



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BIYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

**Melanom ve Yaşlanma İçin Gen Ekspresyon Verilerinden
Faydalanarak Ortak Mekanizmaların Keşfedilmesi ve
Bunlara Yönelik İlaç Önerileri**

Yüksek Lisans Tezi

Edanur Akarsu

Ocak 2023



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BIYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

**Melanom ve Yaşlanma İçin Gen Ekspresyon Verilerinden
Faydalanarak Ortak Mekanizmaların Keşfedilmesi ve
Bunlara Yönelik İlaç Önerileri**

Yüksek Lisans Tezi

Edanur Akarsu

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Saliha Ece Acuner Zorluuysal

Ocak 2023

TEZ JÜRİSİ ONAYI

Edanur Akarsu tarafından hazırlanan "Melanom ve Yaşlanma için Gen Ekspresyon Verilerinden Faydalanarak Ortak Mekanizmaların Keşfedilmesi ve Bunlara Yönelik İlaç Önerileri" başlıklı bu Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda hazırlanmış ve jürimiz tarafından kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ

İMZA

Tez Danışmanı:

Dr. Öğr. Üyesi Saliha Ece Acuner Zorluuysal
İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Üyeler:

Dr. Öğr. Üyesi Beste Turanlı
Marmara Üniversitesi

Doç. Dr. Nagehan Ersoy Tunalı
İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 24/ 01 / 2023

BEYANLAR

Yazım ve Kaynak Gösterme Kılavuzu Beyanı

Danışmanlığımda yazılan bu tezin İstanbul Medeniyet Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım ve kaynak gösterme kılavuzunda belirtilen kurallara uygun olarak yapılandırıldığı ve bu kılavuzun Vancouver kaynak gösterme standartlarının bu tezde tutarlı olarak uygulandığı tarafımdan incelenerek teyit edilmiştir.

İmza

Dr. Öğr. Üyesi Saliha Ece Acuner Zorluuysal

Etik İlkeler Sadakat Beyanı

Hazırladığım bu tezin tamamen kendi çalışmam olduğunu, akademik ve etik kuralları gözeterek çalıştığımı ve her alıntıya kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

İmza

Edanur Akarsu

TEŞEKKÜR

Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü mezunu olarak girdiğim Biyomühendislik Yüksek Lisans eğitimim boyunca bilgisini ve yardımlarını benden esirgemeyen ve destekleri ile her zaman yanımda olan, bilgi ve tecrübelerini esirgemedi bana yol gösteren danışman hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Saliha Ece Acuner'e; Tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen hocalarım sayın Doç. Dr. Nagehan Ersoy Tunalı ve Dr. Öğr. Üyesi Beste Turanlı'ya, bilgi ve tecrübeleriyle bana her zaman yol gösteren değerli araştırmacılar Ezgi Keske ve Pınar Altındağ'a ve Eğitimim boyunca yardımlarını ve bilgisini esirgemeyen sınıf arkadaşım Şefika Feyza Maden'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB) tarafından açılan Hesaplamalı Yapısal Biyoloji Stratejik Ar-Ge Proje Çağrısı'na yaptığımız başvuru sonucunda kabul alan projemiz 'Melanom tedavisine yönelik bütünlük bir yaklaşım: hesaplamalı yöntemler olan ilaç yeniden konumlandırma ve moleküler kenetlenme ile in vitro validasyon deneylerinin birleştirilmesi' için aldığımız bütçe desteği sebebiyle TÜSEB'e teşekkür ederim.

Lisans ve Yüksek Lisans Eğitimim boyunca her türlü desteğini gösteren sevgili arkadaşım Serap Sakarya'ya ve son olarak eğitim hayatım boyunca hem maddi hem manevi desteğini esirgemeyen her zaman yanımda olan annem Nilgün Ak'a ve Babam Aytekin Akarsu'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ JÜRİSİ ONAYI	i
BEYANLAR	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
KISALTMALAR.....	vi
TABLO LİSTESİ.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
GİRİŞ.....	1
1. LİTERATÜR ÖZETİ	3
1.1 Melanom.....	3
1.2 Melanom ve Yaşlanma	4
1.3 İlaç Yeniden Konumlandırma.....	5
1.3.1 Profil Tabanlı İlaç Yeniden Konumlandırma.....	7
1.3.2 Veri Tabanlı İlaç Yeniden Konumlandırma.....	8
1.3.3 Ağ Tabanlı İlaç Yeniden Konumlandırma	9
1.4 Moleküler Kenetlenme.....	10
1.4.1 Ligand ve Proteinin Hazırlanması.....	12
1.4.2 Kenetleme Türünü Tanımlama.....	12
1.4.3 Ligand Konformasyonları İçin Arama Stratejilerini Ayarlama.....	13
1.4.4 Puanlama İşlevleri.....	13
1.4.5 Kenetleme Doğruluğu	14
1.4.6 Sonuçların Analizi.....	15
1.5 <i>İn Vitro</i> Sitotoksosite Analizleri	15
1.5.1 Sitotoksosite Ölçümünde Kullanılan Yöntemler	16
2. MATERYAL VE METOT	18
2.1 Melanom Ve Yaşlanmanın Melanom Üzerilerine Etkileri İçin Transkripsiyon Veri Setlerinin Eldesi.....	19
2.1.1 Melanom İçin Transkripsiyon Veri Setlerinin Elde Edilmesi.....	20
2.1.2 Melanom Ve Yaşlılıkla İlgili Transkripsiyon Veri Setlerinin Elde Edilmesi. 20	

2.2 Tüm Transkripsiyon Veri Setleri İçin mRNA Seviyesinde Anlatımı Farklılık Gösteren Genlerin Tespit Edilmesi	21
2.3 Tespit Edilen SEG ve DEG'leri Hedefleyen İlaçların Belirlenmesi.....	22
2.3.1 Melanom için İlaç Yeniden Konumlandırma	22
2.3.2 Melanom Ve Yaşlanma ile ilişkili Protein-Protein Etkileşim Ağına Alt Ağ Analizi Yapılarak İlaçların Belirlenmesi.....	23
2.3.2.1 Yaşlanma ile ilişkili genlerle protein-protein etkileşim ağı oluşturulması ve anlatımı farklılık gösteren genlerin haritalanması.....	23
2.3.2.2 Alt Ağ Analizi	23
2.3.2.3 Alt Ağı Hedefleyen İlaçların Tespit Edilmesi	24
2.4 Moleküler Kenetleme Çalışmaları.....	24
2.4.1 Melanom İçin Belirlenen İlaçlara Yönelik Moleküler Kenetleme Çalışmaları.....	25
2.4.2 Melanom Ve Yaşlanma İçin Belirlenen Ortak Genleri Hedefleyen İlaçlara Yönelik Moleküler Kenetlenme Çalışmaları.....	26
2.5 Melanom İçin Belirlenen Yeniden Konumlandırılan İlaçlar İçin <i>InVitro</i> Sitotoksiste Analizleri.....	26
3. BULGULAR	28
3.1 Hesaplamalı ve Deneysel Yöntemleri Kullanan Bütünleşik Yaklaşımla Melanom İçin İlaç Yeniden Konumlandırma.....	28
3.1.1 Melanom İçin Transkriptom verilerinin Analizi ve İlaç Yeniden Konumlandırma Çalışmaları.....	28
3.1.2 Melanom İçin Yeniden Konumlandırılan İlaçlar ve Hedef Proteinleri İçin Yapılan Moleküler Kenetleme Sonuçları	29
3.1.3 Melanom İçin Yeniden Konumlandırılan İlaçların Yapısal Analizleri.....	30
3.1.4 <i>In Vitro</i> Sitotoksiste Analiz Sonuçları.....	32
3.2 Melanom ve Yaşlanma Arasındaki İlişkinin Analiz Edilmesiyle Ortak İlaç Önerilmesi	37
3.2.1 Melanom Ve Yaşlanma İçin Belirlenen Ortak Genler.....	37
3.2.2 Melanom Ve Yaşlanma İçin Ortak İlaç-Gen Çiftleri Kullanılarak Yapılan Kenetleme Çalışmaları.....	40
3.2.3 Ortak İlaç Önerisi	47
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	48
KAYNAKÇA.....	50

KISALTMALAR

AML: Akut Miyeloid Lösemi

AMPK: 5'-adenosine monophosphate (AMP)- ile aktive edilmiş protein kinaz

ATCC: American Type Culture Collection

CADD: Bilgisayar Destekli İlaç Tasarımı

CVDK-8: Cell Viability Detection Kit-8

DEG: Ekspresyon seviyesi anlamlı oranda farklılık gösteren gen

DGIdb: Drug Gene Interaction Database

DMSO: Dimetil Sülfoksit

EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü

FDR: Yanlış Keşif Oranı

GWAS: Genom Çapında İlişkilendirme Çalışmaları

IC50: İnhibitör konsantrasyon 50

KPM: KeyPathwayMiner UVR: Ultra Viole Radyasyonu

MAPK: Mitojenle etkileşen protein kinaz

MTT: 3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolyum bromür testi

NSCLC: Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri

PBL: İnsan periferik kan lenfositleri

PDB: Protein Data Bank

PKC: Protein kinaz C

PPI: Protein-Protein Etkileşimleri

RMSD: Kök Ortalama Kare Sapma

SCLC: Küçük hücreli akciğer kanseri

SEG: Ekspresyon seviyesi anlamlı olarak değişen gen

SHH: Sonik Kirpi Proteini

TDF: Tenofovir disoproksil fumarat

TME: Tümör Mikro Ortamı

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Yeniden konumlandırılan ilk 12 ilaç.....	6
Tablo 2. Protein-ligand kenetlenme için mevcut yazılım örnekleri ve bunların arama algoritması.....	10
Tablo 3. M93-047, UACC-903, UACC-1273 melanom hücre hatları ve bu hücre hatlarıyla 3 tekrarlı olarak yapılmış deneylerden elde edilen transkriptom veri setleri.....	21
Tablo 4. 3 GSE31879 veri seti için mRNA seviyesinde anlatımı farklılık gösteren genlerden örnekler.....	28
Tablo 5. GSE6887 veri seti için mRNA seviyesinde anlatımı farklılık gösteren genlerden örnekler.....	28
Tablo 6. Veri setlerindeki DEĞleri hedefleyen ilaçların gruplandırılması.....	29
Tablo 7. Grup 1 için belirlenen ilaçlar ve moleküler kenetlenme skorları.....	29
Tablo 8. Grup 2 için belirlenen ilaçlar ve moleküler kenetlenme skorları.....	30
Tablo 9. 3 Grup 3 için belirlenen ilaçlar ve moleküler kenetlenme skorları.	30
Tablo 10. Melanom tedavisi için hücre kültüründe denenmesi için belirlenen ilaçlar.....	32
Tablo 11. A375 hücre hattı için hücre canlılık değerleri ve IC50 değerleri.....	34
Tablo 12. SK-MEL-28 hücre hattı için hücre canlılık değerleri ve IC50 değerleri.....	35
Tablo 13. HFF-1 hücre hattı için hücre canlılık değerleri ve IC50 değerleri.....	35
Tablo 14. A375 ve SK-MEL-28 in HFF-1 ile IC50 karşılaştırmalı değerleri	36
Tablo 15. Cytoscape ile yapılan analiz sonucu en yüksek dereceye sahip ilk 10 anlamlı değişen gen ve dereceleri.....	38
Tablo 16. 3 hücre hattında GEO2R analiz sonucu p-değerine göre ifadesi anlamlı değişen (SEG) ve anlamlı değişmeyen gen sayıları.....	39
Tablo 17. Gen ekspresyonunda (Log-FC değerine göre) anlamlı oranda değişim gözlenen genler (DEG).....	39
Tablo 18. Üç farklı grup için KPM analizi sonucunda Cytoscape'den elde edilen SEG sayıları.....	40
Tablo 19. Aynı anda 4 proteini hedefleyen ligandlar ve bu ligandlarla eşleşen proteinlerin kenetleme çalışmaları.....	40
Tablo 20. Aynı anda 3 proteini hedefleyen ligandlar ve bu ligandlarla eşleşen proteinlerin kenetleme çalışmaları.....	43

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Melanomların klinik ve ilgili histopatolojik görüntüleri.....	4
Şekil 2. İlaç yeniden konumlandırma için hesaplamalı yaklaşımlar.....	8
Şekil 3. Moleküler kenetleme aşamaları.....	11
Şekil 4. Moleküler kenetlemenin iki modeli.....	13
Şekil 5. Melanom ve yaşlılıkla ilgili ilaçları belirlerken kullanılan yöntem basamakları.....	19
Şekil 6. 5 aday ilaç, hedefledikleri 2’şer protein ve proteinlerin referans ligandları için yapılan kenetlenme çalışmaları.....	32
Şekil 7. ATCC firmasından alınıp ekimi yapılan HFF1, A375 ve SK-MEL-28 hücre hatlarının ışık mikroskobu görüntüleri.....	33
Şekil 8. Yaşlılıkla ilgili protein-protein etkileşim ağı.....	38

ÖZET

Yaşlılık günümüzde kanser dahil birçok hastalığın ortaya çıkmasını tetikleyebilmektedir. Çoğu hastalığın yaşlılıkla bir bağlantısı vardır. Bu bağlantıyı tespit etmek birçok hastalığın tedavisi için son derece önemlidir. Ciltteki fiziksel değişiklikler yaşlanmanın en göze çarpan belirtileri arasındadır. Literatürde, bir cilt kanseri türü olan melanom ve yaşlanmaya yönelik olarak ilaç tasarlama çalışmaları bulunmaktadır, fakat bunların arasındaki bağlantı üzerinde fazla durulmamıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda yaşlanma ile artan melanom riski ve buna bağlı tedavi güçlüğü tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında hem yaşlanan hücrelerin onarımına hem de melanoma dönüşmüş epidermis hücrelerine yönelik kullanılabilecek ortak ilaçlar önerilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, tezin ilk kısmında melanoma yönelik olarak bütünleşik bir yaklaşımla hesaplamalı ve deneysel olarak ilaç yeniden konumlandırma çalışmaları yürütülmüştür. Hesaplamalı ilaç yeniden konumlandırma ve moleküler kenetlenme çalışmalarını takiben belirlenen 5 aday ilaç için *in vitro* sitotoksikite deneyleri yürütülmüştür. En kuvvetli aday ilaç olarak antidepresan olarak kullanılan Doxepin ön plana çıkmıştır çünkü A375 VE SK-MEL-28 melanom hücreleri üzerinde öldürücü etkisi görülürken kontrol hücresi olarak kullanılan HFF-1 üzerinde sitotoksik etkisinin minimum oranda olduğu gözlemlenmiştir. Tezin ikinci kısmında ise melanom ve yaşlanmaya özgü gen ekspresyon veri setleri kullanılarak ortak hedefler belirlenmiş, daha sonra bu ortak hedeflere yönelik ilaç molekülleri tespit edilerek moleküler kenetleme çalışmalarıyla bu moleküllerin etkinliği araştırılmıştır. Melanom ve yaşlanma ile ilgili ortak veri setleri ile yapılan ilaç keşfi çalışmalarının sonucunda; Sorafenib, Gefitinib, Etoposide ve Quercetin bileşiklerinin yaşlanan melanom hücreleri üzerine etkili olabileceği, yaşlılığa bağlı olarak görülen melanomun tedavisi ve yaşa bağlı kanser tedavisinin iyileştirilmesinde kullanımı için ileri çalışmalar yapılması önerilmektedir. Bu sayede yaşlanma ile artan melanoma yönelik ilaç kullanımına katkıda bulunulması hedeflenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Melanom, Yaşlanma, İlaç Yeniden Konumlandırma, Moleküler Kenetlenme

ABSTRACT

Aging can trigger the emergence of many diseases, including cancer. Many diseases have a connection with old age. Detecting this connection is critical for the treatment of many diseases. Physical changes in the skin are among the most noticeable signs of aging. In the literature, there are studies to design drugs for melanoma, a type of skin cancer, and aging, but the connection between them has not been emphasized much. In previous studies, it has been shown that the risk of melanoma increases with aging and there is an associated difficulty in treatment. In the first part of this thesis, an integrative approach combining computational and experimental drug repositioning studies for melanoma was implemented. Following computational drug repositioning and molecular docking studies, *in vitro* cytotoxicity experiments were conducted for 5 candidate drugs identified. Doxepin, which is originally used as an antidepressant, is one of the strongest candidate drugs as it had a lethal effect on A375 and SK-MEL-28 melanoma cells, while its cytotoxic effect on HFF-1, which was used as a control cell, was observed to be minimal. In the second part of the thesis, drugs that can be used for both repair of senescent cells and epidermis cells transformed into melanoma were proposed. For this purpose, firstly, common targets were determined using gene expression datasets specific to melanoma and aging, then drug molecules targeting these common targets were detected and the effectiveness of these molecules were investigated by molecular docking studies. As a result of drug discovery studies on common gene expression datasets on melanoma and aging, it is suggested that Sorafenib, Gefitinib, Etoposide and Quercetin compounds may be effective on aging melanoma cells and they can be used in further studies on the treatment of melanoma associated with aging and in the improvement of age-related cancer therapy. In this way, it is aimed to contribute to the use of drugs for age-related melanoma.

Keywords: Melanoma, Aging, Drug Repositioning, Molecular Docking

GİRİŞ

Melanom, cilt kanserinin en saldırgan ve en ölümcül biçimini temsil eder. Melanom, cilt, göz, iç kulak ve leptomeninkslerde bulunabilen pigment üreten hücreler olan melanositlerde genetik mutasyonların ortaya çıkmasından kaynaklanan ve tedavi edilmediğinde ölümcül olabilen bir kanser türüdür. Melanom tüm deri malign tümörlerinin yaklaşık %1'ini oluştursa da, kutanöz malign melanom cilt kanserinin en agresif ve en ölümcül formunu temsil eder (1). Melanom, kanser patogeneğinde genetik ve çevrenin nasıl etkileşime girdiğinin en iyi örneklerinden birini sunar ve yayıldıktan sonra hızla yaşamı tehdit eder hale gelir (2). İnsidans, ırk ve coğrafi konumdan büyük ölçüde etkilenir. Melanom, epitelyal yüzeylerin bazal membranında yer alan normal pigment hücrelerinden, nöral krestten türetilen melanositlerden doğar. Melanositlerin ana işlevi, melanin pigmentlerinin sentezi, depolanması ve çevredeki epitel hücrelerine aktarılmasıdır. Melanom ağırlıklı olarak daha açık pigmentasyona sahip popülasyonların yani Kafkasyalıların bir hastalığıdır ve insidans daha koyu ten rengine sahip popülasyonlarda daha düşüktür (3). Kafkas popülasyonlarında insidans, ekvatora yakınlıktan etkilenir ve bu da güneşe maruz kalmayla bir bağlantı olduğunu düşündürür (3). Kutanöz melanomun insidansı ve ölüm oranları, erken teşhis ve birinci basamak sağlık hizmetlerine erişime bağlı olarak dünya genelinde büyük farklılıklar göstermektedir (2).

Ciltteki fiziksel değişiklikler yaşlanmanın en gözle görülür belirtileri arasında yer alır. Epidermal melanositlerin habis transformasyonu olan melanom, cilt kanserine bağlı ölümlerin önde gelen küresel nedenidir. Artan yaş, olumsuz bir prognostik göstergedir ve melanomlu yaşlı hastalarda, primer tümör faktörleri kontrol edildiğinde bile hastalığa özgü sağkalım daha düşüktür. Yaşlanan ciltteki fiziksel değişiklikleri anlamak, daha yaşlı melanom hastaları için daha etkili tedavi yolları sağlayabilir (4).

Yeni bir ilacın keşfi, geleneksel ilaç geliştirmede zaman alan, yüksek yatırım gerektiren ve yüksek riskli bir süreçtir. İlaç yeniden konumlandırma son yıllarda popüler bir strateji haline gelmiştir. Geleneksel ilaç geliştirme stratejilerinden farklı olarak, bu strateji verimli, ekonomik ve risksizdir (5). Biyoinformatik bilgisinin ve biyoloji büyük verilerinin hızlı büyümesi nedeniyle, ilacın yeniden konumlandırılması, ilaç geliştirme sürecinin zaman maliyetini önemli ölçüde azaltır. Araştırmacıların yeni ilaç hedeflerini belirlemek için

yalnızca 1-2 yıla ve ortalama olarak yeniden konumlandırılmış bir ilacı geliştirmek için 8 yıla ihtiyaçları vardır (6).

Bu tezde, melanom tedavisi için ilaç bileşiklerinin bulunmasında sistematik yaklaşım olan ilaç yeniden konumlandırma (drug repositioning) ile hem yaşlanan hücrelerin onarımına hem de melanoma dönüşmüş epidermis hücrelerine yönelik kullanılabilecek ortak ilaçlar önerilmesi hedeflenmiştir. Bu tez, İstanbul Medeniyet Üniversitesi Lisansüstü Enstitüsü Biyomühendislik Yüksek Lisans programından mezun olan Nevin Betül İmat'ın Ocak 2021'de sunmuş olduğu 'Melanom tedavisine yönelik olarak ilaçların yeniden konumlandırılması ve moleküler kenetleme çalışmaları' isimli tezin devamı niteliğindedir. TÜSEB tarafından desteklenen 2019-TA-02-4591 numaralı "Melanom tedavisine yönelik bütünleşik bir yaklaşım: hesaplamalı yöntemler olan ilaç yeniden konumlandırma ve moleküler kenetlenme ile *in vitro* validasyon deneylerinin birleştirilmesi" proje kapsamında ilaç yeniden konumlandırma ve moleküler kenetleme çalışmalarından elde edilen sonuçlar *in vitro* sitotoksisite deneyleriyle doğrulanmıştır. Bu yüzden hesaplamalı ilaç yeniden konumlandırma ve moleküler kenetleme çalışmalarının hedefe yönelik ilaç keşfinde potansiyel ve gelecek keşifler için önemli bir ilk adım olduğu vurgulanmaktadır.

Tezin amaçları ve bu amaçlara ulaşmak için kullanılacak yöntemlerin bu bölümde (Giriş) tanıtılmasının ardından, takip eden bölümde melanom ve yaşlanma hakkında, tezde kullanılan hesaplamalı ilaç yeniden konumlandırma ve moleküler kenetlenme yaklaşımları ile deneysel *in vitro* sitotoksisite analiz yöntemleri ile ilgili detaylı literatür zeti verilmiştir (Birinci Bölüm). İkinci Bölüm'de tezde kullanılan Materyal ve Metotlar tanıtılmıştır. Sonuçlar ve Tartışma (nc Bölüm) kısmında analiz sonuçları verilmiş ve sonuçların biyolojik olarak anlamları tartışılmıştır. Son olarak tez sonuçlandırılmış, temel bulgular özetlenmiş (Sonuçlar) ve geleceğe yönelik bazı deneysel çalışmalar için tavsiyeler verilmiştir (Tartışma ve öneriler).

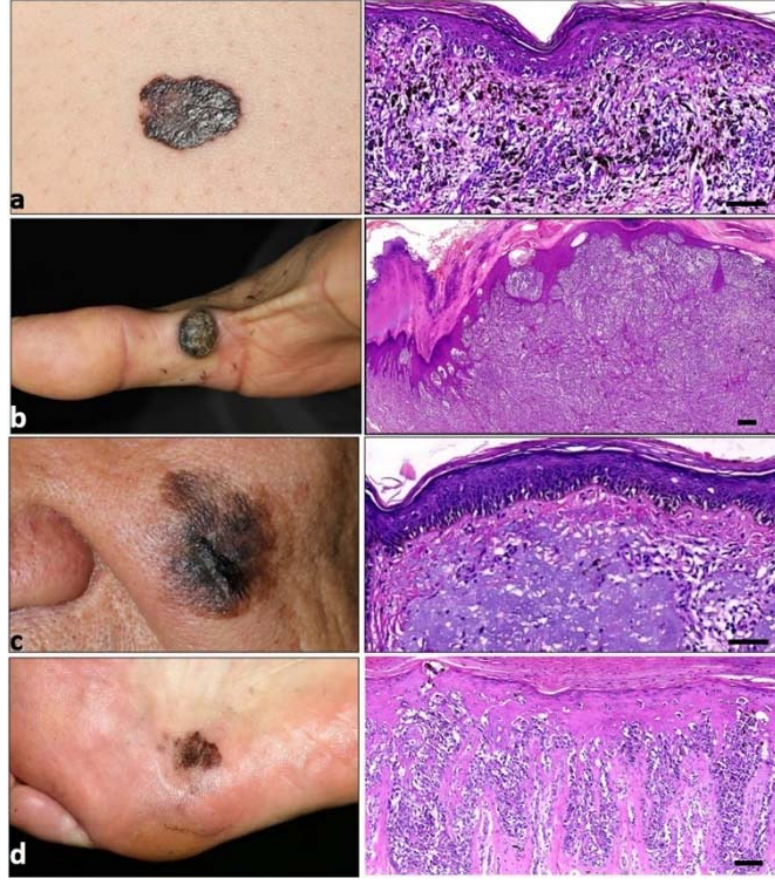
1. LİTERATÜR ÖZETİ

1.1 Melanom

Melanositlerin malign transformasyonundan kaynaklanan cilt kutanöz melanomu, en agresif ve en ölümcül cilt kanseri türüdür. Tüm cilt kanserlerinin yaklaşık %1'ini oluşturmalarına rağmen, bu cilt kanserlerinden kaynaklanan ölümlerin yaklaşık %80'inden sorumludur. Daha da kötüsü, yıllık insidansı artmaya devam etmektedir. Genetik yatkınlık/duyarlılık ile çevresel maruziyet arasındaki etkileşim, melanomun başlamasına ve gelişmesine katkıda bulunur. Ultraviyole maruziyeti ve yüksek tümör mutasyonu yükünün, melanomda en yaygın risk faktörleri olduğu varsayılmaktadır (7).

Kutanöz melanom, güneş ultraviyole maruziyetinin ana risk faktörü olduğu ve yüksek mutasyon yüküne yol açan bir melanosit malignitesidir. Melanom tümörleri, tümör hücresinin hayatta kalması ve çoğalması ile ilişkili birçok farklı sürücü gen ve yolcu gen mutasyonları sergiler. Bu mutasyonlardan bazıları, küçük molekülü ajanlar kullanılarak rasyonel olarak tasarlanmış tedavilerle hedeflenmiştir. Örneğin, BRAF V600E mutasyona uğramış metastatik melanomada kullanımı onaylanan vemurafenib ve dabrafenib, melanomaların ~%50'sinde bulunan mutasyona uğramış proteini spesifik olarak hedefleyen küçük molekülü inhibitörlerdir (8).

Klinik olarak, melanom vakaları, histopatolojik özelliklerine göre, yüzeysel yayılan , nodüler, lentigo maligna ve akral lentiginöz melanom olmak üzere 4 alt tip olarak sınıflandırılır (Şekil 1). Yüzeysel yayılan melanom genellikle radyal veya yatay bir büyüme fazındaki melanomayı ifade eder ve tümör hücreleri bir yuva veya soliter birimler halinde pagetoid (yüzeysel) bir modelde sergilenirken, nodüler melanom genellikle dikey büyüme fazında ortaya çıkar. Ek olarak, lentigo maligna melanomunun önemli bir kronik UV radyasyonu (UVR) belirtisi vardır ve dermal-epidermal bileşke ve cilt uzantılarının yanında ayrı ayrı dağılan hücrelere sahiptir (9).



Şekil 1. Melanomların klinik ve ilgili histopatolojik görüntüleri. Genel olarak, melanomlar histopatolojik özelliklerine göre yüzeysel yayılan melanom (a), nodüler melanom (b), lentigo maligna melanom (c) ve akral lentiginöz melanom (d) olmak üzere dört ana tipe ayrılır . Aynı hastanın karşılık gelen histopatolojik görüntüsü sağda görüntülenir. Ölçek çubuğu = 100 mikron (9)

1.2 Melanom ve Yaşlanma

Epidermal melanositlerin habis transformasyonu olan melanom, cilt kanserine bağlı ölümlerin önde gelen küresel nedenidir. Artan yaş olumsuz bir prognostik göstergedir ve melanomlu yaşlı hastalarda, primer tümör faktörleri kontrol edildiğinde hastalığa özgü sağkalımın daha düşük olduğu gözlemlenmiştir (4). Tümör moleküler yollarındaki ve konakçı bağışıklık tepkisindeki yaşa bağlı farklılıklar kısmen bu bulguların temelini oluşturabilirken, deri yoluyla bağışıklık ve tümör hücresi kaçakçılığını yönetebilecek mimari değişiklikler üzerinde yaşın etkisi iyi araştırılmamıştır (4). Yaşlanma ve bağışıklık, tümör mikro ortamı (TME) yoluyla tümörün biyolojik ilerlemesini etkileyen iki önemli faktördür. TME sadece tümörün ilerlemesinin önemli bir düzenleyicisi olmakla kalmaz, aynı zamanda uzun dönemde hasta prognozunda derin etkilere sahiptir. Yaşlanma, malignite başlangıcı ve ilerlemesinin güçlü bir indükleyicisi olarak kabul edilmiştir. Artan yaşın melanom hastalarının kötü prognozu ile bağlantılı olduğu bildirilmektedir (7).

Mikroskopik düzeyde, yaşlı hastalardan alınan kutanöz melanom numunelerinde ülserasyon, mitotik aktivite, kalınlık ve nodüler histoloji insidansında artış görülmüştür ve tüm bu özelliklerin kötü sonuca katkıda bulunduğu bilinmektedir (10). Mevcut epidemiyolojik veriler, tüm kanserlerin %60'ından fazlasının meydana geldiği yaşlanan popülasyonda kanser insidansının arttığını ve bunun da artan mortaliteye yol açtığını göstermektedir (10). Son istatistikler ayrıca yaşlı hastaların melanom insidansında ve kötü tedavi sonuçlarında en yüksek artışa sahip olduğunu göstermektedir. Kanser genel olarak bir yaşlılık hastalığı olduğu da tespit edilmiştir. Bu nedenle, yaşlı melanom hastalarının zayıf işlevsel bağışıklık sistemi, yaşlılarda artan melanom insidansı ve tedavinin zorluğu ile sonuçlanabilir (10).

Yaşlanma kanser insidans oranlarını, prognozu ve ilaç yanıtını etkiler (11). Bununla ilgili olarak, Kulminski ve ark. (2014), APOE geninin e4 alelinin orta yaştan aşırı yaşlılığa kadar bir dizi yaşta insan sağkalımı üzerindeki etkilerini ve bu etkilerin kardiyovasküler hastalık, kanser ve nörodejeneratif hastalığa duyarlılığını araştırdı. Bu alelin, ishal ve Hepatit C virüsü enfeksiyonunun neden olduğu karaciğer hasarı gibi erken yaşam bulaşıcı hastalıklarına karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu düşünülmektedir. Araştırmaları, alelin erken yaşamda bir avantajı olmasına rağmen, e4 alelinin sağkalım üzerinde orta düzeyde (70-95 yaş) kadınlarla sınırlı önemli bir olumsuz etkisi olduğunu öne sürdü. Ayrıca, cilt dışı kanser, e4 taşıyıcılarının ölüm riskini, orta yaşam süresine sahip kadınlar arasında e4 olmayan taşıyıcılara kıyasla iki kat artırdı. Bu gözlemler, e4 aleli ile yaşam süresi arasında bağlantı kuran ve kanserle ilgili mekanizmalara ilave olmayan bir şekilde müdahale edebilen yaşa ve cinsiyete duyarlı sistemik mekanizmaların varlığını düşündürmektedir (12).

1.3 İlaç Yeniden Konumlandırma

İlacın yeniden konumlandırılması (ilaç yeniden amaca uygun hale getirilmesi, yeniden profillemesi, yeniden yönlendirilmesi, değiştirilmesi vb. olarak da anılır) ile, hali hazırda piyasada bulunan aktif bir farmasötik bileşenin yeni bir endikasyon için yeniden kullanılması amaçlanır. Bu stratejinin bir dizi dezavantajı olmasına ve belirli zorluklar sunmasına rağmen, yeni ilaç keşfi alanında şu anda yaşanan eksikliklerin üstesinden gelinmesine yardımcı olmak da dahil olmak üzere birçok avantaja sahiptir. Bazı tarihsel örnekler mevcut olsa da ilacın yeniden konumlandırılması, 2004 yılında Ashburn ve Thor'un konunun ilk tanımını sağlayan bir makalesiyle ortaya çıkmış olan nispeten yeni bir kavramdır (13). Örnek olarak, Napolitano ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir ilaç yeniden konumlandırma çalışmasında en yüksek skorla yeniden konumlandırılan 12 ilaç ile eski ve yeni kullanım alanları Tablo 1' de gösterilmiştir (14). Bu ilaçlar, klinik ortamda günlük olarak kullanılan onaylanmış ve

pazarlanan bileşikler veya "rafa kaldırılmış" ilaçlar, yani klinik deneylerde başarılı olamayan veya projeleri çeşitli nedenlerle durdurulan moleküller olabilir. Tek cümleyle ilaç yeniden konumlandırma, başarısız ilaçları yenilemek ve başarılı olanların uygulama alanlarını genişletmek olarak tanımlanabilir (15).

Tablo 1. Yeniden konumlandırılan ilk 12 ilaç. Seviye 2 ATC kodları da parantez içinde rapor edilmiştir (14).

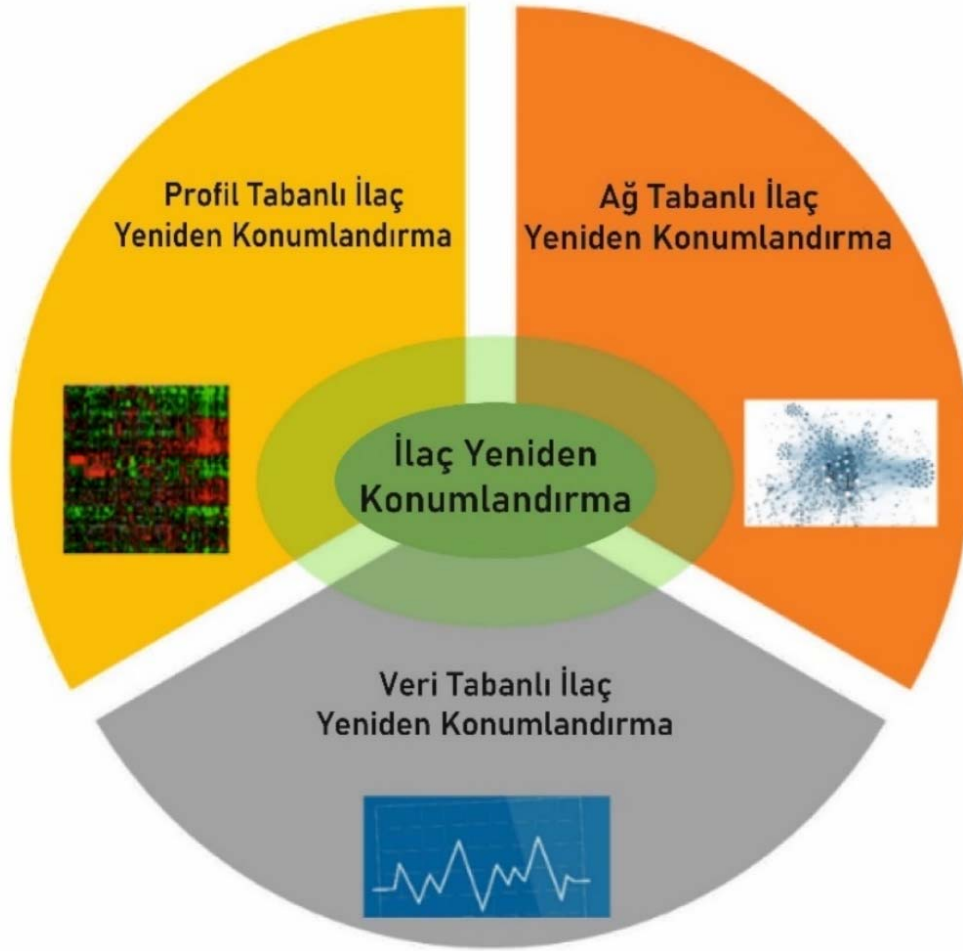
İLAÇ ADI	ORJİNAL ATC TERAPÖTİK SINIFI	ÖNGÖRÜLEN ATC TERAPÖTİK SINIFI
CARBAMAZEPİNE CHLORPHENAMİNE	Antiepileptikler (N03) Sistemik kullanım için antihistaminikler (R06)	Kardiyak tedavi (C01) Psikanaleptikler (N06)
DOBUTAMİNE GEFİTİNİB	Kardiyak tedavi (C01) Antineoplastik ajanlar (L01)	Beta bloke edici ajanlar (C07) Sistemik kullanım için antibakteriyeller (J01)
HYDROXYZİNE	Psikoleptikler (N05)	Sistemik kullanım için antihistaminikler (R06)
IVERMECTİN	Anthelmintikler (P02)	Sistemik kullanım için antibakteriyeller (J01)
LEVOBUNOLOL NİCLOSAMİDE OXAMNİQUİNE SPIRONOLACTONE	Oftalmoloji (S01) Anthelmintikler (P02) Anthelmintikler (P02) Diüretikler (C03)	Beta bloke edici ajanlar (C07) Antineoplastik ajanlar (L01) Antineoplastik ajanlar (L01) Genital sistemin seks hormonları ve modülatörleri (G03)
SULFACETAMİDE	Oftalmoloji (S01)	Sistemik kullanım için antibakteriyeller (J01)
THİETHYLPERAZİNE	Sistemik kullanım için antihistaminikler (R06)	Psikoleptikler (N05)

İlaç yeniden konumlandırmanın birbiriyle ilişkili bir dizi avantajı vardır. Esas olarak, özellikle Amerika Birleşik Devletleri gibi belirli ülkelerde daha önce onaylanmış bir ilacın piyasaya sürülmesine yönelik düzenleyici prosedürlerin basitleştirilmesinden oluşurlar. Bu prosedür, daha önce elde edilen verileri, özellikle de yeniden konumlandırılan bir ilacın geliştirilmesinin ilk aşamalarını önemli ölçüde daha hızlı ve dolayısıyla daha ucuz hale getirebilen ve ilacın piyasaya arz edilme şansını artıran ilacın güvenliği ve toksisitesi hakkında çalışmaları ele alır (13). Yeniden konumlandırılan ilaçlar Faz I, Faz II ve Faz III'teki tüm klinik testleri geçtiği için güvenlikleri onaylanmıştır. Ek olarak, yeniden konumlandırılan bazı ilaçlar moleküler varlıklar olarak pazarlanabilir ve yeni bir endikasyon keşfedildiğinde piyasaya sürülmek için daha fazla fırsata sahip olabilir (5).

İlaç yeniden konumlandırmasındaki temel konu, yeni ilaç-hastalık ilişkilerinin saptanmasıdır. Bu konuyu ele almak için, hesaplamalı, biyolojik deneysel ve karma yaklaşımlar dahil olmak üzere çeşitli yaklaşımlar geliştirilmiştir. Biyoloji mikrodizi tekniklerinin hızla gelişmesiyle çok çeşitli veritabanları oluşturulmuştur (5). Örneğin DrugBank (16), ChemBank (17), OMIM (18), KEGG (19) ve Pubmed (20) gibi çeşitli ilaç ve hastalıkla ilgili bilgi veritabanları ve MIPS (21), PDB (22), GEO (23) ve GenBank (24) gibi proteomik ve genomik veritabanları. Çeşitli verilerin birikimi (örneğin, gen ekspresyonu, kimyasal yapı, proteomik veriler, literatür verileri ve elektronik sağlık kayıtları vb.), ilaç-hastalık ilişkileri için potansiyel adayları vurgulayarak ilacın yeniden konumlandırılması için yeni yöntemlerin geliştirilmesine izin verir (25). Bu bilgi ve veriler, çeşitli yeni hesaplama yaklaşımlarının gelişimini daha hızlı bir şekilde desteklemiştir. Spesifik bakış açılarına odaklanarak ilacın yeniden konumlandırılmasındaki genel stratejileri ve zorlukları sunmak için birkaç kapsamlı inceleme yapılmıştır. İlaç yeniden konumlandırmaya yönelik bu hesaplamalı yaklaşımlar üç stratejiye ayrılabilir: profil tabanlı ilaç yeniden konumlandırma, ağ tabanlı ilaç yeniden konumlandırma ve veri tabanlı ilaç yeniden konumlandırma (Şekil 2) (25).

1.3.1 Profil Tabanlı İlaç Yeniden Konumlandırma

Profil tabanlı ilaç yeniden konumlandırma, bir ilacın biyoaktif profilini diğer ilaç veya hastalık profilleriyle birlikte kullanır. Bu profiller, ifade profilleri, kimyasal yapı profilleri veya klinik profiller olarak kategorize edilebilir. İlaç-ilaç tanımlaması ve ilaç-hastalık tanımlaması için ifadeye dayalı bir profil uygulanabilir. Yeniden konumlandırılan ilaçlar, hücreler veya dokular gibi farklı biyolojik koşullar altında benzer ekspresyon profillerini gösteren ortak terapötik mekanizmaları ortaya çıkarır. Bu mekanizmalar, aday ilaçları ve ilaçların alternatif hedeflerini belirlememizi sağlar. İlaçlar arasındaki veya ilaçlar ve hastalıklar arasındaki transkriptomik profillerin karşılaştırılması, bunlar arasındaki gizli ilişkileri tahmin edebilir (25). Profil tabanlı yaklaşım, mevcut yöntemleri tamamlamak için kullanılabilir ve ilacın yeniden konumlandırılması ve yan etki değerlendirmesinde yeni bir bakış açısı sağlayabilir (26).



Şekil 2. İlaç yeniden konumlandırma için hesaplamalı yaklaşımlar: profil tabanlı ilaç yeniden konumlandırma, ağ tabanlı ilaç yeniden konumlandırma ve veri tabanlı ilaç yeniden konumlandırma (25).

1.3.2 Veri Tabanlı İlaç Yeniden Konumlandırma

Bu ilaç yeniden konumlandırma keşfi, klinik verilerin sistematik analizi ile değil, basit klinik analizlerle tanımlanır. Elektronik sağlık kayıtlar ve klinik araştırma verileri gibi çeşitli klinik verilerin birleştirilmesi için sistematik yaklaşımlar artmıştır. Elektronik sağlık verileri, laboratuvar testlerinin sonuçlarını, ilaç reçete verilerini, semptom açıklamasını ve görüntü verilerini içeren hastaların klinik geçmişine ilişkin çok büyük verileri kapsar. Elektronik sağlık verilerindeki büyük bir miktarı kapsar ve bu veriler ilacın yeniden konumlandırılması için kullanılmıştır; bununla birlikte, Elektronik sağlık verilerinin sınırlı erişilebilirliği ve içsel karmaşası, ilacın yeniden konumlandırılması için kullanımını sınırlamaktadır (25). İlacın yeniden konumlandırılması için kullanılan klinik verilerin en temsili örneği sildenafil'dir (27). Bu ilaç başta pulmoner arteriyel hipertansiyon tedavisi için geliştirilmiştir; ancak beklenmedik yan etkisi nedeniyle sildenafil sonunda erektil disfonksiyon için kullanılmış ve Viagra markası altında satılmıştır. Meme kanserinde raloksifen ve kolorektal

kanserde aspirin gibi retrospektif analizlerden tanımlanan birkaç başka örnekler de vardır (27).

1.3.3 Ağ Tabanlı İlaç Yeniden Konumlandırma

Karmaşık moleküler hastalık durumlarını modelleme ve karşılaştırma zorluğunun üstesinden gelmek için umut verici ağ tabanlı yaklaşımlar Schadt ve arkadaşları tarafından önerilmiştir (28). İlacın yeniden konumlandırılmasına yönelik ağ tabanlı yaklaşımlar, onaylanmış ilaçları ağ ilişkileri yoluyla yeni endikasyonlarla ilişkilendirmeye çalışır. Birçok yönden, ilacın yeniden konumlandırılmasına yönelik ağ tabanlı yaklaşımlar, yeni ilaç-hedef ilişkilerini keşfetmek için kullanılabılır. Bununla birlikte, DrugBank gibi veri havuzlarında bilinen onaylı bileşikler olan ilaç hedefleri ve bu ilaçlar ile endikasyonları arasında bağlantılar sağlayan hem açık hem de etiket dışı reçeteler ile ilişkili çok sayıda bilgi mevcuttur (28).

İnsan Genomu Projesi'nin başarısıyla, genom çapında ilişkilendirme çalışmalarından (GWAS) elde edilen veriler kullanılarak yaygın hastalıkları etkileyen genetik varyantları bulmak için birçok çalışma yapılmıştır. GWAS verilerini kullanan ilaç yeniden konumlandırma çalışmaları genellikle hastalıkla ilişkili mutasyonlara sahip proteinlerin bir hastalığı tedavi eden ilaçların doğrudan hedefi olup olmayacağına odaklanır. GWAS çalışmasından elde edilen genler hedeflenebilir olmadığında, ağ tabanlı bir yaklaşım, GWAS ile ilişkili genlerle protein etkileşimleri olan yeni aday genler sağlayabilir. Bu yaklaşım, çeşitli veritabanlarından elde edilen ilaçlar ve ilgili genlerin hedeflenebilirliğiyle ilgili bilgileri birleştirir ve potansiyel ilaç adaylarını tahmin eder (25). Bu tez çalışmasında ilaç yeniden konumlandırma yöntemi olarak Ağ Tabanlı yaklaşım kullanılmıştır.

Hesaplamalı ilaç yeniden konumlandırma çalışmaları, geleneksel ilaç keşfi ve geliştirme yaklaşımına kıyasla zamandan ve maliyetten tasarruf ederek yeni ilaçların klinik öncesi sürecini optimize etmek için yürütülür; ancak önerilen moleküllerin başarısını anlamak için yeniden konumlandırılan ilaç adaylarının etkinliğini ölçmek gerekmektedir. Bu ölçümler; *in vitro* deneyler, *in vivo* deneyler, elektronik sağlık kayıtları, çapraz doğrulama, önceki modellerle kıyaslama, vaka çalışmaları, literatür çapraz referansı ve alan uzmanlarına danışma olarak sınıflandırılabilir (29). Bu tez çalışmasında melanom için ilaç yeniden konumlandırma ile belirlenen aday ilaçların etkinliğine *in vitro* sitotoksite deneyleriyle bakılmıştır.

1.4 Moleküler Kenetlenme

Moleküler kenetlenme (docking), kimyasal ligandlar ve hedeflerin üç boyutlu yapıları arasındaki ilişkileri, bunların doğrudan fiziksel etkileşimlerinin simülasyonu ve modellenmesi yoluyla keşfetmeyi amaçlayan bir dizi hesaplama yöntemini içerir (30). İlk olarak Kuntz ve diğerleri tarafından tanıtılan kenetlenme, (genellikle) iki bağlanma partnerinden oluşan bir kompleksi sanal olarak tahmin etmeye çalışan bir hesaplama yöntemidir (31). Moleküler kenetleme, ilgili belirli bir proteine bağlanan bir ligandın "en uygun" yönelimini tanımlayan bir optimizasyon problemi olarak tanımlanabilir (32).

Moleküler kenetlenme, bir proteinin bağlanma cebindeki ligandların doğru pozlarını belirlemeyi ve ligand ile protein arasındaki afiniteyi tahmin etmeyi amaçlar. Ligand türlerine göre kenetlenme şu şekilde sınıflandırılabilir: protein-küçük molekül (ligand), protein-nükleik asit, protein-protein kenetlenmesi. Protein-küçük molekül (ligand) kenetlenmesi, karmaşıklık spektrumunun daha basit bir ucunu temsil eder ve proteinleri potansiyel olarak engelleyebilecek molekülleri tahmin etmede özellikle iyi performans gösteren birçok programdan yararlanılabilir (33).

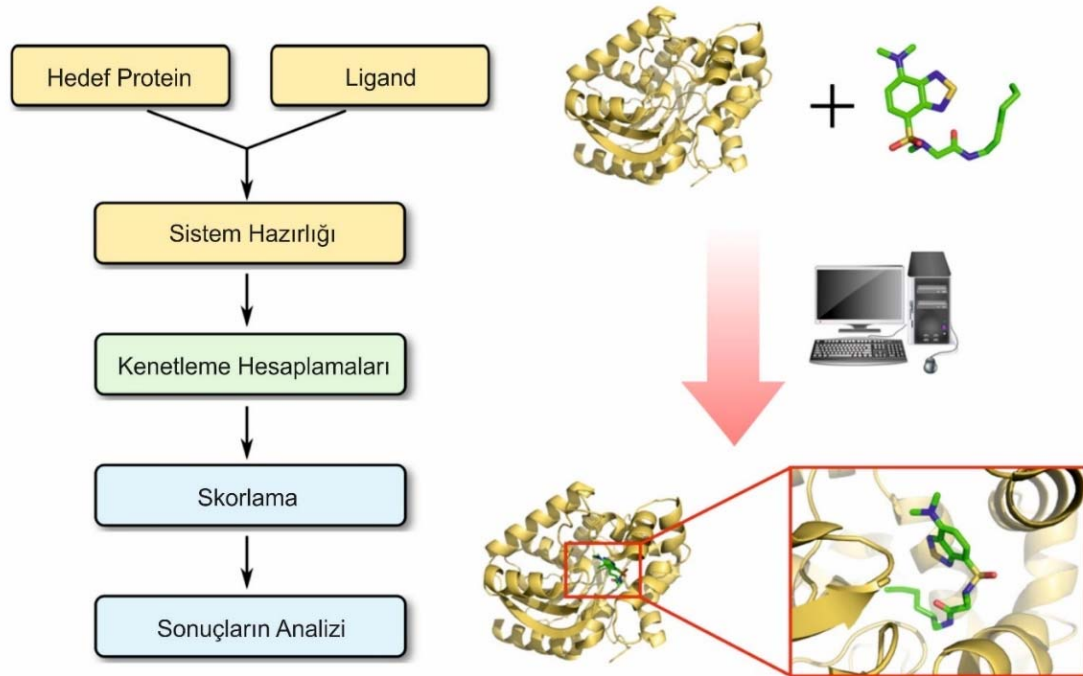
Moleküler kenetlenme için çeşitli sunucular ve programlar mevcuttur. Her araç, poz oluşturma, iyileştirme ve reseptör-ligand etkileşimlerinin hesaplanması için farklı güç alanları ve algoritmalar kullanır. Algoritmaları ve genel bilgileri de dahil olmak üzere başlıca kenetlenme programlarının kısa bir listesi Tablo 2’de gösterilmiştir. Bu programlar arasından ücretsiz olan Autodock Vina yazılımı mükemmel bir başlangıç noktasıdır ve çeşitli protein ailelerine karşı gösterdiği iyi performans nedeniyle "her işin ustası" olarak görülebilir (34).

Tablo 2. Protein-ligand kenetlenmesi için mevcut yazılım örnekleri ve bunların arama algoritması (34)

İSİM	ARAŞTIRMA ALGORİTMASI	TÜR	REFERANS
AUTODOCK4	Lamarckian genetik algoritması	Akademik	Morris, 2009 (35)
DOCK	Şekil eşleştirme	Akademik	Allen, 2015 (36)
OEDOCKING	Şekil eşleştirme	Akademik	Kelley, 2015 (37); McGann, 2011 (38)
FLEKSY	Küme-temelli	Ticari	Nabuurs, 2007 (39); Wagener, 2012 (40)
SWISSDOCK	Evrimsel optimizasyon	Akademik	A. Grosdidier, 2011 (41)
GOLD	Genetik algoritma	Ticari	Jones, 1997 (42)
GLIDE	Hibrit	Ticari	Friesner, 2004 (43)
VINA	Bölgesel optimizasyon	Akademik	Trott & Olson, 2009 (44)

RDOCK	Hibrit	Akademik	Ruiz-Carmona, 2014 (45)
LEDOCK	Benzetimli-tavlama	Akademik	Unzue, 2016 (46)
PLANTS	Karınca koloni optimizasyonu	Akademik	Korb, 2009 (47)
HADDOCK	Hibrit	Akademik	Dominguez, Boelens & Bonvin, 2003 (48)
SURFLEX-DOCK	Şekil eşleştirme	Ticari	Spitzer & Jain, 2012 (49)
MOE	Hibrit	Ticari	Vilar, Cozza & Moro, 2008 (50)
FLEXX	Şekil eşleştirme	Ticari	Kramer, Rarey & Lengauer, 1999 (51)
FITTED	Hibrit	Ticari	Corbeil & Moitessier, 2009 (52); De Cesco, 2017 (53); Englebienne & Moitessier, 2009 (54); Moitessier, 2016 (55)
LIGANDFIT	Şekil eşleştirme	Ticari	Venkatachalam, 2003 (56)
ICM	Hibrit	Ticari	Neves, Totrov & Abagyan, 2012 (57)
IGEMDOCK	Evrimsel optimizasyon	Akademik	Yang & Chen, 2004 (58)

Moleküler Kenetleme işlemi 3 ana bölüme ayrılabilir; 1) Ligand ve Proteinin Hazırlanması (59); 2) Kenetlenme Türünü Tanımlama; Esnek ve Sabit (60); 3) Ligand Konformasyonları İçin Arama Stratejilerini Ayarlama (61). Moleküler Kenetleme işlemlerinin bir sonraki aşamasında verilerin analizi için 4) Puanlama/Skorlama işlevleri ve 5) Kenetleme doğruluğu iyi anlaşılmalıdır (Şekil 3).



Şekil 3. Moleküler kenetleme aşamaları (62)

1.4.1 Ligand ve Proteinin Hazırlanması

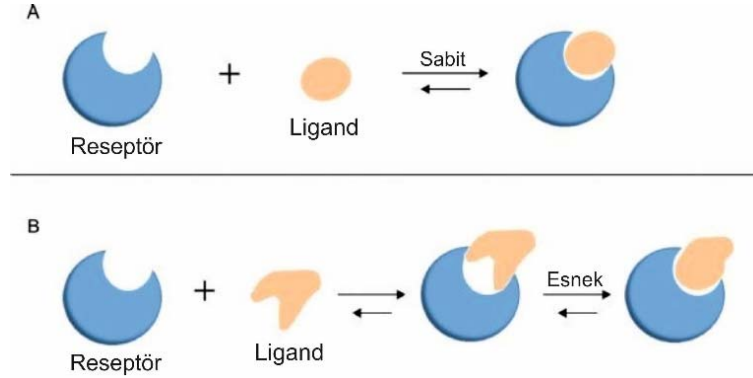
Herhangi bir hesaplama yapmadan önce ligand ve protein dikkatlice seçilmeli ve hazırlanmalıdır. İlk adım, hedef proteinin, tercihen hali hazırda ligandla bağlı, yapısını elde etmektir. Yüksek çözünürlüğe sahip üç boyutlu yapıların veya doğal substratlarla birlikte kristalize edilmiş yapıların dikkate alınması bu aşamada tavsiye edilir. Bazı proteinler için bu her zaman böyle olmayabilir. Bu gibi durumlarda, önceden moleküler kenetlenme veya yapısal çalışmaları bulunan yapılar kullanılabilir. Genellikle ligand ve protein ayrı olarak işlenir ve hazırlanır (34).

Protein yapıları, PDB ve benzeri protein veri bankalarından elde edilebilir ve küçük molekül ligand yapıları araştırmanın konusuna göre DrugBank, ChEMBL gibi farklı kaynaklardan temin edilebilir. Ligand ve protein hazırlığının ardından, tahmini bağlanma bölgesi seçilmeli ve arama o bölgeyle sınırlandırılmalıdır. Bu adım, koordinatlar belirtilerek manuel olarak veya herhangi bir bağlı ligandın koordinatları kullanılarak otomatik olarak yapılabilir. Bağlanma bölgesinin haritalanması (kenetlenme hesaplamalarının ortalanaacağı yer) genellikle GRID yöntemi ile yapılır (63). Kısaca GRID, bir araştırma atomunun olası bir etkileşim konturunu çizdiği daha küçük küplere bölünmüş, belirli boyutlarda bir kutu olarak düşünülebilir. Bu nedenle, sonuçlar GRID çözünürlüğüne ve boyutuna bağlıdır. Bu noktayı açıklamak için iyi bir örnek Autodock Vina'dır; Autodock Vina bunu anında yaparak daha hızlı bir hesaplama sağlar (44).

1.4.2 Kenetleme Türünü Tanımlama

Protein ve ligand hazırlığının ardından kenetleme tipi seçilmelidir. Günümüzde moleküler kenetlenme için birçok yazılım ve program kullanılmaktadır. Bu yazılımlar yöntemine göre 3 türe ayrılmaktadır: 1) Sıkı (rijit) Kenetleme; Kenetleme sırasında moleküllerin konumu, uzamsal şekli bozulmadan değiştirilmektedir. Molekül bir değişikliğe uğramaz. 2) Esnek-Sıkı Kenetleme; Kenetleme sırasında makromolekül reseptörünün yapısı sabit, küçük molekülün yapısı esnektir. Sabit kenetlemeye göre doğruluk oranı daha yüksektir. 3) Esnek Kenetleme; Kenetleme sırasında hem makromolekül reseptör yapısı hem de küçük molekül yapısı esnektir (Şekil 4). Moleküllerdeki hareketli bağlar doğada olduğu gibi programda da hareketlidir. Bu da daha gerçekçi sonuçların alınmasını sağlar. Ancak bu daha fazla hesaplama yükü demektir ve daha fazla işlemci kapasitesi gerektirir (64). Esnek

kenetlenmede, residüler enerji hesaplaması için ek koşul olarak seçilir. Bu manuel olarak (Autodock, Vina) veya otomatik olarak (ICM, MOE) yapılabilir.



Şekil 4. Moleküler kenetlemenin iki modeli (64).

1.4.3 Ligand Konformasyonları İçin Arama Stratejilerini Ayarlama

Ligand yapısı ve yerleşimi, kenetleme algoritmasının seçimine bağlı olacaktır. Bu, konformasyonel bir araştırmayı ve puanlama fonksiyonuna göre en uygun çözümün seçimini içerir. Bu arama sistematik veya rastgele olabilir (64). Sistematik arama, konformasyonların kapsamlı bir örneklemesini ve yapısal parametrelerin kombinasyonunu içerir. Bununla birlikte, bu yaklaşım, daha fazla kaynak kullanır ve konformerleri oluşturmak ve bunları ayrı ayrı değerlendirmek için önemli ölçüde daha fazla zaman alır. Ek olarak, gerçek bir sistematik arama bir kombinatoriyal patlama oluşturabilir. Bu sorunu önlemek için, ligandı farklı parçalardan oluşturarak sistematik araştırma yapılır: biri ana yapı olarak seçilir ve sırayla kalan parçaların kombinasyonları eklenir (64).

1.4.4 Puanlama İşlevleri

Puanlama işlevi, kenetleme sonucu oluşan yapıları potansiyel bağlanma yakınlıklarına göre değerlendirmek ve sıralamak için kullanılır (65). Puanlama işlevleri kabaca dört sınıfa ayrılabilir: kuvvet alanı tabanlı, bilgi tabanlı, ampirik ve birleşik. Farklı yazılımlar farklı puanlama türleri kullanabilir. Örneğin, AutoDock puanlama işlevi klasik moleküler mekanik kuvvet alanlarına dayalıyken, AutoDock Vina puanlama işlevi herhangi bir fiziksel modele değil, 'makine öğrenimi' biçimciliğine dayalıdır (65). Kenetleme algoritmaları, bağlanma bölgesi içindeki ligand için bir dizi yönelimi (poz) tahmin eder. Öngörülen ligand konformasyonlarının değerlendirilmesi ve sıralanması, skorelama fonksiyonları olarak bilinen bazı yaklaşık matematiksel fonksiyonlar tarafından yürütülür. Serbest enerji

pertürbasyonu yaklaşımları, çeşitli bağlanma bileşenlerin dikkate alan bir formülle ifade edilir (Denklem 1). Bu denklem, çözücünün ligand ve protein ile etkileşiminin etkisi nedeniyle $\Delta G_{\text{solvent}}$, protein ve liganddaki konformasyonel değişikliklerin etkisi nedeniyle ΔG_{conf} , spesifik protein-ligand etkileşiminin serbest enerjisi nedeniyle ΔG_{int} , genellikle entropik katkı olarak bilinen, donabilen dönebilen bağlardan kaynaklanan serbest enerji nedeniyle ΔG_{rot} , iki cismin (protein ve ligand) tek bir cisim (protein-ligand kompleksi) oluşturmak üzere birleşmesinden kaynaklanan translasyonel ve rotasyonel serbest enerji kaybı nedeniyle $\Delta G_{\text{trans/rot}}$ ve titreşim modlarındaki değişiklikler nedeniyle ΔG_{vib} gibi parametreleri barındırır (66) (Denklem 1).

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_{\text{solvent}} + \Delta G_{\text{conf}} + \Delta G_{\text{int}} + \Delta G_{\text{rot}} + \Delta G_{\text{trans/rot}} + \Delta G_{\text{vib}}$$

Denklem 1. Bağlanma serbest enerji bileşenleri denklemi

Puanlama işlevi, her poz için bir puan üretir ve elde edilen değerler, farklı pozları ve ligandları sıralamak için kullanılır. Metodolojik anlamda kenetlenme sürecinde iki bağımsız aşama vardır: poz oluşturma ve puanlama. Poz oluşturmada, farklı ligand yapılarını proteinin bağlanma bölgesi içinde hizalamak için kullanılan yöntemleri ifade eder. İkincisi, puanlama, poz kalitesinin nicel bir tahmini için kenetlenme sürecinde gereklidir (31).

1.4.5 Kenetleme Doğruluğu

Docking yöntemlerinin doğru pozları belirlemede ortalama olarak %60-75 civarında başarı oranına sahip olduğu gösterilmiştir (67). Kenetlenmenin kapsamı ve yetenekleri yıllar boyunca tartışıldı. Bugüne kadar, farklı kenetlenme programlarını karşılaştıran birkaç kıyaslama çalışması yayınlanmıştır (34). Sanal taramanın doğru aşamasında doğru kenetlenme algoritmasını kullanmak çok önemlidir (68).

Wang ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, PDDBind veri tabanından (sürüm 2014) alınan 2002 protein-ligand komplekslerinin kapsamlı bir veri setine dayanarak, beş ticari program (LigandFit, Glide, GOLD, MOE Dock, ve Surflex-Dock) ve beş akademik program (AutoDock, AutoDock Vina, LeDock, rDock ve UCSF DOCK), bağlanma pozunu tahmini (örnekleme gücü) ve bağlanma afinite tahmininin (puanlama gücü) doğrulukları incelenerek sistematik olarak değerlendirilmiş, sonuçta GOLD ve LeDock'un en iyi örnekleme gücüne (GOLD: en çok puan alan pozlar için %59,8 doğruluk; LeDock: en iyi pozlar için %80,8 doğruluk) ve AutoDock Vina'nın en iyi puanlama gücüne sahip olduğunu gösterilmiştir

(rp/rs cinsinden 0.564/0.580 ve 0.569/0.584 en yüksek puanlı pozlar ve en iyi pozlar) (67). Bu tezde kenetleme çalışmaları Autodock Vina yazılımı ile yapılacaktır.

1.4.6 Sonuçların Analizi

Herhangi bir teknikte olduğu gibi, kenetlenme protokollerinin de doğrulanması gerekir (69). Bu süreç, protein modellemesi ve seçimi de dahil olmak üzere simülasyondan önce başlar. Yukarıda belirtildiği gibi kenetlenme girdisi farklı kaynaklardan gelebilir, ancak en yaygın olanı deneysel yollarla bulunmuş üç boyutlu yapıları içeren PDB'dir (70).

Moleküler hedefin üç boyutlu yapısını hazırladıktan sonra, kenetleme protokolünün doğrulanması için yaygın kullanılan bir uygulama, referans ligandın ilgilenilen reseptöre yeniden kenetlenmesidir. Bu, kenetleme algoritmasının doğru bir poz üretip üretmediğini ve puanlama işlevinin bunu bir üst poz olarak tanımlayıp tanımlayamayacağını test etmek için yapılır. Standart veya ortak bir doğrulama ölçütü olarak araştırmacılar, her iki yapının tüm ağır atomlarının tahmin edilen koordinatlarına karşı ilk uyumun koordinatlarını karşılaştıran kök ortalama kare sapmayı (RMSD) kullanır (Denklem 2). RMSD, bu bağlamda genellikle atomlar (alfa-karbonlar) olmak üzere iki nokta arasındaki Öklid (düz çizgi) mesafesini 3B uzayda ölçmenin bir yoludur. Basitçe x, y ve z koordinatlarının karesi alınır (herhangi bir işareti kaldırmak için), toplanır ve ardından büyüklüğü doğru düzeye döndürmek için tümü kareköklenir. Denklem 2'de N, atom sayısıdır; i, değişken; c_i, 1. molekülün atomları d_i, ikinci molekülün atomları ve x,y ve z 3B koordinat vektörleridir. Genel olarak, RMSD değerleri 2,0 Å'den az olmalıdır; büyük bir sapma, kenetleme programının sonuç pozunun tahmini için uygun olmadığını gösterir (71). RMSD'ye ek olarak, doğru poz değerlendirmesi etkileşim-geri kazanıma dayalı olmalıdır, yani protein-ligand etkileşimleri referans ve tahmin ile eşleşmelidir.

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_{ci} - x_{di})^2 + (y_{ci} - y_{di})^2 + (z_{ci} - z_{di})^2}$$

Denklem 2. Kök Ortalama Kare Sapma (RMSD) formülü

1.5 *In Vitro* Sitotoksikite Analizleri

İlaç yeniden konumlandırma hem hesaplamalı hem de deneysel yöntemlerden yararlanır. Hesaplamalı yaklaşımlarla seçilen aday bileşiklerin, *in vitro* ve *in vivo* deneysel testler veya elektronik sağlık kayıtları ile uygun şekilde doğrulanması gerekir. Genomik verisindeki

ilerlemeler sayesinde, hastalıklarla bağlantılı yollar ve bunların veritabanlarından sağlanıyor oluşu, kişiselleştirilmiş tıpta ilaç yeniden konumlandırmanın uygulamasının önünü açmaktadır (72).

Biyolojik değerlendirme ve tarama testlerinden biri olan *in vitro* sitotoksosite testi, hücre büyümesini, çoğalmasını ve morfolojik etkilerini *in vitro* olarak gözlemlemek için dokudan elde edilmiş hücre hatlarını kullanır (73). Sitotoksosite, tercih edilen ve zorunlu maddelerle birlikte bir dizi avantajı olduğu için biyolojik değerlendirme için en önemli yöntemlerden biridir (74). Sitotoksosite, uygulanan molekülün dozuna ve maruz kalma süresine bağlı olarak hücrelerin farklı derecelerde zarar gördüğü bir olaydır. Hücreler, sitotoksik maddeye maruz kalırsa apoptoz, otofaji ve nekroz gibi olaylar sonucunda ölebilir ya da üreme özelliklerini kaybedebilirler (75). *In vitro* deneyler sonucunda hücrelerin sitotoksosite değerleri ölçülmelidir. Canlı hücreler, tetrazolyum bileşiklerini, bir spektrofotometre ile bir absorbans değişikliği olarak tespit edilebilen yoğun renkli formazan ürünlerine indirger. ATP ölçümü, kültürde bulunan canlı hücre sayısının geçerli bir göstergesi olarak geniş çapta kabul görmüştür. Hücre kültürü altında, metabolizmayı büyük ölçüde değiştirmeyen deneysel koşullar altında, ATP miktarı canlı hücrelerin sayısı ile doğru orantılıdır (76). Cansız hücreler yalnızca ATP sentezleme yeteneğini kaybetmekle kalmaz, aynı zamanda mevcut ATP'yi hızla tüketen endojen ATPazları da içerir (77).

1.5.1 Sitotoksosite Ölçümünde Kullanılan Yöntemler

In vitro sitotoksosite testleriyle canlılık ölçümü için kullanılan yöntemler 4 ayrı başlık altında açıklanabilir.

- 1) Boyama yöntemleri: Bu yöntemle canlı hücreler boyayı geçirmezken ölü hücreler boyanır ve görüntülenmesi kolaylaşır. *In vitro* testler için kullanılan boyalara Tripan Blue, Eozin ve Eritrosin B örnek verilebilir.
- 2) Kolorimetrik yöntemler: Bu yöntemler içinde en sık kullanılan testler, metabolik aktivitenin ölçümünü baz alan hücre ölümü ve proliferasyonu testleridir. Nötral kırmızısı alım (NRU) testi, 3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolyum bromür (MTT) testi, XTT testi, MTS testi, suda çözünen formazan 1 (WST-1) testi, sulforhodamin B (SRB) ve suda çözünen formazan 8 (WST-8) testi bu yöntem için örnek gösterilebilir. Testler uygulandıktan sonra spektrofotometrik okumalarla hücre canlılığı tespit edilir.
- 3) Florometrik yöntemler: alamarBlue testi ve CFDAAM testleri bunlara örnek verilebilir.

4) Luminometrik yöntemler: Gerçek zamanlı canlılık belirleme yöntemleri ve ATP miktarı ölçümü sık kullanılan luminometrik testlere örnek verilebilir.

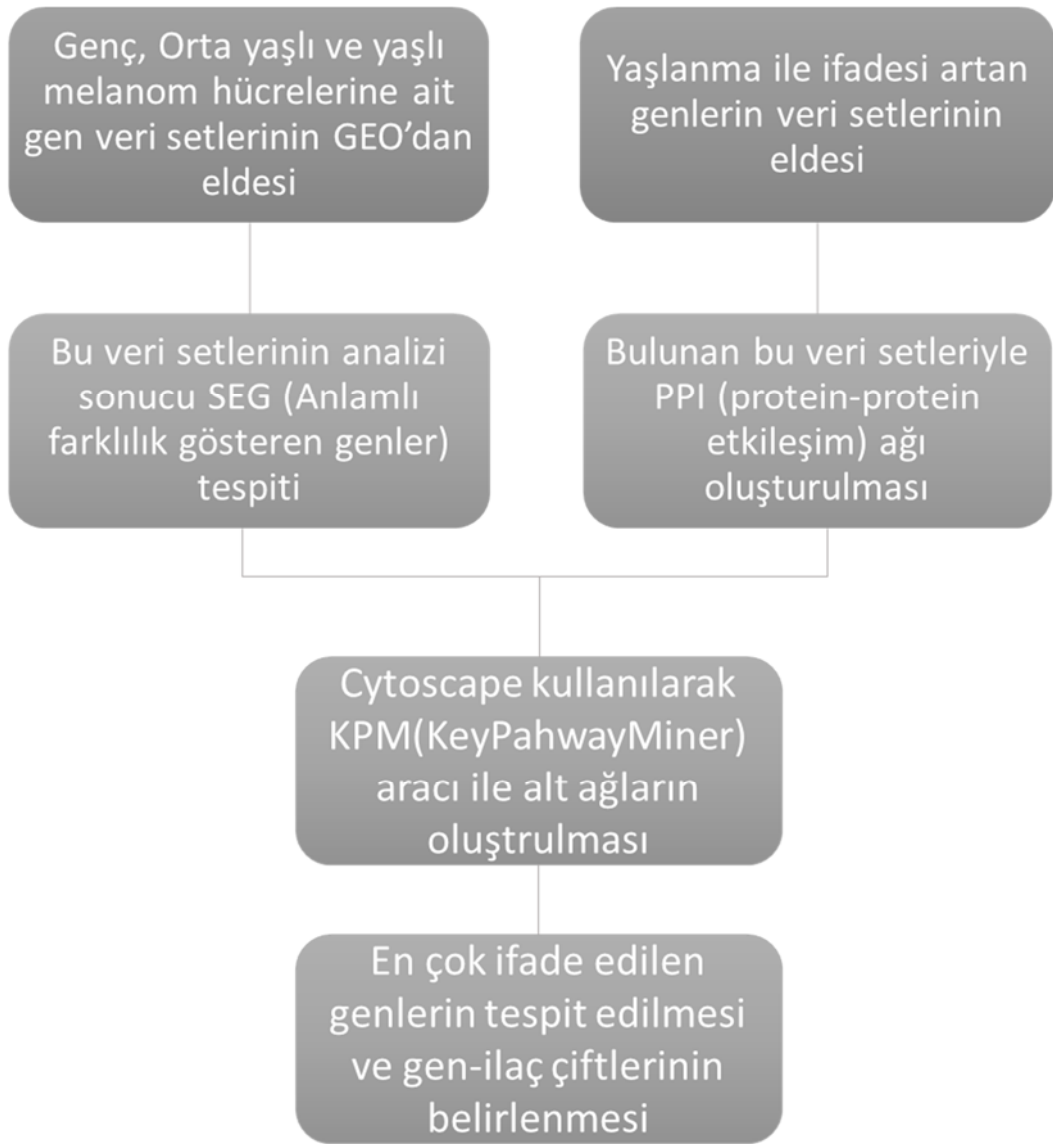
5) Apoptozun belirlenmesi: Bunun için kaspazların aktiviteleri ölçülebilir. DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlayan TUNEL yöntemi kullanılabilir. Apoptotik ve Nekrotik hücreler ve oranları akış sitometrisi ile belirlenebilir ve bunların oranları belirlenebilir. Ayrıca, apoptozda rol alan proteinlerin ekspresyonları belirlenebilir.

6) Otofajinin belirlenmesi için kullanılan teknikler: Otofajide rol alan proteinlerin ekspresyonlarının belirlenmesinden yararlanılabilir.

Bunlar arasından en çok tercih edilen yöntemler ucuz ve kolay uygulanabilir olması sebebiyle kolorimetrik yöntemlerdir. Canlılık ölçümü testinden sonra IC50 (inhibitör konsantrasyon 50), yani hücrelerin %50'nin öldüğü konsantrasyon değeri kullanılarak toksisitenin değerlendirmesine farklı analizlerle devam edilir (78).

2. MATERYAL VE METOT

Bu tez çalışmasında melanoma yönelik ilaç yeniden konumlandırmak ve yaşlanmanın melanom üzerine etkilerini belirleyerek ortak ilaç önerisi yapmak için öncelikle Gene Expression Omnibus (GEO) (23) veri tabanından ilgili transkripsiyon veri setleri elde edilmiştir. Bu veri setlerinin R tabanlı GEO2R ile analizi sonucunda mRNA seviyesi anlamlı olarak değişen genler (SEG) olarak tespit edilmiştir. Anlamlı olarak ifade edilen genlerin hastalık durumunda aynı zamanda iki kattan fazla yukarı- veya aşağı-regüle olduğu belirlenirse anlatımı anlamlı oranda farklılık gösteren gen (DEG) olarak kabul edilmiştir. Tezin ilk aşamasında; melanoma yönelik olarak belirlene DEG'ler kullanılarak geneXpharma (79) ile ilaç yeniden konumlandırma yapılmış ve aday ilaçlar için AutoDock Vina (44) kullanılarak yapılan moleküler kenetlenme çalışmaları sonucunda belirlenen en uygun aday ilaçlar *in vitro* sitotoksiste deneyleriyle test edilmiştir. Melanomla ilgili tüm bu çalışmalar TÜSEB 2019-TA-02 4591 no'lu proje ile desteklenmiştir. Tezin ikinci aşamasında; melanom ve yaşlanma arasındaki ilişkiyi analiz etmek üzere öncelikle yaşlanma ile ilgili genleri barındıran GenAge veri tabanından (80) genler alınarak STRING web aracı (81) ile bu genlerin kodladığı proteinler ve komşularını içeren protein-protein etkileşim ağı oluşturulmuştur. Melanom ve yaşlanmaya yönelik protein-protein etkileşim ağını incelemek ve transkriptom verilerini haritalayarak alt ağları oluşturmak amacıyla Cytoscape (82) programında KeyPathwayMiner (KPM) (83) eklentisi kullanılmıştır. Sonuçta elde edilen alt-ağdaki proteinleri hedefleyen ilaçlar DGIdb (84) veri tabanından elde edilmiştir. Melanom ve yaşlılıkla ilgili ilaç-protein çiftleri için moleküler kenetleme çalışmaları yapıldıktan sonra belirlenen en uygun ilaç adayları literatür taramasıyla birlikte incelenmiştir. Tezin ikinci kısmı için izlenen yöntemler Şekil 5'te özetlenmiştir.



Şekil 5. Melanom ve yaşlılıkla ilgili ilaçları belirlerken kullanılan yöntem basamakları.

2.1 Melanom Ve Yaşlanmanın Melanom Üzerilerine Etkileri İçin Transkripsiyon Veri Setlerinin Eldesi

Bu tez çalışmasında melanoma yönelik olarak ilaç yeniden konumlandırma yapılarak test edilmiş ve daha sonra yaşlılığın melanom üzerine etkileri incelenerek ortak ilaç önerisi yapılmıştır.

2.1.1 Melanom İçin Transkripsiyon Veri Setlerinin Elde Edilmesi

Çalışmanın amacına göre seçilen transkriptom veri setlerinde, hastalıklı örneklere karşılık sağlıklı bireylere ait gen ekspresyon verileri seçimine dikkat edilmiştir. Ayrıca, heterojeniteyi oluşturacak nitelikteki farklılıklar (doku veya hücre tipi, kanserin aşaması, sağkalım, vb.) dikkate alınarak örnekler sınıflandırılmıştır. Bu gereksinimi karşılayacak nitelikte melanom rneği içeren GSE31879 ve GSE6887 mRNA gen ekspresyon (transkriptom) veri setleri Gene Expression Omnibus (GEO) veri bankasından (85) elde edilmiştir. GSE31879 veri seti, 4 normal (kanseri olmayan) melanosit ve 10 birincil melanom rneği ile toplam 14 örneklem sayısına sahiptir ve Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array platformu kullanılarak analiz edilmiştir. GSE31879 veri seti daha önce çalışma arkadaşımız Nevin Betül İmat'ın tez çalışmasında (86) incelenmiş olup bu tez kapsamında eklenen yeni veri setiyle birlikte tekrar analiz edilmiştir. Yeni eklenen GSE6887 veri seti ise, 23 normal (kanseri olmayan) ve 23 melanom hasta rneği ile toplam 46 örneklem sayısına sahiptir ve Agilent-012097 Human 1A (V2) G4110B platformu kullanılarak analiz edilmiştir.

2.1.2 Melanom Ve Yaşlılık İlgili Transkripsiyon Veri Setlerinin Elde Edilmesi

Bu çalışmada, ayrıca, hem yaşlanan hücrelerin onarımına hem de melanoma dnşmiş epidermis hücrelerine yönelik kullanılabilecek ortak ilaçlar önerilmesi hedeflenmektedir. Bu yüzden transkriptom veri setlerini seçerken yaşlılığın melanom üzerine etkisini inceleyen çalışmadan elde edilen transkriptom veri seti de kullanılacaktır. Bu amaçla GSE57445 veri seti GEO veri bankasından elde edilmiştir. Bu veri setinin eldesinde yaşlanan mikro ortamın melanom hücre gen ekspresyonu üzerindeki etkilerini değerlendirmek için, transwell odaları kullanarak üçer kopya halinde üç farklı melanom hücre hattı ile:

- UACC1273, 50 yaşında erkekten alınan melanoma hücre hattı;
- M93-047, 75 yaşında kadından alınan melanoma hücre hattı;
- UACC903, 25 yaşında erkekten alınan melanoma hücre hattı;

genç (<35 yaş), orta (35-55 yaş) ve yaşlı (>55 yaş) bireylerin dermal fibroblastlarıyla birlikte kültürlenmiştir. Yani farklı kombinasyonlarda toplam $3 \times 3 \times 3 = 27$ örneklem bulunmaktadır (Tablo 3). 96 saatlik ortak kültürden sonra st oyuktaki fibroblastlar çıkarılmış ve melanom hücreleri (alt bölme) mikrodizi analizine tabi tutulmuştur (87).

Tablo 3. M93-047, UACC-903, UACC-1273 melanom hücre hatları ve bu hücre hatlarıyla 3 tekrarlı olarak yapılmış deneylerden elde edilen transkriptom veri setleri.

M93-047 HÜCRE HATTI	UACC-903 Hücre Hattı	UACC-1273 Hücre Hattı
Genç Fibroblastlar 1. Tekrar	Genç Fibroblastlar 1. Tekrar	Genç Fibroblastlar 1. Tekrar
Genç Fibroblastlar 2. Tekrar	Genç Fibroblastlar 2. Tekrar	Genç Fibroblastlar 2. Tekrar
Genç Fibroblastlar 3. Tekrar	Genç Fibroblastlar 3. Tekrar	Genç Fibroblastlar 3. Tekrar
Orta Yaşlı Fibroblastlar 1. Tekrar	Orta Yaşlı Fibroblastlar 1. Tekrar	Orta Yaşlı Fibroblastlar 1. Tekrar
Orta Yaşlı Fibroblastlar 2. Tekrar	Orta Yaşlı Fibroblastlar 2. Tekrar	Orta Yaşlı Fibroblastlar 2. Tekrar
Orta Yaşlı Fibroblastlar 3. Tekrar	Orta Yaşlı Fibroblastlar 3. Tekrar	Orta Yaşlı Fibroblastlar 3. Tekrar
Yaşlı Fibroblastlar 1. Tekrar	Yaşlı Fibroblastlar 1. Tekrar	Yaşlı Fibroblastlar 1. Tekrar
Yaşlı Fibroblastlar 2. Tekrar	Yaşlı Fibroblastlar 2. Tekrar	Yaşlı Fibroblastlar 2. Tekrar
Yaşlı Fibroblastlar 3. Tekrar	Yaşlı Fibroblastlar 3. Tekrar	Yaşlı Fibroblastlar 3. Tekrar

2.2 Tüm Transkripsiyon Veri Setleri İçin mRNA Seviyesinde Anlatımı Farklılık Gösteren Genlerin Tespit Edilmesi

Sağlık ve hastalık koşulları karşılaştırıldığında, anlatım/ekspresyon seviyesinde anlamlı olarak değişen (significantly expressed gene, SEG) ve anlamlı oranda farklılık gösteren genlerin (differentially expressed gene, DEG) bulunması için her veri seti bağımsız olarak R/Bioconductor (88) yazılım platformu altında istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Analiz süresince, RMA normalizasyonu (89) ve mikrodizin verileri için linear modeller (LIMMA) (90) metodu kullanılmıştır. Çoklu hipotez testleri gereğince p-değerlerinin düzeltilmesi FDR (yanlış keşif oranı) yöntemi ile gerçekleştirilmiş ve veri setinin istatistiksel analizi sonrasında DEG’ler tespit edilmiştir.

Veri setlerinin istatistiksel analizi yapılırken melanom için kullanılan GSE31879 ve GSE6887 veri setleri için p-değeri üst sınırı sırasıyla 0,05 ve 0,01 olarak belirlenmiştir (2. veri setinden çok fazla sayıda SEG geldiği için daha düşük bir p-değeri seçilmiştir). p-değeri istatistiksel anlamlılığın varlığını veya farklılığını, bu farklılığın eğer varsa düzeyini belirlemek için kullanılan bir değerdir. Her istatistiksel testin sonucunda kullanılan test istatistiğine ait bir p-değeri hesaplanır. Bu p-değeri “ilgili hipotez testi sonucunda anlamlı fark vardır” denilen durumlarda hatalı karar verme olasılığının ne olduğunu gösterir. Her ne kadar p-değerinin 0,05’ten küçük olması tıp literatüründe “istatistiksel olarak anlamlı” kabul edilse de araştırmacının tercihlerine göre 0,01 olarak da kabul edilebilir. p-değeri ne kadar küçük olursa sıfır hipotezini reddetmek için elimizdeki kanıt o kadar yüksek olur (91).

Gen anlatımındaki değişikliğin yönü (gen anlatımı artan/azalan) belirlenirken kat değişim (fold change, FC) değerleri için 2 tabanında logFC 1'in üstündeysen (gen anlatımında 2 kat artan) yukarı-regule ve -1'in altındaysa (gen anlatımında yarı yarıya azalan) aşağı-regule olarak dikkate alınmıştır. Genlerin isimlendirmeleri (gene symbol, Entrez Gene ID, Affy ID vs.) ile alakalı değişiklik yapılması gerektiğinde bioDBnet platformu kullanılmıştır (92).

2.3 Tespit Edilen SEG ve DEG'leri Hedefleyen İlaçların Belirlenmesi

2.3.1 Melanom için İlaç Yeniden Konumlandırma

geneXpharma (79), istatistiksel analizlerle desteklenen transkriptomik güdümlü bir ilaç yeniden konumlandırma (repozisyon) aracıdır. Bu biyoinformatik araç, 15 farklı veri tabanını birleştiren Drug Gene Interaction Database (DGIdb 2.0) (84) veribankasından kapsamlı ilaç-gen etkileşim verisini kullanarak, gen ifadesine dayalı bir ilaç yeniden konumlandırma analiziyle rahim ağzı kanserinin de içinde bulunduğu 48 hastalık için ilaç adayları sunar. geneXpharma, 48 hastalık için 118 hastalığa özgü gen ekspresyon profil veri setini, gen-hastalık ve ilaç-hastalık ilişkileri için istatistiksel değerlendirmeleri içerir. İstatistiksel bağlantı yöntemi (93), gen ekspresyon verisine uyarlanmış ve ilaç-veri seti ilişkilerinin öngörülmesinde kullanılmıştır. Bir ilacın hastalık veri seti ile ilişkisi, hipergeometrik olasılık yoğunluk fonksiyonu kullanılarak yapılan istatistiksel bir test ile belirlenmektedir (Denklem 3) ve geneXpharma, mRNA seviyesinde anlatımı anlamlı oranda farklılık gösteren genler (DEG) sağlandığında ilaçların o veri setindeki ilaç-gen etkileşimi için p-değeri vermektedir.

$$p_{\alpha, \beta} = \frac{\binom{m}{x} \binom{N-m}{n-x}}{\binom{N}{n}}$$

Denklem 3

Denklem 3'te, p, ilaç alfanın veri kümesi beta ile ilişkisinin olasılığını açıklar; N, veri kümesi beta'daki prob sayısıdır; m ise veri kümesi betadaki toplam DEG'lerin sayısıdır. n, bütün ilaç-ilaç etkileşimleriyle ilgili, ilaç alfa ile ilişkili genlerin sayısıdır, x ise, veri seti betada ilaç a ile etkileşime giren genlerin sayısıdır. Kısaca, m/N insan genomu içerisinde hastalığa bağlı genlerin oranını ve x/n ilaç alfa ile etkileşime giren, ancak veri seti beta ile ilişkili olan

genlerin oranını gösterir. Aynı prosedür, ilacın en az bir etkileşimi de dahil olmak üzere her olası ilaç veri kümesi çifti için tekrar edilmiştir (93).

İlaç-gen etkileşimleri seçilirken melanom veri setinde hipergeometrik olasılık yoğunluk fonksiyonu ile daha önce anlatılan şekliyle hesaplanan ilaç-gen etkileşim p-değeri sınırı 0,001 olarak seçilmiş ve bu değerin altında kalan etkileşimler kenetlenme çalışmaları için değerlendirilmiştir. p-değerinin 0,001 olarak belirlenmesinin sebebi deneysel adıma geçmek için aday ilaç sayısını azaltmaktır.

2.3.2 Melanom Ve Yaşlanma ile ilişkili Protein-Protein Etkileşim Ağına Alt Ağ Analizi Yapılarak İlaçların Belirlenmesi

2.3.2.1 Yaşlanma ile ilişkili genlerle protein-protein etkileşim ağı oluşturulması ve anlatımı farklılık gösteren genlerin haritalanması

Protein-protein etkileşimleri (PPI) hücrenin metaboliksel işleyişi, kontrolü, hücreler arası iletişimi gibi birçok biyolojik proses sonucu oluşan etkileşimlerdir (94). PPI ile yapılan çalışmalar, proteinlerin hücre içi fonksiyonlarını anlamak için önemlidir. Tanımlanamayan bir proteinin fonksiyonları, fonksiyonları daha önce tespit edilmiş bir protein ile olan etkileşimleri tespit edilerek tahmin edilebilir. PPI'ların ayrıntılı bir şekilde incelenmesi, hücresel süreçlerin anlaşılması için model geliştirme sürecini hızlandırmıştır (95). Yaşlanma ile ilgili protein-protein etkileşim ağı oluşturmak için GenAge (80) veri tabanından içerisinde yaşlılıkla ilişkili 309 gen bulunan liste elde edilmiştir. Daha sonra bu genler protein-protein ilişkilendirme ağı verisi sunan STRING'de (81) çoklu protein analizi kısmında analiz edilmiştir.

Transkriptom verilerine R-bazlı gen ekspresyon analizi gerçekleştirebilen bir web aracı olan GEO2R kullanılarak karşılaştırmalı analiz yapılmıştır. Analizler GEO2R programında her hücre hattı için ayrı ayrı, Yaşlı-Genç fibroblastlar, Yaşlı-Orta yaşlı fibroblastlar ve Orta yaşlı-Genç fibroblastlar karşılaştırılarak yapılmıştır (Tablo 3).

2.3.2.2 Alt Ağ Analizi

Transkriptom verilerinin PPI ağlarına haritalanmasıyla, ilgili duruma bağlı olarak ifade seviyeleri önemli ölçüde değişen genler tarafından kodlanan proteinler belirlenebilir ve yeni modüller elde edilebilir (96). Bu yaklaşım, daha önce hastalık durumuyla ilişkili olduğu bilinmeyen proteinleri ve hücresel mekanizmaları ortaya çıkarabilir. Böylece, entegre bir transkriptom ve proteom analizi yaklaşımıyla, ağ dinamiklerinin altında yatan farklı mekanizmalar vurgulanabilir (97). Cytoscape'in KeyPathwayMiner (KPM) eklentisi (83),

biyolojik bir ağdaki maksimum bağlı tüm alt ağları verimli bir şekilde ortaya çıkarabilir (98,99). Farklı koşullar altında alt ağ bulma algoritmalarının performanslarını karşılaştıran bir çalışmada KPM ile analizin yüksek performans gösterdiği bildirilmiştir (100). KPM algoritması, transkriptom verilerini, p değerlerini "1" veya "0" olarak işler (101), bu nedenle p-değerleri, anlamlı ölçüde ifade edilen genler (SEG veya DEG'ler) için "1" ve diğerleri için "0" olarak düzenlenir. Tüm analizler için dosyalar bu kurallara göre düzenlenmiştir.

2.3.2.3 Alt Ağı Hedefleyen İlaçların Tespit Edilmesi

Tüm melanom hücre hatlarından gelen Yaşlı-Genç, Yaşlı-Orta yaşlı, Orta yaşlı-Genç karşılaştırmalı veri analizi ile yaşlılıkla durumunda anlamlı olarak ifade edildiği tespit edilen genler KPM ile analiz edilip alt PPI ağları oluşturulmuştur. KPM analizi sonucunda elde edilen protein setini hedefleyen ilaçların tespiti için DGIdb (102) veri bankasından yararlanılmıştır. DGIdb, genler ve bunların bilinen veya potansiyel ilaç ilişkileri arasında bağlantılar sağlar. Elde edilen bu veri çiftleri arasından en çok hedefe yönelik olan ilaçlar moleküler kenetleme çalışmaları için uygun bulunmuştur.

2.4 Moleküler Kenetleme Çalışmaları

Belirlenen aday ilaç-gen çiftleri p-değeri sınırına göre elenip sıralandıktan sonra moleküler kenetlenme çalışmaları için incelenecek ilaçlar ve karşısındaki genin kodladığı proteinler seçilmiştir. Moleküler kenetlenme programı olarak AutoDock Vina yazılımı kullanılmıştır (44) ve kenetlenme çalışmalarını yapmak için üç girdi gerekmektedir: (i) Ligand yapısı, (ii) Protein yapısı ve (iii) Kenetlenme parametresi. Son olarak kenetlenme sonucunda elde edilen kompleks yapılarının detaylı incelenmesi PyMOL görüntüleme programı (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.3.2, Schrödinger, LLC.) kullanılarak yapılmıştır.

Moleküler kenetleme çalışmalarının yapılması için ligand olarak kullanılan ilaçların ve proteinlerin üç boyutlu yapısının bulunması gerekmektedir. Bu nedenle moleküler kenetleme çalışmaları için 3D yapısı hali hazırda var olan ilaçlar temel alındı. Her bir ligandın 3D yapısını Drugbank veri bankasından (16) 'pdb' formatında elde edildi. Autodock'un girdi olarak kullanılacak dosyaları 'pdbqt' formatında kabul etmesinden dolayı AutoDockTools (v1.5.6) kullanılarak protein yapıları ve ligandlar 'pdbqt' formatında kaydettikten sonra kenetlenme çalışmaları için hazır hale getirildi.

Genlerin kodladığı proteinlerin yapısını elde etmek için protein veri bankası (RCSB PDB, Protein Data Bank) (70) kullanılmıştır. PDB deneysel olarak belirlenmiş olan 3 boyutlu

biyomoleköl yapılarının evrensel olarak depolandığı veri bankasıdır. Her bir proteinin yapısını ortaya çıkarmak ve görselleştirmek için x-ışını kristalografisi, NMR spektroskopisi ve kriyo-elektron mikroskobu gibi yöntemler sonucunda oluşturulmuş yapılar yer alır. Birden fazla yapısı olan proteinlerden en iyi çözünürlüğe sahip olan yapılar öncelikli olarak tercih edilerek kriterlere uygun olan yapılar belirlenmiştir. Protein yapısına karar verirken hali hazırda ligandla bağlı olması, mutasyon bulundurmaması ve çözünürlüğünün iyi olması gibi parametreler dikkate alınmıştır. Seçilen protein yapısı ‘pdb’ formatında indirilmiş ve yapıda bulunan ligand bilgisi dosyadan silinmiştir. Daha sonra ligandı silinmiş olan protein yapısı AutoDockTools’da (v1.5.6) açılarak ‘pdbqt’ formatında kaydedilip ilgili ligand ile kenetlenme çalışmaları için hazır hale getirilmiştir.

AutoDock’ta kenetlenme çalışması için ligand ve protein yapısından sonra en önemli girdi bilgisi kenetlenme parametresidir. Kenetlenme parametresi, kenetlenme çalışmalarında, ligandın protein üzerinde bağlanmasını istediğimiz bölgenin koordinatlarının belirlenmesi için gereklidir. AutoDockTools (v1.5.6) da bulunan ‘grid kutusundan’ yararlanarak ligandın protein üzerinde bağlanması istenilen bölge belirlenip, oluşturulan koordinatlar konfigürasyon dosyasında belirtildi. Bu çalışmada grid kutusu hali hazırda var olan ligand bölgesini kapsayacak şekilde seçilmiştir.

2.4.1 Melanom İçin Belirlenen İlaçlara Yönelik Moleküler Kenetleme Çalışmaları

Moleküler kenetleme yapmak için ilaç yeniden konumlandırma ile belirlenen ilaçların mevcut olan kullanımları dışında, antineoplastik sınıfına ait olup olmadığı kontrol edilmiştir. Bu ilaçların içinde kanser dışında depresyon, şizofreni, Alzheimer, AIDS, diyabet, hipertansiyon, menapoz, madde bağımlılığı gibi çeşitli birçok hastalıkta ve bozuklukta hali hazırda tedavi amacıyla kullanılan ilaçlar mevcut olabileceği için ilaçlar kullanım alanlarına göre üç gruba ayrılmıştır. Grup 1 olarak belirlenen ilaçlar melanom veya çeşitli kanser türleri tedavilerinde kullanılmakta olan antineoplastik ajanlardan oluşmaktadır. Grup 2 olarak belirlenen ilaçlar kanser tedavilerinde kullanılmayan fakat literatürde kanser tedavisi çalışmalarında uygulanmış ve bununla ilgili çalışmalar yapılmış ilaçlardan oluşmaktadır. Grup 3 olarak belirlenen ve çalışmanın devamı için ilaç önerisi yapılacak olan ilaçlar ise kansere yönelik olmayan, kanserle ilişkisi olmadığı literatür taramalarıyla belirlenen ilaçlardır.

Melanoma yönelik yeni bir aday ilacın keşfi için kanserde kullanımına göre gruplandırılmış ilaçlardan Grup 3, yani daha önce melanomda denenmemiş olan ilaçlar ve karşılarındaki

genlerin kodladığı proteinler için üçer tekrarlı olarak moleküler kenetlenme çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen ortalama bağlanma serbest enerji değerlerindeki değişimler (ΔG , kcal/mol) ve bağlanma bölgelerinin uygunluğuna göre melanoma yönelik ilaç yeniden konumlandırma için en uygun ilaç adayları belirlenmiştir ve deneylerle aday ilaçların uygunluğu test edilmiştir.

2.4.2 Melanom Ve Yaşlanma İçin Belirlenen Ortak Genleri Hedefleyen İlaçlara Yönelik Moleküler Kenetlenme Çalışmaları

Melanom ve yaşlanma için ortak belirlenen genleri hedefleyen ilaçlar ve bunlarla ilişkisi bulunan genlerin kodladığı proteinler için üçer tekrarlı olarak moleküler kenetlenme çalışmaları yapılmıştır. Belirlenen alt ağda aynı anda en çok geni hedefleyen ilaçlar analizde önceliklendirilmiştir.

2.5 Melanom İçin Belirlenen Yeniden Konumlandırılan İlaçlar İçin *In Vitro* Sitotoksite Analizleri

Melanom için yapılan moleküler kenetleme analizleri ve literatür taraması sonuçlarına bakılarak tespit edilen en uygun 5 ilaç ile *in vitro* sitotoksite deneyleri yapılmıştır. Bu doğrultuda sitotoksite deneyleri için iki farklı fenotipe sahip melanom hücre hatları olan A375 VE SK-MEL-28 ve kontrol grubu olarak da sağlıklı sünnet derisinden elde edilmiş HFF-1 fibroblast hücre hattı kullanılmıştır. Bunlardan A375 malign melanomlu 54 yaşındaki bir kadın hastanın derisinden izole edilen epitel morfolojisi sergileyen bir hücre hattıdır. SK-MEL-28 malign melanomlu 51 yaşındaki bir erkek hastanın deri dokusundan izole edilen melanositlerdir.

İlk olarak, ATCC hücre bankasından elde edilen hücre hatları belirtildiği şekilde kültürlenerek çoğaltılıp stoklanmıştır. A375 ve SK-MEL-28 hücre hatları, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, katalog no. 30-2002, ATCC) besiyeri, %10 fetal sığır serumu (FBS-fetal bovine serum, GIBCO) ve 1% penisilin-streptomisin (GIBCO) kullanılarak 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde kültüre alınmıştır. HFF-1 hücre hattı ise DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, katalog no. 30-2002, ATCC) besiyeri, %15 fetal sığır serumu (FBS-fetal bovine serum, GIBCO) ve 1% penisilin-streptomisin (GIBCO) kullanılarak 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde kültürlenmiştir. Hücrelerin yoğunluğu büyütüldükleri petri kabında yaklaşık %70-80 oranına ulaştığında alt kültürleri (pasaj) yapılmıştır. Çoğaltılan hücreler %10 DMSO içeren bazal besiyeri ile sıvı azotta dondurularak çalışmalarda kullanılmak üzere stoklanmıştır.

Moleküler kenetlenme çalışmaları sonrası aday ilaçlardan ne çıkan 5 tanesi belirlenmiştir ve kullanılacak ilaçlar için yapılan literatür taramasından sonra her ilaç için denenmesi kararlaştırılan konsantrasyon aralıkları seçilmiştir. Yapılan literatür taramasına göre ilaçlar için dozlar belirlenmiş ve daha sonra yeniden düzenlenerek deneyler yapılmıştır. Buna göre tüm ilaçlar için önce en yüksek konsantrasyon hazırlanıp, sonrasında da uygulanacak konsantrasyona göre seyreltmeler yapılmıştır. IC50 değerlerinin belirlenebilmesi için CVDK-8 ile kit protokolüne uygun olarak hücre canlılığı ölçülmüştür. Hücrelerin flaska yapışabilmesi için bir gece inkübe edilip ve farklı süre ve konsantrasyonlarda ilaç tatbik edilmiş ve spektrofotometrik yöntemler kullanılarak ölçümler yapılmıştır. Artan süre ve artan doz aralığı kullanılarak birbirinden bağımsız 3 deney tekrarı yapılmıştır.

3. BULGULAR

3.1 Hesaplamalı ve Deneysel Yöntemleri Kullanan Bütünleşik Yaklaşımla Melanom İçin İlaç Yeniden Konumlandırma

3.1.1 Melanom İçin Transkriptom verilerinin Analizi ve İlaç Yeniden Konumlandırma Çalışmaları

GSE31879 veri setinin analizi sonucunda 826 tane gen aşağı-regule, 383 tane gen ise yukarı-regule olarak belirlenmiştir. GSE6887 veri setinin analizi sonucunda ise 77 tane gen aşağı-regule, 38 tane gen ise yukarı-regule olarak belirlenmiştir. Tablo 4 ve Tablo 5'te sırasıyla GSE31879 ve GSE6887 veri setlerinde aşağı ve yukarı regule olarak belirlenen ilk 10 gen, p-değerleri ve kat değişimi (FC) değerleri ile birlikte gösterilmiştir. Daha sonra her iki veri seti için de mRNA seviyesinde anlatımı farklılık gösteren genler (DEG) listelenmiş ve geneXpharma kullanılarak melanom için ilaç-gen çiftlerini belirlemek amacıyla hazır hale getirilmiştir.

Tablo 4. GSE31879 veri seti için mRNA seviyesinde anlatımı farklılık gösteren genlerden örnekler.

Aşağı-Regule			Yukarı-Regule		
Gen	p-değeri	Kat Değişim (FC)	Gen	p-değeri	Kat Değişim (FC)
SLC16A6	4.33E-07	0.012074	MGP	0.000916	89.26931
TYR	7.36E-05	0.015133	CXCR4	6.19E-05	43.96514
DPP4	9.72E-12	0.021018	LYZ	0.004307	20.75511
DKK3	2.09E-06	0.026976	SERPINA3	0.000505	15.51111
MMP1	0.002107	0.03539	NR3C1	8.37E-05	14.95516
ABCB5	2.39E-10	0.037962	PECAM1	0.000253	14.68679
SLC39A6	3.09E-09	0.039287	CXCL8	0.000977	13.95756
DPP6	9.39E-06	0.039713	SOCS3	0.000427	13.37661
CDK2	7.93E-07	0.047053	SPP1	0.002389	12.12713
CTNNB1	1.11E-07	0.047521	VCAM1	0.006908	12.11786

Tablo 5. GSE6887 veri seti için mRNA seviyesinde anlatımı farklılık gösteren genlerden örnekler.

Aşağı-Regule			Yukarı-Regule		
Gen	p-değeri	Kat Değişim (FC)	Gen	p-değeri	Kat Değişim (FC)
APOBEC3B	0.00184	0.389867	NCS1	3.66E-05	1.732663
RSAD2	1.11E-06	0.445389	CTNNAL1	0.00206	1.525275
IFIT3	9.89E-07	0.455324	RPS26	0.000759	1.439884
NRIR	2.77E-06	0.470717	YWHAG	0.00846	1.369924
IFIT1	5.92E-06	0.47623	ELP5	2.47E-06	1.307636
IFI44L	1.02E-06	0.492147	NRCAM	0.00745	1.288324
CXCL10	0.000451	0.500042	CCR9	0.00937	1.275125

İlaç yeniden konumlandırma ile belirlenen ilaçların var olan kullanımları dışında, antineoplastik sınıfına ait olup olmadığı belirlenmiştir. Bu ilaçların içinde kanser dışında depresyon, şizofren, Alzheimer, AIDS, diyabet, hipertansiyon, menapoz, madde bağımlılığı gibi çeşitli birçok hastalıkta tedavi amacıyla kullanılan ilaçlar mevcut olduğu gözlemlenmiştir. Bu ilaçlar, her veri seti ayrı olarak ele alınıp, kendi arasında üç gruba ayrılmıştır (Tablo 6).

Tablo 6. Veri setlerindeki DEGLeri hedefleyen ilaçların gruplandırılması.

VERİ SETİ	TOPLAM İLAÇ SAYISI	1. GRUPTAKI İLAÇ SAYISI	2. GRUPTAKI İLAÇ SAYISI	3. GRUPTAKI İLAÇ SAYISI
GSE31879	303	87	139	77
GSE6887	64	35	18	11

3.1.2 Melanom İçin Yeniden Konumlandırılan İlaçlar ve Hedef Proteinleri İçin

Yapılan Moleküler Kenetleme Sonuçları

Gruplandırılan ilaçlardan en iyi skorlu olan 10 tanesi için moleküler kenetlenme çalışmaları yapılmıştır (Tablo 7-9).

Tablo 7. Grup 1 için belirlenen ilaçlar ve moleküler kenetlenme skorları

İLAÇ	GEN	PROTEIN PDB KODU	ORTALAMA ΔG (KJ/MOL)
PACLITAXEL	GSTP1	5DAL	-10.4
	RRM1	3HNC	-13.4
IRINOTECAN	RRM1	6L7L	-10.1
	GSTP1	6Y1E	-9.9
DOCETAXEL	RRM1	6L7L	-10.4
	MDM4	7C44	-8.4
TRAMETINIB	BCL2L1	3SP7	-8.6
	YAP1	6G8K	-10.1
TEMSİROLİMUS	CDK2	1GZ8	-9.3
	MDM4	3FE7	-8.9
DOXORUBICIN	SMPD1	5I81	-8.7
	CYCS	5TY3	-8.1
VEMURAFENIB	BCL2L1	3SP7	-8.7
	PML	5YUF	-6.9
OLAPARIB	AKT1	1UNQ	-6.3
	KIT	6MOB	-9.2
LENALIDOMIDE	PML	5YUF	-7.5
	KIT	6MOB	-6.9
MITOXANTRONE	MECP2	6OGK	-7.4
	GSTP1	6Y1E	-6.6

Tablo 8. Grup 2 için belirlenen ilaçlar ve moleküler kenetlenme skorları.

İLAÇ	GEN	PROTEIN PDB KODU	ORTALAMA ΔG (KJ/MOL)
CYCLOSPORINE	CREBBP	4NYX	-9.1
	GSTP1	5DAL	-10.3
ATAZANAVİR	ABCC1	2CBZ	-7.9
	ABCC6	6BZR	-10.8
NADH	CYB5R3	1UMK	-8.6
	IDH3G	6L59	-9.8
MOMETASONE	NR3C1	4HN5	-9.5
	ICAM1	5MZA	-7.7
RIBOFLAVİN	CAT	1DGF	-8.7
	CYB5R3	1UMK	-8.2
PREDNİSONE	CCND1	6P8H	-7.8
	GSTP1	5DAL	-8.6
KETOTİFEN	PDE8A	3ECM	-7.3
	PDG	4GWG	-6.7
LEUCOVORİN	GSTP1	5DAL	-6.5
	NMT1	5O6J	-8.2
METHYLENE BLUE	CAT	1DGF	-7.0
	CYB5R3	1UMK	-6.5
PAROXETİNE	GSK3B	1GNG	-7
	PML	5YUF	-6.5

Tablo 9. Grup 3 için belirlenen ilaçlar ve moleküler kenetlenme skorları.

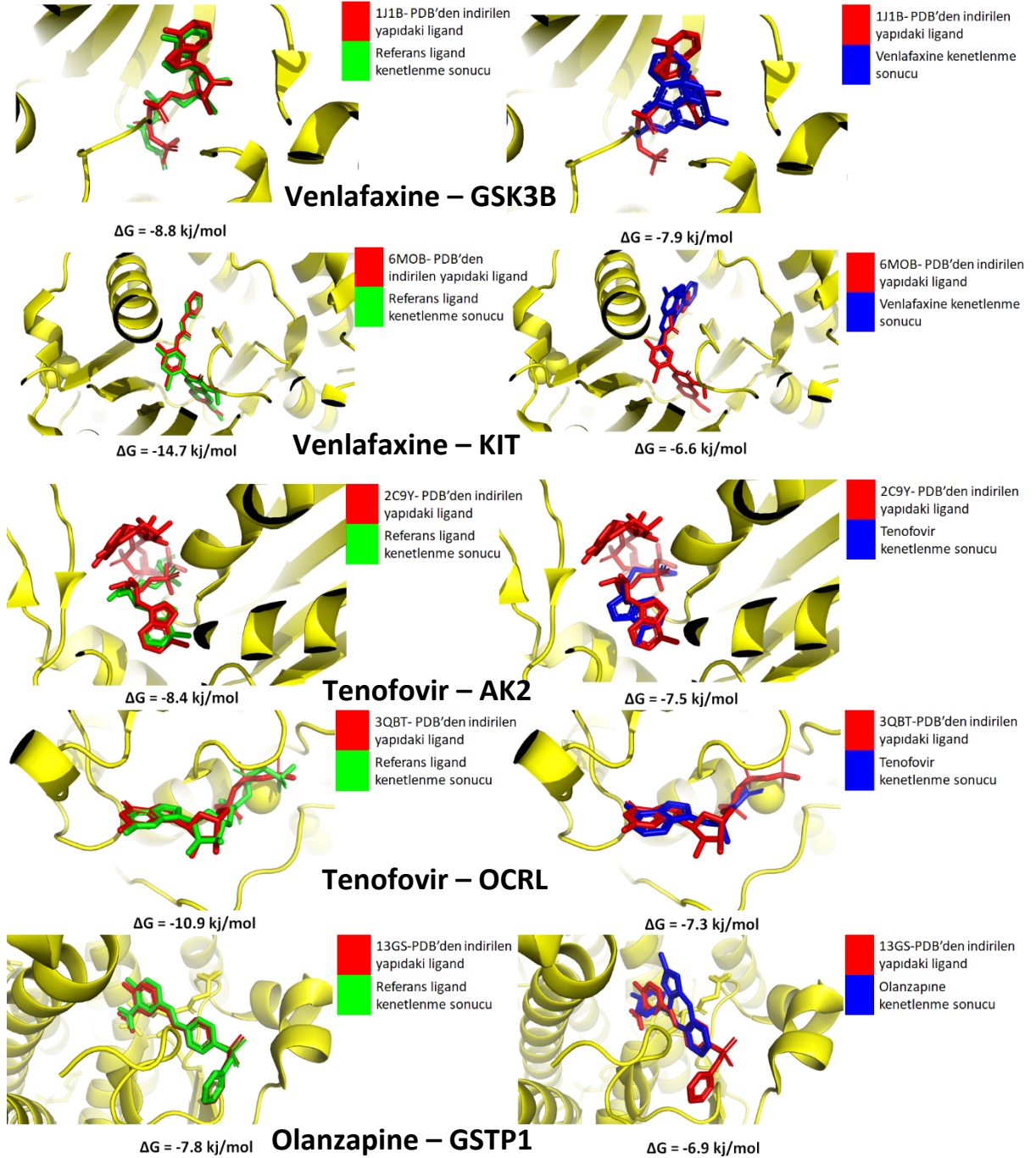
İLAÇ	HASTALIK	GEN	PROTEIN PDB KODU	ORTALAMA ΔG (KJ/MOL)
OLANZAPINE*	Şizofreni	GSTP1	13GS	-6.9
		PPARG	6MS7	-8.1
HALOPERİDOL*	Şizofreni	COMT	3BWY	-7.3
		ATP2A2	7BT2	-5.9
FLAVİN ADENİN DİNÜCLEOTİDE	Keratit, Göz hastalıkları	CYB5R3	1UMK	-8.6
		NQO1	1D4A	-8.1
DEXTROMETHORPHAN	Öksürük, Soğuk algınlığı	SIGMAR1	5HK1	-8.2
		PML	5YUF	-6.2
TENOFVİR*	HIV, Hepatit B, HHV-2	AK2	2C9Y	-7.5
		OCRL	3QBT	-7.3
VENLAFAXİNE*	Depresyon	GSK3B	1J1B	-7.9
		KIT	6MOB	-6.6
İNOSİTOL 1,3,4,5- TETRAKİSPHOSFATE	Osteoartrit	AKT1	1UNQ	-6.9
		CYTH3	4KAX	-7.7
TRİMİPRAMİN	Depresyon	KIT	1T45	-7.5
		PML	5YUF	-6.4
DOXEPİN*	Depresyon	KIT	6MOB	-7.2
		CYP1A2	2HI4	-10.6
GUANOSİN-5'- DİFOSFATE	(Organik bileşik)	GSPT1	5HXB	-8.8
		RAB5A	1N6H	-6.4

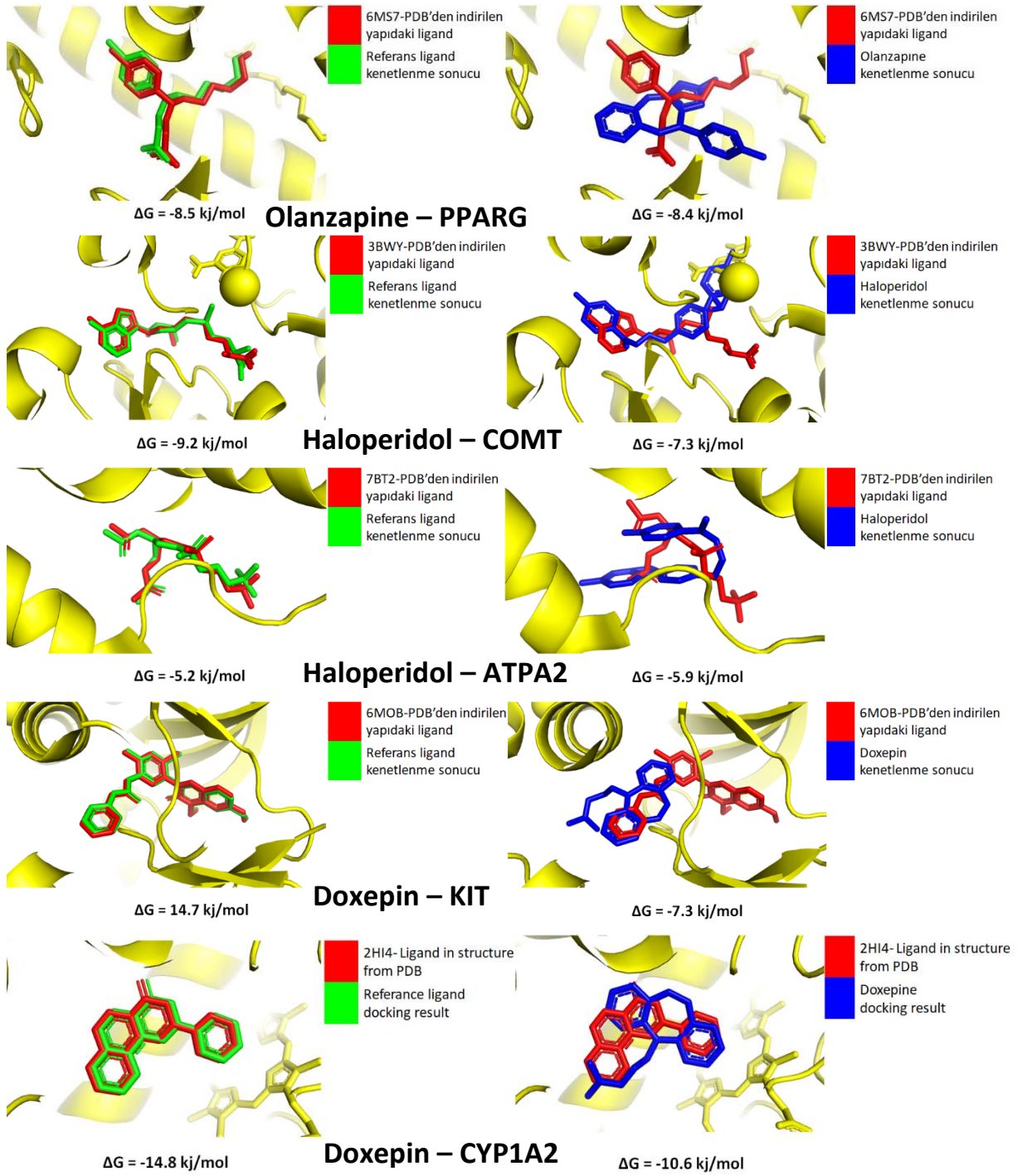
*en iyi skoru veren ve aynı zamanda hücre hattı ilaç denemeleri için kriterleri uygun bulunan ilaçlar.

3.1.3 Melanom İçin Yeniden Konumlandırılan İlaçların Yapısal Analizleri

Grup 3 için belirlenen ilaçların sadece kenetlenme skorlarını dikkate alarak ilaç önermek yeterli olmayacağı için bu sonuçlar görselleştirilip, ilaçların proteinlerin doğru bölgelerine

bağlanıp bağlanmadığı yapısal olarak incelenmiştir. Yapısal analiz sonucunda 5 ilacın ilgili hedef proteinlerin doğru bölgesine bağlandığı tespit edilmiştir. Bağlanma bölgesinin yerini tespit edebilmek için proteinlerin PDB’de bağlı olduğu referans ligandlar kullanılmış ve yapısal hizalama yapılmıştır (Şekil 6).





Şekil 6. 5 aday ilaç, hedefledikleri 2'şer protein ve proteinlerin referans ligandları için yapılan kenetlenme çalışmaları.

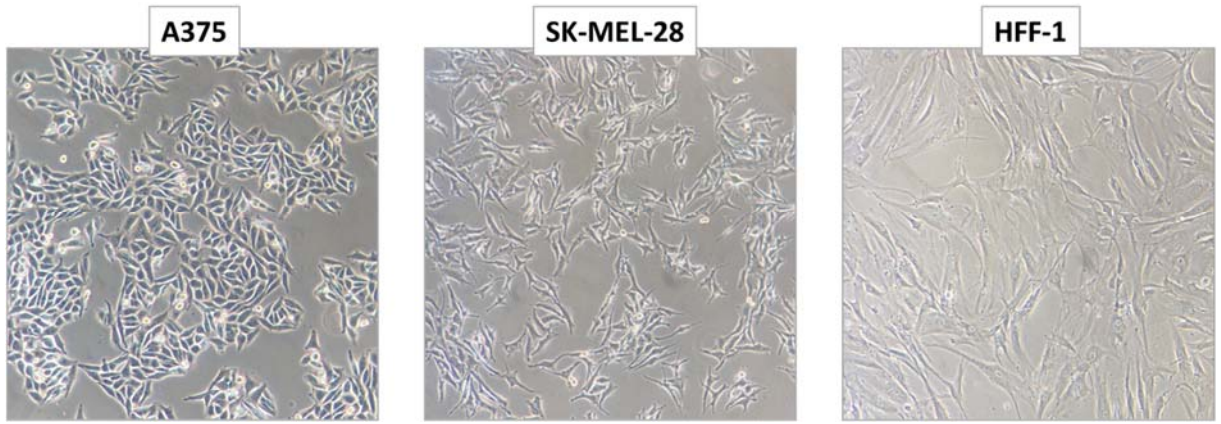
3.1.4 *In Vitro* Sitotoksosite Analiz Sonuçları

Çalışma grubumuz tarafından yürütülen ve sonuçlanan TÜSEB 2019-TA-02 4591 no'lu proje kapsamındaki ilaç yeniden konumlandırma ve kenetlenme çalışmaları sonucunda belirlenmiş olan 5 ilacın (Tablo 10) *in vitro* sitotoksosite ölçümleriyle test edilmesine karar verilmiştir.

Tablo 10. Melanom tedavisi için hücre kültüründe denenmesi için belirlenen ilaçlar

İLAÇ	HASTALIK
OLANZAPINE	ŞİZOFRENİ
TENOFOVIR	HIV, Hepatit B, HHV-2
HALOPERIDOL	ŞİZOFRENİ
VENLAFAXINE	DEPRESYON
DOXEPIN	DEPRESYON

İlaçların üzerinde deneneceği HFF-1, A375 ve SK-MEL-28 hücre hatları ATCC hücre bankasından satın alınmış ve hücre bankasının belirttiği (Bölüm 2.5'te detayları olan) şekilde kültürlenmiş ve gözlem yapılmıştır (Şekil 7).



Şekil 7. ATCC firmasından alınıp ekimi yapılan HFF1, A375 ve SK-MEL-28 hücre hatlarının ışık mikroskobu görüntüleri (10X).

Moleküler kenetlenme çalışmaları sonrası aday ilaçlardan öne çıkan 5 tanesi belirlenmiştir ve kullanılacak ilaçlar için yapılan literatür taramasından sonra her ilaç için denenmesi kararlaştırılan konsantrasyon aralıkları seçilmiştir. Yapılan literatür taramasına göre Lu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, feokromositoma hücreleri (PC-12) Tenofovir disoproksil fumarat (TDF) ile doz aralığı olarak 25, 50, 100, 200 ve 400 $\mu\text{mol/l}$ içeren 100 μl DMEM ile muamele edilmiştir. (103). Venlafaxine ile insan periferik kan lenfositlerinde (PBL'ler) yapılan bir başka çalışmada doz olarak 25, 50 ve 100 $\mu\text{g/ml}$ dozlarda ilaç 24 ve 48 saat muamele edilmiştir (104). Doksepin ile yapılan bir başka çalışmada 24 saat boyunca insan periferik lenfositlerine her iki ilacın dört farklı konsantrasyonu (1, 2.5, 5 ve 10 $\mu\text{g/mL}$) uygulanmıştır (105). Canlılık üzerindeki etki için yapılan bir başka deneyde, glioma hücre hatları olarak seçilen U87 ve U251 hücre hatları için 5, 10, 20, 50 ve 100 μM konsantrasyonlarda ve T98 için ise 10, 20, 40, 80 ve 160 μM konsantrasyonlarda haloperidol

denenmiştir (106). Son olarak Xiong ve arkadaşlarının yaptığı bir deneyde olanzapinin PC12 hücrelerinde rotenon kaynaklı toksisiteye karşı nöroprotektif etkileri araştırılmış ve 5'-adenozin monofosfat (AMP) ile aktive edilmiş protein kinaz (AMPK)'ı etkinleştirip etkinleştirmedigini belirlemek için PC12 hücreleri 24 saat 10, 20 ve 40 μM olanzapin ile muamele edilmiştir (107).

İlaç denemeleri için Tenofovir, Venlafaxine, Haloperidol ve Olanzapine DMSO ile (Dimetil Sülfoksit), Doxepin ise su ile çözdürülmüştür. İlaç denemeleri farklı ilaç konsantrasyonlarında (**A375** için: Tenofovir, 100, 200, 400, 600, 800 μM ; Venlafaxine, 200, 400, 600, 800 μM ; Doxepin, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 22.5, 25 $\mu\text{g/ml}$; Haloperidol 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2 $\mu\text{g/ml}$; Olanzapine, 0.5, 1, 2, 4, 8, 10 $\mu\text{g/ml}$; **SK-MEL-28** için: Tenofovir, 100, 200, 400, 600, 800 μM ; Venlafaxine, 200, 400, 600, 800 μM ; Doxepin, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 22.5, 25 $\mu\text{g/ml}$; Haloperidol 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2, 2.2 $\mu\text{g/ml}$; Olanzapine, 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2 $\mu\text{g/ml}$; **HFF-1** için: Tenofovir, 100, 200, 400, 600, 800 μM ; Venlafaxine, 200, 400, 600, 800 μM ; Doxepin, 10, 15, 17.5, 22.5, 25 $\mu\text{g/ml}$; Haloperidol 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2 $\mu\text{g/ml}$; Olanzapine, 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2 $\mu\text{g/ml}$) 96 well-plate ile yapılmıştır. Ekimi yapılan hücreler 24 saat boyunca 37°C'de inkübe edildikten sonra ilaç eklemesi yapılmıştır ve 48 saat daha inkübe edilmiştir. Daha sonra CVDK-8 Kiti uygulanarak 4 saat daha bekletilmiş ve kolorimetrik ölçüm için spektrofotometrede ölçüm yapılmıştır. Üçer tekrarlı olarak yapılan sitotoksikite deneyleri sonucunda elde edilen değerler analiz edilmiş ve IC50 değerleri hesaplanmıştır. A375, SK-MEL-28 ve HFF-1 için konsantrasyon değerleri, hücre canlılık hesaplamaları ve IC50 değerleri sırasıyla Tablo 11, Tablo 12 ve Tablo 13'te gösterilmiştir.

Tablo 11. A375 hücre hattı için hücre canlılık değerleri ve IC50 değerleri.

A375 IC50 Sonuçları			
İlaç	Konsantrasyon (μM)	Canlılık	IC50(μM)
Tenofovir	100	105,9725	950,54
Tenofovir	200	97,19765	
Tenofovir	400	82,67799	
Tenofovir	600	76,62667	
Tenofovir	800	58,05237	
Venlafaxine	200	85,70984	785,85
Venlafaxine	400	70,09326	
Venlafaxine	600	60,37306	
Venlafaxine	800	50,19689	

İlaç	Konsantrasyon (µg/ml)	Canlılık	IC50(µg/ml)
Doxepin	10	89,51275	16,69
Doxepin	12,5	75,17464	
Doxepin	15	59,91093	
Doxepin	17,5	38,20293	
Doxepin	20	30,15194	
Doxepin	22,5	16,76563	
Doxepin	25	8,959134	
Haloperidol	1	92,88208	1,7367
Haloperidol	1,2	89,22176	
Haloperidol	1,4	68,27345	
Haloperidol	1,6	59,62383	
Haloperidol	1,8	48,05158	
Haloperidol	2	31,27041	
Olanzapine	0,5	100,5824	3,412
Olanzapine	1	96,28859	
Olanzapine	2	35,11361	
Olanzapine	4	8,029329	
Olanzapine	8	6,843487	
Olanzapine	10	7,112036	

Tablo 12. SK-MEL-28 hücre hattı için hücre canlılık değerleri ve IC50 değerleri.

SK-MEL-28 IC50 Sonuçları			
İlaç	Konsantrasyon (µM)	Canlılık	IC50(µM)
Tenofovir	100	106,2551	1.450,67
Tenofovir	200	106,4027	
Tenofovir	400	101,3589	
Tenofovir	600	91,09324	
Tenofovir	800	74,78624	
Venlafaxine	200	95,30693	735,7
Venlafaxine	400	79,19617	
Venlafaxine	600	62,53357	
Venlafaxine	800	43,59525	
İlaç	Konsantrasyon (µg/ml)	Canlılık	IC50(µg/ml)
Doxepin	10	75,81641	16,35
Doxepin	12,5	69,83845	
Doxepin	15	54,76508	
Doxepin	17,5	45,83766	
Doxepin	20	31,43619	
Doxepin	22,5	24,87031	
Doxepin	25	12,78099	
Haloperidol	1	82,38519	5,04
Haloperidol	1,2	74,28889	
Haloperidol	1,4	71,24444	
Haloperidol	1,6	64,4	
Haloperidol	1,8	55,22963	

Haloperidol	2	46,58519	
Haloperidol	2.2	21,71111	
Olanzapine	1	94,60926	
Olanzapine	1,2	86,3633	
Olanzapine	1,4	84,97286	
Olanzapine	1,6	71,50718	6,61
Olanzapine	1,8	64,3691	
Olanzapine	2	65,10521	

Tablo 13. HFF-1 hücre hattı için hücre canlılık değerleri ve IC50 değerleri.

HFF-1 IC50 Sonuçları			
İlaç	Konsantrasyon (µM)	Canlılık	IC50(µM)
Tenofovir	100	98,20128	
Tenofovir	200	95,59533	
Tenofovir	400	90,18163	1.934,10
Tenofovir	600	82,28481	
Tenofovir	800	81,25823	
Venlafaxine	200	85,0173	
Venlafaxine	600	54,05837	766,9
Venlafaxine	800	51,90278	
İlaç	Konsantrasyon (µg/ml)	Canlılık	IC50(µg/ml)
Doxepin	10	102,9972	
Doxepin	15	97,08289	
Doxepin	17,5	91,93348	59,89
Doxepin	22,5	90,59054	
Doxepin	25	90,30594	
Haloperidol	1	92,55733	
Haloperidol	1,2	87,90134	
Haloperidol	1,4	75,81999	
Haloperidol	1,6	57,83643	1,933
Haloperidol	1,8	49,77066	
Haloperidol	2	54,98053	
Olanzapine	1	99,71319	
Olanzapine	1,2	95,89779	
Olanzapine	1,4	66,45229	
Olanzapine	1,6	46,79298	1,64
Olanzapine	1,8	33,67808	
Olanzapine	2	26,92508	

IC50 değerleri hesaplandıktan sonra kontrol hücreleri olan HFF-1 ile A375 ve SK-MEL-28 ile yapılan denemelerin IC50 değerleri hesaplanmış ve bu hesaplamalar sonucunda karşılaştırmalı analizler yapılmıştır (Tablo 14). Bunun sonucunda özellikle Doxepin ilacının melanom üzerinde potansiyel antitümöral ajan olabileceği yapılan ilaç yeniden

konumlandırma ve moleküler kenetleme çalışmalarıyla gösterilmiş, *in vitro* sitotoksiste deneyleriyle pekiştirilmiştir. Doxepin ilacının melanom hücreleri olan A375 VE SK-MEL-28 üzerinde öldürücü etkisi görülürken kontrol hücresi olarak kullanılan HFF-1 üzerindeki sitotoksik etkisinin minimum oranda olduğu bulgular arasındadır.

Tablo 14. A375 ve SK-MEL-28 in HFF-1 ile IC50 karşılaştırmalı değerleri

	Tenofovir		Venlafaxine		Doxepin		Haloperidol		Olanzapine	
	HFF		HFF		HFF		HFF		HFF	
SK-MEL	1450,67	62,61751	735,7	51,82	16,35	95,99	5,04	-92,145	6,61	-354,72
	μM	μM	μM	μM	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$
A375	950,54	75,67091	785,85	48,89	16,69	95,7	1,7367	58,9842	3,412	40,55277
	μM	μM	μM	μM	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/ml}$

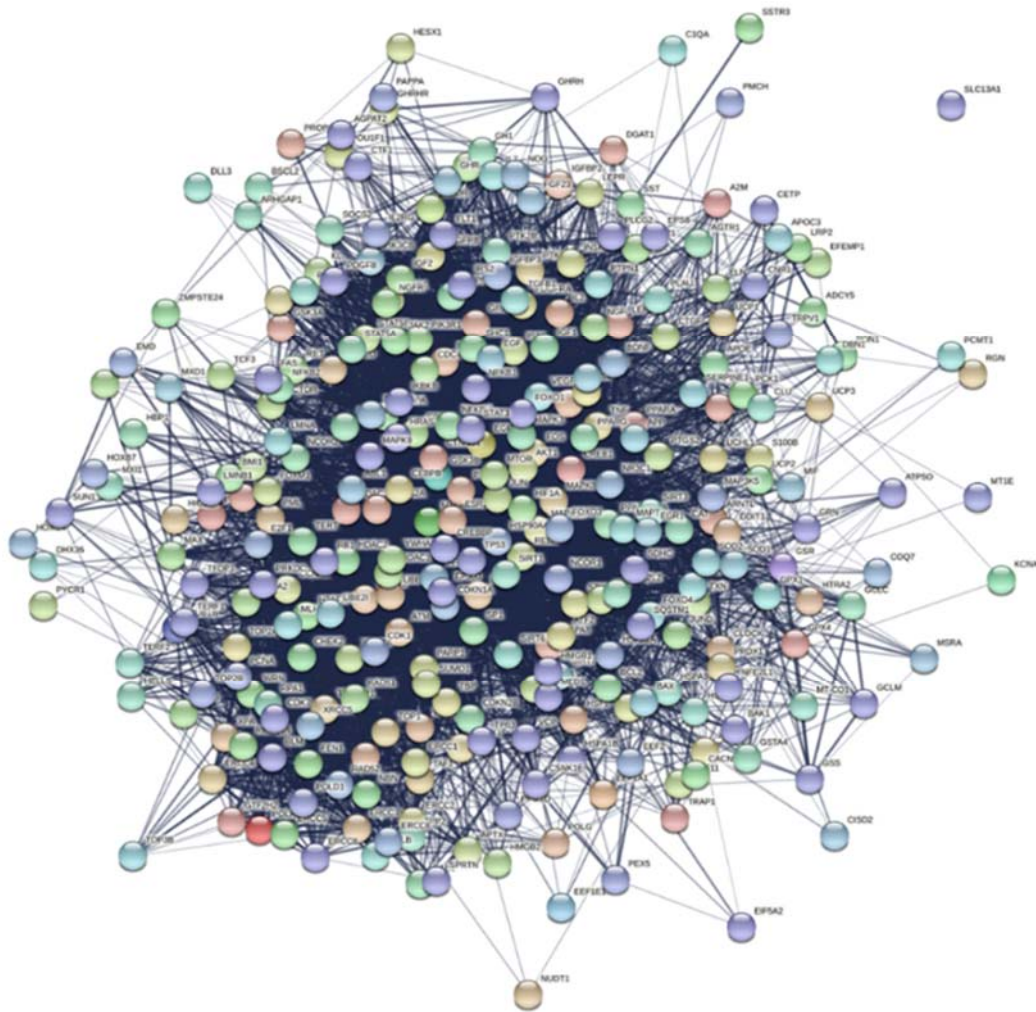
Yapılan hücre hattı deneyleri sonucunda ilaçların moleküler kenetleme çalışmaları sonrasında elde edilen verilerin *in vitro* sitotoksiste deneylerine paralel sonuç verdiği gözlemlenmiştir. Buna göre moleküler kenetleme sonucunda ΔG (kJ/mol) değerleri uygun bulunan ilaçların melanom hücre hattında hücre canlılığını düşürücü etki gösterdiği gözlenmiştir.

3.2 Melanom ve Yaşlanma Arasındaki İlişkinin Analiz Edilmesiyle Ortak İlaç Önerilmesi

3.2.1 Melanom Ve Yaşlanma İçin Belirlenen Ortak Genler

Yaşlılık gen seti kullanılarak STRING’de yaşlılıkla ilgili PPI ağı oluşturulmuştur (Şekil 8). 306 node, 7862 edge bulunduran etkileşim ağına Cytoscape’te KPM aracılığıyla GEO2R ile yapılan analizler sonrasında elde edilen transkriptom verileri haritalanmıştır. Cytoscape’de yapılan topolojik analizler sonucunda her gruptan en yüksek dereceye sahip ilk 10 anlamlı değişen gen Tablo 15’te örnek olarak gösterilmiştir. Ayrıca 3 hücre hattı için yapılan GEO2R analizleri sonucunda yaşlı-genç, genç-orta yaşlı ve yaşlı-orta yaşlı karşılaştırmalı analizleri sonucu ekspresyonunda anlamlı değişim gözlenen gen (SEG) sayıları Tablo 16’da verilmiştir. Aynı zamanda gen ekspresyonundaki değişimin yönü, 2 tabanında log(FC) değerlerine göre belirlenmiştir. Katlama değişiminin logaritması (logFC) değeri 1’in üzerinde olan genler yukarı regüle edilmiş ve -1’in altında olanlar aşağı regüle edilmiş olarak kabul edilmiştir. Buna göre M93-047 hücre hattı için yapılan yaşlı-genç ve yaşlı-orta yaşlı karşılaştırmalı analizleri sonucunda gen ekspresyonunda anlamlı oranda değişim gözlenen

13 adet gen (DEG) tespit edilmiştir (Tablo 17). Bu genlerden PTCH1 hem yaşlı-genç hem de yaşlı-orta yaşlı karşılaştırmasında ortak DEG olarak tespit edilmiştir ve her iki durumda da gen ekspresyon oranı yarıdan fazla azalmakta yani aşağı-regüle olmaktadır. PTCH1 embriyonik morfogenezde rol alan ve merkezi sinir sistemi, uzuvlar, parmaklar dahil vücudun diğer birçok bölümünün organizasyonunu kontrol eden Sonik Kirpi Proteini(SHH)'nin bir reseptörüdür. Cho ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada SHH'nin ve onun ana reseptörü PTCH1'in ekspresyon seviyelerinin, yaşlanmayla belirgin şekilde azaldığı ve SHH aktivitesinin , güçlü bir yaşlanma karşıtı faktör olarak hem *in vitro* hem de *in vivo* yaşlanma ile açıkça azaldığını gösterilmektedir (108). Ayrıca Ozretić ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada qPCR kullanılarak, sağlıklı dokuya kıyasla melanom tümör örneklerinde daha düşük PTCH1 seviyeleri gözlenmiştir böylece PTCH1 geninin melanom tümör dokularında aşağı regüle olduğu gösterilmiştir (109). Literatürdeki bu güncel yayınlar bizim bulgularımızı destekler niteliktedir.



Şekil 8. Yaşlılıkla ilgili protein-protein etkileşim ağı.

Tablo 15. Cytoscape ile yapılan analiz sonucu en yüksek dereceye sahip ilk 10 anlamlı değişen gen ve dereceleri.

YAŞLI-GENÇ		YAŞLI-ORTA YAŞLI		ORTA YAŞLI-GENÇ	
GEN	DERECE	GEN	DERECE	GEN	DERECE
CTNNB1	42	AKT1	44	EGFR	39
SIRT1	42	SIRT1	41	CTNNB1	38
STAT3	41	CTNNB1	40	SIRT1	35
MAPK3	41	STAT3	40	MAPK3	35
PTEN	38	MAPK3	38	HIF1A	32
EGFR	38	EGFR	36	IL6	32
CREB1	36	PTEN	35	IGF1	28
ATM	35	ATM	35	APP	27
HSP90AA1	35	MAPK8	34	BRCA1	26
MAPK8	34	CREB1	33	CDK1	25

Tablo 16. 3 hücre hattında GEO2R analiz sonucu p-değerine göre ifadesi anlamlı değişen (SEG) ve anlamlı değişmeyen gen sayıları.

	M93-047		UACC-903		UACC-1273	
	SEG	SEG Değil	SEG	SEG Değil	SEG	SEG Değil
Yaşlı-Genç	2712	18044	827	19932	782	19977
Yaşlı-Orta Yaşlı	2712	18044	471	20288	782	19977
Orta Yaşlı Genç	1091	19665	1424	19335	1761	19998

Tablo 17. Gen ekspresyonunda (Log-FC değerine göre) anlamlı oranda değişim gözlenen genler (DEG).

		P-DEĞERİ	LOG-FC	GEN
M93-047	Yaşlı-genç	0,0230997	-1,66406215	CCL2
		0,0305057	-1,39814539	COL1A1
		0,0046774	-1,28576198	PTCH1
		0,0083666	-1,28092245	RASL12
		0,0107496	-1,12096236	HEYL
		0,0359335	-1,11981752	C4orf3
		0,0100656	-1,11334212	TNFRSF11B
		0,033776	-1,03239354	LIMCH1
		0,0149374	-1,01077312	SYNC

		0,0347179	1,00798753	CSGALNACT2
		0,0123066	1,01310588	RNVU1-7
		0,0090324	1,03859899	RNU1-3
		0,0023103	1,1085563	SERPINB8
M93-047	Yaşlı-Orta Yaşlı	0,04229	-1,01785752	PTCH1

3.2.2 Melanom Ve Yaşlanma İçin Ortak İlaç-Gen Çiftleri Kullanılarak Yapılan Kenetleme Çalışmaları

Son olarak, melanom ve yaşlanma bağlantısıyla ilgili hücre hatlarıyla yapılan üç farklı hücre hattı analizi sonucunda tüm analizlerde ortak SEG olarak bulunan ve alt-ağlardan gelen 15 adet gen DGIdb veri bankasında (102) aratılarak 458 adet ilaç-gen veri çifti elde edildi. Bunun için önce KPM analizi sonucunda elde edilen genler listelenmiştir. KPM analizi sonucunda üç hücre hattında ortak olarak yapılan analizler sonucunda elde edilen ifadesi anlamlı olarak değişen gen (SEG) sayıları Tablo 18’de gösterilmiştir.

Tablo 18. Üç farklı grup için KPM analizi sonucunda Cytoscape’den elde edilen SEG sayıları.

	YAŞLI - GENÇ	YAŞLI – ORTA YAŞLI	ORTA YAŞLI - GENÇ
ANLAMLI OLARAK İFADE EDİLEN GEN SAYILARI (SEG)	80	76	77

Analiz sonucunda listelenen bu üç gruptan oluşan bu anlamlı değişen genler DGIdb programında aratılarak bu genlerin kodladığı proteinlerle ilişkili bulunan ilaçlar elde edilmiştir. Buna göre bu üç grupta ortak olarak bulunan 15 adet protein DGIdb veri bankasında arama kısmına yazılarak bu proteinlerle ilişkili olan ilaçlar listelenmiştir. Daha sonra bu ilaçlar ve ilaçların hedeflediği proteinler moleküler kenetleme için seçilmiştir.

Sonuçta 458 adet ilaç-gen veri çifti elde edilmiştir ve elde edilen ilaçlardan en çok proteini hedefleyenler kenetleme için seçilmiştir. Bunun için ilaçlar alt-ağda hedeflediği protein sayısına göre iki gruba ayrılmıştır. Bunlardan Resveratrol, Sorafenib ve Gefitinib en fazla yani aynı anda dört proteini hedefleyen ilaçlardır ve moleküler kenetleme sonuçları Tablo 19’da gösterilmiştir. Diğer grup, yani alt-ağdaki üç proteini hedefleyen ilaçlar ise liste halinde Tablo 20’de gösterilmiştir.

Tablo 19. Aynı anda 4 proteini hedefleyen ligandlar ve bu ligandlarla eşleşen proteinlerin kenetleme çalışmaları.

LİGAND	PROTEİN	PDB KODU	SONUÇ ORT ΔG (KJ/MOL)
Resveratrol	APP	3UMH	-5.2
	MAPK14	6SFO	-6.0
	PRKCA	4DNL	-5.3
	SIRT1	4I5I	-8.8
Sorafenib	MAPK14	6SFO	-8.8
	MAPK3	4QTB	-9.0
	MAPK8	4G1W	-7.7
	EGFR	7SYD	-8.0
Gefitinib	EGFR	7SYD	-6.7
	MAPK14	6SFO	-6.1
	MAPK8	4G1W	-7.4
	CHEK2	2W0J	-4.9

Resveratrol

Resveratrol (trans -3,5,4'-trihidroksistilben veya 5-[(E)-2-(4-hidroksifenil)-etenil]benzen-1,3-diol; $C_{14}H_{12}O_3$), üzüm, kırmızı şarap, dut, yer fıstığı ve raventin çekirdeklerinde ve kabuklarında bulunan bir polifenolik flavonoiddir. Polifenoller, birçoğu sağlığı iyileştirdiği ve yaşam süresini uzattığı bilinen bir müdahale olan kalori kısıtlamasıyla etkinleştirilenlerle aynı olan hücre içi yolları etkinleştirerek çeşitli sağlık yararları sağlarlar (110). Araştırmalar, bu bileşiğin maya ve sineklerin ömrü üzerindeki etkisine dair ilginç bilgilere istinaden resveratrolün yaşa bağlı insan hastalıklarını tedavi etmede yaşlanma karşıtı potansiyel bir ajan olabileceğini göstermektedir (111).

Resveratrol, kırmızı şarapta bulunan ve memeli NAD⁺ bağımlı deasetilazların çok önemli bir üyesi olan ve yaşlanmayla ilgili birçok hastalık için çekici bir terapötik hedef olarak ortaya çıkan SIRT1'in aktivasyonu yoluyla potansiyel sağlık yararını gösterdiği öne sürülen doğal bir bileşiktir (112).

SIRT1 geni ile ilgili bir çalışmada normal cilt ve normal melanositlerle karşılaştırıldığında SIRT1'in klinik insan melanom dokularında ve insan melanom hücre hatlarında (Sk-Mel-2, WM35, G361, A375 ve Hs294T) aşırı eksprese edildiğini bulunmuştur. Ek olarak, A375, Hs294T ve G361 melanom hücre hatlarının küçük moleküllu bir SIRT1 inhibitörü olan

Tenovin-1 ile tedavisi, hücre büyümesinde ve hücre canlılığında önemli bir düşüşle sonuçlanmıştır. Bu çalışmaya göre SIRT1, melanomların çoğunda mutasyona uğramamış olan tümör baskılayıcı p53'ün aktivitesi yoluyla etki ediyor gibi görünmektedir (113).

Literatür taraması sonucunda Resveratrolün, kanser önleyici özelliklere sahip, doğal olarak oluşan bir bileşik olduğu melanom tedavisinde kemoterapiye ek olarak kullanılabilecek bir bileşik potansiyeli olduğu görülmüştür (114).

Menicacci ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, resveratrolün yaşlanmış melanom hücreleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Buna göre iyi bilinen bir *in vitro* yaşlanma modeli olan insan MRC5 fibroblastlarıyla şartlandırılmış ortam oluşturulmuş ve A375 ile A375-M6 melanom hücreleri bu ortamda kültüre alınmıştır. Melanom hücreleri üzerindeki fonksiyonel deneyler, Genç MRC5 kültürleri tarafından üretilen şartlandırılmış ortam ile karşılaştırıldığında, Yaşlanmış MRC5 hücreleri tarafından üretilen şartlandırılmış ortamın protümoral bir etkisini ortaya çıkarmıştır. Yaşlanmış şartlandırılmış ortam kullanıldığında her iki melanom hücre hattının invazivliğinde bir artış ölçülmüştür (115).

A375 ve A375-M6 hücreleri, yaşlanmış MRC5 şartlandırılmış ortamının protumoriyenik etkisi ile ilişkili olabilecek genlerin mRNA ekspresyonu için analiz edilmiştir. MRC5 fibroblast kültürlerinin 5 uM resveratrol ile tedavi protokolü, yaşlanan şartlandırılmış ortamda üretilen A375 ve A375-M6 hücre hatlarının habis özelliğe neden olduğu zararlı etkileri azaltma yeteneğine sahiptir. Resveratrol ile işlenmiş yaşlanmış hücrelerin şartlandırılmış ortam ile inkübasyonu, hücre farklılaşması, çoğalması ve hayatta kalması ile ilişkili olan p38 ve ERK1/2 proteinlerinin fosforilasyon seviyelerinin düşürülmesinde etkili olmuştur. Bu da resveratrolün yaşlanan melanoma hücreleri üzerinde antitümöral etkisi olabileceğini göstermektedir (115).

Melanom, içsel kemorezistans direnci nedeniyle standart kemoterapiye zayıf yanıt verir. BRAF kinaz genindeki aktive edici bir mutasyon da dahil olmak üzere çoklu genetik ve moleküler kusurlar, melanom ile ilişkilidir ve proliferasyonu ve apoptozu düzenleyen sinyal iletim yollarında ortaya çıkan değişikliklerin, kemorezistans direncine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. BRAF kinazı hedefleyen bir multikinaz inhibitörü olan Sorafenib, ilerlemiş renal hücreli ve hepatoselüler karsinomlarda kullanım için Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylanmıştır (116).

Sorafenib

Sorafenib, tümü Raf-MAPK/ERK kinaz-ERK yolu tarafından yönlendirilebilen hücre proliferasyonunu, hücre sağkalımını ve anjiyogenezi bloke eder. Melanom hücre hatlarının sorafenib ile tedavisi, hücre ölümü ve tümör büyümesinde gecikme ile sonuçlanmıştır. (117).

Hilda ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada ilerlemiş Hepatoselüler Karsinom (HCC) hastalarında sorafenibin tedavi veya cerrahi müdahalelere uygun olmayan daha genç (<70 yaş) ve daha yaşlı (≥ 70 yaş) hastalar arasında sorafenibin etkinliğini ve tolere edilebilirliği değerlendirilmiştir. Tedavi sonucunda yaşlı hastalarda yaşa atfedilebilecek hiçbir beklenmedik toksisite kaydedilmemiştir (118).

Literatürde farklı kanser türleri için sorafenible tedavi yöntemini araştıran çalışmalar bulunsa da yaşlı melanom hastaları için yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrıca sorafenibin yaşlanma karşıtı ajan olarak kullanılabileceği yönünde bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Gefitinib

Gefitinib, sıklıkla hem koroidal hem de koroidal olmayan melanom hücrelerinde eksprese edilen bir epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) inhibitörüdür (119). Bir çalışmada, EGFR mutasyonu olan ilerlemiş küçük hücreli olmayan akciğer kanserli (NSCLC) 75 yaş üstü yaşlı hastalarda gefitinib ile birinci basamak tedavinin güvenliliği ve etkililiği doğrulanmıştır. Güçlü antitümör aktivitesi ve hafif toksisitesi göz önüne alındığında, yaşlı hastalar için birinci basamak gefitinib, standart kemoterapiye tercih edilebilir (120).

Yapılan başka bir çalışmada ise Gefitinibin malign melanom üzerindeki etkisi ve mekanizması araştırılmıştır. Wan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada A375 hücre hattı *in vitro* kültürlenmiş ve gefitinib gruplarına (5 ve 10 uM) ve bir kontrol grubuna ayrıldı. Hücre proliferasyonu bir MTT testi kullanılarak ölçülerek ve kaspaz-3 aktivitesi bir kit kullanılarak değerlendirilmiştir. Tümör büyümesinde ve metastazında önemli bir proanjyogenik faktör olarak vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve melanom metastazını teşvik eden protein kinaz AKT'nin mRNA ve protein ekspresyon seviyeleri, ters transkripsiyon-kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu ve western blot analizleri kullanılarak tespit edilmiştir. Sonuçta gefitinibin, melanom hücre proliferasyonunu önemli ölçüde inhibe ettiği, kaspaz 3 aktivitesini arttırdığı ve tümör hücresi istilasını baskıladığı görülmüştür (121).

Yapılan analizler sonucunda 3 proteini hedefleyen ilaçlar ve bu ilaçlarla yapılmış olan moleküler kenetleme çalışmalarının sonuçları Tablo 20'de gösterilmiştir.

Tablo 20. Aynı anda 3 proteini hedefleyen ligandlar ve bu ligandlarla eşleşen proteinlerin kenetleme çalışmaları.

Ligand	Protein	PDB Kodu	Sonuç Ortalama ΔG (kJ/mol)
Cenisertib	CHEK2	2W0J	-7.0
	EGFR	7SYD	-8.6
	MAPK8	4G1W	-8.7
CI_1040	MAPK14	6SFO	-6.6
	MAPK8	4G1W	-7.1
	PRKCA	4DNL	-5.2
Etoposide	E2F1	5M9N	-8.5
	EGFR	7SYD	-9.3
	MAPK3	4QTB	-9.8
GO_6976	CHEK2	2W0J	-10.2
	EGFR	7SYD	-10.7
	MAPK8	4G1W	-10.3
Ilorasertib	CHEK2	2W0J	-6.2
	EGFR	7SYD	-7.7
	MAPK14	6SFO	-6.1
Irinotecan	E2F1	5M9N	-10.1
	EGFR	7SYD	-11.1
	UBE2I	2GRN	-8.8
Quercetin	E2F1	5M9N	-8.1
	MAPK3	4QTB	-9.0
	PRKCA	4DNL	-7.1

Cenisertib

Cenisertib, AurA ve B dahil olmak üzere bir dizi kinaza karşı geniş bir inhibitör aktivite gösterir (122). Bir çalışmada test edilen ikinci nesil antimitotik ve Aurora inhibitörü olan cenisertib Akut Miyeloid Lösemi (AML) için umut vadetmiştir (123). Bu bileşik hayatta kalmayı ve büyümeyi destekleyen bir sinyal iletim yolu olan AKT hedefleyerek kanser araştırmaları için potansiyel taşıır (124).

Literatür araştırması sonucunda cenisertibin melanom ve yaşlanmayla ilgili yapılmış çalışmasına rastlanmamıştır.

CI_1040 (PD184352)

MAPK/ERK (MEK) hücre yüzeyindeki bir reseptörden gelen bir sinyali hücrenin çekirdeğindeki DNA'ya ileten hücredeki bir sinyal yoludur (125). CI-1040, Pfizer/Warner-Lambert tarafından klinik aşamada yürütülen ilk MEK inhibitörüdür (126). CI-1040, kolorektal kanser, meme kanseri, pankreas kanseri ve akciğer kanseri için faz II'de geliştirilmiştir, ancak zayıf çözünürlüğü ve hızlı atılım ile ilgili maruziyet olduğu ve yetersiz

antitümör aktiviteye yol açtığı bulunmuştur (127). PD-0325901, MEK inhibitörü CI-1040'ın bir türevidir. Melanom, kolonik neoplazmalar ve göğüs neoplazmalarının tedavisine yönelik bir faz I/II çalışması, kas-iskelet, nörolojik ve oküler toksisite nedeniyle 2007'de sonlandırılmıştır (128).

Literatür taraması sonucunda CI-1040 molekülü için yaşlanma üzerine yapılan çalışmalarla ilgili verilere rastlanmamıştır.

Etoposide

Etoposid , testis ve küçük hücreli akciğer tümörlerini tedavi etmek için kullanılan bir podofilotoksin türevidir. Dirençli testis tümörlerinin tedavisinde ve küçük hücreli akciğer kanseri (NSCLC) hastalığına sahip kişilerde birinci basamak tedavi olarak diğer kemoterapötik ajanlarla kombinasyon halinde kullanım içindir (129). Yapılan bir çalışma, etoposidin yüksek oranda metastaz yapmış melanomların tedavisi için kullanılabildiğinden ve dolayısıyla onları azaltabildiğinden dolayı bu molekülün önemini vurgulamıştır (130).

Etoposid, küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC) tedavisi için en aktif ajanlar arasındadır; hem oral hem de intravenöz preparatlar mevcuttur. Etoposid oral yolla tedavinin biyoyararlanımı %15 ila %75 arasında değişir. Histolojik olarak SCLC tanısı doğrulanmış yaşlı hastalarda (70 yaş ve üstü) etoposid ile ilgili bir faz II denemesi gerçekleştirmiştir bu denemede yaşlı hastalar için yüksek yanıt oranı ve anlamlı sağkalım uzaması ile mükemmel bir palyatif tedavi olduğu görülmüştür. Ek olarak, terapi minimal toksisite ile ilişkilidir ve tamamen ayakta tedavi bazında uygulanabilir (129).

Bu çalışmaya göre Etoposid'in yaşlı melanom hastalarında da kullanılabilecek bir ajan olarak araştırılabileceği görülmektedir.

GO-6976

Protein kinaz C(PKC)'nin kalsiyuma bağımlı izoformlarının bir inhibitörüdür (131). PKC, serin veya treonin fosforilasyonu yoluyla çeşitli büyüme ve hareketlilikle ilişkili proteinlerin işlevini düzenleyen, en az 12 izoformdan oluşan önemli bir sinyal veren multigen enzim ailesidir (132). Bir çalışmada, PKC'nin bir izoformu olan PKC- α 'nın immün yetmezliği olan farelerde çok sayıda metastaz oluşturan agresif bir metastatik melanom hücre hattında melanom hücre migrasyonunda rol oynadığı gösterilmiştir. Bulgular seçici inhibitör GO-6976 tarafından PKC- α yıkımının melanom hücre göçünü önemli ölçüde azalttığını göstermiştir (133). Bir çalışmada meme kanseri çalışmasında NF- κ B'nin uygun bir hedef

olduğunu ve NF-κB inhibe edici aktiviteye sahip Go6976 veya benzer bileşiklerin meme kanseri hastaları için potansiyel olarak yeni terapötik ajanlar olduğunu önerilmiştir (134).

Kanser araştırmalarında umut vadeden GO-6976 molekülü için yaşlanan bireydeki antitümöral etki ile ilgili çalışmalara rastlanmamıştır.

Ilorasertib

Ilorasertib, Miyelodisplazi, Solid Neoplazma, İleri Kanserler, İleri Katı Tümörler ve Akut Miyeloid Lösemi gibi hastalıkların tedavisini inceleyen çalışmalarda kullanılmıştır. Ilorasertibin Aurora A, B ve C ve VEGF ve PDGF reseptör kinazları dahil olmak üzere çoklu kinazların güçlü bir inhibitörü olduğunu gösteren preklinik çalışmaları desteklemektedir. Bu nedenle Akut Miyeloid Lösemi gibi hastalıklarda klinik aktiviteye sahip olabilir (135).

Ilorasertibin melanom ve yaşlanma üzerine etkileri ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Irinotecan

Taş ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada metastatik malign melanomlu hastaların tedavisinde 3 haftalık intravenöz dosetaksel ve irinotecanın etkinliği ve toksisitesi araştırılmıştır. Sonuçta intravenöz docetaxel ve irinotecan kombinasyonu etkisiz görülmüş ve önerilmemiştir (136).

Araştırmalar irinotecan ile tedavide 65 yaş üstü hastalarda 3. veya 4. derece ishalin iki kat daha sık meydana geldiğini göstermiştir (137). Ancak bazı araştırmalar da, 70 yaş üstü yaşlı hastaların irinotecan ile güvenli bir şekilde tedavi edilebileceğini düşündürmektedir (138).

Quercetin

Quercetin, sağlıkla ilgili çeşitli sorunları tedavi etmek için kullanılabilen güçlü bir moleküldür. Quercetin, hem *in vivo* hem de *in vitro* antioksidan özellikler gösterir. Quercetin'in serbest radikal süpürme aktivitesi, yaşa bağlı çeşitli bozukluklardan korur (139). Çalışmalar, quercetin'in yaşa bağlı bozuklukların önlenmesinde çok önemli bir rol oynadığını kanıtlamıştır. Quercetin, şu anda çeşitli farmasötiklerde kullanılan güçlü bir antioksidandır. Quercetin'in özellikleri, diğer çeşitli bozukluklarda daha fazla araştırılabilir. Quercetin, anti-oksidatif, anti-inflamatuar, anti-proliferatif, anti-kanserojen, anti-diyabetik ve anti-viral özelliklere sahiptir. Molekül lipofiliktir ve BBB'yi (Kan-Beyin Bariyeri) kolayca geçebilir ve bu nedenle nörodejeneratif hastalıklardan korur. Çeşitli *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar, quercetin'in rolünü göstermiştir ve burada, quercetin'in nörodejenerasyon,

diyabet, kanser ve inflamasyonda iyileştirici bir ajan olarak ayrıntılı bir incelemesi yapılmıştır. Quercetin'in nanoformülasyonları ve lipozomal formülasyonları, yaşa bağlı diğer hastalıkları tedavi etmek için potansiyel taşıyıcı (140). Quercetin'in güçlü bir şekilde melanom büyümesini ve invaziv ve metastatik potansiyeli inhibe ettiği; bu nedenle, metastatik melanomun kombinasyon terapisinde ve melanom metastazlarının önlenmesinde değerli bir araç oluşturabileceği çalışmalarda gösterilmiştir (141).

3.2.3 Ortak İlaç Önerisi

Yapılan literatür taramaları ve moleküler kenetleme çalışmaları sonucunda yaşam süresini uzattığı ve yaşlanma ile ilgili hastalıkların tedavisinde potansiyel olduğu bilinen Resveratrolün, kanser önleyici özelliklere sahip, doğal olarak oluşan bir bileşik olduğu melanom tedavisinde kemoterapiye ek olarak kullanılabilir bir bileşik potansiyeli olduğu görülmüştür.

Sorafenib için melanoma yönelik araştırmalarda pozitif sonuçlar gözlenirken yaşlı melanom hastaları ile yapılmı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Gefitinib için küçük hücreli olmayan akciğer kanserli 75 yaş üstü yaşlı hastalarda birinci basamak tedavinin güvenliliği ve etkililiği doğrulanmıştır. Aynı zamanda melanom için de pozitif araştırma sonuçları bulunan gefitinibin melanom üzerinde etkili bir molekül olabilme potansiyeli vardır.

Etoposide yüksek oranda metastaz yapmış melanomların tedavisi için kullanılabildiğinden ve dolayısıyla onları azaltabildiğinden dolayı bu molekülün önemi yapılan çalışmalarda vurgulanmıştır. Aynı zamanda yaşlı hastalar için yüksek yanıt oranı ve anlamlı sağkalım uzaması etkisi yapılan çalışmalarda görülmüştür. Bu molekül de yaşlanan melanom hücreleri üzerinde potansiyel taşımaktadır.

Yaşa bağlı bozuklukların önlenmesinde çok önemli bir rol oynadığı kanıtlanan Quercetin, melanom büyümesini ve metastazını önlediği ve bu yüzden yaşlanan hücrelerde veya yaşlı hastalarda melanomun tedavisi için önemli bir araç olabileceği çalışmalarda gösterilmiştir.

Literatür taraması sonucunda bu bileşiklerin yaşlılığın neden olduğu melanoma, yaşlılıkla artan tedavi zorluklarının aşılması veya yaşlanan hücrelerdeki tedavinin iyileştirilmesi ile ilgili potansiyel taşıdığı görülmüştür. Yapılan ilaç yeniden konumlandırma ve moleküler kenetleme çalışmalarıyla bu bileşiklerin melanom kanseri hücrelerindeki proliferasyonu önleyebileceği gösterilmiştir.

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Melanom, kansere bağlı ölümlerin büyük bir kısmından sorumludur. Tedavinin zorlukları ve hastalığın insidansının artması etkili ilaç keşif yöntemlerinin geliştirilmesini gerektirmektedir. Bununla birlikte, yaşlanma, bağışıklık sisteminin düzensizliği ile ilişkilidir ve yaşlı popülasyonda melanom tedavisinin başarısını etkilemesi muhtemeldir. İlaçların yeniden konumlandırılması, mevcut ilaçlar için yeni kullanım alanları sağlayan yenilikçi bir yaklaşımdır. Bu çalışmada ilk olarak literatürden melanom yaşlanma için transkriptom (gen ekspresyon) veri seti elde edilerek mRNA seviyesinde anlatımı farklılık gösteren genler (DEG) tespit edilmiş ve gen ekspresyonu aracılı bir ilaç yeniden konumlandırma yazılımı kullanılarak melanoma yönelik anlamlı ilaç-gen çiftlerinin tahmini elde edilmiştir.

Bu tez çalışmasının ilk kısmında yürütülen hesaplamalı ve deneysel çalışmalar TÜSEB 2019-TA-02 program kodlu, 4591 numaralı ve “Melanom tedavisine yönelik bütünleşik bir yaklaşım: hesaplamalı yöntemler olan ilaç yeniden konumlandırma ve moleküler kenetlenme ile *in vitro* validasyon deneylerinin birleştirilmesi” isimli proje kapsamında desteklenmiştir. Bu proje kapsamında yapılan moleküler kenetleme sonuçlarının *in vitro* sitotoksosite deneyleri ile paralel sonuç verdiği gözlenmiştir ve seçilmiş olan 5 ilacın melanoma hücreleri üzerinde öldürücü etkisi olduğu görülmüştür. Özellikle Doxepin ilacının melanom üzerinde potansiyel antitümöral ajan olabileceği yapılan ilaç yeniden konumlandırma ve moleküler kenetleme çalışmalarıyla gösterilmiş, *in vitro* sitotoksosite deneyleriyle pekiştirilmiştir. En kuvvetli aday ilaç olarak antidepresan olarak kullanılan Doxepin ön plana çıkmıştır çünkü A375 VE SK-MEL-28 melanom hücreleri üzerinde öldürücü etkisi görülürken kontrol hücresi olarak kullanılan HFF-1 üzerinde sitotoksik etkisinin minimum oranda olduğu gözlemlenmiştir.

Tez çalışmasının ikinci kısmında yapılan melanom ve yaşlanmaya yönelik ortak ilaç keşfi çalışmalarında Sorafenib, Gefitinib, Etoposide ve Quercetin bileşiklerinin yaşlanan melanom hücreleri üzerine etkisi, yaşlılığa bağlı olarak görülen melanomun tedavisi ve yaşa bağlı kanser tedavisinin iyileştirilmesinde potansiyel olabileceği görülmüştür. Literatür taramasında hem yaşlanma üzerinde yaşlanma karşıtı etki gösteren hem de melanoma ve yaşlanan melanoma üzerinde etki gösteren potansiyel bir bileşik olan Resveratrolün rolü de yapılan ilaç yeniden konumlandırma çalışmalarında gözlemlenmiştir.

Yaşlı insanlardaki kanser tedavisi gençlerdekine göre ilaç duyarlılığı, ilacın uygulama süresi vs. açısından daha zor bir süreçtir. Bu süreçte yaşlanan hücrelerin ilaçlardan alacağı olumsuz etkiler ve yan etkiler en aza indirilmelidir. Bu yüzden yaşlı kanser hücreleri üzerindeki etkisi açısından ilaçların yeniden konumlandırılması ve yaşlı hastalar üzerinde ilacın güvenli kullanımı için ilaç araştırmaları önem arz etmektedir.

Bu tez çalışmasının devamında tespit edilen 4 potansiyel bileşik olan Sorafenib, Gefitinib, Etoposide ve Quercetin bileşikleri için daha sonra hücre hattı deneyleri yapılması önerilmektedir. Hem genç hem de yaşlı melanom hücre hatlarında bu bileşiklerin *in vitro* sitotoksikite deneylerinin yapılması genç hastaların hücrelerinde etkili olan ilaçların yaşlı hücre hatlarında da aynı etkiyi gösterip göstermeyeceğine ve yan etkilere dair bilgi vermesi beklenmektedir. Bununla ilgili genç melanom hücre hattı olan LM-MEL-19 (ATCC, 28 yaş) ve yaşlı melanom hücre hattı olan LM-MEL-75 (ATCC, 75 yaş) gibi hücre hatları karşılaştırmalı olarak *in vitro* deneylere tabi tutulup daha sonra analiz edilebilir.

KAYNAKÇA

1. Domingues B, Lopes J, Soares P, Populo H. Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets Ther.* Haziran 2018;Volume 7:35-49.
2. Schadendorf D, van Akkooi ACJ, Berking C, Griewank KG, Gutzmer R, Hauschild A, vd. Melanoma. *The Lancet.* Eylül 2018;392(10151):971-84.
3. Houghton AN, Polsky D. Focus on melanoma. *Cancer Cell.* Ekim 2002;2(4):275-8.
4. Kaur A, Ecker BL, Douglass SM, Kugel CH, Webster MR, Almeida FV, vd. Remodeling of the Collagen Matrix in Aging Skin Promotes Melanoma Metastasis and Affects Immune Cell Motility. *Cancer Discov.* 01 Ocak 2019;9(1):64-81.
5. Xue H, Li J, Xie H, Wang Y. Review of Drug Repositioning Approaches and Resources. *Int J Biol Sci.* 2018;14(10):1232-44.
6. Wong HH, Jessup A, Sertkaya A, Birkenbach A, Berlind A, Eyraud J. Examination of clinical trial costs and barriers for drug development final. Off Assist Secr Plan Eval US Dep Health Hum Serv [Internet]. 25 Temmuz 2014; Erişim adresi: www.erg.com
7. Lv W, Zhan Y, Tan Y, Wu Y, Chen H. A combined aging and immune prognostic signature predict prognosis and responsiveness to immunotherapy in melanoma. *Front Pharmacol.* 11 Ağustos 2022;13:943944.
8. Kalaora S, Nagler A, Wargo JA, Samuels Y. Mechanisms of immune activation and regulation: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer.* Nisan 2022;22(4):195-207.
9. Guo W, Wang H, Li C. Signal pathways of melanoma and targeted therapy. *Signal Transduct Target Ther.* 20 Aralık 2021;6(1):424.
10. Hegde UP, Chakraborty N, Kerr P, Grant-Kels JM. Melanoma in the elderly patient: relevance of the aging immune system. *Clin Dermatol.* Kasım 2009;27(6):537-44.
11. Doherty A, Kernogitski Y, Kulminski AM, Pedro de Magalhães J. Identification of polymorphisms in cancer patients that differentially affect survival with age. *Aging.* 20 Ekim 2017;9(10):2117-36.
12. Kulminski AM, Arbeev KG, Culminskaya I, Arbeeva L, Ukraintseva SV, Stallard E, vd. Age, Gender, and Cancer but Not Neurodegenerative and Cardiovascular Diseases Strongly Modulate Systemic Effect of the Apolipoprotein E4 Allele on Lifespan. Schork NJ, editör. *PLoS Genet.* 30 Ocak 2014;10(1):e1004141.
13. Jourdan JP, Bureau R, Rochais C, Dallemagne P. Drug repositioning: a brief overview. *J Pharm Pharmacol.* 10 Ağustos 2020;72(9):1145-51.
14. Napolitano F, Zhao Y, Moreira VM, Tagliaferri R, Kere J, D'Amato M, vd. Drug repositioning: a machine-learning approach through data integration. *J Cheminformatics.* Aralık 2013;5(1):30.
15. Barratt MJ, Frail D, editörler. *Drug repositioning: bringing new life to shelved assets and existing drugs.* Hoboken, N. J: John Wiley & Sons; 2012. 477 s.
16. Wishart DS. DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Res.* 01 Ocak 2006;34(90001):D668-72.

17. Seiler KP, George GA, Happ MP, Bodycombe NE, Carrinski HA, Norton S, vd. ChemBank: a small-molecule screening and cheminformatics resource database. *Nucleic Acids Res.* 23 Aralık 2007;36(Database):D351-9.
18. Hamosh A. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders. *Nucleic Acids Res.* 17 Aralık 2004;33(Database issue):D514-7.
19. Ogata H, Goto S, Sato K, Fujibuchi W, Bono H, Kanehisa M. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* 01 Ocak 1999;27(1):29-34.
20. PubMed: US National Library of Medicine National Institutes of Health [Internet]. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
21. Mewes HW, Hani J, Pfeiffer F, Frishman D. MIPS: a database for protein sequences and complete genomes. *Nucleic Acids Res.* 01 Ocak 1998;26(1):33-7.
22. Bernstein FC, Koetzle TF, Williams GJB, Meyer EF, Brice MD, Rodgers JR, vd. The protein data bank: A computer-based archival file for macromolecular structures. *J Mol Biol.* Mayıs 1977;112(3):535-42.
23. Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, Evangelista C, Kim IF, Tomashevsky M, vd. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update. *Nucleic Acids Res.* 26 Kasım 2012;41(D1):D991-5.
24. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, vd. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 26 Kasım 2012;41(D1):D36-42.
25. Ko Y. Computational Drug Repositioning: Current Progress and Challenges. *Appl Sci.* 23 Temmuz 2020;10(15):5076.
26. Ye H, Yang L, Cao Z, Tang K, Li Y. A pathway profile-based method for drug repositioning. *Chin Sci Bull.* Haziran 2012;57(17):2106-12.
27. Ashburn TT, Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov.* Ağustos 2004;3(8):673-83.
28. Dudley JT, Schadt E, Sirota M, Butte AJ, Ashley E. Drug Discovery in a Multidimensional World: Systems, Patterns, and Networks. *J Cardiovasc Transl Res.* Ekim 2010;3(5):438-47.
29. Jarada TN, Rokne JG, Alhaji R. A review of computational drug repositioning: strategies, approaches, opportunities, challenges, and directions. *J Cheminformatics.* Aralık 2020;12(1):46.
30. Dudley JT, Deshpande T, Butte AJ. Exploiting drug-disease relationships for computational drug repositioning. *Brief Bioinform.* 01 Temmuz 2011;12(4):303-11.
31. Kuntz ID, Blaney JM, Oatley SJ, Langridge R, Ferrin TE. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J Mol Biol.* Ekim 1982;161(2):269-88.
32. Jorgensen WL. Rusting of the Lock and Key Model for Protein-Ligand Binding. *Science.* 15 Kasım 1991;254(5034):954-5.
33. Roy K, Kar S, Das RN. Other Related Techniques. İçinde: *Understanding the Basics of QSAR for Applications in Pharmaceutical Sciences and Risk Assessment* [Internet]. Elsevier; 2015 [a.yer 16 Şubat 2023]. s. 357-425. Erişim adresi: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128015056000107>
34. Saldívar-González F, Prieto-Martínez FD, Medina-Franco JL. Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional. *Educ Quím.* Ocak 2017;28(1):51-8.

35. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, vd. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem.* Aralık 2009;30(16):2785-91.
36. Allen WJ, Balias TE, Mukherjee S, Brozell SR, Moustakas DT, Lang PT, vd. DOCK 6: Impact of new features and current docking performance. *J Comput Chem.* 05 Haziran 2015;36(15):1132-56.
37. Kelley BP, Brown SP, Warren GL, Muchmore SW. POSIT: Flexible Shape-Guided Docking For Pose Prediction. *J Chem Inf Model.* 24 Ağustos 2015;55(8):1771-80.
38. McGann M. FRED Pose Prediction and Virtual Screening Accuracy. *J Chem Inf Model.* 28 Mart 2011;51(3):578-96.
39. Nabuurs SB, Wagener M, de Vlieg J. A Flexible Approach to Induced Fit Docking. *J Med Chem.* 01 Aralık 2007;50(26):6507-18.
40. Wagener M, Vlieg J de, Nabuurs SB. Flexible protein-ligand docking using the Fleksy protocol. *J Comput Chem.* 2012;n/a-n/a.
41. Grosdidier A, Zoete V, Michielin O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acids Res.* 01 Temmuz 2011;39(suppl):W270-7.
42. Jones G, Willett P, Glen RC, Leach AR, Taylor R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking 1 Edited by F. E. Cohen. *J Mol Biol.* Nisan 1997;267(3):727-48.
43. Friesner RA, Banks JL, Murphy RB, Halgren TA, Klicic JJ, Mainz DT, vd. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J Med Chem.* 01 Mart 2004;47(7):1739-49.
44. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem.* 2009;NA-NA.
45. Ruiz-Carmona S, Alvarez-Garcia D, Foloppe N, Garmendia-Doval AB, Juhos S, Schmidtke P, vd. rDock: A Fast, Versatile and Open Source Program for Docking Ligands to Proteins and Nucleic Acids. Prlic A, editör. *PLoS Comput Biol.* 10 Nisan 2014;10(4):e1003571.
46. Unzue A, Zhao H, Lolli G, Dong J, Zhu J, Zechner M, vd. The “Gatekeeper” Residue Influences the Mode of Binding of Acetyl Indoles to Bromodomains. *J Med Chem.* 14 Nisan 2016;59(7):3087-97.
47. Korb O, Stützle T, Exner TE. Empirical Scoring Functions for Advanced Protein–Ligand Docking with PLANTS. *J Chem Inf Model.* 26 Ocak 2009;49(1):84-96.
48. Dominguez C, Boelens R, Bonvin AMJJ. HADDOCK: A Protein–Protein Docking Approach Based on Biochemical or Biophysical Information. *J Am Chem Soc.* 19 Şubat 2003;125(7):1731-7.
49. Spitzer R, Jain AN. Surflex-Dock: Docking benchmarks and real-world application. *J Comput Aided Mol Des.* Haziran 2012;26(6):687-99.
50. Vilar S, Cozza G, Moro S. Medicinal Chemistry and the Molecular Operating Environment (MOE): Application of QSAR and Molecular Docking to Drug Discovery. *Curr Top Med Chem.* 01 Aralık 2008;8(18):1555-72.
51. Kramer B, Rarey M, Lengauer T. Evaluation of the FLEXX incremental construction algorithm for protein-ligand docking. *Proteins Struct Funct Genet.* 01 Kasım 1999;37(2):228-41.

52. Corbeil CR, Moitessier N. Docking Ligands into Flexible and Solvated Macromolecules. 3. Impact of Input Ligand Conformation, Protein Flexibility, and Water Molecules on the Accuracy of Docking Programs. *J Chem Inf Model*. 27 Nisan 2009;49(4):997-1009.
53. De Cesco S, Kurian J, Dufresne C, Mittermaier AK, Moitessier N. Covalent inhibitors design and discovery. *Eur J Med Chem*. Eylül 2017;138:96-114.
54. Englebienne P, Moitessier N. Docking Ligands into Flexible and Solvated Macromolecules. 5. Force-Field-Based Prediction of Binding Affinities of Ligands to Proteins. *J Chem Inf Model*. 23 Kasım 2009;49(11):2564-71.
55. Moitessier N, Pottel J, Therrien E, Englebienne P, Liu Z, Tomberg A, vd. Medicinal Chemistry Projects Requiring Imaginative Structure-Based Drug Design Methods. *Acc Chem Res*. 20 Eylül 2016;49(9):1646-57.
56. Venkatachalam CM, Jiang X, Oldfield T, Waldman M. LigandFit: a novel method for the shape-directed rapid docking of ligands to protein active sites. *J Mol Graph Model*. Ocak 2003;21(4):289-307.
57. Neves MAC, Totrov M, Abagyan R. Docking and scoring with ICM: the benchmarking results and strategies for improvement. *J Comput Aided Mol Des*. Haziran 2012;26(6):675-86.
58. Yang JM, Chen CC. GEMDOCK: A generic evolutionary method for molecular docking. *Proteins Struct Funct Bioinforma*. 27 Şubat 2004;55(2):288-304.
59. Halperin I, Ma B, Wolfson H, Nussinov R. Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins Struct Funct Genet*. 01 Haziran 2002;47(4):409-43.
60. Agarwal S, Mehrotra R. An overview of Molecular Docking. *Quantum Opt Photon Phys CSIR-Natl Phys Lab India*. 2016;
61. Ferreira L, dos Santos R, Oliva G, Andricopulo A. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules*. 22 Temmuz 2015;20(7):13384-421.
62. WEB: <https://www.profacgen.com/protein-ligand-docking.htm>.
63. Goodford PJ. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *J Med Chem*. Temmuz 1985;28(7):849-57.
64. Fan J, Fu A, Zhang L. Progress in molecular docking. *Quant Biol*. Haziran 2019;7(2):83-9.
65. Tanchuk VY, Tanin VO, Vovk AI, Poda G. A New, Improved Hybrid Scoring Function for Molecular Docking and Scoring Based on AutoDock and AutoDock Vina. *Chem Biol Drug Des*. Nisan 2016;87(4):618-25.
66. Yadava U. Search algorithms and scoring methods in protein-ligand docking. *Endocrinol Int J*. 2018;6(6):359-67.
67. Wang Z, Sun H, Yao X, Li D, Xu L, Li Y, vd. Comprehensive evaluation of ten docking programs on a diverse set of protein–ligand complexes: the prediction accuracy of sampling power and scoring power. *Phys Chem Chem Phys*. 2016;18(18):12964-75.
68. Elokely KM, Doerksen RJ. Docking Challenge: Protein Sampling and Molecular Docking Performance. *J Chem Inf Model*. 26 Ağustos 2013;53(8):1934-45.
69. Verdonk ML, Taylor RD, Chessari G, Murray CW. Illustration of Current Challenges in Molecular Docking. İçinde: *Structure-Based Drug Discovery* [Internet]. Dordrecht: Springer

Netherlands; 2007 [a.yer 16 Şubat 2023]. s. 201-21. Erişim adresi: http://link.springer.com/10.1007/1-4020-4407-0_8

70. Berman HM. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 01 Ocak 2000;28(1):235-42.
71. Dias R, de Azevedo Jr. W. Molecular Docking Algorithms. *Curr Drug Targets.* 01 Aralık 2008;9(12):1040-7.
72. Bursulaya BD, Totrov M, Abagyan R, Brooks III CL. Comparative study of several algorithms for flexible ligand docking. *J Comput Aided Mol Des.* Kasım 2003;17(11):755-63.
73. Würth R, Thellung S, Bajetto A, Mazzanti M, Florio T, Barbieri F. Drug-repositioning opportunities for cancer therapy: novel molecular targets for known compounds. *Drug Discov Today.* Ocak 2016;21(1):190-9.
74. Kunzmann A, Andersson B, Thurnherr T, Krug H, Scheynius A, Fadeel B. Toxicology of engineered nanomaterials: Focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* Mart 2011;1810(3):361-73.
75. Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, Alnemri ES, Andrews DW, Baehrecke EH, vd. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ.* Ağustos 2009;16(8):1093-107.
76. Riss T, Moravec R. Cell Proliferation Assays Improved Homogeneous Methods Used to Measure the Number of Cells in Culture. İçinde: *Cell Biology* [Internet]. Elsevier; 2006 [a.yer 16 Şubat 2023]. s. 25-31. Erişim adresi: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780121647308500058>
77. Niles AL, Moravec RA, Riss TL. In Vitro Viability and Cytotoxicity Testing and Same-Well Multi-Parametric Combinations for High Throughput Screening. *Curr Chem Genomics.* 11 Haziran 2009;3:33-41.
78. PinarErkekoğlu T. Güncel İn Vitro Sitotoksikite Testleri. *ET J.* 2021;41(1):45-63.
79. Turanlı B, Gulfidan G, Arga KY. Transcriptomic-Guided Drug Repositioning Supported by a New Bioinformatics Search Tool: geneXpharma. *OMICS J Integr Biol.* Ekim 2017;21(10):584-91.
80. Barardo D, Thornton D, Thoppil H, Walsh M, Sharifi S, Ferreira S, vd. The DrugAge database of aging-related drugs. *Aging Cell.* Haziran 2017;16(3):594-7.
81. STRING [İnternet]. Erişim adresi: <https://string-db.org/>
82. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, vd. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. *Genome Res.* Kasım 2003;13(11):2498-504.
83. Alcaraz N, Pauling J, Batra R, Barbosa E, Junge A, Christensen AG, vd. KeyPathwayMiner 4.0: condition-specific pathway analysis by combining multiple omics studies and networks with Cytoscape. *BMC Syst Biol.* Aralık 2014;8(1):99.
84. Wagner AH, Coffman AC, Ainscough BJ, Spies NC, Skidmore ZL, Campbell KM, vd. DGIdb 2.0: mining clinically relevant drug-gene interactions. *Nucleic Acids Res.* 04 Ocak 2016;44(D1):D1036-44.
85. Barrett T, Edgar R. [19] Gene Expression Omnibus: Microarray Data Storage, Submission, Retrieval, and Analysis. İçinde: *Methods in Enzymology* [Internet]. Elsevier; 2006 [a.yer 16 Şubat 2023]. s. 352-69. Erişim adresi: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687906110198>

86. İmat NB. Melanom tedavisine yönelik olarak ilaçların yeniden konumlandırılması ve moleküler kenetlenme çalışmaları [[Yayımlanmış yüksek lisans tezi]]. [İstanbul]: İstanbul Medeniyet Üniversitesi; 2021.
87. Kaur A, Webster MR, Marchbank K, Behera R, Ndoeye A, Kugel CH, vd. sFRP2 in the aged microenvironment drives melanoma metastasis and therapy resistance. *Nature*. 14 Nisan 2016;532(7598):250-4.
88. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, vd. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol*. 2004;5(10):R80.
89. Irizarry RA. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*. 01 Nisan 2003;4(2):249-64.
90. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, vd. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 20 Nisan 2015;43(7):e47-e47.
91. Kittelson JM. A Review of: “*Fundamentals of Biostatistics*, 7th ed., by B. Rosner”: Boston: Brooks/Cole, 2011, ISBN 978-0-538-73349-6, xvii +859 pp., \$190.95. *J Biopharm Stat*. 01 Eylül 2011;21(5):1046-8.
92. Mudunuri U, Che A, Yi M, Stephens RM. bioDBnet: the biological database network. *Bioinformatics*. 15 Şubat 2009;25(4):555-6.
93. Amelio I, Gostev M, Knight RA, Willis AE, Melino G, Antonov AV. DRUGSURV: a resource for repositioning of approved and experimental drugs in oncology based on patient survival information. *Cell Death Dis*. 06 Şubat 2014;5(2):e1051-e1051.
94. Braun P, Gingras AC. History of protein-protein interactions: From egg-white to complex networks. *PROTEOMICS*. Mayıs 2012;12(10):1478-98.
95. Zhang A. Protein interaction networks: computational analysis. Cambridge University Press; 2009.
96. He H, Lin D, Zhang J, Wang Y ping, Deng H wen. Comparison of statistical methods for subnetwork detection in the integration of gene expression and protein interaction network. *BMC Bioinformatics*. Aralık 2017;18(1):149.
97. Rakshit H, Rathi N, Roy D. Construction and Analysis of the Protein-Protein Interaction Networks Based on Gene Expression Profiles of Parkinson’s Disease. Fleming S, editör. *PLoS ONE*. 29 Ağustos 2014;9(8):e103047.
98. Maden SF, Acuner SE. Mapping Transcriptome Data to Protein–Protein Interaction Networks of Inflammatory Bowel Diseases Reveals Disease-Specific Subnetworks. *Front Genet*. 18 Ağustos 2021;12:688447.
99. Acuner SE, Kocaer AF, Çelik RH, Turanlı B, Nikerel E, Karaca E, vd. Protein Yapısı, Mühendisliği, Etkileşimleri, Dinamiği ve İlaç Tasarımındaki Yeri [İnternet]. Ankara Nobel Tıp Kitapevleri; 2021. Erişim adresi: <https://www.researchgate.net/publication/355381864>
100. Batra R, Alcaraz N, Gitzhofer K, Pauling J, Ditzel HJ, Hellmuth M, vd. On the performance of de novo pathway enrichment. *Npj Syst Biol Appl*. 03 Mart 2017;3(1):6.
101. Alcaraz N, List M, Dissing-Hansen M, Rehmsmeier M, Tan Q, Mollenhauer J, vd. Robust de novo pathway enrichment with KeyPathwayMiner 5. *F1000Research*. 28 Haziran 2016;5:1531.

102. Freshour SL, Kiwala S, Cotto KC, Coffman AC, McMichael JF, Song JJ, vd. Integration of the Drug–Gene Interaction Database (DGIdb 4.0) with open crowdsourcing efforts. *Nucleic Acids Res.* 08 Ocak 2021;49(D1):D1144-51.
103. Lu M, Dong H, Bao D, Liu B, Liu H. Tenofovir disoproxil fumarate induces pheochromocytoma cells apoptosis. *Eur J Pharmacol.* Şubat 2019;844:139-44.
104. Ayabaktı S, Yavuz Kocaman A. Cytogenotoxic effects of venlafaxine hydrochloride on cultured human peripheral blood lymphocytes. *Drug Chem Toxicol.* 03 Mart 2020;43(2):192-9.
105. Cobanoglu H, Coskun M, Çayır A, Coskun M. *In vitro* genotoxic and cytotoxic effects of doxepin and escitalopram on human peripheral lymphocytes. *Drug Chem Toxicol.* 03 Nisan 2018;41(2):238-44.
106. Papadopoulos F, Isihou R, Alexiou GA, Tsalios T, Vartholomatos E, Markopoulos GS, vd. Haloperidol Induced Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Glioblastoma Cells. *Biomedicines.* 11 Aralık 2020;8(12):595.
107. Xiong Y jie, Song Y zhen, Zhu Y, Zuo W qing, Zhao Y fan, Shen X, vd. Neuroprotective effects of olanzapine against rotenone-induced toxicity in PC12 cells. *Acta Pharmacol Sin.* Nisan 2020;41(4):508-15.
108. Cho A, Park SR, Kim SR, Nam S, Lim S, Park CH, vd. An Endogenous Anti-aging Factor, Sonic Hedgehog, Suppresses Endometrial Stem Cell Aging through SERPINB2. *Mol Ther.* Temmuz 2019;27(7):1286-98.
109. Ozretić P, Hanžić N, Proust B, Sabol M, Trnski D, Radić M, vd. Expression profiles of p53/p73, NME and GLI families in metastatic melanoma tissue and cell lines. *Sci Rep.* 28 Ağustos 2019;9(1):12470.
110. Wood JG, Rogina B, Lavu S, Howitz K, Helfand SL, Tatar M, vd. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature.* 05 Ağustos 2004;430(7000):686-9.
111. Alarcón de la Lastra C, Villegas I. Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: Mechanisms and clinical implications. *Mol Nutr Food Res.* Mayıs 2005;49(5):405-30.
112. Hou X, Rooklin D, Fang H, Zhang Y. Resveratrol serves as a protein-substrate interaction stabilizer in human SIRT1 activation. *Sci Rep.* 30 Kasım 2016;6(1):38186.
113. Wilking MJ, Singh C, Nihal M, Zhong W, Ahmad N. SIRT1 deacetylase is overexpressed in human melanoma and its small molecule inhibition imparts anti-proliferative response via p53 activation. *Arch Biochem Biophys.* Aralık 2014;563:94-100.
114. Rahal K, Schmiedlin-Ren P, Adler J, Dhanani M, Sultani V, Rittershaus AC, vd. Resveratrol has antiinflammatory and antifibrotic effects in the peptidoglycan-polysaccharide rat model of Crohn's disease: Inflamm Bowel Dis. *Nisan 2012;18(4):613-23.*
115. Menicacci B, Laurenzana A, Chillà A, Margheri F, Peppicelli S, Tanganelli E, vd. Chronic Resveratrol Treatment Inhibits MRC5 Fibroblast SASP-Related Protumoral Effects on Melanoma Cells. *J Gerontol Ser A.* Eylül 2017;72(9):1187-95.
116. Augustine CK, Toshimitsu H, Jung SH, Zipfel PA, Yoo JS, Yoshimoto Y, vd. Sorafenib, a Multikinase Inhibitor, Enhances the Response of Melanoma to Regional Chemotherapy. *Mol Cancer Ther.* 01 Temmuz 2010;9(7):2090-101.
117. Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature.* 22 Şubat 2007;445(7130):851-7.

118. Wong H, Tang YF, Yao TJ, Chiu J, Leung R, Chan P, vd. The Outcomes and Safety of Single-Agent Sorafenib in the Treatment of Elderly Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma (HCC). *The Oncologist*. 01 Aralık 2011;16(12):1721-8.
119. Patel SP, Kim KB, Papadopoulos NE, Hwu WJ, Hwu P, Prieto VG, vd. A phase II study of gefitinib in patients with metastatic melanoma. *Melanoma Res*. Ağustos 2011;21(4):357-63.
120. Maemondo M, Minegishi Y, Inoue A, Kobayashi K, Harada M, Okinaga S, vd. First-Line Gefitinib in Patients Aged 75 or Older With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Harboring Epidermal Growth Factor Receptor Mutations: NEJ 003 Study. *J Thorac Oncol*. Eylül 2012;7(9):1417-22.
121. Wan X, Zhu Y, Zhang L, Hou W. Gefitinib inhibits malignant melanoma cells through the VEGF/AKT signaling pathway. *Mol Med Rep* [Internet]. 13 Mart 2018 [a.yer 17 Şubat 2023]; Erişim adresi: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2018.8728>
122. Peter B, Bibi S, Eisenwort G, Wingelhofer B, Berger D, Stefanzi G, vd. Drug-induced inhibition of phosphorylation of STAT5 overrides drug resistance in neoplastic mast cells. *Leukemia*. Nisan 2018;32(4):1016-22.
123. Novais P, Silva PMA, Amorim I, Bousbaa H. Second-Generation Antimitotics in Cancer Clinical Trials. *Pharmaceutics*. 02 Temmuz 2021;13(7):1011.
124. Shariati M, Meric-Bernstam F. Targeting AKT for cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs*. 02 Kasım 2019;28(11):977-88.
125. Orton RJ, Sturm OE, Vyshemirsky V, Calder M, Gilbert DR, Kolch W. Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway. *Biochem J*. 01 Aralık 2005;392(2):249-61.
126. Cheng Y, Tian H. Current Development Status of MEK Inhibitors. *Molecules*. 26 Eylül 2017;22(10):1551.
127. Wabnitz PA, Mitchell D, Wabnitz DAM. In Vitro and in Vivo Metabolism of the Anti-Cancer Agent CI-1040, a MEK Inhibitor, in Rat, Monkey, and Human. *Pharm Res*. Eylül 2004;21(9):1670-9.
128. Boasberg PD, Redfern CH, Daniels GA, Bodkin D, Garrett CR, Ricart AD. Pilot study of PD-0325901 in previously treated patients with advanced melanoma, breast cancer, and colon cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. Ağustos 2011;68(2):547-52.
129. Carney DN, Grogan L, Smit EF, Harford P, Berendsen HH, Postmus PE. Single-agent oral etoposide for elderly small cell lung cancer patients. *Semin Oncol*. Şubat 1990;17(1 Suppl 2):49-53.
130. Athawale RB, Jain DS, Singh KK, Gude RP. Etoposide loaded solid lipid nanoparticles for curtailing B16F10 melanoma colonization in lung. *Biomed Pharmacother*. Mart 2014;68(2):231-40.
131. Behrens MM, Strasser U, Choi DW. Gö 6976 Is a Potent Inhibitor of Neurotrophin-Receptor Intrinsic Tyrosine Kinase. *J Neurochem*. 07 Temmuz 2008;72(3):919-24.
132. Nishizuka Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. Nisan 1995;9(7):484-96.
133. Byers HR, Boissel SJS, Tu C, Park HY. RNAi-mediated knockdown of protein kinase C- α inhibits cell migration in MM-RU human metastatic melanoma cell line. *Melanoma Res*. Haziran 2010;20(3):171-8.

134. Biswas DK, Cruz AP, Gansberger E, Pardee AB. Epidermal growth factor-induced nuclear factor κ B activation: A major pathway of cell-cycle progression in estrogen-receptor negative breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci.* 18 Temmuz 2000;97(15):8542-7.
135. Garcia-Manero G, Tibes R, Kadia T, Kantarjian H, Arellano M, Knight EA, vd. Phase 1 dose escalation trial of ilorasertib, a dual Aurora/VEGF receptor kinase inhibitor, in patients with hematologic malignancies. *Invest New Drugs.* Ağustos 2015;33(4):870-80.
136. Tas F, Camlica H, Kurul S, Aydiner A, Topuz E. Combination Chemotherapy with Docetaxel and Irinotecan in Metastatic Malignant Melanoma. *Clin Oncol.* Mayıs 2003;15(3):132-5.
137. Kweekel D, Guchelaar HJ, Gelderblom H. Clinical and pharmacogenetic factors associated with irinotecan toxicity. *Cancer Treat Rev.* Kasım 2008;34(7):656-69.
138. Comella P, Farris A, Lorusso V, Palmeri S, Maiorino L, Lucia LD, vd. Irinotecan plus leucovorin-modulated 5-fluorouracil I.V. bolus every other week may be a suitable therapeutic option also for elderly patients with metastatic colorectal carcinoma. *Br J Cancer.* Eylül 2003;89(6):992-6.
139. Ulusoy HG, Sanlier N. A minireview of quercetin: from its metabolism to possible mechanisms of its biological activities. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 27 Ekim 2020;60(19):3290-303.
140. Deepika, Maurya PK. Health Benefits of Quercetin in Age-Related Diseases. *Molecules.* 13 Nisan 2022;27(8):2498.
141. Caltagirone S, Rossi C, Poggi A, Ranelletti FO, Natali PG, Brunetti M, vd. Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *Int J Cancer.* 15 Ağustos 2000;87(4):595-600.