırmak için yeterli olmadığından, kanser tedavisinde kombine tedaviler uygulanmaktadır. Antihistaminiklerin toksisitesinin kanser tedavisinde kullanılan geleneksel kemoterapötik ajanlarla karşılaştırıldığında daha düşük olduğu düşünüldüğünde, geleneksel tedavi için yeniden konumlandırma kapsamında kullanımının incelenmesi gerekmektedir. Ancak, antihistaminiklerin yeni kanser ajanları olarak kullanımını önermeden önce, farklı tümör tiplerindeki histamin reseptörlerinin tam seviyesini ve her birinin aktivasyonunun kanser büyümesi üzerindeki etkilerini açıklığa kavuşturmak, bunları *in vitro* ve *in vivo* değerlendirmek gerekmektedir (Carson ve ark., 2010).

Histamin reseptörleri, meme, serviks, over, vajina, uterus, vulvar, kolorektal kanser ve melanom olmak üzere çeşitli kanserlerde tanımlanmıştır (Park ve ark., 2023). Mast hücre mediatörlerinin kanser gelişimi üzerindeki etkilerini değerlendiren bazı çalışmaların sonuçları, bunların yeni kanser tedavilerinde potansiyel hedefler olabileceğini düşündürmektedir, çünkü bunların degranülasyonunun inhibisyonu pro-tümör mediatörlerinin salınımını engellemektedir (Carson ve ark., 2010).

Antihistaminiklerin kolorektal (Rajendra ve ark., 2004) ve lösemik (Aichberger ve ark., 2006) ve insan melanom hücre hatlarında tümör hücrelerinin büyümesini engellediği

gözlemlenmiştir (Jangi ve ark., 2006). Birkaç araştırmacı, antihistaminiklerin aminoetil eter grubunun, hücre içi histamin reseptörlerine bağlanarak MCF-7 meme kanseri hücrelerinin *in vitro* büyümesini engellediği ve bilinen bir tamoksifen türevi olan *N*, *N*-dietil-2-(4-(fenilmetil)fenoksi)etanamin HCl (DPPE) 'ye yapısal olarak benzediğini gözlemledi (Brandes ve ark., 1985; Brandes ve ark., 1994; Nadalin ve ark., 2003). Aynı zamanda doksilamin ve setirizin'in herhangi bir hücre hattının büyümesini değiştirmediğini doğruladılar. Brandes ve Mcdonald tarafından gerçekleştirilen bir *in vitro* çalışmada (Brandes ve ark., 1985) MCF-7 ve EVSA-T insan meme kanseri hücre hatlarında, hidroksizinin bu insan meme kanseri hücrelerine karşı sitotoksik olduğu gösterilmiştir.

Jiang ve arkadaşları (Jiang C. G. ve ark., 2010) H2 antihistaminik gruptan simetidin'in *in vitro* ve *in vivo* etkilerini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada MTT testi ile, SGC-7901 insan gastrik karsinom metastatik lenf nodu hücre hattında, MGC-803 insan gastrik mukuslu adenokarsinom hücre hattında ve GES-1 normal insan gastrik epitel hücre hattında 24 ve 48 saatlik maruziyetten sonra farklı simetidin konsantrasyonlarının büyümeyi inhibe edici etkilerini değerlendirilipve Simetidin'in neoplastik hücrelerde apoptozu indüklediğini ve normal gastrik hücrelerde neredeyse hiç etkisi olmadığını doğruladılar.

Histamin reseptörlerini hedef alan antihistaminikler, çoğu insan tarafından iyi tolere edilen, minimum yan etkilere sahip güvenli ilaçlar olduğundan kanser tedavisinde ilacın yeniden konumlandırılması için mükemmel birer adaydırlar. Feniramin Hidrojen Maleat, daha önceki bölümlerde açıklandığı gibi H1-antihistaminik ve damar genişletici özelliklere sahip bir alkil amin türevi olan feniraminin maleat'ın tuz formudur. Orijinal olarak onaylanmış endikasyonunun ötesinde diğer tıbbi durumları tedavi etmek için literatürde *in siliko* olarak fazla çalışma olmadığı gibi küçük hücreli dışı akciğer karsinomu KHDAK üzerinde feniramin maleatın etkilerini araştıran ilaç yeniden konumlandırma çerçevesinde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Rashmi ve ark. 2018'de yaptıkları inceleme makalesine göre tip 2 diyabette kullanılan bir ilaç olan metforminin bir dizi *in vitro* çalışmada kanser hücrelerinin çoğalmasını engellediği gösterilmiştir. Buna göre metforminin tirozin kinaz inhibitörlerine dirençli

KHDAK hücrelerini hassaslaştırdığı gösterilmiştir (Li L. ve ark., 2014; Shah ve ark., 2019).

Retrospektif bir kohort çalışmasında epilepsi ilacı Valproatın, uzun süreli kullanımının baş ve boyun kanserleri riskinde önemli bir azalma ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Ancak akciğer, mesane, kolon ve prostat kanserlerinde kanser insidansında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bu yüzden daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Kang H. ve ark., 2014a).

Chavez-Lopez ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada H1 anti-histaminik astemizol ve epidermal büyüme faktörü reseptör inhibitörü gefitinibin insan akciğer kanseri hücre hatlarında (A549 ve NCI-H1975) proliferasyon, sağkalım, apoptoz ve potasyum kanallarının gen ve protein ekspresyonu üzerindeki kombine etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada kullanılan ilaçların combine kullanımlarının hücre proliferasyonunu ve sağkalımını azaltarak üstün bir etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Her iki ilacın da tek başına NCI-H1975 hücrelerinin apoptozunu etkilemediği, ancak ilaçların IC₂₀ dozlarının kombine uygulanmasının, her iki ilacın tek başlarına uygulanmalarınakıyasla apoptozu yaklaşık dört kat artırdığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak yazarlar, astemizol-gefitinib kombinasyonunun akciğer kanseri hastaları için yeni ve umut verici bir tedavi olabileceğini öne sürmüşlerdir (Chávez-López ve ark., 2017; Shah ve ark., 2019).

KHDAK 'nin tedavisi olmakla birlikte, tedavide kullanılan ilaçlara karşı gelişen direnç, tümörün plastisitesi ve heterojenliği tedavinin zorlaşmasına neden olmaktadır. Bu nedenle, özellikle combine tedaviler için alternatif ilaç arayışları devam etmektedir. Bizde bu nedenle tezimizde, KHDAK'ı tedavi etmek için feniramin maleatın ilaç yeniden konumlandırma kapsamında değerlendirme potansiyelini belirlemek istedik. Tez kapsamında öncelikle, Feniramin maleat'ın diğer kanser ilaçlarına olan benzerliğini DrugCentral2023.org web server üzerinden araştırdık. Tablo 4.2 de görüldüğü üzere FHM, en yüksek olarak akciğer kanseri tedavisinde kullanılan erlotinibe benzemektedir. Bu yüzden akciğer kanseri hücre hattında FHM'nin etkili olabileceğini öngördük. Erlotinb'e benzerliğinden yola çıkarak İlacın Hücrelerin proliferasyonu üzerine etkisi olabileceğini ve hatta sitotoksik etki de gösterebileceğini öngörerek tez kapsamında olası hücre ölümünün apoptoz kaynaklı olup olmadığını test etmek istedik. Apoptoz içsel ve

dışsal olmak üzere iki ana yolağa sahiptir. Bu noktada, İlacın olası apoptotik etkilerinin hangi yolak üzerinden gerçekleştirildiğini belirlemek için dışsal yolağı *in silico* olarak, içsel yolağı da *in vitro* olarak test ettik. Apoptoz dışsal yolak denememizde, dışsal yolakta önemli rol oynayan Fas ligand L reseptörü (FasLR) ile feniramin maleat arasındaki etkileşim *in silico* olarak değerlendirilmiştir. *In silico* verilerimize göre, FHM,/FasLR arasındaki etkileşimde farklı bağ tiplerinin yer aldığı bulunmuştur. Bu bağlar: FasLR proteinin tireonin-165, valin-188, tireonin-97, serin-42, lizin-45, metiyonin-127, tirozin-195, lizin-45, tireonin-129 aminoasitleri ile FHM arasındaki van der Waals bağları ve . Glutamin-164, lösin-189 ve alanin-94 aminoasitleri ile FHM arasında hidrojen bağı ve prolin-43 aminoasidi ile FHM arasında pi-alkil bağı olarak belirlenmiştir.

In vitro sonuçlarımıza göre FHM A549 hücreleri üzerinde tek başına ve 5FU ile kombine uygulandığında sitotoksik bir etki göstermesine rağmen, elisa ve western blot deneylerinde kaspaz-7 seviyelerindeki değişim üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Apoptozun dışsal yolağı genellikle Fas ligand (FasL) ve TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) gibi hücre dışı ölüm reseptör ligandlarının ilgili transmembran reseptörlerine bağlanmasıyla tetiklenir. Moleküler docking sonuçlarında dışsal yolak proteinlerinden FasL reseptörü ve FHM nin arasındaki etkileşim A549 hücrelerinde ki apoptozu dışsal yolaktan başlatıyor gibi görünmektedir. Kaspaz 7 ve kesilmiş kaspaz-7 nin seviyelerindeki artış ölümün apoptozla olduğunu göstermektedirancak 5FU ve FHM kombine tedavi uygulamasında hücre ölümünün kaspaz-7 üzerinden değilde farklı bir protein üzerinden gerçekleştirmiş olabileceğini düşündürmektedir. Bu noktada FHM'nin combine terapiler için iyi bir alternatif olduğunu önermeden önce mutlaka ölüm yolağındaki moleküler mekanizmanın açığa çıkarılması gerekmektedir.

İlaç yeniden konumlandırma kapsamında, toksisitesi çok az olan feniramin hidrojen maleatın olası anti-kanser etkilerinin ilk kez belirlendiği bu çalışmayla elde ettiğimiz verilerin yeni *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar için yol gösterici olacağını umud etmekteyiz.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Feniramin maleat, çeşitli alerjik durumların tedavisinde kullanılan, kolay erişilebilir bir antihistaminiktir ve daha önce literatürde ilaç yeniden konumlandırma kapsamında akciğer kanser tedavisi ile ilgili yapılmış *in siliko* bir çalışma yoktur. Bu nedenle feniramin hidrojen maleatın anti-anker potansiyelini değerlendiren bu tez kapsamında;

1-FHM'nin kemoteröpatiklere benzerliği Drug Central2023.org web server ile analiz edilmiştir. RMSD (Root Mean Square Deviation) değerlerine göre FHM'nin kanser tedavisinde kullanılan erlotinib isimli ilaçla benzerliği 0,96 olarak belirlenmiştir.

2- Moleküler docking sonuçlarımıza göre, FHM ve FasLR arasındaki bağlanma afinitesi -6,2 kcal/mol'dür. Analizin sonuçlarına göre FHM ve FasLR arasında van der Waals, pi-alkil ve hidrojen bağı olmak üzere üç farklı kimyasal etkileşim bulunmaktadır.

3-İn vitro sonuçlarımıza göre sitotoksite testlerinde FHM'nin tek başına ve 5-fluorourasil (5-FU) ile kombine tedavide sitotoksik etki gösterdiği açığa çıkarılmıştır.

4-Migrasyon test sonuçlarımıza göre hem tek başına FHM hem de kombine tedavinin hücre göçünü engellediği gösterilmiştir.

5-Koloni oluşumu deneylerinde sadece kontrol gruplarında koloni oluşumu gözlenmiş tek başına ve kombine tedavi gruplarında hücrelerin koloni oluşturmadığı gözlenmiştir.

6-ELISA test sonuçlarımıza göre, FHM tek başına kaspaz-7 protein seviyelerinde artışa sebep olurken, 5FU ile kombine uygulandığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır.

7-Western blot analiz sonuçlarımıza göre, ELISA testinde anlamlı bulunan gruplarda FHM'nin tek başına kaspaz-7 ve kesilmiş kaspaz-7 seviyelerinde anlamlı artış görülmüş fakat kombine tedavi uygulanan deney gruplarında bant oluşmamıştır.

Sonuç olarak, Feniramin hidrojen maleatın ilaç yeniden konumlandırma kapsamında antikanser potansiyeli yüksek iyi bir alternatif olabileceği bulunmuştur. İleri düzey *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara zemin oluşturmasını umuyoruz.

KAYNAKLAR

- Agu PC, Afiukwa CA, Orji OU, Ezeh EM, Ofoke IH, Ogbu CO , ve ark. Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. *Sci Rep*. 2023; 13: 13398.
- Aichberger KJ, Mayerhofer M, Vales A, Krauth MT, Gleixner KV, Bilban M , ve ark. The cml-related oncoprotein bcr/abl induces expression of histidine decarboxylase (hdc) and the synthesis of histamine in leukemic cells. *Blood*. 2006; 108: 3538-3547.
- Armando RG, Mengual Gómez DL, Gomez DE. New drugs are not enough-drug repositioning in oncology: An update. *Int J Oncol*. 2020; 56: 651-684.
- Bacchi S, Palumbo P, Sponta A, Coppolino MF. Clinical pharmacology of non-steroidal anti-inflammatory drugs: A review. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem*. 2012; 11: 52-64.
- Bahmad HF, Daher D, Aljamal AA, Elajami MK, Oh KS, Alvarez Moreno JC , ve ark. Repurposing of anticancer stem cell drugs in brain tumors. *J Histochem Cytochem*. 2021; 69: 749-773.
- Bahmad HF, Demus T, Moubarak MM, Daher D, Alvarez Moreno JC, Polit F , ve ark. Overcoming drug resistance in advanced prostate cancer by drug repurposing. *Med Sci (Basel)*. 2022; 10.
- Bahmad HF, Elajami MK, El Zarif T, Bou-Gharios J, Abou-Antoun T, Abou-Kheir W. Drug repurposing towards targeting cancer stem cells in pediatric brain tumors. *Cancer Metastasis Rev*. 2020; 39: 127-148.
- Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C , ve ark. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: Prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet*. 2005; 366: 1267-1278.
- Barzaman K, Karami J, Zarei Z, Hosseinzadeh A, Kazemi MH, Moradi-Kalbolandi S , ve ark. Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *Int Immunopharmacol*. 2020; 84: 106535.
- Bhateja P, Dowlati A, Sharma N. Phase i study of the combination of quinacrine and erlotinib in patients with locally advanced or metastatic non small cell lung cancer. *Invest New Drugs*. 2018; 36: 435-441.
- Blaiss MS. Allergic rhinitis and impairment issues in schoolchildren: A consensus report. *Curr Med Res Opin*. 2004; 20: 1937-1952.
- Brandes LJ, Macdonald LM, Bogdanovic RP. Evidence that the antiestrogen binding site is a histamine or histamine-like receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1985; 126: 905-910.
- Brandes LJ, Warrington RC, Arron RJ, Bogdanovic RP, Fang W, Queen GM , ve ark. Enhanced cancer growth in mice administered daily human-equivalent doses of some h1-antihistamines: Predictive in vitro correlates. *J Natl Cancer Inst*. 1994; 86: 770-775.
- Breckenridge A, Jacob R. Overcoming the legal and regulatory barriers to drug repurposing. *Nat Rev Drug Discov*. 2019; 18: 1-2.
- Brooijmans N, Kuntz ID. Molecular recognition and docking algorithms. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*. 2003; 32: 335-373.
- Carson S, Lee N, Thakurta S. Drug class reviews. In *Drug class review: Newer antihistamines: Final report update 2*. Portland (OR): Oregon Health & Science University

Copyright © 2010 by Oregon Health & Science University, Portland, Oregon 97239. All rights reserved.; 2010.

- Cavalla D. Predictive methods in drug repurposing: Gold mine or just a bigger haystack? *Drug Discov Today*. 2013; 18: 523-532.
- Celepli S, Bigat İ, Celepli P, Karagin PH. Apoptoz ve apoptotik yolların gözden geçirilmesi. 2020.
- Chang A. Chemotherapy, chemoresistance and the changing treatment landscape for nsclc. *Lung Cancer*. 2011; 71: 3-10.
- Chang M, Smith S, Thorpe A, Barratt MJ, Karim F. Evaluation of phenoxybenzamine in the cfa model of pain following gene expression studies and connectivity mapping. *Mol Pain*. 2010; 6: 56.
- Chávez-López MG, Zúñiga-García V, Hernández-Gallegos E, Vera E, Chasiquiza-Anchatuña CA, Viteri-Yáñez M , ve ark. The combination astemizole-gefitinib as a potential therapy for human lung cancer. *Onco Targets Ther*. 2017; 10: 5795-5803.
- Cianchi F, Vinci MC, Masini E. Histamine in cancer: The dual faces of the coin. *Cancer Biol Ther*. 2008; 7: 36-37.
- Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M , ve ark. Mir-15 and mir-16 induce apoptosis by targeting bcl2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102: 13944-13949.
- Crivellato E, Nico B, Ribatti D. Mast cells and tumour angiogenesis: New insight from experimental carcinogenesis. *Cancer Lett*. 2008; 269: 1-6.
- Cuvitoglu A, Isik Z. Network neighborhood operates as a drug repositioning method for cancer treatment. *PeerJ*. 2023; 11: e15624.
- Cvetkovic RS, Goa KL. Lopinavir/ritonavir: A review of its use in the management of hiv infection. *Drugs*. 2003; 63: 769-802.
- Das DR, Kumar D, Kumar P, Dash BP. Molecular docking and its application in search of antisickling agent from carica papaya. *J. Appl. Biol. Biotechnol*. 2020; 8: 105-116.
- Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspases. *Oncogene*. 2003; 22: 8543-8567.
- del Cuvillo A, Mullol J, Bartra J, Dávila I, Jáuregui I, Montoro J , ve ark. Comparative pharmacology of the h1 antihistamines. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2006; 16 Suppl 1: 3-12.
- Doumat G, Daher D, Zerdan MB, Nasra N, Bahmad HF, Recine M , ve ark. Drug repurposing in non-small cell lung carcinoma: Old solutions for new problems. *Curr Oncol*. 2023; 30: 704-719.
- Egami K, Murohara T, Shimada T, Sasaki K, Shintani S, Sugaya T , ve ark. Role of host angiotensin ii type 1 receptor in tumor angiogenesis and growth. *J Clin Invest*. 2003; 112: 67-75.
- El Zarif T, Yibirin M, De Oliveira-Gomes D, Machaalani M, Nawfal R, Bittar G , ve ark. Overcoming therapy resistance in colon cancer by drug repurposing. *Cancers (Basel)*. 2022; 14.
- Ellegaard AM, Dehlendorff C, Vind AC, Anand A, Cedervik L, Petersen NHT , ve ark. Repurposing cationic amphiphilic antihistamines for cancer treatment. *EBioMedicine*. 2016; 9: 130-139.
- Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007; 35: 495-516.
- Eseverri J. [projection of new antihistamines]. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2000; 28: 143-152.
- Faustino-Rocha AI, Ferreira R, Gama A, Oliveira PA, Ginja M. Antihistamines as promising drugs in cancer therapy. *Life Sci*. 2017; 172: 27-41.
- Fulda S. Therapeutic exploitation of necroptosis for cancer therapy. *Semin Cell Dev Biol*. 2014; 35: 51-56.
- Garcia-Caballero M, Neugebauer E, Campos R, Nunez de Castro I, Vara-Thorbeck C. Increased histidine decarboxylase (hdc) activity in human colorectal cancer: Results of a study on ten patients. *Agents Actions*. 1988; 23: 357-360.
- Golightly LK, Greos LS. Second-generation antihistamines: Actions and efficacy in the management of allergic disorders. *Drugs*. 2005; 65: 341-384.

- Gómez-Fabre PM, de Pedro E, Medina MA, Núñez de Castro I, Márquez J. Polyamine contents of human breast cancer cells treated with the cytotoxic agents chlorpheniramine and dehydrodidemnin b. *Cancer Lett.* 1997; 113: 141-144.
- Grilo AL, Mantalaris A. Apoptosis: A mammalian cell bioprocessing perspective. *Biotechnol Adv.* 2019; 37: 459-475.
- Groth-Pedersen L, Jäättelä M. Combating apoptosis and multidrug resistant cancers by targeting lysosomes. *Cancer Lett.* 2013; 332: 265-274.
- Halip L, Avram S, Curpan R, Borota A, Bora A, Bologa C , ve ark. Exploring drugcentral: From molecular structures to clinical effects. *J Comput Aided Mol Des.* 2023; 37: 681-694.
- Hammoud H, Saker Z, Harati H, Fares Y, Bahmad HF, Nabha S. Drug repurposing in medulloblastoma: Challenges and recommendations. *Curr Treat Options Oncol.* 2020; 22: 6.
- Han JY, Lee SH, Yoo NJ, Hyung LS, Moon YJ, Yun T , ve ark. A randomized phase ii study of gefitinib plus simvastatin versus gefitinib alone in previously treated patients with advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2011; 17: 1553-1560.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011; 144: 646-674.
- Handley DA, Magnetti A, Higgins AJ. Therapeutic advantages of third generation antihistamines. *Expert Opin Investig Drugs.* 1998; 7: 1045-1054.
- Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. Ampk: A nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012; 13: 251-262.
- Harmon BV, Allan DJ. Apoptosis. *Adv Genet.* 1997; 35: 35-56.
- Hazal U. (2022). İlaçların yeniden konumlandırılmasında yapay zeka. Retrieved from <https://pharmaino.com/ilaclarin-yeniden-konumlandirilmasinda-yapay-zeka/>
- Hecht M, Harrer T, Körber V, Sarpong EO, Moser F, Fiebig N , ve ark. Cytotoxic effect of efavirenz in bxp-3 pancreatic cancer cells is based on oxidative stress and is synergistic with ionizing radiation. *Oncol Lett.* 2018; 15: 1728-1736.
- Ho MM, Ng AV, Lam S, Hung JY. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Res.* 2007; 67: 4827-4833.
- Hobbs BP, Barata PC, Kanjanapan Y, Paller CJ, Perlmutter J, Pond GR , ve ark. Seamless designs: Current practice and considerations for early-phase drug development in oncology. *J Natl Cancer Inst.* 2019; 111: 118-128.
- Hosseinimehr SJ, Ghasemi F, Flahatgar F, Rahmadian N, Ghasemi A, Asgarian-Omran H. Atorvastatin sensitizes breast and lung cancer cells to ionizing radiation. *Iran J Pharm Res.* 2020; 19: 80-88.
- Jancinová V, Petříková M, Májeková M, Nosál R. Effect of pheniramine, chlorpheniramine and brompheniramine on stimulated blood platelets: Structure-activity relationships. *Inflamm Res.* 1995; 44 Suppl 1: S38-39.
- Jangi SM, Díaz-Pérez JL, Ochoa-Lizarralde B, Martín-Ruiz I, Asumendi A, Pérez-Yarza G , ve ark. H1 histamine receptor antagonists induce genotoxic and caspase-2-dependent apoptosis in human melanoma cells. *Carcinogenesis.* 2006; 27: 1787-1796.
- Jia X, Gu Z, Chen W, Jiao J. Tigecycline targets non-small cell lung cancer through inhibition of mitochondrial function. *Fundam Clin Pharmacol.* 2016; 30: 297-306.
- Jiang CG, Liu FR, Yu M, Li JB, Xu HM. Cimetidine induces apoptosis in gastric cancer cells in vitro and inhibits tumor growth in vivo. *Oncol Rep.* 2010; 23: 693-700.
- Jiang J, Geng G, Yu X, Liu H, Gao J, An H , ve ark. Repurposing the anti-malarial drug dihydroartemisinin suppresses metastasis of non-small-cell lung cancer via inhibiting nf- κ b/glut1 axis. *Oncotarget.* 2016; 7: 87271-87283.

- Jiang X, Lu W, Shen X, Wang Q, Lv J, Liu M , ve ark. Repurposing sertraline sensitizes non-small cell lung cancer cells to erlotinib by inducing autophagy. *JCI Insight*. 2018; 3.
- Jones GS, Baldwin DR. Recent advances in the management of lung cancer. *Clin Med (Lond)*. 2018; 18: s41-s46.
- Kale J, Osterlund EJ, Andrews DW. Bcl-2 family proteins: Changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ*. 2018; 25: 65-80.
- Kallunki T, Olsen OD, Jaattela M. Cancer-associated lysosomal changes: Friends or foes? *Oncogene*. 2013; 32: 1995-2004.
- Kang H, Gillespie TW, Goodman M, Brodie SA, Brandes M, Ribeiro M , ve ark. Long-term use of valproic acid in us veterans is associated with a reduced risk of smoking-related cases of head and neck cancer. *Cancer*. 2014a; 120: 1394-1400.
- Kang M, Jeong CW, Ku JH, Kwak C, Kim HH. Inhibition of autophagy potentiates atorvastatin-induced apoptotic cell death in human bladder cancer cells in vitro. *Int J Mol Sci*. 2014b; 15: 8106-8121.
- Karamanakos PN, Pappas P, Marselos M. Possible role for chlorpheniramine in the treatment of l-dopa induced dyskinesia in parkinson's disease. *Pharm World Sci*. 2008; 30: 1-2.
- Keiser MJ, Setola V, Irwin JJ, Laggner C, Abbas AI, Hufeisen SJ , ve ark. Predicting new molecular targets for known drugs. *Nature*. 2009; 462: 175-181.
- Kim S, Chen J, Cheng T, Gindulyte A, He J, He S , ve ark. Pubchem 2023 update. *Nucleic Acids Res*. 2023; 51: D1373-D1380.
- Kitchen DB, Decornez H, Furr JR, Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications. *Nature reviews Drug discovery*. 2004; 3: 935-949.
- Knox C, Wilson M, Klinger CM, Franklin M, Oler E, Wilson A , ve ark. Drugbank 6.0: The drugbank knowledgebase for 2024. *Nucleic Acids Res*. 2024; 52: D1265-D1275.
- Kuhn M, Campillos M, Gonzalez P, Jensen LJ, Bork P. Large-scale prediction of drug-target relationships. *FEBS Lett*. 2008; 582: 1283-1290.
- Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: Pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest*. 2005; 115: 2665-2672.
- Lei Z, Yang W, Zuo Y. Beta-blocker and survival in patients with lung cancer: A meta-analysis. *PLoS One*. 2021; 16: e0245773.
- Leurs R, Church MK, Taglialatela M. H1-antihistamines: Inverse agonism, anti-inflammatory actions and cardiac effects. *Clin Exp Allergy*. 2002; 32: 489-498.
- Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*. 2008; 27: 6194-6206.
- Li L, Han R, Xiao H, Lin C, Wang Y, Liu H , ve ark. Metformin sensitizes egfr-tki-resistant human lung cancer cells in vitro and in vivo through inhibition of il-6 signaling and emt reversal. *Clin Cancer Res*. 2014; 20: 2714-2726.
- Li Y, Zhang X, Cao D. The role of shape complementarity in the protein-protein interactions. *Scientific reports*. 2013; 3: 3271.
- Liu R, Xu KP, Tan GS. Cyclooxygenase-2 inhibitors in lung cancer treatment: Bench to bed. *Eur J Pharmacol*. 2015; 769: 127-133.
- Liu WJ, Du Y, Wen R, Yang M, Xu J. Drug resistance to targeted therapeutic strategies in non-small cell lung cancer. *Pharmacol Ther*. 2020; 206: 107438.
- Maeda H. Nitroglycerin enhances vascular blood flow and drug delivery in hypoxic tumor tissues: Analogy between angina pectoris and solid tumors and enhancement of the epr effect. *J Control Release*. 2010; 142: 296-298.
- Mansoori B, Mohammadi A, Davudian S, Shirjang S, Baradaran B. The different mechanisms of cancer drug resistance: A brief review. *Adv Pharm Bull*. 2017; 7: 339-348.

- Marima R, Hull R, Dlamini Z, Penny C. Efavirenz and lopinavir/ritonavir alter cell cycle regulation in lung cancer. *Front Oncol.* 2020; 10: 1693.
- Martinel Lamas DJ, Rivera ES, Medina VA. Histamine h4 receptor: Insights into a potential therapeutic target in breast cancer. *Front Biosci (Schol Ed).* 2015; 7: 1-9.
- Medina MA, García de Veas R, Morata P, Lozano J, Sánchez-Jiménez F. Chlorpheniramine inhibits the synthesis of ornithine decarboxylase and the proliferation of human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat.* 1995; 35: 187-194.
- Meng XY, Zhang HX, Mezei M, Cui M. Molecular docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr Comput Aided Drug Des.* 2011; 7: 146-157.
- Moffat JG, Rudolph J, Bailey D. Phenotypic screening in cancer drug discovery - past, present and future. *Nat Rev Drug Discov.* 2014; 13: 588-602.
- Mukhopadhyay T, Sasaki J, Ramesh R, Roth JA. Mebendazole elicits a potent antitumor effect on human cancer cell lines both in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res.* 2002; 8: 2963-2969.
- Nadalin V, Cotterchio M, Kreiger N. Antihistamine use and breast cancer risk. *Int J Cancer.* 2003; 106: 566-568.
- Nakane T, Kotecha A, Sente A, McMullan G, Masiulis S, Brown P, ve ark. Single-particle cryo-em at atomic resolution. *Nature.* 2020; 587: 152-156.
- Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 1999; 6: 1028-1042.
- Nielsen SF, Nordestgaard BG, Bojesen SE. Statin use and reduced cancer-related mortality. *N Engl J Med.* 2012; 367: 1792-1802.
- Nowak-Sliwinska P, Scapozza L, Ruiz i Altaba A. Drug repurposing in oncology: Compounds, pathways, phenotypes and computational approaches for colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2019; 1871: 434-454.
- Oh MS, Guzner A, Wainwright DA, Mohindra NA, Chae YK, Behdad A, ve ark. The impact of beta blockers on survival outcomes in patients with non-small-cell lung cancer treated with immune checkpoint inhibitors. *Clin Lung Cancer.* 2021; 22: e57-e62.
- Pantziarka P, Bouche G, Meheus L, Sukhatme V, Sukhatme VP, Vikas P. The repurposing drugs in oncology (redo) project. *Ecanermedicalscience.* 2014; 8: 442.
- Park C, Lee JW, Kim K, Seen DS, Jeong JY, Huh WK. Simultaneous activation of cxc chemokine receptor 4 and histamine receptor h1 enhances calcium signaling and cancer cell migration. *Sci Rep.* 2023; 13: 1894.
- Parvathaneni V, Elbatanony RS, Goyal M, Chavan T, Vega N, Kolluru S, ve ark. Repurposing bedaquiline for effective non-small cell lung cancer (nslc) therapy as inhalable cyclodextrin-based molecular inclusion complexes. *Int J Mol Sci.* 2021; 22.
- Parvathaneni V, Kulkarni NS, Muth A, Gupta V. Drug repurposing: A promising tool to accelerate the drug discovery process. *Drug Discov Today.* 2019; 24: 2076-2085.
- Patil SM, Sawant SS, Kunda NK. Inhalable bedaquiline-loaded cubosomes for the treatment of non-small cell lung cancer (nslc). *Int J Pharm.* 2021; 607: 121046.
- Peña-Blanco A, García-Sáez AJ. Bax, bak and beyond - mitochondrial performance in apoptosis. *Febs j.* 2018; 285: 416-431.
- Peng F, Liao M, Qin R, Zhu S, Peng C, Fu L, ve ark. Regulated cell death (rcd) in cancer: Key pathways and targeted therapies. *Signal Transduct Target Ther.* 2022; 7: 286.
- Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY).* 2016; 8: 603-619.
- Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, ve ark. Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov.* 2019; 18: 41-58.

- Rabben HL, Andersen GT, Ianevski A, Olsen MK, Kainov D, Grønbech JE, ve ark. Computational drug repositioning and experimental validation of ivermectin in treatment of gastric cancer. *Front Pharmacol*. 2021; 12: 625991.
- Rajendra S, Mulcahy H, Patchett S, Kumar P. The effect of h2 antagonists on proliferation and apoptosis in human colorectal cancer cell lines. *Dig Dis Sci*. 2004; 49: 1634-1640.
- Repka-Ramirez MS. New concepts of histamine receptors and actions. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2003; 3: 227-231.
- Ribatti D, Guidolin D, Marzullo A, Nico B, Annese T, Benagiano V, ve ark. Mast cells and angiogenesis in gastric carcinoma. *Int J Exp Pathol*. 2010; 91: 350-356.
- Rizvi SAA, Ferrer G, Khawaja UA, Sanchez-Gonzalez MA. Chlorpheniramine, an old drug with new potential clinical applications: A comprehensive review of the literature. *Curr Rev Clin Exp Pharmacol*. 2024; 19: 137-145.
- Rudin CM, Brahmer JR, Jurgens RA, Hann CL, Ettinger DS, Sebree R, ve ark. Phase 2 study of pemetrexed and itraconazole as second-line therapy for metastatic nonsquamous non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2013; 8: 619-623.
- Sahoo R, Pattanaik S, Pattnaik G, Mallick S, Mohapatra R. Review on the use of molecular docking as the first line tool in drug discovery and development. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2022; 84.
- Sarvepalli S, Parvathaneni V, Chauhan G, Shukla SK, Gupta V. Inhaled indomethacin-loaded liposomes as potential therapeutics against non-small cell lung cancer (nsclc). *Pharm Res*. 2022; 39: 2801-2815.
- Sasaki J, Ramesh R, Chada S, Gomyo Y, Roth JA, Mukhopadhyay T. The anthelmintic drug mebendazole induces mitotic arrest and apoptosis by depolymerizing tubulin in non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2002; 1: 1201-1209.
- Schulz M. Book: Dark remedy: The impact of thalidomide and its revival as a vital medicine. *Bmj*. 2001; 322: 1608-1608.
- Shah RR, Stonier PD. Repurposing old drugs in oncology: Opportunities with clinical and regulatory challenges ahead. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 2019; 44: 6-22.
- Shamas-Din A, Kale J, Leber B, Andrews DW. Mechanisms of action of bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013; 5: a008714.
- Sidorova M, Petrikaite V. The effect of beta adrenoreceptor blockers on viability and cell colony formation of non-small cell lung cancer cell lines a549 and h1299. *Molecules*. 2022; 27.
- Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin*. 2022; 72: 7-33.
- Simons FE. Advances in h1-antihistamines. *N Engl J Med*. 2004; 351: 2203-2217.
- Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: The balancing act of bcl-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019; 20: 175-193.
- Skwarski M, McGowan DR, Belcher E, Di Chiara F, Stavroulias D, McCole M, ve ark. Mitochondrial inhibitor atovaquone increases tumor oxygenation and inhibits hypoxic gene expression in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2021; 27: 2459-2469.
- Sleire L, Forde HE, Netland IA, Leiss L, Skeie BS, Enger PO. Drug repurposing in cancer. *Pharmacol Res*. 2017; 124: 74-91.
- Smyth MS, Martin JH. X ray crystallography. *Mol Pathol*. 2000; 53: 8-14.
- Sosa Iglesias V, Giuranno L, Dubois LJ, Theys J, Vooijs M. Drug resistance in non-small cell lung cancer: A potential for notch targeting? *Front Oncol*. 2018; 8: 267.
- Sousa SF, Fernandes PA, Ramos MJ. Protein-ligand docking: Current status and future challenges. *Proteins: structure, function, and bioinformatics*. 2006; 65: 15-26.

- Sugiki T, Kobayashi N, Fujiwara T. Modern technologies of solution nuclear magnetic resonance spectroscopy for three-dimensional structure determination of proteins open avenues for life scientists. *Comput Struct Biotechnol J*. 2017; 15: 328-339.
- Sukhai MA, Prabha S, Hurren R, Rutledge AC, Lee AY, Srisanthadevan S , ve ark. Lysosomal disruption preferentially targets acute myeloid leukemia cells and progenitors. *J Clin Invest*. 2013; 123: 315-328.
- Talevi A, Bellera CL. Challenges and opportunities with drug repurposing: Finding strategies to find alternative uses of therapeutics. *Expert Opin Drug Discov*. 2020; 15: 397-401.
- Taylor JS, Burnett RM. Darwin: A program for docking flexible molecules. *Proteins*. 2000; 41: 173-191.
- Thangam EB, Jemima EA, Singh H, Baig MS, Khan M, Mathias CB , ve ark. The role of histamine and histamine receptors in mast cell-mediated allergy and inflammation: The hunt for new therapeutic targets. *Front Immunol*. 2018; 9: 1873.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: Enemies within. *Science*. 1998; 281: 1312-1316.
- Trapp S, Rosania GR, Horobin RW, Kornhuber J. Quantitative modeling of selective lysosomal targeting for drug design. *Eur Biophys J*. 2008; 37: 1317-1328.
- Turabi KS, Deshmukh A, Paul S, Swami D, Siddiqui S, Kumar U , ve ark. Drug repurposing-an emerging strategy in cancer therapeutics. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2022; 395: 1139-1158.
- Ursu O, Holmes J, Knockel J, Bologa CG, Yang JJ, Mathias SL , ve ark. Drugcentral: Online drug compendium. *Nucleic Acids Res*. 2017; 45: D932-D939.
- Venugopal K, Reddy MM, Bharathraj MY, Jaligheid K, Kushal DP. Pheniramine maleate-induced rhabdomyolysis and aki: Is it fatal? *Toxicol Int*. 2014; 21: 319-321.
- Voruganti HK, Dasgupta B. A novel volumetric criterion for optimal shape matching of surfaces for protein-protein docking. *Journal of Computational Design and Engineering*. 2018; 5: 180-190.
- Wagner MJ, Cranmer LD, Loggers ET, Pollack SM. Propranolol for the treatment of vascular sarcomas. *J Exp Pharmacol*. 2018; 10: 51-58.
- Walther U, Emmrich K, Ramer R, Mittag N, Hinz B. Lovastatin lactone elicits human lung cancer cell apoptosis via a cox-2/ppary-dependent pathway. *Oncotarget*. 2016; 7: 10345-10362.
- Wick M, Hurteau G, Dessev C, Chan D, Geraci MW, Winn RA , ve ark. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs mediating cyclooxygenase-independent inhibition of lung cancer cell growth. *Mol Pharmacol*. 2002; 62: 1207-1214.
- Wong RS. Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011; 30: 87.
- Xia Y, Sun M, Huang H, Jin WL. Drug repurposing for cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther*. 2024; 9: 92.
- Yang F, Zhang Q, Ji X, Zhang Y, Li W, Peng S , ve ark. Machine learning applications in drug repurposing. *Interdiscip Sci*. 2022; 14: 15-21.
- Yasuda H, Yamaya M, Nakayama K, Sasaki T, Ebihara S, Kanda A , ve ark. Randomized phase ii trial comparing nitroglycerin plus vinorelbine and cisplatin with vinorelbine and cisplatin alone in previously untreated stage iiib/iv non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2006; 24: 688-694.
- Zeng Q, Ma X, Song Y, Chen Q, Jiao Q, Zhou L. Targeting regulated cell death in tumor nanomedicines. *Theranostics*. 2022; 12: 817-841.

Zhao J, Hou Y, Yin C, Hu J, Gao T, Huang X , ve ark. Upregulation of histamine receptor h1 promotes tumor progression and contributes to poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 2020; 39: 1724-1738.

Zheng M. Classification and pathology of lung cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2016; 25: 447-468.

Zhou B, Wang R, Wu P, Kong DX. Drug repurposing based on drug-drug interaction. *Chem Biol Drug Des*. 2015; 85: 137-144.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı		Uyruğu	
Soyadı		Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise		
Lisans		
Yüksek Lisans		
Doktora		

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)

Burslar-Ödüller:

Yayınlar ve Bildiriler:

