

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

YENİ SENTEZLENEN BAZI ORGANİK MOLEKÜLLERİN ANTİ-KANSER
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENEREK İLAÇ ADAYI OLMA
POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Emine ŞAHİN

HAZİRAN 2023
TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

YENİ SENTEZLENEN BAZI ORGANİK MOLEKÜLLERİN ANTİ-KANSER
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENEREK İLAÇ ADAYI OLMA
POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Emine ŞAHİN

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde

"DOKTOR (KİMYA)"

Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 11 / 05 / 2023

Tezin Savunma Tarihi : 16 / 06 / 2023

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Yakup KOLCUOĞLU

Trabzon 2023

ÖNSÖZ

Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim dalında doktora tezi olarak hazırlanmıştır.

Çalışmada, hEGFR proteinine bağlanma incelemek istediğimiz ve yeni 1,2,4-triazol bileşiklerinin hEGFR üzerine inhibitör etkisi *in vitro* ortamda biyokimyasal olarak incelenerek karakterize edildi. Tezde kullanılan moleküller 118Z187 nolu TÜBİTAK projesi kapsamında sentezlenmiştir. Aynı zamanda inhibitör olarak en aktif olan bileşiklerin aktiviteleri, hücre kültürü çalışmalarıyla *in vitro* ortamda araştırılmıştır. Tezin çalışmalarında kullanılan moleküllerin ADME özellikleri ise *in silico* olarak incelenmiştir.

Prof. Dr. Şenay ŞANLIER hocama yürütülen sitotoksosite çalışmalarında sunduğu katkılarından dolayı teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Ayrıca, doktora çalışmaları boyunca desteğini esirgemeyen, nezaketi ve çalışkanlığıyla örnek olan saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Yakup KOLCUOĞLU'na saygı ve şükranlarımı sunarım.

Son olarak, kadınların eşit haklardan yararlanabilmesi ve toplumun her alanında var olabilmesi için mücadele veren ve uygar bir toplum olma yönünde ilke ve inkılaplarıyla yolumuzu aydınlatan devletimizin kurucusu Gazi Mustafa Kemal ATATÜRK'ü özlem ve minnetle anarken, çağdaş bir eğitim almamı sağlayarak öncelikle fikri bağımsızlığımı daha sonra da ekonomik bağımsızlığımı kazanabilmem için her türlü maddi ve manevi olanaklarını seferber eden, her koşulda yanımda olan, varlığımı borçlu olduğum canım anneme ve canım babama ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim abilerime sonsuz minnet ve sevgilerimi sunuyorum.

Emine ŞAHİN

Trabzon 2023

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “Yeni sentezlenen bazı organik moleküllerin anti-kanser özelliklerinin incelenerek ilaç adayı olma potansiyellerinin araştırılması” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Yakup KOLCUOĞLU’nun sorumluluğunda tamamladığımı, verileri /örnekleri kendim topladığım, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 16/06/2023

Emine ŞAHİN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ.....	XI
KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ	XII
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Kanser Hastalığının Tarihçesi ve Tedavi Yöntemleri	2
1.2.1. Cerrahi Yöntem	5
1.2.2. Radyoterapi	6
1.2.3. Kemoterapi	7
1.2.4. Hormon Tedavisi.....	8
1.2.5. Gen Terapisi	9
1.2.6. İmmünoterapi	11
1.2.7. Hedefe Yönelik Tedaviler	13
1.3. Protein Kinazlar.....	17
1.3.1. Protein Kinazların Sınıflandırılması.....	18
1.3.2. Reseptör Tirozin Kinazlar	20
1.3.3. Reseptör Tirozin Kinazların Aktivasyon Mekanizması	25
1.4. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR)	28
1.5. Reseptör Tirozin Kinaz İnhibitörleri	32
1.6. EGFR-TKİ İlaçlarının Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflandırılması.....	35
1.7. Tirozin Kinaz İnhibitör İlaçlarının Geliştirilme Sürecinde Yapılan Bazı Çalışmalar.....	38
1.8. Triazol Bileşiklerinin Kanser Tedavisinde Kullanımı.....	45
1.9. Çalışmanın Amacı	47
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	48

2.1.	Çalışmada Kullanılan Bileşikler.....	48
2.2.	Enzim İnhibisyon Çalışmaları	48
2.2.1.	Enzim Aktivitesi.....	48
2.2.2.	Optimum Enzim Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	50
2.2.3.	Optimum Susbrat Konsantrasyonunun Belirlenmesi ve Kinetik Parametrelerin Hesaplanması.....	50
2.2.4.	Enzim İnhibisyonu	50
2.3.	ADME Çalışmaları.....	51
2.4.	<i>In Vitro</i> Sitotoksosite Çalışmaları	52
2.4.1.	Maddelerin Hazırlanması	52
2.4.2.	Hücrelerin Çoğaltılması	52
2.4.3.	Sitotoksosite Testleri	53
3.	BULGULAR	54
3.1.	Çalışmada Kullanılan Moleküller	54
3.2.	Enzim Aktivitesinin Tayini ve Optimizasyonu	61
3.3.	İnhibisyon Çalışmaları	63
3.4.	SwissADME Çalışmaları	73
3.5.	Hücre Kültürü ve Sitotoksosite Çalışmaları.....	85
4.	TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	97
5.	ÖNERİLER	111
6.	KAYNAKLAR.....	113
ÖZGEÇMİŞ		

Doktora Tezi

ÖZET

YENİ SENTEZLENEN BAZI ORGANİK MOLEKÜLLERİN ANTİ-KANSER ÖZELLİKLERİNİN İNCELENEREK İLAÇ ADAYI OLMA POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Emine ŞAHİN

Karadeniz Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Yakup KOLCUOĞLU

2023, 125 Sayfa

118Z187 nolu TÜBİTAK projesi kapsamında, bu tez çalışmasında kullanılmak üzere, *in silico* yöntemlerle yapılan çalışmalarla hEGFR üzerinde etkili olabilecek 1,2,4-triazol iskeleti ve substituentler tasarlanarak moleküller sentezlenmiştir. Tez kapsamında, öncelikle ticari olarak satın alınan enzimin optimum reaksiyon şartları belirlenmiştir. Enzimin optimum protein ve substrat konsantrasyonları sırasıyla 0,01 µg/mL ve 0,5 mM olarak hesaplandı. Kinetik çalışmalarla, her bir inhibitör molekülün IC₅₀ değeri bulunmuştur. En iyi IC₅₀ değerine sahip moleküllerin, 31 (0,0004 mM) ve 9, 27, 30 (0,0008 mM) numaralı moleküller olduğu belirlendi. İnhibitör moleküllerin inhibisyon türü araştırıldı ve en iyi K_i değerleri 0,00232 µM (31) ve 0,0889 µM (9) olarak hesaplandı. En iyi inhibisyon etkisine sahip moleküllerin (9, 27, 30, 31) biyoyumluluk testleri için A549, NCI-H358, WI-38, OVCAR-3 ve SKOV-3 hücreleri kullanıldı. 9 ve 27 numaralı bileşiklerin en iyi sitotoksosite özelliğine sahip olduğu tespit edildi. Gefitinib ve dört molekülün OVCAR-3 hücre hattına karşı, 9 numaralı molekülün ise WI-38 hücre hattına karşı aktivitesi belirlenememiştir. ADME çalışmalarında, moleküllerin hiçbirinin tahmini kan-beyin bariyer geçiş özelliği olmadığı, çoğu molekülün ise pasif gastrointestinal emilim özelliğinin olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: hEGFR, Enzim inhibisyonu, ELISA, 1,2,4-triazol, Sitotoksosite, ADME

PhD. Thesis

SUMMARY

INVESTIGATION OF THE POTENTIAL OF BEING A DRUG CANDIDATE BY EXAMINING THE ANTI-CANCER PROPERTIES OF SOME NEWLY SYNTHESIZED ORGANIC MOLECULES

Emine ŞAHİN

Karadeniz Technical University
The School of Natural and Applied Sciences
Chemistry Graduate Program
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Yakup KOLCUOĞLU
2023, 125 Pages

Within the scope of the TUBITAK project numbered 118Z187, 1,2,4-triazole skeleton and substituents that could be effective on hEGFR were designed by *in-silico* methods, and molecules were synthesized to be used in this thesis. Within the scope of the thesis, first of all, the optimum reaction conditions of the commercially purchased enzyme were determined. The optimum protein and substrate concentrations of the enzyme were calculate as 0,01 µg/mL and 0,5 mM, respectively. The IC₅₀ value of each molecule was found by kinetic studies. Molecules with the best IC₅₀ values were determined as 31 (0,0004 mM) and 9, 27, 30 (0,0008 mM). The inhibition types of molecules were investigated and the best Ki values of these molecules were calculated as 0,00232 µM (31) and 0,0889 µM (9). A549, NCI-H358, WI-38, OVCAR-3, SKOV-3 cells were used for biocompatibility tests of molecules (9, 27, 30, 31) with the best inhibitory effect. Molecules with the best cytotoxicity were found as 9 and 27. The activity of gefitinib and four molecules against the OVCAR-3 cell, and the activity of molecule 9 against the WI-38 cell could not be determined. In ADME studies, it was predicted that none of the synthesized molecules had blood-brain barrier crossing properties, and most of them had passive gastrointestinal absorbtion properties.

Keywords: hEGFR, Enzyme inhibition, ELISA, 1,2,4-triazole, Cytotoxicity, ADME

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.	Reseptör tirozin kinaz yapısı.	23
Şekil 2.	Reseptör tirozin kinazların alt sınıfları için belirleyici olan hücre dışı öğeler.	25
Şekil 3.	Reseptör tirozin kinazların örnek yapısı ve aktivasyon mekanizması.....	27
Şekil 4.	ErbB reseptör ailesinin lineer gösterimi	30
Şekil 5.	PTK aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan ELISA reaksiyonu	49
Şekil 6.	hEGFR enzim aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisi.....	62
Şekil 7.	ATP-2Na varlığında çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	63
Şekil 8.	1, 2, 3 numaralı moleküllerin hEGFR aktivitesi üzerine etkisi	64
Şekil 9.	4, 5, 6 numaralı moleküllerin hEGFR aktivitesi üzerine etkisi	64
Şekil 10.	12, 9, 7 numaralı moleküllerin hEGFR aktivitesi üzerine etkisi	64
Şekil 11.	13, 14 numaralı moleküllerin hEGFR aktivitesi üzerine etkisi	65
Şekil 12.	11, 10, 8 numaralı moleküllerin hEGFR aktivitesi üzerine etkisi	65
Şekil 13.	16, 17, 15, 24 numaralı moleküllerin hEGFR aktivitesi üzerine etkisi	66
Şekil 14.	19, 20, 23, 22 numaralı moleküllerin hEGFR aktivitesi üzerine etkisi	67
Şekil 15.	18, 21 numaralı moleküllerin hEGFR aktivitesi üzerine etkisi	67
Şekil 16.	30, 27, 25 numaralı moleküllerin hEGFR aktivitesi üzerine etkisi	68
Şekil 17.	31, 32 numaralı moleküllerin hEGFR aktivitesi üzerine etkisi	68
Şekil 18.	Gefitinib ve 29, 28, 26 numaralı moleküllerin hEGFR aktivitesi üzerine etkisi	69
Şekil 19.	11, 13, 26, 9 moleküllerinin varlığında hEGFR inhibisyon türlerinin belirlenmesi.	71
Şekil 20.	28, 26, 31, 29, 24, 22, 27, 30, 32 moleküllerinin varlığında hEGFR inhibisyon türlerinin belirlenmesi.....	72
Şekil 21.	Sentezlenen bileşiklerin molekül ağırlıkları	77
Şekil 22.	Sentezlenen moleküllerin ESOL metoduna göre suda çözünürlükleri.....	77
Şekil 23.	Moleküllerin WLOGP-TPSA (haşlanmış yumurta grafiği) grafiği.....	80
Şekil 24.	Sentezlenen moleküllerin ve gefitinib inhibitörünün SwissADME biyoyararlanım radar grafikleri.....	81
Şekil 25.	Gefitinib inhibitörünün WI-38 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (μ M) bağlı sitotoksikite etkileri.....	86

Şekil 26. 9 numaralı molekülün WI-38 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (μM) bağlı sitotoksosite etkileri.....	87
Şekil 27. 27 numaralı molekülün WI-38 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (μM) bağlı sitotoksosite etkileri.....	87
Şekil 28. 30 numaralı molekülün WI-38 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (μM) bağlı sitotoksosite etkileri.....	88
Şekil 29. 31 numaralı molekülün WI-38 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (μM) bağlı sitotoksosite etkileri.....	88
Şekil 30. Gefitinib inhibitörünün A549 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (μM) bağlı sitotoksosite etkileri.....	89
Şekil 31. 9 numaralı molekülün A549 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (μM) bağlı sitotoksosite etkileri.....	89
Şekil 32. 27 numaralı molekülün A549 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (μM) bağlı sitotoksosite etkileri.....	90
Şekil 33. 30 numaralı molekülün A549 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (μM) bağlı sitotoksosite etkileri.....	90
Şekil 34. 31 numaralı molekülün A549 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (μM) bağlı sitotoksosite etkileri.....	91
Şekil 35. Gefitinib inhibitörünün NCI-H358 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (μM) bağlı sitotoksosite etkileri	91
Şekil 36. 9 numaralı molekülün NCI-H358 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (μM) bağlı sitotoksosite etkileri	92
Şekil 37. 27 numaralı molekülün NCI-H358 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (μM) bağlı sitotoksosite etkileri	92
Şekil 38. 30 numaralı molekülün NCI-H358 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (μM) bağlı sitotoksosite etkileri	93
Şekil 39. 31 numaralı molekülün NCI-H358 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (μM) bağlı sitotoksosite etkileri	93
Şekil 40. Gefitinib inhibitörünün SKOV-3 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (μM) bağlı sitotoksosite etkileri.....	94
Şekil 41. 9 numaralı molekülün SKOV-3 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (μM) bağlı sitotoksosite etkileri.....	94
Şekil 42. 27 numaralı molekülün SKOV-3 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (μM) bağlı sitotoksosite etkileri	95
Şekil 43. 30 numaralı molekülün SKOV-3 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (μM) bağlı sitotoksosite etkileri	95
Şekil 44. 31 numaralı molekülün SKOV-3 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (μM) bağlı sitotoksosite etkileri	96

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Tirozin kinazların (TK) reseptör ve non reseptör üyeleri.....	20
Tablo 2. Reseptör tirozin kinazların alt grupları ve kanserle ilişkileri	21
Tablo 3. Sentezlenen moleküllerin kodları, IUPAC adlandırılması ve formülleri	54
Tablo 4. Sentezlenen moleküllerin hEGFR aktivitesi üzerine inhibisyon etkileri	70
Tablo 5. 11, 13, 26, 9 molekülleri varlığında inhibisyon türlerinin belirlenmesi ve Ki değerleri.....	71
Tablo 6. 28, 26, 31, 29, 24, 22, 27, 30, 32 molekülleri varlığında inhibisyon türlerinin belirlenmesi ve Ki değerleri	73
Tablo 7. 9, 27, 30 ve 31 Numaralı molekülün farmakokinetik ve fizikokimyasal özellikleri.....	75
Tablo 8. Moleküllerin ilaç benzerlikleri, farmakokinetik ve tıbbi kimya özellikleri..	78
Tablo 9. Hücre hatlarında gefitinib ve 9, 27, 30, 31 numaralı moleküllere ait IC50 değerleri.....	86

KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ

ABS	: Abbott biyoyararlılık skoru
ADME	: İlaç bileşiklerinin emilim, dağılım, bozunma ve atılım özellikleri
ALK	: Anaplastik lenfoma kinaz reseptörü
ATP	: Adenozin trifosfat
BBB	: Kan-beyin bariyer geçirgenliği
BOILED Egg	: Brain or intestinal estimated permeation-haşlanmış yumurta
°C	: Santigrat derece
cm	: Santimetre
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EMA	: Avrupa ilaç ajansı
FDA	: Amerika gıda ve ilaç dairesi
FGFR	: Fibroblast büyüme faktörü reseptörü
g	: Gram
GI	: Gastrointestinal emilim
hEGFR	: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü
¹ H-NMR	: Proton nükleer manyetik rezonans
IGF	: İnsülin-benzeri büyüme faktörü
IUPAC	: Uluslararası temel ve uygulamalı kimya birliği
JAK	: Janus kinaz
kDa	: Kilodalton
M	: Molar
mAb	: Monoklonal antikor
MAP	: Mitojenle aktive olan kinaz
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
mmol	: Milimol
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
MW	: Moleküler ağırlık
nM	: Nanomolar
NRTK	: Non-reseptör tirozin kinaz
NSCLC	: Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
PAINS	: Pan assay interference structures

PDGFR	: Trombosit türevli büyüme faktörü reseptörü
PI3K	: Fosfatidilinositol 3-kinaz
PTK	: Protein tirozin kinaz
RET	: Transfeksiyon sırasında yeniden düzenlenen reseptör ailesi
RTK	: Resepör tirozin kinaz
STAT	: Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü
TKİ	: Tirozin kinaz inhibitörü
TPSA	: Topolojik polar yüzey alanı
VEGFR	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü
μL	: Mikrolitre



1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Hastalıkların veya hastalık semptomlarının çeşitli nedenleri vardır. Bu nedenler arasında vücuttaki belirli metabolitlerin normal değerlerinin üstünde veya altında olması, yabancı bir organizmanın vücudu istila etmesi veya hücrelerin anormal şekilde büyümesi yer alır (Silverman ve Holladay, 2014). Büyüme özellikleri bozulmuş hücrelerin klonal yayılımı olarak tanımlanan ve en yaygın hastalıklardan biri olan kanserin oluşumundaki etkenler arasında, bakteri ve virüsler, radyasyon, kalıtım, çevresel faktörler, beslenme ve maruz kalınan kimyasallar yer almaktadır (Yokuş ve Çakır, 2012).

Hücre içi ve hücreler arası sinyal iletiminin gerçekleşmesi ve devamlılığının sağlanması, hücrelerin embriyogenez, çoğalma, farklılaşma ve yaşamını sürdürebilme fonksiyonlarını yerine getirebilmesi bakımından gereklidir. Dış sinyallerin hücre içine, hücre içi sinyal iletim mekanizmaları ile ulaştırılması sonucu hücrede önemli yanıtlar oluşur. Dışarıdan sinyal alamaması ise hücrenin apoptoza uğramasına neden olur. İnsan vücudunda görev yapan genlerin yaklaşık beşte birinin, sinyal iletim mekanizmalarında görev alması, bu sinyal iletim mekanizmalarının hücre için ne kadar önemli olduğunu göstermektedir (Çoban ve Güran, 2013). Normal hücrelerde meydana gelen onkojenik mutasyonlar, sinyal iletim yollarını ve sinyal proteinlerini etkilemek suretiyle, hücrenin çoğalma veya yaşama işlevlerini etkiler ve kontrolsüz bir şekilde çoğalmalarına sebep olur. Bu nedenle kanser gelişiminde ilk etkilenen mekanizma, genellikle hücre içindeki sinyal iletim yolları olmakta ve bu yollarla meydana gelen onkojenik mutasyonlar invazyon/metastaz süreçlerine de etki etmektedir (Özcan ve Dikmen, 2015). Bu yollar, normal hücrelerin yaşamını belirleyen çoğalma, farklılaşma gibi fonksiyonları düzenlemenin yanı sıra, kanser hücrelerinde, aktivitelerinin artması veya inaktif olmaları suretiyle, kontrolsüz çoğalmaya, farklılaşmanın ve apoptozun engellenmesine ve doku yapısının değişmesine sebep olur (Pazarbaşı vd., 2011). Hücrelerin biyolojik işlevlerinin yerine getirilmesinde görev alan bu yollarla, sinyallerin oluşumu ve iletimi için enzimler görev almaktadır. Bu nedenle, bu tür enzimlerin inhibisyonuyla hücrelerin kontrolsüz büyüme ve çoğalma gibi işlev sorunlarının çoğu çözülebilir. Enzimlerin inhibisyonunda,

enzim inhibitörleri kullanılmakta ve bu inhibitörler, tersinir veya geri döndürülemez şekilde işlev görebilmektedir (Silverman ve Holladay, 2014).

Kanser hücreleri, gelişimleri aşamasında bazı değişimler sonucu birçok fenotipik özellikler edinir. Bu değişimler, tümör hücrelerinin hızlı ve kontrolsüz çoğalmasıyla birlikte çevre dokulara yayılmalarına sebep olur. Bu hücreler, bulunduğu hücreden bağımsız olarak varlığını sürdürme ve metastaz yapma özelliği de gösterebilir. Protoonkogenler ve tümör baskılayıcı genlerin bir seri mutasyonları sonucu aktivitesinin ve apoptozun baskılanmasının, karsinojende maligniteyi artırdığı bilinmektedir (Doğan ve Güç, 2004; Tecen, 2016).

Kanserin oluşumunda ve ilerlemesinde rol oynayan moleküler mekanizmaların anlaşılması ve yeni tedavilerin keşfedilmesi süreçlerinde önemli gelişmeler kaydedilmektedir. Ancak, kansere bağlı mortalite ve morbidite oranının fazla olması, tedavisinin uzun süreli olması, maddi yükü, tedavilere bağlı yan etkileri ve aynı zamanda sık görülmesinden dolayı kanser, günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biri olmaya devam etmektedir. Kanser, dünyada kardiyovasküler hastalıklardan sonra en fazla ölüme neden olan hastalıktır ve kansere yakalananların sayısı da her geçen gün artmaktadır (Acar ve Altundaş, 2019; Gürkan-Alp ve Bozca, 2019). 2020 yılında tüm dünyada kanserden ölenlerin sayısı yaklaşık 10 milyon, kansere yakalananların sayısı ise 19,3 milyondur (Erçakallı ve Polat, 2022). Dünya Sağlık Örgütü'ne bağlı Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu verilerine göre, 2030 yılında ölüm nedenleri arasında yaklaşık 12,9 milyon kişi ile kanserin birinci sırada olacağı ve yaklaşık 24,6 milyon kişide kanser vakası görüleceği öngörülmektedir. 2040 yılına kadar ise bu sayıların sırasıyla, yaklaşık 16,3 milyon ve 30,2 milyon olacağı tahmin edilmektedir (URL-1, 2021).

1.2. Kanser Hastalığının Tarihçesi ve Tedavi Yöntemleri

Kanser, modern çağın hastalığı olarak kabul edilmesine rağmen, antik belgelerden, onkoloji tarihinin eski Mısır ve Yunan uygarlıklarına kadar dayandığı anlaşılmaktadır. Çeşitli tarihi ve bilimsel kanıtlar, kanserin insanlık tarihinden önce de var olduğunu göstermektedir. Dinazor gibi bazı tarih öncesi hayvan fosillerinde, osteosarkoma veya kemik metastazına benzer kemik tümörlerinin izine rastlanmıştır. İnsan tümörlerine ait en eski bilimsel kanıtlar ise yaklaşık M.Ö. 3000 yıllarına kadar dayanmaktadır. Bu tarihlerden sonra yazıldığı tahmin edilen ve Edwin Smith tarafından keşfedilen papirüste, meme

kanserinden ve tedavi amacıyla uygulanan cerrahi müdahaleden bahsedilmektedir. M.Ö. 1500 yıllarında hazırlandığı tahmin edilen Ebers papirüsü, o dönemde tedavi edilemez olarak kabul edilen farklı kanser türleri (cilt kanseri, rahim kanseri, mide kanseri ve rektum kanseri) hakkında bilgi vermektedir. Kanser, antik Mısır’da, tanrıların ezoterik güçlerine bağlı bir olay olarak görülürken, kanseri bilimsel olarak tanımlayan ilk kişi, M.Ö. 3. yüzyılda Hipokrat olmuştur (Falzone vd., 2018). Kanser terimi, yengeç anlamına gelen Latince “canker” veya “carcinos” kelimelerinden türemiş olup tümörün etrafını saran damarları yengeç bacağına benzettiği için ilk defa Hipokrat, bu terimi kullanmıştır. Latince’de şişme anlamına gelen “oncos” terimini ise ilk defa antik çağ hekimlerinden Galen kullanılmıştır (Baykara, 2016).

Hipokrat tarafından, kan, balgam, sarı ve siyah safra gibi vücut sıvıları arasındaki dengesizliğin neden olduğu bir hastalık olarak tanımlanan kanserin tedavisinde, Antik Mısır döneminden on dokuzuncu yüzyılın sonuna kadar çoğunlukla sağlıklı bir diyet, dağlama ve yüzeysel tümörler için cerrahi yöntemler uygulanırken, tedavi edilemeyen derindeki türler için çoğunlukla haşhaş özünden elde edilen ağrı giderici gibi palyatif tedaviler uygulanmıştır. Yüzyıllar boyunca yapılan önemli keşifler sayesinde, tümörlerin biyolojik ve patolojik özellikleri tanımlanmıştır. Modern onkolojinin, 1700’lerde, bilim insanlarının tütün veya kurum gibi bazı maddelerin kanserojen etkilerini ilk kez araştırmaya başlamasıyla doğduğu varsayılmakla birlikte, 1800’lerin sonuna kadar etkili terapötik yaklaşımlar geliştirilememiştir. On altıncı yüzyıldan on dokuzuncu yüzyılın sonuna kadar tümörleri anatomik, biyolojik, epidemiyolojik ve terapötik bir bakış açısıyla inceleyen birçok bilim insanının önemli keşifleri sayesinde, tıbbi, cerrahi ve girişimsel alanda bir devrim yaşandı. Bu keşiflerden biri olan X ışınlarının tümör tedavisinde kullanılmaya başlanması, medikal onkolojide ilk modern terapötik yaklaşımı meydana getirmiştir (Falzone vd., 2018). 1924 yılında yapılan bir araştırmada, o dönemde en sık görülen lösemi olan kronik miyelostik löseminin tedavisinde, X-ışınlarının etkili olduğu anlaşıldı. Günümüzde lösemi ve birçok kanserin tedavisinde kullanılan kemoterapinin bulunuşu ise İkinci Dünya Savaşı sırasında mustard gazı taşıyan geminin batması sonucu, erlerde lökopeni tespit edilmesinden sonra gerçekleşmiştir (Atıcı, 2007). Bu süreçte, sitotoksik antitümör ilaçların keşfi ve çeşitli hematolojik ve katı tümörlerin tedavisinde kemoterapinin kullanılmaya başlanmasıyla, gerçek bir atılım gerçekleşmiştir. Bu çığır açan gelişmeden sonra, kanser tedavisine yönelik yeni ilaç çalışmaları katlanarak çoğalmıştır. Onkoloji ve farmakoloji alanındaki ikinci atılım, 1980’lerin başında, kanser hücrelerinin

oluşumunda etkili olan bazı moleküler hedeflere yönelik özel ilaçların geliştirilmesine ve hedefe yönelik tedaviye olanak sağlayan moleküler ve hücresel biyoloji çalışmalarıyla birlikte gerçekleşmiştir. Genetik mühendisliği alanında yapılan çalışmalarla birlikte, kanser tedavisinde üçüncü atılım dönemi başlamıştır. Bu süreçte, daha önce etkili bir tedavisi olmayan, ilerlemiş veya metastatik tümörlerin tedavisi için monoklonal antikorlar ve immün sistemi kontrol eden inhibitörlerin etkinliği üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Son yıllarda ise bazı araştırmacılar, hücre terapileri, anti-tümör aşıları ve yeni biyoteknolojik ilaçların geliştirilmesine odaklanmıştır (Falzone vd., 2018).

Kanser hastalıklarının tedavisinde çeşitli cerrahi, radyasyon ve kemoterapi yöntemleri ayrı ayrı veya birbirlerine destek olarak kullanılmaktadır. Kemoterapi, genellikle, hücre bölünmesi süreçlerinde görevli enzimleri inhibe etmek amacıyla uygulanmaktadır. Bu tedavi yöntemi, etkili olmasına rağmen bazı yan etkilere sahiptir. Kanserli hücrelerin yanında, özellikle mide-bağırsak sistemi ve saçtaki hücreler gibi nispeten hızlı bölünen sağlıklı hücreler de kemoterapiden etkileneceği için bu tedavi yöntemi, saç dökülmesi, mide-bağırsak rahatsızlığı (mide bulantısı, kusma), tad alma bozuklukları gibi yan etkilere sebep olabilmektedir. Kemoterapinin yan etkileri nedeniyle son yıllarda, kanser tedavisinde, daha seçici etki gösterecek ve böylece sağlıklı hücreler üzerinde istenmeyen yan etkileri önleyebilecek, hedefe yönelik tedavi yöntemlerine ağırlık verilmiştir. Hedefe yönelik tedavi yöntemi, kanser hastalığını özel olarak teşvik eden, anormal davranış sergileyen biyolojik bir hedefin belirlenmesi ve engellenmesi esasına dayanır (Silverman ve Holladay, 2014).

Kanser tedavisinde, herkese uygulanan aynı monoterapi yöntem yerine, hastanın durumuna ve hastalığın evresine bağlı olarak özelleştirilmiş ilaç kombinasyonlarının kullanımı günümüzde geçerli olan tedavi yaklaşımlarından biridir (Koca vd., 2022). Klinik uygulamalarda, sıklıkla, iki veya daha fazla tedavi yöntemi bir arada kullanılmaktadır. Örneğin, tümörün cerrahi olarak vücuttan uzaklaştırılmasından önce kemoterapi, immünoterapi, radyoterapi veya hormon tedavisi uygulanabilmektedir. Bu uygulamanın amacı, ameliyat öncesi tümörün boyutunu olabildiğince küçülterek tümör hedefini daha belirgin hale getirmek, tümörün çevresindeki damarlar ve hayati organlarla olan bağlantısını kesmek ve böylece cerrahi işlemin kolay ve başarılı sonuçlanmasını sağlamaktır. Cerrahi operasyon sonrası diğer tedavi yöntemlerinin kullanım amacı ise saptanamayan ve daha sonra hastalığın tekrarlamasına neden olabilecek kanserli hücrelerin ortadan kaldırılmasıdır. Tedavinin bir önceki basamakta direnç göstermesi veya kabul

edilemeyecek yan etkilerin ortaya çıkması durumunda, farklı tedavi yöntemleri bir dizi halinde kullanılabilir (Kuznetsov vd., 2021).

1.2.1. Cerrahi Yöntem

1846'da anestezinin keşfinden sonra, Bilioth, Handley ve Halsted isimli cerrahlar tarafından lenf düğümleriyle birlikte bütün tümörün çıkarılması, en eski kanser tedavi yöntemlerinden biri olan cerrahi yöntemde öncü bir dönemin başlangıcı olmuştur (Sudhakar, 2009). Cerrahi yöntem, bölgesel primer tümörlerin ve ilişkili olduğu bölgesel lenfatiklerin tedavisinde uygulanmakta olan tedavi yöntemlerinin en etkilisidir. Cerrahi yöntemle, çıkarılan tümörlü hücrelerin tamamı öldürülebildiği için, monoterapi olarak uygulandığında, diğer tedavi yöntemlere göre iyileştirme oranı daha yüksektir. 20. Yüzyılın başlarında, radyasyonun ve ardından kemoterapinin uygulanmaya başlamasıyla, kanser cerrahisi konservatif hale geldi. Ancak, radyoterapi ve kemoterapide tümör hücrelerinin sadece belli bir kısmı öldürülebildiğinden, her iki tedavi de cerrahi yöntemin tamamlayıcısı olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda, ameliyat tekniklerinde ve kombine tedavilerdeki gelişmeler sayesinde, katı tümörlere bağlı morbidite ve mortalite oranlarında önemli ölçüde azalma meydana gelmiştir (Urruticoechea vd., 2010). Cerrahi yöntem, tek başına uygulanabildiği gibi, genellikle, tedavinin başarı oranını artırmak için radyoterapi ve kemoterapi gibi yöntemlerle de uygulanmaktadır. Bu yöntem, tedavi sürecinin başlangıcında yapılabildiği gibi, kemoterapi veya radyoterapi gibi yöntemlerle tümörün küçültülmesi sonrasında da tercih edilebilir (Baykara, 2016). Cerrahi yöntem, öncelikle bölgenin tümörden olabildiğince arındırılması için kullanılır. Bununla birlikte, biyopsi tanısı koyabilmek, kanserin aksiller lenf düğümlerine yayılmasını araştırmak, meme kanserinde olduğu gibi kanserli bölgenin alınması sonrası hasarlı dokuya veya organa eski şeklini verebilmek ve kanserin gelişimine bağlı olarak ortaya çıkan semptomları hafifletebilmek amacıyla da cerrahi yöntem kullanılmaktadır. Cerrahi operasyon ile vücudun diğer bölgelerine yayılan kanserli hücreleri tedavi etme olasılığı düşük olsa da kanserin ilerleme hızını yavaşlatmada veya semptomları önlemede ve hafifletmede başarı sağlanabilmektedir (Ozsahin. vd., 2017). Cerrahi yöntem olarak geleneksel cerrahi tekniklerin yanında laparoskopik cerrahi, kriyo cerrahi, robotik cerrahi, lazer cerrahisi, elektro cerrahi gibi çok çeşitli cerrahi teknikler kullanılmaya başlanmıştır. Bu yeni cerrahi

yöntemlerin kullanılmaya başlanmasıyla oldukça başarılı sonuçlar elde edilmektedir (Baykara, 2016).

1.2.2. Radyoterapi

İyonlaştırıcı radyasyonun kanser hastalıklarının tedavisinde kullanımı, 1898'de Marie Skiodowska Curie ve Pierre Curie tarafından radyumun keşfinin hemen sonrasında başlamıştır. Radyasyonun, histolojik olarak kanser tedavisinde kullanılması, ilk 1903 yılında S.W.Goldberg ve Efim Semenovich London tarafından St. Petersburg'da gerçekleştirilmiştir. Günümüzde, radyumun keşfinden 100 yıldan fazla bir süre sonra bile, radyoterapi, kanseri önleme, erken teşhis ve tarama, tanı koyma, tedavi ve palyatif bakım gibi kanser tedavilerinin çeşitli aşamalarında kullanılmaya devam etmektedir (Rosenblatt ve Zubiraretta, 2017). Radyoterapi, kanserli hücelere yüksek enerjili X-ışını gönderilmek suretiyle uygulanan bir yöntemdir. Bu yöntemde temel amaç, kanserli hücreler üzerinde azami düzeyde öldürücü veya büyümeyi yavaşlatıcı etki göstermektir. Yöntem, bölgesel veya tüm vücutta, harici ve dahili şekilde uygulanabilmektedir. Harici radyoterapide kanserli hücreler, vücut dışındaki ışın kaynağından gönderilen yoğun radyasyona maruz bırakılırken, dahili radyoterapi tekniğinde ise radyoaktif madde, katater, iğne, tel gibi uygulama aletleri aracılığıyla doğrudan kanserli hücre üzerine veya yakınına gönderilir (Ozsahin, 2017). Hastalığın türüne, evresine ve hastanın özelliklerine göre uygulanan çeşitli radyoterapi yöntemleri mevcuttur. Üç boyutlu konformal radyoterapi (Three Dimensional Conformal Radiotherapy-3D-CRT), konformal proton ışın radyasyon terapisi (Conformal Proton Beam Radiation Therapy), yoğunluk aracılı radyoterapi (Intensity Modulated Radiotherapy-IMRT) ve görüntü rehberliğinde radyoterapi (Image Guided Radiotherapy-IGRT) uygulanmakta olan radyoterapi tekniklerindendir. Ayrıca, helikal tomoterapi (helikal tomotherapy-HT), volumetrik ark tedavisi (volumetric arc therapy-VMAT) ve rotasyonel RapidArcTM (RA) teknikleri de klinik uygulamada başarılı bir şekilde uygulanmaktadır (Kinhikar vd., 2014). Radyoterapi, genellikle cerrahi işlem öncesi uygulanmaktadır. Cerrahi işlem öncesi uygulanmasındaki amaç, kanserli hücreleri öldürerek tümörü olabildiğince küçültmektir. Kanserli hücrelerle birlikte sağlıklı hücrelerin de hasar görmesine ve ölümüne sebep olan radyoterapi yönteminin bazı yan etkileri ortaya çıkabilmektedir. Başlıca yan etkileri arasında, kusma, saç dökülmesi, halsizlik, iştah

azalması yer almaktadır. Bu yan etkiler hastanın yaşam kalitesini oldukça etkilemektedir (Baykara, 2016).

1.2.3. Kemoterapi

Kemoterapi tedavi yönteminin kanser tedavisinde kullanılması, 20. yüzyılın başında, hastalığın seyrini etkileyeceği düşünülen kimyasalların, tümörlü kemirgenler üzerinde denenmesiyle başladı. Böylelikle, kanser tedavisi yöntemlerine kemoterapi de eklenmiş oldu. 1960'lara kadar kanser tedavisinde baskın olarak kullanılan cerrahi ve radyoterapi yöntemlerinin hastalığı iyileştirme oranı ancak %33'e kadar çıkabiliyordu. Çocukluk çağı lösemisi ve Hodgkin lenfoması hastalarının tedavi kombinasyonlarında, kemoterapinin kullanılmaya başlanmasıyla iyileşme oranının arttığı gözlenmiştir (De Vita ve Chu, 2008). Kemoterapi yöntemindeki amaç, diğer yöntemlerde olduğu gibi, kanser hücrelerini yok etmek veya büyümesini olabildiğince yavaşlatmaktır. Tedavi sırasında ilaçlar, ağızdan veya damar yoluyla vücuda verilerek, kanser hücrelerine ulaşması için kan dolaşımına dahil edilir. Kemoterapi, tek başına veya kanser hücreleri üzerinde daha fazla etkinlik sağlayabilmek için diğer tedavi yöntemleriyle birlikte kullanılır. Kemoterapi, diğer tedavi yöntemleri ile kullanılma sırasına göre, iki şekilde adlandırılır. Ameliyat veya radyasyon terapisinden önce tümörün boyutunu azaltmak için uygulanan kemoterapi, neoadjuvan kemoterapi olarak adlandırılırken, ameliyat veya radyasyon tedavisinden sonra arta kalan kanserli hücrelerin öldürülmesi amacıyla uygulanan kemoterapi ise adjuvan kemoterapi olarak adlandırılır (Malik vd., 2021). Her iki yöntemin de amacı, kemoterapiden önce veya sonra uygulanacak tedavinin etkinliğini artırmaktır. Uygulanacak kemoterapinin türü ve ilaç dozu, kanserin türüne, evresine ve hastanın özelliklerine göre belirlenir (Ozsahin vd., 2017).

Kemoterapi, genellikle hücrelerin bölünmesinde görevli enzimlerin inhibisyonunu sağlayarak kanser hücrelerinin büyümesini durdurmak veya hücreleri apoptoza zorlayarak yok etmek suretiyle, tümör hücrelerinde değişiklikler meydana getirir. Bu etki mekanizmalarına göre, büyümeyi durduran kemoterapötik ilaçlar sitostatik (biyolojik ilaçlar) ilaçlar olarak adlandırılırken, hücreleri apoptoza uğratarak ölümlerine yol açan ilaçlar da sitotoksik ilaçlar olarak adlandırılır (Abbas ve Rehman, 2018).

Kemoterapi ilaçları, ileri ve metastatik evredeki hastalarda kanserin ilerlemesini geciktirerek, hastanın yaşam süresine katkı sağlar. Kemoterapide kullanılan sorafenib,

lenvatinib ve regorafenib vb. ilaçların, kanser gibi hızlı büyüyen hücreler üzerinde anti-proliferatif ve anti-inflamatuvar etkileri vardır. İlaçların hızlı büyüyen hücreler üzerinde etki göstermesi, beraberinde olumsuz sonuçlar da getirir (Mansouri vd., 2021). Şöyle ki; kemoterapötik ilaçlar, kanser hücreleri üzerine etki ederken, hızlı büyüyen sağlıklı hücreler de bu tür ilaçlardan etkilenir. Bunun sonucu olarak da tedavi sırasında saç dökülmesi gibi yan etkiler ortaya çıkar. Kemoterapinin uygulanması esnasında, doza ve ilaç türüne bağlı olarak, saç dökülmesi haricinde mide ve bağırsak rahatsızlıkları (mide bulantısı, kusma), yorgunluk, tad ve koku alma bozuklukları gibi yan etkilerle karşılaşmaktadır. Kemoterapinin aşırı uygulanması, hastanın bağışıklık sisteminin baskılanmasına ve bunun sonucu olarak, enfeksiyon gelişmesine, hatta ölümlere sebep olabilir (Abbas ve Rehman, 2018).

1.2.4. Hormon Tedavisi

Hormonal tedavi veya endokrin tedavisi olarak da adlandırılan hormon tedavisi, vücudun hormon üretme sisteminin bozulması sonucu, hormona duyarlı veya hormon reseptörlerine sahip olan tümörlerin büyümesini azaltan veya durduran bir tedavi yöntemidir (Ozsahin vd., 2017). 1878'de Thomas Beatson'ın, tavşanların yumurtalıklarını çıkardıktan sonra, süt salgısının durduğunu keşfetmesinden sonra, erkek üreme organının uzaklaştırılmasıyla da metastatik prostat kanserinde belirgin bir azalmanın olduğu görülmüştür. Hormonların kanser hastalığı üzerine etkileri olduğunun anlaşılması, meme ve prostat kanserlerinin oluşma riskini azaltma çalışmalarına ve tedavideki gelişmelere ışık tutmuştur. Elde edilen veriler ışığında, hormon salınımının gerçekleştiği organlarda ortaya çıkan kanser türlerinin tedavisinde, yeni ilaç türleri (aromataz inhibitörler, anti-hormon ilaçları) geliştirilmeye başlanmıştır (Sudhakar, 2009). Hormonal değişiklikler, tedavinin etki mekanizmasını oluşturduğundan, hormona duyarsız tümörlerin veya hormon reseptörlerine sahip olmayan tümörlerin tedavisinde, hormon tedavisi etkisiz kalır. Hormon salınımını veya etkinliğini azaltmak için uygulanan hormonal tedavi, radyasyon tedavisi veya cerrahi yöntemlerden bir veya birkaçının kombinasyonu şeklinde tercih edilir (Ozsahin vd., 2017).

Hormon tedavisinde kullanılan ilaçlar genel olarak üç alt gruba ayrılır. Birinci grupta yer alan hormon sentez inhibitörlerinin amacı, hormonun üretildiği yerde sentezi baskılamaktır. Aromataz inhibitörleri ve gonadotropin salgılayan hormon analogları olarak

iki sınıfa ayrılır. İkinci grupta yer alan hormon reseptör antagonistleri ise belli bir hormon reseptörüne bağlanmak suretiyle, hücrenin büyümesi için gerekli sinyallerin oluşumuna engel olan moleküllerdir. Hormon reseptör antagonistleri, anti-androjenler ve anti-östrojenler olarak iki sınıfta toplanır. Genel olarak, vücutta bir hormon seviyesi yükseldiğinde, onu düşürecek başka bir hormon salgılanarak, karşılıklı etkiye dayalı belli bir denge oluşturulur. Bazı durumlarda, hormon reseptörlerini bloke etmek yerine, vücuda dışarıdan hormon takviyesi yapılarak kanser hücreleri üzerine sitotoksik etki oluşturulabilir. Hormon tedavisi yönteminde kullanılan ilaçların üçüncü grubu olan hormon takviyelerine sentetik progesteronlar ve sentetik östrojenler örnek olarak verilebilir (Baykara, 2016).

1.2.5. Gen Terapisi

Gen terapisi, kusurlu hale gelmiş bir geni tamamlayabilen, değiştirebilen veya hücre ölümünü indükleyebilen ekzojen genlerin hastanın vücuduna aktarılmasıyla hastalığın tedavi edildiği veya hastalığa bağlı semptomların hafifletildiği bir terapötik yöntemdir. Bu yöntem, gen değişimi, gen modifikasyonu, gen çoğaltma ve gen blokajı şeklinde uygulanmaktadır (Li vd., 2018). Hastalığı genetik kaynağında tedavi etme fikri her ne kadar cazip olsa da gen terapisinin uygulanmasında bazı zorluklarla karşılaşmaktadır. Bu zorluklardan birisi, gen transferi işlemi yapılırken genetik bilgiyi, hücresel düzenleyici mekanizmaları bozmadan, karmaşık hücre ve doku bariyerlerini aşabilmektir. Diğer bir zorluk ise genetiği düzeltilmiş hücrelerin, bağışıklık sistemi tarafından tespit edilmeden bozukluğu giderebilmesi ve onarılmış genlerin sonraki nesillere aktarılabilmesi için fazla miktarda olma gerekliliğidir (Sivarajah vd., 2022). İlk olarak 1990 yılında, nadir görülen bir bağışıklık sistemi hastalığının tedavisinde, hastalara adenoazin deaminaz geninin T hücrelerine iletilme çalışması ile başlayan gen tedavisi çalışmaları, günümüzde yaklaşık 2900 adet klinik çalışma ile devam etmekte olup, bu çalışmaların yaklaşık üçte ikisi kanser hastalığının tedavisine ilişkindir (Debela vd., 2021). Kanser gen terapisi, genetik materyaller kullanılarak kanser hücrelerinin düzeltilmesini sağlayan geniş bir tedavi sınıfını oluşturmaktadır. Gen terapisinin uygulanmasında, genel olarak immünoterapi (aşı tedavisi, antikör tedavisi), onkolitik viro terapi ve gen transferi şeklinde üç farklı yaklaşım mevcuttur (Bidram vd., 2019). Gen terapisi çalışmaları kapsamında gen bazlı aşılar, tümörlere karşı etkinliğin sağlanabilmesi ve immünojenisitenin uzun süreli devam

edebilmesi için umut verici bir teknoloji olarak ortaya çıkmasına rağmen, aşılama, genlerin hedef organellere başarısız transferinden kaynaklanan zayıf immünojenisite gözlenmiştir. Bu nedenle, başarılı gen aşılamaının gerçekleştirilebilmesi için ilgili genin, enzimatik saldırılardan korunması ve hedef bölgelere güvenli bir şekilde iletilmesi gerekmektedir. Son zamanlarda ise gerçekleştirilen lokal uygulama teknikleri sayesinde, antijen oluşturan hücrelere daha verimli DNA aktarımı yapılabilmekte ve böylece transfeksiyon işlemi daha etkin hale gelebilmektedir (Lee vd., 2022).

Gen terapileri sınıflandırılırken, çeşitli kriterlerden yararlanılmaktadır. Onarılmış genin canlıya aktarılmasında kullanılan taşıyıcı araçların cinsi (viral/non-viral), tedavisi amaçlanan hastalığın türü ve vektörün hastaya aktarılmasında *ex vivo/in vivo* yöntemlerden hangisinin kullanıldığına bağlı olarak gen terapileri, değişik şekillerde sınıflandırılmaktadır (Anguela ve High, 2018). Retrovirüsler (lentivirüsler), reovirüsler adenovirüsler, adenovirüslerle ilişkili virüsler, herpes virüsleri, çiçek virüsleri ve bakterilerden (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium*, *Listeria* vb.) viral veya bakteriyel gen taşıyıcı vektörler olarak yararlanılmaktadır (Amer, 2014). Terapötik genlerin hücrelere aktarılması için taşıyıcı olarak kullanılan viral olmayan vektörler arasında ise lipozomlar, moleküler konjugantlar, gen tabancaları ve yalın/plazmid DNA'lar yer almaktadır (Zaimy vd., 2017, Abaan ve Criss, 2002). Viral vektörler, gen terapisinde kullanılan ilk taşıyıcılar olup, doğası ve özellikleri gereği RNA ve DNA'nın insan hücrelerine iletiminde vektör olarak kullanılan virüsler, klinik deneylerle oldukça tercih edilir hale geldi (Rodrigues vd., 2020). Ayrıca, ek bir transfer yöntemine gerek duyulmadan hücre transfeksiyonu ve gen iletimi işleminde, bu vektörler daha başarılı sonuç verir. Ancak, rastgele mutajeneze yol açabilmeleri, zor üretilebilmeleri, immünojenisite ve toksisite gibi sorunlara sebep olmaları ve aynı zamanda sağlıklı hücreleri de olumsuz etkileyebilmeleri nedeniyle son zamanlarda viral olmayan vektörler üzerinde çalışmalara yoğunlaşmıştır. Viral olmayan vektörlerle yapılan gen transfer çalışmalarında, viral olanlarda görülen aksaklıklara kıyasla daha olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Bununla birlikte, viral olmayan vektörler, bazı hücrelere doğal olarak nüfuz edemedikleri için katyonik lipidler, katı lipid nanopartikülleri, peptit bazlı ve polimer bazlı vektörler gibi ek taşıyıcı araçlara ihtiyaç duyar. Tüm dezavantajlarına rağmen, bu vektörlerin gen iletiminde daha başarılı olduğu görülmüştür (Bidram vd., 2019).

Gen terapisi yöntemlerinin sınıflandırma kriterlerinden biri de tedavisi amaçlanan hastalığın türüdür. Gen terapisi, başta kanser olmak üzere, monojenik hastalıklar, bulaşıcı

hastalıklar, kalp ve damar hastalıkları, nörolojik hastalıklar, göz hastalıkları, enflamatuvar hastalıkların tedavisi çalışmalarında, gen işaretleme ve sağlıklı gönüllüler üzerinde yapılan klinik çalışmalarda uygulanmakta olup, gen terapisinin uygulama alanları gün geçtikçe artmaktadır. Klinik çalışmalar sonucu bazı gen terapisi ilaçları onay almıştır. Bu ilaçlardan, 2003 yılında onaylanan gendicine baş ve boyun skuamoz hücreli karsinomlarda, 2012 yılında onaylanmış glybera® lipoprotein lipaz eksikliğinde, 2016 yılında onaylanmış strimvelis™ adenozin deaminaz eksikliğinde, 2017 yılında onaylanmış kymriah™ akut lenfoblastik lösemide, yescarta™ B-hücreli lenfomada, luxturna™ ise retinal distrofide kullanılmaktadır (Ginn vd., 2018).

Gen terapisi, ayrıca genlerin vücuda aktarılmasında uygulanan *ex vivo* veya *in vivo* yöntem olması durumuna göre de sınıflandırılabilir. *Ex vivo* yöntemde, laboratuvar koşullarında klonlanmış tümör hücreleri, kültür hücrelerinin içine transfeksiyon ile aktarıldıktan sonra hastaya nakledilmektedir. *In vivo* yöntemde ise terapötik nükleik asitler, tümörlerin bulunduğu yere ve hastalığın ilerleme derecesine bağlı olarak, damar veya ağız yoluyla, damla şeklinde, deri emilimi yoluyla veya burundan doğrudan hastanın dokusuna nakledilmektedir. *Ex vivo* transferinin en büyük dezavantajlarından biri, belli bir boyuta kadar olan DNA parçalarının hücre içine transferinin gerçekleştirilebilmesidir. Ancak, gen eklemesinin yapılacağı yerin seçilebilmesi, gen transferi gerçekleşmiş hücrelerin kültürden seçilerek alınması ve hastaya nakledilebilmesi, *in vivo* yöntemine göre *ex vivo* transferin başarı oranını artırmaktadır. *Ex vivo* yöntemle, gen değişikliğinin kromozomda daha yüksek oranda kalıcı hale gelebilmesi de uzun vadede tekrarlayan transfer ihtiyacını azaltmaktadır (Baykara, 2016; Cusack ve Tanabe, 2002). *In vivo* yöntemde, terapötik nükleik asitlerin vücuda verildikten sonra biyolojik engellerden (nükleazlar, bağışıklık sistemi) kaçınabilmesi ve terapötik vektörün kan yoluyla tüm vücuda dağılmadan verimli bir şekilde tümör hücrelerine hedeflenebilmesi için kararlı taşıyıcıların kullanılması gerekir. Viral veya non-viral olabilen taşıyıcı vektörler, ne kadar güvenli, etkili ve kontrol edilebilir ise gen terapisi o derece başarılı olmaktadır (Rodrigues vd., 2020).

1.2.6. İmmünoterapi

Biyolojik terapi veya biyoterapi olarak da adlandırılan immünoterapi, vücudun kendi hücreleri uyarılarak veya dışarıdan verilen maddelerle, tümörlere karşı immün yanıt oluşturulması temeline dayanır (Barbaros ve Dikmen 2015). Kanser immünoterapisi,

müdahale açısından aktif ve pasif tedavi olarak iki şekilde uygulanır. Aktif immünoterapide, konakçı bağışıklık sistemi tümör yüzeyinde bulunan tümör bağlantılı antijenlere doğrudan saldırarak etki gösterirken, pasif immünoterapide, konakçı bağışıklığı artırılarak antikanser tepkisi gelişir (Paul ve Sa, 2021). Aktif tedavi sınıfında, kanser aşıları (dendritik hücre (DC)-, peptit-, nükleik asit-, protein bazlı aşılar vb.), immün kontrol noktası engelleyici (ICB) tedavisi, tümör mikro çevre (TME) modülasyonu ve immünojenik hücre ölümü (ICD) ile indüklenen tedavi yer alırken, pasif tedavi sınıfında ise antikor hedefli tedavi, adoptif hücre terapisi ve onkolitik viroterapi yer alır (Meng vd., 2021).

Kanser immünoterapisinin etki mekanizması, malign hücrelerde eksprese edilen ancak normal doku hücrelerinde olmayan hedef antijenlere karşı, immün sistemi aktive etmektir. İlk olarak, 1891’de, immünoterapinin babası olarak bilinen William B. Coley tarafından, bakteriyel toksinlerin kemik ve yumuşak doku sarkomunun tedavisinde kullanılmaya başlayan immünoterapi yöntemi, bir asırlık gelişim süreci sonunda yeni bir döneme girmiştir. 2011 yılında sitotoksik T-lenfosit ilişkili protein 4’e (CTLA4) karşı ipilimumab ilacının monoklonal antikor olarak onaylanmasıyla başlayan bu yeni dönem kanser immünoterapisi, bağışıklık kontrol noktası engelleyici moleküllerinin klinik başarısıyla birlikte hızla gelişmeye devam etmektedir (Meiliana vd., 2016; Khan vd., 2021).

Nanoteknoloji, birçok hastalığın tedavisinde olduğu gibi kanser immünoterapisinde de son gelişmelerden biri olarak yerini almaktadır. İmmüno düzenleyici moleküllerin, hedeflenen noktaya etkili iletimi için nanomoleküllerden yararlanılmakta ve ilaç dağıtımında kullanımları hızla yaygınlaşmaktadır. 10-200 nm boyutundaki nanomoleküller, tümörün hızlı proliferasyonuna ve oluşan düzensiz damar yapısına karşı, böbreklerden süzülmeden vücutta kalarak tümör dokusuna hızlı nüfuz edebilmekte, belirli bağışıklık hücrelerini doğrudan hedefleyebilmekte ve bağışıklıkla ilgili olumsuz durumların oluşumunu azaltabilmektedir. Kanser immünoterapisinde kullanılan nanomoleküller organik ve inorganik olarak iki sınıfa ayrılır. Organik nanomolekül olarak, nükleik asit bazlı nanomoleküller, lipid nanomoleküller, hücre zarı bazlı nanomoleküller ve tasarlanmış hücreler kullanılır. İnorganik nanomolekül olarak ise polimerik nanomoleküller, metalik nanomoleküller (altın nanomoleküller, demir oksit nanomoleküller ve manyetik özellikli nanomoleküller) ve metalik olmayan nanomoleküller (karbon nanomoleküller ve silikon dioksit) kullanılmaktadır (Hou vd., 2022).

İmmünoterapötik ilaçlar, artık birinci basamak tedavide veya standart birinci basamak tedavinin başarısız olduğu birden çok kanser türünün tedavisinde onaylanmıştır. İmmüno terapi ile birçok klinik tedavide olumlu sonuçlar elde edilmesine rağmen, kısıtlı sayıda kanser türlerinin tedavilerine yanıt verebildiği için ve toksisiteye bağlı sınırlı doz kullanımları nedeniyle klinik uygulamada henüz yeteri kadar yaygınlaşamamıştır (Meng vd., 2021; Oiseth ve Aziz, 2017).

1.2.7. Hedefe Yönelik Tedaviler

Kanser tedavilerinde, özellikle de kemoterapide kullanılan ilaçlar, kanser hücrelerinin yanı sıra normal hücreleri de hedef alır. Bu nedenle, kemoterapiye bağlı oluşan yan etkileri azaltmak için daha farklı terapilere ihtiyaç duyulmuştur. Hedefe yönelik tedavilerde, sadece tümör hücrelerini hedef alan ilaçların kullanılmasıyla, kemoterapide oluşan yan etkilerin azaltılması amaçlanmıştır (Hosseinzadeh vd., 2017). Bu nedenle, hedefe yönelik kanser tedavileri, tümörün büyümesi ve ilerlemesinde görev alan özel moleküllere müdahale ederek kanserin büyümesini ve yayılmasını engelleyen ilaçlar veya maddeler olarak tanımlanabilir. Bu tedavilerin çoğunda, hücre bölünmesi, hücre hareketi ve hücre ölümü gibi hücrenin temel işlevlerini yöneten sinyal iletim yollarında görev alan proteinlere odaklanılır ve kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasını teşvik eden sinyaller engellenerek kanserin ilerlemesi durdurulur. Ayrıca, hedefe yönelik tedaviler, doğrudan apoptozu indükleyerek veya kanser hücrelerini tanıyıp yok etmesi için bağışıklık sistemini uyararak veya toksik madde göndermek suretiyle de kanser hücrelerinin ölümüne neden olabilir. Kansere özgü moleküler ve hücresel değişikliklere odaklanması nedeniyle, hedefe yönelik tedaviler, kemoterapi ve radyoterapiye göre daha etkilidir ve normal hücrelere daha az zarar verir (Christy ve Bojan, 2013).

Hedefe yönelik tedavilerde, doğrudan veya dolaylı iki yaklaşım mevcuttur. Doğrudan yaklaşımda, tümör hücresi oluşumunda etkili olan hedef proteinlerin çalışmasını engelleyen küçük moleküllü ilaçlar veya monoklonal antikorlar (mAb'lar), sinyallerini değiştirmek amacıyla, tümör antijenlerini hedef alır. Dolaylı yaklaşımda ise farklı tür etkiye sahip ligandlar için hedef olarak görev yapan, hücre yüzeyinde eksprese edilen tümör antijenleri hedef alınır. Bu yaklaşımlarda ilaçlar, tümörlere özgü mAb'ları veya tümör hücrelerindeki reseptörlere bağlanan peptid ligandları kullanarak, tümörlerle aktif etkileşime girebilir (Wu vd., 2006).

Hedefe yönelik tedaviler üç ana sınıfa ayrılır. Bunlar; monoklonal antikorlar, küçük moleküllü inhibitörler ve immünoterapilerdir. Monoklonal antikorlar; sadece kanser hücrelerinin yüzeyinde değil ayrıca tümörü çevreleyen stromal ve vasküler hücrelerde bulunan kansere özgü antijenleri de hedeflemeye kullanılır (Walter ve Ahmed, 2021). Bu yöntemde esas amaç, belirli hücre reseptörlerinin engellenmesi suretiyle bağışıklık sistemini uyarmak ve tümör büyümesini önlemektir. Monoklonal antikorların antikanser etkileri, çeşitli mekanizmalarla gerçekleşir. Hedef hücreye saldırmak için konakçı bağışıklık fonksiyonlarını yeniden düzenlemek, ligandlara veya reseptörlere bağlanarak kanser hücrelerinin temel işlevlerini engellemek veya bir radyoizotop ve toksin gibi öldürücü bir yükü hedef hücreye ulaştırmak bu mekanizmalardandır. mAb'lar, protein yapıları gastrointestinal sistemde denatüre olduğu için vücuda damar yolundan verilir (Gerber, 2008). Kanser tedavisinde kullanılan monoklonal antikorlar, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) gibi kanserin gelişimine katkı sağlayan büyüme faktörleri ile kanser hücrelerine özgü antijenleri (CD52 (cluster of differentiation 52), ve CD20 (cluster of differentiation antigen) v.b.) hedef alır (Yazıcıoğlu vd., 2018). mAb'ların üretimi, ilk olarak saflaştırılmış hedef moleküllerle bağışıklık kazanmış deney hayvanlarında antikor üretimi şeklinde gerçekleştirilir. Daha sonra antikor üreten bu deney hayvanlarının dalak hücreleri alınarak miyelom hücreleriyle kaynaştırılır. Klonlanan bu hücreler sayesinde büyük miktarlarda tek tip antikor veya monoklonal antikor üretimi mümkün olur. Elde edilen antikorlar daha sonra test edilerek aralarından hedefle en iyi reaksiyon verenler açığa çıkarılır (Christy ve Bojan, 2013). 1986'da US Food and Drug Administration (FDA) tarafından monoklonal antikor ilaç olarak ilk onaylanan, muromonab-CD3'dür. Bu ilaç, organ nakli sonrası T- hücre fonksiyonlarını engelleyerek akut organ reddini önlemeye yönelik kullanılır. Daha sonra hedefe yönelik tedavide kullanılmak üzere birçok monoklonal antikor ilaç onaylanmış olup, yaklaşık yarısı kanser tedavisinde kullanılmaktadır (Gerber, 2008). FDA ve European Medicines Agency (EMA) onayı almış monoklonal antikorlar, onkoloji ve hematoloji alanlarında artık yaygın olarak kullanılmaktadır. Yaygın olarak kullanılan onaylanmış monoklonal antikor ilaçlardan bazıları: trastuzumab (herceptin), rituximab, bevacizumab, trastuzumab emtansine (T-DM1) obinutuzumab, labetuzumab, cetuximab, panitumumab, pertuzumab ve sibrotuzumabdır (Walter ve Ahmed, 2021). Monoklonal antikor ilaçların adlandırılmasında genel olarak ilaç isminin sonuna –mab eki getirilir (Georgakopoulou vd., 2018). Elde edilmiş

şekillerine göre adlandırılan monoklonal antikolar, dört sınıfa ayrılır. Birincisi; “momab” ekini alan ve kemirgenlerden elde edilen insan anti fare antikoları (HAMA), ikincisi; “ximab” ekini alan insan antikolarının sabit fragman (Fc) kısmı ve sıçan monoklonal antikolarının antijen bağlanma bölgesi (Fab) kısımlarının birleşimi ile elde edilen kimerik antikolar, üçüncüsü; “zumab” ekini alan, sıçan antikolarının Fab kısmının küçük bir parçası ile insan antikolarının birleştirilmesi sonucu elde edilen humanize edilmiş antikolar ve dördüncüsü ise “mumab” ekini alan ve tamamen insandan elde edilen insan antikolarıdır (Yazıcıoğlu vd., 2018).

Hedefe yönelik tedavilerin diğer bir sınıfını oluşturan ilaçlar, küçük molekülü inhibitörlerdir. Çoğu monoklonal antikolar, hücrenin plazma zarına nüfuz edemezken küçük molekülü ilaçlar, genel olarak plazma membranları boyunca yer değiştirebilir, hücre yüzeyi reseptörlerinin sitoplazmik alanı ile etkileşime girerek tümör boşluklarına ve hücrelere yayılabilir ve hücrenin içinde bulunan sinyal proteinlerini hedefleyebilir (Tanaka ve Tamura, 2012; Natoli vd., 2010). Küçük molekülü ilaç adayları, genellikle, belirlenen hedefi en iyi etkileyen bileşiklerin tespit edildiği ilaç tarama programları olarak bilinen çalışmalarla belirlenir. Bu çalışmalar sonucu belirlenen en iyi aday moleküller, daha sonra kimyasal olarak dizayn edilerek, en etkili ve özgün ilaçları belirlemek için test edilir (Christy ve Bojan, 2013). Oral yoldan uygulanabilen küçük molekülü inhibitör ilaçlar, çoğu ilaç gibi kimyasal maddelerdir ve antikanser ilaçlarının en hızlı gelişim gösteren sınıfıdır. İlaç isimleri, genellikle inhibitör kelimesinin kısaltması olan -ib ile biter ve adlarındaki son ekler, ilaçların etki biçimini ifade eder. Örneğin; -nib: tirozin kinaz inhibitörü, -mib: proteozom inhibitörü, -ciclib: sikline bağlı kinaz inhibitörler, -parib: poli (ADP-riboz) polimeraz inhibitörleri, -gib: Hedgehog yolağı inhibitörü, -tib: arora kinaz inhibitörü, -stat: kinaz olmayan enzim inhibitörü, -limus: mTOR inhibitörü, -clax: Bcl-2 inhibitörü, -sib: serin treonin kinaz inhibitörü olduğunu belirtir. Küçük molekülü inhibitörlerin monoklonal antikolara göre bazı avantajları vardır. Bu avantajlar, kimyasal olarak üretilibildikleri için biyomühendislik gerektiren mAb'lara göre daha ucuz elde edilebilmeleri ve mAb'ların aksine oral yoldan vücuda verilebilmesidir. Ancak, bu tür ilaçların, yine de pahalı olması tedavi maliyetlerini artırmaktadır (Georgakopoulou vd., 2018). Küçük molekülü inhibitörler, avantajlarının yanında, mAb'lara göre bazı dezavantajlara da sahiptir. Örneğin; çoklu hedeflemeye sahip olan küçük molekülü inhibitörler, daha az spesifik hedefleme sağlar ve büyük bir kısmı, P450 enzimleri tarafından metabolize olur. Monoklonal antikoların yarılanma ömürleri haftalarla ifade

edilebilirken küçük moleküllü ilaçların ise saatlerle sınırlıdır. Bu nedenle, küçük moleküllü ilaçların her gün doz uygulaması yapılması gerekmektedir. Kronik miyoid lösemi tedavisinde kullanılan imatinib, ilk onay almış küçük moleküllü inhibitörlerden olup ayrıca en etkili olanlardandır (Gerber, 2008).

Kanser tedavilerinde hedefe yönelik ilaç olarak kullanılan monoklonal antikorlar ve küçük moleküllü ilaçlar, diğer yöntemlerde kullanılan ilaçların aksine, sitostatik özellikte olup etkilerini hücre membranı veya sitoplazmasındaki reseptörlerle ya da bu reseptörlerin aşağı yönlü sinyal yollarındaki efektörler ile etkileşime girerek gösterir. İlaç adaylarıyla etkileşime girebilme potansiyeli olan her bir reseptör ve sinyal yollarındaki her bir bileşen, farmakolojik çalışmalarda birer hedeftir. Bu amaçla, kanser patofizyolojisinde etkili olan birçok reseptör, sinyal yolağı ve yollarda görev alan bileşenler, yapılan çalışmalarla moleküler düzeyde tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda, birden fazla reseptörün aynı yolağı aktive edebildiği, farklı yollarda görev alan efektörlerin birbirlerini etkileyebildikleri ve tüm bu etkileşimler sonucu yolların aktivitelerinde değişkenlik olduğu görülmüştür. Tüm bu bilgiler ışığında, bir kanser türü üzerinde birden fazla reseptörün, proteinin veya yolağın birlikte etkisinin olduğu veya aynı yolların farklı kanser türlerinin oluşumunda etkili olduğu söylenebilir. Yeni dönem ilaçlardan bir kısmının hedef proteinlere karşı etkin olmasının yanısıra birden fazla reseptörle veya sinyal yolağıyla etkileşime girebilen ilaçlar da vardır. Bu tür ilaçlar tek bir kanser türünün tedavisinde kullanılabildiği gibi birden fazla kanser türüne karşı da etki gösterebilmektedir (Mutluay ve Kozacı, 2021).

Son yıllarda, gen çalışmalarına ağırlık verilmesiyle, farmakolojik çalışmalarda kişiye özgü terapötik ilaçlar ortaya çıkmıştır. Bu gelişmeler ışığında, kişiye özgü tedavilerdeki hedefe yönelik çalışmalar (spesifik enzim molekül hedeflemeleri, büyüme faktörü reseptörleri, sinyal yolları, onkogenik hücresel çalışmalar v.b.), her geçen gün önem kazanmaktadır (Küçük, 2016). Hedefe yönelik tedavi yöntemlerinde terapötik hedef olarak, hücre içi sinyal yollarından PI3K/Akt yolağı ve mTOR, Ras/Raf/Mek/ERK yolağı (MAPK/ERK yolağı), ubiquitin-proteazom yolağı ve hedgehog yolağı kullanılmaktadır. Terapötik hedef olarak protein kinazların kullanılması durumunda ise reseptör tirozin kinaz olarak EGFR ailesi (ErbB1 (EGFR/HER1), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) ve ErbB4 (HER4)), VEGF reseptörleri (VEGFR-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3), platelet kaynaklı büyüme faktör reseptörü (PDGFR), FMS benzeri tirozin kinaz 3 reseptörü (FLT3), anaplastik lenfoma kinaz reseptörü (ALK) hedef alınırken; diğer protein kinazlardan ise

Src (steroid receptor coactivator), Bruton's tirozin kinaz (BTK), siklin bağımlı kinaz (CDK) ve AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK), terapötik ajan olarak hedef alınır. Sinyal yolları ve protein kinazlardan başka diğer moleküler yapıları hedefleyen terapötik ajanlar ise steroid reseptör antagonistleri, toll benzeri reseptör (TLR) agonistleri ve Bcl2 protein inhibitörleri (BCL-2, BCL-X, BAD, DID, BAX, BAK, PUMA)'dir. Yukarıda belirtilen terapötik hedeflerin haricinde, kullanıma potansiyelleri olan çeşitli sinyal yolları ve yollarla ilişkili proteinler de mevcuttur. Örneğin, JAK-STAT yolağı, nükleer faktör kappa B yolağı, NOTCH yolağı, Wnt/ β -Catenin yolağı potansiyel moleküler hedef olma özelliğine sahiptir. Ayrıca, insülin reseptörü ve insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü inhibitörleri, fibroblast büyüme faktör (FGF) reseptörü inhibitörleri, hepatosit büyüme faktörü (HGF) / Met reseptörü inhibitörleri, glikojen sentaz kinaz-3 (GSK-3) inhibitörleri, protein kinaz C (PKC) inhibitörleri, aurora kinaz inhibitörleri, heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitörleri de kemoterapötik hedef potansiyeli olan ajanlardandır. Sinyal yollarının karmaşık yapısı ve birbirleri ile sürekli etkileşim halinde olması, etkili ve hedefe özel terapötik ajanların geliştirilmesini zorlaştırmasına rağmen, bugüne kadar yapılan çalışmalarla elde edilen bilgiler ışığında, bu alanda birçok ilaç geliştirilmiş ve kullanıma sunulmuştur (Mutluay ve Kozacı, 2021). Patent başvuruları dikkate alındığında ise EGFR'nin, hedefe yönelik tedavi çalışmalarında, en çok çalışılan alanların başında geldiği anlaşılmaktadır. Üzerinde en çok çalışılan diğer terapötik hedefler ise HER2, VEGFR, programlanmış hücre ölümü proteini 1 (PD1), CTLA4, HER3 ve CD20 hedef ajanlarıdır (Küçük, 2016).

1.3. Protein Kinazlar

Hedefe yönelik tedavi çalışmalarında, terapötik hedef olarak en çok kullanılan ve belirli hücre tiplerinin kontrolsüz çoğalmasına neden olan protein kinazlar, adenosin trifosfata (ATP) ait fosfat grubunun, proteinlerin yan zincirindeki serin, treonin veya tirozin kalıntıları üzerinde bulunan hidroksil grubuna transferini katalizleyen enzimlerdir (Silverman ve Holladay, 2014).

Protein kinaz ailesi, insanlardaki en büyük enzim ve gen ailesinden biridir. İnsanlarda toplam 518 protein kinaz geni tanımlanmış olup, 385'i serin/treonin kinaz, 90'ı protein-tirozin kinaz ve 43 tanesi de tirozin-kinaz benzeri aile üyelerinden oluşur (Roskoski Jr., 2004).

Protein kinazlar, hücrelerin büyümesinde ve çoğalmasında düzenleyici görevleri olan metabolik yollarda yer alır. Bu yollarda, metabolizmanın düzenlenmesi, gen ekspresyonu, hücre bölünmesi, hücre büyümesi ve hücrelerin farklılaşması gibi yaşamsal önemi olan biyolojik fonksiyonların kontrolünde temel görevleri vardır (Soltan vd., 2021). Protein kinazların kontrolsüz hücre çoğalmasında etkin olmasının nedeni de genellikle normal hücrelerin biyolojik yollarında, hücrelerin ne zaman büyüyeceği ve bölüneceğine dair bilgi akışının varlığıdır. Normal hücrelerde, bu yollar sıkı bir şekilde kontrol edilir ve çoğalma sinyalleri yalnızca belirli zamanlarda verilirken, belirli kinazlarda anormalliklerin meydana gelmesi, kontrolsüz hücre çoğalmasına yol açan sinyallerin artmasına ve düzenleyici kontrol mekanizmasının bozulmasına sebep olur (Silverman ve Holladay, 2014). Kinaz aktivitesinin deregülasyonu, çevrim düzenlemesi, büyüme, farklılaşma, proliferasyon, hayatta kalma, apoptoz, göç gibi hücresel tepkilerin ani değişimi ile sonuçlanır. Protein fosforilasyonunun, transkripsiyon sonrası en yaygın ve en önemli modifikasyonlardan biri olması sebebiyle protein kinazlar, hücrede çok sayıda düzenleyici yolda kilit rol oynar. Bu nedenle, kinaz aktivitesinin kaybı veya deregülasyonu, genellikle çeşitli kanser türlerinin gelişimi ile de ilişkilendirilir (Bhanumathy vd., 2021).

Protein kinazlar, karsinogenik dönüşüme yol açan dört farklı mekanizmaya sahiptir. Bunlar; protoonkogenin retroviral transdüksiyonu, GOF (Gain of function) mutasyonları, protein kinazların aşırı sentezlenmesi ve genomik rearanjman mekanizmalarıdır (Gürkan-Alp ve Bozca, 2019). Yapılan kromozomal harita çalışmalarında, 518 protein kinaz geninden 244'ünün hastalık lokusları veya kanser geni içeren DNA segmentleriyle eşlendiği kanıtlanmıştır. Bu durum protein kinaz inhibitörlerinin ve hedeflerinin kanser hastalığında terapötik potansiyelini ve önemini ortaya koymaktadır (Bhanumathy vd., 2021).

1.3.1. Protein Kinazların Sınıflandırılması

İnsanlarda, 106 psödogen ile birlikte toplamda 518 üyeden oluşan protein kinaz gen ailesi bulunur. Protein kinazlar, insanlarda bulunan ikinci en büyük enzim ailesidir. Gen ailesi olarak da beşincidir. Fosforillenmiş -OH grubunun kaynağına göre, protein kinazlar serin/treonin kinazlar ve tirozin kinazlar olarak sınıflandırılır. İnsan genomu, 90 adet tirozin kinaz geni içerir ve bu genlerin 58 tanesi reseptör tirozin kinaz (RTK) ailesine, 32

tanesi ise non-reseptör tirozin kinaz (NRTK) ailesine aittir. RTK ailesi 20 alt sınıfa ayrılırken, NRTK ailesi 10 alt sınıfa ayrılmıştır (Tablo 1) (Bhanumathy vd., 2021; Soltan vd., 2021).

Tirozin kinazlar, tirozin amino asidine ATP'den fosfat aktarımını sağlayarak proteinde fonksiyonel değişikliğe sebep olur ve büyüme faktörleri, sitokinler ve hormonlar ile birlikte hücrel yanıtarda görev alır (Küpeli, 2022). İki ana gruba ayrılan tirozin kinazlardan reseptör tirozin kinazlar (RTK), hücre dışı sinyalleri hücre içine ileten ve hücrel farklılaşma ve çoğalma sürecinde etkin sinyal iletim ağında görev alan temel arabulucu transmembran proteinlerdir. Tirozin kinazların diğer sınıfı olan reseptör olmayan, yani non-reseptör tirozin kinazlar ise sitoplazmik tirozin kinaz olarak da adlandırılır. Bu sınıfta yer alan tirozin kinazlar, transmembran bölgeye sahip değildir ve plazma membranının iç yüzeyinde, sitozolde ve çekirdekte bulunur. Non-reseptör tirozin kinazlar hücre içi iletişimin gerçekleşmesinde görevlidir (Acar ve Altuntaş, 2019; Sümer-Turanlıgil ve Uyanıkgil, 2010).

Tirozin kinazların, hücrelerin büyüme, çoğalma ve apoptoz süreçlerindeki rolleri nedeniyle bu enzimlerin ekspresiyonunda meydana gelebilecek genetik veya epigenetik değişiklikler, genellikle hücre büyüme kontrolünün kaybına sebep olur ve hücreye onkogenik özellik kazandırır. Her geçen gün artan çalışmalarla birlikte, tirozin kinazların tümörlerin oluşum sürecindeki fonksiyonları giderek açıklığa kavuşmaktadır. Neredeyse bütün kanserlerde, bu enzimlerin ekspresiyonunda meydana gelen aksaklıkların ve buna bağlı olarak da en az bir reseptör tirozin kinazın etkisi olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle, kanser ilacı çalışmalarının en önemli hedeflerinden biri olan reseptör tirozin kinazlara yönelik yapılan çalışmalar her geçen gün artarak devam etmektedir (Golonko vd., 2019).

Tablo 1. Tirozin kinazların (TK) reseptör ve non reseptör üyeleri (Bhanumathy vd., 2021).

RTK	NRTK
• ALK (anaplastik lenfoma kinaz) reseptör ailesi (Örn: LTK ve ALK) • DDR (diskoidin alan reseptörü) ailesi (Örn: DDR1, DDR2) • EGF (epidermal büyüme faktörü) reseptör ailesi (Örn: EGFR, HER2, HER 3, HER4) • Eph (efrin) reseptör ailesi (Örn: EphA1-8 ve EphA10, EphB1-B4 ve EphB6) • FGFR (fibroblast büyüme faktörü reseptörü) ailesi (Örn: FGFR1- FGFR 4) • INSR (insülin reseptör) ve IGF1 (insülin-benzeri büyüme faktörü) reseptörü (IGF1R) ((Örn: IGF1, IGF2, IGF1R, • IGF2R), (IGFBP1 (insülin-benzeri büyüme faktörü bağlanma proteini)-IGFBP 6)) • MET (mezenkimal-epitelyal dönüşüm faktörü) reseptör ailesi (Met) • MuSK (kasa özgü kinaz) reseptör ailesi • NOK (kinaz alanlı yeni onkogen) reseptör ailesi • PDGFR (trombosit türevli büyüme faktörü reseptörü) ailesi (Örn: alfa-tipi ve beta-tipi PDGFRs) • PTK7 (protein kinaz-benzeri tirozin) reseptör ailesi • RET (transfeksiyon sırasında yeniden düzenlenen) reseptör ailesi • ROR (retinoik asit-bağlantılı orfan reseptörü) ailesi • ROS1 (proto-onkogen tirozin-protein kinaz) reseptör ailesi • RYK (reseptör tirozin kinaz bağlantılı reseptör) ailesi • TAM (tümörle ilişkili makrofaj) reseptör ailesi (Örn: TYRO3, AXL ve MER) • TIE immünooglobülin-benzeri ve EGF-benzeri alanlı tirozin kinaz) reseptör ailesi (TIE1, TIE2) • TRK (tropomisin reseptör kinaz) reseptör ailesi (NTRK1 (nörotrofin reseptör kinaz), NTRK2, NTRK3) • Karakterize edilmemiş RTK (RTK106) • VEGFR (vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü) ailesi (VEGFR-1/FLT-1 (FMS-benzeri TK, VEGFR-2/KDR/FLK-1)	• ABL1 ve BCR-ABL (B hücresi antijen reseptörü) ailesi (Örn: ABL1, ARG (Abelson-bağlantılı gen)) • ACK (Örn: ACK1, TNK1) • CSK (C-terminal src kinaz) (Örn: CSK, MATK (megakaryosit bağlantılı tirozin kinaz)) • FAK (fokal adezyon kinaz) ailesi (Örn: FAK, PYK2) • FES (felin sarkoma onkogen) ailesi (Örn: FES, FER) • FRK (fyn-bağlantılı kinaz) ailesi (Örn: FRK, BRK, SRMS) • JAK (janus kinaz) ailesi (Örn: JAK1-JAK 3, TYK2) • SRC (sarkoma-bağlantılı) ailesi (Örn: SRC, FGR, FYN, YES1, BLK, HCK, LCK, LYN) • SYK ailesi (Örn: SYK, ZAP70) • TEC ailesi (Örn: REC, BMX, BTK, ITK, TXK)

1.3.2. Reseptör Tirozin Kinazlar

Transmembran proteinler olarak tanımlanan reseptör tirozin kinazlar (RTK'ler), epidermal büyüme faktörü (EGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF), sinir büyüme faktörü (NGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), insülin ve insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF), efrinler ve anjiyopoietinlerin de dahil

olduğu çok çeşitli büyüme faktörleri için reseptör olarak işlev gören büyük bir protein ailesidir. RTK'lar, çoğalma, göç, farklılaşma, morfogenez ve metabolizma gibi çok çeşitli fonksiyonlara sahiptir (Popovic ve Wilson, 2010; Brunelleschi vd., 2002). Reseptörleri kodlayan 58 tirozin kinaz geni, yapısal hücre dışı özelliklerine dayanarak 20 alt gruba ayrılır. Tablo 2’de, reseptör tirozin kinazların dahil olduğu grupların yanısıra, bu reseptörlere bağlanan ligandlar ve kanserle ilişkileri de belirtilmiştir. Bu alt gruplardan EGFR/ErbB (Sınıf I), insülin reseptörü (Sınıf II), PDGF (Sınıf III), FGF (Sınıf IV), VEGF (Sınıf V) ve HGF (MET, Sınıf VI)’nin, onkolojik hastalıklarla kuvvetli ilişkileri olduğu tespit edilmiştir (Ghosh vd., 2020; Segaliny vd., 2015).

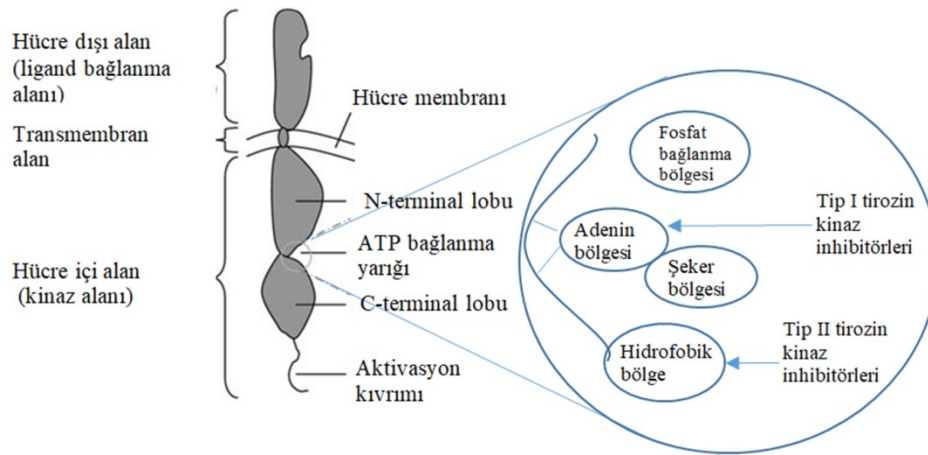
Tablo 2. Reseptör tirozin kinazların alt grupları ve kanserle ilişkileri (Ghosh vd., 2020).

Sınıf	Aile Üyeleri	Ligandlar	Kanserle İlişkisi
Sınıf I (ERBB)	EGFR, ERBB2, ERBB3, ERBB4	EGF, TGF- α , HB-EGF, AREG, BTC, EPG, EPR, NRG1–4	EGFR mutasyonu, tümör oluşumunu teşvik eder ve onkolojik tedavilere direncin göstergesidir. Genellikle kanser hücrelerinde aşırı eksprese edilir ve ayrıca PD-L1’in (programmed death ligand-1) aşırı ekspresyonu ile ilişkilidir.
Sınıf II (İnsülin)	INSR, IGFR, IRR	IGF-1, IGF-2, Insulin	Biyolojik aktivitesi geniş kapsamlı değerlendirilip tümör gelişimine katkısı olduğu belirlenmiştir. ATP bağlayan taşıyıcı proteinlerin düzenlenmesinde ve hücre dışı matris ile etkileşimlerde yer alır.
Sınıf III (PDGF- Trombosit türevli büyüme faktörü)	PDGFR α , PDGFR β , CSF1R, KIT, FLT3L/FLK2	PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD, CSF-1, IL-34, SCF	Tümör gelişimi, hücre proliferasyonu, metastaz, kemoterapi direnci, anjiyogenez, immünoşüpresif tümör mikroçevresi ve apoptoz inhibisyonu ile yakından ilişkilidir.
Sınıf IV (VEGF-Vasküler endotelial büyüme faktörü)	VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3	VEGF A-D, PLGF1–2	Endotel hücrelerinin proliferasyonunu ve hayatta kalmasını uyarak, damarların geçirgenliğini artırarak tümör anjiyogenezini artırır.
Sınıf V (FGF-Fibroblast büyüme faktörü)	FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4	FGF 1–25	Hücrede sinyal düzensizliğine, anjiyogenez sebeb olarak ve kanser tedavilerine direnç göstererek karsinogenez e etki eder.
Sınıf VI (PTK7-Protein tirozin kinaz benzeri)	PTK7/ CCK4	Tanımlanmamış	Tümör oluşumu ve metastazda yer alır.
Sınıf VII (TRK-Tropomisin reseptör kinaz)	TRKA, TRKB, TRKC	NGF, NTF-4, NTF-4, BDNF	NTRK gen füzyonları, hücrelerin farklılaşması ve hayatta kalmasıyla bağlantılı olan farklı kanser türlerinin onkogenik etkenlerindendir. NTRK füzyonu bulunan kanser hastalarının %23’ünün PD-L1’i eksprese ettiği görülmüştür.

Tablo 2'nin devamı

Sınıf VIII (MET-Mezenkimal epidelyal dönüşüm faktörü)	MET, RON	HGF	MET, esas olarak reseptörün aşırı ekspresyonu, HGF ile birlikte ekspresyon veya genomik yukarı yönlü regülasyon ile aktive olur.
Sınıf IX (EPH-Efrin)	EPHA1, EPHB1	EphrinB1-3, ephrinA1-A5	Efrin ligandlarının varlığına bağlı olarak hem onkogenler hem de tümör baskılayıcılar olarak ikili işlev gören bağlı reseptörlerdir.
Sınıf X (AXL)	AXL, MER, TYRO3	Gas6, Pros-1	Tümör hücrelerinin çoğalması, hayatta kalması, kök hücre fenotipi, metastaz ve kanser tedavisine dirençle ilgilidir. Ayrıca, immünosupresif ve protümorijenik fenotiplere yol açar.
Sınıf XI (TIE-Endotelial hücrelerdeki tirozin kinaz reseptörü)	TIE, TEK	Ang1-4	Tümör progresyonu ve anjiyogenezin başlangıç noktası olarak kabul bilinir. Ang-2'nin artan ekspresyonu, farklı maligniteleri olan hastaların durumunun kötüleşmesi ile ilişkilidir.
Sınıf XII (RYK-Tirozin kinaz bağlantılı reseptör)	RYK	Wnt3a, Wnt5a	RYK, bazı kanser türlerinde aşırı eksprese edilir ve sağ kalımları olumsuz etkiler. RYK, kanser kök hücre tedavisi için gerekli olan WNT/ β -katenin yolunu aktive eder.
Sınıf XIII (DDR-Diskoidin alan reseptörü)	DDR1, DDR2	Kolojenler	Epitelial mezenkimal transisyon (EMT), hücre göçü, invazyon ve hayatta kalma, apoptoz inhibisyonu ve kemorezistansı düzenler.
Sınıf XIV (RET-Transfeksiyon sırasında yeniden düzenlenen)	RET	GDNF, Neurturin, artemin, persephin	Hücrenin hayatta kalmasına ve apoptoz inhibisyonuna yol açan farklı malignitelerde sıklıkla mutasyona uğrar.
Sınıf XV (ROS-Rektif oksijen türü reseptörü)	ROS	Tanımlanmamış	ROS'un anormal ekspresyonu (füzyon izoformu), farklı kanser türlerinin önemli bir etkenidir.
Sınıf XVI (LTK-Lökosit tirozin kinaz)	LTK, ALK	PTN, MK, ALKALS, FAM150A, FAM150B	ALK genini etkileyen genomik füzyonlar kanserde yaygındır ve kontrolsüz hücre proliferasyonuna yol açan ALK temelli aktivasyona neden olur.
Sınıf XVII (ROR- reseptör tirozin benzeri orfan reseptörü)	ROR1, ROR2	Wnt5A	Tümör tipine veya evresine bağlı olarak bir tümör baskılayıcı veya aktivatör olarak ikili bir role sahiptir.
Sınıf XVIII (MUSK- Kasa özgü kinaz)	MUSK	ARGIN	Hücre proliferasyonunu, apoptozu, farklılaşmayı ve tümör oluşumunu aktive eder.
Sınıf XIX (LMR-Lemur reseptör kinaz)	AATYK1, AATYK2, AATYK3	Tanımlanmamış	Kolorektal kanser ve prostat kanserinde sıklıkla mutasyona uğrar ve kanser fenotipinin başlaması ve ilerlemesi ile ilişkilidir.
Sınıf XX (STYK1- Serin/treonin tirozin kinaz)	SuRTK106, STYK1	Özel ligandları bağlayacak hücre dışı bağlanma bölgesi (ECD)'den yoksundur	STYK anormal ekspresyonu, kolorektal kanser dahil olmak üzere farklı malignitelere sebep olur

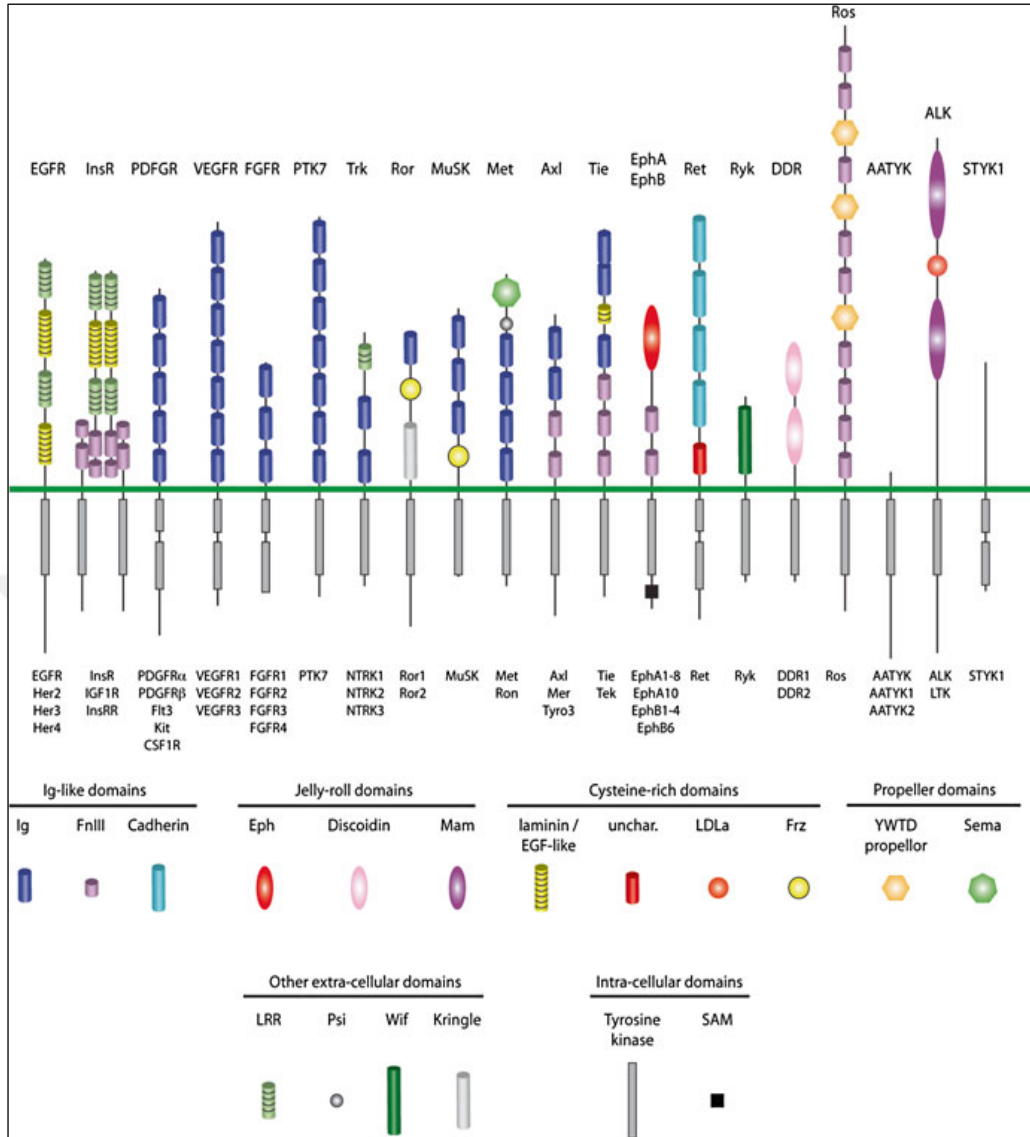
Bütün reseptör tirozin kinazlar, hücre içi tirozin kinaz bölgesi, hücre dışı alan ve bu iki alanı ayıran tek bir transmembran alandan oluşur (Şekil 1). N-terminal hücre dışı alan, ligand bağlanma alanı olarak, C-terminal kuyruğu ile çevrili hücre içi (sitoplazmik alan) alan da tirozin kinaz alanı olarak bilinir. Reseptör tirozin kinazların temel alanlarından olan transmembran alan, hidrofobik özellikte küçük bir kısımdan oluşur (Gotink ve Verheul, 2010). Bu alanın esas görevi, reseptörü membran düzlemine sabitleyerek hücre dışı alanı hücrenin iç alanıyla birbirine bağlamaktır. Başlangıçta, bu alanın, reseptörü membrana sabitleyen pasif bir yapı olduğu düşünülüyordu. Ancak, bir reseptörün transmembran alanındaki bir mutasyonun, dimerizasyon ve reseptör sinyal aktivasyonu ile sonuçlanan konformasyon değişiklikleri üzerinde bir etkiye sahip olabileceği belirlendi. Aslında, bu bölgedeki genetik değişiklikler, bu alanın RTK dimerizasyonunda aktif rolü olduğunu ve her ne kadar dimerizasyon için tek başına yeterli olmasa da aktivasyonun ve sinyalleşmenin gerçekleşebilmesi için o alanın desteğine ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir (Bennasroune vd., 2004).



Şekil 1. Reseptör tirozin kinaz yapısı (Gotink ve Verheul, 2010).

Tirozin kinaz alanı, N- ve C-terminal lobundan ve bu iki lob arasında yer alan ATP bağlanma bölgesinden oluşur. ATP bağlanma bölgesi, adenin, şeker ve fosfat bağlanma bölgelerinden oluşur. ATP bağlanma bölgesi yakınında ise hidrofobik cep meydana gelir ve bu cep, tirozin kinaz inhibitörleri açısından önemlidir (Gotink ve Verheul, 2010). Hücre içi sitoplazmik alanda yer alan C-terminal bölgesi, RTK sınıfları arasında değişkenlik gösterir ve hücrelere gönderilen aşağı yönlü sinyallerin çeşitliliğini ve özgünlüğünü sağlar (Yamaoka vd., 2018).

Reseptör tirozin kinazların ana bölümlerinden olan hücre dışı alan ise ligand özgünlüğünü tanımlayan farklı bir yapıya sahiptir ve reseptör tirozin kinaz türleri arasında farklılık gösterir. RTK'ların her bir üyesi, belirleyici olan immünoglobülin veya epidermal büyüme faktörü gibi alanlar, fibronectin tip III tekrarları veya sistein açısından zengin bölgeler dahil olmak üzere çeşitli tipte korunmuş hücre dışı alanlar bulundurur (Şekil 2) (Zwick vd., 2001). İnsan reseptör tirozin kinaz ailesinde, 16 farklı tipte bu korunmuş alanlardan bulunur. Bunlardan en yaygın olanı, Ig alanı, fibronectin tip III (FnIII) alanı ve kaderin alanının da dahil olduğu immünoglobülin benzeri alan sınıfıdır. İkinci en yaygın sınıf, efrin bağlama alanı, diskoidin alanı ve meprin/A-5 protein reseptörü/protein tirozin fosfotaz mu (Mam) alanın dahil olduğu jelly-roll alan sınıfıdır. Daha sınırlı sayıdaki alan türleri ise lösin açısından zengin tekrar alanları, laminin/EGF benzeri sistein açısından zengin alanlar, sistein açısından zengin diğer alanlar (düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü A sınıfı alan, kıvrımlı alan ve Ret ailesinin henüz karakterize edilmemiş sistein bakımından zengin alan), kringle alanları, Wnt-inhibitör etkili alanlar, pervane şeklindeki alanlar (YWTD), pleksin-semaforin-integrin (Psi) alanları ve semaforin alanlarıdır. Bu alanlar, genellikle kısa, bir veya ikiden fazla kalıntı içermeyen polipeptid bağlarla birbirine ardışık bağlıdır. Uzamış bir dış alan yapısı, konformasyonel değişime imkan sunarken, alanların kısa bağlantılarla ardışık düzenlenmesi, konformasyonel esnekliği azaltır. Bu genel yapı, dış alan yapılarının veya onlara bağlı ligandların, hücre zarına bağlı yardımcı reseptörlerle etkileşime girecek şekilde yeniden konumlanmalarına imkan sağlar (Lawrence ve Ward, 2015). Ligandlar, reseptör tirozin kinaz türleri arasındaki alan çeşitliliğinin bir sonucu olarak, farklı reseptörlere büyük bir özgünlükle bağlanır (Metibemu vd., 2019). Tirozin kinaz enzimatik aktivitesine sahip hücresel reseptörler, büyüme faktörleri, sitokinler ve hormonlar tarafından aktive edilerek ATP'nin ve fosfat gruplarının, proteinlerin tirozin kalıntılarında yer alan hidroksil gruplarına transferini katalizler. Hücre dışı alana ligand bağlanmasıyla başlayan reseptör tirozin kinazların aktivasyon mekanizması, sinyallerin iletimini sağlar ve bu süreç sonunda hücrelerde çoğalma, apoptoz, motilite, anjiyogenez ve farklılaşma gibi hücresel olaylar gerçekleşir (Garcia vd., 2014).



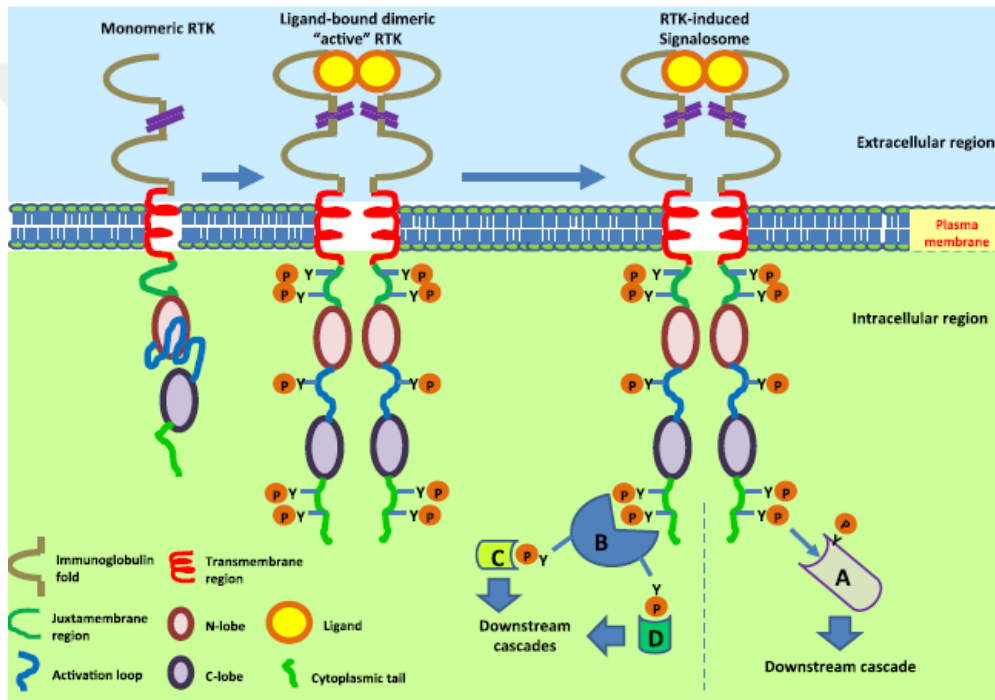
Şekil 2. Reseptör tirozin kinazların alt sınıfları için belirleyici olan hücre dışı öğeler (Lawrence ve Ward, 2015).

1.3.3. Reseptör Tirozin Kinazların Aktivasyon Mekanizması

RTK'ların birçok türleri olmasına rağmen aktivasyon mekanizmalarının iki temel aşaması vardır. Birincisi, ligandlara bağlandıktan sonra dimerizasyon oluşması, ikincisi ise tirozin kalıntıların otomatik fosforilasyonudur (Yamaoka vd., 2018). Reseptör tirozin kinazların aktivasyonunun başlaması, hücre dışı alana ligand bağlanmasıyla olur ve bu bağlanma, genellikle dimerizasyon başta olmak üzere, reseptör monomerlerin oligomerizasyonunu indükler (Garcia vd., 2014). Reseptörler, süreç içerisinde, monomer ve dimerler arasında dinamik dengeye ulaşır. Genel olarak, tirozin kinaz alanının

aktivasyonuna yol açan dimerizasyon dört şekilde gerçekleşir. İlkinde, reseptör dimerizasyonu, Trk A reseptöründe olduğu gibi iki reseptörün hücre dışı alanları arasında doğrudan temas olmaksızın ligand aracılığıyla gerçekleşir. İkinci dimerizasyon şeklinde ise iki aktive edici ligand arasında herhangi bir fiziksel etkileşim olmaksızın reseptör aracılığıyla gerçekleşir. Bu etkileşime örnek olarak, EGFR'nin de dahil olduğu, ErbB aile üyelerinin dimerizasyonu verilebilir. Üçüncü dimerizasyon oluşma şeklinde ise ligand homodimerleri, daha sonra dimer ara yüzeylerinden birbirleriyle etkileşecek olan iki tane reseptör molekülünü bağlar. KIT reseptör dimerizasyonu üçüncü yöntemle örnek verilebilir. Son yöntem olarak, ligand bağlanma ve reseptör-reseptör temasına bağlı reseptör dimerlerin kombinasyonlarına yardımcı moleküllerin katılmasıdır. Heparin veya heparan sülfatın, yardımcı molekül olarak FGFR ailesinin dimerizasyon mekanizmasına katılması, dördüncü yöntemle örnektir (Du ve Lovly, 2018). Her iki reseptörün tirozin kinaz alanlarının yan yana gelmesi, kinaz aktif durumunun sürdürülmesini sağlar. Kinaz aktivasyonun başlamasından sonra dimer veya oligomerdeki bir reseptör, karşıt reseptörün kinaz alanındaki C-terminal bölgesinde bulunan tirozin kalıntılarını fosforile eder. Trans-fosforilasyon olarak adlandırılan bu olay, her bir kinaz alanının trans-otofosforilasyonu ve cis-otoinhibisyonun devreye girmesiyle sonuçlanır (Ghosh vd., 2020; Garcia vd., 2014). Otofosforilasyon, ayrıca, Src homoloji 2 (SH2) alanı veya fosfotirozin bağlama (PTB) alanını içeren çok çeşitli aşağı akış sinyal proteinlerini aktive eder. SH2 alanı içeren proteinler ya doğrudan reseptöre bağlanır ya da dolaylı olarak, PTB alanları üzerinden, reseptör tirozin kinazları bağlayan kenetlenme proteinleri aracılığıyla reseptöre bağlanır. Bu kenetlenme proteinleri, SH2 veya diğer alanları içeren sinyal moleküllerinin reseptöre bağlanabilmesi için bir ortam oluşturur. Bu alanlar, reseptör içindeki belirli fosfotirozin kalıntılarına bağlanarak çeşitli hücresel sinyal yollarının ilerlemesini sağlayan aşağı akış yönündeki aracı molekülleri devreye sokar (Du ve Lovly, 2018). Bu moleküller arasında, kinazlar (fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K), SRC), adaptör proteinler (SHC, GRB2), transkripsiyonel faktörler (sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT)), ubikuitin ligazlar ve fosfolipazlar (PLC- γ) bulunur. Bu moleküller, RAS/RAF/mitojenle aktive olan kinaz (MAP), PI3K/AKT/ rapamisininin memeli hedefi (mTOR), PLC- γ /protein kinaz C ve janus kinaz (JAK)/STAT yolları gibi aşağı akış yönlü sinyal yollarını aktive eder (Yamaoka vd., 2018). Hücre çekirdeğine doğru yönelmiş bu reaksiyon zincirlerinin sonucunda, protein sentezi veya hücre farklılaşması, olgunlaşması, çoğalması ve apoptozu gibi hücresel olaylarının gerçekleşmesi için gen transkripsiyonu başlar.

Beraberinde, hücre içi sinyal sürecini defosforilasyonla kesintiye uğratan fosforilazlar gibi düzenleyici veya inhibitör proteinlerin sentezi veya aktivasyonu gerçekleşebilir. Reseptör tirozin kinazlarla hücre çekirdeği arasındaki gerçekleşen bu reaksiyon zincirleri, belli bir düzen içinde, “upstream” olarak da ifade edilen yukarı akış yönlü (hücre reseptörünün tanınması ve ligand bağlanması için hücre zarı yönünde ilerlemesi) ve “downstream” diye de adlandırılan aşağı akış yönlü (gen transkripsiyonu ile sonuçlanan hücresel uyarıların hücre çekirdeği yönünde ilerlemesi) şekilde karşılıklı tekrarlar (Hernandez-Florez ve Valor, 2016).



Şekil 3. Reseptör tirozin kinazların örnek yapısı ve aktivasyon mekanizması (Butti vd., 2018).

Bölümlerinin ve aktivasyon mekanizmasının şematize edildiği Şekil 3'e göre, reseptör tirozin kinazların N-terminalinden C-terminaline kadar olan bölümleri, immünoglobülin kıvrımlar, transmembran bölge, membrana bitişik bölge, N-lobu, aktivasyon kıvrımı, C-lobu ve sitoplazmik (C-terminal) kuyruktur. Plazma zarında, monomer olarak bulunan, reseptör tirozin kinazlara ligand bağlanması ile reseptör molekülleri çarpaz bağlanır ve reseptör otofosforilasyonu ve aktivasyonuna yol açan konformasyonel değişiklikler gelişir. Fosforile edilmiş RTK, adaptör proteinler (B) için bir bağlanma bölgesi olarak hizmet eder veya doğrudan sinyal moleküllerini (A) fosforile

eder. Adaptör proteinler veya sinyal molekülleri, SH2 veya PTB alanı yoluyla fosforile edilmiş reseptöre bağlanır. Yerleşik adaptör proteinleri, çeşitli aşağı akış yönlü mekanizma moleküllerini (C, D) fosforile ederek sinyallerin ileri taşınması sağlanır (Butti vd., 2018). Uyarıcı ligandlar tarafından indüklenen RTK'ların aktivitesinin, belli bir dengede yürüyebilmesi için gerekli durumlarda zayıflaması ve sonlandırılması gerekir. Bunun için de çeşitli inhibisyon mekanizmaları mevcuttur. Bu mekanizmalar; argos ve anjiyopietin gibi antagonistik ligandlarla inhibisyon, mutant reseptörlerle oluşan hetero-oligomerizasyonun yol açtığı inhibisyon, protein tirozin fosfotazlar aracılığıyla RTK aktivitesinin inhibisyonu, RTK'ların hızlı endositoz ve yıkımıyla hücre yüzeyindeki sinyalin zayıflatılması, protein kinaz-C'nin aktivasyonu sonucu RTK aktivitesinin inhibisyonu ve sitokin sinyallenmesinin baskılayıcısı (SOCS) proteinlerin JAK'ın protein tirozin kinaz alanına bağlanması neticesinde RTK aktivitesinin inhibisyonu şeklinde özetlenebilir (Schlessinger, 2000).

Normal fizyolojik koşullar altında, RTK aktivitesi, aktivasyon/inhibisyon mekanizmaları ve aktivasyona katılan moleküller tarafından sıkı bir kontrol altında ve dengede yürütülürken, çeşitli mekanizmalar yoluyla değişime uğrayarak hücre büyümesi/proliferasyonu ile hücre ölümü arasındaki denge bozulabilir ve nihayetinde normal hücreler onkogenik özellik kazanabilir. Bu nedenle, RTK'lar, hücre çekirdeğine karmaşık bilgilerin aktarılması ve birçok hücreyel işlemin düzenlenmesinde, transkripsiyonel yolların önemli bir düğüm noktasını oluşturur (Du ve Lovly, 2018).

İnsan tümörleri ile ilgili yapılan kapsamlı genom sekanslama çalışmalarında, reseptör tirozin kinazlardan EGFR'yi kodlayan genin, kan hücrelerine bağlı olmayan kanser türlerinde, en sık mutasyona uğrayan genlerden biri olduğu tespit edilmiştir. Başlangıçtaki çalışmalarda, akciğer kanserlerinde ve baş/boyun tümörlerinde yüksek EGFR seviyelerinin varlığı bildirilmişken, sonraki çalışmalarda, EGFR'nin aşırı ekspresyonu daha başka kanser türlerinde de doğrulanmıştır (Pareja vd.,2015).

1.4. Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR)

EGF, hücrelerin büyümesini, çoğalmasını ve hayatta kalmasını uyarmak için hedeflenen hücrelerin yüzeyindeki reseptörlere bağlanan bir polipeptittir (Silverman ve Holladay, 2014). EGFR ise hücre içi alanda bir kinaz enzimi olarak işlev gören, EGF'nin

bağlanmasıyla aktive olan, 170.000-180.000 (170-180 kDa) molekül ağırlığında bir glikoproteindir (Erkan ve Gögebakan, 1999).

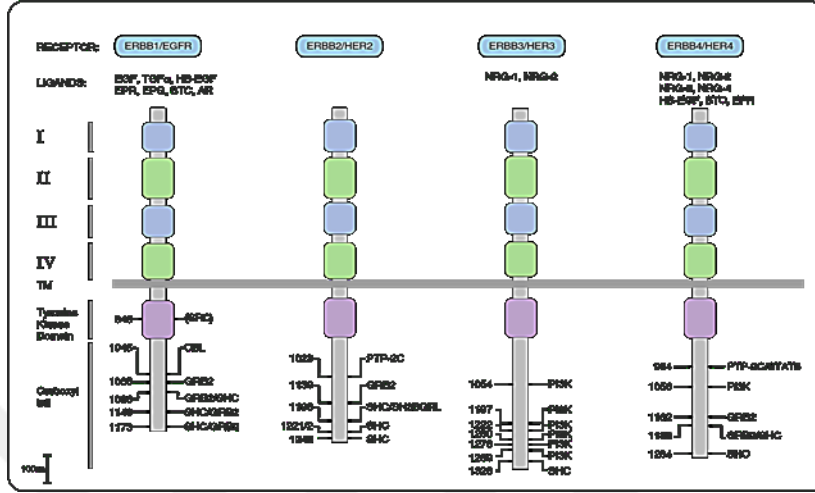
Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), yapılarında ve işlevlerinde benzerlik gösteren RTK'ların, dört üyeli ErbB / HER (insan epidermal reseptör) ailesine aittir. ErbB / HER ailesinin üyeleri, ErbB1 (EGFR veya HER1), ErbB2 (HER2/c-neu), ErbB3 (HER3) ve ErbB4 (HER4)'dür (Raghavendra vd., 2018).

EGF, ilk olarak, 1960'lı yılların başında, Stanley Cohen tarafından, izole edilmiş çene altı bezi ekstraktının yeni doğmuş farelere enjeksiyonundan sonra farelerin gözlerinin daha erken açıldığının ve dişlerinin daha erken çıktığının gözlenmesi sonucunda tanımlanmıştır. Bu keşiften yıllar sonra, radyoaktif olarak işaretlenmiş EGF'nin kullanılmasıyla yapılan çalışmada, EGF'nin ilişkili olduğu epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) tanımlanmıştır (Pareja vd., 2015). Bir transmembran protein olan EGFR, üç ana alandan oluşur. Alanlardan birincisi, epidermal büyüme faktörünün bağlandığı hücre dışı alan, ikincisi, transmembran alan, üçüncüsü ise sitoplazmik alandır (Abourehab vd., 2021). İlk sekanslanan reseptör tirozin kinaz olan EGFR'nin bu alt birimlerinden hücre dışı ligand bağlanma alanının 622 kalıntıya, transmembran alanının 23 kalıntıya ve hücre içi alanının da 522 kalıntıya sahip olduğu belirlenmiştir (Roskoski Jr., 2004).

Sitoplazmik alan, protein tirozin kinaz bölgesi ve C-terminal fosforilasyon bölgesi olarak iki alandan oluşur. Hücre dışı ligand bağlanma alanı ise iki adet lösin açısından zengin tekrar eden alan (I ve III alanları) ve iki adet sistein açısından zengin alan (II ve IV alanları) içeren karakteristik bir yapıdadır (Şekil 4). Alan II, EGFR-homodimerlerinin ve diğer ErbB aile üyeleriyle birlikte oluşturulan heterodimerlerin stabilizasyonunu sağlayan bir reseptör dimerizasyon bölgesi olarak görev yapar (Pareja vd., 2015).

Bütün ErbB aile üyeleri, ortak bir yapıya sahip olmasına rağmen, iki üyede bazı farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Bu farklılıklar, ErbB2'nin, korunmuş bir kinaz alanına sahipken ligand bağlanma alanından yoksun olması ve ErbB3'ün, ligand bağlama özelliği var olmasına rağmen kinaz işlevinin bozulmuş olmasıdır (Pareja vd., 2015). ErbB reseptör üyeleri arasında, dördü homodimer altısı heterodimer olmak üzere toplam on farklı birleşim gerçekleşir (Roskoski Jr., 2004). EGFR'nin de dahil olduğu ErbB ailesi, sınıf I reseptör tirozin kinazlarından olup, hücrelerin çoğalması, sağ kalımı ve farklılaşması gibi hücresel süreçleri düzenlemede görev aldıkları epidelyal, mezenkimal ve sinir dokularında eksprese edilir (Cockerill ve Lackey, 2002). Epidermal büyüme faktörünün (EGF), bilinen

hücresel süreçlerdeki görevlerinin yanı sıra, besinlerin emilmesine ve bağırsak bariyeri bütünlüğünü sağlamaya yönelik etkili bir bağırsak düzenleyicisi olduğu da tespit edilmiştir (Tuncer ve Kozacı, 2022).



Şekil 4. ErbB reseptör ailesinin lineer gösterimi (Pareja vd., 2015).

Hücresel süreçlerin belli bir dengeye ulaşabilmesi için hücreler arasında sürekli bir iletişim gereklidir. Bu amaçla, ErbB ailesi reseptörleri de diğer reseptörlerde olduğu gibi belirli ligandlarla etkileşime girer. Bu etkileşimin gerçekleşebilmesi için büyüme faktörleri, hücre dışı ortama salınır. Şekil 4’de belirtildiği üzere, on bir üyeli EGF-benzeri büyüme faktörü ailesinden yedi tanesi EGFR ile etkileşime girer. Bu ligandlardan, EGF, dönüştürücü büyüme faktörü (TGF α), epigen (EPG), ve amphiregulin (AR) sadece EGFR ile etkileşime girer. Diğer taraftan, heparin bağlayıcı EGF benzeri büyüme faktörü (HB-EGF), epiregulin (EPR) ve betacellulin (BTC) ligandları hem EGFR hem de ErbB4’e bağlanabilirken, neuregulin (NRG) 3 ve 4 yalnızca ErbB4’e bağlanır. NRG 1 ve 2 ise hem ErbB3’e hem de ErbB4’e bağlanabilir. Ligand kaynaklı reseptör dimerizasyonu, ilk olarak EGF ile EGFR arasında keşfedilmiş olup zamanla diğer RTK’lar arasındaki dimerizasyonlar da ortaya çıkarılmıştır. Her ne kadar ligandların varlığında reseptörlerin dimerizasyonu gerçekleşebilse de ErbB reseptörlerinin, ligandların yokluğunda da dimerize veya oligomerize olduğuna dair bulgular mevcuttur. EGFR’nin hücre dışındaki I ve III alanlarına, EGF veya TGF α gibi ligandların bağlanmasıyla birlikte, gizli olan hücre dışındaki alan II’nin dimerizasyon kolu açığa çıkar ve konformasyonel değişiklikler gerçekleşir. Bu konformasyonel değişiklikler, reseptörün başka bir reseptörle etkileşime

girmesini sağlar. Hücre dışı alanlarda meydana gelen konformasyonel değişiklikleri, etkileşime giren reseptörlerden birinin kinaz alanındaki C-terminal lobu ile diğer reseptöre ait N-terminal lobunun birleşmesi ve kinaz alanlarının asimetrik dimerizasyonu takip eder. Ligand-reseptör etkileşimi ile başlayıp dimerizasyonla devam eden süreç, çoklu sinyal yollarının aktivasyonunu başlatan oto-transfosforilasyon ve nihayetinde transkripsiyonel düzenleme ile sonuçlanır (Pareja vd., 2015). Protein kinazların kontrolsüz hücre çoğalmasında etkin olmasının nedeni de biyolojik yollarla hücrelerin ne zaman büyüyeceği ve bölüneceğine dair sinyal iletimini sağlamasındaki rolüdür. Normal hücrelerde, sinyal iletim yolları, sıkı bir şekilde kontrol edilir ve çoğalma sinyalleri yalnızca belirli zamanlarda verilir. Fakat, bu yollarda görev alan spesifik kinazlarda anormalliklerin bulunması, kontrolsüz hücre çoğalmasına yol açan sinyali artırarak, düzenleyici kontrol mekanizmasını bozabilir (Silverman ve Holladay, 2014).

Epitel hücrelerinin yüzeyinde bulunan EGFR'nin, normalden fazla eksprese edilmesi bazı kanser türlerinin gelişimine neden olur. EGFR'nin aşırı ekspresyonunun, bazı agresif meme ve akciğer kanseri türlerinin, gelişmesinde ve ilerlemesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Son yıllarda, EGFR ve HER2, meme kanseri hastaları için önemli biyomarkerlerden ve tedavi hedeflerinden olmuştur (Raghavendra vd., 2018). Meme kanseri haricindeki bazı tümör tiplerinden alınan hücrelerin analizi sonucunda da EGF ve EGFR'de anormalliklere rastlanmıştır. EGFR, meme kanserlerinden başka, akciğer, kolon, baş-boyun, böbrek, pankreas ve mesane kanserlerinde de aşırı eksprese olduğu belirtilmektedir. Beyin tümörlerinde ise EGFR geninin amplifiye ve deregüle olduğu görülmüştür (Altundağ ve Altundağ, 2005). EGFR'nin aşırı ekspresyonu bazı katı tümörlerde farklı oranlarda, sküamöz hücreli baş ve boyun tümörlerinin (SCCHN) ise tamamında gözlenir. Sağlıklı insanlarla karşılaştırıldığında SCCHN'li hastaların kanserli bölge mukozalarında EGFR'nin 70 kat, TGF- α ligandının ise 5 kat aşırı eksprese edildiği, kanserli bölgeye komşu mukozalarda ise EGFR mRNA'sının 30 kat arttığı belirtilmektedir. EGFR'nin ekspresyonu displazi aşamasında gelişerek artarken, karsinom aşamasında belirli bir seviyeye ulaştığı görülmüştür (Öztop, 2008).

Tirozin kinazların, hücre büyüme ve farklılaşmasında görevli sinyal iletim yollarında etkili bir araç olduğunun keşfedilmesinden sonra, tirozin kinazlar ile kanser hücrelerinin anormal çoğalması arasında sıkı bir ilişki olduğu anlaşılmış ve kanser hücrelerini hedef alan tirozin kinaz inhibitörleri (TKİ) geliştirilmeye başlanmıştır (Tuncer ve Kozacı, 2022). Bu nedenle EGFR sinyal inhibisyonu, EGFR aracılığıyla anormal sinyal

iletimi gerçekleştiren tümörlerin büyüme hızını yavaşlatma yöntemlerinden biri olarak kabul edilir ve bu konuda oldukça fazla çalışma yürütülmektedir (Silverman ve Holladay, 2014).

1.5. Reseptör Tirozin Kinaz İnhibitörleri

Tirozin kinaz inhibitörleri (TKİ), büyüme faktörü sinyal yollarını çeşitli mekanizmalarla inhibe etmek suretiyle, büyüme reseptörlerinin mutasyonlarıyla veya anormal aktivasyonu ile meydana gelen kanserlerin tedavisinde kullanılan inhibitörlerdir. TKİ'ler, mutasyona uğramış bu yollar üzerine etki ederken, çoğunlukla normal vücut hücrelerini hedef almaz. Bu inhibitörler, ATP, substrat veya dimerizasyon bölgesi ile yarışmalı bağlanarak allosterik etki gösterir. TKİ'ler, aynı zamanda, apoptoz yoluyla tümör hücresi ölümüne de yol açar (Küpeli, 2022; Acar ve Altundaş, 2019). Kansere özgü moleküler ve hücrel değişikliklere odaklanabilmesi, diğer tedavi yöntemlerinden (kemoterapi ve radyoterapi) daha etkili olabilmesi ve normal hücrelere daha az zarar vermesi, tirozin kinaz inhibitörlerinin kanser tedavi yöntemleri arasında avantajlı konuma gelmesini sağlar (Tecen, 2016). Ancak, tedavi sürecinde kanser hücrelerinde bazı direnç gelişim mekanizmaları meydana gelebilir. Sekonder mutasyonlar, alternatif sinyal yollarının aktivasyonu ve immün sistemden kaçınma bu mekanizmalar arasında sayılabilir. TKİ etkinliğinin azalması ile sonuçlanan tirozin kinaz bağlanma yerinde nokta mutasyonların oluşması ise en sık rastlanılan direnç gelişim mekanizmasıdır (Küpeli, 2022). Ayrıca, TKİ'lerin, hedef reseptöre bağlı olarak, tedavi sürecini etkileyecek ciddi toksik etkilerin olması dezavantajlı olduğu noktalardan biridir. Dezavantajlarına rağmen, özellikle ikinci basamak tedavide, kemoterapi yerine tirozin kinaz inhibitör kullanımının, etkinlik ve güvenlik açısından çok daha avantajlı olduğu belirtilmektedir (Tecen, 2016).

Daha seçici inhibitör tasarlayabilmek için ilk zamanlar, tirozin kinaz inhibitörlerin çoğunluğu ATP aktif bölgesine bağlanabilecek şekilde tasarlanmıştır. İnhibitörlerin çoğu en az iki hidrojen bağı yapabilen alifatik ve aromatik grupları ihtiva eder. Kinaz inhibitörleri, kinazlara bağlanma şekillerine göre Tip 1, 2, 3 ve 4 şeklinde gruplara ayrılır. Tip 1 inhibitörleri, ATP-yarışmalı inhibitörlerin büyük kısmını oluşturur ve kinazın menteşe bölgeleriyle bir ile üç arasında değişen sayılarda hidrojen bağı yapar. Pirazolo [3, 4-d] pirimidinler, pirolo [2, 3-d] pirimidinler, prido [2, 3-d] pirimidinler, kinolinler, indolinonlar, pirazolokarboksamidler ve pirazolil kinoksalinler Src kaynaklı

fosforilasyonun ATP-yarışmalı inhibitörleri olarak tasarlanmıştır. Tip 1 inhibitörlere örnek olarak, staurosporin ve sunitinib verilebilir. Tip 2 inhibitörler, kinazın aktif olmayan konformasyonunda, ATP bağlanma bölgesinin yanındaki “allosterik bölge” olarak isimlendirilen hidrofobik cebe bağlanır. Tamamı üre veya amid grupları içeren tip 2 inhibitörleri, hidrojen bağıyla donör-akseptör çifti meydana getirir ve hidrofobik kuyruk kısımları allosterik bölgeyle etkileşir. Tip 2 inhibitörlerinin çoğu kinazın menteşe bölgesindeki amino asitlerle bir hidrojen bağı meydana getirir. Tip 1 inhibitörlerden daha etkili ve daha seçici olan bu inhibitörler arasında imatinib, sorafenib, nilotinib ve dasatinib yer alır. Tip 3 inhibitörler ise nonkompetitif olarak allosterik bölgeye bağlanır. Belli kinaza ait bağlanma bölgeleri ve düzenleyici mekanizmaları kullandıkları için oldukça seçici olan Tip 3 inhibitörlerin tasarımı, bağlandıkları bölgelerin yapısının çok iyi bilinmemesi sebebiyle oldukça zordur. Bu inhibitörlerden olan ponatinib, Abl kinaz bölgesine inaktif bir konformasyon ile bağlanarak aktif bölgede bulunan birçok amino asitle etkileşime girer. Tip 4 kinaz inhibitörleri, kinaz aktif bölgesinde çoğunlukla nükleofilik sistein kalıntısı ile geri dönüşümsüz olarak kovalent bağ oluşturur. Tip 4 inhibitörlerden olan neratinib, bir EGFR ve Src kinaz inhibitörü olup küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin tedavisi için tasarlanmıştır. Dacomitinib ve afatinib ise EGFR ve HER2 inhibitörlerindendir (Ölgen ve Şentürk, 2021).

Tirozin kinaz inhibitörlerinin sınıflandırılması çeşitli şekillerde yapılabilir. İnhibitörlerin sınıflandırmasında, hedefledikleri kinazlar, onaylanma tarihleri, kimyasal yapıları, EGFR ile etkileşim türleri (geri dönüşümlü, geri dönüşümsüz), klinik uygulamaları (kullanıldıkları kanser türleri), sitotoksiteleri, metabolik yolları gibi çok çeşitli kriterler esas alınabilir (Abourehab vd., 2021).

Hedefledikleri kinaz ailesine göre yapılan sınıflandırmada gruplardan biri olan EGFR tirozin kinaz inhibitörler, genellikle iyi tolere edilir ve sitotoksik ilaçların yol açtığı sistemik yan etkilere sebep olmaz. EGFR-TKİ'ler, EGFR'yi inhibe ettiği kısımlara göre; anti-EGFR monoklonal antikorlar, EGFR'ye özgü küçük molekülü tirozin kinaz inhibitörleri, EGFR ve HER2 reseptörünü aynı anda inhibe eden (dual inhibitör) tirozin kinaz inhibitörleri, EGFR ve diğer ErbB reseptörlerini inhibe eden pan-ErbB inhibitörleri, EGFR'yi, VEGFR'yi ve RET'i baskılayan daha az spesifik inhibitörler şeklinde gruplara ayrılır (Kılıç, 2012).

TKİ olarak geliştirilen ilk ilaç, kronik miyeloid lösemi tedavisinde kullanılan imatinib olup, 2001 yılında FDA tarafından onaylanmıştır (Küpeli, 2022). İlk TKİ'nin

2011 yılında onaylanmasından bu yana toplam 72 protein kinaz inhibitörü FDA onayı almıştır. Tamamına yakını (temsirolimus, netarsudil ve trilaciclib hariç) ağızdan alınan ilaçlardır. Onaylanmış 72 ilacın 12 tanesi protein-serin/treonin protein kinazlara yönelik iken 4 tanesi ikili özgüllük protein kinazlara (MEK1/2), 16 tanesi hedef blok reseptör olmayan protein tirozin kinazlara ve 40 tanesi de blok reseptör protein tirozin kinazlara yönelik inhibitörlerdir. Onaylanmış ilaçların 62 tanesi (57'si meme, akciğer ve kolon gibi katı kanser türlerinde, 10'u lösemi gibi katı olmayan kanser türlerinde, 4'ü de hem katı hem de katı olmayan kanser türlerinde) neoplazm hastalıklarının tedavisinde kullanılırken, 18 tanesi çoklu hastalık türlerinde kullanılmaktadır. Onaylanan inhibitörlerin en yaygın hedefleri arasında BCR- Abl, B-Raf, VEGFR, EGFR, JAK ve ALK bulunur (Roskoski Jr., 2023). Bu TKİ'lerden EGFR hedefli olan gefitinib 2003 yılında, erlotinib 2004 yılında, lapatinib 2007 yılında, vandetanib 2011 yılında, dacomitinib 2018 yılında ve afatinib ise 2013 yılında FDA onayı almıştır. Icotinib ise 2014 yılında Çin'de onay almıştır. Ayrıca faz çalışması aşamasında olup henüz onaylanmamış başka EGFR-TKİ'ler de mevcuttur. Selatinib, allitinib, AZD3759 bunlardan bir kaçıdır (Tecen, 2016; Das ve Hong, 2019). EGFR tirozin kinaz inhibitörlerden, üzerinde en çok çalışılanı gefitinib ve erlotinibtir. Bu inhibitörlerin küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin tedavisinde etkinliği kanıtlanmıştır (Öztop, 2008).

EGFR'in fosforilasyonunu sağlayan yolların inhibisyonu, bazı kanser hastalıklarının tedavisinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Aşağıda, EGFR hedefine yönelik geliştirilen ve kullanımına onay verilen tirozin kinaz inhibitör ilaçlarının etkili oldukları hastalıklara yer verilmiştir (Zhou vd., 2020; Çakar ve Göker, 2019; Tecen, 2016; Asati vd., 2016; Das ve Hong, 2019).

1. Afatinib (EGFR, HER2, HER4); Metastatik küçük hücreli olmayan akciğer kanseri,
2. Dacomitinib (EGFR); Metastatik küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
3. Erlotinib (EGFR); Metastatik küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, metastatik meme kanseri ve metastatik pankreatik kanser,
4. Gefitinib (EGFR); Metastatik küçük hücreli olmayan akciğer kanseri,
5. Icotinib (EGFR); Metastatik küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
6. Lapatinib (EGFR, HER2); Metastatik meme kanseri,
7. Vandetanib (EGFR, VEGFR, RET, BRK, SRC); Tiroid kanseri.

1.6. EGFR-TKİ İlaçlarının Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflandırılması

Tirozin kinazları inhibe etmek için yapılan molekül çalışmaları, kinaz karakterizasyonu ve sinyalizasyon ayrıntılarının bildirilmeye başlandığı 1960'lara kadar dayanmaktadır. Günümüze gelene kadar yapılan çalışmalar sonucu, keşfedilen çok sayıda küçük moleüllü kinaz inhibitörü FDA tarafından onaylanmıştır. Bu kinaz inhibitörlerinin gelişimi aşama aşama gerçekleşmiştir. Geliştirilen EGFR inhibitör ilaçları, etki mekanizmaları açısından kuşaklara ayrılmıştır. Nesil olarak da adlandırılan bu kuşaklar; birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü kuşak EGFR-TKİ'ler şeklinde sıralanmaktadır (Singh ve Jadhav, 2018).

Birinci kuşak EGFR-TKİ'ler, EGFR'nin tirozin kinaz bölgesine ATP ile yarışmalı olarak geri dönüşümlü bağlanır ve ATP'nin tirozin kinaz alanına bağlanmasını önleyerek tirozin fosforilasyonunu, EGFR aktivasyonunu ve devamında sinyal yollarının aktivasyonunu inhibe eder (Tong vd., 2017). Bu inhibisyon, hücre çoğalmasını durdurur ve hücre ölümüne yol açar (Bartholomew vd., 2017). Birinci kuşak EGFR-TKİ'lerden en önemlileri, ileri evre veya metastatik küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) için onaylanan gefitinib, erlotinib ve icotinibtir. Bu inhibitörler geri dönüşümlü olup ileri evre NSCLC hastalarının sağ kalımlarına katkı sağladıkları tespit edilmiştir. Gefitinib, 2003 yılında FDA tarafından monoterapi ilacı olarak onaylanmış ve küçük hücreli olmayan akciğer tümörlerinde önemli küçülmelere neden olduğu görülmüştür. Erlotinib, FDA tarafından 2004 yılında, ileri veya metastatik küçük hücreli olmayan akciğer tümörlerinin tedavisinde kullanılması için onaylanmıştır. Ayrıca, metastatik pankreas kanserlerinin tedavisinde kemoterapi ilacı olan gemcitabine ile birlikte de kullanılmaktadır (Huang vd., 2020; Acar ve Altundaş, 2019; Bartholomew vd., 2017). Fakat, bu ilaçlar mide, gastroözofagal, özofagus, servikal, renal hücreli ve hepatoselüler karsinom da dahil olmak üzere farklı kanser türlerine sahip hastalarda denenmesine rağmen çok fazla klinik fayda gösterememiştir (Mirone vd., 2016). Geri dönüşümlü olmaları ve doğal tip EGFR'nin inhibisyonuna neden olmaları gerekçesiyle sınırlı dozda kullanımları, birinci kuşak EGFR-TKİ'lerin etkinliklerini sınırlandırmaktadır. Diğer bir birinci kuşak EGFR inhibitörü olan lapatinib ise gefitinib ve erlotinibten farklı olarak, hem EGFR hem de ErbB2 için inhibitör etki gösterir. Lapatinib, kardiyak toksisite, döküntü, ishal, kusma ve karaciğer enzimi değerlerinde yükselme gibi çeşitli yan etkilere sahiptir (Acar ve Altundaş, 2019).

Birinci kuşak EGFR-TKİ'lerle yapılan tedavilere karşı gelişen direnç nedeniyle, daha uzun süreli etkiye sahip yeni nesil EGFR-TKİ'lerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur (Tong vd., 2017). Bu amaçla geliştirilen ikinci kuşak EGFR-TKİ'ler, 4-anilinokinazolin veya 4-anilino-3-siyanokinolin yapısında olup EGFR'nin ATP bağlanma bölgesinde bulunan bir sisteine kovalent olarak bağlanır (Acar ve Altundaş, 2019). Birinci kuşak inhibitörlerin aksine, ikinci ve üçüncü kuşak EGFR-TKİ'ler, geri dönüşümsüz ve daha yüksek bağlanma özelliğine sahip olup, birden fazla ErbB ailesi üyesini inhibe eder (Tang vd., 2015). İkinci kuşak EGFR-TKİ'ler, T790 direnç mutasyonuna ve EGFR hassasiyetli mutasyonların her ikisine karşı birinci kuşak EGFR-TKİ'lerden daha iyi aktiviteye sahiptir (Westover vd., 2018). EGFR genindeki 790 kodonunda bulunan treonin kalıntısının metiyonin ile yer değiştirmesi sonucu oluşan T790M nokta mutasyonu, ATP'ye daha yüksek ilgiyle bağlandığı için sinyal yolunu aktive ederek tümör büyümesini teşvik eder (Bartholomew vd., 2017). EGFR mutasyonlarını barındıran ileri evre NSCLC'nin birinci basamak tedavisi için onaylanmış olan ikinci kuşak EGFR-TKİ'lerden afatinib ve dacomitinibin, birinci kuşak inhibitörlere göre daha iyi etkinlik gösterdiği belirlenmiştir (Yoshioka vd., 2020). İkinci kuşak inhibitörlerden afatinib, FDA tarafından 2013 yılında metastatik NSCLC hastalarının tedavisi için, 2016 yılında ise platin esaslı kemoterapi sonrası ilerleme gösteren metastatik skuamöz hücreli NSCLC hastaları için onay almıştır. Dacomitinib, mutant NSCLC'nin tedavisinde kullanılan gefitinib ile kıyaslandığında, daha iyi bir sağ kalım etkisi göstermektedir. Teorik olarak, birinci kuşağa göre EGFR kinaz alanına daha yüksek ilgiyle geri dönüşümsüz olarak bağlanmalarına rağmen, ikinci kuşak EGFR-TKİ'ler, *in vivo* çalışmalarda, klinik olarak uygulanabilir konsantrasyonlarda yetersiz etkinlik göstermektedir. Ayrıca, doğal tip EGFR'nin inhibisyonuna yol açmaları nedeniyle, doz sınırlayıcı toksik etkileri olan afatinib ve dacomitinibin klinik kullanımları ve terapötik faydaları sınırlıdır (Huang vd., 2020; Acar ve Altundaş, 2019).

Birinci ve ikinci kuşak EGFR-TKİ'ler ile görülen geçici fayda sonrası, tedavinin yaklaşık 9-13. ayında, hemen hemen tüm hastalarda direnç gelişir. Gelişen bu dirence, EGFR'nin ATP bağlanma bölgesindeki (T790M) ikincil bir ekson 20 mutasyonun sebep olduğu belirlenmiştir. Bu mutasyon, reseptörün kinaz bölgesine ATP'nin bağlanma ilgisini artırmak suretiyle birinci kuşak EGFR-TKİ'lerin bağlanmasını azaltmaktadır (Remon vd., 2018). Bu nedenle, üçüncü kuşak EGFR-TKİ'ler, birinci ve ikinci kuşak inhibitörlere direnç geliştirmiş hastalara yönelik kullanılmaktadır. Bu bileşiklerin önceki kuşak inhibitörlerden farkı, aminopirimidin iskeleti taşımalarıdır. Üçüncü kuşak EGFR-TKİ'ler,

Cys797 ile kovalent bağ oluşturdıkları ve geri dönüşümsüz olarak bağlandıkları için, T790M mutasyonuna karşı etkinlik gösterirler (Ricordel vd., 2018; Helman vd., 2018). Bu bileşiklerin etkinliğinin, ancak kovalent bağ oluşumunu engelleyecek bir Cys797 mutasyonu ile bozulabileceği bildirilmektedir. Ayrıca, doğal tip EGFR için seçici olmamaları nedeniyle minimal epitel toksisiteye sebep olmaları üçüncü kuşak EGFR-TKİ'lerin dezavantajıdır. Bugüne kadar çeşitli üçüncü nesil EGFR-TKİ geliştirilmiştir (Russo vd., 2017). Bu kuşakta yer alan osimertinib, 2015 ve 2016 yıllarında sırasıyla FDA ve EMA (European Medicines Agency) tarafından onaylanan ilk üçüncü kuşak inhibitör ilaçlardandır (Sullivan ve Planchard, 2017). Gelişen EGFR ekson 20 T790 direnç mutasyonlu tümör hücrelerini hedeflemek üzere, ATP bağlama bölgesindeki Cys797 amino asidine kovalent bağla geri dönüşümsüz şekilde bağlanan osimertinib, güçlü bir inhibitör olarak tasarlanmıştır (Hsu vd., 2019). Osimertinib ile birlikte rociletinib hem T790M mutasyonuna sahip hücrelerde sinyal yollarını hem de doğal tip EGFR'yi inhibe etmektedir. 2,4-Diaminopirimidin iskeleti taşıyan ve mutant EGFR'nin geri dönüşümsüz inhibitörü olan rociletinib de EGFR'nin ATP bağlama bölgesindeki Cys797'ye kovalent olarak bağlanır. *In vitro* çalışmalarda rociletinibin, EGFR'nin bazı ekzon bölgelerinden kaynaklı mutant formları için seçici inhibitör olarak aktivite gösterdiği, bazı formlar için ise aktivite göstermediği gözlenmiştir. Diğer üçüncü kuşak EGFR-TKİ'ler gibi EGFR'nin tirozin kinaz bölgesindeki Cys797'ye kovalent bağlarla geri dönüşümsüz olarak bağlanan olmutinibin, hücre dizilerinde önemli yan etkilere yol açmadan tümör üzerine etkinlik gösterdiği bulunmuştur. Olmutinibe karşı direnç mekanizmaları henüz tanımlanmamıştır (Acar ve Altundaş, 2019). Başka bir üçüncü kuşak EGFR-TKİ olan almonertinib, Çin Ulusal Tıbbi Ürünler İdaresi (NMPA) tarafından onaylanmış olup T790M mutantlı NSCLC hastalarında %68,9'luk yanıt oranına sahip olduğu tespit edilmiştir (Wu vd., 2020). Furmonertinib, lazertinib, BPI-7711 ve nazartinib gibi diğer üçüncü kuşak EGFR-TKİ'lerin, EGFR T790M mutasyonlu ileri evre NSCLC hastalarında umut verici etkinlikleri gözlenmiştir ve güvenliklerinin kabul edilebilir düzeyde olduğu belirtilmektedir (Huang vd., 2020). Alflutinib de EGFR duyarlılığı olan ve T790M mutasyonları için seçici davranan, yeni geliştirilmiş, üçüncü kuşak EGFR tirozin kinaz inhibitörlerdendir (Shi vd., 2019).

EGFR'ye duyarlı mutant NSCLC'nin etkili tedavi yöntemlerinden olmasına rağmen EGFR-TKİ'lere karşı gelişen dirençleri aşabilmek için bir sonraki nesil TKİ'lere ihtiyaç duyulmaktadır. T790M mutasyonunun birinci ve ikinci kuşak EGFR-TKİ'lere direnç

mekanizması geliştirmesine karşı, üçüncü kuşak EGFR-TKİ'lerden faydalanılmaktadır (Tong vd., 2017). Ancak, yeni bir direnç mutasyonu olarak tanımlanan Cys797S mutasyonu, ATP-bağlanma bölgesinin yakınındaki Cys797'ye kovalent bağlanmayı, HER2 ve MET amplifikasyonunu ve BRAF V600E mutasyonunu bozan tüm geri dönüşümsüz EGFR inhibitörlerine direnç kazandırmaktadır (Troiani vd., 2016). Cys797S mutasyonunun üçüncü kuşak EGFR-TKİ'lere karşı geliştirdiği direnç dolayısıyla da yeni nesil inhibitörlerin tasarlanmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla, son zamanlarda, üçüncü kuşak inhibitörlerin direnç gösterdiği EGFR T790M ve C797S mutasyonlarının eş zamanlı olarak üstesinden gelmek için dördüncü kuşak EGFR-TKİ olarak EAI045 geliştirilmektedir (Huang vd., 2020; Acar ve Altundaş, 2019). Dördüncü kuşak EGFR-TKİ'lerden JBJ04-125-02, EA1045 gibi ATP-yarışmalı olmadan geri dönüşümlü olarak bağlanırken, CH7233163 ve brigatinib ATP-yarışmalı olarak geri dönüşümlü bağlanma gerçekleştirir. Dördüncü kuşak inhibitörlerden brigatinib, FDA tarafından onaylı olup diğerleri henüz klinik öncesi çalışma aşamasındadır (Du vd., 2021).

Her geçen gün yeni nesil TKİ'ler geliştirilmeye çalışılırken, diğer taraftan da çeşitli seçeneklerin bir araya getirildiği kombinasyon tedavi çalışmaları yürütülmektedir. Bu çalışmalara örnek olarak EA1045 ile bir monoklonal antikor olan cetuximabın kombinasyon şeklinde kullanılması verilebilir. EA1045, mutant EGFR dimerlerinde sadece bir alt birime bağlandığından mutant EGFR'nin inhibisyonunu tek başına gerçekleştiremez. Cetuximab gibi EGFR dimerizasyonunu engelleyen terapötik bir ajanla birlikte kullanıldığında ise EA1045'in T790M ve Cys797S mutasyonlarına karşı sinerjik olarak etkinliğinin arttığı görülmüştür (Li vd., 2020) .

1.7. Tirozin Kinaz İnhibitör İlaçlarının Geliştirilme Sürecinde Yapılan Bazı Çalışmalar

Aşağıda, protein tirozin kinaz inhibitör ilaçlarının geliştirilme sürecinde EGFR inhibisyonuna etki eden faktörler esas alınarak gerçekleştirilen EGFR inhibitör çalışmalarıyla ilgili bilgi verilmiştir.

Honegger vd (1988) tarafından yapılan çalışmada, özgün otofosforilasyon bölgelerinin (Tyr1068, Tyr1148 veya Tyr1173) fenilalanin kalıntılarıyla değiştirildiği EGFR mutantları elde edilmiştir. Doğal ve mutant reseptör kinazlarının kinetik parametreleri karşılaştırılmıştır. Deneyler sonucunda, protein tirozin kinazın V_{max} 'ının reseptör

konsantrasyonuna bağılı olduğu, ancak mutasyondan önemli ölçüde etkilenmediği görülmüştür. Tirozin kalıntısının bir fenilalanin veya bir alanin kalıntısı ile değiştirildiği Tyr1173 peptid analoglarının da 650-750 μM 'lık K_i ile otofosforilasyonu inhibe ettiği anlaşılmıştır. Sonuç olarak bu analizler, otofosforilasyon bölgelerinin her bir değişikliğinin, EGFR'nin kinaz aktivitesi üzerine büyük bir etkiye sahip olmadığını göstermiştir. Otofosforilasyon üzerine kinaz aktivitesindeki bu küçük artış, ligand aktivasyonuna doğrudan etki etmez. EGF uyarımı, protein tirozin kinazın V_{max} 'ını artırırken, otofosforilasyon, sadece substratın aktif bölgeye afinitesini (K_m) etkiler. Mutasyona uğramış reseptörlerin düşük EGF konsantrasyonlarında mitojenik olarak daha aktif olması, reseptör otofosforilasyonunun görevinin, normal bir mitojenik yanıt başlatmak için aşılması gereken bir uyarılma eşiği oluşturmak olduğunu göstermiştir (Honegger vd., 1988).

Al-Obeidi ve Lam'ın (2000) yapmış olduğu derleme çalışmasında kanser ve diğer bazı hastalıkların tedavisinde protein tirozin kinazlara (PTK) yönelik kullanılan inhibitörlerin gelişimi hakkında bilgi verilmiştir. Bu çalışmada, birçok protein tirozin kinazın insan vücudunda kanserlerin oluşumuyla ilişkili olduğundan bahsedilmiştir. Bu çalışmaya göre, protein tirozin kinazlardan EGFR'nin glioblastomda, HER2/neu'nun akciğer kanserinde, Axl'nin miyeloid lösemide, Src'nin kolon ve akciğer kanserinde ve Rse/Sky'nin akciğer kanserinde aşırı ekspresiyonu ve çoğalması söz konusudur. Bazı kanserlerde amplifikasyona ek olarak, kromozom translokasyonu yaygındır. Bu PTK'lara karşı kullanılan inhibitörlerin, bazı spesifik kanserlere karşı anti-tümör etkilere sahip olduğu kanısına varılmıştır. Örneğin, Bcr-Abl protein tirozin kinazına karşı güçlü ve nispeten spesifik bir küçük molekül inhibitörü olan STI571'in, kronik miyelositik lösemi hastaları üzerinde yapılan son klinik deneylerde başarılı olduğu kanıtlanmıştır. Anti-kanser tedavilerine yönelik bir diğer yaklaşım da bu tedavilerin anjiyogenezi önlediği şeklindedir. Bir VEGF ve FGF-PTK inhibitörü olan SU5416, bu amaç için geliştirilmiştir. Bu çalışmada, protein tirozin kinaz enzimlerinin katalitik bölgelerine bağlanan inhibitörlerin, küçük molekül inhibitörleri olarak bilindiği ve bu inhibitörlerden ilk rapor edilenlerin, quercetin ve genistein gibi flavon ve izoflavon doğal ürünlerinin olduğu belirtilmiştir. Bu inhibitörler, zayıf ve ATP'ye karşı seçici olmayan yarışmalı inhibitörlerdir. Diğer doğal ürün inhibitörlerden indolecarbazole staurosporine, lavendustin ve erbastatin de zayıf ve seçici olmayan EGFR inhibitörlerindendir. Klavilaktonlar, Ret/ptc1 ve EGFR protein kinazlarına karşı aktivite gösterirken indolcarbazol alkaloid K-252a ve analogları

nörotrofin reseptörlerini kapsayan protein tirozin kinazlara karşı inhibitör etkisi gösterir. Doğal ürünler haricinde, quinazolin, pridoprimidinler ve benzer heterosiklik bileşiklerin EGFR'ye karşı inhibitör etkisi vardır. Fenilamino primidinler, c-Abl, PDGF ve c-Kit reseptörlerinin katalitik bölgesi üzerine ATP ile yarışmalı inhibisyon etki gösterir. Benziliden malononitril (trifostinler), enzimin ATP ve substrat bağlanma bölgesinin biri veya her ikisine yarışmalı olarak bağlanır. İndol ve oksindoller ise düşük inhibitör aktivitesine sahiptir ve ATP ve peptid substratına karşı nonkompetitif etki gösterir. Geliştirilmekte olan protein tirozin kinaz inhibitörlerinin çoğu enzimin katalitik alanına yönelik olsa da, diğer kısımlarını hedefleyen bazı ilaçlar da vardır. Örneğin, HER2 ve EGFR gibi protein tirozin kinaz reseptörünün hücre dışı alanı ve Src'nin SH2 alanı, inhibitörlerin etki ettiği katalitik bölge dışındaki alanlardandır. Bu gruptaki inhibitörler, anti-reseptör antikolar ve SH2 bağlanma bölgesi inhibitörleri olarak ayrılırlar Herceptin, akciğer kanseri hücrelerinin büyümesini engelleyen anti-reseptör antikolarla örnek verilebilir. Src SH2 alanına yönelik en çok inhibisyon etkisi gösteren moleküller ise fosfopeptidler veya peptidomimetiklerdir (Al-Obeidi ve Lam, 2000).

Lin vd (2017) tarafından yürütülen çalışmada, lapatinibin EGFR'ye bağlanma mekanizmasından yola çıkılarak bir dizi yeni formononetin türevleri sentezlenmiştir. *In vitro* olarak yürütülen EGFR ve hücre büyümesi inhibisyon analizi çalışması ile sentezlenen formononetin türevlerinden 4v bileşiğinin, meme kanseri hücre hattına (MDA-MB-231) karşı, en güçlü anti-EGFR ve anti-proliferasyon aktivitesi sergilediği belirlenmiştir. Elde edilen veriler, bu bileşiğin lapatinib ile yaklaşık değerlere sahip olduğunu göstermiştir. Dahası, biyolojik deney sonuçları, 4v bileşiğinin etkili bir şekilde apoptozu indükleyebileceğini, EGFR'yi hedefleyerek ve ardından aşağı akış sinyal yollarını (EGFR/PI3K/Akt/Bad, EGFR/ERK ve EGFR/PI3K/Akt/b-catenin yolları) bloke ederek meme kanseri hücrelerinde (MDA-MB-231) proliferasyonu ve göçü inhibe edebileceğini göstermiştir. *In vivo* anti-tümör sonuçları ile 4v bileşiğinin, farelerdeki tümör kemoterapisinde etkinliği doğrulanmış ve MDA-MB-231 habis tümör tedavisinde yeni bir EGFR inhibitör potansiyeli olduğu belirlenmiştir (Lin vd., 2017).

Della Corte v.d., (2018) tarafından gerçekleştirilen *in vivo* çalışmada, mutasyona uğramış küçük hücreli olmayan akciğer kanseri üzerinde osimertinibin, monoklonal antikor olan setuksimab veya MEK1/2-inhibitörü selumetinib ile birlikte kullanılan ilaç kombinasyonlarının, tam bir EGFR inhibisyonunu sağlayıp sağlamadığı araştırılmıştır. Çalışmada, HCC827 (E746-759del / T790M-), H1975 (L858R / T790M+) ve PC9-T790M

(E746-759del / T790M+) mutantlarında, osimertinibe karşı direnç gelişiminden sonra ikinci basamak ve birinci basamak tedavide, osimertinibin selumetinib/setuksimab ile kombinasyonları değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda, osimertinib ile selumetinib veya setuksimabın ikinci basamak tedavide kullanılmasının, farelerin çoğunda % 50-80 yanıt oranıyla osimertinibe duyarlılığı ve sağ kalımı artırdığı ve ilk basamak tedavide kombinasyonların erken kullanımına bağlı olarak yanıt oranının % 90'a çıktığı görülmüştür (Della Corte vd., 2018).

Kombinasyon tedavilerinin etkinliğinin araştırıldığı bir diğer çalışma da Wang vd (2022) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, oligometastatik küçük hücreli dışı akciğer kanseri (NSCLC) hastalarının birinci basamak tirozin kinaz tedavisine radyoterapinin dahil edilmesiyle progresyonsuz sağkalım ve genel sağ kalım sürelerinin nasıl etkileneceği araştırılmıştır. Çalışmada, 5 farklı merkezden toplam 631 hastanın 3,5 yıl boyunca elde edilen verileri taranmıştır. EGFR mutasyonlu oligometastatik NSCLC hastaların bir kısmı sadece tirozin kinaz inhibitörleri olan gefitinib, erlotinib veya icotinib tedavisi görürken diğer bir kısmına bu tedavilerden önce radyoterapi uygulanmıştır. Belirlenen süre sonunda, tek başına uygulanan birinci basamak TKİ tedavisine kıyasla, öncesinde radyoterapi uygulanmış EGFR mutasyonlu oligometastatik NSCLC hastaların progresyonsuz sağkalımlarının ve genel sağ kalımlarının iyileştiği tespit edilmiştir (Wang vd., 2022).

Ma ve arkadaşlarının 2015 yılında yapmış olduğu bir çalışmada, doğal tip EGFR'li NSCLC hastalarının ikinci basamak tedavisinde tirozin kinaz inhibitörleri genel sağkalım süreleri açısından bir kemoterapi ilacı olan docetaxel ile kıyaslanmıştır. Çalışma, 2003-2013 yılları arasında Montreal'de bulunan bir sağlık merkezinde tedavi edilen 145 hastayı içermektedir. Hastalara, ikinci ve üçüncü basamak TKİ tedavisi olarak erlotinib veya gefitinib verilmiştir. Kontrol grubu olarak hastaların bir kısmına da ikinci basamak tedavi olarak docetaxel verilmiştir. Çalışma sonuçları, genel sağkalım, progresyonsuz sağkalım, olaysız sağkalım süreleri bakımından karşılaştırıldığında ikinci basamak-TKİ tedavisinin docetaxel ile yürütülen tedaviden geri kalmadığını göstermiştir. İkinci basamak TKİ grubunda, progresyonsuz sağkalım ve olaysız sağkalım sürelerinin istatistiksel olarak önemli derecede daha iyi olduğu, farkları istatistiksel olarak anlamlı olmasa da genel sağkalım sürelerinin daha iyi olduğu gözlenmiştir (Ma vd., 2015).

Shi vd (2019) tarafından, hastalığı birinci veya ikinci kuşak EGFR tirozin kinaz inhibitör tedavisinden sonra ilerlemiş olan, EGFR T790M mutasyonlu ve ilerlemiş küçük

hücreli olmayan akciğer kanseri hastalarında alflutinibin güvenliği, etkililiği ve farmakokinetiği değerlendirilmiştir. Toplam 130 hasta (doz artırmada 14, doz genişletmede 116) alflutinib tedavisi (günde bir kez 20 mg, 40 mg, 80 mg, 160 mg veya 240 mg) almıştır. Çalışmaya ilerleyen zamanlarda, 79 hasta (% 61) ile devam edilmiştir. Doz artırma çalışmasında doz sınırlayıcı toksisite gözlenmemiştir. Doz genişletme çalışmasında (40-240 mg), genel yanıt oranının % 76.7 ve merkezi sinir sistemi metastazı olan hastalarda ise % 70.6 olduğu belirlenmiştir. Tüm hastaların % 79'unda tedaviyle ilişkili olduğu muhtemel yan etkiler oluşmuştur (% 8'inde 3. derece veya daha yüksek yan etkiler gözlenmiştir). Hastaların % 15'inde ciddi yan etkiler bildirilmiş ve iki ciddi yan etkinin tedaviyle ilişkili olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, alflutinibin, EGFR T790M mutasyonu olan ileri evre küçük hücreli olmayan akciğer kanserli (merkezi sinir sistemi metastazı olanlar dahil) hastalarda kabul edilebilir bir toksisite profiliyle klinik olarak etkili olduğu ve ileri evre çalışmaların devam ettiği belirtilmiştir. Bu çalışmaların, T790M mutasyonlu ilerlemiş veya metastatik küçük hücreli olmayan akciğer kanser hastalarında alflutinibin etkililiğini ve güvenliğini değerlendirmek için bir faz IIb çalışması (NCT 03452592) ve alflutinibi gefitinib ile karşılaştırmak için de randomize faz III çalışmasının (FLAG, NCT03787992) sürdürüldüğü belirtilmiştir (Shi vd., 2019).

Lin vd (2020) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, ibrutinibin EGFR'deki sinyal oluşumunu geri dönüşümsüz şekilde inaktive ettiği, hem sorafenibe duyarlı hem de dirençli hepatoselüler kanser hücresi üzerinde antitümörük etkiler sergilediği gösterilmiştir. Ayrıca, ibrutinibin, bağışıklık hücrelerindeki BTK tirozin kinazı inaktive ederek, tümörün mikro ortamını da düzenlediği belirtilmiştir. Kinaz alanına yönelik klinik olarak onaylanmış diğer EGFR inhibitörlerinden farklı olarak, ibrutinib, hem doğal tip hem de kinaz mutant EGFR'yi geri döndürülemez şekilde inaktive etmektedir. İbrutinib ve sorafenib kombinasyon terapisi, NSG (NOD scid Il2rg) farelerinde oldukça agresif hepatoselüler karsinom (HCC) hücrelerinin sağ kalımını ve sorafenibe dirençli HCCLM3 hücrelerinin sağ kalımını inhibe ettiği gözlenmiştir. Bu kombinasyon uygulaması, farelerde kayda değer sistemik toksisiteye neden olmadan her bir ilacın tek başına uygulanan dozundan çok daha düşük bir dozda gerçekleştirilmiştir (Lin vd., 2020).

Xu vd (2023), osimertinibe karşı direnç göstermiş C797S-EGFR mutasyonlu NSCLC hastalarının tedavisi için yeni nesil EGFR-TKİ'lerin tasarlanması sırasındaki farmakokimyasal süreçler ve stratejiler incelenmiştir. Çalışmada, hastalara 10 ay boyunca uygulanan osimertinibe karşı direnç oluştuğu ve direnç oluşan hastaların yaklaşık %40'ının

EGFR’de meydana gelen ve sistein 797 kalıntısının olmadığı C797S mutasyonuna sahip olduğu belirtilmiştir. Bu mutasyon, üçüncü nesil EGFR-TKİ’lerin akrilamid başlığının EGFR mutantlarıyla kovalent bağ oluşturmaya engel olmuştur. Bu nedenle yeni nesil EGFR-TKİ’lerin tasarımına ihtiyaç duyulmuştur. Bu kapsamda söz konusu çalışma ile EGFR mutantlarını hedef alan yeni inhibitörleri belirlemeye yönelik ilaç tasarım yöntemlerinden mevcut küçük molekülü ilaçların modifikasyonu, bilinen doğal ürünlerin taranması ve kimeraları hedefleyen proteolitik hedefleme (PROTAC) yöntemiyle yeni moleküllerinin tasarımı ele alınmıştır. Küçük molekülü inhibitörler olarak brigatinib türevleri, EAI045 türevleri, osimertinib türevleri, 2-aril-4-aminokinazolin türevleri, 2-amin-pirimidin türevleri, 4-amin-primidin türevleri, 2-okzo-3,4-dihidropirimido [4,5-d] pirimidinler ve kinolin türevleri değerlendirilmiş olup doğal EGFR inhibitörleri olarak lamellarin N ve lamellarin 14 ele alınmıştır. Ayrıca, EGFR mutasyonlarıyla mücadele edebilmek için brigatinibin vorinostat ve kuersetin ile kombinasyon etkinliği değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, çalışmada değerlendirilen moleküllerin üçüncü nesil inhibitörlere direnç gösteren C797S mutantına karşı daha etkili oldukları tespit edilmiştir (Xu vd., 2023).

Roskoski Jr (2023), derleme çalışmasında, FDA tarafından 2023 yılına kadar onaylanmış olan küçük molekülü protein kinaz inhibitörlerinin fizikokimyasal özelliklerinin yanısıra etkili oldukları hastalık türleri, dahil oldukları çeşitli protein kinaz inhibitör sınıfları, öncelikli hedefleri, onaylandıkları tarihler ve ticari bilgileri incelemiştir. Çalışmada, tasarlanan ilaçlardan öncelikli hedef olarak EGFR’ye yönelik kullanılmak üzere onaylananların afatinib (2013), dacomitinib (2018), erlotinib (2004), gefitinib (2003), lapatinib (2007), mobocertinib (2021), neratinib (2017) ve osimertinib (2015) inhibitörleri olduğu belirtilmiştir. Bu ilaçların çoğunluğu küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) türlerinin tedavisinde kullanılırken, lapatinib ve neratinib HER2-pozitif meme kanseri tedavisinde kullanılmaktadır. Erlotinib ise hem NSCLC hem de pankreas kanseri tedavisinde kullanılmaktadır (Roskoski Jr., 2023).

Çelik (2020) yaptığı çalışmada, tiyosemikarbazid (1a-15a), tiyadiazol (1b-13 b) ve triazol (1c-14c) türevleri olan toplam 38 adet benzimidazol bileşikleri sentezlenip, bu bileşiklerin docking çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Docking skoru yüksek çıkan bazı moleküllerin ise EGFR kinaz inhibitör özellikleri ortaya konulmuş ve çıkan sonuçlar kontrol molekülü olan erlotinib inhibitör özellikleriyle karşılaştırılmıştır. Docking çalışması sonucunda glide docking etkileşim enerjileri $-7 <$ olan 5a, 10a, 12a ve 15a kodlu

tiyosemikarbazid bileşiklerinin EGFR ile iyi etkileşebileceklerine karar verilmesi nedeniyle bu bileşiklerin EGFR inhibitör özellikleri *in vitro* ADP-Glo yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Erlotinibin, EGFR aktivitesi üzerine %96,9 inhibisyon etkisi gösterdiği 10 μ M'lık konsantrasyonda 5a, 10a, 12a ve 15a bileşiklerinin sırasıyla %20,9, %2,9, %68,1 ve %7,6 inhibisyon etkisi gösterdiği saptanmıştır. Bu sonuçlara göre erlotinibe en yakın etki gösteren bileşiğin 12a kod numaralı tiyosemikarbazid türevi bileşiği olduğu anlaşılrken, docking çalışmalarına göre beklenenden düşük inhibisyon etkisi gösteren 5a, 10a ve 12a tiyosemikarbazid bileşiklerinin Lipinski kuralı ve diğer kriterler bakımından uygun olmadığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, reseptörle etkileşimleri teorik olarak güçlü olsa da büyük hacimli benziloksi gruplarının bileşiklerin fizikokimyasal özelliklerini olumsuz etkilediği için düşük aktivite gösterdikleri kanısına varılmıştır (Çelik, 2020).

Celik vd (2023) tarafından yapılan çalışmada, di-tiyosemikarbazit ve di-triazol (1,2,4-triazol) moleküllerini içeren yeni benzimidazol bileşikleri sentezlenip EGFR kinaz inhibisyon testi yapılarak inhibisyon özellikleri belirlenmiş, ADME özellikleri hesaplanmış, moleküler yerleştirme çalışmaları yapılarak yerleştirme skoru ve bağlanma enerjisi belirlenmiştir. Çalışmayla birlikte, sentezlenen bileşiklerin EGFR kinaz inhibitör aktiviteleri *in vitro* testle belirlenerek erlotinib ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada, erlotinibin EGFR aktivitesinde %88 oranında inhibisyon etkisi sağlarken, benzimidazol bileşiklerinin %3,7 ile %13,8 arasında değişen oranlarda EGFR kinaz enzim inhibisyon etkisi gösterdiği belirtilmiştir. Çalışmada, benzimidazol bileşiklerinin erlotinibten daha az etkili olduğu tespit edilmiş, triazol türevi bileşiklerin ise EGFR kinaz aktivitesi üzerine tiyosemikarbazid türevi bileşiklerden daha iyi bir inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir. Bileşiklerdeki halka oluşumu aktivitenin artmasına neden olmakta ve küçük alkil yan zinciri içeren tiyosemikarbazid türevleri, piperidinoetil ve morfolinoetil grupları içeren triazol türevlerinden daha yüksek aktivite göstermektedir. Hem triazol hem de tiyosemikarbazid türevleri arasında en yüksek etki, n-propil zinciri taşıyan R gruplarına sahip olanlarda gözlenmiştir. Ayrıca, bu çalışmada Maestro sürüm 10.5 yazılımı kullanılarak moleküler yerleştirme çalışmaları yapılmıştır. Yerleştirmeyi doğrulamak için erlotinib molekülü kullanılarak doğru tahminler yapıp yapmadığı araştırılmıştır. 1M17'deki ligand-protein kompleksinin erlotinib ligandı, yeniden kenetlenme sonucunda elde edilen ve aynı protein-ligand etkileşimlerinden elde edilen erlotinibin tahmini pozunu ile örtüştüğü görülmüştür. Docking çalışmalarına göre ise en aktif bileşiğin ve en düşük bağlanma enerjisine sahip olan molekülün triazol türevlerinden olan 6b molekülü olduğu belirlenmiştir. Bilgisayarlı

hesaplamalar, sentezlenen moleküllerin ADME özelliklerinin uygun olduğunu göstermiştir (Celik vd., 2023).

Banerji vd (2018), yaptığı araştırmada, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) tirozin kinazı hedefleyen bir dizi triazol-kinazolin hibrid bileşiği tasarlanmış ve sentezlenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin çoğu, dört kanser hücre hattına (HepG2, HCT116, MCF-7 ve PC-3) karşı orta ila iyi derecede çoğalma önleyici aktivite göstermiştir. Moleküler docking sonuçları, 5b bileşiğinin Met 769 ve Lys 721 ile hidrojen bağı oluşturduğunu ve EGFR tirozin kinazın Met 742'si ile π – kükürt etkileşimini (PDB ID: 1M17) oluşturduğunu göstermiştir (Banerji vd., 2018).

1.8. Triazol Bileşiklerinin Kanser Tedavisinde Kullanımı

Timör gelişimindeki kritik önemlerinden dolayı EGFR'yi hedef alan birçok antikör ve küçük moleküllü inhibitör 30 yılı aşkın süredir geliştirilmektedir (El-Sherief vd., 2018a). İnhibitörlerin bir kısmından yukarıda bahsedilmiştir. Bunlara ek olarak, yoğun biyolojik aktivite gösteren azot içeren heterosiklik moleküllerden olan triazol bileşikleri ve türevleri birçok sektörün yanı sıra sağlık sektöründe de kullanılmaktadır. Triazol bileşiklerin başta antikanser olmak üzere antifungal, anti-HIV, antimikrobiyal, antiviral, antidepresan, antiinflamatuvar, analjezik, ve diüretik gibi çok kapsamlı aktif biyolojik özellikleri vardır (Timür, 2018). Bu nedenle, literatürde bazı aromatik ve heterohalkalı yapılar içeren hidrazit türevlerinden yola çıkılarak aralarında N-açilhidrazon, hidrazin, tiyosemikarbazit ve 1,2,4-triazol-3-tion türevlerinin de bulunduğu bir çok heterohalkalı bileşik sentezlenmiştir (Lukasz, 2017). N-açilhidrazonlar (hidrazid-hidrazon türevleri), -CONHN=CH- aktif fonksiyonel grubu içeren yapılar olup tiyosemikarbazit (TSK) ve semikarbazid (SC) türevleri, -CONHNHCXNHR (X=O/S) fonksiyonel grubu içeren, diğer adıyla hidrazinkarbo(tiy)amidler, genel olarak hidrazitlerin iso(tiy)siyanatlar ile reaksiyonlardan elde edilirler (Singhal, 2013). Triazol molekülleri, sentetik yapıları ve biyolojik etkinlikleri dolayısıyla, ilaç kimyası çalışmalarında, pek çok araştırma grubunun yoğun ilgisini çekmekte ve önemli ilaç adayları sınıfına dahil edilmektedir (El-Sherief vd., 2018a).

Üç azot atomu içeren beş üyeli, halkalı bir bileşik olan triazol molekülü “triazasiklopentadien” olarak da adlandırılır. 1885’de ilk olarak Bladin, karbon-azot halka sistemi ($C_2N_3H_3$), triazol olarak adlandırmış ve triazollerin türevlerini tanımlamıştır

(Shineine ve Alaraji, 2013). Hetero atomların halkada bulundukları konuma göre triazol izomer halkaları, 1,3,4- (simetrik, sim-triazol) 1,2,4- (asimetrik, asim-triazol) ve 1,2,3- (visinal triazol) olarak üç farklı şekilde adlandırılır. Heterosiklik halka yapısına sahip moleküller, doğada yaygın bir şekilde bulunur. Ancak, sentetik olmayan triazol halka içeren bir molekül henüz tespit edilememiştir (Timür, 2018).

1,2,3-triazol halkası içeren bileşikler, ilaç kimyasında önemli bir heterosiklik olarak kullanılmaktadır. 1,2,3-triazol ve onun türevleri, kanser hastalığının gelişiminde etkisi olan EGFR, VEGFR, PARP gibi farklı enzimler üzerinde gösterdikleri inhibisyon etkisiyle, potansiyel antikanser molekül özelliği gösterir (Alam, 2022).

Yapılan çalışmalar sonucunda 1,2,4-triazol halkası içeren bileşiklerin antikanser, antikonvülsan ve antidepresan, anti-inflamatuar, analjezik, antioksidan, antitüberküler ve antimikrobiyal aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Triazol bileşiklerden 1,2,4-triazol halkalı bileşikler, çok geniş bir alanda biyolojik aktivite gösterdikleri için bu moleküllerin sentezi, karakterizasyonu ve biyolojik aktivitelerinin belirlenmesine yönelik çalışmaların sayısı her geçen gün artmaktadır (Parlak vd.,2018). 1,2,4-Triazol halkası içeren ilaçlardan olan vorozole, letrozol ve anastrozol kanser tedavisinde kullanılan steroidal ilaçlara örnek olarak verilebilir (Koçak ve Akdemir, 2020).

Literatürde, değişik substitue gruplar içeren (tiyo)semikarbazit türevi bileşiklerin farklı farmakolojik özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir. 3- klorobenzhidrazit bileşiği kullanılarak, bunun 4-bromo fenil izosiyanat ve 4-iyodo fenil izosiyanat ile reaksiyonundan 21 (a,b) bileşikleri elde edilmiş ve bu bileşiklerin *B. cereus* ATCC 10876'a karşı ampicillinden daha aktif olduğu tespit edilmiştir (Plech, 2011). Bir başka çalışmada, 4-florobenzhidrazidin 2-kloroetil izosiyanat ve etil izosiyanat ile reaksiyonundan elde edilen 22a ve 22b bileşiklerinin iyi derecede sitotoksik aktivite gösterdiği ifade edilmiştir (El- Sadek, 2007). Diğer bir çalışmada ise 4-floro-3-fenoksifenil ve 2,4-dikloro-5-florofenil içeren 1,2,4- triazol[3,4-b]tiyadiazol ve 1,3,4-okzadiazol türevlerinden bazılarının lösemi, kolon kanseri, akciğer kanseri, renal kanser, prostat kanseri ve meme kanserinde yüksek düzeyde antikanser özellik gösterdikleri bildirilmiştir. 1,2,4,-triazol türevleri, özellikle, lösemi, yumurtalık ve renal kanserlerinde etkili olduğu belirtilmiştir (Koçak ve Akdemir, 2020).

Al-Soud ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, sentezlemiş oldukları bazı 1,2,4- triazol bileşiklerinin (8c, 10b, 19c, 13a, 13c, 15) bazı kanser türlerine (lösemi, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, kolon kanseri, merkezi sinir sistemi kanseri, melanoma,

yumurtalık kanseri, böbrek kanseri, prostat kanseri, meme kanseri) karşı antitümör özellikleri araştırılmıştır. Sonuç olarak priazol-piridin substitüenti taşıyan, N-1-benzotriazol molekülü (8c) belirli tümör hücre hatlarına karşı iyi bir aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca 8c molekülü ile antineoplastik ajan olarak bilinen melphalanın antitümör aktivitesi karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, melphalanın GI_{50} değeri 27,1 μM olarak hesaplanırken, 8c molekülünün GI_{50} değeri ise 31,0 μM olarak hesaplanmıştır. Bu değerlerden yola çıkarak, ikisinin de hemen hemen aynı aktivite gösterdiği kanısına varılmıştır. Ancak melphalan molekülünün daha seçici antitümör ajan etkisi gösterdiği belirlenmiştir (Al-Soud vd., 2003).

1.9. Çalışmanın Amacı

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), ErbB reseptör tirozin kinaz ailesine aittir ve bu proteinin inhibisyonu, meme kanseri ve baş ve boyun yassı hücreli karsinom gibi birçok kanser tedavisinde yeni bir yaklaşım şekli olmuştur. Bu nedenle EGFR, antikanser tedavisi için çekici bir hedeftir ve çok sayıda EGFR tirozin kinaz inhibitörü (TKİ'ler) geliştirilmeye devam etmektedir.

Triazol türevi moleküller, klinik uygulamada olan çok sayıda antikanser ilacında kullanılmasına ve halen klinik veya prelinik çalışmaları yapılan önemli bir grup olmasına rağmen, tez çalışmasına başlanıldığı tarihlerde bu moleküllerin EGFR üzerindeki etkileri henüz ayrıntılı olarak ortaya konulmadığı tespit edilmiştir.

Yaptığımız bu tez çalışmamızla, 118Z187 nolu TÜBİTAK projesi kapsamında sentezlenen yeni 1,2,4-triazol türevlerinin hedef protein üzerindeki inhibe edici aktiviteleri ve ayrıca seçilen hücre hatlarında *in vitro* ortamdaki sitotoksik aktiviteleri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar gerçekleştirilen *in silico* çalışmalarla da desteklenmiştir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Çalışmada Kullanılan Bileşikler

hEGFR, ATP-2Na, potasyum fosfat dibazik, potasyum fosfat monobazik, tween 20 ve **gefitinib** Sigma ve Merck firmalarından temin edilmiştir. ELISA kit ve Wash and stop solution for ELISA without sulfuric acid 5*96 rxn TAKARA firmasından alınmıştır. Sitotoksik çalışmalar Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü deneylerinde kullanılan insan akciğer karsinom hücre hattı A549, insan küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hattı NCI-H358, sağlıklı kontrol hücre grubu olarak kullanılan sağlıklı akciğer hücre hattı WI-38 ve ayrıca over kanseri hücre hattı SKOV-3 ve OVCAR-3 ATCC'den (American Type Culture Collection) temin edilmiştir. RPMI 1640, DMEM, 3-(4,5-dimetil tiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) ise Amresco'dan temin edilmiştir.

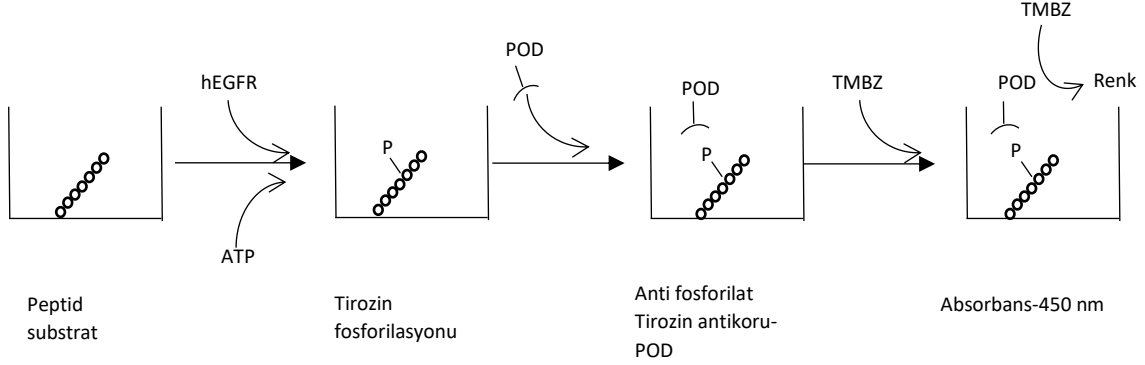
2.2. Enzim İnhibisyon Çalışmaları

2.2.1. Enzim Aktivitesi

Enzim aktivite ölçümleri TAKARA Universal Tyrosine Kinase Assay Kit ve Wash and Stop Solution for ELISA Without Sulfuric Acid kullanılarak gerçekleştirildi. EGFR aktivitesinin ve inhibisyonunun ölçümünde ELISA metodunun kullanıldığı, elde edilen sonuçların radyoaktif yöntemlerle ve farklı kitlerle kıyaslanabilir ve güvenilir olduğu literatürde belirtilmektedir (Ma vd., 2016; Varkondi vd., 2005; Abou-Seri, 2010). Çalışmada kullanılan enzim (EGFR active human), ticari olarak temin edilmiştir.

Aktivite işlemleri esnasında genel olarak kit prosedürüne bağlı kalınmış ancak çalışmaya başlamadan önce enzimin, kullanılan kitle aktivite gösterip göstermeyeceğinin belirlenmesi amacıyla optimum protein ve substrat konsantrasyonu açısından karakterize edilmesi işlemi gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu çalışmalardan elde edilen verilerle kullanılan enzimin V_{maks} ve K_m değerleri hesaplanmıştır. Bunun sonucunda aktivite çalışmalarında kullanılan kit, enzim ve ATP konsantrasyonu açısından kısmen modifiye

edilmiştir. Enzim aktivitesinin belirlenmesi amacıyla kullanılan ELISA yöntemi Şekil 5’de belirtilen prensibe dayanmaktadır.



Şekil 5. PTK aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan ELISA reaksiyonu

Bu amaçla, enzim aktivite reaksiyonu daha önceden yüzeyi kaplanmış (pre-coating) 96-kuyucuklu plate üzerinde gerçekleştirildi. Aktivitenin belirlenebilmesi için plate üzerindeki her bir kuyuya 40 μ L seyreltilmiş enzim örneği eklendi. Akabinde, her bir kuyucuğa 10 μ L ATP-2Na çözeltisinden ilave edildi ve 37 °C’de 30 dk. inkübe edildi. ATP çözeltisinin eklenmesi tirozinin fosforillenmesi işlemini başlatmaktadır. Sonrasında solüsyon kuyucuktan uzaklaştırıldı ve kuyucuklar kit içeriğinde yer alan yıkama tamponuyla (% 0.05 (v/v) Tween 20 içermektedir) 4 defa yıkandı. Bu işlemi takiben 100 μ L bloklama çözeltisi (kit içerisinde yer almaktadır) eklenerek 37 °C’de 30 dk. inkübe edildi. Blokaj çözeltisi uzaklaştırılarak kuyucuklar yıkama tamponuyla tekrar yıkandı. Yine her bir kuyucuğa 50 μ L anti-fosfotirozin (PY20-HRP) çözeltisi (bir vial liyofilize edilmiş anti-fosfotirozinin 5,5 mL distile suda çözülmesiyle hazırlanmıştır) ilave edilerek 37 °C’de 30 dk. inkübe edildi. Bu işlem sonrasında antibody çözeltisi uzaklaştırılarak kuyucuklar yıkama çözeltisiyle 4 defa yıkandı. 100 μ L HRP substrat çözeltisi (TMBZ) (kit kullanım talimatına göre kitte yer alan çözelti direkt olarak kullanılmıştır) yine her bir kuyucuğa ilave edildi. Yaklaşık 15 dk. 37 °C’de inkübe edildi. Kuyucuklara substrat çözeltisinin eklendiği sıralamada 100 μ L durdurma çözeltisi (stop solution, direkt olarak kullanılmıştır) ilave edildi. 450 nm’de aktivite ölçümü yapıldı. Bir (U) enzim, 1 dakika içinde 1 pmol fosfatın substrata (KVEKIGEGTYGVVYK: p-34’ün 6-20 kalıntısı) bağlanması için gereken miktar olarak tanımlandı (Ölgen vd., 2003).

2.2.2. Optimum Enzim Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Gerçekleştirilen optimum enzim konsantrasyonu çalışmalarında, enzimin en iyi aktivite gösterdiği protein konsantrasyonunu belirlemek amacıyla, sabit substrat konsantrasyonunda ve optimum pH ve sıcaklık değerlerinde (üretici firma tarafından belirlenen) enzim konsantrasyonu (0,0007-0,1 $\mu\text{g/mL}$) aralığında olacak şekilde aktivite ölçümleri yapıldı. Hesaplanan enzim aktiviteleri enzim konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirildi ve bundan sonraki çalışmalar bu grafikten belirlenen ve ilk hız ölçümlerinin doğru bir şekilde yapılabileceği uygun bir enzim konsantrasyonunda gerçekleştirildi.

2.2.3. Optimum Substrat Konsantrasyonunun Belirlenmesi ve Kinetik Parametrelerin Hesaplanması

Enzimin optimum substrat konsantrasyonunun ve bazı kinetik parametrelerinin belirlenmesi amacıyla, nihai konsantrasyonu 0,005-5 mM aralığında değişen ATP-2Na substratı varlığında ve sabit enzim konsantrasyonu (0,01 $\mu\text{g/mL}$), optimum pH ve sıcaklık şartları altında gerçekleştirilen reaksiyonlarda enzim aktivitesi tayin edildi. Diğer bir substrat olan poly (Glu-Tyr) (KVEKIGEGTYGVVYK: 6 - 20 residue of p34cdc2) satın alınan ticari kitte, kuyucuklarda immobilize halde olduğundan bu substratın konsantrasyonunda değişiklik yapılamadı. Elde edilen sonuçlara göre hız değerleri hesaplandı ve Lineweaver-Burk grafiği (Lineweaver ve Burk, 1934) çizilerek K_m ve V_{maks} değerleri belirlendi.

2.2.4. Enzim İnhibisyonu

Sentezlenen moleküllerin hEGFR üzerindeki inhibisyon potansiyellerini belirlemek amacıyla, moleküller DMSO ile çözüldü ve değişen konsantrasyonlarda toplam çözelti içerisindeki çözücü miktarı %3 olacak şekilde ayarlanarak (Copeland, 2005) enzimle ön inkübasyonu sağlandı. DMSO'nun enzim üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla benzer işlem yalnızca bu çözücü varlığında tekrarlandı. Sonrasında enzim aktivite tayini yukarıda belirtildiği şekliyle gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlarla her bir organik molekül için inhibitör konsantrasyonuna karşı %Bağıl Aktivite grafiği çizildi (Şekil 9-19) ve aktivitenin %50 azaldığı inhibitör konsantrasyonu IC_{50} değeri olarak belirlendi (Tablo

4). Daha sonra hesaplanan IC_{50} değerleri dikkate alınarak en düşük IC_{50} değerine sahip moleküller için inhibisyon türü incelendi. Elde edilen sonuçlardan Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibitör varlığında ve yokluğunda K_m ve V_{maks} değerleri hesaplandı. Çizilen bu grafiklerden inhibisyon türü belirlendi ve ayrıca K_i değeri matematiksel olarak hesaplandı.

2.3. ADME Çalışmaları

Moleküllerin ADME (emilim, dağılım, bozunma ve atılım) özellikleri açık erişimli veri tabanı olan <http://www.swissadme.ch/> web sayfası üzerinden SwissADME programı kullanarak hesaplandı ve bazı farmakokinetik özellikler (kan-beyin bariyerini geçebilme, gastro intestinal emilim) incelendi. Beyin veya gastrointestinal emilim tahmini geçirgenlik özelliği haşlanmış yumurta (Brain Or Intestinal Estimated Permeation-BOILED Egg) grafik yöntemi kullanılarak incelendi.

BOILED-Egg yönteminde gerçekleştirilen tahmin, iyi absorplanan ve zayıf absorplanan moleküllerin lipofilitelerine ve polaritelerine, n-oktanol/su dağılım katsayılarına ($\log P$) ve polar yüzey alanına (PSA) dayanarak yapılmaktadır. BOILED-Egg modeli kullanılarak Wildman ve Crippen tarafından geliştirilen $\log P$ değerlerine (WLOGP) karşılık topolojik polar yüzey alanı (TPSA) değerleri grafiğe geçirildi ve moleküllerin pasif insan gastrointestinal emilimi ve kan-beyin bariyer geçişine ilişkin tahminler yürütüldü. Grafikte kullanılan WLOGP, molekülün oktanol ve su arasındaki bölme katsayısının logaritmik formunu gösterirken TPSA, polar gruplar tarafından kaplanan yüzeyin hesaplanmış alanı olarak değerlendirilir. Modele göre, beyaz eliptik alan içerisindeki moleküller, gastrointestinal sistem tarafından en yüksek pasif emilim olasılığı olan maddeleri gösterir. Sarı renkli yuvarlak alan, kan beyin bariyer geçirlik özelliğine sahip molekülleri gösterir Gri alan ise gastrointestinal emilimin ve kan-beyin bariyer geçişinin kısıtlı olduğunu ifade eder. Mavi renkli nokta (PGP+), aktif olarak dışa aktığını, kırmızı nokta (PGP-) ise bu durumun tersini ifade eder.

SwissADME çalışmaları sonucunda ayrıca, bir molekülün ilaca benzerliğinin değerlendirildiği SwissADME grafiği olan biyoyararlanım radar grafikleri elde edildi (Şekil 24). Grafik elde edilirken lipofiliklik, boyut, polarite, çözünürlük, esneklik ve doyumluk gibi moleküllere ait altı fizikokimyasal değerler kullanıldı. Her ekseninde bir

fizikokimyasal referans aralık tanımlandı ve bir dizi optimal değer pembe bir alan olarak gösterildi.

2.4. *In Vitro* Sitotoksisite Çalışmaları

Tez çalışmaları kapsamında, yapılan inhibisyon çalışmaları sonucunda en iyi inhibisyon aktivitesine sahip 9, 27, 30 ve 31 molekülleri *in vitro* sitotoksisite çalışmaları yapıldı.

Hücre kültürü deneylerinde kullanılan insan akciğer karsinoma hücre hattı A549, insan küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hattı NCI-H358, sağlıklı kontrol hücre grubu olarak kullanılan sağlıklı akciğer hücre hattı WI-38 ve ayrıca over kanseri hücre hattı SKOV-3 ve OVCAR-3 ATCC'den (American Type Culture Collection) temin edilmiştir. RPMI 1640, DMEM, 3-(4,5-dimetil tiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) ise Amresco'dan temin edildirmiştir.

2.4.1. Maddelerin Hazırlanması

Gefitinib inhibitörünün *in vitro* sitotoksisite analizi için 4 μ M ana stok ve 9, 27, 30 ve 31 numaralı moleküllerin *in vitro* sitotoksisite analizi için 320 μ M ana stok çözelti hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltiler 100 kata kadar besiyeri ile seyreltildi.

2.4.2. Hücrelerin Çoğaltılması

A549 ve WI-38 hücre hatları için DMEM besiyeri, NCI-H358 ve OVCAR-3 hücre hatları için RPMI besiyeri, SKOV-3 hücre hattı için ise Mc Coy's 5A besiyeri kullanıldı. Hücreler 37 °C, %5 CO₂ ve %95 nem içeren steril hücre kültür etüvünde (Thermo Electron Corporation's Class 100) inkübe edildi. Hücrelerin canlılığı, çoğalması inverted mikroskop kullanılarak düzenli olarak takip edildi. Hücre canlılığının kontrolü tripan mavisi boyama yöntemi ile yapıldı. Kültür kabı %80 doluluk oranına ulaştığında hücreler tripsin-EDTA ile kaldırılıp pasajlama ve stoklama işlemleri gerçekleştirildi.

2.4.3. Sitotoksikite Testleri

Canlılık testi için mitokondriyal enzim aktivitesine bağlı ölçüm imkanı sağlayan MTT testi uygulandı. MTT testi için hücreler yeterli sayıya ulaştıktan sonra 96 kuyucuklu plakalara, kuyucuk başına 5000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Hücreler 24 saat boyunca inkübe edilerek yüzeye yapışmaları sağlandı. Süre sonunda hücrelerin üst fazları (100 μ L) alındı. A549, NCI-H358, SKOV-3 ve OVCAR-3 hücre hattı için tüm kuyucuklara kendi besiyerleri ile 0,16; 0,08; 0,04; 0,02; 0,01 μ M konsantrasyonlarına seyreltilen gefitinib ve 12,8; 6,4; 3,2; 1,6; 0,8 μ M konsantrasyonlarına seyreltilen 9, 27, 30 ve 31 numaralı moleküller 100 μ L olacak şekilde eklendi. WI-38 hücre hattı için tüm kuyucuklara kendi besiyerleri ile 0,04; 0,02; 0,01; 0,005; 0,0025 μ M konsantrasyonlarına seyreltilen gefitinib ve 3,2; 1,6; 0,8; 0,4; 0,2 μ M konsantrasyonlarına seyreltilen 9, 27, 30 ve 31 numaralı moleküller 100 μ L olacak şekilde eklendi.

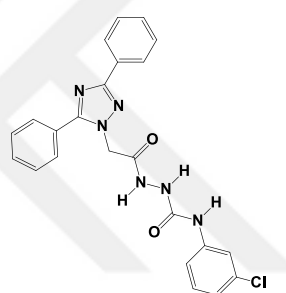
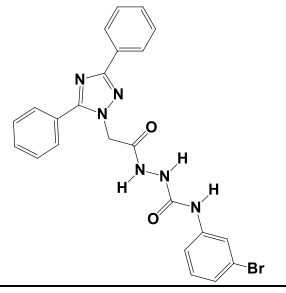
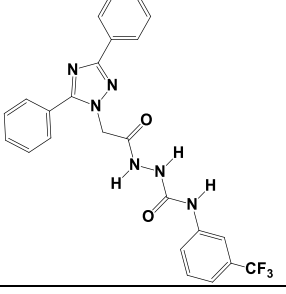
Örnek uygulamalarından sonra tüm hücreler 48 saat boyunca 37 °C, %5 CO₂ ve %95 nem içeren steril hücre kültür etüvünde inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda MTT testi için kuyucuklardan örnekler uzaklaştırılarak 5 mg/mL MTT çözeltisi (100 μ L) uygulandı. MTT ile muamele edilen hücreler 37 °C'de 4 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun ardından MTT çözeltisi uzaklaştırıldı. Canlı hücrelerdeki mitokondriyal enzim aktivitesi sonucu MTT bileşiğindeki tetrazolyum tuzunun formazon tuzuna dönüşmesi sonucu oluşan kristaller 100 μ L DMSO eklenerek çözüldü ve 540 nm'de microplate reader'da (Thermo Multiscan FC) absorbans ölçümleri yapıldı. Grapdpad v8 programı kullanılarak laboratuvar koşullarında hücre büyümesini %50 azaltan konsantrasyon değerleri (IC₅₀) belirlendi.

3. BULGULAR

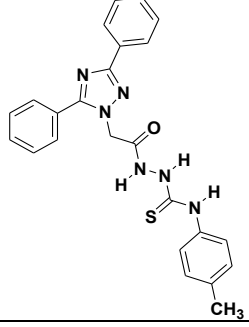
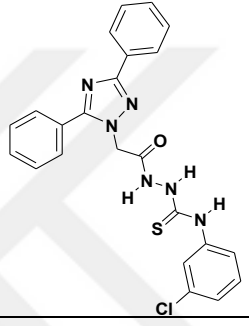
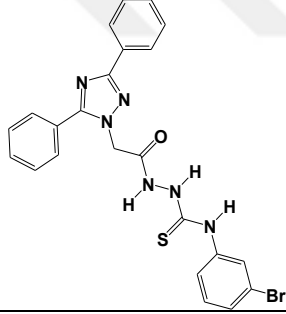
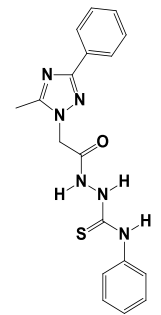
3.1. Çalışmada Kullanılan Moleküller

Enzim inhibisyon çalışmalarında kullanılan moleküllerin kodları formülleri ve adlandırılması Tablo 3'te ifade edilmiştir.

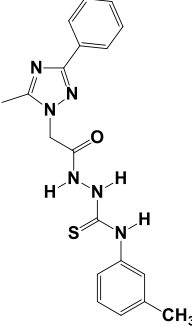
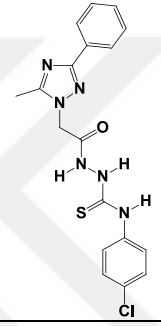
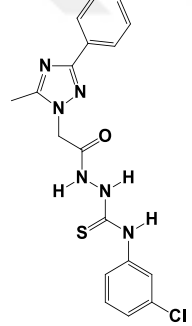
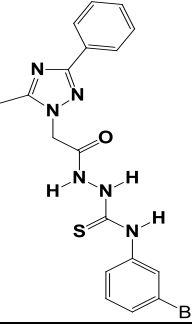
Tablo 3. Sentezlenen moleküllerin kodları, IUPAC adlandırılması ve formülleri

Molekül Kodları	Moleküllerin IUPAC Adlandırması	Formül
1	2-[3,5-difenil-1H-1,2,4-triazol-1-il)asetil]4-(3-klorofenil) semikarbazit	$C_{23}H_{19}ClN_6O_2$ 
2	2-[3,5-difenil-1H-1,2,4-triazol-1-il)asetil]4-(3-bromofenil) semikarbazit	$C_{23}H_{19}BrN_6O_2$ 
3	2-[(3,5-difenil-1H-1,2,4-triazol-1-il)asetil]4-(3-triflorofenil) semikarbazit	$C_{24}H_{19}F_3N_6O_2$ 

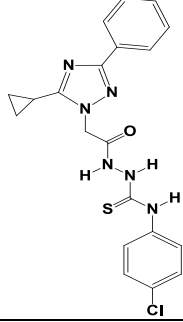
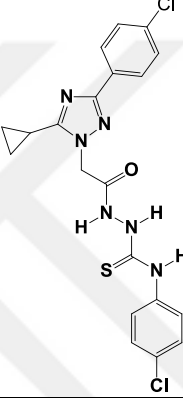
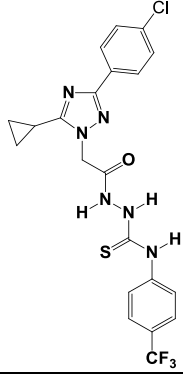
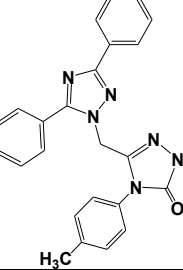
Tablo 3'ün devamı

4	2-[(3,5-difenil-1H-1,2,4-triazol-1-il)asetil]4-(4-p-tolilfenil) tiyosemikarbazit	$C_{24}H_{22}N_6OS$ 
5	2-[3,5-difenil-1H-1,2,4-triazol-1-il)asetil]4-(3-klorofenil) tiyosemikarbazit	$C_{23}H_{19}ClN_6OS$ 
6	2-[3,5-difenil-1H-1,2,4-triazol-1-il)asetil]4-(3-bromofenil) tiyosemikarbazit	$C_{23}H_{19}BrN_6OS$ 
7	2-{[5-metil-3-fenil-1H-1,2,4-triazol-1-il]asetil}4-feniltiyosemikarbazit	$C_{18}H_{18}N_6OS$ 

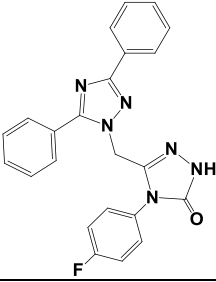
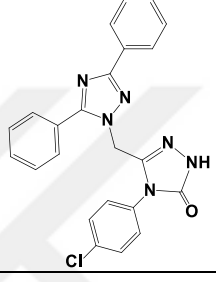
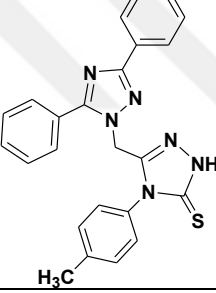
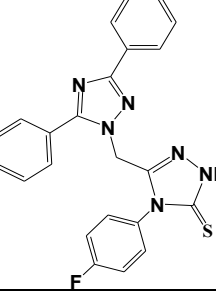
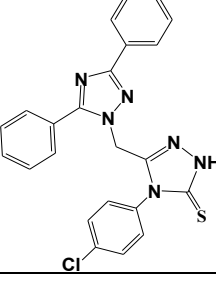
Tablo 3'ün devamı

8	2-{{5-metil-3-fenil-1H-1,2,4-triazol-1-il]asetil}-4-(m-metilfenil) tiyosemikarbazit	$C_{19}H_{20}N_6OS$ 
9	2-{{5-metil-3-fenil-1H-1,2,4-triazol-1-il]asetil}-4-(4-klorofenil) tiyosemikarbazit	$C_{18}H_{17}ClN_6OS$ 
10	2-{{5-metil-3-fenil-1H-1,2,4-triazol-1-il]asetil}-4-(m-klorofenil) tiyosemikarbazit	$C_{18}H_{17}ClN_6OS$ 
11	2-{{5-metil-3-fenil-1H-1,2,4-triazol-1-il]asetil}-4-(m-bromofenil) tiyosemikarbazit	$C_{18}H_{17}BrN_6OS$ 

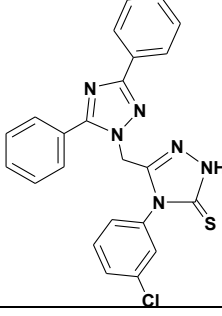
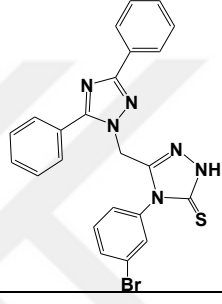
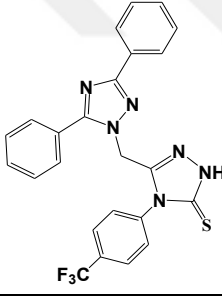
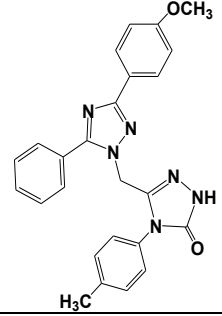
Tablo 3'ün devamı

12	2-[[5-siklopropil-3-fenil-1H-1,2,4-triazol-1-il]asetil]-4-(4-klorofenil) tiyosemikarbazit	$C_{20}H_{19}ClN_6OS$ 
13	2-[[3-(4-klorofenil)-5-siklopropil-1H-1,2,4-triazol-1-il]asetil]-4-(4-klorofenil) tiyosemikarbazit	$C_{20}H_{18}Cl_2N_6OS$ 
14	2-[[3-(4-klorofenil)-5-siklopropil-1H-1,2,4-triazol-1-il]asetil]-4-(4-triflorometilfenil) tiyosemikarbazit	$C_{21}H_{18}ClF_3N_6OS$ 
15	5-[(3,5-difenil-1H-1,2,4-triazol-1-il)metil]4-(p-tolil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-on	$C_{24}H_{20}N_6O$ 

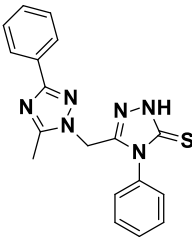
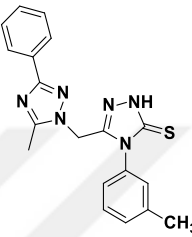
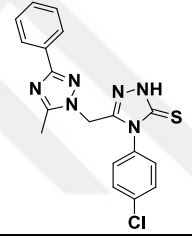
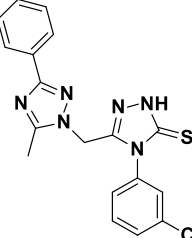
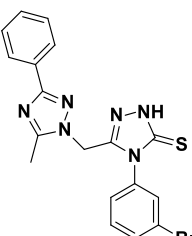
Tablo 3'ün devamı

16	5-[(3,5-difenil-1H-1,2,4-triazol-1-il)metil]4-(4-florofenil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-on	$C_{23}H_{17}FN_6O$ 
17	5-[(3,5-difenil-1H-1,2,4-triazol-1-il)metil]4-(4-klorofenil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-on	$C_{23}H_{17}ClN_6O$ 
18	5-[(3,5-difenil-1H-1,2,4-triazol-1-il)metil]4-(p-tolil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon	$C_{24}H_{20}N_6S$ 
19	5-[(3,5-difenil-1H-1,2,4-triazol-1-il)metil]4-(p-flor)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon	$C_{23}H_{17}FN_6S$ 
20	5-[(3,5-difenil-1H-1,2,4-triazol-1-il)metil]4-(p-klor)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon	$C_{23}H_{17}ClN_6S$ 

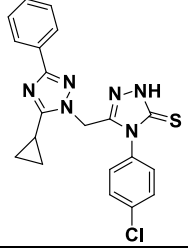
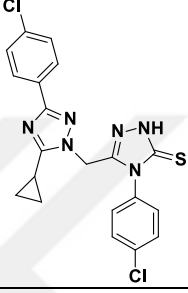
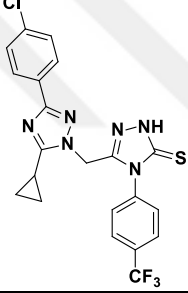
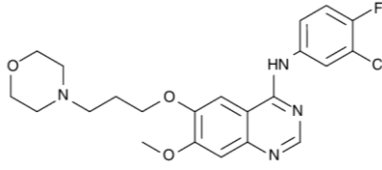
Tablo 3'ün devamı

21	5-[(3,5-difenil-1H-1,2,4-triazol-1-il)metil]4-(3-kloro)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon	$C_{23}H_{17}ClN_6S$ 
22	5-[(3,5-difenil-1H-1,2,4-triazol-1-il)metil]4-(3-bromo)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon	$C_{23}H_{17}BrN_6S$ 
23	5-[(3,5-difenil-1H-1,2,4-triazol-1-il)metil]4-(p-triflorometil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon	$C_{24}H_{17}F_3N_6S$ 
24	5-[3-(4-metoksi-fenil)-5-fenil-[1,2,4]triazol-1-ilmetil]-4-p-tolil-2,4-dihidro-[1,2,4] triazol-3-on	$C_{25}H_{22}N_6O_2$ 

Tablo 3'ün devamı

25	5- {[5-metil-3-fenil-1H-[1,2,4]triazol-1-il]metil} -4-fenil-2,4-dihidro-[1,2,4] triazol-3-tiyon	$C_{18}H_{16}N_6S$ 
26	5- {[5-metil-3-fenil-1H-[1,2,4]triazol-1-il]metil} -4-(m-metilfenil)-2,4-dihidro-[1,2,4] triazol-3-tiyon	$C_{19}H_{18}N_6S$ 
27	5- {[5-metil-3-fenil-1H-[1,2,4]triazol-1-il]metil} -4-(4-klorofenil)-2,4-dihidro-[1,2,4] triazol-3-tiyon	$C_{18}H_{15}ClN_6S$ 
28	5- {[5-metil-3-fenil-1H-[1,2,4]triazol-1-il]metil} -4-(m-klorofenil)-2,4-dihidro-[1,2,4] triazol-3-tiyon	$C_{18}H_{15}ClN_6S$ 
29	5- {[5-metil-3-fenil-1H-[1,2,4]triazol-1-il]metil} -4-(m-bromofenil)-2,4-dihidro-[1,2,4] triazol-3-tiyon	$C_{18}H_{15}BrN_6S$ 

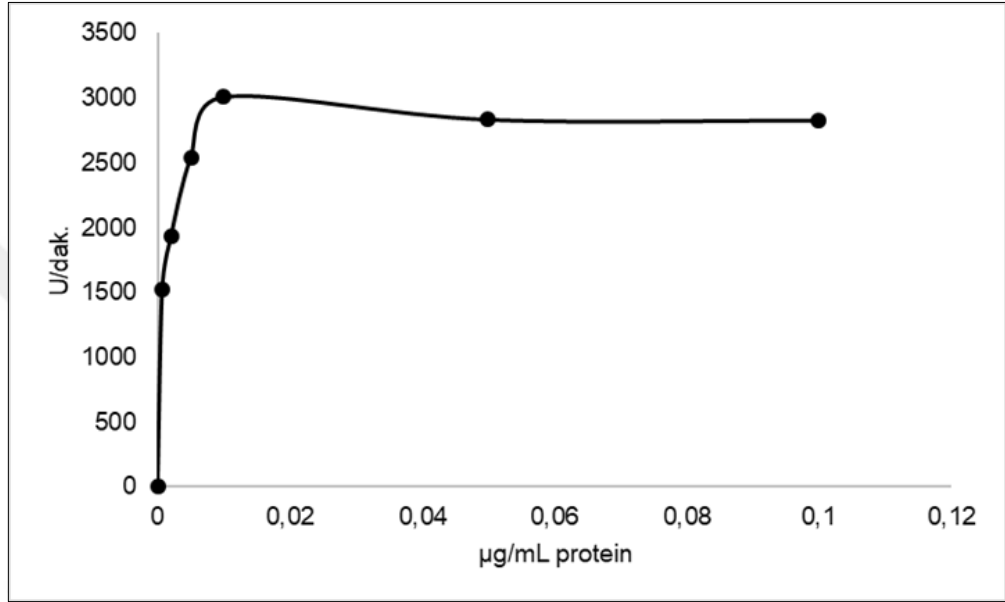
Tablo 3'ün devamı

30	5-{{5-siklopropil-3-fenil-1H-[1,2,4]triazol-1-il]metil} -4-(4-klorofenil)-2,4-dihidro-[1,2,4] triazol-3-tiyon	$C_{20}H_{17}ClN_6S$ 
31	5-{{3-(4-klorofenil)-5-siklopropil-1H-[1,2,4]triazol-1-il]metil} -4-(4-klorofenil)-2,4-dihidro-[1,2,4] triazol-3-tiyon	$C_{20}H_{16}Cl_2N_6S$ 
32	5-{{3-(4-klorofenil)-5-siklopropil-1H-[1,2,4]triazol-1-il]metil} -4-(4-triflorometilfenil)-2,4-dihidro-[1,2,4] triazol-3-tiyon	$C_{21}H_{16}ClF_3N_6S$ 
Gefitinib	N-(3kloro-4-floro-fenil)-7-metoksi-6-(3-morfolin-4-ilpropoksi)kuinazolin-4-amin	$C_{22}H_{24}ClFN_4O_3$ 

3.2. Enzim Aktivitesinin Tayini ve Optimizasyonu

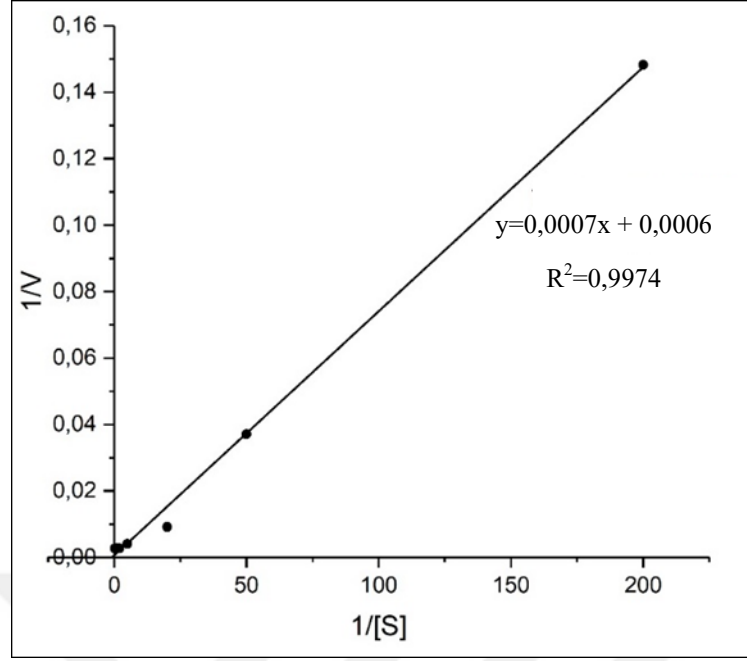
Çalışmada sentezlenen organik moleküllerin, ticari olarak satın alınan hEGFR enzimi üzerindeki inhibisyon potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla yapılan inhibisyon çalışmalarına başlamadan önce enzim aktivitesinin parametreleri olan optimum protein ve substrat konsantrasyonları belirlendi. Optimum sıcaklık ve pH değerleri ise üretici firmanın belirttiği şekliyle uygulandı.

Yapılan çalışmalar kısmında ifade edildiği şekliye gerçekleştirilen optimum enzim konsantrasyonu çalışmalarında, sabit substrat konsantrasyonunda ve optimum pH ve sıcaklık değerlerinde, enzim konsantrasyonu 0,0007-0,1 $\mu\text{g/mL}$ aralığında olacak şekilde aktivite ölçümleri yapıldı. Elde edilen hiperbolik eğriden enzimin optimum konsantrasyonu 0,01 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulundu (Şekil 6).



Şekil 6. hEGFR enzim aktivitesi üzerine protein konsantrasyonunun etkisi

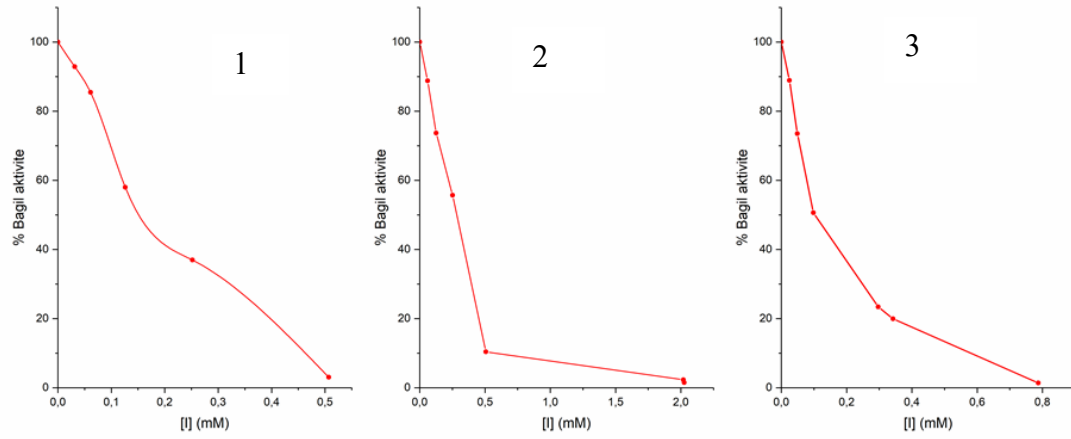
Enzimin reaksiyon şartlarında olması gereken optimum substrat konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla, nihai konsantrasyonu 0,005-5 mM aralığında değişen ATP-2Na substratı varlığında ve sabit enzim konsantrasyonu (0,01 $\mu\text{g/mL}$), optimum pH ve sıcaklık şartları altında gerçekleştirilen reaksiyonlarda enzim aktivitesi tayin edildi. Elde edilen sonuçlara göre hız değerleri hesaplandı ve Lineweaver-Burk grafiği çizilerek K_m ve V_{maks} değerleri belirlendi. Bu çalışma sonucunda, enzimin en iyi aktivite gösterdiği optimum substrat konsantrasyonu 0,5 mM olarak bulundu. K_m ve V_{maks} değerleri ise sırasıyla Lineweaver-Burk grafiğinden 1,167 mM ve 1666,6 $\mu\text{mol/dk.}$ olarak hesaplandı (Şekil 7).



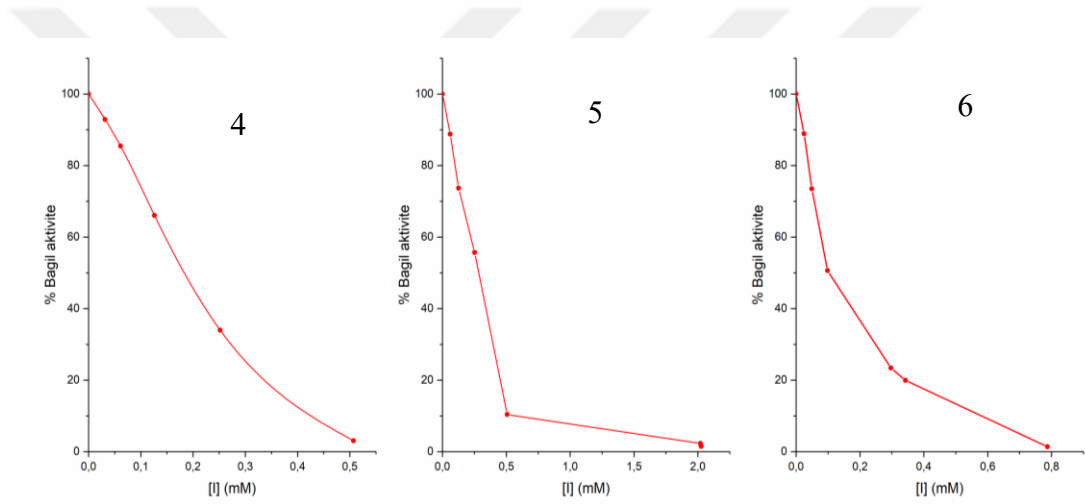
Şekil 7. ATP-2Na varlığında çizilen Lineweaver-Burk grafiği

3.3. İnhibisyon Çalışmaları

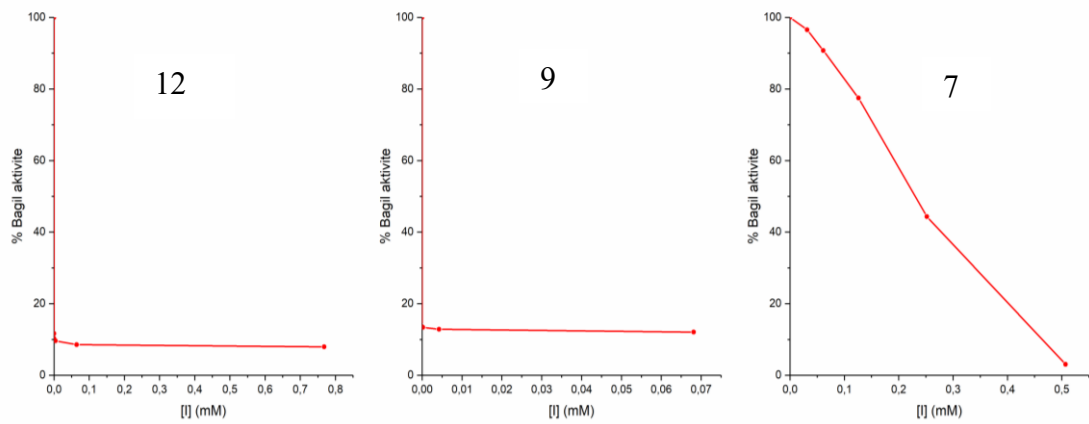
Enzim inhibisyon çalışmaları için çalışma kapsamında sentezlenen moleküller ve referans inhibitör olarak gefitinib kullanıldı. İnhibisyon çalışmaları, yapılan çalışmalar kısmında anlatıldığı şekliyle gerçekleştirildi. Her bir molekül için farklı konsantrasyon aralıklarında bir seri ölçüm yapıldı. Elde edilen sonuçlarla her bir organik molekül için inhibitör konsantrasyonuna karşı %Bağıl Aktivite grafiği çizildi (Şekil 8-18) ve aktivitenin %50 azaldığı inhibitör konsantrasyonu IC_{50} değeri olarak belirlendi (Tablo 4). Gerçekleştirilen inhibisyon çalışmaları sonucunda sentezlenen tüm bileşikler için IC_{50} değeri hesaplandı.



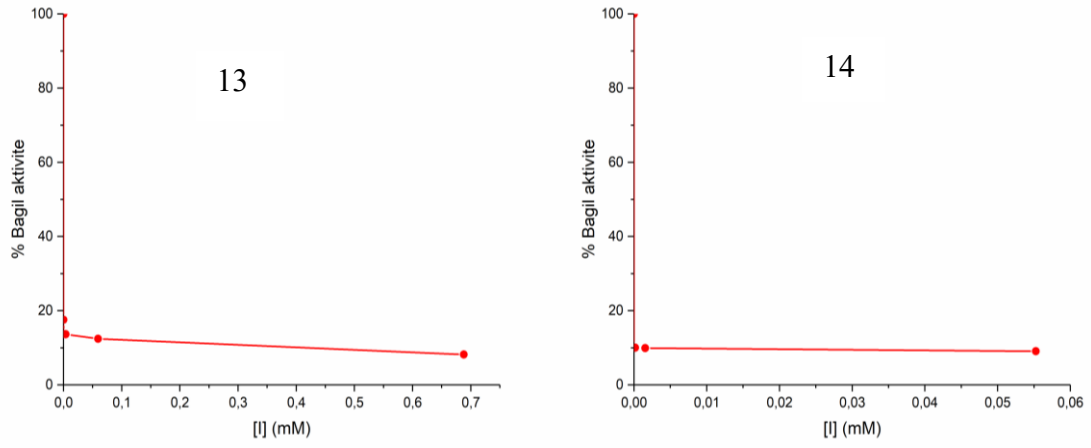
Şekil 8. 1, 2, 3 numaralı moleküllerin hEGFR aktivitesi üzerine etkisi



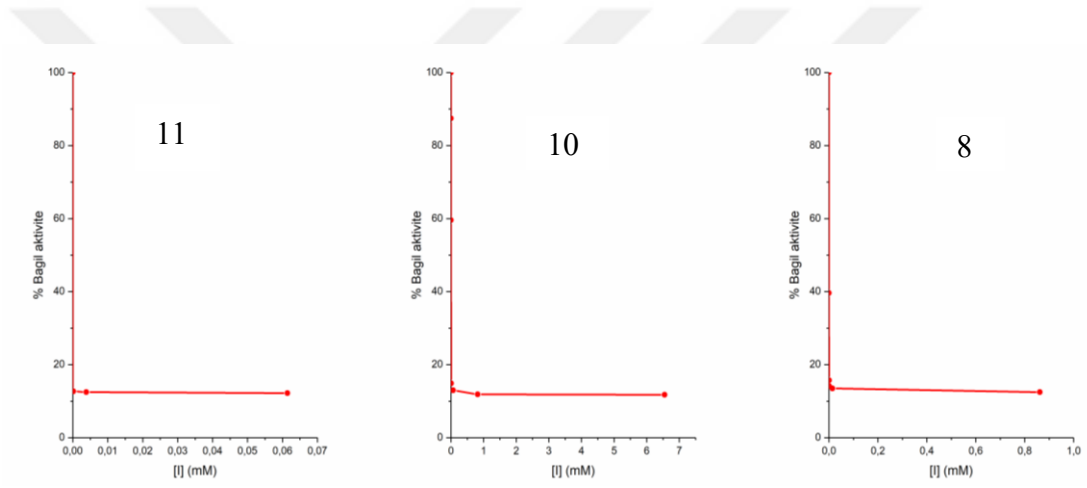
Şekil 9. 4, 5, 6 numaralı moleküllerin hEGFR aktivitesi üzerine etkisi



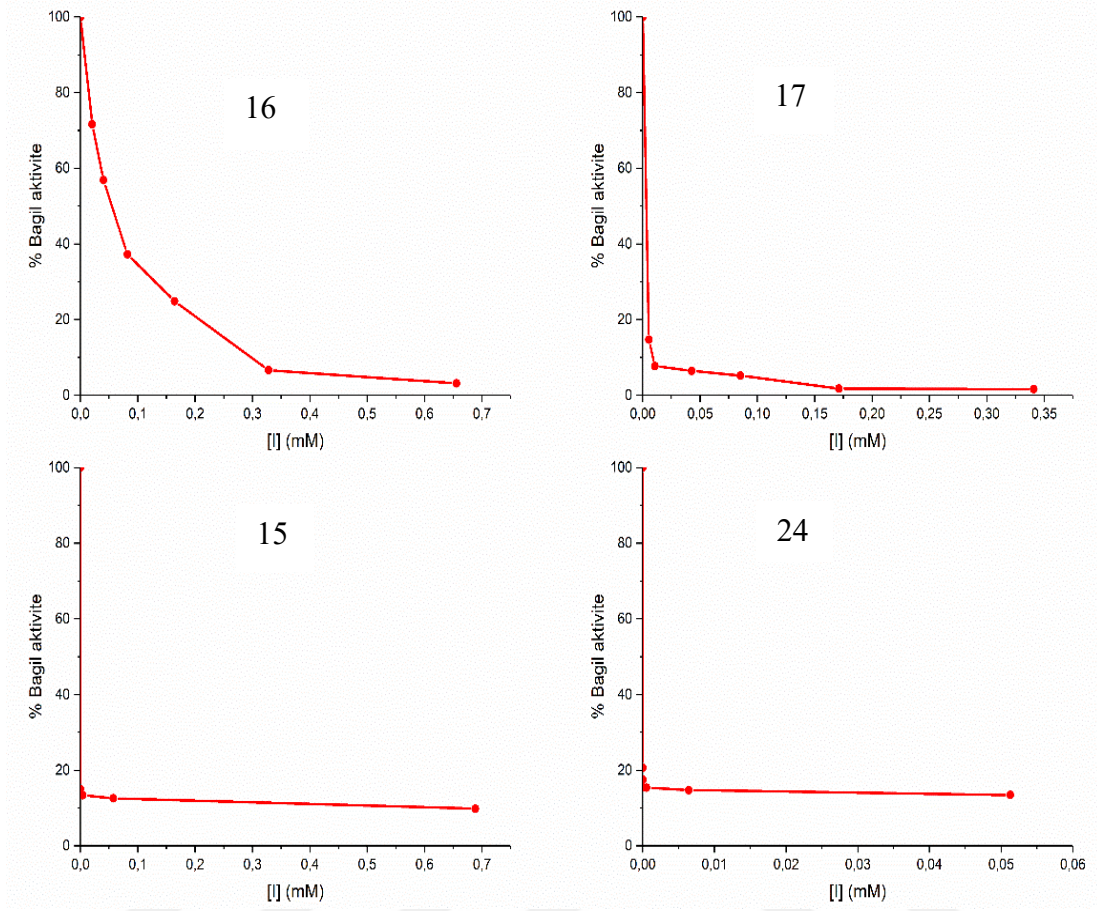
Şekil 10. 12, 9, 7 numaralı moleküllerin hEGFR aktivitesi üzerine etkisi



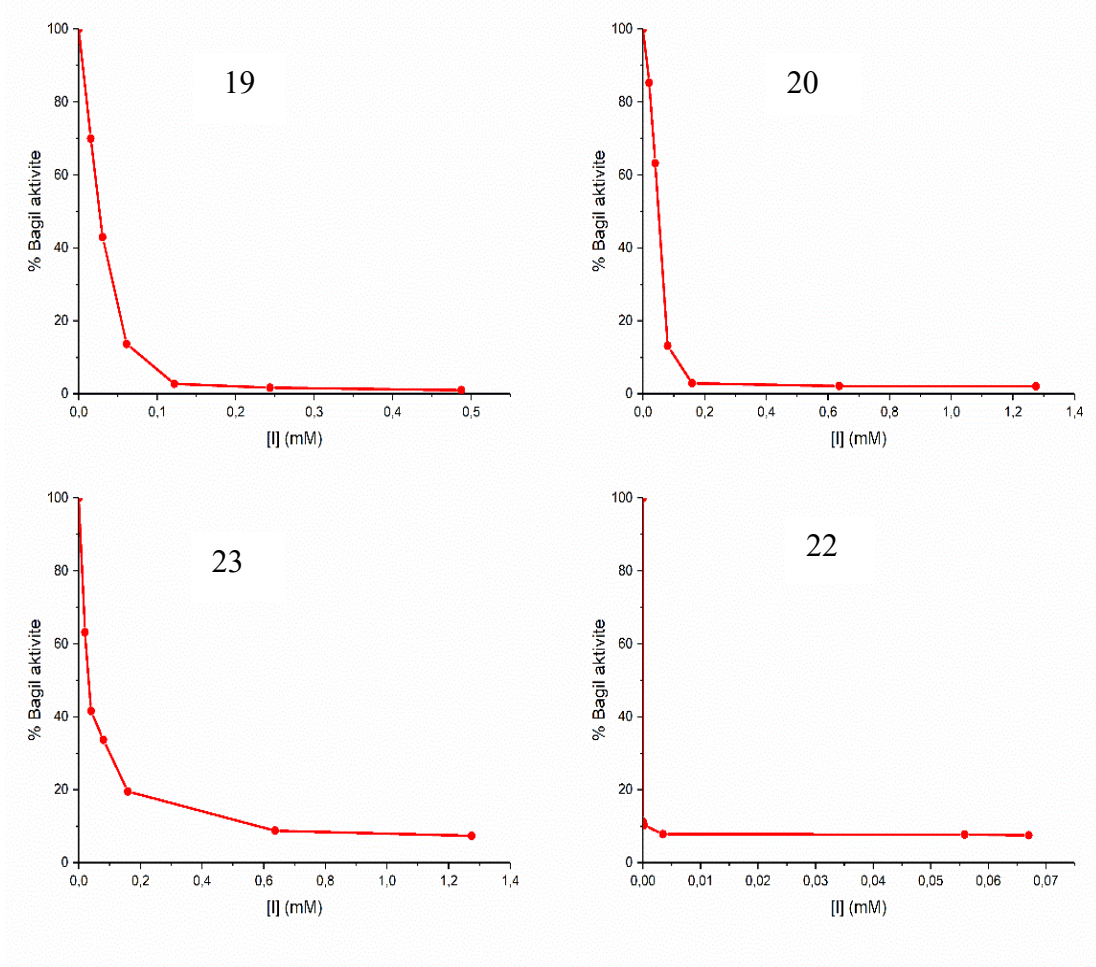
Şekil 11. 13, 14 numaralı moleküllerin hEGFR aktivitesi üzerine etkisi



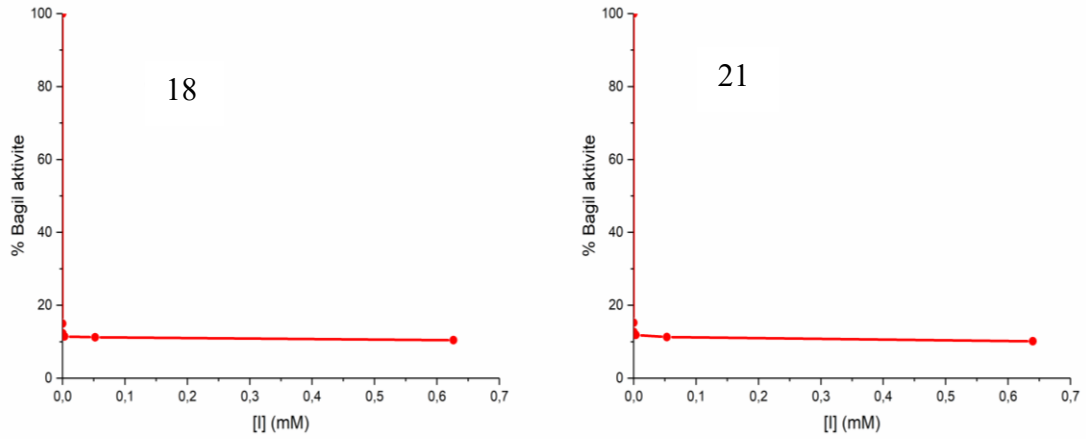
Şekil 12. 11, 10, 8 numaralı moleküllerin hEGFR aktivitesi üzerine etkisi



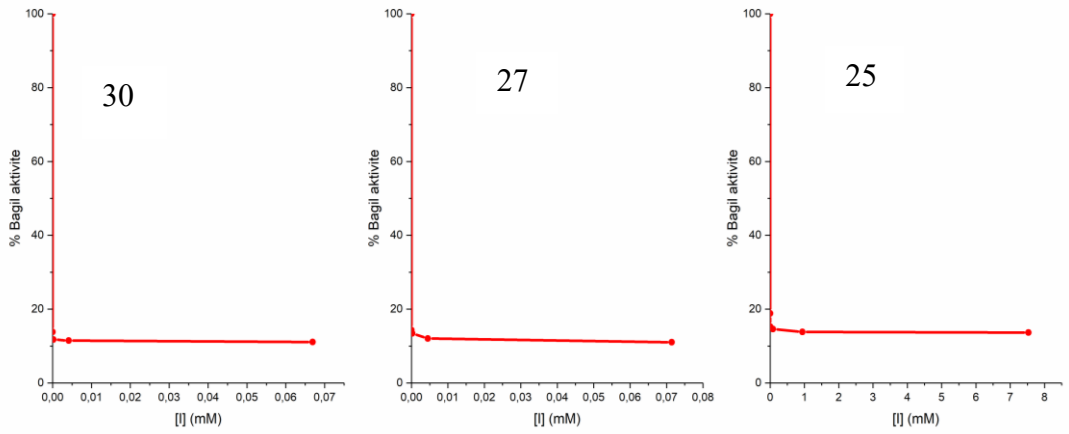
Şekil 13. 16, 17, 15, 24 numaralı moleküllerin hEGFR aktivitesi üzerine etkisi



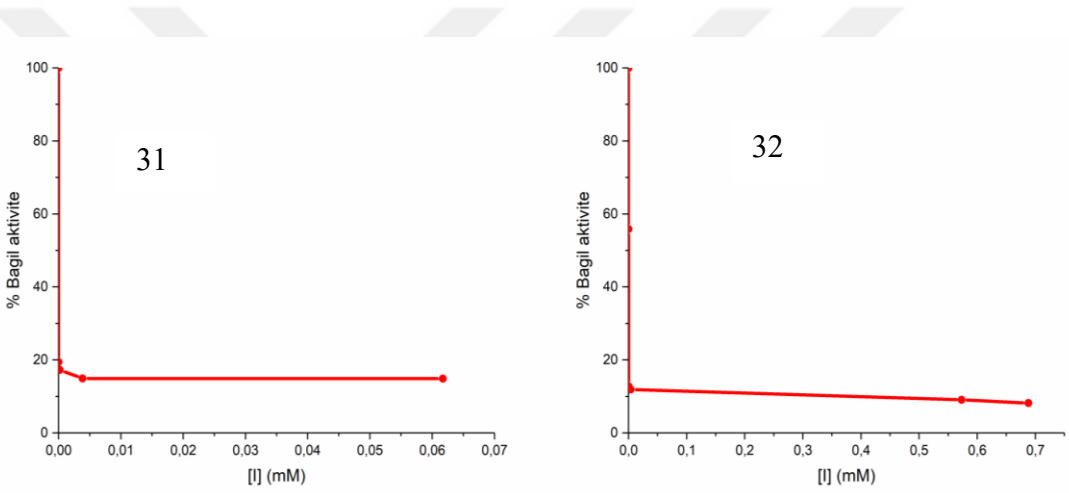
Şekil 14. 19, 20, 23, 22 numaralı moleküllerin hEGFR aktivitesi üzerine etkisi



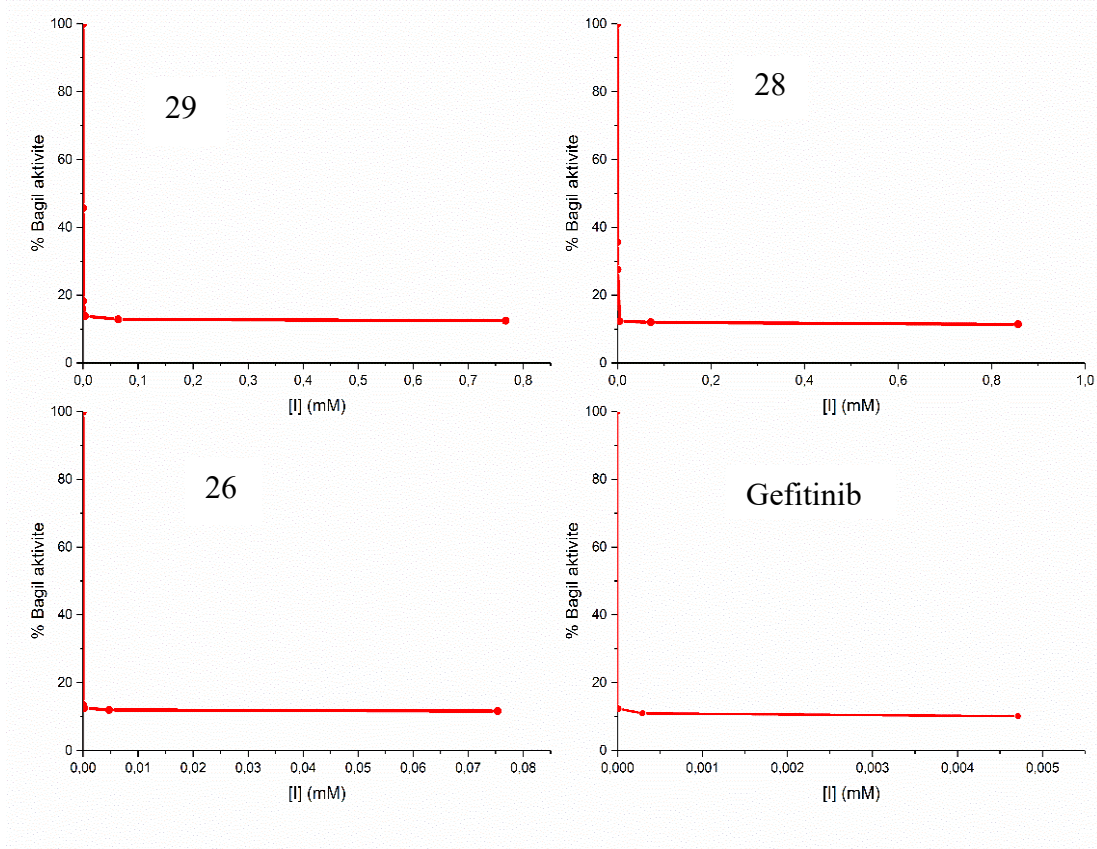
Şekil 15. 18, 21 numaralı moleküllerin hEGFR aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 16. 30, 27, 25 numaralı moleküllerin hEGFR aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 17. 31, 32 numaralı moleküllerin hEGFR aktivitesi üzerine etkisi

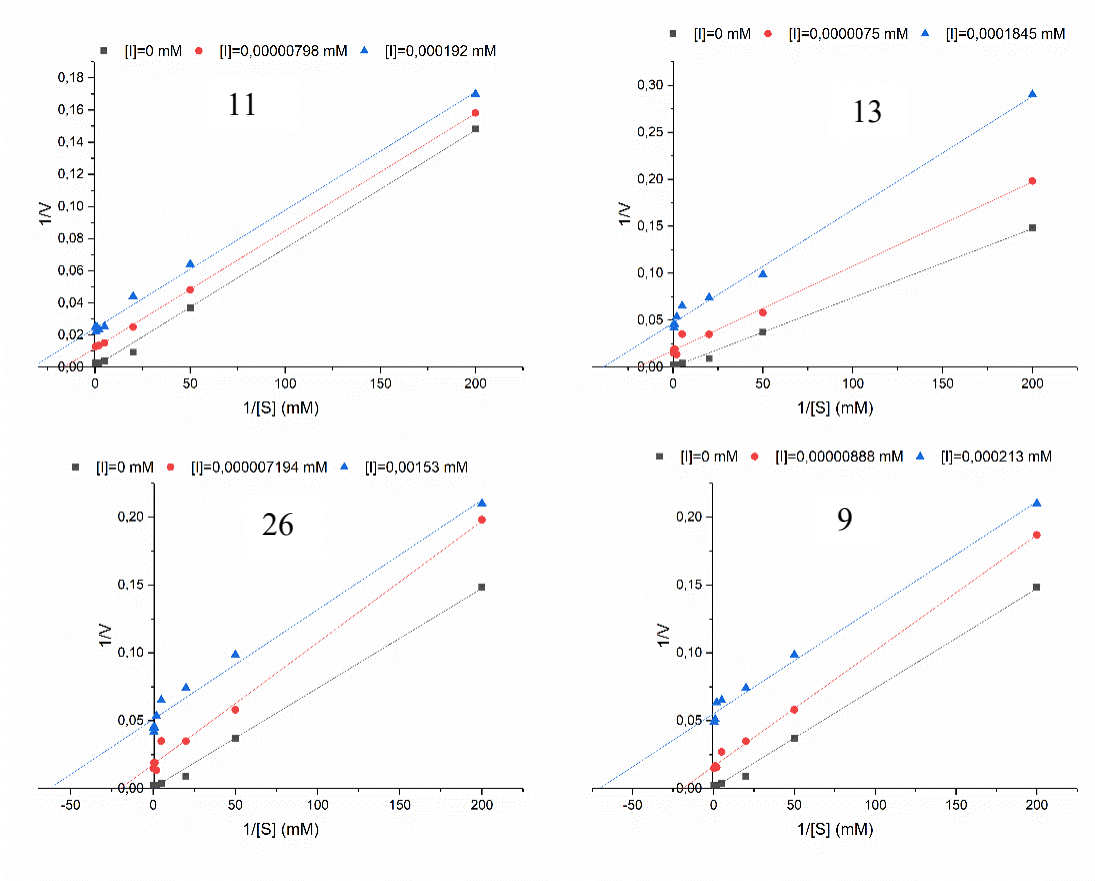


Şekil 18. Gefitinib ve 29, 28, 26 numaralı moleküllerin hEGFR aktivitesi üzerine etkisi

Tablo 4. Sentezlenen moleküllerin hEGFR aktivitesi üzerine inhibisyon etkileri

İnhibitör	IC ₅₀ , mM	Maksimum İnhibisyon	
		%	[I], mM
1	0,2072	99,30	0,507
2	0,2618	98,50	2,025
3	0,155	98,60	0,787
4	0,204	87,03	0,607
5	0,2035	89,89	0,618
6	0,0217	89,89	0,562
7	0,206	96,98	0,507
8	0,0267	88,51	0,862
9	0,0008	88,88	0,0681
10	0,0142	89,62	6,548
11	0,0082	87,77	0,0614
12	0,0374	92,07	0,768
13	0,0051	87,59	0,0592
14	0,0037	92,20	0,0552
15	0,0294	99,60	0,688
16	0,0859	96,80	0,656
17	0,0184	98,40	0,341
18	0,0321	90,63	0,626
19	0,0408	98,90	0,487
20	0,0878	97,90	1,275
21	0,0297	90,22	0,639
22	0,0082	92,48	0,0671
23	0,0812	92,70	1,275
24	0,0027	87,22	0,00642
25	0,0354	88,47	0,941
26	0,0097	88,37	0,0754
27	0,0008	89,35	0,0714
28	0,0094	90,17	0,856
29	0,0076	87,96	0,767
30	0,0008	89,22	0,0669
31	0,0004	88,93	0,0616
32	0,0037	91,83	0,687
Gefitinib	0,00001	89,85	0,00471

Tablo 4'den en düşük IC₅₀ değerine sahip moleküller seçilerek, bu moleküllerin sebep olduğu inhibisyon tipi belirlendi ve K_i değerleri matematiksel olarak hesaplandı (Şekil 19-20, Tablo 5-6). Bu amaçla, 9, 11, 13, 14, 22, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31 ve 32 numaralı moleküller, inhibisyon türleri belirlenmek üzere seçildi. Seçilen bu moleküllerin farklı iki konsantrasyonunda ve K_m değerinin hesaplanmasında kullanılan substrat aralığında bir seri hEGFR aktivitesi tayini yapıldı. Elde edilen sonuçlardan Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek, inhibitör varlığında ve yokluğunda K_m ve V_{maks} değerleri belirlendi.



Şekil 19. 11, 13, 26, 9 moleküllerinin varlığında hEGFR inhibisyon türlerinin belirlenmesi.

Tablo 5. 11, 13, 26, 9 molekülleri varlığında inhibisyon türlerinin belirlenmesi ve K_i değerleri

Molekül	İnhibitör (μ M)	K_m (mM)	V_{maks} (μ mol/dk)	İnhibisyon Türü	Ortalama K_i (μ M)
11	İnhibitörsüz	1,167	1666,67	unkompetitif	0,102
	0,00798	0,0583	83,333		
	0,192	0,0289	41,322		
13	İnhibitörsüz	1,167	1666,67	unkompetitif	0,119
	0,0075	0,0473	55,865		
	0,1845	0,0255	21,231		
26	İnhibitörsüz	1,167	1666,67	unkompetitif	0,778
	0,007194	0,0503	55,866		
	1,53	0,0157	19,608		
9	İnhibitörsüz	1,167	1666,67	unkompetitif	0,0889
	0,00888	0,0545	60,606		
	0,213	0,0145	18,083		

Şekil 20. 28, 26, 31, 29, 24, 22, 27, 30, 32 moleküllerinin varlığında hEGFR inhibisyon türlerinin belirlenmesi

Tablo 6. 28, 26, 31, 29, 24, 22, 27, 30, 32 molekülleri varlığında inhibisyon türlerinin belirlenmesi ve K_i değerleri

Molekül	İnhibitör (μM)	K_m (mM)	V_{maks} ($\mu\text{mol/dk}$)	İnhibisyon türü	Ortalama K_i (μM)
28	İnhibitörsüz	1,167	1666,67	Nonkompetitif	0,429
	0,009298	1,2	909,1		
	0,222	1,13	666,66		
26	İnhibitörsüz	1,167	1666,67	Nonkompetitif	0,598
	0,00981	1,143	714,28		
	0,237	1,176	588,23		
31	İnhibitörsüz	1,167	1666,67	Nonkompetitif	0,00232
	0,00804	1,1	1000		
	0,192	1	769,231		
29	İnhibitörsüz	1,167	1666,67	Nonkompetitif	0,218
	0,00833	1	1000		
	0,2001	1	769,231		
24	İnhibitörsüz	1,167	1666,67	Nonkompetitif	0,205
	0,000696	1	1000		
	0,001671	1	769,231		
22	İnhibitörsüz	1,167	1666,67	Nonkompetitif	0,245
	0,00726	1	1000		
	0,174	1	909,09		
27	İnhibitörsüz	1,167	1666,67	Nonkompetitif	0,169
	0,00928	1,18	909,09		
	0,222	1,153	769,23		
30	İnhibitörsüz	1,167	1666,67	Nonkompetitif	0,161
	0,0087	1	625		
	0,2088	1,06	588,23		
32	İnhibitörsüz	1,167	1666,67	Nonkompetitif	0,194
	0,00747	1,12	1250		
	0,1791	1,16	833,33		

3.4. SwissADME Çalışmaları

Sentezlenen moleküllerin ve gefitinib referans ilacının SwissADME çalışması ile ilaç ve kurşun benzerlikleri, Brenk kuralına uyumlulukları, kan-beyin bariyer geçişi ve gastrointestinal emilim gibi özellikleri değerlendirildi (Tablo 8). Enzim inhibisyon çalışmaları sonucunda hücre kültürü ve sitotoksikite çalışmaları için uygun görülen 9, 27, 30 ve 31 moleküllerine ait hesaplanan farmakokinetik, temel fizikokimyasal, ilaca

benzerlikle ilgili değerler ve lipofiliklik gibi değerler detaylı olarak Tablo 7’de verildi. Diğer taraftan, SwissADME çalışmaları sonucunda sentezlenen tüm moleküllerin ve gefitinib inhibitörünün biyoyararlanım radar grafikleri (Şekil 24) ve WLOGP-TPSA (haşlanmış yumurta grafiği) grafiği (Şekil 23) elde edildi.

Tablo 7’de yer alan fizikokimyasal değerlerden moleküler ağırlık, boyut için hesaplanmış olup, 150 ila 500 g/mol arasında olması gerektiği belirtilmektedir. Sp³ hibritlenmiş karbon atomlarının molekülün toplam karbon sayısına oranı olarak hesaplanmış fraksiyon csp³ değeri, doyumluk için en az 0,25 olmalıdır. Moleküllerin polarite özelliğini değerlendirmede kullanılan topolojik polar yüzey alanı (TPSA), kükürt ve fosforu polar atom olarak esas alarak hesaplanan bir tekniktir ve 20 ila 130 Å² arasında olması gerektiği belirtilmektedir. Moleküllerin lipofiliklik özelliklerinin değerlendirildiği bölümde XLOGP329 değeri, -0,7 ila +6,0 arasında olmalıdır (Daina vd, 2017).

Bu bölümde ayrıca, iLOGP, XLOGP3, WLOGP, MLOGP ve SILICOS-IT hesaplama yöntemleri ile elde edilen değerlerin aritmetik ortalaması da verildi. Suda çözünürlük bölümünde üç model kullanılarak moleküllerin sudaki çözünürlüklerinin ondalık logaritma değerleri (logS mg/ml) hesaplanmıştır. Her üç model için de moleküllerin logS ölçeğinde çözünürlük sınıfları, “çözünmez>10>zayıf>6>orta derecede>4>çözünür>2>iyi çözünür>0>çok iyi çözünür” kriterine göre tahmin edildi. Bu kriterlere göre logS değerinin 6’yı geçmemesi gerektiği belirtilmektedir (Daina vd, 2017).

K_p, deri geçirgenlik katsayısını tahmin etmeye yarayan moleküler boyut ve lipofiliklik ile doğrusal ilişkili bir değerdir. Farmakokinetik özellikler bölümünde yer alan deri geçirgenlik katsayısı LogK_p (cm/s), olarak hesaplandı. Bu değer, ne kadar negatif olursa, o molekülün deri geçirgenliği o kadar az olur (Daina vd, 2017). Farmakokinetik özellikler bölümünde moleküllerin gastrointestinal emilimleri, kan-beyin bariyer geçişleri ve p-glikoprotein ile olan substrat etkileşimleri hakkında tahminler de yürütülmüştür. İlaç benzerliği bölümünde, biyoyararlanım açısından moleküllerin oral ilaç olma ihtimalleri niteliksel olarak değerlendirildi.

SwissADME’de, molekülün ilaca benzer olarak tanımlandığı çeşitli aralıklara sahip beş farklı kural (Lipinski, Ghose, Veber, Egan ve Muegge) tabanlı filtreleme yapıldı. Bu filtrelemeler büyük ilaç şirketlerinin tescilli kimyasal arşivlerinin analizinden gerçekleştirildi. Abbot biyoyararlanım skorları (ABS) moleküllerin sıçanda en az %10 oral biyoyararlanım veya ölçülebilir Caco-2 geçirgenliğine sahip olma olasılığını tahmin etmede kullanıldı. Tıbbi kimya özelliklerinin belirlendiği bölümün amacı, iki tanımlayıcı

filtreleme programı (PAINS ve Brenk) ile molekül üzerindeki sorunlu olma potansiyeli olan grupların tanımlanmasıdır. SwissADME çalışması yapılan molekül üzerinde bu iki filtreleme arşivindeki tanımlı grupların (toksik olduğu varsayılan, kimyasal olarak reaktif, metabolik olarak kararsız veya zayıf farmakokinetikten sorumlu özellikler taşıdığı belirlenen gruplar) bulunması durumunda sistem uyarı verir (Daina vd, 2017).

Kurşun benzerliği kavramında, ilaca benzerlik kavramına benzer ancak iyi bir optimizasyon için uygun moleküler varlık tanımlayan fizikokimyasal sınırlara odaklanıldı. Sentetik erişilebilirlik puanı, esas olarak gerçekten elde edilebilir moleküllerdeki fragmanların sentez kolaylığı ile ilişkili olduğu varsayımına dayanır. Sentetik erişilebilirlik puanı olarak moleküllere, 1 (kolay) ile 10 (çok zor) arasında bir değer verildi (Daina vd, 2017).

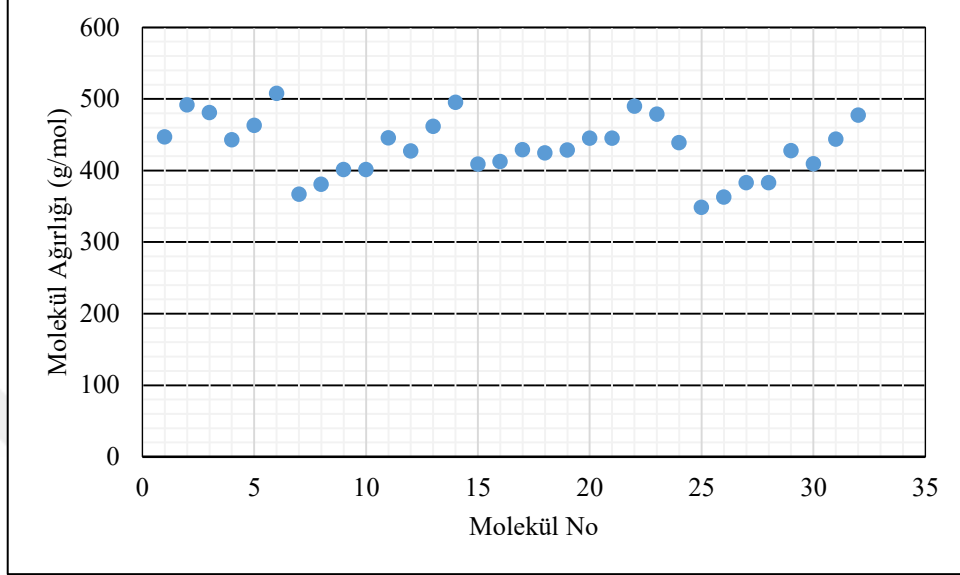
Tablo 7. 9, 27, 30 ve 31 Numaralı molekülün farmakokinetik ve fizikokimyasal özellikleri

Moleküller		9	27	30	31
Fizikokimyasal Özellikleri	150< Molekül Ağırlığı (g/mol) <500	400,89	382,87	408,91	443,35
	Molar Refraktivite	108,73	103,49	110,99	116
	Fraksiyon Csp3 (Doygunluk Parametresi) $\geq 0,25$	0,11	0,11	0,20	0,20
	20<TPSA(Å ²)<130	115.96 Å ²	96.41 Å ²	96.41 Å ²	96.41 Å ²
Lipofiliklik Özellikleri	Log $P_{O/W}$ (WLOGP)	2,73	4,20	4,70	5,36
	-0,7<Log $P_{O/W}$ (XLOGP3)<+6,0	3,63	4,13	4,31	4,94
	Ortalama Log $P_{O/W}$ (iLOGP, XLOGP3, WLOGP, MLOGP, SILICOS-IT hesaplama yöntemleri ile elde edilen değerlerin aritmetik ortalaması)	3,06	3,77	4,09	4,61
Topolojik metodlara Göre Ölçülen Suda Çözünürlük (Log S (mg/ml) Değerleri, Çözünürlük Dereceleri)	Metod 1 (ESOL)	4,55	5,18	5,34	5,93
	≤ 6	Kısmi Çözünür	Kısmi Çözünür	Kısmi Çözünür	Kısmi Çözünür
	Metod 2 (Ali)	5,75	5,86	6,05	6,70
		Kısmi Çözünür	Kısmi Çözünür	Zayıf Çözünür	Zayıf Çözünür
	Metod 3 (SILICOS-IT): FILTER-IT Programı	6,66	6,68	6,87	7,46
		Zayıf Çözünür	Zayıf Çözünür	Zayıf Çözünür	Zayıf Çözünür

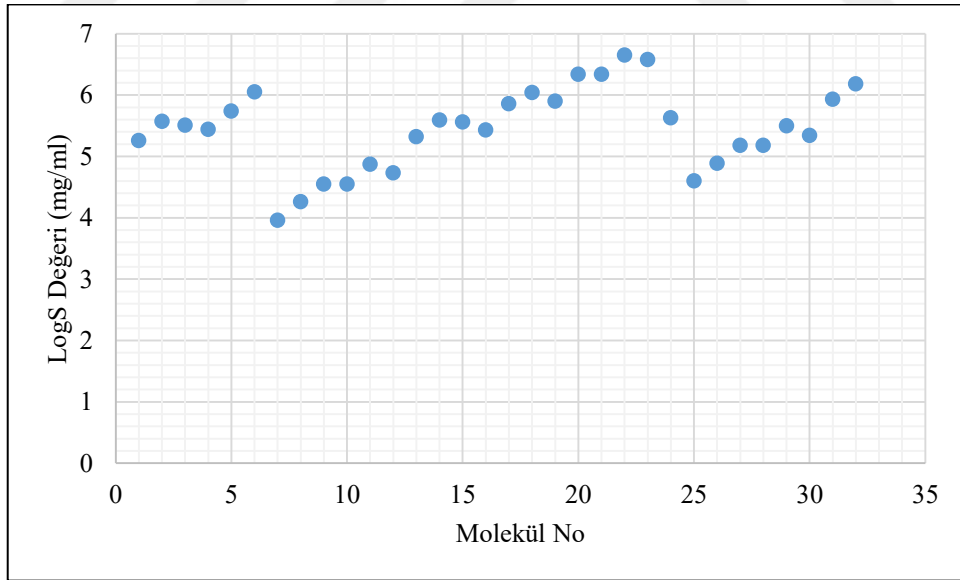
Tablo 7'nin devamı

Farmokinetik Özellikleri	Üzerinde İnhibitör Etkisi Gösterdikleri Enzim Sistemleri	CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4	CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4	CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4	CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4
	Gastrointestinal Emilim	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Yüksek
	Kan-Beyin Bariyer Geçişi	Yok	Yok	Yok	Yok
	p-Glikoprotein ile Olan Substrat Etkileşimi	Yok	Yok	Var	Var
	Log K _p (Deri Geçirgenlik Katsayısı) (cm/s)	-6,17	-5,70	-5,73	-5,50
İlaç Benzerlikleri İçin Filtrelenen Veri Tabanlarına Uygunlukları, Varsa Kural İhlalleri	Lipinski (MW ≤ 500; MLOGP ≤ 4.15; N veya O ≤ 10; NH veya OH ≤ 5)	Evet: 0 Kural İhlali	Evet: 0 Kural İhlali	Evet: 0 Kural İhlali	Evet: 0 Kural İhlali
	Ghose (160 ≤ MW ≤ 480; -0.4 ≤ WLOGP ≤ 5.6; 40 ≤ MR ≤ 130; 20 ≤ atom ≤ 70)	Evet	Evet	Evet	Evet
	Veber (Rotor ≤ 10; TPSA ≤ 140)	Evet	Evet	Evet	Evet
	Egan (WLOGP ≤ 5.88; TPSA ≤ 131.6)	Evet	Evet	Evet	Evet
	Muegge (200 ≤ MW ≤ 600; -2 ≤ XLOGP ≤ 5; TPSA ≤ 150; Halkalı grup sayısı ≤ 7; Karbon > 4; Heteroatom Sayısı > 1; Rotor ≤ 15; H-bağı alıcısı ≤ 10; H-bağı vericisi ≤ 5)	Evet	Evet	Evet	Evet
İlaç Benzerlikleri	Abbott Biyoyararlılık Skoru (ABS)	0,55	0,55	0,55	0,55
Tıbbi Kimya Özellikleri	PAINS (Pan Assay Interference Structures)	Yok	Yok	Yok	Yok
	Brenk Kuralına Göre Yapısal Uyarı	1 Uyarı: Tiyo karbonil grup	1 Uyarı: Tiyo karbonil grup	1 Uyarı: Tiyo karbonil grup	1 Uyarı: Tiyo karbonil grup
	Sentetik Erişilebilirlik Puanı	3,25	3,2	3,43	3,44

Sentezlenen bileşiklerin molekül ağırlıklarının dağılımı Şekil 21’de ve suda çözünürlüklerine ait logS (mg/ml) değerlerinin dağılımları Şekil 22’de gösterildi.



Şekil 21. Sentezlenen bileşiklerin molekül ağırlıkları



Şekil 22. Sentezlenen moleküllerin ESOL metoduna göre suda çözünürlükleri

Tez çalışmamızda yer alan tüm moleküllerin ve gefitinib inhibitörünün ilaç ve kurşun benzerlikleri, Brenk kuralına uyumlulukları, kan-beyin bariyer geçişi ve gastrointestinal emilimine ait SwissADME’den elde edilen bilgiler, Tablo 8’de sunuldu.

Tablo 8. Moleküllerin ilaç benzerlikleri, farmakokinetik ve tıbbi kimya özellikleri

Molekül	İlaç Benzerlikleri, Varsa Kural İhlalleri Uyarılar		Kurşun Benzerlikleri, Varsa Kural İhlalleri (250≤MW≤350; XLOGP≤3.5; Rotor≤7)	Brenk Kuralı Uyumsuzluğu	BBB	GI Emilim
	Lipinski Kuralı (MW≤500; MLOGP≤4.15; N veya O ≤10; NH veya OH ≤5)	Veber Kuralı (Rotor≤10; TPSA≤140)				
1	Evet	Evet	Yok, 3 Uyarı (MW, Rotor, XLOGP3)	Yok	Yok	Yüksek
2	Evet	Evet	Yok, 3 Uyarı (MW, Rotor, XLOGP3)	Yok	Yok	Yüksek
3	Evet 1 Kural İhlali (MLOGP)	Evet	Yok, 3 Uyarı (MW, Rotor, XLOGP3)	Yok	Yok	Yüksek
4	Evet	Evet	Yok, 3 Uyarı (MW, Rotor, XLOGP3)	1 Uyarı: Tiyokarbonil Grup	Yok	Yüksek
5	Evet	Evet	Yok, 3 Uyarı (MW, Rotor, XLOGP3)	1 Uyarı: Tiyokarbonil Grup	Yok	Yüksek
6	Evet 1 Kural İhlali (MW)	Evet	Yok, 3 Uyarı (MW, Rotor, XLOGP3)	1 Uyarı: Tiyokarbonil Grup	Yok	Yüksek
7	Evet	Evet	Yok, 2 Uyarı (MW, Rotor)	1 Uyarı: Tiyokarbonil Grup	Yok	Yüksek
8	Evet	Evet	Yok, 2 Uyarı (MW, Rotor)	1 Uyarı: Tiyokarbonil Grup	Yok	Yüksek
9	Evet	Evet	Yok, 3 Uyarı (MW, Rotor, XLOGP3)	1 Uyarı: Tiyokarbonil Grup	Yok	Yüksek
10	Evet	Evet	Yok, 3 Uyarı (MW, Rotor, XLOGP3)	1 Uyarı: Tiyokarbonil Grup	Yok	Yüksek
11	Evet	Evet	Yok, 3 Uyarı (MW, Rotor, XLOGP3)	1 Uyarı: Tiyokarbonil Grup	Yok	Yüksek
12	Evet	Evet	Yok, 3 Uyarı (MW, Rotor, XLOGP3)	1 Uyarı: Tiyokarbonil Grup	Yok	Yüksek
13	Evet	Evet	Yok, 3 Uyarı (MW, Rotor, XLOGP3)	1 Uyarı: Tiyokarbonil Grup	Yok	Yüksek
14	Evet	Evet	Yok, 3 Uyarı (MW, Rotor, XLOGP3)	1 Uyarı: Tiyokarbonil Grup	Yok	Düşük
15	Evet	Evet	Yok, 2 Uyarı (MW, XLOGP3)	Yok	Yok	Yüksek
16	Evet	Evet	Yok, 2 Uyarı (MW, XLOGP3)	Yok	Yok	Yüksek
17	Evet 1 Kural İhlali (MLOGP)	Evet	Yok, 2 Uyarı (MW, XLOGP3)	Yok	Yok	Yüksek
18	Evet	Evet	Yok, 2 Uyarı (MW, XLOGP3)	1 Uyarı: Tiyokarbonil Grup	Yok	Yüksek
19	Evet	Evet	Yok, 2 Uyarı (MW, XLOGP3)	1 Uyarı: Tiyokarbonil Grup	Yok	Yüksek
20	Evet 1 Kural İhlali (MLOGP)	Evet	Yok, 2 Uyarı (MW, XLOGP3)	1 Uyarı: Tiyokarbonil Grup	Yok	Yüksek
21	Evet 1 Kural İhlali (MLOGP)	Evet	Yok, 2 Uyarı (MW, XLOGP3)	1 Uyarı: Tiyokarbonil Grup	Yok	Yüksek

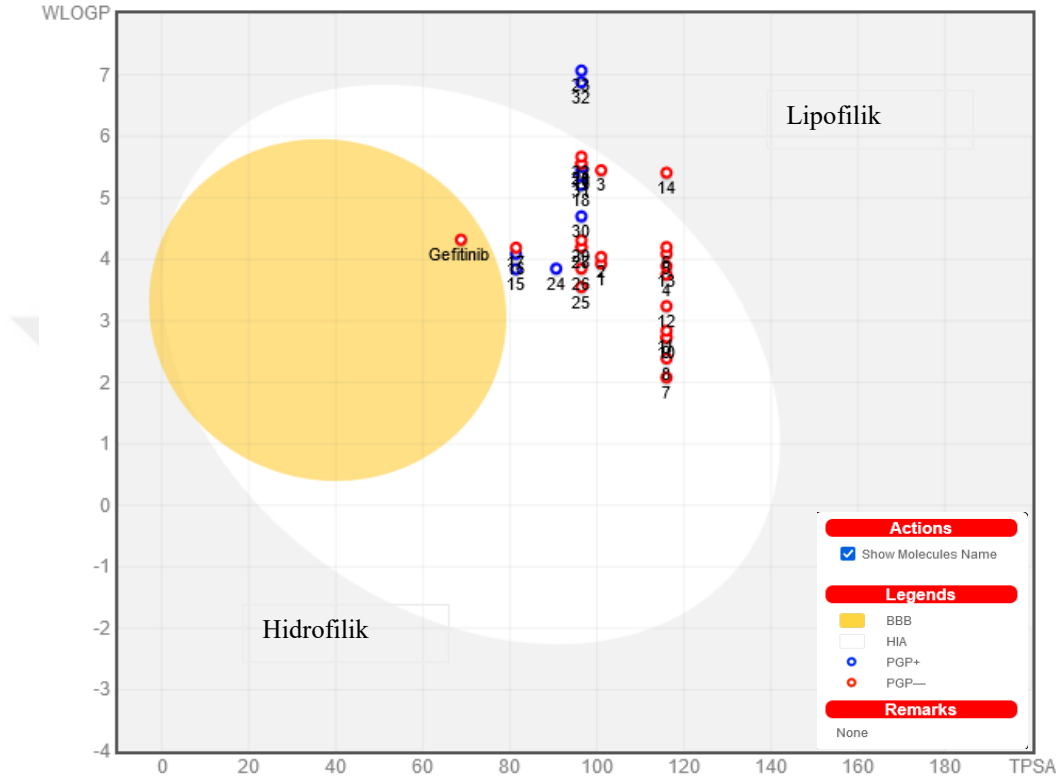
Tablo 8'in devamı

22	Evet 1 Kural İhlali (MLOGP)	Evet	Yok, 2 Uyarı (MW, XLOGP3)	1 Uyarı: Tiyokarbonil Grup	Yok	Yüksek
23	Evet 1 Kural İhlali (MLOGP)	Evet	Yok, 2 Uyarı (MW, XLOGP3)	1 Uyarı: Tiyokarbonil Grup	Yok	Düşük
24	Evet	Evet	Yok, 2 Uyarı (MW, XLOGP3)	Yok	Yok	Yüksek
25	Evet	Evet	Yok, 1 Uyarı (XLOGP3)	1 Uyarı: Tiyokarbonil Grup	Yok	Yüksek
26	Evet	Evet	Yok, 2 Uyarı (MW, XLOGP3)	1 Uyarı: Tiyokarbonil Grup	Yok	Yüksek
27	Evet	Evet	Yok, 2 Uyarı (MW, XLOGP3)	1 Uyarı: Tiyokarbonil Grup	Yok	Yüksek
28	Evet	Evet	Yok, 2 Uyarı (MW, XLOGP3)	1 Uyarı: Tiyokarbonil Grup	Yok	Yüksek
29	Evet	Evet	Yok, 2 Uyarı (MW, XLOGP3)	1 Uyarı: Tiyokarbonil Grup	Yok	Yüksek
30	Evet	Evet	Yok, 2 Uyarı (MW, XLOGP3)	1 Uyarı: Tiyokarbonil Grup	Yok	Yüksek
31	Evet	Evet	Yok, 2 Uyarı (MW, XLOGP3)	1 Uyarı: Tiyokarbonil Grup	Yok	Yüksek
32	Evet 1 Kural İhlali (MLOGP)	Evet	Yok, 2 Uyarı (MW, XLOGP3)	1 Uyarı: Tiyokarbonil Grup	Yok	Düşük
Gefitinib	Evet	Evet	Yok; 3 Uyarı (MW, Rotor, XLOGP3)	Yok	Var	Yüksek

Moleküllere ait WLOGP-TPSA (haşlanmış yumurta grafiği) grafiğinden (Şekil 23) pasif insan gastrointestinal emilimine ve kan-beyin bariyeri permeasyonuna ilişkin tahminler elde edildi. Haşlanmış yumurtanın beyaz bölgesi, gastrointestinal sistem tarafından yüksek pasif absorpsiyon olasılığı olan molekülleri kapsarken, sarı bölge yüksek beyin penetrasyonu olan moleküllerin varlığını tanımlar. Sarı ve beyaz alanlar birbirini dışlayan alanlar değildir. Bu grafiğe ayrıca, moleküllerin önemli farmakokinetik davranışlarını ve küçük moleküllerin substrat veya inhibitör olma eğilimlerini belirleyen ikili sınıflandırma modeli de eklendi.

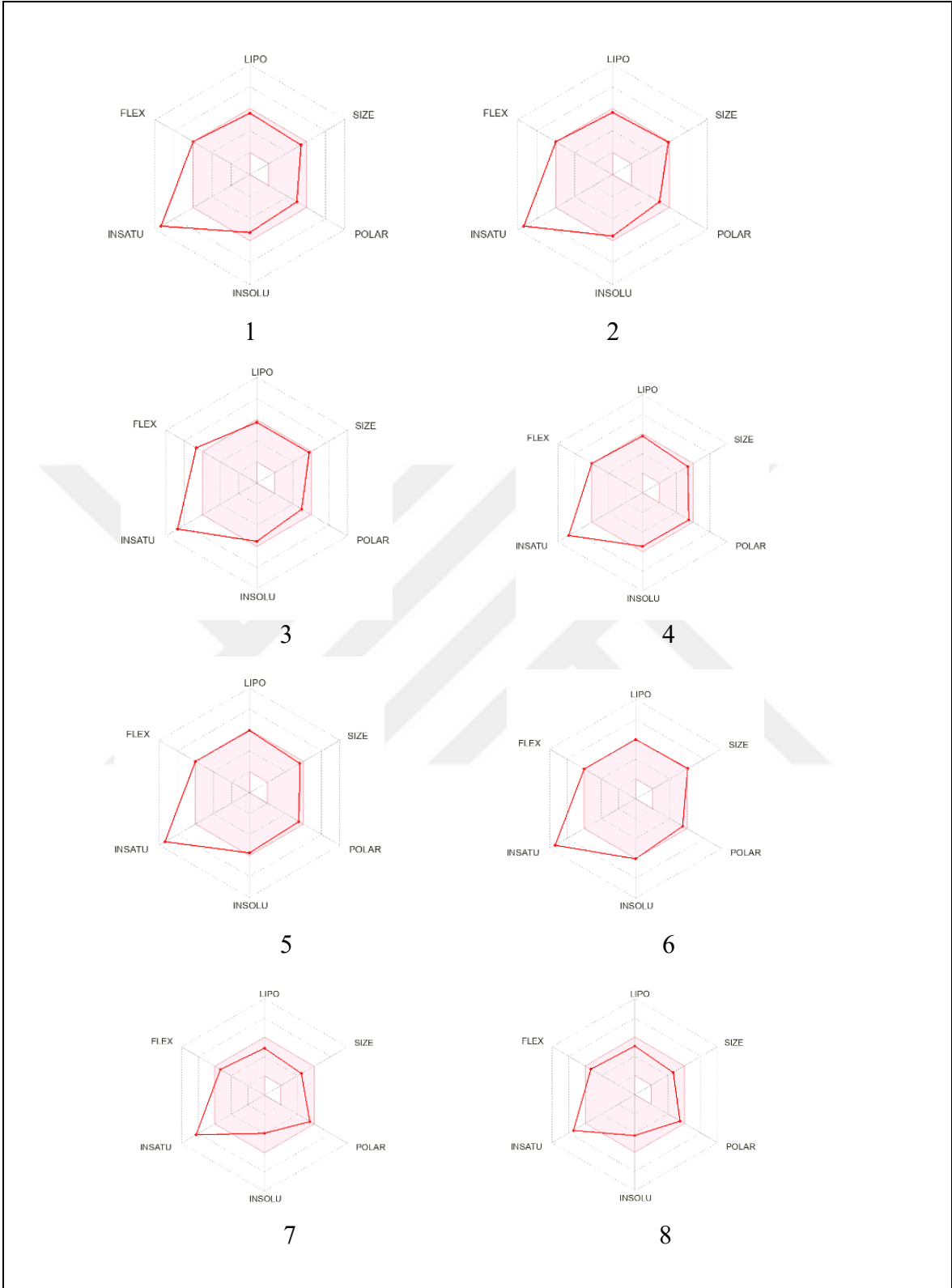
SwissADME ile moleküllerin, P-gp'nin substratı olma olasılığını tahmin etmek için kullanıldı. P-gp'nin substratı olan moleküller WLOGP-TPSA (haşlanmış yumurta grafiği) grafiğinde mavi renkte, substratı olmayanlar ise kırmızı renkte gösterildi. Moleküllerin geçirgenlik glikoproteininin (P-gp) substratı olup olmadığı hakkındaki bilgi, gastrointestinal duvardan lümene olan akışı veya beyin gibi biyolojik membranlardan aktif akışı değerlendirmek için kullanılır. P-gp'nin en önemli görevlerinden biri merkezi sinir

sistemini ksenobiyotiklerden korumaktır. Daha da önemlisi, P-gp bazı tümör hücrelerinde aşırı ekspres edildiği ve çoklu ilaç direnci gösteren kanserlere yol açtığı bildirilmektedir (Daina vd, 2017).



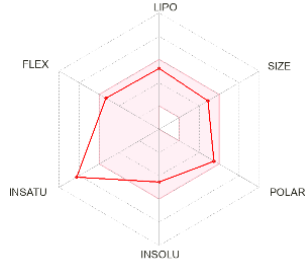
Şekil 23. Moleküllerin WLOGP-TPSA (haşlanmış yumurta grafiği) grafiği

SwissADME çalışmaları sonucunda ayrıca, bir molekülün ilaca benzerliğinin değerlendirildiği SwissADME grafiği olan biyoyararlanım radar grafikleri elde edildi (Şekil 24). Grafikler elde edilirken lipofiliklik, boyut, polarite, çözünürlük, esneklik ve doygunluk gibi moleküllere ait altı fizikokimyasal değer kullanıldı. Her ekseninde bir fizikokimyasal referans aralık tanımlandı ve optimal değerlerin sınırları pembe bir alan olarak gösterildi.

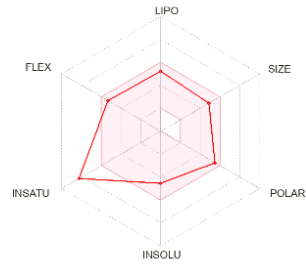


Şekil 24. Sentezlenen moleküllerin ve gefitinib inhibitörünün SwissADME biyoyararlanım radar grafikleri

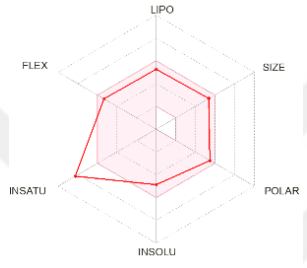
Şekil 24'ün devamı



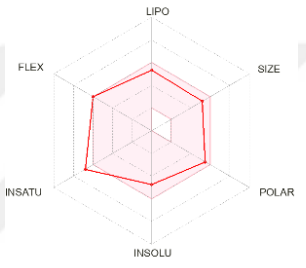
9



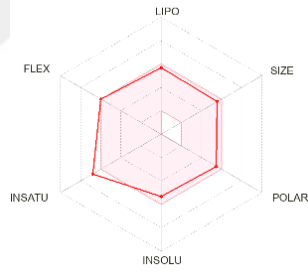
10



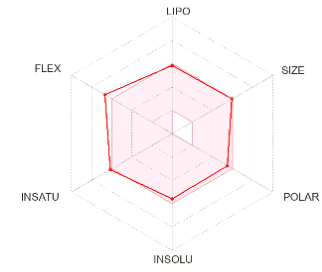
11



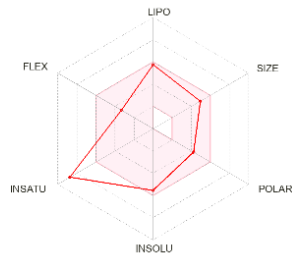
12



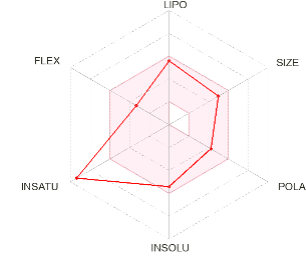
13



14

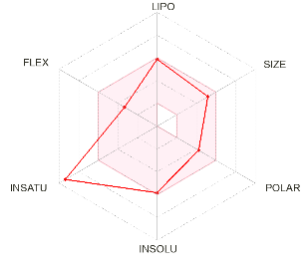


15

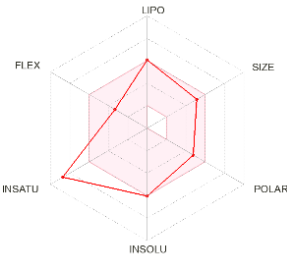


16

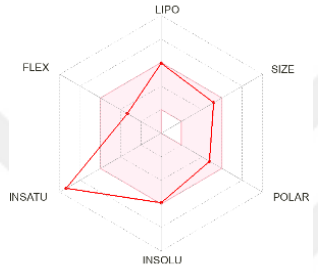
Şekil 24'ün devamı



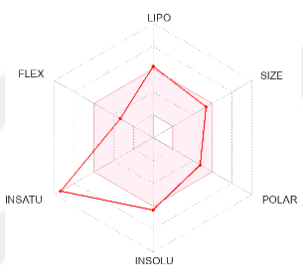
17



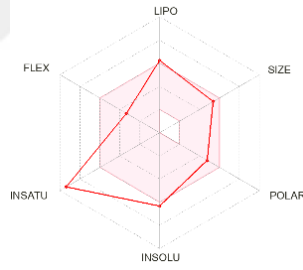
18



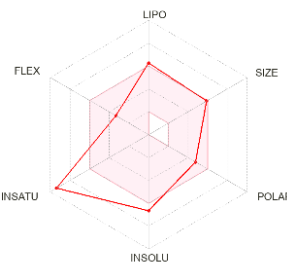
19



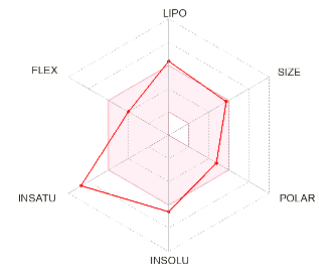
20



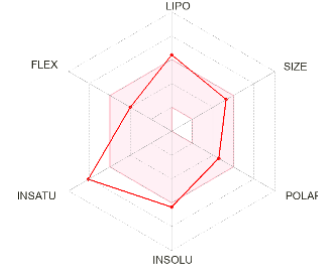
21



22

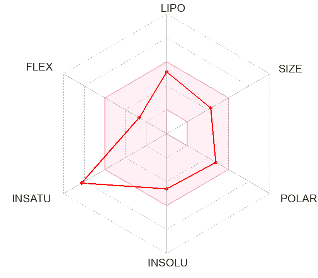


23

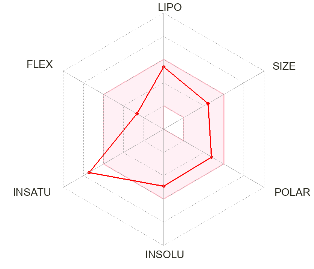


24

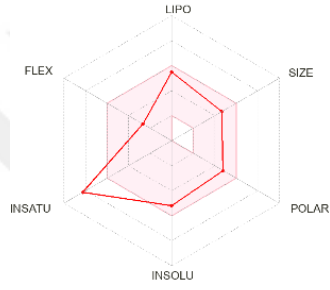
Şekil 24'ün devamı



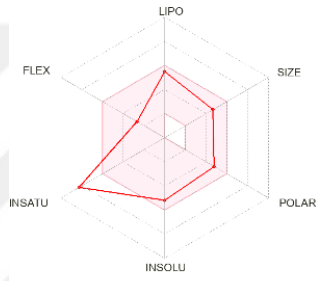
25



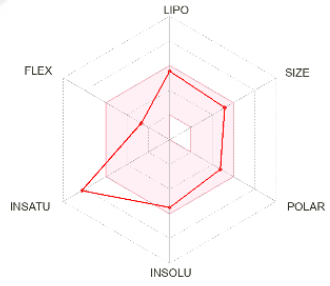
26



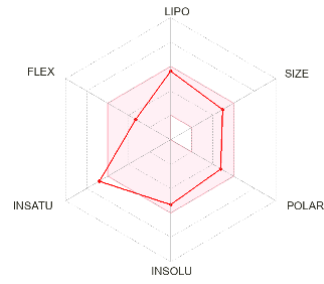
27



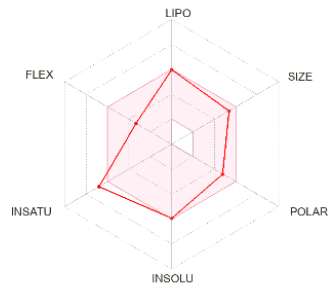
28



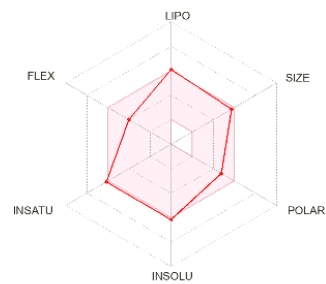
29



30

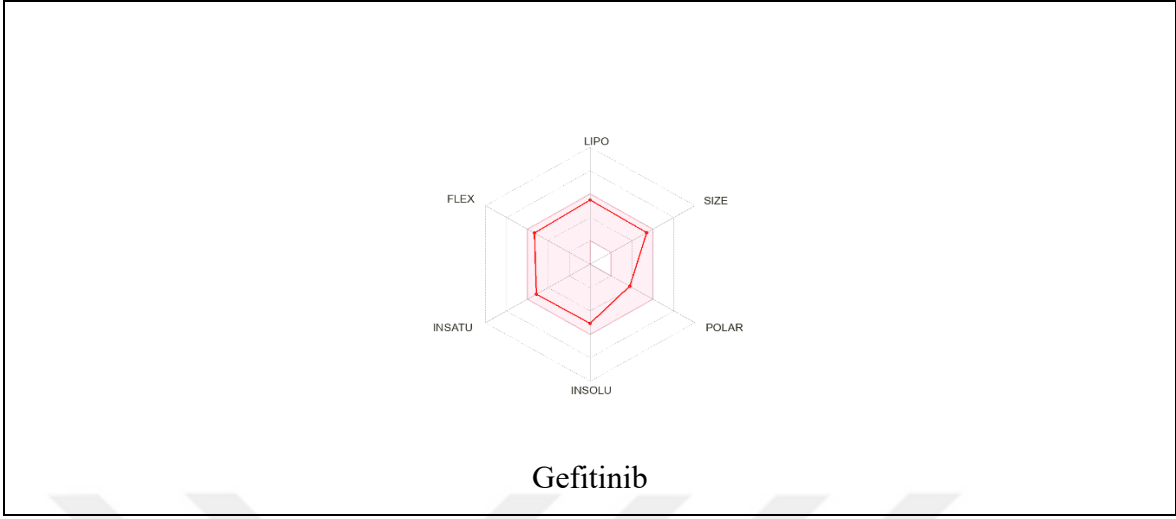


31



32

Şekil 24'ün devamı



3.5. Hücre Kültürü ve Sitotoksosite Çalışmaları

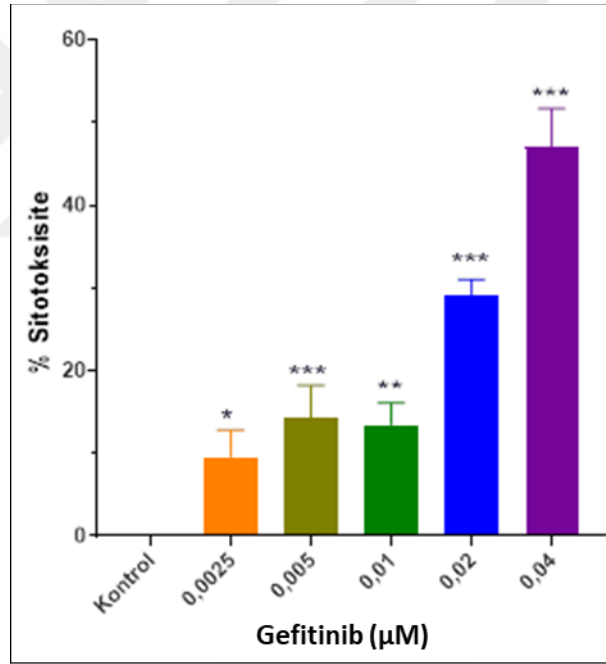
Sitotoksosite denemeleri için 9, 27, 30 ve 31 maddeleri ve gefitinib, hücre büyüme ortamında seyreltilerek/dağıtılarak hazırlandı. WI-38, A549, NCI-H358, OVCAR-3 ve SKOV-3 hücre hatlarının 9, 27, 30 ve 31 maddeleri ve gefitinib ile 48 saatlik inkübasyonları sonucu canlılıkları MTT analizi ile belirlendi. Besi ortamında inkübe edilen kontrol grubu hücrelerinde saptanan canlılık miktarı %100 kabul edilerek sentezlenen madde örnekleri uygulanan hücrelerde canlılık hesaplamaları yapıldı. Doza bağlı % sitotoksosite grafikleri Grapdpad v8 programı ile çizildi ve tek yönlü ANOVA ardından posthoc test olarak Dunnett's t testi ile analiz edildi, $p < 0,05$ değerleri anlamlı kabul edildi. Bu grafiklerde yer alan yıldız “*” işaretleri, elde edilen % sitotoksosite değerlerinin kontrol gruplarıyla aralarındaki farkın ne kadar anlamlı olduğunu ifade etmektedir.

Çalışma kapsamında denenen hücre hatlarında gefitinib ve 9, 27, 30 ve 31 numaralı moleküllere ait 48 saatlik inkübasyon sonucu hesaplanan IC_{50} değerleri Tablo 9'da verilmiştir.

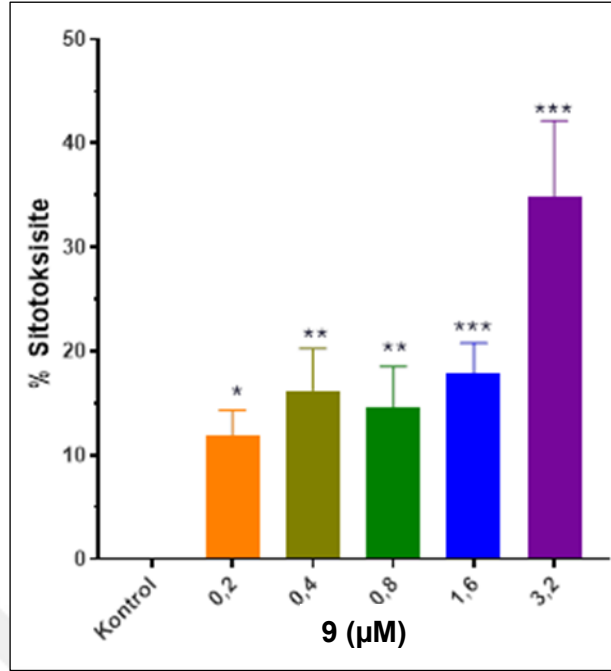
Tablo 9. Hücre hatlarında gefitinib ve 9, 27, 30, 31 numaralı moleküllere ait IC₅₀ değerleri

Hücre Madde	IC ₅₀ (μM)				
	WI-38	A549	NCI-H358	SKOV-3	OVCAR-3
31	2,55	6,25	7,54	5,60	Belirlenemedi
27	3,56	5,89	7,23	5,13	Belirlenemedi
9	Belirlenemedi	6,40	6,93	7,65	Belirlenemedi
30	0,05	6,07	7,06	4,50	Belirlenemedi
Gefitinib	0,05	0,16	0,08	0,065	Belirlenemedi

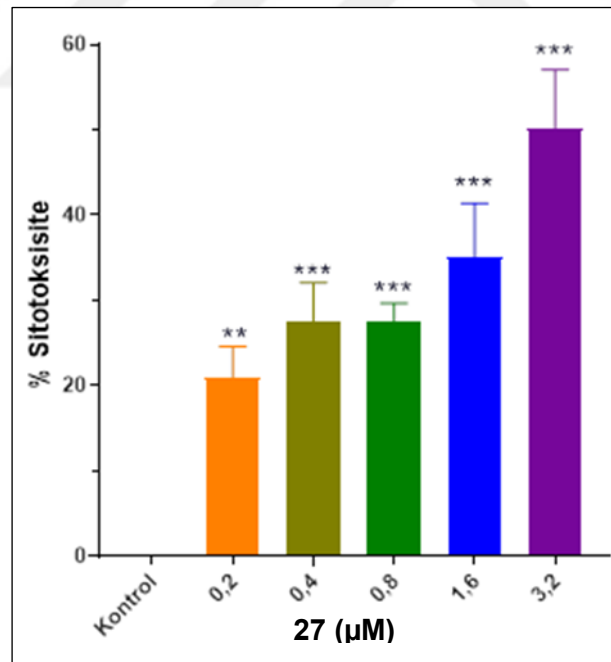
WI-38 hücre hattında gefitinib ve 9, 27, 30, 31 numaralı moleküllerin doza bağlı sitotoksosite etki grafikleri Şekil 25-29'de verilmiştir.



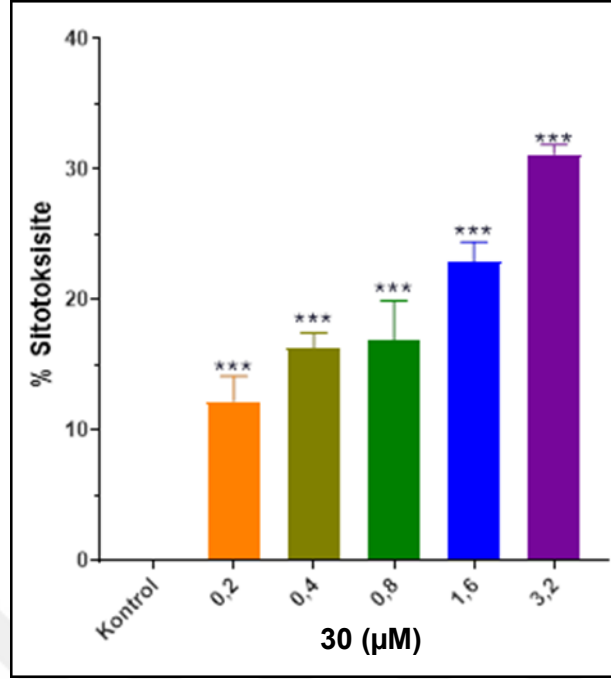
Şekil 25. Gefitinib inhibitörünün WI-38 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (μM) bağlı sitotoksosite etkileri



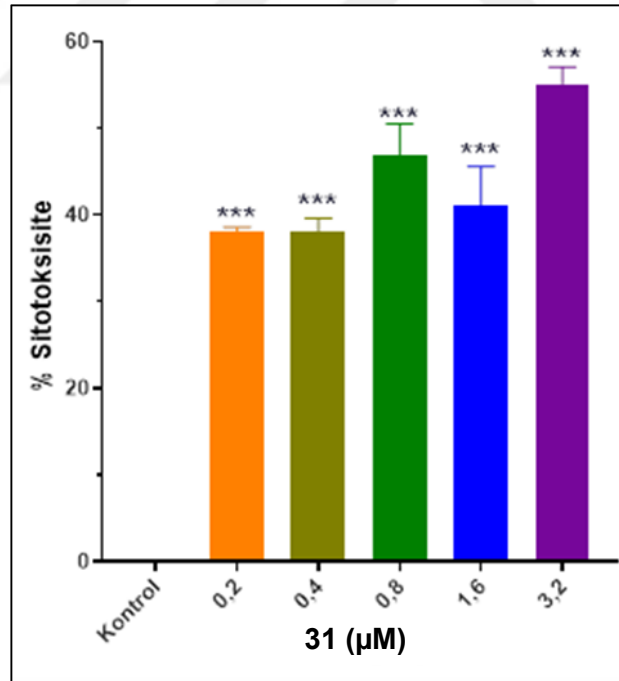
Şekil 26. 9 numaralı molekülün WI-38 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (µM) bağlı sitotoksiste etkileri



Şekil 27. 27 numaralı molekülün WI-38 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (µM) bağlı sitotoksiste etkileri

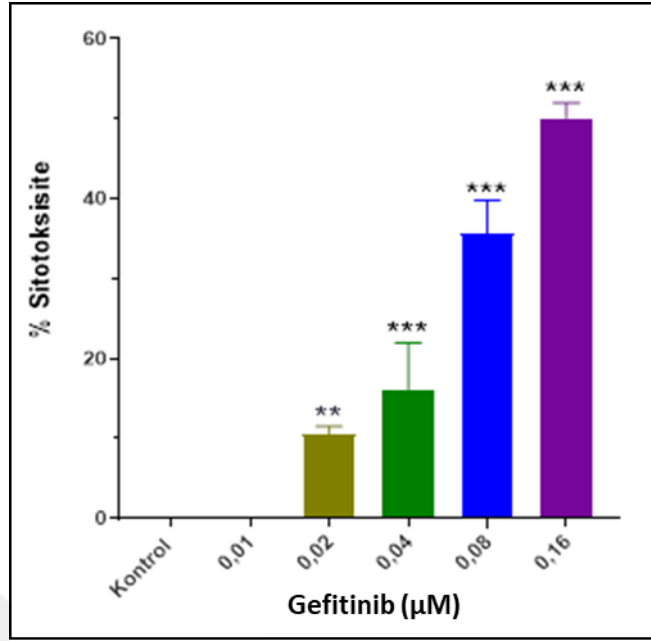


Şekil 28. 30 numaralı molekülün WI-38 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (µM) bağlı sitotoksizite etkileri

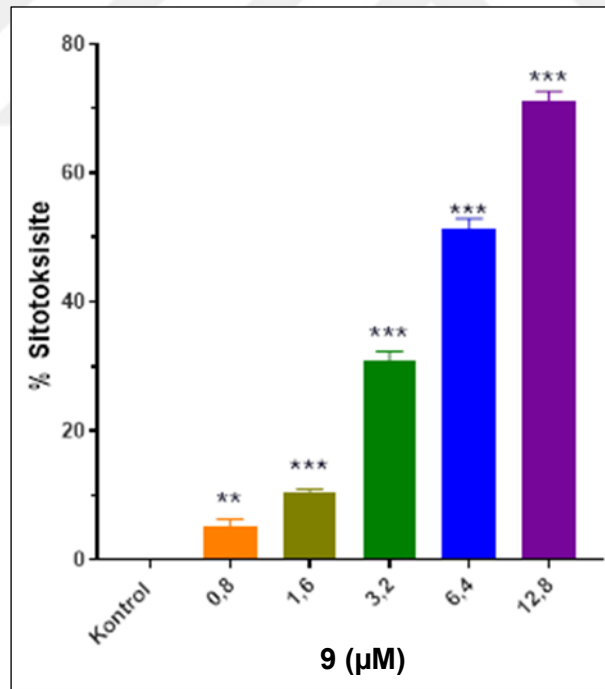


Şekil 29. 31 numaralı molekülün WI-38 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (µM) bağlı sitotoksizite etkileri

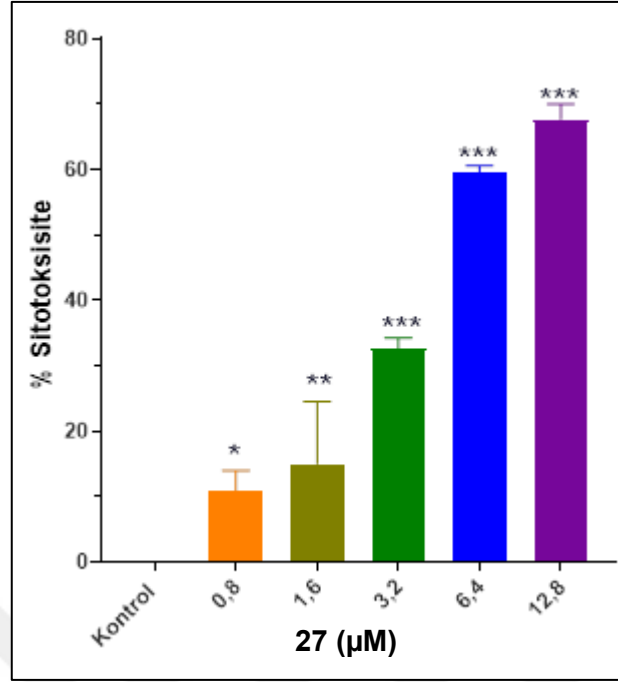
A549 hücre hattında gefitinib ve 9, 27, 30, 31 numaralı moleküllerin doza bağlı sitotoksizite etki grafikleri Şekil 30-34'de verilmiştir.



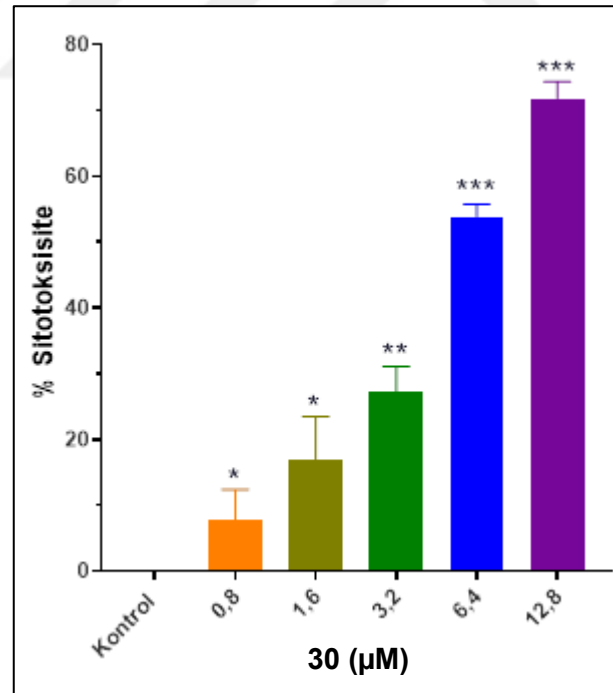
Şekil 30. Gefitinib inhibitörünün A549 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (μM) bağlı sitotoksiste etkileri



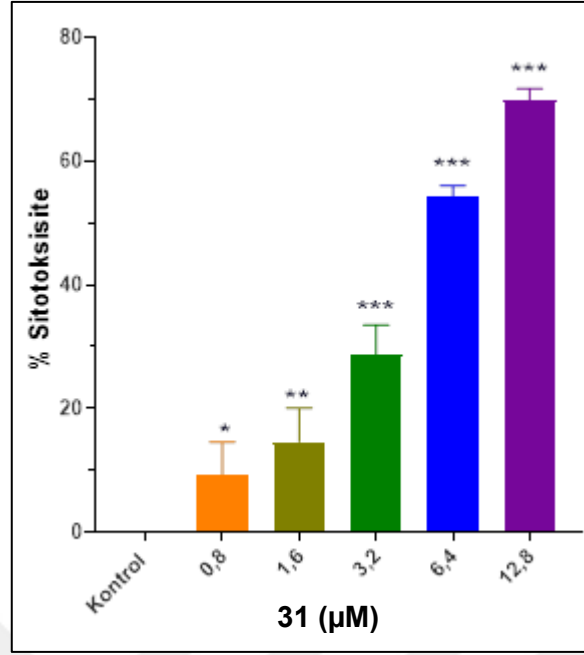
Şekil 31. 9 numaralı molekülün A549 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (μM) bağlı sitotoksiste etkileri.



Şekil 32. 27 numaralı molekülün A549 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (µM) bağlı sitotoksosite etkileri

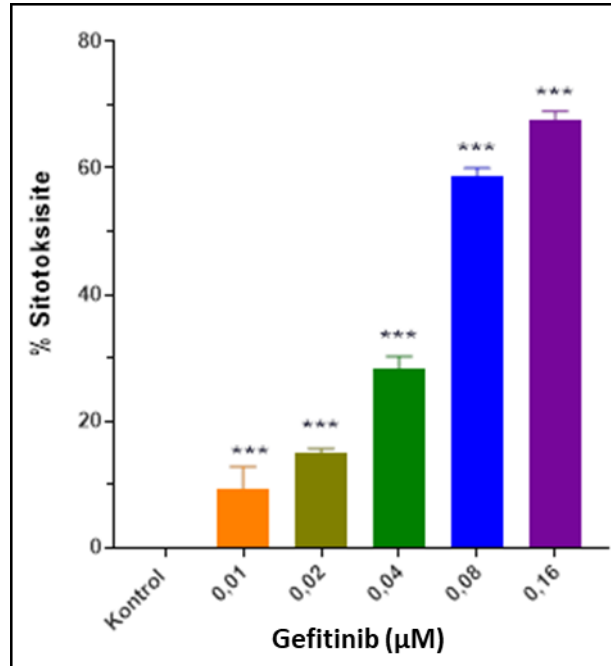


Şekil 33. 30 numaralı molekülün A549 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (µM) bağlı sitotoksosite etkileri

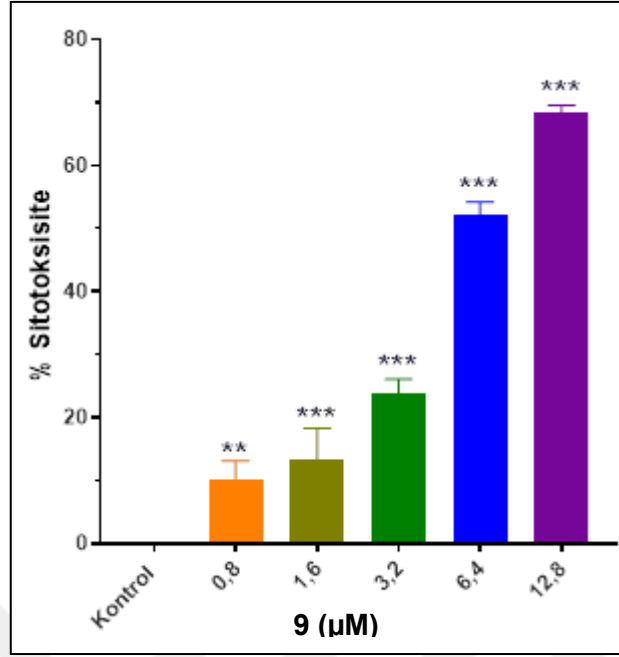


Şekil 34. 31 numaralı molekülün A549 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (µM) bağlı sitotoksosite etkileri

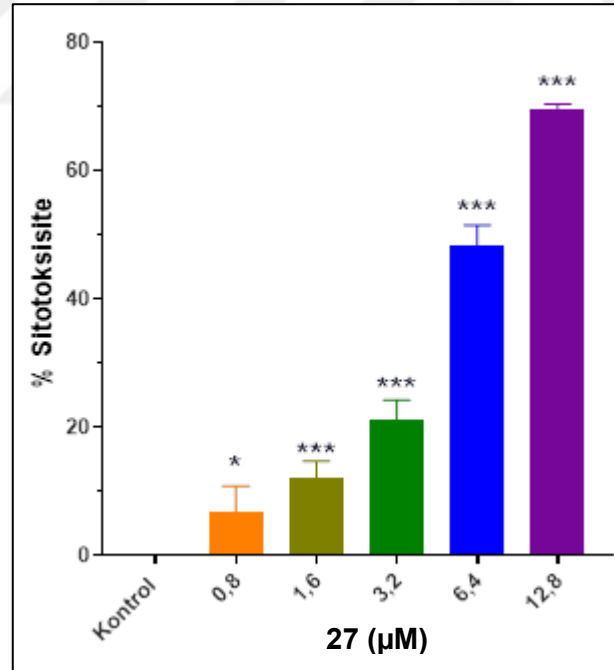
NCI-H358 hücre hattında gefitinib ve 9, 27, 30, 31 numaralı moleküllerin doza bağlı sitotoksosite etki grafikleri Şekil 35-39’da verilmiştir.



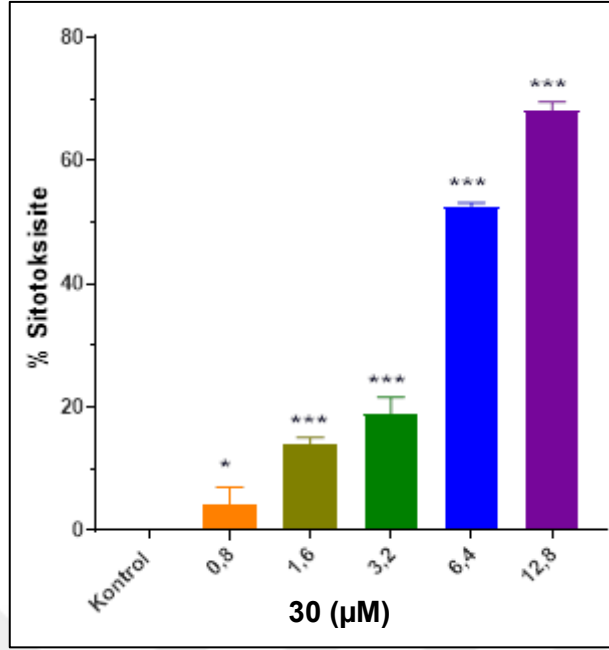
Şekil 35. Gefitinib inhibitörünün NCI-H358 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (µM) bağlı sitotoksosite etkileri



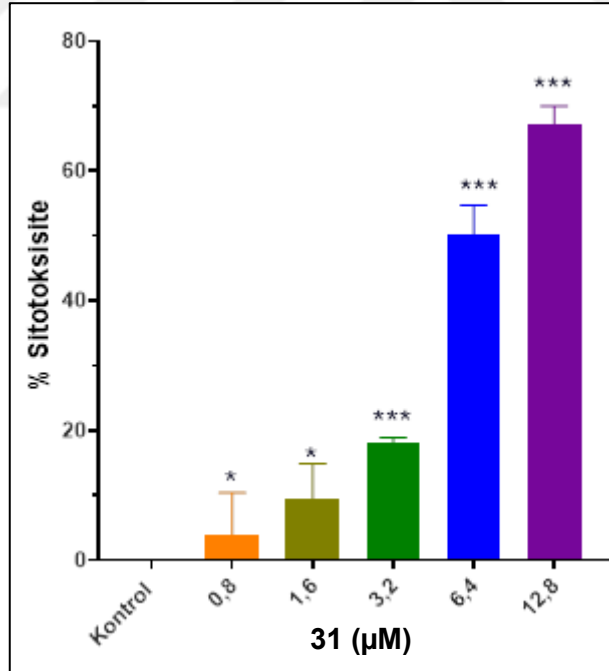
Şekil 36. 9 numaralı molekülün NCI-H358 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (µM) bağlı sitotoksosite etkileri



Şekil 37. 27 numaralı molekülün NCI-H358 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (µM) bağlı sitotoksosite etkileri

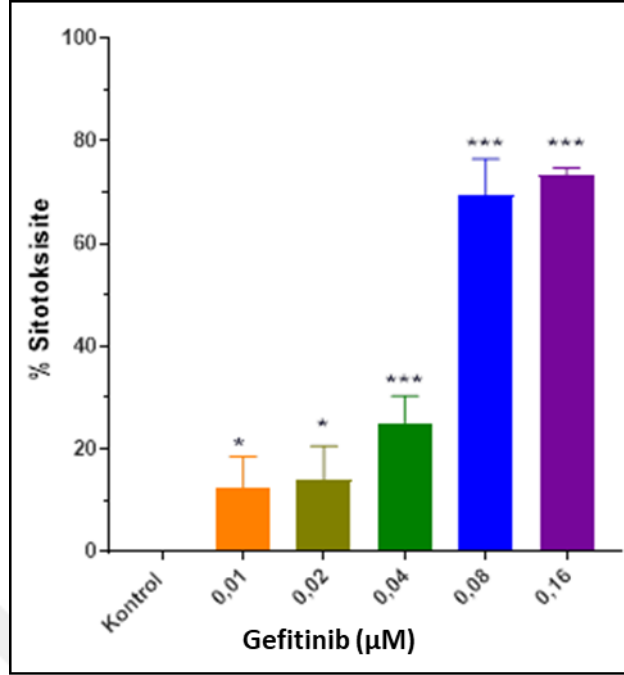


Şekil 38. 30 numaralı molekülün NCI-H358 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (µM) bağlı sitotoksosite etkileri

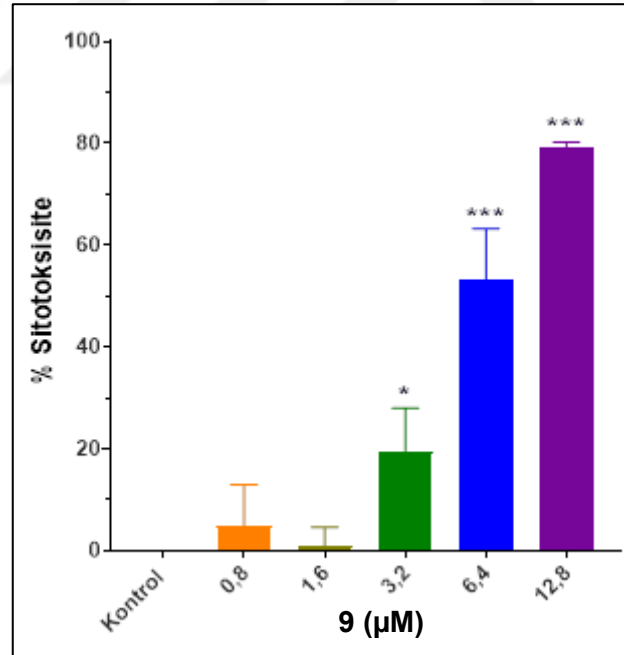


Şekil 39. 31 numaralı molekülün NCI-H358 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (µM) bağlı sitotoksosite etkileri

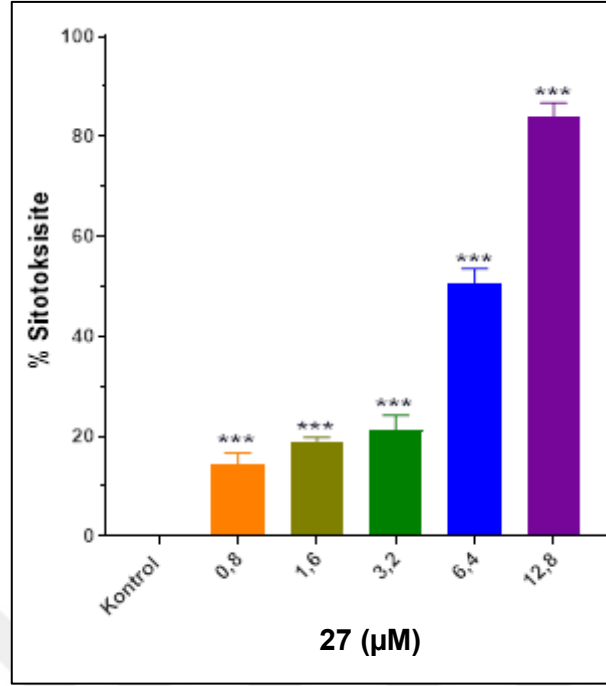
SKOV-3 hücre hattında Gefitinib ve 9, 27, 30, 31 numaralı moleküllerin doza bağlı sitotoksosite etki grafikleri Şekil 40-44'de verilmiştir.



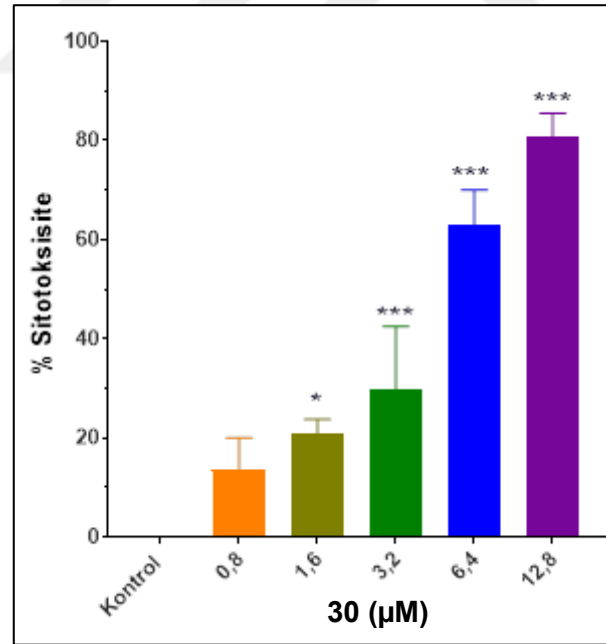
Şekil 40. Gefitinib inhibitörünün SKOV-3 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (μM) bağlı sitotoksosite etkileri



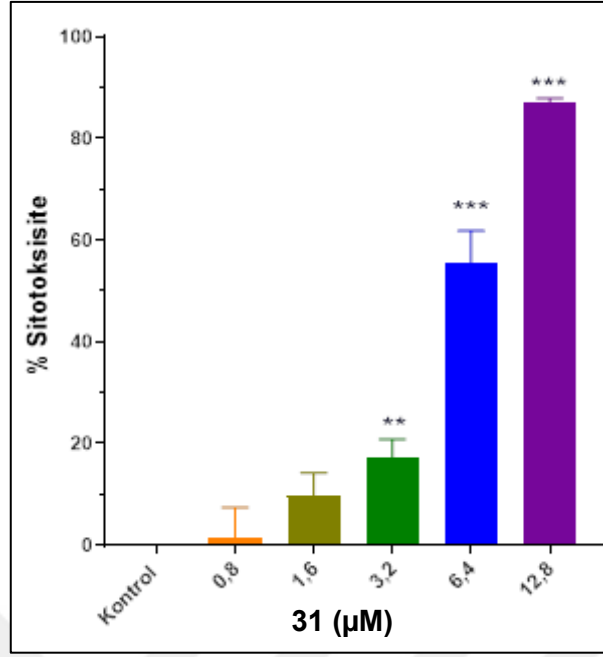
Şekil 41. 9 numaralı molekülün SKOV-3 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (μM) bağlı sitotoksosite etkileri



Şekil 42. 27 numaralı molekülün SKOV-3 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (µM) bağlı sitotoksosite etkileri



Şekil 43. 30 numaralı molekülün SKOV-3 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (µM) bağlı sitotoksosite etkileri



Şekil 44. 31 numaralı molekülün SKOV-3 hücreleri üzerindeki konsantrasyona (µM) bağlı sitotoksosite etkileri

4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Hastalık tedavisinde enzimler, ilaç moleküllerinin hedefi olarak oldukça önemli bir yere sahiptir. Bunun sebebi, birçok hastalığın vücuttaki enzim etkinliğine bağlı olmasının yanında hastalığa neden olan enzimlerin küçük molekül ağırlıklı inhibitör moleküllerle inhibe olabilmelerinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle klinik olarak kullanılan ilaçların büyük bir kısmı enzim inhibitörü olarak görev yapmaktadır. Bunun sonucunda, yakın gelecekte de farmasötik araştırmaların temel noktasını spesifik enzim inhibisyonlarının oluşturacağı düşünülmektedir (Copeland, 2005).

Günümüzde kanserin büyümesine, ilerlemesine ve yayılmasına yol açan belirli moleküllere müdahale ederek kanserin büyümesini ve yayılmasını engelleyen ilaçlar olarak karşımıza hedefe yönelik kanser tedavileri çıkmaktadır (Perez-Herrero ve Medarde, 2015). Kanser tedavisi için moleküler hedefleme stratejileri, artan tümör özgülüğü sağlama potansiyelleri açısından geleneksel kemoterapi ve radyoterapiden farklıdır. Onkolojide yüksek umut vadeden belirli bir moleküler hedef, epidermal büyüme faktörü reseptörüdür (EGFR). EGFR, birçok epitelyal malignitede aşırı eksprese edilir, düzensizleşir veya mutasyona uğrar. Bu sebeple EGFR aktivasyonu, tümör büyümesi ve ilerlemesinde önemli görülmektedir. Setuksimab (Erbix) gibi EGFR'nin hücre dışı alanını hedefleyen monoklonal antikorlar (mAb'ler) ve gefitinib (Iressa) ve erlotinib (Tarceva) gibi EGFR'nin reseptör katalitik alanını hedefleyen küçük molekülü tirozin kinaz inhibitörler (TKİ'ler) olmak üzere iki baskın EGFR inhibitörü sınıfı geliştirilmiştir (Harari, 2004).

Son birkaç on yılda, antikonvülsan (Kamboj vd., 2015), antikanser, antidepresan (Bhatnagar vd., 2011), antibakteriyel (Karabasanagouda vd., 2007), antifungal (Sztanke vd., 2008), antiinflamatuvar, analjezik (Sarigol vd., 2015) ve antiviral (Küçükgül vd., 2008) aktiviteler gibi geniş biyolojik aktiviteler yelpazesinden dolayı 1,2,4-triazol türevlerine büyük önem verilmiştir. Bununla birlikte, 1,2,4-triazollerin Schiff ve Mannich bazı türevlerinin sentez yollarının basitliği ve farklı uygulamalarda kullanılabilirlik olmaları bu bileşiklerin son yıllarda daha fazla ilgi çekmelerine neden olmuştur (Haijian vd., 1998).

Çalışma kapsamında sentezlenen moleküller hEGFR inhibisyon potansiyelleri açısından değerlendirilmiş ve bu amaçla her bir molekül için IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Bunun yanında en düşük IC_{50} değerine sahip olan 9, 11, 13, 14, 22, 24, 26, 27, 28, 29, 30,

31 ve 32 numaralı moleküller seçilerek inhibisyon mekanizmaları araştırılmış ve bu moleküllerin K_i değerleri belirlenmiştir. Seçilen moleküllerin inhibisyon türünü belirlemek amacıyla, öncelikle hEGFR için K_m ve V_{maks} değerleri hesaplanmıştır. İnhibisyon mekanizması belirlenirken çalışmalar %10-75 inhibisyona neden olan inhibitör konsantrasyon aralığında gerçekleştirilmiştir (Copeland, 2005). Bununla birlikte, organik moleküllerin çözünürlükleri ve çözücünün sebep olabileceği inhibisyon etkisi, çalışmada kullanılan organik moleküllerin konsantrasyon aralığının belirlenmesinde etkili olmuştur.

Bu amaçla, moleküllerin en iyi çözündüğü DMSO, çözücü olarak kullanılarak stok çözeltileri hazırlandı. Enzim aktivite reaksiyonları hazırlanırken inhibitör çözeltilerinin reaksiyon ortamındaki son konsantrasyonu %3 olarak ayarlandı (Copeland, 2005). DMSO'nun da hEGFR üzerinde inhibitör etkisi olabileceğinden, sadece bu çözücünün varlığında aktivite ölçümü gerçekleştirildi ve çözücünden gelebilecek inhibisyon etkisi bertaraf edilmiş oldu. Çalışılan organik moleküllerin her birinin davranış şekli farklı olduğundan, yapılan inhibisyon çalışmalarında kullanılan konsantrasyon aralıkları farklılık göstermiştir (Şekil 8-18). Gerçekleştirilen çalışmalar neticesinde elde edilen IC_{50} değerleri ve moleküllerin maksimum inhibisyon konsantrasyonları Tablo 4'de toplu olarak verilmiştir. Sonuçlar göz önüne alındığında referans molekül olarak kullandığımız gefitinib inhibitörüne en yakın IC_{50} değerine sahip olanların 9, 27, 30, 31 numaralı moleküller olduğu görülmüştür. Bu moleküllerin yanında düşük IC_{50} değerine sahip 11, 13, 14, 22, 24, 26, 28, 29 ve 32 numaralı moleküller de dikkate alınarak çizilen $1/V-1/[S]$ grafiklerinden bu moleküllerin inhibisyon türleri belirlendi (Şekil 19-20, Tablo 5-6). Gerçekleştirilen bu çalışma sonucunda, 9, 11, 13 ve 14 numaralı moleküllerinin unkompetitif inhibisyona ve 22, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31 ve 32 numaralı moleküllerinin ise nonkompetitif inhibisyona neden oldukları belirlendi. Belli bir başlangıç molekülünden türeyen ve belli pozisyondaki değişken gruplara türevlendirilen bileşiklerin inhibisyon mekanizmalarının benzer olabileceği literatürde bildirilmiştir (Copeland, 2005). Nonkompetitif inhibisyon durumunda enzimin aktif bölgesi dışında serbest enzime veya enzim-substrat kompleksine zayıf etkileşimle ve dönüşümlü olarak bağlanması sonucu inhibisyonun gerçekleştiği söylenebilir. Unkompetitif inhibisyon ise, inhibitörün enzim substrat kompleksine zayıf etkileşimle ve dönüşümlü olarak bağlanmasıyla gerçekleşmektedir.

Bu çalışmaların sonucu olarak inhibisyon türü araştırılan moleküller için K_i değeri matematiksel olarak hesaplanmıştır (Tablo 5, 6). Elde edilen sonuçlardan en iyi K_i değerine sahip olan molekülün 0,00232 μM değeriyle 31 numaralı bileşiğinin olduğu ve bunu

takiben de 0,0889 μ M ile 9 numaralı bileşimin olduğu görülmektedir. Diğer bileşiklerin K_i değerlerinin ise hemen hemen birbirine yakın olduğu gözlenmiştir. Literatür veri tabanları (wos ve scopus) incelendiğinde 1,2,4-triazol iskeletine sahip moleküllerle ilgili olarak, tez çalışmalarına başlandığı tarihten günümüze kadar olan süreçte, tez kapsamında yapılan çalışmalara benzer olarak, ELISA kit kullanarak inhibitör moleküllerin IC_{50} değerlerinin, inhibisyon mekanizmasının ve K_i değerlerinin belirlendiği bir araştırmaya rastlanamamıştır. Bununla birlikte, farklı kimyasal yapıdaki moleküllerin hücre kültürüne yönelik EGFR inhibisyonu çalışmaları literatürde mevcuttur.

Tez kapsamında gerçekleştirilen bu kinetik çalışmalarla, 1,2,4-triazol bileşiklerinin hEGFR üzerine inhibisyon etkisinin incelenmesi ve inhibisyon tipinin belirlenmesi açısından literatüre yeni bir bakış açısının kazandırılabilceği düşünülmektedir. Ayrıca elde edilen bulgular dikkate alındığında, sentezlenen moleküllerden 31, 27, 30 ve 9 numaralı moleküllerin IC_{50} değerleri standart inhibitör olarak kullanılan gefitinib ile kıyaslandığında umut verici ve geliştirilebilir inhibitör aday moleküller olabilecekleri söylenebilir.

Tez çalışmamızdaki bütün moleküllerin SwissADME çalışması sonucu, Lipinski ve Veber veri tabanlı filtreleme programlarına göre moleküllerin hepsinin ilaç benzerliğinin olduğu belirlenmiştir. Moleküllerin farmakokinetik, temel fizikokimyasal, ilaca benzerlikle ilgili Tablo 8’de sunulan verileri incelendiğinde, molekül ağırlıklarının 6 numaralı molekül haricinde Lipinski kuralına göre uygun olduğu, lipofilite kriterlerinden olan MLOGP değerinin ise 3, 17, 20-23 ve 32 numaralı molekül için bu kurala uymadığı görülmüştür. Ayrıca, tüm moleküllerin ilaç benzerlik tanımlama programlarından Veber kuralına uygun olduğu da tespit edilmiştir. SwissADME çalışmasında, moleküllerin tıbbi kimya özelliklerinin belirlendiği filtreleme programı Brenk ile molekül üzerindeki sorunlu olma potansiyeli olan gruplar tanımlanmış ve tez çalışmamız kapsamında sentezlenen moleküllerin çoğunda (1, 2, 3, 15, 16, 17, 24 hariç) yer alan tiyokarbonil grubu için sistem uyarı vermiştir. Moleküllerin tümünün topolojik polar yüzey alan değerlerinin sınırlar içerisinde olduğu belirlenmiştir. Bu durum, moleküllere ait biyoyararlanım radar grafiklerinde, “POLAR” bölgesi olarak gösterilmektedir. Doygunluk parametresi olan csp3 fraksiyon değeri, en az 0,25 olması gerekirken sentezlenen moleküllerin hiç birinin bu değere ulaşmadığı belirlenmiştir. Biyoyararlanım radar grafiğinde “INSATU” bölgesi olarak gösterilen csp3 fraksiyon değerine en çok yaklaşanların, 0,24 değerleriyle 32 ve 14 numaralı moleküller ve ikinci olarak 0,20 değerleriyle 31, 30, 18, 13, 12 numaralı

moleküller olduğu tespit edilmiştir. SwissADME çalışmaları sonucunda moleküllerin, farmakokinetik özelliklerini belirlemede kullanılan, üzerinde etkili oldukları enzim sistemleri incelendiğinde, bütün moleküllerin CYP2C9 ve CYP2C19 enzim sistemleri üzerinde etkili olacağı tahmin edilmektedir. Bazı moleküllerin ise Tablo 7’de görüldüğü gibi bu enzim sistemlerinin haricinde, CYP1A2 (27, 30 ve 31 numaralı molekül dahil) ve CYP3A4 (9, 27, 30 ve 31 numaralı molekül dahil) enzim sistemleri üzerinde de etkili olacakları tahmin edilmektedir. SwissADME çalışmaları sonucu, Tablo 7’de yer alan moleküllerin yanısıra diğer moleküllerin de Abbot biyoyararlanım skorunun 0,55 olduğu ve bu değerın gefitinib biyoyararlanım skoru ile aynı olduğu tespit edilmiştir. Yine bu çalışmalar sonucu, 3,26 sentetik erişilebilirlik puanı olduğu tespit edilen gefitinib gibi 3,19-3,68 arasındaki sentetik erişilebilirlik puanlarıyla sentezlenen moleküllerin de oldukça kolay erişilebilir oldukları söylenebilir.

Şekil 22’deki moleküllerin ESOL metoduna göre hesaplanan logS değerleri incelendiğinde ise 6, 18, 20, 21, 22, 23 ve 32 numaralı moleküllerin logS değerlerinin 6-10 aralığında ve zayıf çözünürlüğe sahip olduğu, 3,96 logS değerine sahip 7 numaralı molekülün çözünür nitelikte olduğu, diğer moleküllerin ise logS değerlerinin 6-4 aralığında ve orta dereceli çözünürlüğe sahip olduğu tahmin edilmektedir.

Moleküllerin ilaç benzerliklerinin tahmininde kullanılan Şekil 24’deki biyoyararlanım radar grafikleri incelendiğinde lipofiliklik, boyut, polarite, çözünürlük, esneklik ve doyumluk gibi kriterlerin tümü bakımından optimal değerlerle örtüşen moleküllerin, 12, 13, 14, 30, 31 ve 32 olduğu ve doyumluk değeri hariç olmak üzere diğer moleküller için de biyoyararlanım grafiğindeki optimal değerlerinin sağlandığı görülmektedir. Çalışmamızda yer alan moleküller ile gefitinib referans ilacının biyoyararlanım grafikleri karşılaştırıldığında gefitinib ile en fazla örtüşen moleküllerin 12, 13, 14, 30, 31 ve 32 olduğu anlaşılmaktadır. Biyoyararlanım radar grafik görüntüleri hücre kültürü çalışması için uygun bulunan 9, 27, 30 ve 31 numaralı molekül özelinde değerlendirildiğinde, grafik görüntülerinin hücre kültürü çalışma sonuçlarını destekleyecek şekilde olduğu ve radar değerlerinin optimal aralığı temsil eden pembe alanla büyük ölçüde örtüştüğü görülmüştür. Grafiklerde, 9 ve 27 numaralı moleküllere ait doyumluk değerlerinde optimum değerlerden sapma olduğu, 9, 27, 30 ve 31 numaralı moleküllere ait doyumluk değeri dışında kalan bütün grafik değerlerinin optimum değerler içerisinde kaldığı görülmektedir.

SwissADME çalışmaları sonucu, sentezlenen bütün moleküllerin değerlendirildiği Şekil 23'deki WLOGP-TPSA (haşlanmış yumurta grifiği) grafiği incelendiğinde, moleküllerimizin hemen hemen hepsinin (32, 23 ve 14 numaralı moleküller hariç) gastrointestinal emilim olasılığının yüksek olacağı ancak moleküllerimizin hiç birisinin BBB (blood-brain barrier) sistemi penetrasyon olasılığının olmayacağı ve beyine ulaşamayacağı tahmin edilmektedir. Bu nedenle, çalışmamızda yer alan moleküllerin (32, 23 ve 14 numaralı moleküller hariç) gefitinib ile gastrointestinal emilim bakımından benzediği ancak hiçbirinin ise BBB sistemi penetrasyonu bakımından benzemediği görülmüştür. Ayrıca bu grafiğe göre 15, 16, 18, 19, 23, 24, 30, 31 ve 32 numaralı moleküllerin p-glikoprotein ile etkileşimleri olurken diğer moleküllerin etkileşiminin olmayacağı tahmin edilmektedir.

In vivo sitotoksiste çalışmalarında, literatürde bu tür çalışmalarda en çok kullanılan hücre hatları olan insan akciğer karsinom hücre hattı A549, insan küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hattı NCI-H358, over kanseri hücre hattı SKOV-3 ve OVCAR-3 ve ayrıca sağlıklı kontrol hücre grubu olarak kullanılan sağlıklı akciğer hücre hattı WI-38 kullanıldı. Enzimin aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu (IC_{50}) değerleri incelendiğinde en iyi IC_{50} değerlerine sahip 9, 27, 30 ve 31 numaralı moleküllerin belirtilen hücre hatlarında MTT testi ile sitotoksik etkileri incelendi. Yapılan çalışmalarda gefitinib molekülü pozitif kontrol olarak değerlendirildi. A549, NCI-H358 ve SKOV-3 hücre hatlarında gefitinib inhibitörü ve 9, 27, 30 ve 31 numaralı moleküllerin artan konsantrasyonlarda daha fazla sitotoksik etki yarattığı tespit edildi.

Tablo 9'da gefitinib ve 9, 27, 30 ve 31 numaralı moleküllerin WI-38, A549, NCI-H358, SKOV-3 ve OVCAR-3 hücrelerinin IC_{50} değerleri gösterilmektedir. Elde edilen bulgulara, sağlıklı hücre hattına karşı 30 numaralı molekül ile gefitinib IC_{50} değerlerinin aynı olduğu 31 ve 27 numaralı moleküllerin standart molekülden sırasıyla 51 ve 71,2 kat daha yüksek olduğu ve 9 numaralı molekülün ise IC_{50} değerinin belirlenemediği gözlemlendi. Sağlıklı hücre hatlarında, kullanılan moleküllerin sitotoksitesinin az olması beklendiğinden, 9, 31 ve 27 numaralı moleküllerin gefitinib inhibitöründen daha iyi sonuç verdiği görülmektedir. Kanserli hücre hatlarında yapılan denemelerde ise, gefitinib inhibitörünün tüm hücre hatlarında daha iyi IC_{50} değerine sahip olduğu gözlemlenmiştir; A549 hücre hattına karşı 27 numaralı molekülün, NCI-H358 hücre hattına karşı 9 numaralı molekülün ve SKOV-3 hücre hattına karşı ise 30 numaralı molekülün IC_{50} değerleri açısından en etkin inhibitörler oldukları bulunmuştur (Tablo 9). Bu durumun hücrelerin

inhibitör moleküllere olan duyarlılığı veya hücre içerisine girişleri ile açıklanabileceği düşünülmektedir.

Aşağıda, 1,2,4-triazol moleküllerinin EGFR ve farklı kanser hücre hatları üzerindeki inhibisyon etkileri ve sitotoksik aktivitelerinin araştırıldığı literatürdeki bazı çalışmalarla ilgili bilgi verilerek, bu çalışmalardan elde edilen sonuçlarla tez çalışmamızın sonuçları karşılaştırılmıştır.

Tez çalışmamızda yer alan moleküllerin inhibisyon aktiviteleri incelendiğinde, yapılarındaki farklı substituent grupların inhibisyon aktivitesi üzerine etkileri olduğu anlaşılmıştır. Konuyla ilgili olarak Acar ve Altuntaş (2019) tarafından yapılan derleme çalışmasında, EGFR inhibitörlerinin en büyük kimyasal sınıflarından biri olan kinazolinlerin yapısında bulunan farklı substituentlerin antikanser aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada, molekül bünyesinde bulunan 4-anilino grubunun, EGFR kinaza karşı seçiciliği artırdığı belirtilmiştir. Ayrıca, anilin grubundaki 3-bromo, 3-hidroksi, 4-hidroksi ve 4-kloro substituentlerinin varlığının molekülün etkinliği üzerinde olumlu katkı sağladığı, 4-anilokinazolin'in 6 ve 7 numaralı konumlarında bulunan oksijen atomlarının metil, etil veya propil gibi gruplarla birleşerek halka meydana getirmesi neticesinde molekülün antiproliferatif etkisinin arttığı belirtilmiştir. Kinazolinlerin bünyesinde bulunan 4-kloro anilinin enzim aktivitesi üzerinde göstermiş olduğu etkiye benzer şekilde, çalışmamızda yer alan moleküllerde de 4-klorofenil substituentinin etkisi görülmüştür. Çalışmamızda en yüksek inhibisyon aktivitesi gösteren moleküllerin (9, 27, 30, 31) tümünün yapısında 4-klorofenil substitüenti olduğu ve iki adet 4-klorofenil substitüenti barındıran 31 numaralı molekülün IC₅₀ değerinin bir adet bulunduran diğer moleküllerin (9, 27, 30) yarısı kadar olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgulardan yola çıkarak 4-klorofenil substituentinin EGFR kinaz enzim inhibisyonunda önemli bir katkıda bulunduğu söylenebilir. Bu düşüncayı destekler nitelikte olan başka çalışmalara da literatürde rastlanmıştır.

El-Sherief ve ark (2018a ve 2018b) tarafından yapılan iki farklı çalışmada, 1,2,4-triazol iskeletine sahip yeni sentezlenen bir dizi molekülün MTT yöntemi kullanılarak farklı hücre hatlarına karşı antiproliferatif aktiviteleri incelenmiş ve en iyi aktivite gösterenlerin daha sonra EGFR, BRAF ve tubulin hedeflerine karşı inhibisyon edici etkinlikleri araştırılmıştır. Sonuç olarak, bir çalışmada (2018b) EGFR'ye karşı en iyi inhibisyon aktiviteye sahip olduğu anlaşılan 8c (R: piridin-3-il ve R₁: 4-OCH₃) ve 8d (R: piridin 4-il ve R₁: 4- OCH₃) bileşiklerinin sırasıyla 3,6 µM ve 4,6 µM IC₅₀ değerine sahip

olduğu bildirilmiştir. Diğer çalışmada (2018a) ise 14d (R_1 : 4- OCH_3 ve R_2 : 4-Cl), 14e (R_1 : 3,4,5-tri(OCH_3) ve R_2 : H) ve 14f (R_1 : 3,4,5-tri(OCH_3) ve R_2 : 4-Cl) bileşiklerinin IC_{50} değerleri sırasıyla 1,5 μM , 2,8 μM ve 1,7 μM olarak, standart olarak ise erlotinib IC_{50} değeri 0,07 μM olarak hesaplanmıştır. Bu çalışmadaki moleküllerin hücre kültürü çalışmalarında, A549 hücre hattına karşı 10 μM sabit konsantrasyonda 11b maddesiyle %32 oranında büyüme inhibisyonu tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada OVCAR-3 hücre hattında inhibisyon gözlenememiştir. Bu sonuçlara bakıldığında, bu moleküllerin EGFR'ye karşı güçlü birer inhibisyon aktivitesi sergilediği ancak, bu değerler çalışmamızda elde edilen değerlerle karşılaştırıldığında, en düşük 0,4-0,8 μM 'lık IC_{50} değerleriyle çalışmamızdaki 9, 27, 30 ve 31 numaralı moleküllerin EGFR'ye karşı daha iyi inhibisyon aktivitesi sergilediği görülmüştür.

Hashem vd (2022) tarafından yeni sentezlenen 1,2,4-triazol ve 1,3,5-triazin türevleriyle gerçekleştirilen sitotoksikite çalışmasında, dört kanser hücre hattı (HepG-2, PC-3, MCF-7 ve A549) ve normal periferik kan mononükleer hücre hattı kullanılmış ve bazı moleküllerin EGFR^{WT} ve EGFR^{T790M} mutasyonu üzerindeki etkinlikleri, *in vitro* ortamda, erlotinib ve doxorubicin standart ilaçlarla kıyaslanarak değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda, en güçlü sitotoksik aktiviteyi, MCF-7 hücre hattına karşı 1,29-4,30 μM arasında değişen IC_{50} değerleriyle 6a-c 1,2,4-triazol moleküllerinin sergilediği ve bu değerlerin 4,16 ve 4,17 μM 'lık IC_{50} değerine sahip referans ilaçların değerlerine yakın olduğu belirlenmiştir. A549 hücre hattının ise bu bileşiklere karşı (3,18-5,85 μM arasında değişen IC_{50} değerleriyle) 8,20 μM IC_{50} değerine sahip doxorubicine göre yaklaşık 1,3-2,6 kat daha fazla duyarlı olduğu, 3,76 μM IC_{50} değerine sahip erlotinibe karşı ise yaklaşık eşit duyarlılık sergilediği görülmüştür. Çalışmamızdaki 9, 27, 30, 31 numaralı moleküllerin A549 hücre hattına karşı elde edilen IC_{50} değerlerinin bu çalışmadaki moleküllerin A549 hücre hattına karşı elde edilen değerlerine yakın olduğu görülmektedir. Sentezlenen tüm moleküller ise normal hücre hattına karşı düşük sitotoksik aktivite göstermiştir. Diğer taraftan, 5a-c, 6a-c numaralı 1,2,4-triazol molekülleri, referans ilaçlarla karşılaştırıldığında, EGFR^{T790M} mutantına karşı daha fazla inhibitör potansiyeli göstermekle birlikte, doğal tip EGFR'ye karşı da umut verici inhibitör etki gösterdiği anlaşılmıştır. Ayrıca, 6b molekülü her iki mutanta karşı en güçlü inhibitör etkiyi göstermiştir. Yapılan incelemede, çalışmamızda EGFR'ye karşı en iyi inhibisyon aktiviteyi gösteren moleküller ile bu çalışmadaki EGFR^{WT} ve EGFR^{T790M} mutantına karşı en iyi aktiviteyi gösteren moleküllerin inhibisyon aktivitelerinin oldukça yakın olduğu görüldü.

Emami ve arkadaşları (2022) tarafından sentezlenen on dokuz yeni 1,2,4-triazol bazlı molekülün kimyasal yapıları IR, ¹H-NMR, kütle spektrumları ve element analizi ile doğrulanmış ve ADME özellikleri, SwissADME yazılımı kullanılarak belirlenmiştir. Çalışmadaki en iyi sitotoksik aktivite gösteren moleküllerin ADME sonuçları, tez çalışmamızdaki EGFR kinaz üzerinde en iyi inhibisyon aktivitesi gösteren moleküler (9, 27, 30, 31) ile karşılaştırıldığında ise her iki çalışmadaki moleküllerin fizikokimyasal özelliklerinin Lipinski/Veber kurallarına (MW, LogP, HBD, HBA, dönebilen bağ sayısı, TPSA) uygun olduğu belirlenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin *in vitro* sitotoksik aktivitesi, MTT yöntemi kullanılarak MCF-7, Hela ve A549 kanser hücre hatlarına karşı değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, sentezlenen bileşiklerin, MCF-7 ve Hela kanser hücre hatlarına karşı nispeten yüksek ve orta dereceli antiproliferatif aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. 7d, 7e, 10a ve 10d molekülleri, test edilen üç hücre hattına karşı en güçlü aktiviteyi göstermiştir. Ancak, moleküllerin A549 hücre hattına karşı IC₅₀ değerlerinin (9,4 µM < IC₅₀ < 177,3 µM) diğer hücre hatlarına kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Diğer taraftan, bu değerlerin, çalışmamızda yer alan moleküllerin A549 hücre hattına karşı elde edilen IC₅₀ değerlerinden yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu durumda, çalışmamızdaki moleküllerin A549 hücre hattına karşı daha iyi sitotoksik aktivite gösterdiği anlaşılmaktadır. Ayrıca, bu çalışmadaki moleküllerin yapı-aktivite ilişkileri incelendiğinde, fenil halkası üzerinde bulunan elektronegatif sübstituentlerin varlığının yanı sıra bir karbonil grubunun varlığının da sentezlenen bileşiklerin sitotoksik aktivitesinde nispi bir artışa neden olduğu belirlenmiştir.

Shahzadi ve arkadaşlarının (2021) yürütmüş olduğu bir çalışmada, N-fenil asetamid gruplarına sahip teofilin-7-asetik asit (asefilin) türevi yeni 1,2,4-triazol bileşikleri sentezlenmiş (11a-j) ve bu moleküllerin A549 ve MCF-7 kanser hücre hatlarına karşı MTT yöntemi kullanılarak inhibisyon potansiyelleri ve hücre canlılıkları araştırılmış ve 11a, 11c, 11d, 11g ve 11h moleküllerinin her iki hücre hattına karşılık elde edilen canlılık değerlerinin yaklaşık % 20-60 aralığında olduğu tespit edilmiştir. Moleküllerin A549 hücre hattına karşı IC₅₀ değerleri incelendiğinde en güçlü ajanın, en düşük IC₅₀ değerine (1,25 µM) sahip 11g molekülü olduğu kabul edilmiştir. Bu çalışmadaki A549 hücre hattına karşı elde edilen sitotoksikite sonuçları, çalışmamızdaki 9, 27, 30, 31 numaralı moleküllerin sonuçlarıyla kıyaslandığında, 11g molekülü hariç bütün 1,2,4-triazol moleküllerin IC₅₀ değerlerinin çalışmamızda yer alan moleküllerden çok daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu da çalışmış olduğumuz moleküllerin anti-kanser ilaç olabilme potansiyellerinin daha

yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca 11g molekülünün docking çalışmaları da yapılmış ve sonuçları biyolojik tespit çalışma sonuçları ile uyumlu çıkmıştır. Güncel çalışmalarda, asefinil bağlı triazol moleküllerinin öncü bileşikler olacağı ve asefinilli bu bileşikler üzerinde gerçekleştirilecek daha fazla modifikasyonun, anti-kanser ilaçlarındaki ilerlemeyi artırabileceği belirtilmektedir.

Alsaad ve arkadaşları (2022) bir çalışmada, 1,2,4-triazol molekülleri (H7-H12) sentezlemiş ardından bu triazol molekülleri DCC kullanılarak mefenamik asit ile reaksiyona sokularak nihai moleküller (HB1-HB6) sentezlenmiştir. Ardından bu bileşiklerin, A549 ve Hep G2 kanser hücre hattı ve WI-38 normal hücre hattına karşı, MTT yöntemi kullanılarak, sitotoksik özellikleri ve EGFR tirozin kinaz inhibisyon aktiviteleri araştırılmıştır. Çalışma sonunda, sentezlenen altı molekülün her iki kanser hücre hattına karşı sitotoksik özellik gösterdiği ve HB5 molekülünün, Hep G2 hücre hattına karşı, 2,87 μM ile en düşük IC_{50} değerini sergilediği belirlenmiştir. A549 hücre hattına karşı moleküllerin IC_{50} değerleri ise 9,69-18,74 μM aralığında tespit edilmiştir. Bu değerler, hücre kültürü çalışmamızda kullanılan moleküllerin A549 hücre hattına karşı elde edilen değerlerden daha yüksektir. Bu bakımdan, hücre kültürü testine tabi tutulan moleküllerimizin sitotoksik aktivitelerinin daha iyi olduğu söylenebilir. HB5 molekülünün kanser hücrelerine karşı seçici olup olmadığının anlaşılması için WI-38 normal hücre hattına karşı sitotoksik aktivitesi incelenmiş olup, 23,67 μM 'lık IC_{50} değeri ve 8,25'lik seçicilik indeksi değeri ($\text{SI} = \text{IC}_{50, \text{normal hücre}} / \text{IC}_{50, \text{kanser hücreleri}}$) ile kanser hücrelerine karşı oldukça iyi bir seçicilik özelliğine sahip olduğu tespit edilmiştir. Alsaad ve arkadaşlarının yürütmüş olduğu çalışmada ayrıca, 1,2,4-triazol moleküllerinin ve erlotinibin ADME özellikleri incelenmiş ve HB1'in en iyi ADME özelliklerine sahip olduğu kanısına varılmıştır. Çalışmamızdaki ve bu çalışmadaki moleküllerin ADME çalışma sonuçları karşılaştırıldığında, gastrointestinal emilim ve kan-beyin bariyer geçişi verileri bakımından her iki çalışmadaki moleküllerin benzer etkiler gösterdiği anlaşılmaktadır. Ayrıca, CYP enzim sistemlerine yönelik metabolizma profillerinin incelenmesi sonucu moleküllerin, karaciğer enzimlerinin çoğuna karşı herhangi bir inhibitör etki göstermediği ve sonuçların erlotinib sonuçlarıyla paralellik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar bakımından ise çalışmamızdaki moleküllerin CYP enzim sistemleri üzerine daha iyi inhibitör etkisi göstereceği tahmin edilmektedir. Diğer taraftan, bileşiklerin yapı-aktivite ilişkileri incelendiğinde bazı tespitler yapılmıştır. Buna göre, 4-nitrofenil grubuna sahip bileşiklerin, 4-fenil grubuna sahip olanlarla hemen hemen eşit aktivite gösterdiği,

hidrofobik kuyrukta klor grupları içeren bileşiklerin (HB2 ve HB5), MTT analizine göre hedeflenen hücrelere karşı en iyi aktiviteyi gösterdiği ve bu nedenle, HB5'deki klor türevinin HB6'daki metoksi türevinden ve HB4'deki fenil türevinden daha iyi olduğu kanısına varılmıştır. Bu kanı, çalışmamız sonucunda varılan, 1,2,4-triazol moleküllerinin sahip olduğu 4-4-klorofenil substitüentinin EGFR inhibisyonu üzerine olumlu katkı sağlayabileceği tespitini destekler niteliktedir.

Mohassab ve arkadaşları (2020), yapmış oldukları bir çalışmada, EGFR ve BRAF^{V600E} kinazlarını hedeflemek amacıyla 1,2,4-triazol grubu içeren 18 adet yeni kinolin/kalkon hibrit molekülleri sentezlemiş ve bu moleküllerin farklı hücre hatları (A549, MCF-7, Panc-1, HT-29) üzerindeki anti-proliferatif etkileri incelenmiştir. MTT yöntemi kullanılarak yapılan sitotksisite çalışmaları sonucunda, 7a, 7b, 9a, 9b ve 9d molekülünün umut verici anti-proliferatif aktivite gösterdiği ve bu moleküllerin docking çalışmalarında EGFR ve BRAF^{V600E} enzimine iyi bağlanma ilgilerinin olduğu değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, A549 kanser hücre hattına karşı elde edilen IC₅₀ değerlerinin çoğunun, çalışmamızdaki sitotoksik analizlerde elde edilen değerlerinden daha yüksek olduğu ancak 7b, 9b ve 9d moleküllerinin değerlerinin daha düşük olduğu (3,6-4,7 µM), 7a ve 9a molekülünün IC₅₀ değerlerinin ise çalışmamızdaki moleküller ile yakın olduğu görülmektedir. Bu çalışmada sentezlenen moleküllerden kanser hücre hatlarına karşı en iyi anti-proliferatif etki gösterdiği anlaşılan 7a, 7b, 9a, 9b ve 9d moleküllerinin EGFR ve BRAF^{V600E} enzim inhibisyon değerleri (IC₅₀= 1,3-4,8 µM), erlotinib referans ilacı değeriyle (IC₅₀ = 0,08 µM) karşılaştırılmıştır. Elde edilen bu değerlere bakıldığında, bu çalışmada sentezlenen moleküllerin standart ilaç olarak kullanılan erlotinibten ve tez çalışmamızdaki en iyi aktivite gösteren 9, 27, 30, 31 numaralı moleküllerden daha düşük EGFR enzim inhibisyon aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir.

Khairnar ve arkadaşları (2020) çalışmalarında, bir dizi 1,2,4-triazol-il-kuinazolin-4-on türevi moleküller (QT01-09) sentezleyerek karakterizasyon çalışması yapmıştır. Sentezlenen moleküllerin docking çalışmaları, EGFR-tirozin kinaz enzimini inhibe etme potansiyelleri ve bazı kanser hücre hatlarına (A549, HeLa, MCF-7) karşı antikanser özelliklerinin araştırılması yapılmıştır. QT01-09 moleküllerinin tümünün, ELISA yöntemi kullanılarak, enzim inhibisyon aktiviteleri araştırılmış ve QT07 molekülünün (%I=75,54) kıyaslandığı standart ilaca (%I=96) yakın EGFR inhibisyon aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir. Enzim testinden elde edilen bulgular, bu molekülün güçlü EGFR inhibitör aktivitesi gösterdiğini ve çeşitli kanser hücre hatlarına karşı iyi bir anti-kanser etkisine

sahip olabileceğini bildirilmiştir. Ancak, çalışmamızdaki moleküllerin EGFR enzimi üzerindeki % inhibisyon değerleriyle karşılaştırıldığında ise bu çalışmada elde edilen değerlerin daha düşük olduğu anlaşılmaktadır. Moleküllerin kanser hücre hatlarına karşı sergilediği inhibisyon etkilerine bakıldığında, EGFR üzerine iyi bir inhibisyon etkisi olduğu tespit edilen QT07 molekülünün, her üç kanser hücre hattına karşı güçlü bir aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (LC_{50} (μM)= 0,044 (HeLa); 1,54 (MCF-7); 0,154 (A549)). Ayrıca, QT03, QT04 ve QT08 molekülünün de her üç hücre hattına karşı hafif seviyede aktivite gösterdiği, diğer moleküllerin ise en az düzeyde aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Yapılan karşılaştırmada, QT07 molekülüne ait A549 hücre hattına karşı elde edilen LC_{50} değerinin, tez çalışmamızdaki sitotoksik çalışmalardan elde edilen en düşük IC_{50} değerine ($31=0,4 \mu M$) göre yaklaşık 2,5 kat daha düşük olduğu görülmektedir. Bu durum, QT07 molekülünün A549 hücre hattına karşı, çalışmamızda sentezlenen moleküllerden daha fazla sitotoksik aktiviteye sahip olduğuna işaret etmektedir.

Yahya ve Abdullah (2020), çalışmalarında bazı N'-benzilidenisonikotinohidrazid, 2,3-dihidro-1,3,4-okzadiazol (4a-h) ve 4,5-dihidro-1,2,4-triazol (5a-h) molekülleri sentezlemiş ve bu moleküllerin antitümör aktivitesi incelenmiştir. Sentezlenen moleküllerin MCF-7 kanser hücre hattına karşı sitotoksik aktiviteleri SRB kolorimetrik yöntemi kullanılarak incelenmiş ve sonuçlar standart inhibitör ilaç olarak kullanılan doxorubicin ile kıyaslanmış ve sentezlenen moleküllerin iyi ve orta düzeyde sitotoksik aktivite sergiledikleri sonucuna varılmıştır. Bu çalışmadaki MCF-7 hücre hattına karşı en iyi aktivite gösteren 1,2,4-triazol molekülünün (5c) IC_{50} değeri, tez çalışmamızda kullanılan kanser hücre hatlarına karşı elde edilen değerlerle kıyaslandığında her iki çalışmadaki IC_{50} değerlerinin birbirine oldukça yakın olduğu tespit edilmiştir. Diğer taraftan, bu çalışmadaki moleküllerin fenil grubuna bağlı substitüentlerin konumlarının, çalışmamızda gözlemlendiği gibi, antikanser aktiviteleri üzerinde büyük oranda etki gösterdiği de tespit edilmiştir.

Yang ve arkadaşları (2019) tarafından sentezlenen yeni 2-amino-4-(1,2,4- triazol) piridin türevlerinin (8a-b, 9a-b, 10a-l), önce HTRF yöntemi kullanılarak hem doğal tip EGFR kinaz hem de L858R/T790M mutant EGFR kinaz için enzimatik inhibitör aktiviteleri incelenmiştir. Daha sonra, moleküllerin bazı NSCLC hücre hatlarına ve glioblastoma (GBM) hücre hatlarına karşı anti-proliferatif sitotoksik aktiviteleri de incelenmiş ve bazı standart EGFR inhibitörlerin (gefitinib, erlotinib, osimertinib ve lazertinib) değerleriyle karşılaştırılmıştır. Ayrıca, sentezlenen moleküllerin *in silico*

ADMET çalışmaları yürütölüp, 10c ve 10j moleküllerinin kan-beyin bariyer geçişı yapabileceği ve iyi bir merkezi sinir sistemi penetrasyon özelliğine sahip oldukları tahmininde bulunulmuştur. Tez çalışmamızdaki moleküllerin ADME sonuçlarıyla karşılaştırıldığında, 10c ve 10j molekülünün kan-beyin bariyer geçişı sonuçları bakımından daha iyi sonuç vermiştir. Sitotoksik aktivite deneyleri sonucu, 8a ($IC_{50}=163,6$ nM) ve 10b ($IC_{50}=146,9$ nM) moleküllerinin mutant EGFR'yi sırasıyla, % 90 ve 87 oranda inhibe ettiği tespit edilmiştir. Ancak, R1 konumunda yer alan bir propanol grubuna sahip 8a molekülünün 10b'ye kıyasla hem NSCLC hem de GBM hücre hatları üzerinde daha zayıf anti-proliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu nedenle, daha sonra moleküldeki SCH₃ (R1) ve OCH₃ (R2) grupları sabit tutularak R3 konumundaki çeşitli hidrofilik grupların aktivite üzerine etkileri de incelenmiştir. Bu çalışma sonucunda ise R3 konumundaki trimetilmelandiamin grubunu içeren 10c molekülünün doğal tip ve mutant EGFR'ye karşı sergiledikleri %90 ve %105 inhibisyon oranlarıyla en güçlü inhibe edici aktiviteye sahip olduğu görölmüştür. Yapılan karşılaştırmada, 10c molekülünün bu çalışmada EGFR'ye karşı elde edilen en düşük IC_{50} değeriine sahip olduğu ve çalışmamızdaki 9, 27, 30 ve 31 numaralı moleküllerin IC_{50} değerlerinden yaklaşık 10-20 kat daha düşük değere sahip olduğu anlaşılmaktadır. Ancak, her iki çalışmadaki moleküllerin geneline bakıldığında ise çalışmamızda yer alan moleküllerin EGFR inhibisyon oranlarının daha yüksek olduğu görölmektedir.

Thabet ve arkadaşları (2022), yeni bis(1,2,4-triazolo[3,4-b][3,4-b][1,3,4]tiadiazin) (8a-l) ve bis((kinoksalin-2-il) fenoksi) alkan (10a-e) türevlerini sentezleyerek, EGFR ve PARP-1 molekül hedeflerine karşı apoptoz indüksiyonlarını değerlendirmiştir. Bu çalışmada, ayrıca MTT yöntemi kullanılarak MCF-7 ve MDA-MB-231 kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik çalışmalar yürütölmüş ve moleküllerin IC_{50} değerleri standart ilaç olarak kullanılan erlotinib değeriyle karşılaştırılmıştır. Sonuçlara göre, 8d, 8i ve 8l moleülleri her iki hücre hattına karşı en iyi aktiviteyi göstermiştir. Her iki hücre hattına karşı en iyi sitotoksik aktivite sergileyen 8i molekülünün seçicilik özelliğinin araştırılması için daha sonra normal hücre hattı olan MCF-10A'ya karşı sitotoksik aktivitesi incelenmiş ve 52,4 μ M'lık IC_{50} değeri ile zayıf bir sitotoksik aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuç, 8i molekülünün her iki meme kanseri hücre hattına karşı oldukça seçici bir özellik sergilediğini ifade etmektedir. Sitotoksik çalışma sonrası, en iyi aktiviteye sahip olan moleüller (8d, 8i ve 8l) seçilerek EGFR enzim hedefine karşı IC_{50} inhibisyon değerleri incelenmiş ve sırasıyla 123,1 nM, 64,65 nM ve 78,9 nM olarak hesaplanmıştır. EGFR'ye

karşı elde edilen bu IC_{50} inhibisyon değerleri tez çalışmamızdaki 9, 27, 30 ve 31 numaralı moleküllerin değerleriyle karşılaştırıldığında, 8d, 8i ve 8l molekülün sonuçlarının daha umut verici olduğu görülmektedir.

Youssef ve arkadaşları (2022) tarafından, EGFR ve PARP-1 enzim hedefli ikili inhibitör amaçlı sentezlenen yeni biyoaktif indolil-1,2,4-triazol hibritlerinin MTT yöntemi kullanılarak MCF-7 ve HepG2 kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik aktiviteleri tayin edilmiştir. Elde edilen IC_{50} değerleri erlotinibin değerleriyle karşılaştırılmış ve en fazla sitotoksik aktivite gösteren bileşiğin erlotinibden daha düşük IC_{50} değerine sahip olan 13b olduğu ve diğer moleküllerin ise orta düzeyde sitotoksik aktivite sergilediği kanısına varılmıştır. En fazla sitotoksik aktiviteye sahip olduğu belirlenen 13b molekülünün normal hücre hatlarına (MCF-10A ve THLE2) karşı inhibisyon yüzdeleri araştırılmış ve 13b molekülünün, kanser hücrelerine karşı etkili olurken sağlıklı hücreler üzerinde toksik etki göstermediği anlaşılmıştır. Daha sonra, sitotoksik çalışmada en iyi aktivite sergileyen moleküllerin EGFR ve PARP-1 enzim hedeflerine karşı inhibisyon aktiviteleri araştırılmıştır. EGFR ve PARP-1 hedefli gerçekleştirilen inhibisyon çalışmaları sonucu 13b molekülünün, erlotinibe ($IC_{50, EGFR}=80$ nM) karşılık elde edilen 62,4 nM'lık IC_{50} değeri ve olaparibe ($IC_{50, PARP-1}=1,49$ nM) karşılık elde edilen 1,24 nM'lık IC_{50} değerine bakıldığında, bu molekülün EGFR ve PARP-1 ikili enzim inhibisyonu için umut verici bir ajan olabileceği kanısına varılmıştır. Ayrıca, bu değerlerle çalışmamızdaki EGFR'ye karşı elde edilen en düşük IC_{50} inhibisyon değerleri karşılaştırıldığında, bu moleküllerin sonuçlarının daha umut verici olduğu görülmektedir. Diğer çalışmalardan ve tez çalışmamızdan farklı olarak, 13b molekülünün *in vivo* ortamda antikanser etkinliğinin doğrulaması yapılmış ve bunun için katı Ehrlich karsinom (SEC) hücreleri kullanılmış ve daha sonra deney farelerinde tümör yükü araştırılmıştır. Deney sonunda kan ve tümör parametrelerine bakıldığında, 13b molekülünün SEC hücrelerinin tümör etkinliğini önemli ölçüde azalttığı belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuç, tez çalışmamızdaki moleküllerin *in vivo* ortamda antikanser etkinliğinin araştırılması önerisi için teşvik edici olmuştur. Diğer taraftan, *in silico* çalışmada 13b molekülünün fiziksel ve kimyasal özellikleri ve ilaca benzerlik skorları gibi farmakokinetik özellikleri SwissADME programı kullanılarak tahmin edilmiştir. BOILED-Egg grafiğinden 13b molekülünün gastrointestinal geçişinin olduğu ancak kan-beyin bariyer geçişinin olmadığı sonucuna varılmıştır. 13b Molekülünün BOILED-Egg grafiğindeki görüntüsü, tez çalışmamızda yer alan moleküllerin çoğunluğunun görüntüsüyle örtüşmektedir. 13b Molekülünün biyoyararlanım grafiği

incelendiğinde de çalışmamızda kullanılan moleküllerin çoğunun biyoyararlanım grafiklerinde olduğu gibi “INSATU” değeri dışındaki değerlerin hepsinin sınırlar içerisinde kaldığı görülmektedir. Ayrıca, bu çalışmada sentezlenen moleküllerden, R gruplarında 4-4-klorofenil substitüenti barındıranların diğer substitüentlere kıyasla daha fazla sitotoksik aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. Bu yapı-aktivite ilişkisi, çalışmamızda yer alan moleküllerde de gözlenmiş olup çalışmamızdaki tespitleri destekler niteliktedir.



5. ÖNERİLER

Bu çalışmada, TÜBİTAK (1001) 118Z187 kodlu proje kapsamında sentezlenmiş hEGFR inhibitörü adayı olabilecek bileşiklerin enzim inhibisyon çalışmaları, *in vitro* sitotoksisite çalışmaları ve ADME çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Yapısında 4- klorofenil substitüenti bulunduran 9, 27, 30 ve 31 numaralı moleküllerin EGFR kinaz üzerindeki başarılı inhibisyon aktivitesi göstermeleri nedeniyle 4-klorofenil substitüenti taşıyan daha farklı 1,2,4-triazol molekülleri sentezlenip EGFR kinaz inhibisyon aktivitelerinin incelenmesinde yarar olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, çalışmamız kapsamında sentezlenen moleküllerin -NH, -CONHNHCSNH- gibi aktif substitüent içermesi nedeniyle bu moleküllerin kullanılması sonucu daha başka biyoaktif moleküllerin sentezlenmesi sağlanabilir.

Brenk filtreleme programına göre toksik olduğu ve kimyasal olarak reaktif, metabolik olarak kararsız veya zayıf farmakokinetikten sorumlu özellikler taşıdığı varsayılan tiyokarbonil grubu gibi sorunlu substitüentlerin olmadığı moleküller sentezlenerek, bu moleküllerin EGFR üzerinde nasıl bir etkiye sahip olacağı araştırılabilir.

Bir sonraki aşamada, çalışmamızda sentezlenen moleküllerden en yüksek inhibisyon aktivasyonu gösteren moleküllerin, *in vivo* ortamda antikanser etkinliklerinin doğrulamasının yapılması bu moleküllerin EGFR-TKİ ajanı olabilmesi yolunda önemli bir adımdır.

Kanser hücrelerinin EGFR mutasyonuna uğraması sonucu geliştirilen EGFR-TKİ'lere karşı zamanla direnç başlaması, kanser tedavisinde karşılaşılan en önemli sorunlardandır. Bu nedenle çalışmamızda en yüksek aktivite gösteren moleküllerin EGFR^{T790M} mutasyonlu kanser hücre hatlarına karşı *in vitro* sitotoksisite çalışmaları yapılabilir.

Ayrıca, iyi inhibisyon aktivitesi gösteren moleküller nanopartikül sisteme dönüştürülerek hedefe yönelik etkileri araştırılarak normal sistemle kıyaslamaları yapılabilir.

Yapılan çalışmalar sonucunda 1,2,4-triazol halkası içeren bileşiklerin EGFR inhibisyon aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir. 1,2,4-Triazol halkalı bileşiklerin, antikanser aktivitelerinin dışında, antikonvülsan ve antidepresan, anti-inflamatuar, analjezik, antioksidan, antitüberküler ve antimikrobiyal gibi çok geniş bir alanda biyolojik

aktivite gösterdikleri de bilinmektedir. Bu nedenle, çalışmamız kapsamında antikanser aktiviteleri araştırılan moleküllerin diğer biyolojik aktivitelerinin tayini için de bir çalışma gerçekleştirilebilir.

Tüm bu çalışmalardaki inhibisyon ve kinetik çalışmaları sonucu elde edilen veriler dikkate alındığında docking ve SwissADME çalışmalarıyla desteklenen ve biyokimyasal olarak optimize edilmiş daha etkili 1,2,4-triazol moleküllerinin tasarlanması ve sentezlenmesinin yolunun açılacağı düşünülmektedir.



6. KAYNAKLAR

- Abaan, O.D. ve Criss, W.E., 2002. Gene Therapy in Human Breast Cancer, Turkish Journal of Medical Sciences, 32, 283-291.
- Abbas, Z. ve Rehman, S., Neoplasm, Shahzad, H.N., 2018. First Edition, 139-157, Intechopen Ebook Press, London.
- Abourehab, M.A.S., Alqahtani, A.M., Youssif, B.G.M. ve Gouda, A.M., 2021. Globally Approved EGFR Inhibitors: Insights Into Their Syntheses, Target Kinases, Biological Activities, Receptor Interactions, and Metabolism, Molecules, 26, 6677, 1-56.
- Abou-Seri, S.M., 2010. Synthesis and Biological Evaluation of Novel 2,4'-Bis Substituted Diphenylamines as Anticancer Agents and Potential Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors, European Journal of Medicinal Chemistry 45, 4113-4121.
- Acar, C. ve Altuntaş, T.G., 2019. Hedefe Yönelik Kanser Tedavisinde Kullanılan Akıllı İlaçlar: EGFR İnhibitörleri, FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences, 44, 1, 47-63.
- Alam, M.M., 2022. 1,2,3-Triazole Hybrids as Anticancer Agents: Review, Archive der Pharmazie, 355, e2100158, 1-18.
- Al-Obeidi, F.A. ve Lam, K.S., 2000. Development of Inhibitors for Protein Tyrosine Kinases, Oncogene, 19, 5690-5701.
- Alsaad, H., Kubba, A., Tahtamouni, L.H. ve Hamzah, A.H., 2022. Synthesis, Docking Study, and Structure Activity Relationship of Novel Anti-tumor 1,2,4-Triazole Derivatives Incorporating 2-(2,3-Dimethyl Aminobenzoic Acid) Moiety, Pharmacia, 69, 2, 415-428.
- Al-Soud, Y.A., Al-Masoudi, N.A. ve Ferwanah, A.El-R.S., 2003. Synthesis and Properties of New Substitued 1,2,4-Triazoles: Potential Antitumor Agents, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 11, 1701-1708.
- Altundağ, Ö. ve Altundağ, K., 2005. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserlerinde Epidermal Büyüme Faktör Reseptör (Egfr) İnhibitörlerinin Yeri, Uluslararası Hematoloji-Onkoloji Dergisi, 15, 3, 165-174.
- Amer, M.H., 2014. Gene Therapy for Cancer: Present Status and Future Perspective, Molecular and Cellular Therapies, 2, 27, 1-19.
- Anguela, X.M. ve High, K.A., 2019. Entering the Modern Era of Gene Therapy, Annual Review of Medicine, 70, 273-288.

- Asati, V., Mahapatra D.K. ve Bharti, S.K., 2016. "PI3k/ Akt/Mtor and Ras/Raf/Mek/Erk Signaling Pathways Inhibitors as Anticancer Agents: Structural and Pharmacological Perspectives, The European Journal of Medicinal Chemistry, 109, 314-341.
- Atıcı, E., 2007. Tıp Tarihinde Kanser ve Lösemi, Türk Onkoloji Dergisi, 22, 4, 197-204.
- Banerji, B., Chandrasekhar, K., Sreenath, K., Roy, S., Nag, S. ve Saha, K.D., 2018. Synthesis of Triazole-Substituted Quinazoline Hybrids for Anticancer Activity and a Lead Compound as the EGFR Blocker and ROS Inducer Agent, ACS Omega, 3, 16134–16142.
- Barbaros, B. ve Dikmen, M., 2015. Kanser İmmünoterapisi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 31, 4, 177-181.
- Bartholomew, C., Eastlake, L., Dunn, P. ve Yiannakis, D., 2017. EGFR Targeted Therapy in Lung Cancer; An Evolving Story, Respiratory Medicine Case Reports, 20, 137-140.
- Baykara, O., 2016. Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar, Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi, 5, 3, 154-165.
- Bennasroune, A., Gardin, A., Aunis, D., Cremel, G. ve Hubert, P., 2004. Tyrosine Kinase Receptors as Attractive Targets of Cancer Therapy, Critical Reviews in Oncology / Hematology, 50, 23-38.
- Bhanumathy, K.K., Balagopal, A., Vizeacoumar, F.S., Vizeacoumar, F.J., Freywald, A. ve Giambra, V., 2021. Protein Tyrosine Kinases: Their Roles and Their Targeting in Leukemia, Cancers, 13, 184, 1-21.
- Bhatnagar, A. Sharma, P.K. ve Kumar, N., 2011. A Review on "Imidazoles": Their Chemistry and Pharmacological Potentials, International Journal of PharmTech Research, 3, 268-282.
- Bidram, E., Esmaeili, Y., Ranji-Burachaloo, H., Al-Zaubai, N., Zarrabi, A., Stewart, A. ve Dunstan, D.E., 2019. A Concise Review on Cancer Treatment Methods and Delivery Systems, Journal of Drug Delivery Science and Technology, 54, 101350, 1-28.
- Brunelleschi S., Penengo, L., Santaro, M.M. ve Gaudino, G., 2002. Reseptor Tyrosine Kinases as Target for Anti-cancer Therapy, Current Pharmaceutical Design, 8, 1959-1972.
- Butti, R., Das, S., Gunasekaran, V.P., Yadav, A.S., Kumar, D. ve Kundu, G.C., 2018. Receptor Tyrosine Kinases (Rtk) in Breast Cancer: Signaling, Therapeutic Implications and Challenges, Molecular Cancer, 17, 34, 1-18.
- Celik, I., Kilcigil, G.A., Guven, B., Kara, G. ve Besikci, A.O., 2023. *In Vitro* and *In Silico* Evaluation of Some New 1H-Benzimidazoles Bearing Thiosemicarbazide and Triazole as Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, Polycyclic Aromatic Compounds, 43, 1, 444-455.

- Christy, A.W. ve Bojan, A., 2013. Targeted Therapy: A Novel Approach in Head and Neck Cancer, Indian Journal of Dental Research, 24, 2, 261-266.
- Cockerill, G.S. ve Lackey, K.E., 2002. Small Molecule Inhibitors of the Class I Receptor Tyrosine Kinase Family, Current Topics in Medicinal Chemistry, 2, 1001-1010.
- Copeland, R. A., 2005. Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists, 2nd. Edition, A John Wiley & Sons, Inc., New Jersey.
- Cusack, J.C. ve Tanabe, K.K., 2002. Introduction to Cancer Gene Therapy, Surgical oncology clinics of North America, 11, 3, 497-519.
- Çakar, B. ve Göker, E., 2019. Breast Disease Management and Therapies, Aydın, A., İğci, A., ve Soran A., Vol. 2, Second Edition, 529-539, Springer Nature, Switzerland.
- Çelik, İ., 2020. EGFR Kinaz İnhibitörleri Olarak Triazol/tiyadiazol Halkaları İçeren Bazı Yeni Benzimidazol Türevlerinin Sentezi ve Biyolojik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Çoban, D.Z. ve Güran, Ş., 2013. Hücre İçi Sinyal İletimi Mekanizmalarının Kanseri Tanı ve Tedavisindeki Rolü, Cumhuriyet Tıp Dergisi, 35, 302-310.
- Daina, A., Michielin, O. ve Zoete, V., 2017. SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules, Nature/Scientific Reports, 7, 42717, 1-13.
- Das, D., ve Hong, J., 2019. Recent Advancements of 4-Aminoquinazoline Derivatives as Kinase Inhibitors and Their Applications in Medicinal Chemistry, European Journal of Medicinal Chemistry, 170, 55-72.
- De Vita, V.T. ve Chu, E., 2008. A History of Cancer Chemotherapy, American Association for Cancer Research Journals, 68, 21, 8643-8653.
- Debela, D.T., Muzazu, S.G., Heraro, K.D., Ndalama, M.T., Mesele, B.W., Haile, D.C., Kitui, S.K. ve Manyazewal, T., 2021. New Approaches and Procedures for Cancer Treatment: Current Perspectives, SAGE Open Medicine, 9, 1-10.
- Della Corte, C.M., Ciaramella, V., Cardone, C., La Monica, S., Alfieri, R., Petronini, P.G., Malapelle, U., Vigliar, E., Pepe, F., Troncone, G., Castellone, M.D., Troiani, T., Martinelli, E., Ciardiello, F. ve Morgillo F., 2018. Antitumor Efficacy of Dual Blockade of EGFR Signaling by Osimertinib in Combination with Selumetinib or Cetuximab in Activated EGFR Human NCLC Tumor Models, Journal of Thoracic Oncology, 13, 6, 810-820.
- Doğan, A.L. ve Güç, D., 2004. Sinyal İletimi Mekanizmaları ve Kanseri, Hacettepe Tıp Dergisi, 35, 34-42.

- Du, X., Yang, B., An, Q., Assaraf, Y.G., Cao, X. ve Xia, J., 2021. Acquired Resistance to Third-Generation EGFR-TKIs and Emerging Next-Generation EGFR Inhibitors, Cell Press-The Innovation Journal, 2, 100103, 1-18.
- Du, Z., Lovly, C.M., 2018. Mechanisms of Receptor Tyrosine Kinase Activation in Cancer, Molecular Cancer, 17, 58, 1-13.
- El-Sadek, M.E., Aboukull, M.E., 2007. El-Sabbagh, O.I. ve Shallal, H.M., Design, Synthesis and Cytotoxic Activity of Novel 1-Aroyl-4-(2-Chloroethyl) Semicarbazides, Pharmaceutical Chemistry Journal, 41, 188-192.
- El-Sherief, H.A.M., Youssif, B.G.M., Bukhari, S.N.A., Abdelazeem, A.H., Abdel-Aziz, M. ve Abdel-Rahman, H.M., 2018a. Synthesis, Anticancer Activity and Molecular Modeling Studies of 1,2,4-Triazole Derivatives as EGFR Inhibitors, European Journal of Medicinal Chemistry, 156, 774-789.
- El-Sherief, H.A.M., Youssif, B.G.M., Bukhari, S.N.A., Abdel-Aziz, M. ve Abdel-Rahman, H.M., 2018b. Novel 1,2,4-Triazole Derivatives as Potential Anticancer Agents: Design, Synthesis, Molecular Docking and Mechanistic Studies, Bioorganic Chemistry, 76, 314-325.
- Emami, L., Sadeghian, S., Mojaddami, A., Khabnadideh, S., Sakhteman, A., Sadeghpour, H., Faghhi, Z., Fereidoonenezhad, M. ve Rezaei, Z., 2022. Design, Synthesis and Evaluation of Novel 1,2,4-Triazole Derivatives as Promising Anticancer Agents, BMC Chemistry, 16, 91, 1-18.
- Erçakallı, T.S. ve Polat, S., 2022. Kanser Kök Hücrelerine Güncel Yaklaşım, Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 31, 2, 111-121.
- Erkan, M. ve Göğebakan, N., 1999. Epidermal Growth Factor, Erciyes Tıp Dergisi, 21, 4, 241-244.
- Falzone, L., Salomone, S. ve Libra, M., 2018. Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium, Frontiers in Pharmacology, 9, 1300, 1-26.
- Garcia, E.C., Saceda, M. ve Lacaci, I.M., 2014. Role of Receptor Tyrosine Kinases and Their Ligands in Glioblastoma, Cells, 3, 199-235.
- Georgakopoulou, E., Stebbing, J. ve Scully, C., 2018. Targeted Cancer Therapies- Oral Health Care Implications, Journal of the American Dental Association, 149, 2, 100-111.
- Gerber, D.E., 2008. Targeted Therapies: A New Generation of Cancer Treatments, American Family Physician, 77, 3, 311-319.
- Ghosh, S., Morrocco, I. ve Yarden, Y., 2020. Advances in Cancer Research, Vol. 147, First Edition, 1-57, Elsevier Inc.-ePub., London.

- Ginn, S.L., Amaya, A.K., Alexander, I.E., Edelstein, M. ve Abedi, M.R., 2018. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide to 2017: An Update, *Journal of Gene Medicine*, 20, e3015, 1-16.
- Golonko, A., Lewandowska, H., Swislocka, R., Jasinska, U.T., Priebe, W. ve Lewansowski, W., 2019. Curcumin as Tyrosine Kinase Inhibitor in Cancer Treatment, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 181, 111512, 1-25.
- Gotink, K.J. ve Verheul, H.M.W., 2010. Anti-Angiogenic Tyrosine Kinase Inhibitors: What is Their Mechanism of Action?, *Angiogenesis*, 13, 1-14.
- Gürkan-Alp, A.S. ve Bozca, F., 2019. Tirozin Kinaz Enzim İnhibitörü Yeni Bileşikler ve Yapı- Aktivite İlişkilerinin Değerlendirilmesi, *FABAD J. Pharm. Sci.*, 44, 1, 65-78.
- Haijian, S., Zhongyi, W. ve Haoxina, S., 1998. Study on the Intramolecular Mannich Reaction of 4-Amino-3-Aryl-2,3-Dihydrogen-5-Mercapto-1,2,4-Triazoles, *Synthetic Communications*, 28, 3973-3982.
- Harari. P. M., 2004. Epidermal Growth Factor Receptor Inhibition Strategies in Oncology, *Endocrine-Related Cancer*, 11, 689–708.
- Hashem, H.E., Amr, A.E.G.E., Nossier, E.S., Anwar, M.M. ve Azmy, E.M., 2022. New Benzimidazole-,1,2,4-Triazole-, and 1,3,5-Triazine-Based Derivatives as Potential EGFR^{WT} and EGFR^{T790M} Inhibitors: Microwave-Assisted Synthesis, Anticancer Evaluation, and Molecular Docking Study, *ACS Omega*, 7, 7155-7171.
- Helman, E., Nguyen, M., Karlovich, C.A., Despain, D., Choquette, A.K., Spira, A.I., Yu, H.A., Camidge, D.R., Harding, T.C., Lanman, R.B. ve Simmons, A.D., 2018. Cell-Free DNA Next-Generation Sequencing Prediction of Response and Resistance to Third-Generation EGFR Inhibitor, *Clinical Lung Cancer*, 19, 6, 518-530.
- Hernandez-Florez, D. ve Valor, L., 2016. Protein-Kinase Inhibitors: A New Treatment Pathway for Autoimmune and Inflammatory Diseases, *Reumatol Clinica*, 12, 2, 91-99.
- Honegger, A., Dull, T.J., Szapary, D., Komoriya, A., Kris, R., Ullrich, A. ve Schlessinger, J., 1988. Kinetic Parameters of The Protein Tyrosine Kinase Activity of EGF-Receptor Mutants with Individually Altered Autophosphorylation Sites, *The EMBO Journal*, 7, 10, 3053-3060.
- Hosseinzadeh, E., Banaee, N. ve Nedaie, H.A., 2017. Cancer and Treatment Modalities, *Current Cancer Therapy Reviews*, 13, 1, 17-27.
- Hou, Y., Liu, Y., Tang, C., Tan, Y., Zheng, X., Deng, Y., He, N. ve Li, S., 2022. Recent Advance in Nanomaterials for Cancer Immunotherapy, *Chemical Engineering Journal*, 435, 134145, 1-17.

- Hsu, C.C., Liao, B.C., Liao, W.Y., Markovets, A., Stetson, D., Thress, K. ve Yang, J.C.H., 2019. Exon 16-Skipping HER2 as a Novel Mechanism of Osimertinib Resistance in EGFR L858R/T790M-Positive Non-Small Cell Lung Cancer, Journal of Thoracic Oncology, 15, 1, 50-61.
- Huang, L., Jiang, S. ve Shi, Y., 2020. Tyrosine Kinase Inhibitors for Solid Tumors in the Past 20 Years (2001-2020), Journal of Hematology&Oncology, 13, 143, 1-23.
- Kamboj, V.K., Verma, P.K., Dhanda, A. ve Ranjan, S., 2015. 1,2,4-Triazole Derivatives as Potential Scaffold for Anticonvulsant Activity, Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry, 15, 17-22.
- Karabasanagouda, T., Adhikari, A.V. ve Suchetha Shetty, N.S., 2007. Synthesis and Antimicrobial Activities of Some Novel 1,2,4-Triazolo [3,4-b]-1,3,4-Thiadiazoles and 1,2,4-Triazolo[3,4-b]-1,3,4-Thiadiazines Carrying Thioalkyl and Sulphonyl Phenoxy Moieties, European Journal of Medicinal Chemistry, 42, 521-529.
- Khairnar, N.S., Patil, A.V. ve Noolvi, M.N., 2020. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Triazolyl Quinazolin-4-One Derivatives As Anticancer Agents, European Journal of Molecular&Clinical Medicine, 7, 11, 5201-5214.
- Khan, M., Maker, A.V. ve Jain, S., 2021. The Evolution of Cancer Immunotherapy, MDPI-Vaccines, 9, 614, 1-11.
- Kılıç, A., 2012. Epidermal Büyüme Faktör Reseptör İnhibitörleri ve Dermatolojik Yan Etkiler, Türk J. Dermatol, 6, 168-174.
- Kinhikar, R.A., Pawar, A.B., Mahantshetty, U., Murthy, V., Dheshpande, D.D. ve Shrivastava, S.K., 2014. Rapid Arc, Helical Tomotherapy, Sliding Window Intensity Modulated Radiotherapy and Three Dimensional Conformal Radiation for Localized Prostate Cancer: Adosimetric Comparision, Journal of Cancer Research and Therapeutics, 10, 3, 575-582.
- Koca, G., Seydou, S. ve Yıldırım, Ö., 2022. Kanser İmmünoterapisinde Güncel Yaklaşımlar Ve İmmünoterapinin Sınırlayıcı Etkilerine Genel Bakış, Turkish Journal of Clinics and Laboratory, 13, 1, 153-165.
- Koçak, G. ve Akdemir, E., 2020. Tiyosemikarbazit ve Bis-1,2,4-Triazol Türevlerinin Antikanser, Apoptotik ve Antibakteriyal Etkileri, BEÜ Fen Bilimleri Dergisi, 9, 3, 1124-1133.
- Kuznetsov, M., Clairambault, J. ve Volpert, V., 2021. Improving Cancer Treatments via Dynamical Biophysical Models, Physics of Life Reviews, 39, 1-48.
- Küçük, E., 2016. Medikal Onkoloji Polikliniğinde Tedavi Alan Hastalarda Hedefe Yönelik Tedavi İle İlgili Sorunların Belirlenmesi ve Önlenmesinde Klinik Eczacının Rolü, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- Küçükgülzel, İ., Tatar, E., Küçükgülzel, Ş.G., Rollas, S. ve De Clercq, E., 2008. Synthesis of Some Novel Thiourea Derivatives Obtained from 5-[(4- Aminophenoxy) Methyl]-4-Alkyl/Aryl-2,4-Dihydro-3H-1,2,4-Triazole-3-Thiones and Evaluation as Antiviral/Anti-HIV and Anti-tuberculosis Agents, European Journal of Medicinal Chemistry, 43, 381-392.
- Küpel, S., 2022. Kanserde Hedefe Yönelik Tedavi: Tirozin Kinaz İnhibitörleri, Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 31, 2, 78-81.
- Lawrence, M.C. ve Ward, C.W., 2015. Reseptor Tyrosine Kinases: Structure, Functions, and Role in Human Disease, Wheeler, D.L. ve Yarden, Y., Kindle Edition, 163-193, Springer Science-Business Media, New York.
- Lee, D.Y., Huntoon, K., Jiyang, W. ve Kim, B.Y.S., 2022. Engineering Technologies and Clinical Translation, Amiji, M.M. ve Milane, L.S., Vol. 3, 197-239, Elsevier Inc., London.
- Li, R., Zhou, X., Yao, H. ve Li, L., 2020. Four Generations of EGFR TKIs Associated with Different Pathogenic Mutations in Non-Small Cell Lung Carcinoma, Journal of Drug Targeting, 28, 9, 861-872.
- Li, T., Kang, G., Wang, T. ve Huang, H., 2018. Tumor Angiogenesis and Anti-Angiogenic Gene Therapy for Cancer (Review), Oncology Letters, 16, 687-702.
- Lin, C.H., Elkholy, K.H., Wani², N.A., Li, D., Hu, P., Barajas, J.M., Yu, L., Zhang, X., Jacob, S.T., Khan, W.N., Bai, X.F., Noonan, A.M.ve Ghoshal, K., 2020. Ibrutinib Potentiates Antihepatocarcinogenic Efficacy of Sorafenib by Targeting EGFR in Tumor Cells and BTK in Immune Cells in the Stroma, Molecular Cancer Therapeutics, 19, 2, 384-396.
- Lin, H.Y., Sun, W.X., Zheng, C.S., Han, H.W., Wang, X., Zhang, Y.H., Qiu, H.Y., Tang, C.Y., Qi, J.L., Lu, G.H., Yang, R.W., Wang, X.M. ve Yang, Y.H., 2017. Synthesis, Characterization and Biological Evaluation of Formononetin Derivatives as Novel EGFR Inhibitors via Inhibiting Growth, Migration and Inducing Apoptosis in Breast Cancer Cell Line, The Royal Society of Chemistry, 7, 48404–48419.
- Lineweaver, H. ve Burk, D., 1934. The Determination of Enzyme Dissociation Constant, Journal of American Chemical Society, 56, 658-661.
- Lukasz Popiolek, L., 2017. Hydrazide–hydrazones as Potential Antimicrobial Agents: Overview of the Literature Since 2010, Medicinal Chemistry Research, 26, 287–301.
- Ma, C.Y., Wang, Z.X., Jin, S. J., Zhang, Y.X., Cui, D.T., Wang, J.S., Wang, M., Wang, F.Q., Hu, G.Q. ve Zhao, Z.J., 2016. Dual Inhibition of Topoisomerase II and Tyrosine Kinases by the Novel Bis-Fluoroquinolone Chalcone-Like Derivative HMNE3 in Human Pancreatic Cancer Cells, Plos One, 10, 1-15.

- Ma, K., Cohen, V., Kasymjanova, G., Small, D., Novac, K., Peterson, J., Levit, A. ve Agulnik, J., 2015. An exploratory Comparative Analysis of Tyrosine Kinase Inhibitors or Docetaxel in Second-Line Treatment of EGFR Wild-Type Non-Small-Cell Lung Cancer: A Retrospective Real-World Practice Review at a Single Tertiary Care Centre, Current Oncology, 22, 3, e157-e163.
- Malik, D., Mahendiratta, S., Kaur, H. ve Medhi, B., 2021. Futuristic Approach to Cancer Treatment, Gene, 805, 145906, 1-11.
- Mansouri, V., Beheshtizadeh, N., Gharibshahian, M., Sabouri, L., Varzandeh, M. ve Rezaei, N., 2021. Recent Advances in Regenerative Medicine Strategies for Cancer Treatment, Biomedicine & Pharmacotherapy, 141, 111875, 1-21.
- Meiliana, A., Dewi, N.M. ve Wijaya, A., 2016. Cancer Immunotherapy: A Review, The Indonesian Biomedical Journal, 8, 1, 1-20.
- Meng, X., Lei, Y., Zhang, X., Sun, K., Zhang, L. ve Wang, Z., 2021. Cancer Immunotherapy: Classification, Therapeutic Mechanisms, and Nanomaterial-Based Synergistic Therapy, Applied Materials Today, 24, 101149, 1-28.
- Metibemu, S.D., Akinloye, O.A., Akamo, A.J., Ojo, D.A., Okeowo, O.T. ve Omotuyi, O., 2019. Exploring Receptor Tyrosine Kinases Inhibitors in Cancer Treatments, Egyptian Journal of Medical Human Genetics, 20, 35, 1-16.
- Mirone, G. Perna, S. ve Marfe, G., 2016. Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors, Focosi, D., Vol. 10, 27-107, Springer Int. Pub., Switzerland.
- Mohassab, A.M., Hassan, H.A., Abdelhamid, D., Gouda, A.M., Youssif, B.G.M., Tateishi, H., Fujita, M., Otsuka, M. ve Abdel-Aziz, M., 2021. Design and Synthesis of Novel Quinoline/Chalcone/1,2,4-Triazole Hybrids as Potent Antiproliferative Agent Targeting EGFR and BRAF^{V600E} Kinases, Bio-Organic Chemistry, 106, 104510, 1-47.
- Mutluay, S.U. ve Kozacı, L.D., 2021. “Hücre İçi Sinyal Yolaklarını Hedefleyen Kemoterapötik Ajanlar”, Black Sea Journal of Health Science, 4, 2, 175-184.
- Natoli, C., Perrucci, B., Perrotti, F., Falchi, L. ve Iacobelli, S., 2010. Tyrosine Kinase Inhibitors, Current Cancer Drug Targets, 10, 4, 1-22.
- Oiseth, S.J. ve Aziz, M.S., 2017. Cancer Immunotherapy: A Brief Review of the History, Possibilities, and Challenges Ahead, Journal of Cancer Metastasis and Treatment, 3, 250-261.
- Ozsahin, D.U., Uzun, B., Musa, M.S., Helwan, A., Wilson, C.N., Nurçin, F.V., Şentürk, N. ve Ozsahin, I., 2017. Evaluating Cancer Treatment Alternatives using Fuzzy PROMETHEE Method, International Journal of Advanced Computer Science and Applications, 8, 10, 177-182.

- Ölgen, S., Akaho, E. ve Nebioğlu, D., 2003. Evaluation of Indole Esters as Inhibitors of p60^{c-Src} Receptor Tyrosine Kinase and Investigation of the Inhibition Using Receptor Docking Studies, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 18, 6, 485–490.
- Ölgen, S. ve Şentürk, A.M. 2021. Tirozin Kinaz İnhibitörü Bileşiklerin Tasarımı ve Antikanser Etki Mekanizmaları, FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences, 46, 2, 159-178.
- Özcan, Ö. ve Dikmen, M., 2015. Kanser Tedavisinde mTor İnhibitörleri, Marmara Pharmaceutical Journal, 19, 290-297.
- Öztop, İ., 2008. Baş Boyun Tümörlerinde Hedefe Yönelik Tedavi, Uluslararası Hematoloji Onkoloji Dergisi, 18, 1, 46-56.
- Pareja, F., Pines, G. ve Yarden, Y., 2015. Reseptor Tyrozine Kinases: Family and Subfamilies, Wheeler, D.L. ve Yarden, Y., e-book, 107-165, Humana Press, Switzerland.
- Parlak, A.E., Koparır, P., Timür, İ. ve Saraç, K., 2018. 4-Fenil-5-(2-Tiyenil)-2,4-Dihidro-3H-1,2,4-Triazol-3- Tiyon Bileşiğinin Meme Kanseri MCF-7 Hücre Hattında Potansiyel Antikanser Aktivitesinin Belirlenmesi, V. Uluslararası multidisipliner çalışmaları sempozyumu (ISMS), Ankara, 311-318.
- Paul, S. ve Sa, G., 2021. Curcumin as an Adjuvant to Cancer Immunotherapy, Frontiers in Oncology, 11, 675923, 1-16.
- Pazarbaşı, A., Kasap, M. ve Kasap, H., 2011. Kanser Yolakları, Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 20, 4, 187-229.
- Pérez-Herrero, E. ve Fernández-Medarde, A., 2015. Advanced Targeted Therapies in Cancer: Drug Nanocarriers, the Future of Chemotherapy, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 93, 52–79.
- Plech, T., Wujec, M., Siwek, A., Kosikowska, U. ve Malm, A., 2011. Synthesis and Antimicrobial Activity of Thiosemicarbazides, s-Triazoles and Their Mannich Bases Bearing 3-Chlorophenyl Moiety, European Journal of Medicinal Chemistry, 46, 241-248.
- Popovic, N. ve Wilson, E., 2010. Reseptor Systems, McQueen, C., Second Edition, 81-90, Elsevier, Texas.
- Raghavendra, N.M., Pingili, D., Kadasi, S., Mettu, A. ve Prasad, S.V.U.M., 2018. Dual or Multi-Targeting Inhibitors: The Next Generation Anticancer Agents, European Journal of Medicinal Chemistry, 143, 1277-1300.
- Remon, J., Steuer, C.E., Ramalingam, S.S. ve Felip, E., 2018. Osimertinib and Other Third-Generation EGFR TKI in EGFR-Mutant NSCLC Patients, Annals of Oncology, 29, 1, i20-i27.

- Ricordel, C., Friboulet, L., Facchinetti, F. ve Soria, J.C., 2018. Molecular Mechanisms of Acquired Resistance to Third-Generation EGFR-TKIs in EGFR T790M- Mutant Lung Cancer, Annals of Oncology, 29, 1, i28-i37.
- Rodrigues, C.R., Garcia, L.R., Baptista, P.V. ve Fernandes, A.R., 2020. Gene Therapy in Cancer Treatment: Why Go Nano?, Pharmaceutics, 12, 233, 1-34.
- Rosenblatt, E. ve Zubizaretta, E., 2017. Radiotherapy in Cancer Care: Facing the Global Challenge, Rosenblatt, E. ve Zubizaretta, E., Non-serial Publication, 1-10, International Atomic Energy Agency, Vienna.
- Roskoski Jr., R., 2004. The Erbb/HER Receptor Protein-Tyrosine Kinases and Cancer, Biochemical and Biophysical Research Communications, 319, 1-11.
- Roskoski Jr., R., 2023. Properties of FDA-Approved Small Molecule Protein Kinase Inhibitors: A 2023 Update, Pharmacological Research, 187, 106552, 1-21.
- Russo, A., Franchina, T., Ricciardi, G.R.R., Smirolto, V., Picciotto, M., Zanghì, M., Rolfo, C. ve Adamo, V., 2017. Third Generation EGFR TKIs in EGFR-Mutated NSCLC: Where are We Now and Where are We Going, Critical Reviews in Oncology/Hematology, 117, 38-47.
- Sarigol, D., Baran, A.U., Tel, B.C., Somuncuoglu, E.İ., Kazkayasi, İ., Sari, K.O., Tan, O.U., Okay, G., Ertan, M. ve Tozkoparan, B., 2015. Novel Thiazolo [3,2-b]-1,2,4-Triazoles Derived from Naproxen with Analgesic/Anti-inflammatory Properties: Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Modeling Studies, Bioorganic Medicinal Chemistry, 23, 2518–2528.
- Schlessinger, J., 2000. Cell Signalling by Receptor Tyrosine Kinases, Cell, 103, 211-225.
- Segaliny, A.I., Gabriel, M.T., Heymann, M.F. ve Heymann, D., 2015. Receptor Tyrosine Kinases: Characterisation, Mechanism of Action and Therapeutic Interests for Bone Cancers, Journal of Bone Oncology, 4 , 1-12.
- Shahzadi, I., Zahoor, A.F., Rasul, A., Mansha, A., Ahmad, S. ve Raza Z., 2021. Synthesis, Hemolytic Studies, and *In Silico* Modeling of Novel Acefylline–1,2,4-Triazole Hybrids as Potential Anti-cancer Agents Against MCF-7 and A549, ACS Omega, 6, 11943–11953.
- Shi, Y., Zhang, S., Hu, X., Feng, J., Ma, Z., Zhou, J., Yang, N., Wu, L., Liao, W., Zhong, D., Han, X., Wang, Z., Zhang, X., Qin, S., Ying, K., Feng, J., Fang, J., Liu, L. ve Jiang, Y., 2019. “Safety, Clinical Activity, and Pharmacokinetics of Alflutinib (AST2818) in Patients with Advanced NSCLC with EGFR T790M Mutation, Journal of Thoracic Oncology, 15, 6, 1015-1026.
- Silverman, R.B., Holladay, M.W., 2014. The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action, Third Edition, 208-265, Elsevier Inc., San Diego.
- Singh, M. ve Jadhav, H. R., 2018. Targeting Non-Small Cell Lung Cancer with Small-Molecule EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors, Drug Discovery Today, 23, 3, 745-753

- Singhal, S., Arora, S., Agarwal, S., Sharma, R. ve Singhal, N., 2013. A Review on Potential Biological Activities of Thiosemicarbazides, WJPPS, 2, 4661-4681.
- Sivarajah, S., Emerick, K. ve Kaufman, H.L., 2022. What Surgeons Need to Know About Gene Therapy for Cancer, Advances in Surgery, 56, 151-168.
- Soltan, O.M., Shoman, M., E., Abdel-Aziz, S.A., Narumi, A., Konno, H. ve Abdel-Aziz, M., 2021. Molecular Hybrids: A Five-Year Survey on Structures of Multiple Targeted Hybrids of Protein Kinase Inhibitors for Cancer Therapy, European Journal of Medicinal Chemistry, 225, 113768, 1-32.
- Sudhakar, A., 2009. History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods, Journal of Cancer Science and Therapy, 1, 2, 1-4.
- Sullivan, I. ve Planchard, D., 2017. Next-Generation EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors for Treating EGFR-Mutant Lung Cancer Beyond First Line, Frontiers in Medicine, 3, 76, 1-13.
- Sümer-Turanlıgil, N.C. ve Uyanıkgil, D., 2010. Hücre İçi Sinyal Yolakları ve Klinik Yansımaları, Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 19, 3, 180-191.
- Sztanke, K., Tuzimski, T., Rzymowska, J., Pasternak, K. ve Kandefer-Szerszen, M., 2008. Synthesis, Determination of the Lipophilicity, Anticancer and Antimicrobial Properties of Some Fused 1,2,4-Triazole Derivatives, European Journal of Medicinal Chemistry, 43, 404-419.
- Tang, J., Yİ, Q., Li, H., Kopecky, B.J., Ding, D., Ou, H.C., DeCook, R., Chen, X., Sun, Z., Kobel, M. ve Bao, J., 2015. Canertinib-Induces Ototoxicity in Three Preclinical Models, Hearing Research, 328, 59-66.
- Tanaka, T. ve Tamura, K., 2012. Recent Advances in Molecular Targeted Therapy for Advanced Colorectal Cancer and Non-Small Cell Lung Cancer, Journal of Physical Chemistry and Biophysics, 2, 3, 1-9.
- Tecen, K., 2016. Tirozin kinaz inhibitörleri ile tedavi edilen hastalarda tedavi izleminde, ilaç etkileşimleri ve yan etkilerin saptanması ve önlenmesinde klinik eczacının rolü, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Thabet, F.,M., Dawood, K.M., Ragab, E.A., Nafie, M.S. ve Abbas, A.A., 2022. Design and Synthesis of New Bis (1,2,4-Triazolo [3,4-b][1,3,4] Thiadiazines) and Bis ((Quinoxalin-2-yl) Phenoxy) Alkanes as Anti-Breast Cancer Agents Through Dual PARP-1 and EGFR Targets Inhibition, Royal Society of Chemistry, 12, 23644-23660.
- Timür, İ., 2018. Farklı triazol bileşiklerinin bazı biyolojik etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi, Bingöl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bingöl.
- Tong, C.W.S., Wu, W.K.K., Loong, H.H.F., Cho, W.C.S. ve To, K.K.W., 2017. Drug Combination Approach to Overcome Resistance to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors in Lung Cancer, Cancer Letters, 405, 100-110.

- Troiani, T., Napolitano, S., Della Corte, C.M., Martini, G., Martinelli, E., Morgillo, F. ve Ciardiello, F., 2016. Therapeutic Value of EGFR Inhibition in CRC and NSCLC: 15 Years of Clinical Evidence, ESMO Open, 1, 5, e000088.
- Tuncer, Z., ve Kozacı, L.D., 2022. Büyüme Faktörleri, Reseptörleri ve Sinyal İletim Yolları, KTO Karatay Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 3, 2, 91-107.
- URL-1:https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?years=2030&single_unit=500000&types=1, International Agency for research on cancer, Estimated number of new cases from 2020 to 2040, both sexes, age [0-85+] all cancers, World, 05.04.2021.
- Urruticoechea, A., Alemany, R., Balart, J., Villanueva, A., Vinals, F. ve Capella, G., 2010. Recent Advances in Cancer Therapy: An Overview, Current Pharmaceutical Design, 16, 3-10.
- Varkondi, E., Schäfer, E., Bökönyi, G., Gyökeres, T., Örfi, L., Petak, I., Pap, İ., Szokolocz, O., Kerı, G. ve Schwab, R., 2005. Comparison of Elisa-Based Tyrosine Kinase Assays for Screening EGFR Inhibitors, Journal of Receptors and Signal Transduction, 25, 45–56.
- Walter, H.S. ve Ahmed, S.I., 2021. argeted Therapies in Cancer, Surgery (Oxford), 39, 4, 202-207.
- Wang, X.S., Bai, Y.F., Verma, V., Yu, R.L., Tian, W., Ao, R., Deng, Y., Xia, J.L., Zhu, X. Q., Liu, H., Pan, H. X., Yang, L., He, Y. K., Bai, H.S., Luo, X., Guo, Y., Zhou, M. X., Sun, Y. M., Zhang, Z. C., Li, S. M., Cheng, X., Tan, B. X., Han, L. F., Liu, Y. Y., Zhang, K., Zeng, F. X., Jia, L., Hao, X. B., Wang, Y. Y., Feng, G., Xie, K., Lu, Y. ve Zeng, M., 2022. Randomized Trial of First-Line Tyrosine Kinase Inhibitor With or Without Radiotherapy for Synchronous Oligometastatic EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer, Journal of the National Cancer Institute, 114, 5, 1-7.
- Westover, D., Zugazagoitia, J., Cho, B.C., Lovly, C.M. ve Paz-Ares, L., 2018. Mechanisms of Acquired Resistance to First- and Second-Generation EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors, Annals of Oncology, 29, 1, i10-i19.
- Wu, H.C., Chang, D.K. ve Huang, C.T., 2006. Targeted Therapy for Cancer, Journal of Cancer Molecules, 2, 2, 57-66.
- Wu, L., Ke, L., Zhang, Z., Yu, J. ve Meng, X., 2020. Development of EGFR TKIs and Options to Manage Resistance of Third-Generation EGFR TKI Osimertinib: Conventional Ways and Immune Checkpoint Inhibitors, Frontiers in Oncology, 10, 602762, 1-14.
- Xu, L., Xu, B., Wang, J., Gao, Y., He, X., Xie, T. ve Ye, X.Y., 2023. Recent Advances of Novel Fourth Generation EGFR Inhibitors in Overcoming C797S Mutation of Lung Cancer Therapy, European Journal of Medicinal Chemistry, 245, 114900, 1-13.
- Yahya, T.A. ve Abdullah, J.H., 2020. Synthesis of Some 2,3-Dihydro-1,3,4-Oxadiazoles and 4,5-Dihydro-1,2,4-Triazoles as Anticancer Agents, International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 12, 8, 92-99.

- Yamaoka, T., Kusumoto, S., Ando, K., Ohba, M. ve Ohmori, T., 2018. Receptor Tyrosine Kinase-Targeted Cancer Therapy, International Journal of Molecular Sciences, 19, 3491, 1-35.
- Yang, H., Yan, R., Jiang, Y., Yang, Z., Zhang, X., Zhou, M., Wu, X., Zhang, T. ve Zhang, J., Design, 2019. Synthesis and Biological Evaluation of 2-Amino-4-(1,2,4-Triazol) Pyridine Derivatives as Potent EGFR Inhibitors to Overcome TKI-Resistance, European Journal of Medicinal Chemistry, 187, 111966, 1-36.
- Yazıcıoğlu, M.B.I., Ceylaner, B., Turna, S. ve Kaşıkçı, H., 2018. Kanserde Hedefe Yönelik Monoklonal Antikor Tedavisi, Haliç Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi, 1, 131-142.
- Yokuş, B. ve Çakır, D.Ü., 2012. Kanser Biyokimyası, Dicle Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 1, 2, 7-18.
- Yoshioka, H., Kato, T., Okamoto, I., Tanaka, H., Hida, T., Seto, T., Kiura, K., Tian, Y., Azuma, H. ve Yamamoto, N., 2020. Therapies After First-Line Afatinib in Patients with Egfr⁺ NSCLC in Japan: Retrospective Analysis of LUX-Lung 3, Future Oncology, 16, 4, 49-60.
- Youssef, M.F., Nafie, M.S., Salama, E.E., Boraie, A.T.A. ve Gad, E.M., 2022. Synthesis of New Bioactive Indolyl-1,2,4-Triazole Hybrids as Dual Inhibitors for EGFR/PARP-1 Targeting Breast and Liver Cancer Cells, ACS Omega, 7, 4665-45677.
- Zaimy, M.A., Saffarzadeh, N., Mohammadi, A., Pourgadamyari, H., Izadi, P., Sarli, A., Moghaddam, L.K., Paschepari, S.R., Azizi, H., Torkamandi, S. ve Tavakkoly-Bazzaz, J., 2017. New Methods in the Diagnosis of Cancer and Gene Therapy of Cancer Based on Nanoparticles, Cancer Gene Therapy, 24, 233-243.
- Zhou, X., Shi, K., Hao, Y., Yang, C., Zha, R., Yi, C. ve Qian Z., 2020. Advances in Nanotechnology-Based Delivery Systems for EGFR Tyrosine Kinases inhibitors in Cancer Therapy, Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 15, 26-41.
- Zwick, E., Bange, J. ve Ullrich, A., 2001. Receptor Tyrosine Kinase Signalling as a Target for Cancer Intervention Strategies, Endocrine-Related Cancer, 8, 3, 161-173.

ÖZGEÇMİŞ

Emine ŞAHİN ilköğretim hayatına Of ilçesindeki Dumlusu Köyü Fatih İlkokulu'nda başladı. Daha sonra, Of Şehit Ahmet Türkkân Lisesi'nde ortaokula devam etti. 1996 yılında Trabzon Fatih Lisesi'nden mezun olduktan sonra 1997 yılında Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nde öğrenim görmeye hak kazandı. 2003 yılında lisans öğrenimini tamamladıktan sonra aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü'nde yüksek lisans öğrenimine başladı. 2006 yılında yüksek lisans öğrenimini tamamladı. Ayrıca, 2014-2016 yılları arasında ise Anadolu Üniversitesi Açık Öğretim Fakültesi Adalet Bölümü'nde öğrenim görerek mezun oldu. Diğer yandan, 2004 yılında Tarım Bakanlığı taşra teşkilatına (Trabzon) gıda mühendisi olarak ataması yapıldı ve aynı kurumda çalışmaya devam etmektedir. 2014 yılından beri de A Sınıfı İş Güvenliği Uzmanlığı belgesine sahiptir.

Tez ile ilgili yayınlanmış makaleler:

- Design and synthesis of new heterocyclic compounds containing 5-[(1H-1,2,4-triazol-1-yl) methyl]-3H-1,2,4-triazole-3-thione structure as potent hEGFR inhibitors, Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2023 (SCI-Expanded), 1-15, doi.:10.1080/07391102.2023.2167113