



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



GABAPENTİNOİDLERİN MEME KANSER HÜCRE VE KÖK HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Doktora Tezi

Saliha AKSUN

Kök Hücre Anabilim Dalı

İzmir
2025

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

GABAPENTİNOİDLERİN MEME KANSER HÜCRE VE KÖK HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Saliha AKSUN

Danışman
Prof. Dr. Gülinnaz ERCAN

Kök Hücre Anabilim Dalı

İzmir
2025

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof.Dr. Gülinnaz Ercan

(Danışman)

Üye : Prof.Dr. Yiğit Uyanıkgil

Üye : Prof.Dr. Çığır Biray Avcı

Üye : Prof.Dr. Yasemin Delen Akçay

Üye : Prof. Dr. Barış Karadaş

Üye :Doç. Dr. B. Emre Gölboyu

Doktora tezinin kabul edildiği tarih: 24.02.2025

Önsöz

Bir tezinizin olması, bir hipotez bulmanız her zaman kolay değildir. Bilirsiniz ki yapılan her işin toplum için bir faydası olmalıdır. Bu konu neden önemli, gerçekten bu konuda bir hipotez geliştirdiğimde sonuçların toplum sağlığına bir katkısı olacak mı? Elde edilecek olan çıktılar, alandaki bir boşluğu doldurmaya hizmet edecek mi?

Tez konumun belirlenmesi sırasında pek çoğumuz gibi ben de bu yolculuğa çıktım, ana hedefim, araştırmamızın verilerinin sağlık alanına bir hizmet sunabilmesiydi.

Konumuzu belirledikten sonra, planlama sürecinde, tez çalışmalarının her aşamasının araştırmacıyı bilimsel anlamda geliştirdiğini görmeye başlarız. Araştırmalar devam ettikçe yeni soru işaretleri ortaya çıkaran, yeni varsayımlar ortaya çıkaran bir süreçtir bilimsel araştırma süreci. Başlangıçta planlamadığınız yeni deneyler yapmanıza, bu konularda araştırma yapan başka bilim insanlarına ulaşp, görüş almanıza, deneyim sahibi olanların değerlendirmelerine gereksinim duyulabilir bu yolculukta. Aslında bir araştırmayı, araştırma yapan da budur. Bu süreçte, bağlantılarınız artar, görüşleriniz olgunlaşmaya başlar, araştırma yapmanın keyfi ve mutluluğu oluşmaya başlar. Tüm aşamalarda, planlamayı, literatür taramayı, literatüre göre planlarınızı yeniden düzenlemeyi, malzeme seçmeyi, satın alma yöntemlerini, malzemeyi korumayı, güvenli laboratuvar çalışmalarını, veri güvenliğini sağlamayı, verileri elde ettikten sonra istatistiksel yöntemlerle değerlendirmeyi, bulgularınızı yorumlamayı ve tartışmayı öğrenirsiniz. En sonunda, sonuçlara ulaşıldığında tüm çalışmalarınız bir bütüne dönüşür ve sizden sonra gelecek araştırmacıların yararlanması için bir eser oluşur. Bu çok büyük bir mutluluktur.

Bu süreçler sırasında, bazen ortam koşulları bazen de malzeme eksikliği nedeni ile planlanan sürele uyulamadığını, B planlarının belki de C planlarının ne kadar önemli olduğunu görebilirsiniz.

Ayrıca, belirtmek isterim ki, hücrelerle ilgili çalışmalar yaptığınızda bazı tatillerinizin belki de tamamını laboratuvar da geçirmeniz gerektiğini görebilirsiniz. Hücrelerinizin yanıt süreçleri her zaman öngörüldüğü gibi olamayabilir.

Sonuç olarak, bu araştırma projemiz sırasında, hücrelerin bir bebek gibi bakım istediğini gördüm, bu alanda bir çalışma yapmanın maliyetinin yüksek olabileceğini anladım. İnternet ortamında maliyet araştırması yaptığınızda, hücre çalışmalarında kullanılacak malzemeler ile ilgili x kadar görünen bir etiket fiyatının, ürün Avrupa'dan ya da Amerika'dan geldiği için, 10x TL gibi yüksek fiyatlara mal edilebildiğini

gördüm. Özellikle de kanser kök hücreleri ile ilgili bir projeniz varsa, kanser kök hücrelerin elde edilebilmesinin ne kadar zor olduğunu, zorluğun sadece bütçe ile ilgili olmadığını, satın almak istesenez bile kanser kök hücrelerinin transfer koşulları sırasında geçecek olan uzun sürece dayanamayabileceklerini, canlı olarak elinize ulaşmasının çok zor olduğunu anladım. Bu nedenle, kök hücre ile ilgili çalışmalar yapan ve sağlık alanına bu alanda katkı sunan tüm çalışmacıların ne kadar çok özveride bulunduğu bir kere daha şahit oldum.

Araştırma yapmayı çok seven, deneyimli bir danışmanınızın olması, laboratuvar süreçleri ve diğer tüm süreçlerde birlikte çalışacağınız ekip arkadaşlarınızın, destek alabileceğiniz kişilerin varlığı, süreci aydınlatan, içinize güven veren en önemli noktalardır. Tüm araştırma planlamaları sırasında öncelikle bu noktaya dikkat edilmesinin gerekliliğine yürekten inanıyorum.

Ve umuyorum ki bizim araştırma sonuçlarımız, diğer araştırmacıların bundan sonra yapacakları planlamalara, hastalarımız ve klinisyen hekimlerimiz için klinik karar süreçlerine yararlı olur, yüzümüzü aydınlatır, gururumuz olur.

İzmir, 24.02.2025

Dr. Saliha AKSUN

Özet

Gabapentinoidlerin Meme Kanseri Hücre ve Kök Hücreleri Üzerine Etkisi

Dünyada kanser görülme sıklığı giderek artmaktadır ve kanser hastalarına nöropatik ağrıları nedeniyle, ağrıları hafifletmek için sıklıkla gabapentin ilaç grubundan pregabalin verilmektedir.

Kanser kök hücreleri (KKH)'nin tümör oluşumu, invazyon, metastaz, ilaç direnci ve tümörün nüksetmesinden sorumlu olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, kanser hastasının ağrısını azaltmak amacı ile kullanılacak ilaçlara KKH'nin hücresel yanıtlarının bilinmesi kritik önem taşımaktadır.

Tez projemizin amacı, pregabalinin kanser hücreleri (KH) ve KKH üzerine sitotoksik/proliferatif etkisinin olup olmadığı konusunu araştırmaktır. Bu amaçla, meme KH'nin iki farklı hücre hattından (MCF-7 ve MDA-MB-231) FACS ile CD44⁺/CD24⁻ meme KKH izole edilmiştir.

1.35x10⁷ MDA-MB-231 KH'den, 4.73x10⁵ (%3.5); 1.8x10⁷ MCF-7 KH'den, 1.3x10⁴ (%0.07) CD44⁺/CD24⁻ meme KKH elde edilmiştir. CD133⁺ KKH %0.0-0.2 olduğundan, elde edilen meme KKH, CD44⁺/CD24⁻/CD133⁻ MDA-MB-231 KKH ve CD44⁺/CD24⁻/CD133⁻ MCF-7 KKH olarak tanımlanmıştır.

Meme KH ve KKH'lerine farklı konsantrasyonlarda (0.3, 1, 3, 10 ve 30 µM) pregabalin uygulanırken, ilaç verilmeyen kontrol grupları yanısıra, sitotoksik etkili siklofosfamid ilacı uygulanan pozitif kontrol grupları da oluşturulmuştur.

EC50 değeri ve sitotoksik/proliferatif etkilerin belirlenmesi için MTT, migrasyon/motilite özelliğinin değerlendirilmesi için WH (Wound Healing) testleri, canlılık/apoptoz durumunu gözlemlemek için ANNEXİN-V/PI testi yapılarak pregabalinin MCF-7 ve MDA-MB 231 KH ve KKH üzerindeki etkileri belirlenmiştir.

MTT deneylerinde, MDA-MB-231 KH'de 3 µM, 10 µM ve 30 µM Pregabalin verilen hücrelerde 48.saatte maksimum olmak üzere Optik Dansite (OD) ölçümlerinde artış saptanmıştır. 48.saatte kontrol hücrelerinin OD=0.397 olarak bulunurken, 3 µM, 10 µM ve 30 µM pregabalin uygulanan MDA-MB-231 KH'nin OD değerleri sırasıyla 0.921, 1.068, 1.016 (p<0.0001) olarak bulunmuştur. 72. saatte de kontrol grubuna göre

(OD=0.461); 3 μ M ve 10 μ M konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı derecede OD artışı olmuştur (sırasıyla; OD=0.869; $p<0,0001$ ve OD=0.706; $p<0,05$).

MDA-MB-231 meme KKH'lerinde, 3 μ M Pregabalin uygulanan hücrelerde, OD değerlerinin 48. ve 72. saatlerde kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde yüksek olması (kontrol ve 3 μ M pregabalin uygulanan hücrelerin OD değerleri sırasıyla 48. saatte 1.425'e karşı 2.035; $p<0.05$; 72. saatte 1.555'e karşı 2.382; $p<0.005$) Pregabalinin bu meme KKH'ni proliferere ettiğini göstermektedir.

MCF-7 meme KKH'lerinde, 30 μ M pregabalin uygulamasıyla 48. saatte kontrol grubuna kıyasla OD'de artış gözlenirken (OD=0.401'e karşı OD=0.638; $p<0.05$), 30 μ M siklofosfamid uygulamasıyla ise 72. saatte kontrol grubuna kıyasla OD değerlerinde anlamlı bir azalma gözlenmesi (OD=0.564'e karşı OD=0.232; $p<0.0005$); Pregabalinin meme KKH'lerinin proliferasyonunu artırırken, siklofosfamidin meme KKH'lerinin proliferasyonunu sitotoksik etkisiyle inhibe ettiğini göstermektedir.

MDA-MB-231 KH'nin pregabalin uygulamasına verdiği proliferasyon yanıtı MCF-7 KH'ne göre ~2 kat daha fazladır (48. saatte, MDA-MB-231 KH'de kontrol OD=0.397'e karşı 3 μ M'da OD=0.921, 30 μ M'da OD=1.016) iken; MCF-7 KH'de (kontrol OD=0.378'e karşı, 3 μ M'da OD=0.417; 30 μ M'da OD=0.520).

WH testinde, pregabalinin ≥ 3 μ M konsantrasyonlarda meme KH ve KKH'nin motilitesini/migrasyonunu arttırdığı gözlemlenmiştir. Annexin-V/PI testinde, 30 μ M pregabalinin özellikle MDA-MB-231 KKH'nde en yüksek olmak üzere (%82 canlılık) tüm gruplarda hücre canlılığını kontrol/siklofosfamid gruplarına göre arttırdığı belirlenmiştir. MTT 48 saat test sonuçları ile WH ve Annexin V/PI test sonuçları birbiri ile uyumlu bulunmuştur.

Sonuç olarak, pregabalinin meme KH'leri ve KKH'leri üzerindeki etkisinin ilk kez incelendiği bu çalışmada, hücre proliferasyonunun artan ilaç konsantrasyonu ile arttığının gözlenmesi; KH yanı sıra KKH üzerinde de *in vitro* koşullarda ilaç etkisinin test edilmesi gerektiğini ve bu alanda daha fazla çalışmaya gereksinim duyulduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Meme Kanseri, Kanser Kök Hücresi (KKH), Meme kanseri kök hücresi (meme KKH), Pregabalin, MTT, MCF-7, MDA-MB-231.

Abstract

Effect of Gabapentinoids on Breast Cancer Cells and Stem Cells

The incidence of cancer is increasing worldwide and since cancer patients experience neuropathic pain, pregabalin from the gabapentin drug group is frequently given to relieve their pain.

Cancer stem cells (CSCs) are known to be responsible for tumor formation, invasion, metastasis, drug resistance and tumor recurrence. Therefore, it is of critical importance to know the cellular responses of CSCs to the drugs that will be used to reduce the pain of cancer patients.

The aim of our thesis project is to investigate whether pregabalin has a cytotoxic/proliferative effect on cancer cells (CCs) and cancer stem cells (CSCs). For this purpose, CD44⁺/CD24⁻ breast CSCs were isolated from two different cell lines of breast CCs (MCF-7 and MDA-MB-231) by FACS.

From 1.35x10⁷ MDA-MB-231 CCs, 4.73 x10⁵ (%3.5); from 1.8x10⁷ MCF-7 CCs, 1.3x10⁴ (%0.07) CD44⁺/CD24⁻ breast CSCs were obtained. Since CD133⁺ CSCs were 0.0-0.2%, our breast CSCs were defined as CD44⁺/CD24⁻/CD133⁻ MDA-MB-231 CSCs and CD44⁺/CD24⁻/CD133⁻ MCF-7 CSCs. While pregabalin was applied to breast CCs and CSCs at different concentrations (0.3, 1, 3, 10 and 30 µM), drug-free control groups, and cytotoxic cyclophosphamide applied positive control groups were also created. In order to determine the effects of pregabalin on MCF-7 and MDA-MB-231 CCs and CSCs, we used MTT to find EC50 and observe cytotoxic/proliferative effects, WH (Wound Healing) test for migration/motility properties, and ANNEXIN-V/PI test for the viability/apoptosis status.

In MTT experiments, an increase in Optical Density (OD) measurements was detected in cells given 3 µM, 10 µM and 30 µM Pregabalin in MDA-MB-231 CCs, with a maximum increase at 48 hours. While the OD of control cells was 0.397, the OD values of MDA-MB-231 CCs treated with 3 µM, 10 µM and 30 µM pregabalin at 48th hour were 0.921, 1.068, 1.016 (p<0.0001), respectively. Also at the 72nd hour, a statistically significant increase in OD were determined with pregabalin doses of 3 µM

(OD=0.869; $p<0.0001$) and 10 μ M (OD=0.706; $p<0.05$) in comparison to the control group (OD=0.461) of MDA-MB-231 CCs.

In MDA-MB-231 breast CSCs, it was determined that 3 μ M dose of Pregabalin significantly increased the OD values compared to the drug-free control group at 48th and 72nd hours indicating proliferation of these breast CSCs (OD values of control and 3 μ M pregabalin-applied cells were 1.425 vs. 2.035; $p<0.05$ at 48th hour; 1.555 vs. 2.382; $p<0.005$ at 72nd hour, respectively).

On MCF-7 breast CSCs, an increase in OD was observed at the 48th hour with the application of 30 μ M pregabalin compared to the control group (0.638 vs 0.401 $p<0.05$), while a significant decrease in OD values was observed at the 72nd hour with the application of 30 μ M cyclophosphamide compared to the control group (0.232 vs 0.564 $p<0.0005$); showing that while pregabalin increased the proliferation of breast CSCs, cyclophosphamide inhibited proliferation of breast CSCs via cytotoxicity.

The proliferation response of MDA-MB-231-CCs to Pregabalin application is ~2-fold higher than MCF-7-CCs at 48th hour (control OD=0.397 vs. OD=0.921 at 3 μ M, OD=1.016 at 30 μ M in MDA-MB-231 CCs; in comparison to control OD=0.378 vs. OD=0.417 at 3 μ M; OD=0.520 at 30 μ M in MCF-7-CCs).

In the WH test, it was observed that pregabalin increased the motility/migration of breast CCs and CSCs at concentrations of $\geq 3 \mu$ M. In the Annexin-V/PI test, it was determined that 30 μ M Pregabalin increased cell viability in all groups, especially the highest viability rate (82%) in MDA-MB-231 CSCs compared to the control/cyclophosphamide groups. The MTT 48th hour test, the WH test and Annexin-V/PI test results were found to be consistent with each other.

In conclusion, in this study, in which the effect of pregabalin on breast CCs and CSCs was examined for the first time, it was observed that cell proliferation increased with increasing drug concentration. Therefore, this situation indicates that the reliability of drugs such as pregabalin used in the treatment of cancer-related neuropathic pain should be tested *in vitro* on CCs as well as CSCs, and further studies are needed in this area.

Key words: breast cancer, cancer stem cells; (CSCs), breast cancer stem cell, (BCSC), Pregabalin, MTT, MCF-7, MDA-MB-231.

İçindekiler

Önsöz	ii
Özet.....	iv
Abstract.....	vi
İçindekiler	viii
Tablolar Dizini.....	xi
Şekiller Dizini	xii
Grafikler Dizini	xiv
Kısaltma Listesi	xv
Giriş	1
1.1. Araştırmanın Problemi.....	1
1.2. Araştırmanın Sorusu	2
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	3
1.4. Araştırmanın Varsayımları.....	4
1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları	4
1.6. Araştırmanın Amacı	5
Genel Bilgiler	6
2.1.Pregabalin.....	6
2.1.1.Pregabalin Nedir?	6
2.1.2. Pregabalinin Kullanım Alanları	6
2.1.3.Pregabalin Kullanımı Sonrası Ortaya Çıkan Yan Etkiler, Pregabalinin Kanser Ağrısı için Kullanılması:	7
2.2. Meme Kanseri.....	8
2.2.1. Meme Kanseri Risk Faktörleri	9
2.2.2. Meme Kanseri Alt Grupları-Histolojik Gruplandırması.....	9
2.2.3. Meme Kanserinin Moleküler Sınıflandırılması.....	10
2.2.4. İntrensek Alt Grupların Hiyerarşik Sınıflamasına Göre Meme Kanserleri.....	11
2.2.5. Meme Kanseri Tedavisinde Kemoterapinin Yeri	12
2.3. Solid Tümörler ve Tümör Kök Hücreleri.....	12
2.4. Kanser Kök Hücreleri (KKH)	12
2.4.1. Kanser Kök Hücrelerinin Kökeni ve Özellikleri.....	12
2.4.2.Kanser Kök Hücrelerinin Tedaviye Direnci.....	14

2.5. Kanser Kök Hücrelerinin Tümör Dokusundan İzolasyonu:	14
2.5.1. Meme Kanseri Kök Hücrelerinin Yüzey Belirteçleri Kullanılarak İzolasyonu	16
2.6. Meme Kanseri Hastalarında Nöropatik Ağrı Tedavisinde Pregabalin Kullanılması ve Pregabalinin Hücre Metabolizması Üzerine Etkisi Var mıdır?	16
2.7. Meme Kanseri Hücre Dizileri	19
2.7.1. MDA-MB-231 Hücre Dizisi.....	19
2.7.2. MCF-7 Hücre Dizisi	20
Gereç ve Yöntem	22
3.1. Araştırmamızın Kısıtlamaları.....	22
3.2.Çalışma Tasarımı	23
3.3. Kullanılan kitler, cihazlar, sarf malzemeleri ve kimyasallar	25
3.3.1.Kimyasal ve Cihazlar	25
3.4.Hücre Hatlarının Temin Edilmesi ve Çoğaltılması.....	28
3.4.1. Hücre Kültürü	28
3.4.2. Donmuş Hücrelerin Açılması	28
3.4.3. Hücrelerin Pasajlama İşlemi.....	28
3.4.4. Hücre Kültürü Besi Ortamlarının Hazırlanması.....	29
3.4.5. Hücrelerin Canlılığının Belirlenmesi	30
3.5. Kanser Hücre Hattından Kanser Kök Hücre Elde Edilmesi	30
3.5.1. Hücrelerin FACS Analizi İçin Hazırlanması.....	31
3.6. Uygulanacak Olan Etken Maddelerin Hazırlanması	32
3.7. Sitotoksosite-Hücre Proliferasyon Testleri.....	33
3.7.1 Hücre Canlılığı ve EC50 Değerlerinin Belirlenmesi	34
3.8. Hücre Motilitesi, Migrasyon Deneyi (Wound Healing, WH, Yara İyileşmesi Testi).....	35
3.9. Apoptosis ve Hücre Nekrozu Belirleme Testi.....	36
3.9.1.Annexin V-FITC/PI Apoptosis-Nekroz Testinin Çalışma Prensipleri	36
3.9.2. Annexin V-FITC/PI Apoptosis-Nekroz Testinin Uygulama Aşamaları ...	36
3.10.İstatistiksel Değerlendirme.....	39
Bulgular.....	40
4.1. Meme Kanseri Hücre Hatlarının Kültür Sonuçları.....	40

4.2. FACS ile Meme Kanseri Hücrelerinden, Meme Kanseri Kök Hücrelerinin Elde Edilmesine İlişkin Sonuçlar	41
4.2.1. MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücrelerinden Meme Kanseri Kök Hücrelerinin Elde Edilmesi	41
4.2.2. MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinden Meme Kanseri Kök Hücrelerinin Elde Edilmesi	43
4.3. Kanseri Kök Hücrelerinin Hücre Kültürü Bulguları	46
4.4. Hücre Dizilerinde Pregabalin Etken Maddesinin EC50 Değerinin Belirlenmesi	48
4.5. MTT Deneyi Bulguları.....	49
4.6. Migrasyon Testi Sonuçları	64
4.7 Annexin V/PI Testi Sonuçları	66
Tartışma	71
Sonuç ve Öneriler.....	84
Kaynaklar	87
Ekler	106
Teşekkür	107
Özgeçmiş	110

Tablolar Dizini

Tablo 1: Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler.....	25
Tablo 2: Çalışmada Kullanılan Cihazlar	26
Tablo 3: Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeleri.....	27
Tablo 4: MCF-7 Meme Kanser Hücre Hattı ve MCF-7 meme kanser hücrelerinden elde edilen CD44 ⁺ /CD24 ⁺ /CD133 ⁻ meme KKH ile yapılan çalışmalar için kullanılan hücre besiyeri ortamının bileşenleri	29
Tablo 5: MDA-MB231 Meme Kanser Hücre Hattı ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinden elde edilen CD44 ⁺ /CD24 ⁺ /CD133 ⁻ meme KKH ile yapılan çalışmalar için kullanılan hücre besiyeri ortamının bileşenleri	29
Tablo 6: Analizler için kullanılan etken maddelerin, molarite hesaplamaları	32
Tablo 7: Annexin V-FITC /PI Testi Sonuçlarını Değerlendirme Kriterleri.....	36
Tablo 8: ANNEXİN V-FITC /PI analizi aşamaları.....	38
Tablo 9: Meme kanser hücreleri ve kanser kök hücrelerinin, 30 µM Pregabalin ve Siklofosfamid (Endoxan) ilacı uygulaması sonrası 48. saatte akım sitometrisi ile değerlendirilen canlılık oranları.	68

Şekiller Dizini

Şekil 1: Gabapentinoidlerin kapalı formül yapısı	6
Şekil 2: MDA-MB-231 hücrelerinin kültüre edildikten 48 saat sonraki görüntüsü (ATCC).	20
Şekil 3: MCF-7 hücrelerinin kültüre edildikten 48 saat sonraki görüntüsü (ATCC).	21
Şekil 4: Hücre sayımı için kullanılan Neubauer lamı	30
Şekil 5: MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin, hücre kültür plağındaki görüntüleri (10x, 20x, 40x büyütme).	40
Şekil 6: MCF-7 meme kanseri hücrelerinin, hücre kültür plağındaki görüntüleri (10x, 20x, 40x büyütme)	40
Şekil 7: MDA-MB-231 meme kanser hücre hattından FACS ile CD44 ⁺ /CD24 ⁻ /CD133 ⁻ hücre elde edilmesi.....	42
Şekil 8: MCF-7 meme kanser hücre hattından FACS ile CD44 ⁺ /CD24 ⁻ /CD133 ⁻ hücre elde edilmesi.....	45
Şekil 9: MCF-7 meme kanseri hücre dizisinden (A, 40x) elde edilen MCF-7 kanser kök hücrelerinin (A1, A2, 20x) hücre kültür flaskına alındıktan 24 saat sonraki görüntüleri	46
Şekil 10: MCF-7 meme kanseri kök hücrelerinin, 48 saat sonra hücre kültür plağındaki görüntüleri (10x)	46
Şekil 11: MCF-7 meme kanseri kök hücrelerinin, 72 saat sonra hücre kültür plağındaki görüntüleri (10x)	47
Şekil 12: MDA-MB-231 meme kanseri hücre dizisinden (B, 40X) elde edilen MDA-MB-231 kanser kök hücrelerinin (B1, B2 20X) hücre kültür flaskına alındıktan 24 saat sonraki görüntüleri	47
Şekil 13: MDA-MB-231 meme kanseri kök hücrelerinin hücre kültür plağındaki 48. saat görüntüleri (A:40x, B:10x)	47
Şekil 14: MTT deneyinin reaksiyon görüntülerinden örnekler.....	49
Şekil 15: MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı ve MDA-MB-231 kök hücrelerinin migrasyon testi sonuçları.....	64
Şekil 16: MCF-7 meme kanseri hücre hattı ve MCF-7 meme kanseri kök hücrelerinin migrasyon testi sonuçları.....	65
Şekil 17: MDA-MB-231 meme kanser hücreleri (A) ve MDA-MB-231 meme KKH'lerinin (B) Apoptoz testi sonuçları.....	66

Şekil 18: MCF-7 meme kanser hücreleri (C) ve MCF-7 meme KKH'lerinin (D) Apoptoz testi sonuçları.....	67
Şekil 19: Tüm hücre tiplerinde, Pregabalin ve Siklofosfamidin 48. saatteki etkileri	70



Grafikler Dizini

Grafik 1: MDA-MB-231 KH'de farklı konsantrasyonlardaki pregabalinin etkisinin doz yanıt eğrisi ile gösterilmesi.....	48
Grafik 2 : Pregabalin uygulanmış MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinin MTT test sonuçları	50
Grafik 3: MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerine uygulanmış pregabalin ve siklofosfamid ilaçlarının etkileri	51
Grafik 4: Pregabalin uygulanmış MDA-MB-231 meme KKH MTT test sonuçları ..	52
Grafik 5: MDA-MB-231 meme KKH üzerine uygulanmış Pregabalin ve Siklofosfamid ilaçlarının etkileri	53
Grafik 6: Pregabalin uygulanmış MCF-7 meme kanser hücrelerinin MTT sonuçları	54
Grafik 7: MCF-7 meme kanser hücreleri üzerine uygulanmış Pregabalin ve Siklofosfamid ilaçlarının etkileri.....	55
Grafik 8: Pregabalin uygulanmış MCF-7 meme KKH MTT test sonuçları.....	56
Grafik 9: MCF-7 meme KKH üzerine uygulanmış Pregabalin ve Siklofosfamid etken maddelerin MTT test sonuçları	57
Grafik 10: MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinin, Pregabalin etken maddesinin farklı konsantrasyonlarına yanıtının karşılaştırılması.....	58
Grafik 11: MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanser kök hücrelerinin, Pregabalin etken maddesinin farklı konsantrasyonlarına yanıtının karşılaştırılması.....	59
Grafik 12: MDA-MB-231 meme kanser hücreleri ve kanser kök hücrelerinin, Pregabalin etken maddesinin farklı konsantrasyonlarına yanıtının karşılaştırılması ..	60
Grafik 13: MDA-MB-231 meme kanser hücreleri ve kanser kök hücrelerinin, Pregabalin etken maddesinin farklı konsantrasyonlarına 48. ve 72. saat yanıtının karşılaştırılması	61
Grafik 14: MCF-7 meme kanser hücreleri ve kanser kök hücrelerinin, Pregabalin etken maddesinin farklı konsantrasyonlarına yanıtının karşılaştırılması.....	63
Grafik 15: MDA-MB-231 meme KH ve MDA-MB-231 meme KKH'lerinin Apoptoz testi sonuçları	69
Grafik 16: MCF-7 meme KH ve MCF-7 meme KKH'lerinin Apoptoz testi sonuçları	69

Kısaltma Listesi

Apoptoz	Programlanmış Hücre Ölümü
AREL	Araştırma ve Eğitim Laboratuvarı
BCSCs	Breast Cancer Stem Cells
BLBC	Bazal like meme kanseri
CD44	Cluster of differentiation 44
FITC-CD44 Antibody	Fluorescein isothiocyanate ile konjuge CD44 antikor
CD133	Cluster of differentiation133, Prominin-1
APC-CD133 Antibody	Allophycocyanin ile konjuge CD133 antikor
CD24	Cluster of differentiation 24
PE-CD24 Antibody	Phycoerythrin ile konjuge CD24 antikor
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
DMEM/F12	Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium
DMEM HG	Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glukoz
DMSO	Dimetil sülfoksit
EC50	Half maximal effective concentration (EC50). (Bir ilacın bir süre uygulamasından sonra, deney ortamındaki topluluğun, % 50'sinin bir yanıt ortaya çıkardığı düzeyi).
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EMA	Avrupa Tıbbi Ürünler Ajansı-European Medicines Agency
ER	Östrojen reseptörü
FACS	Fluorescence-activated cell sorting

FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Uygulamaları Servisi-US Food and Drug Administration
FBS	Fetal Bovine Serum
GABA	Gama aminobütirik asit
HER2	Herceptin- İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
IBG	İzmir Biyotıp ve Genom Enstitüsü
pD ₂	EC ₅₀ veya IC ₅₀ değerinin negatif logaritmasıdır .
PI	Propidium Iodide
PR	Progesteron hormon reseptörü
RPM	Dakikada devir sayısı (Revolutions Per Minute)
VBKK	Voltaja bağımlı kalsiyum kanalları
WH	Wound Healing
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

Giriş

1.1. Araştırmanın Problemi

Kanserin oluşturduğu metabolik etkiler ve kanser tedavisine bağlı akut ya da kronik yan etkiler nedeni ile kanserle ilişkili ağrılara yaygın olarak rastlanmaktadır. Tümör cerrahisi sonrasında kanser türüne ve dokusuna göre değişen protokollerle kemoterapi, ve radyoterapi gibi tedaviler de cerrahi tedaviye eklenebilmektedir.

Günümüzde kanser tedavisinin başarılı olmasında radyoterapi, kemoterapi, immunoterapi, hormonal terapi gibi tedavi yöntemlerinin etkinliği sayesinde kanserli hastanın yaşam süresinin arttığı da görülmektedir. Ancak, bu tedavi rejimlerinin yan etkileri de yadsınamaz. Hastalarda kansere bağlı ağrı birçok sebeple oluşabilmekte, bunların arasında ilaçlara bağlı olarak oluşan nöropatik ağrı da ağrıya yol açan diğer nedenlerle birlikte yer alabilmektedir (Fallon, M.T., 2013; Was, H., 2022). Nitekim, bu yan etkiler içinde en sık görülen ve hasta için sorunlu olanların başında da nöropatik ağrılar gelmektedir. Nörotoksik yan etkisi olan kemoterapotik ilaçlar kullanan kanser hastalarının %90'ında nöropatik ağrı görülebilmektedir (Fallon, M.T., 2013; Mitsuru, S., 2021; Mulvey, MR., 2024).

Onkoloji hastaları için farklı disiplinler tarafından ağrı kesici ilaçlar reçete edilebilmektedir. Onkolojik cerrahi öncesi ya da sonrasında, ya da cerrahi tedavi uygulanmayacak olan hastalar için algoloji polikliniğinde ağrı kesici ilaçlar kullanılmaktadır. Bu endikasyonlar arasında, kanser nedeni ile cerrahi uygulama yapılan hastaların postoperatif dönemlerindeki ağrılarının sağaltımı, yoğun bakım ünitesinde takip edilen kanser hastalarında sedasyon sağlama amacı (Takagi, Y., 2023; Wang, Q., 2023) ya da analjezik amaçlarla opiyat ve türevi ilaçların kullanılması yer almaktadır (Chapman, EJ., 2020). Bundan başka, onkoloji polikliniğinde kemoterapi ile tedaviye alınan hastalara ek tedavi olarak farklı analjezik ilaçlar uygulanabilmektedir (Brozović, G., 2022; Mestdag, F., 2023)

Cerrahi prosedürle kanser dokusunun tam olarak çıkarılması durumunda bile, bazı durumlarda kanser kök hücrelerinin (KKH) cerrahi sınırdan ya da periferik dolaşımda hala bulunma olasılığı vardır (Bao, S., 2006). Tümör cerrahisi işlemlerinden sonra kişinin bedeninde, kanserle ilişkili hiçbir hücrenin kalmadığını söylemek zordur. Bu durumda hangi kanser türü olduğundan bağımsız olarak hastaya verilecek olan tüm

tedavi biçimlerinin, halen mevcut olabilecek bir miktar kanser hücrelerini ve kanser kök hücrelerini proliferasyon yönünde etkilememesi oldukça önemlidir.

Kanserle ilişkili ağrılarda yaygın olarak kullanılmakta olan morfin ve diğer opioid grubu ilaçlar etkilerini opioid reseptörleri üzerinden ortaya koyarlar (Abou-Kassem, D., 2022; Abdel Shaheed, C., 2024). Kansere bağlı nöropatik ağrının tedavisinde opioidler dışında, tramadol ve duloksetin yanısıra gabapentinoid grubu ilaçlardan olan pregabalin ve gabapentin de sıklıkla kullanılmaktadır (Lyndon, A., 2017; Morrison, EE., 2017; Lacobucci, G., 2017).

Pregabalin, US gıda ve ilaç uygulama birliği tarafından, ağrılı durumlarla seyreden diyabetik nöropati ve postherpetik nevralji gibi nörolojik endikasyonlarda kullanımı onay almış olan gabapentinoid grubundan bir ilaçtır (Verma, V., 2014). Kanser kemoterapi ile tedavisi sonrası ortaya çıkabilen nöropatik ağrı ya da periferik nöropatide pregabalin ya da gabapentin kullanımı ile ilgili çok sayıda klinik çalışma ve yayın bulunmaktadır, nöropatik ağrının giderilmesi amacı ile pregabalin ve gabapentini içeren gabapentinoid türevi ilaçların kullanımı son yıllarda giderek artmıştır (Spence D., 2010; Dai J., 2021; Wang, M., 2023). Bu tür ilaçların kanser hücreleri ve onların kök hücrelerinin proliferasyonuna yol açmaması önemlidir. Bu ilaçların tedavide kullanımı ve dozajının ayarlanmasında bu hususa dikkat edilmelidir.

1.2. Araştırmanın Sorusu

Pregabalin kullanımının zararlı etkileri ile ilgili bugüne kadar yapılan çalışmaların çoğunda, ilaçların kilo aldırıcı, periferik veya nonperiferik ödem yapıcı etkisi, iştahsızlık, görme bozukluğu, somnolans, vertigo ve öfori gibi yan etkileri tanımlanmıştır (Evoy, KE., 2021; Erdoğan, G., 2011). Alışkanlık ve kötüye kullanım oluşturması üzerine makaleler yazılmıştır (Murnion, B., 2018; Azmi, S., 2019; Evoy, KE.,2021).

Bu makalelerde pregabalinin nöropatik ağrıyı kesmedeki yararlılığı ile birlikte potansiyel yan etkileri nedeni ile zararlı olabileceği tartışılmıştır, klinisyenin bu konuda farkındalığının yüksek olması gerektiğine dikkat çekilmiştir (Awasthi, H., 2023; Polat, CS., 2023). Ancak bu ilacın kanser hücreleri ve KKH'leri üzerine olan etkileri henüz yeterince tartışılmamıştır. Klinik açıdan yararlılığı ve yan etkileri bu denli çokça araştırılmış bir etken maddenin, kanser hücresinin üzerine proliferatif ya da apoptotik etkileri, neovaskülarizasyonu tetikleyici ya da hücre yaşamı için gerekli mikroçevreyi baskılayıcı özellikleri henüz yeterince araştırılmamıştır.

Pregabalinin, kanser hastası için ağrı ile ilgili semptomları azaltıp hastaya bir konfor ortamı sunarken, mevcut kanser dokusuna ya da cerrahi sonrası halen var olma olasılığı olan kanser hücresi ve KKH üzerine nasıl etki ettiği henüz bilinmemektedir. Meme kanseri hastalarında nöropatik ağrı tedavisinde pregabalin kullanılması güvenli midir? Pregabalinin hücre metabolizması üzerinde proliferasyon yönünde etkisi var mıdır? Pregabalinin kanser hücresi ve KKH'lerinin proliferasyonuna neden olup kanserin büyümesine mi yoksa onları apoptoza sürükleyip ölmesine mi neden olduğu bilinmemektedir.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

Araştırmamız sırasında, ilk olarak meme kanser hücreleri üzerinde, sitotoksite deneyleri ile pregabalinin EC50 (*Half maximal effective concentration*) konsantrasyonunun hesaplanması planlanmıştır.

Hipotezimize göre pregabalin maddesi belli bir konsantrasyonun üzerinde, kanser hücreleri ve/veya KKH üzerinde proliferatif etkiye sahip olabilir.

“Kanser ağrısının giderilmesinde kullanılan pregabalinin kullanımı güvenli midir?”

“Dozu sınırlandırılmalı mıdır?” gibi sorular henüz yanıt alamamıştır.

Onkolojik nedenlerle takip edilen ve operasyon şansı olmayan hastalara analjezik tedavi verilmesi, cerrahi ile tümör dokusu çıkarılan onkoloji hastalarının postoperatif dönemlerinde ağrı kesici endikasyonu ile ilaç başlanması, algoloji polikliniklerine başvuran onkoloji hastalarının ağrısını kesmek amacıyla tedavi verilmesi, yoğun bakım ünitesine kabul edilen kanser hastalarında sedasyon sağlamak amacıyla ilaç uygulamaları yapılması gibi durumlar sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Hastaya fayda sağlamak için ilaç verilirken, bu ilacın öncelikle başka bir etki mekanizması ile kanser hastasına zarar vermediğini bilmek de oldukça önemlidir. Bu nedenle bu tür ilaçların

hücre düzeyindeki etkisini öngörebilmek gereklidir. Bir maddenin hücreler üzerine etkisi farklı şekillerde olabilir. Bu etki, tümör hücreleri ve kök hücrelerinin programlanmış hücre ölümü (apoptoz) (Eisenberg-Lerner A., 2009; Hanahan D, 2011) yönünde olup antikanser tedaviye destek sağlayacak olumlu bir etki olabileceği gibi, istenmeyen kanser hücreleri ve kanser kök hücreleri üzerine proliferasyon yapıcı yönde bir etkinin de olması olasıdır (Gallego MA., 2008).

Bu ilaçların tümör hücreleri ve kök hücreleri üzerine proliferatif ve yeni damar oluşumu yapıcı etkilerinin olup olmadığının araştırılması ve tartışılması gereklidir. Ağrı için kullanılan bu tür ilaçların kanser hücreleri ve/veya KKH üzerine apoptotik etkilerinin olması durumunda, antikanserojen tedaviye ek bir fayda sağlayacağı aşıkardır (Bialik, S., 2010). Ancak bu ilaçların KKH üzerinde proliferatif etkisi olması durumunda, tümörün yeniden büyümesine sebep olabileceği ya da cerrahi olarak çıkarılmış bir tümör olsa bile gözle görünmeyen KKH'nin halen operasyon bölgesinde mevcut olması halinde tümörün yeniden oluşmasına sebep olabileceği düşünülebilir. Bu durumda “öncelikle zarar vermemek” ilkesi doğrultusunda hastanın tedavisine eklenen her ilacın ya da bitkisel ürünün hücreler üzerindeki kanıta dayalı etkileri ortaya konulmalıdır. Ek olarak, kullanılan ağrı kesici ilaçların kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaçlarla etkileşiminin yönünün ve derecesinin de incelenmesinde yarar vardır.

1.4. Araştırmanın Varsayımları

KKH, kanser hücrelerine ve/veya sağlıklı hücrelere göre bazı ilaç ve maddelerden çok farklı yönde etkilenir (Allison, MR. 2011).

Kök hücre doğası gereği diferansiyasyon yeteneğine sahiptir ve bu diferansiyasyonun hangi yönde olacağını önceden tahmin edebilmek zordur (Hermann, P.C., 2010).

Yararlı olacağı fikri ile kullanılan bazı ilaçların hücre üzerinde, hücrenin biyolojik ve metabolik davranışında oluşturduğu değişiklikler farklı olabilir. Ortaya konulan varsayımların tekrarlanabilirliğini test etmek önemlidir.

1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırmamız sırasında yapılacak olan deneyler sadece kanser hücresi üzerinde değil, KKH üzerinde de yapılmıştır ve KKH'nin elde edilmesi bu araştırmanın kısıtlılıklarından biri olmuştur. KKH'nin hazır ticari hücre hattı olarak satın alınması

mümkün olamamıştır, çünkü satın alma işlemine aracılık yapacak olan ticari firmalar KKH'nin yurtdışından transfer koşullarına dayanıksız olduğunu ifade etmişlerdir. Uzun süren transfer sırasında şimdiye kadar olan deneyimlere göre, hücreler için uygun koşullar sağlanamadığından, kanser kök hücre hatlarının canlı olarak ulaşamadığı ifade edilmiştir. Bu durumda KKH, kültüre edilmiş kanser hücre hatlarından *floresanla aktive edilmiş hücre ayırma (FACS, Fluorescence-activated cell sorting)* yöntemiyle ayrıştırılarak elde edilmeye çalışılmıştır.

1.6. Araştırmanın Amacı

Bu proje ile nöropatik ağrı, fantom ağrı gibi ağrıları olan hastaların tedavileri sırasında analjezik amaçla kullanılan Pregabalin etken maddeli ilacın meme kanser hücresi ve meme KKH üzerindeki metabolik etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın bulgularına göre, inoperabl ya da postoperatif dönemdeki kanser hastalarında nöropatik ağrının sağaltımı için kullanılan pregabalin gibi ilaçların kanser hücresi ve KKH üzerine proliferatif yönde bir etki yapıp yapmadığı sorusuna yanıt aranılarak, özellikle anestezi ve algoloji uygulamalarında klinik kullanımının güvenliliği kanıta dayalı olarak yorumlanabilecektir.

Pregabalin, kanser hücreleri ve KKH üzerinde proliferasyon yönünde etki yapar mı? Pregabalinin programlanmış hücre ölümü (apoptoz) yapma etkisi var mıdır, kanser hücrelerini ve KKH'ni öldürür mü? Araştırma tez projemizde, bu soruların yanıtlarının araştırılması amaçlanmıştır.

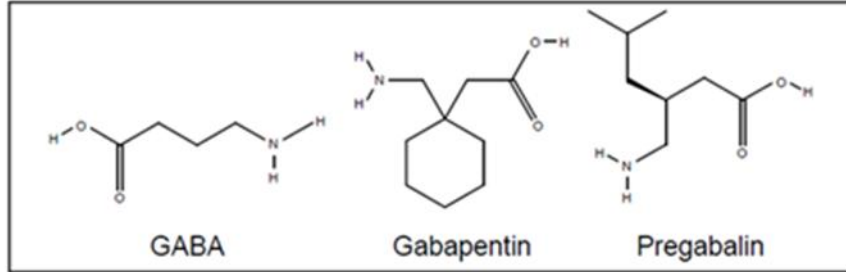
Projemizin bulguları ile klinik tedavilerin kanıta dayalı olarak daha güvenli sürdürülmesini sağlamak üzere literatüre katkıda bulunabilmek hedeflenmiştir.

Bu amaçla planlanan araştırma projemizde, analjezik etkisi nedeni ile sıklıkla kullanılan pregabalin etken maddesinin kanser hücresi ve kanser kök hücresi üzerine olası sitotoksik, proliferatif, preapoptotik, apoptotik ve nekrotik etkilerinin meme kanser hücre hattı ve meme KKH üzerinde belirlenerek değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada elde edilen verilere göre, etkisi araştırılan ilacın kanser hücresi ve KKH üzerine proliferasyon yönünde bir etkisinin saptanması durumunda, bundan sonra planlanacak ek projeler ile sinyal yollarının ve tümör çevresindeki diğer faktörlerdeki değişimlerin araştırılması ve böylece proliferasyon, mikrometastaz ve invazyonun moleküler sebepleri ve önlenmesi yönünde veriler elde edilebilmesi amaçlanmıştır.

Genel Bilgiler

2.1.Pregabalin

2.1.1.Pregabalin Nedir?



Şekil 1: Gabapentinoidlerin kapalı formül yapısı

Pregabalin; gamma aminobutirik asit (GABA) analogu bir antiepileptik ilaçtır (Stahl SM; 2012). 1980’li yıllarda, ilacın kan-beyin bariyerini geçebilmesini sağlamak üzere GABA yapısına alifatik bir yan zincir eklenmesiyle (Şekil 1) sentezlenmiştir. Moleküler ağırlığı 159 daltondur. Pregabalinin etkisi santral sinir sisteminde, nöronlarda, $\alpha_2\delta$ kalsiyum kanallarının baskılanması ile ortaya çıkmaktadır. Voltaja bağımlı bu kalsiyum kanalları, hücrelerde vezikül içeriğinde bulunan nörotransmitterlerin sinaptik aralığa boşalmasını sağlamaktadır, bu nörotransmitterlerin içerisinde uyarıcı moleküller olan glutamat, noradrenalin, substans P vardır. Pregabalin, sözü edilen kalsiyum kanallarının inhibisyonu ile noradrenalin, substans P ve glutamatın hücre dışına çıkışını engellemektedir (Schwan S, 2010). Pregabalin, bunun dışında glutamik asit dekarboksilaz enzimini aktive ederek, beyindeki majör inhibitör transmitter olan GABA üretimini arttırmaktadır. Sistemik biyoyararlanımı %90.0’dır (Bonnet, U., 2017).

2.1.2. Pregabalinin Kullanım Alanları

Pregabalin, GABA’yı arttırıcı etkisi ile, sinir uyarılarına bağlı olarak oluşan nöbetleri modüle edici ve anksiyolitik etkiler oluşturmaktadır. S-pregabalin, doza bağımlı önleyici aktivite göstermektedir ve bu nedenle terapötik amaçlı olarak refraktör epilepside kullanılmıştır. Gıda ve ilaç uygulamaları konusunda onaylar veren FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Uygulamaları Servisi-US Food and Drug Administration)

pregabalinin 2004 yılında diyabete bağılı periferik sinir hastalıkları ile ilişkili nörolojik kökenli ağrı ve postherpetik nevraljide kullanımını onaylamıştır. Avrupa Birliğı üye ülkelerinde Avrupa Tıbbi Ürünler Ajansı (EMA-European Medicines Agency) merkezi ve periferik nörolojik ağrının, anksiyete bozukluğunun tedavisinde ve lokal epilepsisi olan hastaların tedavisi için kullanımını onaylamıştır. 2005’de yetişkinlerde parsiyel başlangıçlı nöbetlerde kullanımı tanımlanmış, ayrıca yetişkinlerde, yaygın ya da sosyal anksiyete bozukluğunda tedavi için onaylanmıştır. Nöropatik ağrıda, anksiyetede, fibromiyalji gibi durumlarda, lokal epilepsili yetişkin hastalarda, günde 150-600 mg doz aralığında kullanılmaktadır (Driot, D., 2019; Lexi-Drugs; Martinotti, G., 2012). İngiltere’de hem pregabalin hem de gabapentin 2019’da C grubu ilaçlar arasında sınıflandırılmıştır (Schifano, F., 2018).

Pregabalin ve gabapentin, nöropatik olmayan inatçı ağrı durumlarında da opiyatlara alternatif olarak kullanılmak istenmiştir, ancak etkisi opiyatlara göre daha az olmuştur. Dolayısıyla hastalar bu ilaçlardan çok yararlanamadıkları gibi istenmeyen etkileri de görölmüştür. Pregabalinin antikonvülzan özelliğı dışında, özellikle kronik ağrı gibi klinik durumlarda kullanımı (Gaber, S., 2019) yaygınlaşmakla birlikte, bazı yayınlarda tedavi dışında yüksek doz kullanımına bağılı olarak ölüm olgularının olduğı bildirilmiştir. İnatçı ağrı durumlarında pregabalin sıklıkla tedavi edici amaçla gabamimetik etki için opioidlerle birlikte reçetelenmektedir. Ancak opiat ve opioidlerle birlikte bu şekilde pregabalin kullanılması sonrasında bazı olgular tarafından kötüye kullanıldığı da saptanmıştır (Calendre, EP., 2016; Gomes, T., 2017; Wang, Y., 2017; Schifano F., 2018). Opioidler dışında, alkol ve benzodiazepinlerle birlikte de kullanıldığı ve kötüye kullanımının oranında da artma olduğı bildirilmektedir. Pregabalinin fibromyalji, nöropatik ağrı, huzursuz bacak sendromu gibi endikasyonlarla kullanıldığı hastaların önemli bir kısmının öforizan etkiden söz ettiğı bildirilmiştir (Calandre, EP., 2016).

2.1.3.Pregabalin Kullanımı Sonrası Ortaya Çıkan Yan Etkiler, Pregabalinin

Kanser Ağrısı için Kullanılması:

Pregabalinin kansere bağılı nöropatik ağrı tedavisinin yönetiminde kullanımı ile ilgili faydaların ve zararların değeriendirildiğı çalışmalara göre Lyndon, A., 2017; Morrison, EE., 2017; Lacobucci, G., 2017) pregabalin, ağrının bazı semptomlarını gidermede yararlı olarak tanımlanmıştır. Wang ve arkadaşları 2017 yılında,

pregabalinin nöropatik ağrıda ilk tercih edilen ağrı kesici olduğunu, bunun yanında klinisyenlerin bu ilacı kullanımları sırasında, artan yan etki bildirimlerine dikkat etmeleri gerektiğini vurgulamışlardır (Wang, Y., 2017).

Pregabalin kullanımı ile baş dönmesi, uyku hali, sedasyon, disosiyasyon, halüsinasyon görme, sosyal davranış bozuklukları gibi yan etkilerin oluşabildiği, yan etkileri nedeni ile tedavinin kesilebildiği, kardiyak öyküsü olan yaşlı hastalarda yetmezlik gelişebildiğine ilişkin vakalara rastlanıldığı bildirilmiştir (Erdoğan, G., 2011).

Kansere bağlı ağrı dışında, fibromyalji, osteoartrit, siyatalji, inflamatuvar artrit, kronik baş ağrısı, orak hücre hastalığı gibi ağrı durumlarında diğer ağrı kesiciler gibi pregabalin de sıklıkla kullanılabilir. Ancak Mc Donagh ve arkadaşlarının 2020 yılında yayımladıkları raporda ve Onakpoya ve arkadaşlarının meta analizinde bildirildiği üzere tüm ilaç gruplarında gözlenebilen periferik ödem, baş dönmesi, görme bozukluğu gibi istenmeyen yan etkiler pregabalin ve gabapentin kullanımı ile de oluşabilmektedir (Mc Donagh, MS., 2020, Onakpoya, IJ., 2019, Wood, H., 2018).

Nitekim, Karabulut ve arkadaşlarının çalışmasında, akciğer kanserine bağlı nöropatik ağrının tedavisi için kullanılan duloksetin ve pregabalinin yan etkileri karşılaştırılmış ve benzer bulunmuştur (Karabulut, G., 2020). Pankreas kanserli hastalarda, kanser tedavisinde, genellikle yeni tedavi rejimleri olarak, 5-florourasil, oksaliptatin, irinotekan, lökovorin ya da gemesitabin ve paklitaksel rejimlerinin kullanıldığı ve bu tür ilaçlar kullanılarak yapılan kemoterapi ile indüklenmiş periferik nöropatide pregabalin kullanımının oldukça yararlı olduğu ancak yine de yan etkilere bağlı olarak % 50 hastada pregabalin tedavisinin kesildiği bildirilmiştir (Sugimoto, M., 2021).

2.2. Meme Kanseri

2018’de yayımlanan bir makaleye göre meme kanseri kadınlarda görülen kanserlerin %11,6’sıdır, kanserle ilişkili ölümlerin de %6.6’sını oluşturmaktadır (Siegel, R.L., 2016; Bray, F., 2018; Taurin, S., 2020). Tanı ve tedavi stratejilerindeki son gelişmelere rağmen remisyon durumundaki hastalarda bile relaps ve metastazlar gelişebilmektedir. Bunun dışında nadiren de olsa erkeklerde de meme kanseri görülebilmekte ve genellikle ilerlemiş evrelerde fark edilebilmektedir. Beş yıllık hayatta kalım zamanı erkeklerde kadınlardan daha düşük olarak görünmektedir (%77.6 ve %86.4) (Anderson, WF., 2010; Wang, F., 2019).

Kadınlarda meme kanseri sıklığı ve mortalitesi yaşanılan bölge ve sosyoekonomik durumdan etkilenebilmektedir (Hu, K., 2019). Kuzey Amerika, Batı Avrupa gibi lokasyonlarda, meme kanseri tanı sıklığı daha fazla olmakta, ancak Güney Amerika, Doğu Afrika ve Güney Asya'da daha az sayıda kadın hasta tanı alabilmektedir (Carioli, G., 2017).

2.2.1. Meme Kanseri Risk Faktörleri

Otozomal dominant genler olan, BRCA1 ve BRCA2 varlığı meme kanserine genetik yatkınlık olduğunu göstermektedir (Kuchenbaecker, KB., 2017). CHEK2, ATM PALB2 varlığı da orta derecede riskle ilgili bulunmaktadır (Meijers-Heijboer, H., 2002; Renwick, A., 2006; Rahman, N., 2007).

Yaş faktörü meme kanseri için ek bir risk faktörü olarak tanımlanmaktadır. Meme kanserleri genellikle 50 yaş üzerinde artan sıklıkta görülmektedir ve yaşla birlikte oluşan genetik, epigenetik ve hormonal değişimler bu durumdan sorumlu tutulmaktadır (Takeshima, H., 2019; Rodríguez-Rodero, S., 2014).

Meme dansitesinin yüksek olması (Duffy, SW., 2018), erken yaşta menarş dönemine girilmesi, geç menapoz, doğum sayısının düşük olması, ilk doğumun geç olması (Ewertz, M., 1990; Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Ca., 2012), yüksek kilolu olmak ve postmenapozal dönemde vücut-kitle indeksinin yüksek olması (Shieh, Y., 2019), hormon replasman tedavileri almış olmak (Cancer CGoHFiB., 2019; Kahlenborn C., 2006), prenatal dönemde dietilstilbestrol maruziyeti (Palmer, JR., 2006), radyoterapi maruziyeti (Monninkhof, EM., 2007), alkol kullanımının olması (Chen, WY., 2011), kimyasal toksik ajanlara maruziyet (Hiatt, RA., 2018), gece çalışıyor olmak (Megdal SP., 2005) diğer risk faktörleri olarak tanımlanmaktadır.

2.2.2. Meme Kanseri Alt Grupları-Histolojik Gruplandırması

Meme kanseri, farklı biyolojik ve klinik özellikler sergileyen heterojen bir hastalıktır. Genel olarak lobüler ve duktal karsinomlar en sık görülen meme kanseri türlerini oluşturur. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), meme kanserini histopatolojik özelliklerine göre 20'den fazla alt tipe ayırmıştır.

Meme kanseri öncelikle histolojik görünümüne göre karsinoma in-situ ya da invaziv karsinom olarak sınıflandırılmaktadır. Karsinoma in-situ, lobuler ya da duktal olarak ayrılmaktadır. Yeni tanı almış meme kanserlerinin %15-30'u karsinoma in situ olarak

tanı almaktadır (Siziopikou, KP., 2013). Karsinoma in situ'nun her iki formu da eğer tedavi edilmezse invaziv kansere dönüşme eğiliminde olabilmektedir (Van Seijen, M., 2019; Pareja, F., 2020). İnvaziv meme karsinomu, WHO tarafından invaziv karsinom (%70), invaziv lobuler karsinom, mikroinvaziv karsinom ve daha nadir görülen alt tipler olarak gruplandırılmıştır (Cserni, G., 2010).

En yaygın görülen meme kanseri türü invaziv duktal karsinom olup, meme kanseri olgularının yaklaşık %75'ini oluşturmaktadır. Günümüzde meme kanseri evreleme süreçlerinde, Uluslararası Kanserle Mücadele Birliği (UICC) ve Amerikan Kanser Komitesi (AJCC) tarafından oluşturulan TNM evreleme sistemi yaygın olarak kullanılmaktadır. AJCC, belirli periyotlarla meme kanseri evreleme sistemine yeni güncellemeler getirmektedir.

2.2.3. Meme Kanserin Moleküler Sınıflandırılması

Meme kanserleri pek çok farklı alttipleri olan ve farklı tedavi yaklaşımları uygulanan heterojen bir hastalık grubudur. İmmünohistokimyasal olarak ve gen ekspresyon profillerine göre farklı subgrupları tanımlanmıştır (Fragomeni, S.M., 2018; Toss, A., 2015).

Meme kanserleri; östrojen reseptörünün (*estrogen receptor-α (ER)*), progesteron reseptörünün (*progesterone receptor (PgR)*), ve *human epidermal growth factor receptor 2 (epidermal growth factor receptor-2 (HER2 veya ERBB2))* varlığına göre, ER-pozitif, HER2 pozitif ve her üç reseptörün bulunmaması durumunda triple (-) meme kanseri olarak adlandırılmaktadır (*triple-negative BC, TNBC*). Bu grupta içerisinde, triple negatif meme kanserleri %20'lik bir sıklıkta görülmektedir. Prognozu en kötü olan ve erken metastazların en sık görüldüğü altgrup bu gruptur (Toss, A., 2015; Balic, M., 2019). ER pozitif tümörler tüm meme tümörlerinin %75'ni, PgR pozitif tümörler %55-65'ini oluşturmaktadır (Kastner, P., 1990; Hopp, T.A., 2004; Allison, K.H., 2020). %15-20 meme tümöründe ise *Fluorescence in situ hybridization* (floresans in situ hibridizasyon) yöntemi ile *HER2* geninin varlığı saptanmakta ya da immünohistokimyasal yöntemle *HER2* proteininin aşırı ekspresyonu belirlenmektedir (Loibl S., 2017).

2.2.4. İntrensek Alt Grupların Hiyerarşik Sınıflamasına Göre Meme Kanseri

Meme kanserleri, Luminal A, Luminal B, HER2 artmış olan tip, bazal tip ve normal benzeri tip olmak üzere beş grupta sınıflandırılmaktadır (Perou, CM., 2000; Sørli, T., 2001). Bu alt gruplar, kanserin etiolojisi, başlangıç yaşı ve hastanın prognozu ile ilgili olmaktadır.

Luminal A ve B alt grupları en sık görülen tipleridir ve ER, PgR ve ER ilişkili genlerin ileri düzeyde ekspresyonu ile ilgili bulunmuştur (Sørli, T., 2001). Luminal A tipinin hormon tedavisine iyi cevap verdiği (Ades, F., 2014), ancak ER pozitif olan yaklaşık %40 tümörün PgR negatif olduğu ve bu tümörlerin hormonal tedaviye karşı dirençli ve kötü prognozla ilişkili olduğu (Rakha, EA., 2011) bildirilmektedir.

Bu tümörlerde HER2 ekspresyonunun belirlenmesi tedavide bir hedef oluşturmaktadır. FDA bu reseptöre yönelik olarak 1998 yılında, Humanized anti-HER2 monoclonal antibody (Herceptin, Trastuzumab) kullanılmasını onaylamış ve bu ilaç kemoterapi ile kombine edilerek uygulanmıştır (Wolff, AC., 2007).

Bazal benzeri meme kanseri (BLBC), meme kanserlerinin agresif bir moleküler alt tipidir. Bu grupta sitokeratin gibi, epidermal büyüme faktörü reseptörü gibi proteinlerin aşırı ekspresyonu bulunmakta ancak buna karşılık ER, PgR, HER2'nin ise azalmış ekspresyonu ya da hiç olmadığı görülmektedir. BLBC'nin sadece %15-45'inde ER, PgR ya da HER2 ekspresyonunun görülebildiği bildirilmektedir (Rakha EA., 2011) Bu tip tümörler invaziv meme kanserlerinin %15-20'lik bir bölümünü oluşturmaktadır ve başlangıçta kemoterapiye cevap veriyor olsa da genellikle kötü prognoz ve relapslarla ilişkili bulunmaktadır (Bertucci, F., 2012). BLBC, mitotik indeksin yüksek olması ve Ki67 ekspresyonunun fazla olması ile karakterize tümörler olarak bilinmektedir (Rakha, EA., 2011). BLBC'nin bir alt grubu olan triple negatif meme kanserleri (TNBC) formu, bu alt grubun yaklaşık %80'nini oluşturmaktadır ve bu meme kanseri alt grubu en fazla meme kanseri kök hücresi (BCSC) içeren tipidir, en yaygın kullanılan hücre yüzey biyobelirteçleri olan CD44 pozitif ve CD24 negatif/düşük pozitif ve ALDH1 pozitif olarak tanımlanabilmektedir (Ricardo, S., 2011; Mylona, E., 2008; Honeth, G., 2008).

TNBC tipindeki meme tümörleri için cerrahi tedavi, kemoterapi, radyoterapi sınırlı yarar sağlamaktadır (Lehmann, BD., 2016).

2.2.5. Meme Kanseri Tedavisinde Kemoterapinin Yeri

Meme kanserlerinin yarısından fazlası invazivdir (Malhotra, GK., 2010). Meme kanseri tedavisinde cerrahi yöntemlerin yanısıra, östrojen reseptörünün (*HER*) pozitif olup olmamasına göre çeşitli ilaç tedavisi yöntemleri de kullanılmaktadır. Meme kanserlerinin yaklaşık %17'sinde Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (*EGFR*), östrojen reseptörünün aşırı üretilmesine neden olmaktadır ve tedavide kullanılan Trastuzumab adlı ilaç, *HER2* proteinini hedefleyen monoklonal antikordur. Tamoksifen, kanser hücrelerinin yüzeyindeki östrojen reseptörlerini baskılayarak etki gösteren bir tedavi bileşenidir. Tamoksifen, östrojenin meme hücresindeki kendi reseptörüne bağlanmasını engelleyerek meme kanseri hücrelerinin östrojen etkisine maruz kalmasını önler ve bu yolla kanser hücrelerinin büyümesini durdurur (Davies, C., 2011).

2.3. Solid Tümörler ve Tümör Kök Hücreleri

Tümör kitlesinde bulunan tümör hücreleri sınırlandırılmış sayıda bölünme yeteneğine sahiptir ve kitle oluşturma özelliği düşüktür, ancak kanser hücrelerinin belli bir grubu yenilenme ve yeni bir tümör oluşturma potansiyeline sahiptir. Bu hücre grubuna kanser kök hücreleri ismi verilmiştir (Reya, T., 2001).

1963 yılında, Bruce ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışma ile, transplante edilen az miktarda murin lenfoma hücresinin *in vitro* ortamda koloni oluşturabileceği ve fare dalağında bir kanseri başlatabileceği gösterilmiştir (Bruce, W.R., 1963). KKH fenotipine sahip olan yaklaşık yüz adet hücre fareye transplante edildiğinde çoğalıp yeni bir tümör oluşturma yeteneğine sahip olduğu görülmüştür (Al Hajj, M., 2003).

2.4. Kanser Kök Hücreleri (KKH)

2.4.1. Kanser Kök Hücrelerinin Kökeni ve Özellikleri

Tümör kitlesinde bulunan tümör hücreleri sınırlandırılmış sayıda bölünme yeteneğine sahiptir ve kitle oluşturma özelliği düşüktür, ancak kanser hücrelerinin belli bir grubu yenilenme ve yeni bir tümör oluşturma potansiyeline sahiptir. Bu hücre grubuna kanser kök hücreleri ismi verilmiştir (Reya, T., 2001; Spillane, B., 2007).

Kök hücrelerin, diğer hücrelerden farklı olarak kendine özgü birçok özelliği bulunmaktadır. Bunların arasında, pluripotensi (*stemness*), kendini yenileyebilme

(*self-renewal*) ve farklılaşabilme (*plastisite*) yetenekleri sayılmaktadır. Kendini yenileme özelliği kök hücrelerin sürekli yenilenerek sayılarının artmasına yol açmaktadır. Farklılaşma (*plastisite*) özellikleri ise kök hücrelerin köken aldığı orijinin spesifik hücreleri dışında başka hücrelere de dönüşebileceğini göstermektedir (Raimondi, S., 2009).

Bunun dışında, kök hücreler; normal koşullar altında dokularda az sayıda bulunurlar. Asimetrik bölünme özellikleri vardır ve bu şekilde asimetrik olarak bölünürlerse, ortaya çıkan iki hücreden en az biri kök hücre olarak kalır, diğer hücre ise farklılaşarak progenitör hücreyi oluşturur. Hücre hasarı olduğunda, bölünme hızlarını artırırlar, zarar görmüş dokuya doğru yönelirler. Ortamda bulunan büyüme faktörleri ve sinyal moleküllerine kök hücreler diğer hücrelerden daha fazla bir duyarlılık göstererek hızla yanıt verirler (Krause, DS., 2002).

KKH'ler *in vitro* ortamda genellikle aşağıdaki belli karakterlerine göre tanımlanmaktadır;

- a) KKH, farklılaşma düzeyi ve yüzey belirteci paternine göre izole edilebilmektedir.
- b) KKH'lerden zengin popülasyonlar, süspanse kültürlerde sferoid oluşturma yeteneği ile tanınabilirler.
- c) KKH'lerinden zengin popülasyonlara konvansiyonel kemoterapi ajanları ya da iyonize radyasyon ile muamele edildiğinde yüksek oranda sağkalım gösterebilmektedirler.

Malign tümörler içinde nadir bulunan hücre alt-popülasyonlarını tanımlayan KKH, tümör oluşumu için malign hücrenin kendisinden daha fazla potansiyele sahiptir ve tedaviden sonra da halen vücutta kalmış olan KKH mevcut ise tümörün yeniden büyümesi hızlanabilmektedir. Kemoterapi ve radyasyon tedavisi gibi birçok tedaviler tümör hücrelerini öldürerek, tümör kitlesini küçültebilmekte ancak dirençli KKH'lerini elimine edemediği için kanser tedavisinde kür başarılı olamamakta ve nüks oluşmaktadır. Nitekim, Tang DG ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalar, KKH'den zengin tümörlerin KKH bulunmayan tümörlere göre standart kanser tedavilerine daha dirençli olduğunu göstermiştir (Tang, DG., 2012; Sin, W.C., 2017; Toss, A., 2015).

Tümör büyümesini araştıran çalışmalarda tümör oluşumu ve büyümesi konusunda, evrim ve KKH teorisine dayanan modeller kullanılmaktadır. KKH'lerinin tümörü

başlatma ve sürdürme özelliğine sahip olduğu düşünülmektedir. Tümör oluşumunun temelinde KKH teorisi düşünüldüğünde, tümör cerrahisi yapıldıktan sonra geride kalan dokuda kanser kök hücrelerinin hala bulunması halinde tümörün yeniden başlaması mümkün olabilmektedir (Dick, JE.,2009).

KKH'lerin solid tümörlerde varlığına ilişkin olarak pek çok kanıt bulunmaktadır. Örneğin, insan meme kanseri hücrelerinden elde edilen CD44⁺/CD24⁻/CD133⁺ meme kanser kök hücrelerinin immunolojik olarak baskılanmış farelere enjeksiyonu sonucu tümör geliştiği gözlenmiştir (Al-Hajj, M., 2003). Meme kanseri dışında, prostat, kolon, karaciğer, akciğer kanserlerinde de bu kanser tiplerine özgün olan kanser kök hücrelerinin varlığı belirlenmiştir (Collins, AT., 2005; O'Brien, CA., 2007; Herman, PC., 2010).

2.4.2.Kanser Kök Hücrelerinin Tedaviye Direnci

KKH'leri, DNA hasarı sonrasında DNA'yı tamir edebilecek yeteneğe sahip olduğu için kemoterapi ve radyoterapi sonrasında oluşan hasarı da onarabilmektedirler. Ayrıca KKH'ler hücre ölümü mekanizmalarına ve özellikle de apoptoza karşı bir direnç oluşturmaktadırlar. Bu nedenle, eğer kanser dokusu mikroçevresinde yeterince KKH var ise, kanserin tedaviye direnç göstermesine sebep olmaktadır (Tanei, T., 2009).

Diğer taraftan, tümör mikroçevresinde WNT sinyal yolağının varlığı kanser kök hücrelerinin canlı kalmalarını sağlamaktadır (Sun, X., 2012). KKH'nin bulunduğu dokudan gelen büyüme sinyallerinin etkisi ile kök hücre büyümekte, çoğalmakta, kemoterapiye direnç gösterebilme özelliklerini kazanmakta ve yaşamını sürdürmesi mümkün olabilmektedir (Xiaoli, Z., 2020).

Zaten, kanser dokusunun uzak bir bölgeye yayılımını tanımlayan metastazın kanser kök hücreleri tarafından başlatıldığını gösteren kanıtlar da bulunmaktadır (Oskarsson, 2014; Baccelli, I., 2012; Li, W., 2017).

2.5. Kanser Kök Hücrelerinin Tümör Dokusundan İzolasyonu

Kök hücreler dört ana yöntem ile izole edilebilmektedir. En yaygın olarak kullanılan yöntem spesifik hücre yüzey biyobelirteçlerinin kombinasyonlarının kullanıldığı izolasyon yöntemidir. Diğer yöntemler, Hoechst 33342, ALDEFLUOR yöntemi ve mamosfer formasyonu oluşturularak yapılan izolasyon yöntemleridir (Luo, H.,2014).

Kök hücre farklılaşması aşamasında retinolün retinoik aside indirgenmesini sağlayan ve hücre içinde bulunan aldehitlerin yükseltgenme ve indirgemesinden sorumlu olan ALDH aktivitesine dayanan ALDEFLUOR testi tümör dokusundan KKH izole edilmesi için kullanılabilen bir biyokimyasal yöntemdir (Zhou, L., 2019).

Bir başka yöntem, ABC transportirlarının Hoechst 33342 adlı floresan boyayı, hücre dışına pompalaması prensibinden temel almaktadır. KKH'nin bu boyayı içine alma kapasitesi diğer hücrelerden düşüktür. Bu yöntemle, kanser hücre topluluğuna Hoechst 33342 boyası uygulanıp, boyayı hücre içine geçiremeyen hücreler akım sitometride izole edilmekte ve bu hücreler KKH olarak kabul edilmektedir (Boesch, M., 2016).

Bunlara ek olarak, küre (sphere) kültürü yöntemi de kök hücre izolasyonu veya ayrıştırılması için kullanılabilir. Bu teknik, kök hücrelerin, epidermal büyüme faktörü (EGF), insülin büyüme faktörü (IGF) ve fibroblast büyüme faktörü içeren (FGF) besiyeri ortamında hayatta kalmalarına olanak sağlayan bir tekniktir. Oluşmuş kürelerin spesifik kanser kök hücreleri bakımından zengin olduğu bildirilmektedir (Alison, MR., 2011).

Fluoresan aktif hücre ayırma (FACS) ile yapılan analizde, CD44⁺/CD24⁻ hücre fenotipine dayalı ayırma gibi yöntemler öne çıkmaktadır, bu özelliğe sahip hücreler kök hücreler olarak ayrılır. Kanser kök hücrelerinin genel hücre popülasyonunun yaklaşık %1-2'sini oluşturduğu ve yüksek tümör oluşturma kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir. CD44 ve CD24, kanser kök hücrelerinin tanımlanmasında en yaygın kullanılan yüzey belirteçleridir (Ricardo, S.; 2011; Mylona, E., 2008; Honeth, G., 2008).

Mamosferleri oluşturan hücrelerin CD44⁺, CD24⁻ yüzey belirteçlerine sahip olduğu ve tümör oluşturma yeteneklerinin yüksek olduğu gösterilmiştir.

Kanser kök hücreleri, bu KKH'lerine ilişkin kök hücre yüzey belirteçlerine spesifik olan antikolar ile işaretlenerek belirlenebildiği gibi sadece kök hücrelere özel olan yüzey belirteçleri sayesinde de tanınabilmektedir (Wu, CP.,2011). *Flow cytometry* (akım sitometrisi) yöntemi ile akan hücrelerin içerisinde bulunan işaretli hücrelerin lazer görüntüleyiciler ve impedans yöntemi ile tanınması ve ardından ayrılabilmesine olanak tanıyan sorting (sıralama) yöntemleri ile kanser hücre topluluğu içinde bulunan kanser kök hücreleri ayrıştırılabilmektedir (Villas, BH., 1998).

2.5.1. Meme Kanseri Kök Hücrelerinin Yüzey Belirteçleri Kullanılarak İzolasyonu

Kanser kök hücreleri, FACS ya da diğer immün ayırma yöntemleri ile CD133⁺, CD44⁺, CD24⁻, CD34⁺, CD29⁺, CD38⁻, CD166⁺, epithelial cell adhesion molecule (EpCAM), and Lin⁻ gibi çeşitli yüzey belirteçleri ile tanınabilirler.

Meme kanseri kök hücrelerinin tanımlanması için en yaygın kullanılan yüzey belirteçleri CD44, CD24, and ALDH1'dir. CD44⁺/CD24^{-/low} fenotip tümörün oluşmasından, ilerlemesinden, metastaz ve ilaç direncinden sorumlu tutulmaktadır (Charafe-Jauret, E., 2009; De Beça, F.F., 2013).

CD44; hücresel adezyon, proliferasyon, hücre yaşamı, diferansiyasyon gibi pek çok hücre fonksiyonunda yer alan bir yüzey transmembran glikoproteinidir. Meme kanseri kök hücrelerinin yüzeyinde bu siyaloprotein varlığı ve/veya ekspresyonu adezyon, proliferasyon ve metastaz özelliklerini arttırmaktadır (Van, P., 2011; Crabtree, JS., 2018).

Meme KKH'lerinin yüzeyinde CD24 proteininin olmaması ya da çok az olması bu kök hücrelerin önemli bir özelliğidir (Bensimon, J., 2012).

ALDH1 Aldehid dehidrogenaz ailesinin bir üyesidir ve kök hücre diferansiyasyonu ve proliferasyonunda rol oynamaktadır (Muzio, G., 2012).

CD133, meme KKH'lerinin ayırımında nadiren kullanılan, prominin-1 olarak da adlandırılan bir hücre yüzey glikoproteinidir. CD133, triple negatif olan, BRCA geni negatif olan mouse tümörlerinde bulunmuştur. CD133'ün aşırı ekspresyonu invazivlik ve kötü prognoz ile ilişkilidir (Liu, TJ.; 2013).

2.6. Meme Kanseri Hastalarında Nöropatik Ağrı Tedavisinde Pregabalin Kullanılması ve Pregabalinin Hücre Metabolizması Üzerine Etkisi Var mıdır?

Pregabalinin kanser ve kanser kök hücresi üzerine etkisi ile ilgili çok az sayıda araştırmaya rastlanmaktadır (Angus, J.,2021; Sivakumar, A., 2022; Wagener, N., 2022).

Özellikle kanser tedavisi yapılan hastalarda, kansere ya da kullanılan ilaçların yan etkilerine bağlı oluşan nöropatik etkilerin azaltılabilmesi için pregabalin, gabapentin

gibi ilaçlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu ilaçların nöropatik ağrıya klinik faydasını gözlemlemek yanısıra, iyi klinik uygulamalar için, hücre düzeyinde antikanser özelliğinin olup olmadığının belirlenmesi ve olası proliferatif ya da sitotoksik potansiyelinin tanımlanmasına gereksinim vardır. Gabapentinoid grubundan bir ilaç olan Pregabalinin kanser kök hücresi ve kanser hücrelerini ne yönde etkilediğinin araştırıldığı çalışmaların sonuçları, onkoloji, iç hastalıkları, yoğun bakım üniteleri ve cerrahi birimlerin multidisipliner çalışmalarında ilaç dozajının belirlenmesi için yardımcı olabilecektir.

Pregabalin ve kök hücre ile ilişkilendirilen çalışmalardan biri, 2021 yılında Angus ve arkadaşları tarafından multipl myelomlu hastalarda yapılmış olan kök hücre ve pregabalin ilişkisini inceleyen bir çalışmadır (Angus, J., 2021). Bu çalışma pregabalinin kanserin yol açtığı nöropatik ağrıda kullanımı ile kansere hücresel düzeyde etkilerini de konu alan sınırlı sayıdaki çalışmalara bir örnektir.

Ayrıca, 2022 yılında Sivakumar ve ekibi tarafından da benzer bir çalışma yapılmıştır (Sivakumar, A., 2022). Bu çalışmalarda bildirildiğine göre, otolog hemopoetik kök hücre transplantasyonu yapılacak multipl myelomlu hastalarda, kök hücre transplantasyonunun öncesinde yüksek doz melfelan rejimi ile tedavi uygulanmaktadır. Hastalığın etkisi ve tedavi ile birlikte gelişen nöropatik ağrının semptomlarının azaltılması için bu hastalara pregabalin ya da gabapentin verilebilmektedir. Bu araştırmalarda, multipl myelomlu hastalarda otolog ve allojenik kök hücre transplantasyonunda, Melfelanın myeloablative etkisi ve antitümoral etkisinin ancak yüksek dozlarda kullanıldığı zaman ortaya çıktığı, Melfelanın, iki alkil grubu içeren bir alkilleyici ajan olduğu, etkisini fenilalanin aminoasiti aracılığı ile L-tip aminoasit transporter 1 (LAT1) ve L-tip aminoasit transporter 2 (LAT2) sistemleri ile hücre içine taşınarak gösterdiği belirtilmiştir. LAT1'in karaciğer, kemik iliği, beyin, testis hücrelerinde fizyolojik olarak yer aldığı, tümör büyümesini ve beslenmesi için besin transportunu arttıracak şekilde malign hücrelerde de bulunduğu belirtilmiştir. Çeşitli tümör dokularında artan LAT1 ekspresyonları nedeni ile, tümör büyümesi, migrasyonu ve invazyonunda LAT1 aminotransportörlerinin rolünün düşünüldüğü vurgulanmıştır. Klinik önemi tam olarak açıklanamamakla birlikte fenilalanin derivativesi bir nitrojen mustard olan melfelan alkilleyici ajanının da bu transportörler aracılığı ile dokuya penetrasyonunun gerçekleştiği bildirilmiştir. İki ayrı çalışmada, Sivakumar A ve arkadaşları yanısıra Cumpston AJA ve ekibi de,

pregabalin ve gabapentinin moleküler yapısında dallanmış uçlarda bulunan aminoasit benzeri yapının, bu ilaçların aminoasit taşıyıcılarına bağlanmasına sebep olduğunu ve yüksek doz melfelan verilen hastalarda gabapentinoidlerin de aynı taşıyıcıları kullandıkları için melfelanın etkinliğini değiştirebileceğini hipotez olarak sunmuşlar, gabapentinoidlerin tedavi üzerine etkisini ve güvenliğini değerlendirmişlerdir. Her iki grup da çalışma yöntemini benzer olarak planlamış, sadece melfelan verdikleri bir hasta grubu ile melfelanla birlikte gabapentinoidleri kombine verdikleri diğer hasta grubu arasında, hastanede kalış süresi, nötrofil ve platelet engraftmanı yanısıra destekleyici ek tedavi ihtiyacı açısından bir fark bulmadıklarını belirtmişlerdir. Ek olarak gabapentin ya da pregabalin alan hasta grubunda yan etkilerden mukozit oluşumunun daha az olduğunu vurgulamışlardır. Belki de LAT1 ve LAT2 düzeylerinin multipl myelom hastalarında bir cevap olarak artmış bulunabileceği ve bu nedenle melfelanla yarışan pregabalin ve gabapentinlerin, melfelanın etkilerini engellemesine izin vermeyecek kadar çok LAT olduğunu yorumlamışlardır. Ancak moleküler temelde açıklama yapılarak giriş yapılan bu çalışmada, araştırmacılar gabapentinoidlerin tedaviye eklenmesi durumunda pregabalin etkisini sadece klinik olarak değerlendirmişlerdir (Sivakumar, A., 2022; Cumpston, A., 2021). Angus ayrıca, makalesinin tartışma bölümünde, gabapentinoidlerin farmakokinetiğinin de incelendiği ek çalışmalara ihtiyaç olduğunu belirtmiştir. Bu çalışmalarda gabapentinoidlerin hücre canlılığı ve proliferasyonu üzerine etkisi ile ilgili bir bölüm bulunmamaktadır.

Başka bir analjezik etkili madde olan opioidlerin, hücre proliferasyonu ve apoptozisi üzerine etkilerini inceleyen çalışmalar daha fazla sayıda olmakla birlikte, pregabalinin kanser hücre hattı üzerinde biyokimyasal etkilerini gösteren çalışmalar oldukça sınırlı bulunmaktadır. Szczepaniak ve arkadaşları tarafından 2020 yılında yayımlanan makalede, opioidlerin kolorektal kanser üzerinde progresyon, metastaz gelişimi yönünden hücresel etkileri değerlendirilmiştir (Szczepaniak, A., 2020). Xu ve arkadaşları, LoVo kolon kanser hattı hücrelerinin üzerine, kolon kanser cerrahisi sırasında sevofloranla birlikte opioid analjezi alan hasta serum örnekleri ile muamele etmişler ve hücre proliferasyonunun azaldığını görmüşlerdir (Xu, YJ., 2016). Çalışma gruplarının dizaynında, kolon kanser hastaları aldıkları anestezi tipine göre iki gruba ayrılmış, birinci grupta epidural anestezi ile propofol uygulanan hastalar ikinci grupta opioid analjezi ile birlikte sevofloranla genel anestezi yapılan hasta grupları

oluşturmuşlar ve ardından iki ayrı LoVo kolon kanser hücre hattına her iki hasta grubunun serum örneği ile muamele etmişlerdir. % 10 epidural anestezi alan hastaların serumu ile müdahale edilen hücre grubunda hücre proliferasyonunun anlamlı olarak azaldığı, aksine opioid analjezi ile birlikte genel anestezi alan grupta LoVo hücrelerinin apoptozisinin belirgin olarak azaldığı bildirilmiştir.

Kanser kök hücresi üzerine opioidlerin etkisini araştıran bu çalışmanın pregabalin maddesi kullanılarak yapılan bir benzeri yoktur, pregabalinin kanser hücreleri ve aynı zamanda kanser kök hücreleri üzerine uygulanması ile ilgili araştırmamız bu nedenle özgündür.

Tegeder ve arkadaşları morfinin hücre siklusu üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmalarında 10 µM morfin dozunun hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini bildirmişlerdir (Tegeder, I., 2003).

A549 kolon kanseri hücre hattı kullanılan bir çalışmada, Tian ve arkadaşları morfin ve oksikodonun morfine göre daha düşük dozda bile p53 ve Bax mRNA ekspresyonunu arttırarak, Bcl mRNA'yı ise azaltarak apoptozu indüklediğini belirtmişlerdir (Tian, M., 2016).

Çelik ve arkadaşları bir çalışmalarında, Fentanilin pankreatik kanser hücre proliferasyonu ve kanser kök hücre diferansiyasyonu üzerine etkilerini incelemiştir (Celik, F., 2019).

Özgürbüz ve arkadaşları tramadolun kanser kök hücresi üzerine etkilerini ve kolon kanseri hücre hattında oluşturduğu metabolik değişiklikleri incelemiştir. Bu çalışmada, Colo 320, Colo 741 ve HCT116 kolon kanseri hücre hattından kanser kök hücresi izolasyonu yapılmış ve tramadolün kanser hücresi ve kök hücresi üzerine sitotoksik etkisi araştırılmıştır (Özgürbüz, U., 2019).

2.7. Meme Kanseri Hücre Dizileri

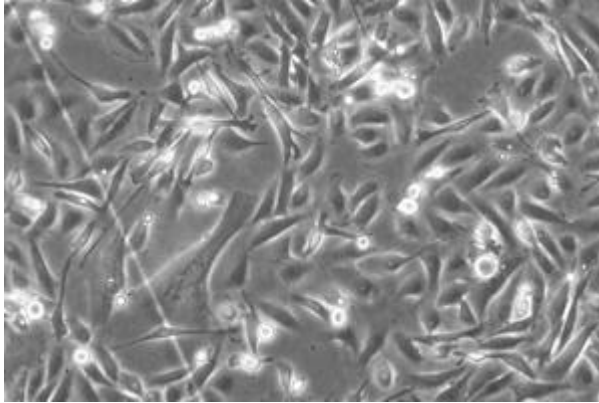
2.7.1. MDA-MB-231 Hücre Dizisi

Meme kanseri çalışmalarında yaygın olarak kullanılan MDA-MB-231 hücre hattı, 1973 yılında M.D. Anderson Kanser Merkezi'nde bir hastadan izole edilmiştir (Dohr, O., 1995). İnvaziv duktal karsinom modeli olarak kullanılmaktadır.

Bu hücrelerin, ER, PR, E-Kaderin yüzey belirteçleri negatiftir. Meme kanserinin bazal altgrubu ile ilgili bir fenotip göstermektedirler (Liu, H., 2003). Ki-67 proliferasyon belirtecinin düşük ekspresyonunu, ve CD44⁺CD24^{-low} fenotipi gibi meme kanseri kök hücreleriyle (CSC'ler) ilişkili özelliklerin ekspresyonunu sergilediği için klaudin-düşük moleküler alt tipine ait olduğu kabul edilmektedir (Holiday, DL., 2011; Harrell, JC., 2014).

Büyüme faktörü reseptörü HER2 negatif olduğu için triple negatif meme kanseri olarak değerlendirilir (Chavez, KJ., 2010). İnvaziv özellikleri yüksek, zayıf diferansiye ve tümörjenik özellikleri güçlü bir hücre dizisidir. Diğer invaziv kanser hücre hatlarına benzer şekilde, MDA-MB-231 hücrelerinin invazivliği, hücre dışı matriksin proteolitik bozunumu ile oluşmaktadır.

Üç boyutlu kültürde, hücre hattı endotel benzeri morfoloji gösterir, genellikle yıldız görünümünde çıkıntılara sahip invaziv fenotipi ile ayırt edilir (Şekil 2).



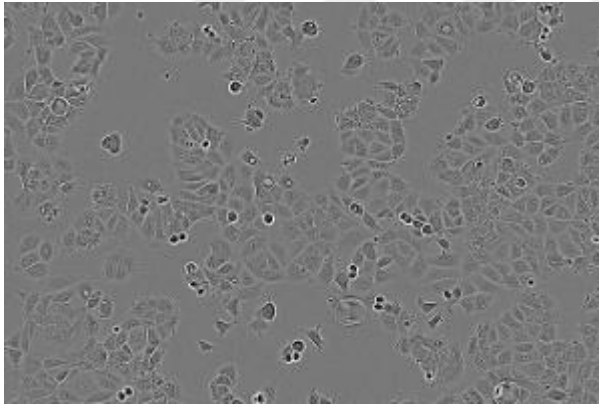
Şekil 2: MDA-MB-231 hücrelerinin kültüre edildikten 48 saat sonraki görüntüsü (ATCC).

2.7.2. MCF-7 Hücre Dizisi

MCF-7 hücre hattı, 1973 yılında Dr. Soule ve arkadaşları tarafından 69 yaşında, metastatik hastalığı olan bir kadın hastanın plevral efüzyonundan üretilmiştir (Soule, HD., 1973). Michigan Kanser Vakfı'nın (MCF) adını almıştır ve dünyada en çok çalışılan insan meme kanseri hücre dizisidir. MCF-7 (ATCC HTB-22) hücre hattından türetilmiştir.

MCF-7 luminal A epitel fenotipini gösteren (Done, SJ., 2011) meme kanseri hücrelerinin belirteçlerini ifade eden ve östrojen reseptörü (ER) pozitif tümörler için model olarak kullanılan bir hücre hattıdır. PR reseptörü de pozitifdir (Shirazi, FH., 2011). Bu hücreler, sitoplazmalarında östrojen reseptörleri aracılığıyla östradiolü (E₂) metabolize etme yeteneğine sahiptir. MCF-7 hücreleri, *WNT7B* onkogenini eksprese ederek hücrel farklılaşma ve büyüme süreçlerini düzenler. MCF-7 hücreleri hormon bağımlı tümör araştırmalarında model olarak kullanılır. MCF-7 agresif özelliği az olan bir tümör hücre dizisidir. Düşük metastatik potansiyeli vardır (Shirazi, FH., 2011). Migrasyon ve invazyon özellikleri düşüktür (Gest, C., 2013; Şerban, C., 2015).

MCF-7 dizilerinin östrojenlerle tedavisinde anti-apoptotik bir etki olduğu gösterilmiştir, tamoksifen gibi anti-östrojen kemoterapi ilaçları ile tedavi, çoğalmayı inhibe ederek ve apoptozu indükleyerek kültürlerin büyümesini azaltabilir. Bu hücre dizisi, 8-12 ay boyunca 1 µM 4-OH-tamoksifen ile sürekli kültüre edilerek tamoksifene dirençli bir hücre hattı elde edilmiştir (Prayogo, AA., 2020).



Şekil 3: MCF-7 hücrelerinin kültüre edildikten 48 saat sonraki görüntüsü (ATCC).

Gereç ve Yöntem

Bu araştırma Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Anabilim Dalı doktora programı bitirme tez projesi kapsamında *in vitro* bir çalışma olarak planlanmış ve laboratuvar çalışmaları Mayıs-Aralık 2024 tarihleri arasında yapılmıştır. Araştırmamızda, pregabalin etken maddesinin kanser hücresi ve kanser kök hücresi üzerine metabolik etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Örneklem grubunu, meme kanser hücreleri ve meme kanseri kök hücrelerinin oluşturması planlanmıştır.

Araştırmamızda uygulanan etken maddenin farklı konsantrasyonları bağımsız değişkenleri, bu ilaçlara hücre kültür ortamında verilen yanıtlar ise bağımlı değişkenleri oluşturmuştur.

Araştırma boyunca öncelikle kapsamlı bir literatür taraması yapılmış, kanser hücreleri ve kök hücreleri ile ilgili çalışmalar taranmış, güncel çalışmalar incelenmiş ve pregabalin etken maddesinin bu hücreler üzerindeki etkileri ile ilgili konularda literatüre katkıda bulunabilmek amacı ile çalışmamızın hipotezi oluşturulmuştur.

3.1. Araştırmamızın Kısıtlamaları

Çalışmamız boyunca karşılaştığımız kısıtlamaların başında kanser kök hücresinin elde edilmesindeki zorluk yer almıştır. Mevcut kanser kök hücre hatlarının yurt dışından getirilmesi sırasında transfer sürecinde yaşanacak olan gecikmeler ve bu süreçte soğuk zincir koşullarının bozulması nedeni ile hazır ticari kanser kök hücre hatlarının elde edilmesi mümkün olmamıştır. Elimizde bulunan meme kanseri hücre hatlarından kanser kök hücresi elde edilmesi yolu ile çalışmamıza devam edilmiş ve bu doğrultuda kanser hücre hattından kanser kök hücresi elde edebilmek için gerekli laboratuvar malzemelerinin satın alınması yapılarak çalışma sürdürülmüştür.

3.2.Çalışma Tasarımı

Hücre kültürü çalışmaları, hücrelerin hayatta kalması ve çoğalması için gerekli besin maddeleri ile optimal çevresel koşulların sağlanmasını içeren bir süreçtir. Yöntemde yer alan tüm deneylerin insan meme kanser hücreleri ve meme kanser kök hücreleri (MKKH) ile yapılması planlanmıştır.

Bu çalışmada, insan meme kanseri hücre hatları MDA-MB-231 (ATCC, HTB-26) ve MCF7 (ATCC, HTB-22) kullanılmıştır. MDA-MB-231 (ATCC, HTB-26) hücreleri İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinin, MCF7 (ATCC, HTB-22) hücreleri, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinin bağışı yolu ile temin edilmiştir.

Hücre hatlarının kültür işlemleri laminar hava akımlı sınıf II steril hücre kültürü kabininde, steril sarf malzemeler ve kitler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin canlılıklarının devamı ve çoğalmaları için ihtiyaç duyulan besinler ve en uygun ortam koşulları sağlanmıştır.

MCF-7 hücre hattının kültürü için *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12* (DMEM/F12), MDA-MB-231 hücre hattı için ise *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) ve *Dulbecco's Modified Eagle MediumHigh Glucose* (DMEM HG) besiyeri kullanılmıştır. Hücreler, deneylerde kullanılacak uygun hücre yoğunluğuna ulaşana kadar %95 nem ve %5 CO₂ içeren, 37°C sıcaklıktaki inkübatörde, steril şartlar altında, 25 cm² ve 75 cm²'lik kültür flasklarında çoğaltılmıştır.

Deney süresince hücrelerin morfolojileri ve çoğalma durumları *inverted* mikroskop kullanılarak düzenli olarak izlenmiştir. Besiyeri değişimi, hücre pasajlama ve dondurma süreçleri, aseptik teknikler ve steril sarf malzemeler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Meme kanser hücrelerinden meme kanser kök hücreleri FACS ile elde edilmiştir. Meme KH ve KKH'lerine farklı konsantrasyonlarda (0.3, 1, 3, 10 ve 30 µM) pregabalin uygulanırken, ilaç verilmeyen kontrol grupları yanısıra, sitotoksik etkili siklofosfamid ilacı uygulanan pozitif kontrol grupları da oluşturulmuştur.

Sitotoksik/proliferatif etkilerin belirlenmesi için MTT, migrasyon/motilite özelliğinin değerlendirilmesi için WH (Wound Healing) testleri, canlılık/apoptoz durumunu gözlemlemek için ANNEXIN-V/PI testi yapılarak pregabalinin MCF-7 ve MDA-MB 231 KH ve KKH üzerindeki etkileri belirlenmiştir.

Projenin laboratuvar çalışmaları, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Eğitim laboratuvarında (AREL), Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında, İzmir Biyoteknoloji ve Genom Enstitüsü (IBG) Akım Sitometri laboratuvarında yapılmıştır.



3.3. Kullanılan kitler, cihazlar, sarf malzemeleri ve kimyasallar

3.3.1. Kimyasal ve Cihazlar

Araştırmamız sürecinde kullanılan kimyasal maddelerin, cihazların ve sarf malzemelerin listesi aşağıdaki tablolarda verilmiştir (Tablo 1, 2, 3).

Tablo 1: Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler

Kitin ismi		Üretim firma ve Katalog numarası
1	<i>MTT kit (MTT Cell Based Proliferation Toxicity assay kit)</i>	Fine test (lot no:K017), (Wuhan Fine Biotech Co., Çin)
2	<i>Annexin V-FITC/PI Apoptosis kit</i>	Fine Test (lot no: K019) (Wuhan Fine Biotech Co., Çin)
3	<i>Allophycocyanin (APC) Anti-human CD133 antibody (CD133 APC antikor)</i>	Elabscience (W6B3C1), (ABD)
4	<i>Phycoerythrin (PE) Anti-human CD24 antibody</i>	Elabscience (ML5), (ABD)
5	<i>Fluorescein isothiocyanate (FITC) Anti-human CD44 Antibody</i>	BD (Becton Dickinson, ABD)
6	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)</i>	Gibco (UK)
7	<i>Dulbecco's Modified Eagle MediumHigh Glucose (DMEM HG)</i>	Gibco (UK)
8	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12)</i>	Gibco, (lot no: 2558268) (UK)
9	<i>Phosphate Buffer Saline (PBS)</i>	Sigma Aldrich (ABD)
10	<i>Dimetil Sülfoksit (DMSO)</i>	Extra püre Merck (Almanya)
11	<i>Fetal Bovine Serum (Fetal Sığır Serumı, FBS)</i>	Biowest, (lot no: S1810), (ABD)
12	<i>L-Glutamine (L-Glutamin)</i>	Thermo Fischer Scientific (lot no: SH3003401), (ABD)
13	<i>Penicillin-Streptomycin (P/S)</i>	Merck Millipore (Almanya)
14	<i>Trypsin EDTA (Trypsin EDTA)</i>	ThermoFischer Scientific (ABD)
15	<i>Trypan Blue (Tripan mavisi)</i>	ThermoFischer Scientific (ABD)
16	<i>Pregabalin</i>	Sigma Aldrich

Tablo 2: Çalışmada Kullanılan Cihazlar

1	Laminer akımlı hücre kültürü kabini	Thermo Scientific
2	<i>Fluorescence-activated cell sorting (FACS)</i>	BD FACS Aria III, Becton Dickinson, ABD
3	Akış Sitometre Cihazı	Accuri C6, Becton Dickinson
4	%5 Karbondioksit İnkübatörü	Thermo Scientific
5	Soğutmalı Santrifüj,	Hettich
6	İnverted Mikroskop,	Shimadzu UV-1208
7	Plak Okuyucu	Thermo multiscan spektrum
8	Su Banyosu	Nüve BM 402
9	Vorteks	Dragonlab
10	Etüv	Heraeus, Germany
11	-80 °C derin dondurucu,	Thermo Scientific, ABD
12	Çift Kapılı Buzdolabı	Regal
13	Mikrosantrifuj	Eppendorf
14	Orbital Shaker,	Eppendorf Mixmate
15	Dijital Hassas Terazî	Sartorius
16	Neubauer sayma lamı	Isolab

Tablo 3: Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeleri

	Sarf Malzeme Adı
1	Pudrasız eldiven
2	Kurutma kağıdı
3	Cam malzemeler (Beher, Erlenmayer, Mezür)
4	Eppendorf tüp (1,5 mL)
5	Otomatik pipet 10-20 µL
6	Otomatik pipet 10-200 µL
7	Otomatik pipet 200-1000 µL
8	Steril mikro pipet uçları (10 µL)
9	Steril mikro pipet uçları (100 µL)
10	Steril mikro pipet uçları (1000 µL)
11	Seroloji pipetleri (2mL)
12	Seroloji pipetleri (5 mL)
13	Seroloji pipetleri (10 mL)
14	Seroloji pipetleri (25 mL)
15	96 well plate (96 Kuyucuklu Plak)
16	25 ml hücre kültür flaskı
17	75 ml hücre kültür flaskı
18	6 well plate (6 Kuyucuklu Plak)
19	12 well plate (12 Kuyucuklu Plak)
20	15 ml Falkon santrifüj tüpü
21	50 ml Falkon tüp
22	2 ml Kriyovialler (Cryogenic Vials)
23	Distile su
24	%70'lik alkol

3.4.Hücre Hatlarının Temin Edilmesi ve Çoğaltılması

3.4.1. Hücre Kültürü

Çalışmada kullanılan insan meme kanseri hücre hatları, *American Type Culture Collection* (Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (ATCC))’dan temin edilen, MCF-7 (ATCC®-HTB-22™) ve MDA-MB-231 (ATCC®-HTB-26™)’dır.

Tüm hücreler, MCF7 hücreleri için DMEM-F12 ve MDA-MB-231 hücreleri için DMEM HG besiyeri kullanılarak, %10 FBS, %1 l-Glutamin ve %1 P/S (Penisilin-Streptomisin) ile hazırlanan hücre kültür ortamında, 37°C’de %95 nem ve %5 CO₂’li inkübatörde inkübe edilmiştir.

3.4.2. Donmuş Hücrelerin Açılması

%10 konsantrasyondaki DMSO ile dondurulmuş olan hücreler hızlı bir şekilde çözündürülmüştür. Bu işlem için hücreler önce -80°C’den 37°C’ye alınmıştır. 5 mL besiyeri bulunan falkon tüpün içerisine 1 mL hücre eklenmiştir. 1200 rpm’de 7 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı uzaklaştırılıp, 2 mL besiyeri ile pelet homojenize edilmiştir. Daha sonra hücreler flaska alınarak inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler %80-90 oranında çoğalınca kadar iki günde bir besiyeri değiştirilerek çoğaltılmıştır. Flask yüzeyidolduğunda hücrelerin canlılığını korumak amacı ile pasajlama işlemi yapılmıştır.

3.4.3. Hücrelerin Pasajlama İşlemi

%80-90 yoğunluğa (konfluens) ulaşan hücrelerin pasajlama işlemi için eski besiyeri uzaklaştırılarak PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. Flask yüzeyine yapışarak çoğalan adherenthücrelerin, yapıştıkları yüzeyden kaldırılması amacı ile, flaska 1-2 mL Tripsin-EDTA enzimi eklenerek 3-4 dakika 37°C’de ve %5 CO₂’li, nemli inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında hücrelerin inverted mikroskopta yüzeyden kalktığı gözlemlenip, flaska tripsin-EDTA miktarının yaklaşık iki katı miktardaFBS’li besiyeri eklenerek, flaskın tüm içeriği 15 mL’lik falkon tüpe

alınmıştır. Falcon tüpde bulunan hücreler, 1200 rpm’de 7 dakika santrifüj edildikten sonra, tüp içerisindeki süpernatant dikkatlice uzaklaştırılıp, pelet üzerine uygun miktarda besiyeri eklenerek homojenize edilmiştir.

Hücre sayımı yapıldıktan sonra, hücrenin miktarına göre flasklara hücre ekimi yapıp, çoğalmaları için 37°C’de %95 nem ve %5 CO₂’li inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır.

3.4.4. Hücre Kültürü Besi Ortamlarının Hazırlanması

MCF-7 hücre hattı için DMEM F12 besiyeri, MDA-MB-231 hücre hattı için DMEM High Glucose (DMEM HG) besiyeri kullanılmıştır.

Tablo 4: MCF-7 Meme Kanseri Hücre Hattı ve MCF-7 meme kanser hücrelerinden elde edilen CD44⁺/CD24⁻/CD133⁻ meme KKH ile yapılan çalışmalar için kullanılan hücre besiyeri ortamının bileşenleri

Kullanılan Solüsyonlar		Hücre Kültür Ortamı İçeriğinde Bulunan Maddelerin Oranları	500 mL Toplam Hacim
1	DMEM F12	%88	440 mL
2	FBS	% 10	50 mL
3	L-Glutamin	% 1	5 mL
4	P/S	% 1	5 mL

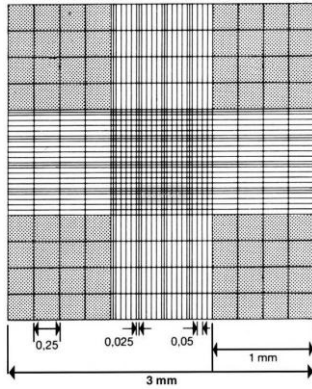
Tablo 5: MDA-MB231 Meme Kanseri Hücre Hattı ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinden elde edilen CD44⁺/CD24⁻/CD133⁻ meme KKH ile yapılan çalışmalar için kullanılan hücre besiyeri ortamının bileşenleri

Kullanılan Solüsyonlar		Hücre Kültür Ortamı İçeriğinde Bulunan Maddelerin Oranları	500 mL Toplam Hacim
1	DMEM HG	%88	440 mL
2	FBS	% 10	50 mL
3	L-Glutamin	% 1	5 mL
4	P/S	% 1	5 mL

3.4.5. Hücrelerin Canlılığının Belirlenmesi

Kültüre edilen hücrelerin canlılığını belirleme ve hücreleri sayma amacıyla tripan mavisi boyası kullanılmıştır. 50 µL süspanse hücre ile 50 µL tripan mavisi boyası karıştırılarak Neubauer lamına aktarılmıştır. 4x4'lük lam ışık mikroskobu altında incelenerek hücre sayımı ve canlılık tespiti yapılmıştır.

Canlı hücreler sağlam hücre zarlarına sahiptir ve tripan mavisini almazlar, hemositometrede parlak/berrak görünürler. Ölü hücrelerin hücre zarları hasarlıdır ve tripan mavisini alırlar, hemositometrede mavi görünürler (Tokur, O., 2017). Boyayı içine alarak mavi renkte görülen hücreler ölü hücreler, boyayı içine almayan renksiz hücreler ise canlı olarak sayılmıştır. Canlı hücre sayısı 2×10^4 ile çarpılarak mililitredeki toplam canlı hücre sayısı bulunmuştur.



Şekil 4: Hücre sayımı için kullanılan Neubauer lamı

3.5. Kanser Hücre Hattından Kanser Kök Hücre Elde Edilmesi

Kök hücrelerin elde edilebilmesi için, Floresanla Aktive Hücre Ayırma (*Fluorescence-activated cell sorting (FACS)*) yöntemi kullanılmıştır.

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları yeterli miktarda çoğaltıldıktan sonra FACS yöntemiyle CD44, CD24, CD133 hücre yüzey belirteçlerine karşı işaretleyici antikolar kullanılarak, kanser kök hücrelerinin izolasyonu BD FACS Aria III akım sitometri cihazı ile (Becton Dickinson, ABD), Dokuz Eylül Üniversitesi İzmir Biyotıp ve Genom Enstitüsünde (IBG) hizmet satın alınımı yoluyla yapılmıştır.

Akım sitometri ile hücre sayımı ardından sorting ile $CD44^+/CD24^-/CD133^{+/-}$ meme kanseri kök hücrelerinin ayırımı ve toplanması için, FITC (*Fluorescein isothiocyanate*) ile işaretlenmiş Anti-human CD44 antikor, PE (*Phycoerythrin*) ile

işaretlenmiş Anti-human CD24 antikor ve APC (*Allophycocyanin*) ile işaretlenmiş Anti-human CD133 antikor kullanılmıştır.

3.5.1. Hücrelerin FACS Analizi İçin Hazırlanması

Meme kanseri hücre hattı MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri 37 °C’de %5 CO₂’li inkübatörde bulunan flasklardan toplandı, Neubauer hücre sayma lamı kullanılarak hücre sayımı yapıldı. MCF-7 meme kanseri hücreleri 1 mL hücre kültürü besi ortamında 2.4×10^7 hücre, MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri, 1 mL hücre kültürü besi ortamında 1.8×10^7 hücre olacak şekilde eppendorf tüplerine alındı. FACS ile kanser kök hücreleri (KKH)’ni tanımlama ve ayırma (*sorting*) işlemi uygulamak üzere hücreler hemen soğuk zincir koşullarında IBG akım sitometre laboratuvarına götürüldü.

Hücrelerin hazırlanması:

- 1) Eppendorflarda bulunan MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinin dörtte biri boyama yapılmadan ayrıldı, bu hücreler ile akım sitometre cihazında boyasız (*unstaining*) görüntü alındı.
- 2) Kalan hücreler polistren akım sitometri tüplerine alındı ve tüp içerisine CD44 FITC, CD24 PE, CD133 APC ve DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) antikorları herbirden 2.5 mikrolitre olmak üzere eklendi. Boyalı antikorlar ve hücreler 15 dakika inkübe edildi.
- 3) İnkübasyon süresi sonunda hücreler akım sitometre cihazı ile sayıma alındı.
- 4) Hücre sayım işleminin ardından önce canlı hücreler tanımlandı. Akım sitometri görüntüsü alındı. Ardından CD24 PE negatif hücre alanı seçilerek kapılama (*gating*) yapıldı.
- 5) CD24 negatif hücrelerin olduğu alanda CD44 pozitif ve CD133 pozitif/negatif hücreler değerlendirildi. Akım sitometri görüntüleri alındı.
- 6) Ardından sorting işlemi başlatılarak, CD44 pozitif, CD24 negatif olan hücreler sorting ile hücre ayırma tüpüne toplandı. İzole edilen kanser kök hücreleri içlerinde yeterli miktarda besiyeri bulunan steril falkon tüplere alındı.
- 7) Toplanan meme kanseri kök hücreleri soğuk zincir koşullarını koruyarak Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi AREL hücre kültür laboratuvarına getirildi. Falkon tüplerinde bulunan hücreler hızlı bir şekilde, steril hücre kültürü kaplarına ekildi

ve ardından hücrelerin canlılığını koruyabilmesi ve çoğalabilmesi için 37 °C’de %5 CO₂’li, nemli inkübatör ortamına alındı.

3.6. Uygulanacak Olan Etken Maddelerin Hazırlanması

Bu çalışmada, gabapentin grubu ilaçlar başlığı altında yer alan Pregabalin etken maddeli ilaç kullanılmıştır. Pregabalin, saf madde olarak 100 µg/mL konsantrasyonda toplam hacim 1 mL olmak üzere Ankara Rotakim Analiz Hizmetleri firmasından hibe yolu ile temin edilmiştir.

Bu araştırma için meme kanseri hücreleri üzerine sitotoksik etkisi bilinen, Siklofosfamid etken madde içeren, terminolojik olarak sıklıkla piyasada bulunan adı ile kullanılan Endoxan adlı kemoterapi ilacı, İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kemoterapi biriminden temin edilmiştir. Günlük olarak hastaların tedavileri için hazırlanıp, kullanılmayıp arta kalan ilaçlar arasından 20 mg/mL konsantrasyonlu toplam 3 mL Endoxan (Siklofosfamid), bedelsiz olarak hibe yolu ile alınmıştır.

Tüm ilaçlar soğuk zincir koşullarında deney laboratuvarımıza ulaştırılmıştır.

Pregabalin ve Siklofosfamid etken maddesinin elimizde bulunan stok konsantrasyonları, ilacın uygulanacağı meme kanseri hücre tipine göre, MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri ve bu hücrelerden elde edilen meme kanseri kök hücreleri (meme KKH) için kullanılmak üzere DMEM HG ile hazırlanan kültür besin ortamındaseyreltilerek, MCF-7 ve bu hücrelerden elde edilen meme KKH için kullanılmak üzere DMEM F12 besin ortamında seyreltilerek, 30, 10, 3, 1, 0.3 mikromolar (µM) konsantrasyonlarda, steril ortamda, steril falkon tüpler kullanılarak hazırlanmıştır.

Tablo 6: Analizler için kullanılan etken maddelerin, molarite hesaplamaları

Etken Madde Adı	Stok konsantrasyon	Maddenin Molekül Ağırlığı	Stok
			Konsantrasyonun Molarite hesabı (Mikromolar)
PREGABALİN	100 µg/mL	159 gram	630.0
SİKLOFOSFAMİD (ENDOXAN)	20 mg/mL	279.1 gram	71.684

3.7. Sitotoksosite-Hücre Proliferasyon Testleri

MDA-MB-231 meme kanser hücreleri ve bu hücrelerden elde edilen MDA-MB-231 meme KKH, MCF-7 meme kanseri hücreleri ve bu hücrelerden elde edilen MCF-7 meme KKH ile çalışılmış ve sitotoksosite/proliferasyon testi için MTT kit (*MTT Cell Based Proliferation Toxicity assay kit, Fine test, Çin*) kullanılmıştır.

MTT testini uygulayabilmek üzere tüm hücre gruplarının 96 kuyucuklu plaklara ekilme işlemi yapılmıştır. Her hücre grubu için, ayrı ayrı olmak üzere 24, 48 ve 72 saatlik izlem plakları kit protokolüne uygun bir şekilde hazırlanmıştır.

Bunun için, hücre kültür flasklarında bulunan hücreler toplanmış, PBS ile yıkanmış, santrüfj edilmiş ve hücre peleti elde edilmiştir.

Pelette bulunan toplam hücre sayısı hesaplandıktan sonra, hücreler 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlar için 96 kuyucuklu plaklara alınmıştır. Her kuyucuğa ortalama 0.5×10^4 hücre 100 µL besiyeri içerisinde ekilmiştir. 96 kuyucuklu deney plaklarına ekilen tüm hücre grupları 24 saat ara ile inverted mikroskop altında kontrol edilmiş ve plak tabanına yapışmaları beklenmiştir. 48 saat sonra hücrelerin plak tabanına yapıştıkları ve her bir kuyucuktaki hücre sayısının eşit dağılmış olarak çoğalmış olduğu görülerek, Pregabalin ve Siklofosfamid (Endoxan) etken maddesinin uygulaması yapılmıştır.

Pregabalin ve Siklofosfamid etken maddesinin 0.3, 1, 3, 10, 30 µM konsantrasyonda hazırlanmış beş farklı konsantrasyonu, her kuyucuğa 100 µL ilaç verilecek şekilde, üçer kez tekrarlı olmak üzere 96 kuyucuklu plaklara ekilmiştir. Bazı kuyucuklara hiç ilaç uygulaması yapılmadan sadece hücre ekilerek kontrol grubu oluşturulmuştur. Sadece ortam ekilen kuyucuklardan alınan OD değerleri de kör OD değerleri olarak göz önünde bulundurulmuştur (Barltrop, J.A., 1991; Terzioğlu, G., 2013).

MTT Test Prensibi

Hücre proliferasyonu testi için kolorimetrik bir ölçüme dayanan bu testin prensibi; suda çözünemeyen [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum'un (MTS), fenazin metosülfat (PMS) varlığında hücre içi dehidrogenazlar tarafından suda çözünebilir bir madde olan formazana dönüştürülmesi ve oluşan formazan ürününün 570 nm absorban değerinde ölçülmesine dayanmaktadır.

Canlı hücreler dehidrogenaz enzimini içerir ve böylece [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum ile muamele edilen canlı hücrelerde Formazan oluşur.

MTT testinin sonucunda ölçülen absorbans düzeyi hücre canlılığı ile koreledir (Barltrop, J.A.,1991).

3.7.1 Hücre Canlılığı ve EC50 Değerlerinin Belirlenmesi

İnkübasyon sonrasında, 24., 48. ve 72. saatlerde, ilaçların EC50 (*Half maximal effectif concentration*) değerini belirlemek üzere sitotoksosite/proliferasyon deneyleri yapılmış ve tüm plaklardaki reaksiyonlar, absorbans değerleri (Optik dansite, OD) ölçülerek değerlendirilmiştir.

Bu analizler için önce plakta bulunan kuyucuktaki ortam aspire edilip üzerine 100 µL MTT reaktifi eklenmiştir. 4 saat boyunca 37 °C’de %5 CO₂’li inkübatörde inkübe edildikten sonra, MTT reaktifi uygulanan hücreler üzerine formazan çözücü solüsyon (formazan dissolving solution), her kuyucuğa 100 µL olmak üzere eklenmiştir. Kit prospektüsünde belirtildiği şekilde formazan çözücü solüsyon uygulaması sonrası plaklar 3 saat inkübasyona alınmıştır. İnkübasyon öncesi tüm plakların çalkalayıcıda (shaker) 5 dakika tutulması ile tüm kuyucuklarda bulunan formazan çöktülerine formazan çözücü solüsyonun karışması ve homojenizasyonu sağlanmıştır.

Süre tamamlandığında plaklarda bulunan tüm kuyucuklardaki hücrelerin verdiği reaksiyonlar, ELISA okuma cihazı (Thermo multiscan spectrum, ABD) ile 570 nm ana dalga boyunda OD değeri belirlenerek değerlendirilmiştir.

EC50 Değerinin Belirlenmesi:

Etken maddenin uygulanan tüm konsantrasyonları için 48. saatte verdiği MTT test yanıtları optik dansite olarak kaydedilmiş ve kontrol grubunun verdiği yanıtı göre yüzdelik etkisi hesaplanmıştır. Hesaplamalarda, ilaç konsantrasyonlarının logaritmik değerleri kullanılmıştır. GraphPad Prism 8 programı ile EC50 ve pD2 değerleri belirlenmiştir.

İstatistiksel Değerlendirme:

Kuyucuklarda bulunan tüm OD değerleri, ortalamaları, tekrarlanabilirlikleri, GraphPad Prism 8 (ABD) programı ile değerlendirilmiştir.

3.8. Hücre Motilitesi, Migrasyon Deneyi (Wound Healing, WH, Yara İyileşmesi Testi)

Hücre hareketliliğini (motilite) ve göçünü (migrasyon) değerlendirmek amacıyla *in vitro* WH testi uygulanmıştır.

6 kuyucuklu plakta çizilerek açılan boşluğun (yaranın) kapanma derecesi hücrelerin motilitesini ve migrasyon yeteneğini belirler ve böylece bir yandan invazyon ve metastaz kapasitesini yansıtırken, bir yandan da hücre sayısı artışını ya da proliferasyonu belirlemede yardımcı olur.

Bu test için, 6 kuyucuklu hücre kültürü plakları kullanılmış, MCF-7, MDA-MB-231 hücre hatları ve MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinden elde edilen meme KKH, hücre motilitesi ve migrasyonu açısından analiz edilmiştir.

Her kuyucuktaki hücre sayısı 1.5×10^5 olacak şekilde, hücreler 2 mL besiyeri içerisinde kuyucuklara eklenmiştir. Beş farklı konsantrasyonda 0.3, 1, 3, 10, 30 μ M pregabalin ve siklofosamid (endoxan) ve ilaçsız kontrol grubunun ekilebilmesi için yeterli sayıda hücre toplanmış ve ilaçların farklı her konsantrasyonu bir kuyucuğa eklenecek şekilde her hücre tipi için 2'şer adet 6 kuyucuklu plak kullanılmıştır.

Hücrelerin plak tabanına yapışması ve çoğalıp plağı kaplamaları için 48 saat süre bekledikten sonra, 200 μ L'lik steril pipet uçları kullanılarak plak tabanları çizilmiş ve böylece yapay bir yara alanı oluşturulmuştur. Plaktan çizik nedeniyle kalkan hücreler PBS ile yıkanarak uzaklaştırılıp üzerine 2 mL taze besiyeri eklenerek sıfırıncı dakika fotoğrafları alınmıştır. Ardından, hücrelerin üzerine besi ortamı ile seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda (0.3, 1, 3, 10, 30 μ M) hazırlanmış olan pregabalin ve siklofosamid (Endoxan) solusyonlarından 500 μ L eklenmiştir. 6 kuyucuklu her plaktaki bir kuyucukta bulunan hücrelerin üzerine çizik oluşturulduktan sonra hiç ilaç eklenmemiştir ve bu hücreler kontrol grubu olarak etiketlenmiştir.

Oluşturulan yara alanları 0. 24. 48. ve 72. saatlerde inverted mikroskop kullanılarak görüntülenmiş ve görüntü analizleri için fotoğrafları çekilmiştir. Hücre motilitesi ve migrasyonu, bu belirli zaman noktalarında plakları kaplayan adhesif hücreler üzerinde oluşturulan çizginin kenarlarından hücrelerin göç ettiği mesafeler ölçülerek ve açıklığı (yarayı) kapatan hücre sayısı da gözlenerek değerlendirilmiştir.

3.9. Apoptozis ve Hücre Nekrozu Belirleme Testi

3.9.1. Annexin V-FITC/PI Apoptosis-Nekroz Testinin Çalışma Prensibi

Annexin V, fosfatidil serine yüksek afinitesi olan ve kalsiyuma bağımlı olarak fosfatidil serini bağlayan bir proteindir. Erken apoptotik hücrelerde fosfatidil serin hücre membranının dışına doğru çıkar ve ortamda Annexin bulunması durumunda Annexin membranın dış kısmına çıkmış olan fosfatidil serine bağlanır. FITC ile işaretli Annexinin fosfatidil serine bağlanarak ışıma vermesi akım sitometre ya da floresan mikroskop ile belirlenir.

Propidium iodide (PI) özgün bir şekilde çift sarmallı DNA'ya bağlanabilme yeteneğine sahiptir. Sağlıklı hücrelerde, PI hücre membranını geçerek çift sarmallı DNA'ya ulaşamamaktadır ancak hücre membran bütünlüğünün bozulduğu geç apoptoz ya da hücre nekrozu olduğu durumlarda, PI hızlıca hücrenin DNA'sını boyamak üzere hücre içine girebilmektedir. PI'nın, Annexin V ile birlikte kullanıldığı deneylerde, apoptozun farklı aşamalarında bulunan hücreler tanımlanabilmektedir (Tablo 7).

Tablo 7: Annexin V-FITC /PI Testi Sonuçlarını Değerlendirme Kriterleri

Annexin V-FITC (-)	PI (-)	Canlı Hücreler
Annexin V-FITC (+)	PI (-)	Erken Apoptotik Hücreler
Annexin V-FITC (+)	PI (+)	Geç Apoptotik Hücreler
Annexin V-FITC (-)	PI (+)	Nekrotik Hücreler

3.9.2. Annexin V-FITC/PI Apoptosis-Nekroz Testinin Uygulama Aşamaları

Apoptozis ve hücre nekrozu analizi için, kit içeriğinde Annexin V-FITC, Propidium İodide (PI), 1x *binding buffer* bulunan, Annexin V-FITC/PI Apoptosis kiti (Fine Test, katalog no: K019, Çin) kullanılmıştır.

Annexin testi için hücre kültür plaklarından toplanan tüm hücre tipleri Neubauer sayma lamı ile sayılmıştır.

MDA-MB-231, MCF-7 meme kanseri hücreleri ve bunlardan elde edilen meme kanseri kök hücreleri, her kuyucuğa 0.3×10^6 hücre olacak şekilde 3 mL besin ortamı

içinde 6 kuyucuklu plaklara (6 well plate) ekilmiş ve hücrelerin plak tabanına yapışabilmesi için plaklar 37°C’de %5 CO₂’li inkübatöre alınmıştır. 48 saat sonra hücrelerin plak tabanına yapıştığı ve %80 oranında yeterli konfluense ulaştığı görülmüştür. Tüm kuyucuklarda hücre yoğunluğu dağılımının aynı olduğu mikroskopla gözlemlenerek onaylanmıştır.

Ardından hücrelerin üzerine Pregabalin ve Siklofosfamid (Endoxan) etken maddeleri 30 µM, 500 µL eklenmiştir. Bir kuyucukta bulunan hücrelerin üzerine hiç bir ilaç eklenmemiş ve besi ortamı ve kontrol grubu olarak etiketlenmiştir (her bir plakta bir kuyucuk, kontrol grubu olarak belirlenmiştir).

İlaç ile hücrelerin 48 saat inkübasyonu sonrasında, 6 kuyucuklu plaklarda bulunan tüm hücre grupları, *Trypsin EDTA* ile tripsinize edilerek plak tabanından ayrılmış ve besiyeri ile birlikte 15 mL’lik falkon tüplerine aktarılmıştır. 300 rpm’de 5 dakika santrifüj işlemi yapıldıktan sonra süpernatant atılmış ve pelette bulunan hücreler 1000 µL PBS ile nazik bir şekilde dikkatlice pipetaj yapılarak çözülmüş ve süspanse edilmiştir. Homojen bir süspansiyon elde edildikten sonra hücre-PBS süspansiyonu içindeki hücreler dikkatlice eppendorf tüplerine aktarılmıştır.

İlaç etken maddesi içeren deney grupları 1000 µL PBS ile eppendorf tüplere aktarılırken kontrol grubu hücreleri 2 ayrı eppendorf tüpüne bölünmüştür.

Tüm eppendorflar bir kez daha 300 rpm’de 5 dakika santrifüje alınmıştır. Santrifüj işlemi sonrası pelet üzerinde bulunan süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır. Eppendorflardaki tüm örneklerin üzerine kit içeriğinde bulunan 500 µL binding buffer eklenmiş, dikkatli bir şekilde homojen süspansiyon elde edilene kadar pipetaj yapılmıştır.

Her hücre hattı için

1. Kontrol hücrelerinin birinci kısmına yalnızca 500 µL Binding Buffer;
2. Kontrol hücrelerinin ikinci kısmına 500 µL Binding Buffer + 5 µL Annexin V-FITC
3. 30 µM Pregabalin ile muamele edilmiş hücrelere 500 µL Binding Buffer + 5 µL Annexin V-FITC + 5 µL PI
4. 30 µM Siklofosfamid (Endoxan) ile muamele edilmiş hücrelere 500 µL Binding Buffer + 5 µL Annexin V-FITC + 5 µL PI eklenmiştir (Tablo 8).

Tablo 8: ANNEXİN V-FITC /PI analizi aşamaları

ANNEXİN-V FITC /PI ANALİZİ	Kontrol Hücreleri 1. Kısım	Kontrol Hücreleri 2. Kısım	Pregabalin 30 µM	Siklofosfamid 30 µM
<i>Binding Buffer (1x)</i>	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
<i>ANNEXİN-V FITC</i>	-	5 µL	5 µL	5 µL
<i>Propidium Iodide</i> (PI)	-	-	5 µL	5 µL

Binding Buffer ve boya eklenmiş tüm örnekler karanlık bir yerde oda sıcaklığında 15 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

15 dakikalık inkübasyon aşamasından sonra tüm örnekler için akım sitometri cihazında (Accuri C6 akış sitometri, Becton Dickinson) analiz işlemi başlatılmıştır.

Akım sitometrisi ile işlem yapmadan önce her bir örneğin içinde bulunan hücrelerin eppendorf tüp tabanına çökmesini önlemek için eppendorf tüpüne parmaklarımızla nazikçe dokunulmuştur. Kontrol örneklerinin hiç bir konjugat maddesi eklenmeyen birinci kısmı flow sitometre cihazında okutulduktan ve unkonjuge örneğin kapılama işlemi yapıldıktan sonra bu örneğe 5 µL PI eklenmiş ve 15 dakikalık inkübasyon süresi sonunda bu örnek kullanılarak PI için kapılama işlemi yapılmıştır.

Tüm okutma işlemleri ve grafikler akım sitometresinde analiz edilmiş ve sonuçlar cihazda bulunan yazılım programı ile değerlendirilmiştir.

Bu test sonrasında, sadece Annexin V, sadece PI, hem Annexin hem de PI ile boyanan ya da hiç boya almayan hücreler akım sitometre cihazı ile analiz edilebileceği gibi, hücrelerin bir lam üzerine yayılması sonrasında lam lamel arasında floresan mikroskopla ışımların saptanması ile de analiz sonuçları elde edilebilmektedir.

Kit prospektüsüne göre, tüm boyama süreçleri sonrasında erken apoptoz, geç apoptotik veya nekrotik ya da canlı hücre varlığı niceliksel olarak tayin edilebilmiştir.

Sadece Annexin V-FITC ile ışıma veren hücreler, erken apoptotik hücreler, hem Annexin hem de PI ile ışıma veren hücreler, geç apoptotik hücreler, sadece PI ile ışıma veren hücreler; nekrotik hücreler, annexin ve PI'nın ikisi ile de ışıma vermeyen hücreler ise sağlam, canlı hücreler olarak adlandırılmakta (Tablo 7) ve akım sitometri

görüntülerine göre sonuç raporlamalarında yüzdelik sonuçlar ya da hücre sayısı ile ifade edilebilmektedir.

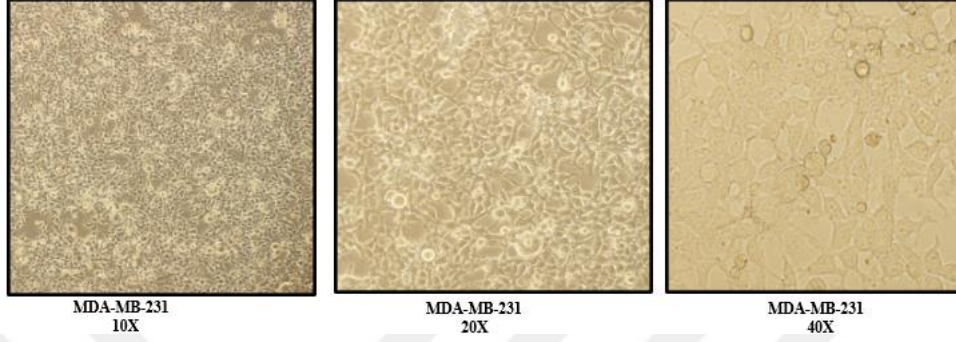
3.10.İstatistiksel Değerlendirme

Kuyucuklarda bulunan tüm OD değerleri, ortalamaları, tekrarlanabilirlikleri, GraphPad Prism 8 programı (Graph Pad Software, USA) ile değerlendirilmiştir. Pregabalin etken maddesinin farklı konsantrasyonlarının etkinliği, kontrol grubu ile karşılaştırılması yoluyla değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizlerde, Paired t test, Two way ANOVA testleri kullanılmıştır. $p<0.05$ değerleri, istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

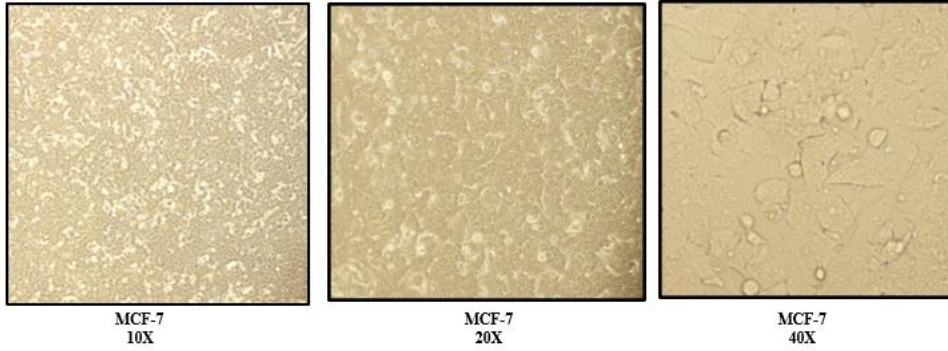


Bulgular

4.1. Meme Kanseri Hücre Hatlarının Kültür Sonuçları



Şekil 5: MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin, hücre kültür plağındaki görüntüleri (10x, 20x, 40x büyütme).



Şekil 6: MCF-7 meme kanseri hücrelerinin, hücre kültür plağındaki görüntüleri (10x, 20x, 40x büyütme)

Kültür plağındaki kanser hücrelerinin %75-80 konfluens durumundaki 10x, 20x, 40x büyütmede görüntüleri alınmıştır. Her iki hücre hattının da kültüre edilmeleri aşamalarında bir problem yaşanmamış ve hücrelerin günlük ya da gün aşırı izlemlerinde üç gün içerisinde %75-80 konfluense ulaştıkları gözlemlenmiştir (Şekil 5,6).

4.2. FACS ile Meme Kanseri Hücrelerinden, Meme Kanseri Kök Hücrelerinin Elde Edilmesine İlişkin Sonuçlar

4.2.1. MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücrelerinden Meme Kanseri Kök Hücrelerinin Elde Edilmesi

1 mL besiyerinde 1.8×10^7 MDA-MB-231 meme kanseri hücresi FACS için laboratuvara götürülmüştür.

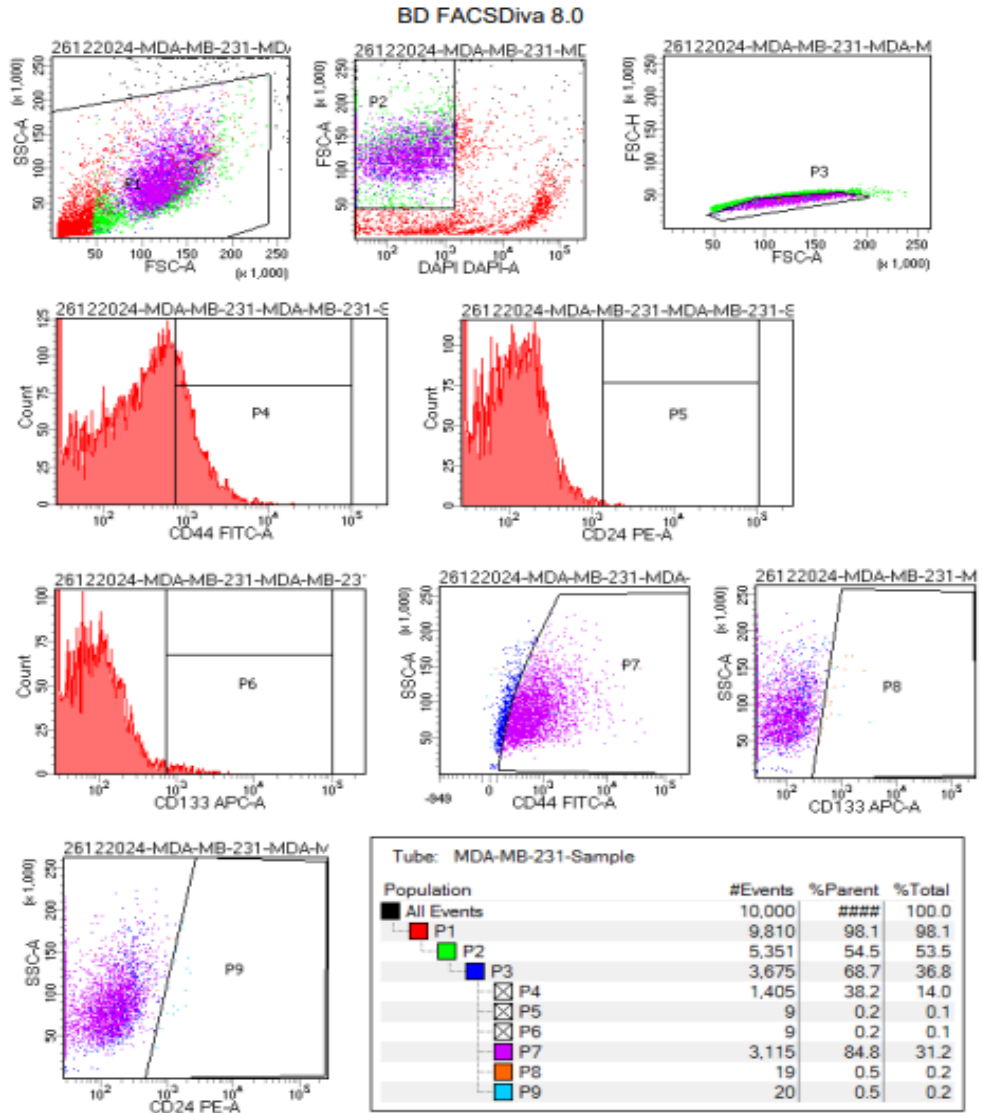
Toplam olarak akım sitometri analizine götürülen 1.8×10^7 hücrenin $\frac{1}{4}$ 'ü boyama yapılmadan kapılama işlemi yapabilmek üzere *unstaining* (boyasız) olarak işleme alınmış, DAPI antikorlu kullanılarak yapılan analiz sonrası hücrelerin yaklaşık %50'si canlı olarak bulunmuştur.

CD44 hücre yüzey belirtecine karşı FITC boyası ile işaretli CD44 antikorları ile kapılama işlemi yapılmıştır.

CD44⁺ olan hücrelerin arasında CD24 PE antikorlu ile yapılan kapılama işlemi sonrası canlı hücrelerin tamamının CD24 hücre yüzey belirtecine olmadığı görülmüştür.

CD133 hücre yüzey belirtecine karşı kullanılan APC boyası ile işaretli CD133 antikorları ile yapılan kapılama işlemi sonrasında CD133 pozitif hücreler % 0.0-0.2 oranında saptanmıştır (Şekil 7) .

Sonuç olarak, 1.35×10^7 MDA-MB-231 meme kanseri hücresinin içinden, %3.5 etkinlikle, CD44⁺/CD24⁻/CD133⁻ olan toplam 4.73×10^5 hücre elde edilmiştir. Bu hücreler CD44⁺/CD24⁻/CD133⁻ MDA-MB-231 meme KKH olarak adlandırılmıştır.



Şekil 7: MDA-MB-231 meme kanser hücre hattından FACS ile CD44⁺/CD24⁻/CD133⁻ hücre elde edilmesi

4.2.2. MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinden Meme Kanseri Kök Hücrelerinin Elde Edilmesi

1 mL besin ortamında, başlangıçta 2.4×10^7 MCF-7 meme kanser hücresi akım sitometri analizi için işleme hazırlanmıştır. Hücrelerin $\frac{1}{4}$ 'ü boyama yapılmadan kapılama işlemi yapabilmek üzere unstaining olarak hazırlanmıştır.

Unstaining sonrası kalan 1.8×10^7 MCF-7 meme kanser hücresinin DAPI antikoru ile yapılan kapılama işlemi sonrası % 37'sinin canlı olduğu görülmüştür.

CD44 hücre yüzey belirtecine karşı FITC boyası ile işaretli CD44 antikorları ile kapılama işlemi yapılmıştır.

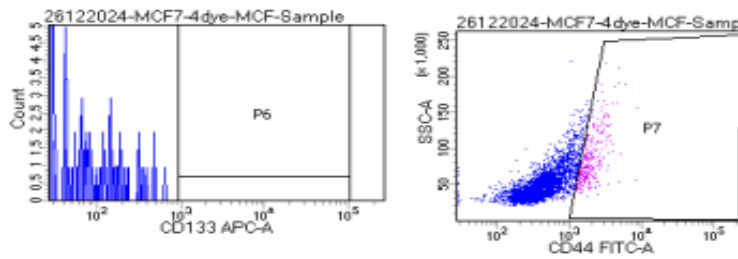
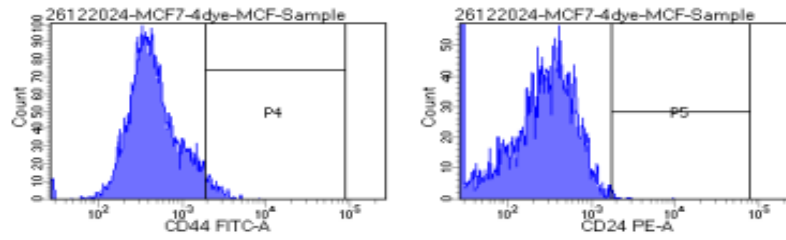
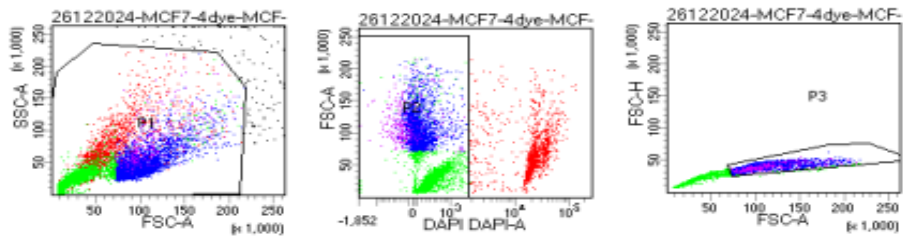
CD24 PE antikoru ile yapılan kapılama işlemi sonrası canlı hücrelerin tamamının CD24 hücre yüzey belirtecinin olmadığı görülmüştür.

CD133 hücre yüzey belirtecine karşı kullanılan APC boyalı CD133 antikorları ile işaretlenen hücre bulunmamıştır.

Sorting işlemine alınan 0.37×10^6 hücrenin içinden, %3 etkinlikle 1.3×10^4 hücre $CD44^+/CD24^-/CD133^-$ olarak toplanmıştır (Şekil 8).

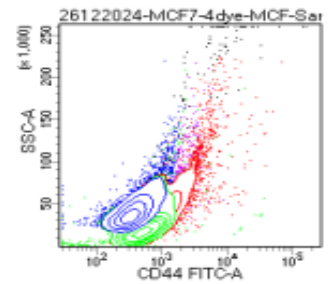
Başlangıçtaki meme kanseri hücre sayısı ile değerlendirildiğinde, floresanla konjuge antikorla işleme giren 1.8×10^7 MCF-7 meme kanser hücresi içinden, %0.07 etkinlikle, $CD44^+/CD24^-/CD133^-$ olan toplam 1.3×10^4 hücre elde edilmiştir. Bu hücreler $CD44^+/CD24^-/CD133^-$ MCF-7 meme KKH olarak adlandırılmıştır (Şekil 8).

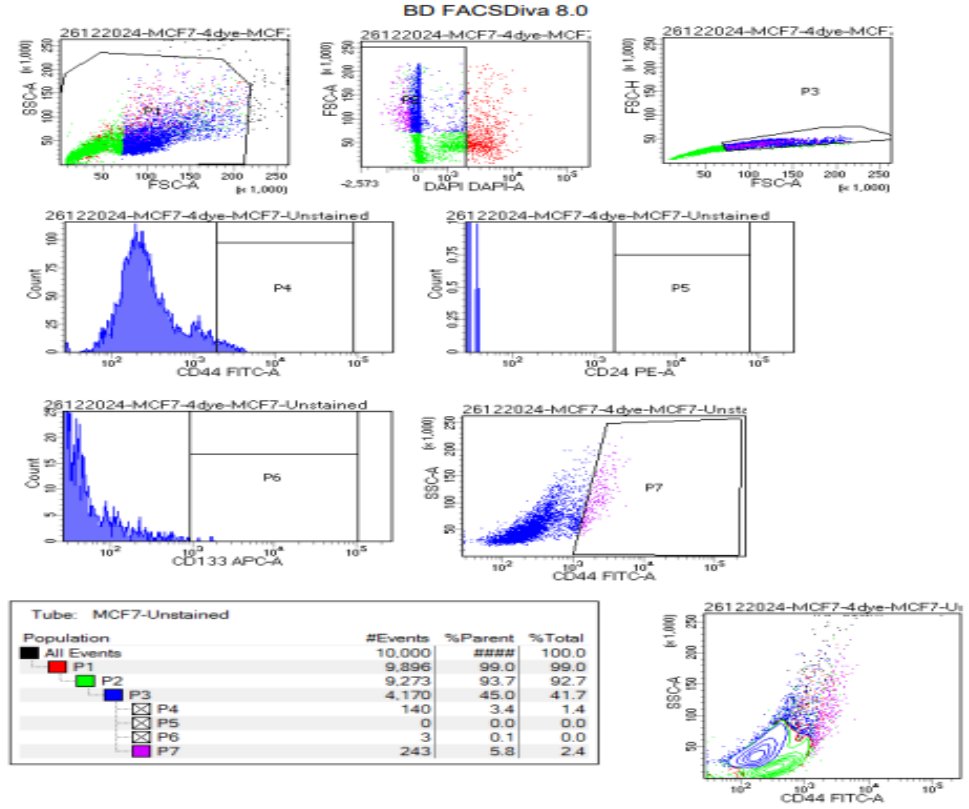
BD FACSDiva 8.0



Tube: MCF-Sample

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	####	100.0
P1	9,883	98.8	98.8
P2	8,329	84.3	83.3
P3	3,761	45.2	37.6
P4	144	3.8	1.4
P5	9	0.2	0.1
P6	0	0.0	0.0
P7	300	8.0	3.0





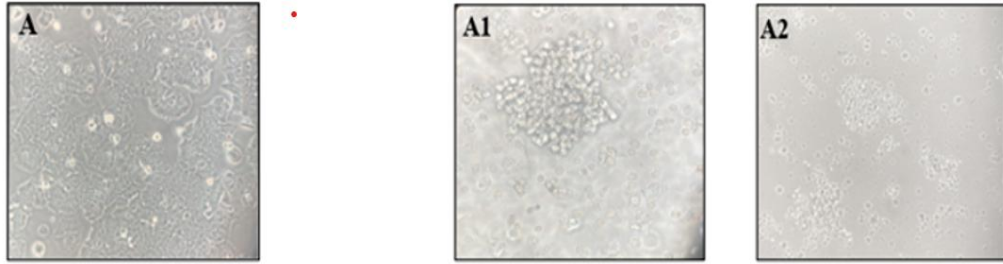
Şekil 8: MCF-7 meme kanser hücre hattından FACS ile CD44⁺/CD24⁻/CD133⁻ hücre elde edilmesi

4.3. Kanser Kök Hücrelerinin Hücre Kültürü Bulguları

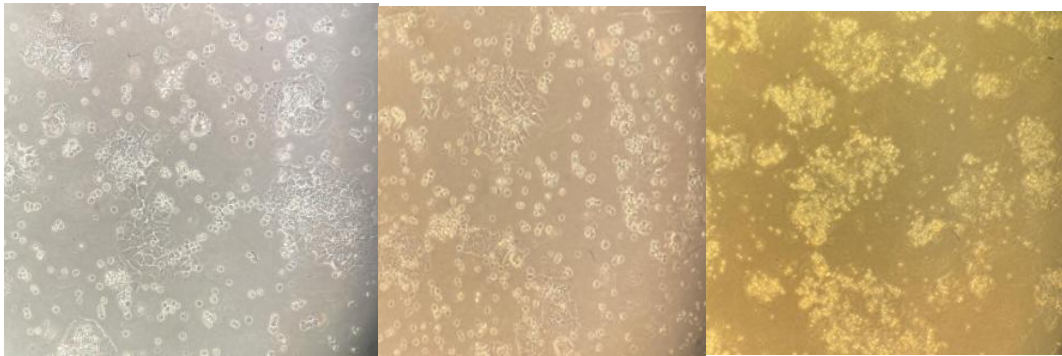
MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinden elde edilen $CD44^+/CD24^-/CD133^-$ kanser kök hücrelerinin laboratuvarında kültüre edilmesinden sonra, kültür plaklarının inverted mikroskop ile görüntüleri alınan meme KKH'leri, meme kanser hücreleri ile birlikte planlanmış olan tüm analizlere alınmıştır (Şekil 9-13).

Kanser kök hücresi olarak adlandırabileceğimiz bu hücrelerin kültür ortamında günlük izlemleri sırasında MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinden elde edilen kök hücrelerin daha hızlı bir çoğalma yanıtı verdikleri gözlemlenmiştir.

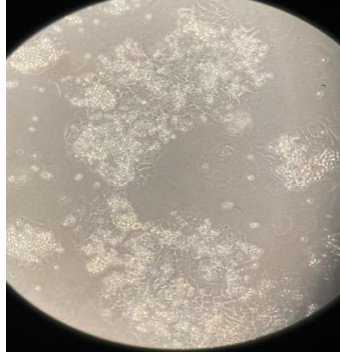
Meme KKH'nin, yapılması planlanmış olan sitotoksosite/proliferasyon, migrasyon ve AnnexinV-FITC ile apoptozis ve PI ile nekroz tayini çalışmaları için yeterli sayıya ulaşabilmelerini sağlamak üzere $CD44^+/CD24^-/CD133^-$ meme KKH'leri laboratuvarında kültür ortamında üç kez pasajlanarak, çoğalmaları sağlanmıştır.



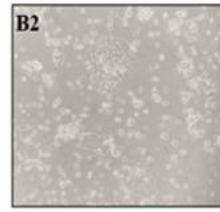
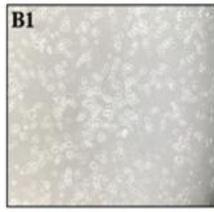
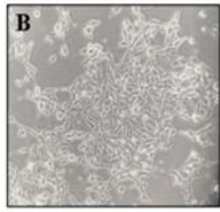
Şekil 9: MCF-7 meme kanseri hücre dizisinden (A, 40x) elde edilen MCF-7 kanser kök hücrelerinin (A1, A2, 20x) hücre kültür flaskına alındıktan 24 saat sonraki görüntüleri



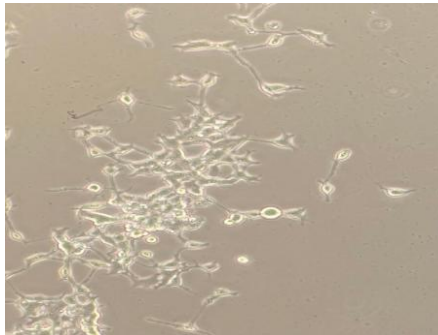
Şekil 10: MCF-7 meme kanseri kök hücrelerinin, 48 saat sonra hücre kültür plağındaki görüntüleri (10x)



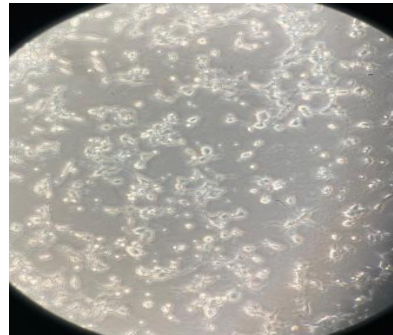
Şekil 11: MCF-7 meme kanseri kök hücrelerinin, 72 saat sonra hücre kültür plağındaki görüntüleri (10x)



Şekil 12: MDA-MB-231 meme kanseri hücre dizisinden (B, 40X) elde edilen MDA-MB-231 kanser kök hücrelerinin (B1, B2 20X) hücre kültür flaskına alındıktan 24 saat sonraki görüntüleri



A



B

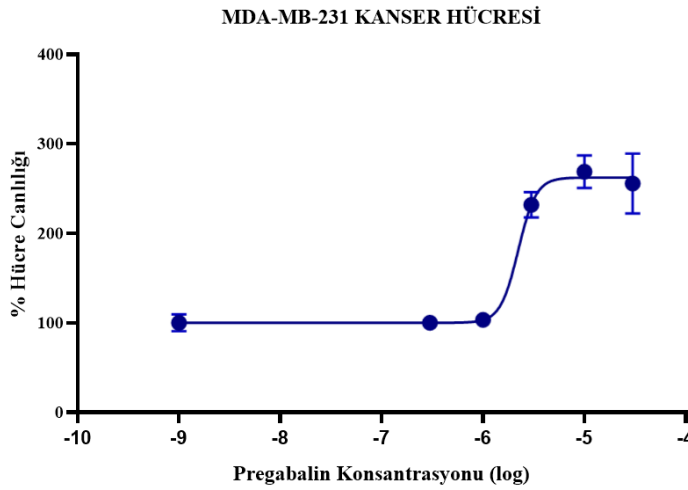
Şekil 13: MDA-MB-231 meme kanseri kök hücrelerinin hücre kültür plağındaki 48. saat görüntüleri (A:40x, B:10x)

4.4. Hücre Dizilerinde Pregabalin Etken Maddesinin EC50 Değerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, Pregabalin etken maddesi 0.3, 1, 3, 10, 30 μM 'lık konsantrasyonlarda kullanılmıştır. Belirlenen konsantrasyonlardaki etken maddenin uygulandığı hücreler üzerinde 24, 48, 72 saat inkübasyon sonrası MTT deneyi yapılmıştır.

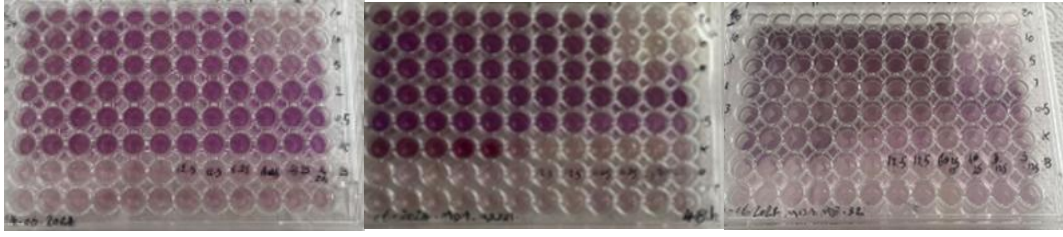
Maksimum cevabın (E_{max}) yarısını oluşturan ilaç konsantrasyonunun sigmoid eğrideki karşılığı $-\log\text{EC}_{50}$ 'dir. Bu değer pD_2 olarak tanımlanır.

Bizim çalışmamızda MDA-MB-231 meme KH için 48. saatte Pregabalin etken maddesinin PD_2 değeri 5.7 olarak bulunmuştur (Grafik 1).



Grafik 1: MDA-MB-231 KH'de farklı konsantrasyonlardaki pregabalinin etkisinin doz yanıt eğrisi ile gösterilmesi

4.5. MTT Deneyi Bulguları



A

B

C

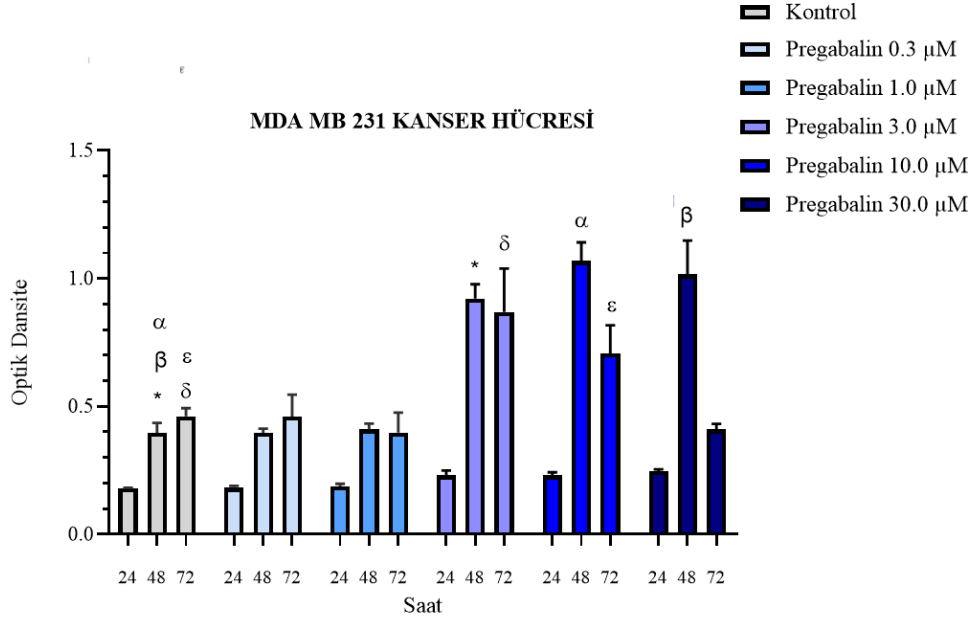
Şekil 14: MTT deneyinin reaksiyon görüntülerinden örnekler

İlaç uygulaması ardından 24 saat inkübasyon sonrası plak üzerindeki kuyucuklarda bulunan MDA-MB-231 hücrelerinin MTT reaktifi ile verdiği reaksiyon (A)

İlaç uygulaması ardından 48 saat inkübasyon sonrası plak üzerindeki kuyucuklarda bulunan MDA-MB-231 hücrelerinin MTT reaktifi ile verdiği reaksiyon (B).

İlaç uygulaması ardından 72 saat inkübasyon sonrası plak üzerindeki kuyucuklarda bulunan MDA-MB-231 hücrelerinin MTT reaktifi ile verdiği reaksiyon (C).

24 saatlik sitotoksosite testi sonuçlarına göre, MDA-MB-231 ve MCF-7 meme kanseri hücreleri ve bunlardan elde edilen meme KKH'de, kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirildiğinde, pregabalin etken maddeli ilacın farklı konsantrasyonlarının uygulandığı hücre gruplarının hiçbirinde, kontrol grubuna göre daha düşük bir optik dansite (OD) ölçümü saptanmamıştır. Aynı şekilde, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda da pregabalin etken maddesinin uygulandığı hücrelerde kontrol hücrelerine göre OD azalması saptanmamıştır.



Grafik 2 : Pregabalin uygulanmış MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinin MTT test sonuçları

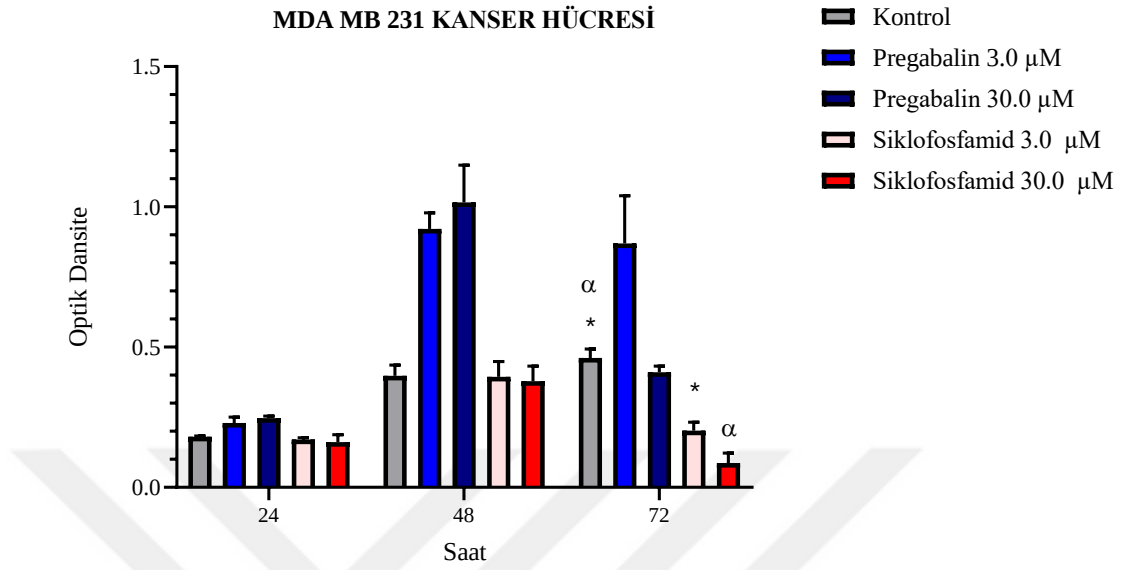
★, α, β, p<0.0001 &, p<0.001 ε, p<0.05

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış Pregabalin etken maddesinin (0.3, 1, 3, 1, 30 µM konsantrasyonlarda) MDA-MB-231 meme kanser hücrelerine uygulamasından 24, 48 ve 72 saat sonra hücre canlılığı bulguları OD olarak verilmiştir.

Proliferasyon deney sonuçlarımıza göre, en belirgin etki, 3, 10, ve 30 µM ilaç verilen hücrelerin 48. saat ölçümlerinde saptanmıştır. 48. saatin sonunda ilaç uygulaması yapılmayan kontrol hücrelerinin OD değeri ortalama 0.397 olarak bulunurken, aynı saatte 3, 10 ve 30 µM pregabalin uygulanan hücrelerin OD değeri sırası ile ortalama 0.921, 1.068, 1.016 (p<0.0001) olarak bulunmuştur. Kontrol hücrelerine göre en yüksek OD değişimi 10 µM etken madde uygulanan hücrelerde saptanmıştır.

72. saatte, 3 ve 10 µM dozlarda kontrol grubuna göre (0.461) istatistiksel olarak anlamlı derecede OD artışı olmuştur (sırası ile 0.869 p<0.001 ve 0.706 ve p<0.05).

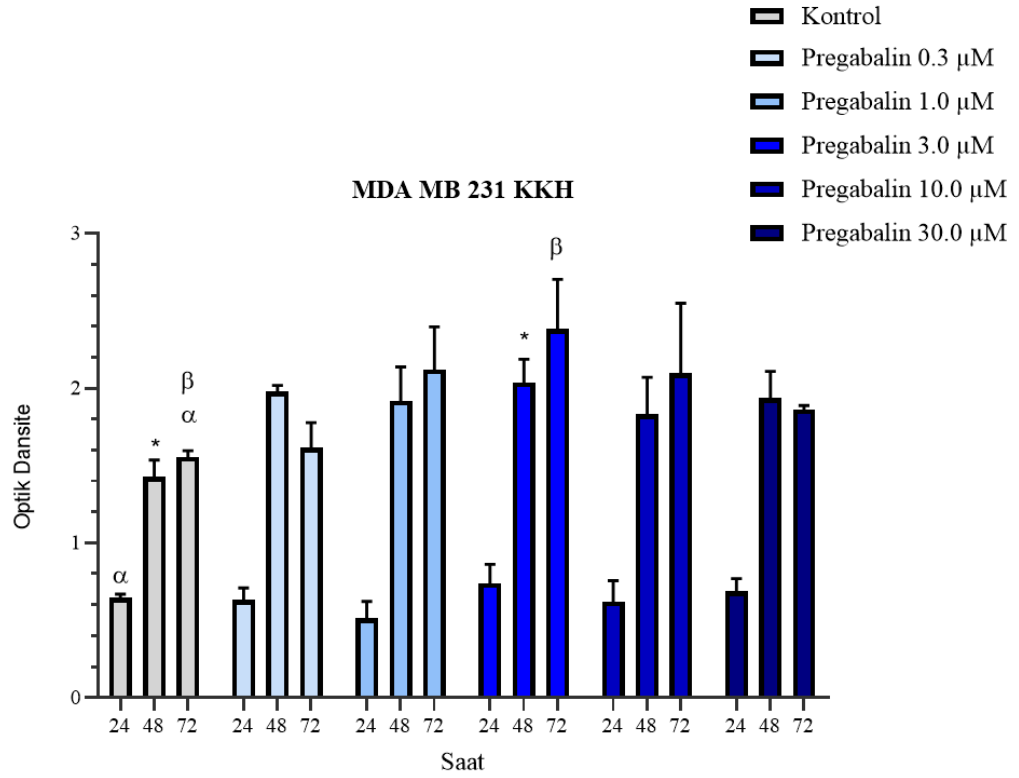
MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinin, etken madde uygulaması sonrası 72. saat verileri değerlendirildiğinde, 3, 10, 30 µM konsantrasyonlarında 48. saat değerlerine göre OD azalması saptanmıştır.



Grafik 3: MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerine uygulanmış pregabalin ve siklofosfamid ilaçlarının etkileri

α, p<0.0001 ★, p<0.05

3 ve 30 µM Siklofosfamid etken maddesinin uygulandığı hücrelerde, 72. saatte kontrol grubundaki hücrelere (OD=0.461) göre anlamlı OD azalması olmuştur (sırası ile 3 ve 30 µM siklofosfamid uygulanan hücrelerde OD=0.202 p<0.05 ve OD=0.087 p<0.0001).

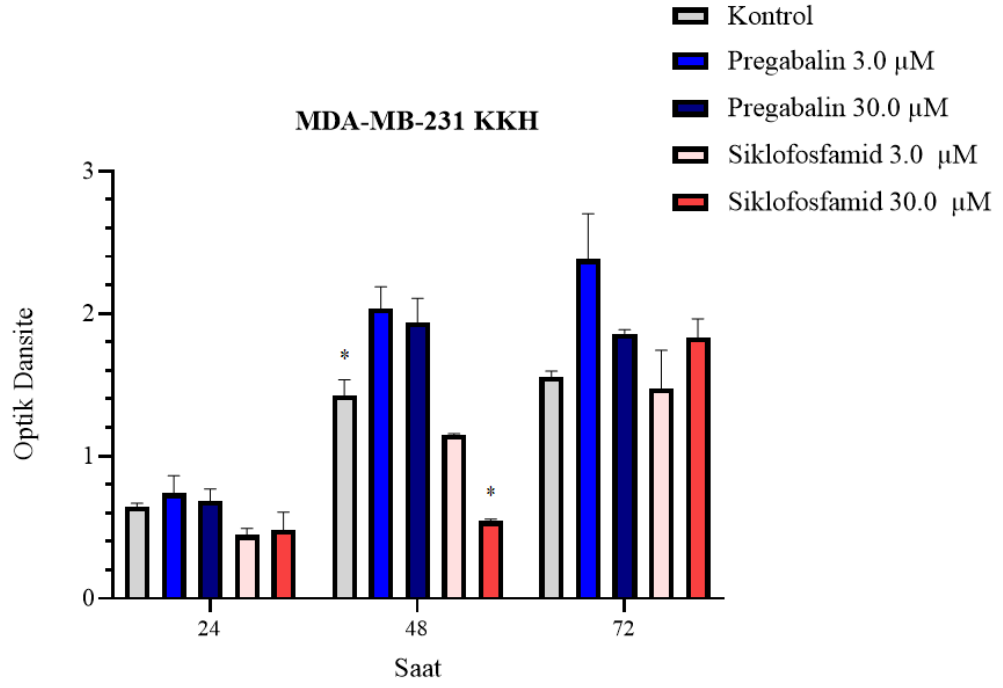


Grafik 4: Pregabalin uygulanmış MDA-MB-231 meme KKH MTT test sonuçları
 α , $p<0.001$ β , $p<0.005$ $\star$, $p<0.05$

Farklı konsantrasyonlarda (0.3, 1, 3, 10, 30 μM) hazırlanmış Pregabalin etken maddesinin MDA-MB-231 meme kanseri hücre dizisinden elde edilen $\text{CD44}^+/\text{CD24}^-/\text{CD133}^-$ meme kanseri kök hücrelerine uygulamasından 24, 48 ve 72 saat sonra hücre canlılığı bulguları OD olarak verilmiştir.

Kontrol hücrelerinin 72 saat inkübasyon sonrası OD artışı 24. saate göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.001$).

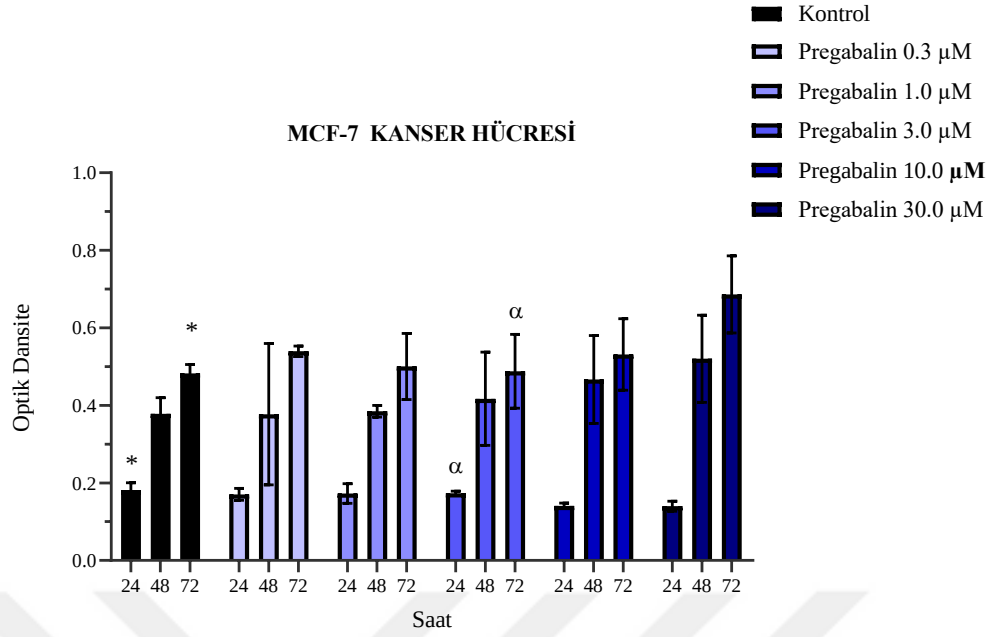
3 μM dozdaki Pregabalinin 48. ve 72. saatteki kontrol grubuna göre OD ölçümünü anlamlı düzeyde yükselttiği görülmektedir (Kontrol ve 3 μM pregabalin uygulanan hücrelerin OD değeri sırası ile 48. saatte, 1.425 ve 2.035 $p<0.05$; 72. saatte, 1.555 ve 2.382 $p<0.005$). Etken maddenin, 10 ve 30 μM konsantrasyonlarında da 48 ve 72. saatlerde, aynı saatlerdeki kontrol gruplarına göre hücre yoğunluğundaki artış OD ölçümü ile gösterilmiştir (10 ve 30 μM için OD sonuçları, sırası ile 48. saatte, 1.831 ve 1.936; 72. saatte 2.096 ve 1.860) (Grafik 4).



Grafik 5: MDA-MB-231 meme KKH üzerine uygulanmış Pregabalin ve Siklofosfamid ilaçlarının etkileri

*, $p < 0.0001$

30 µM siklofosfamid uygulanan hücrelerde 48. saatte kontrol grubuna göre anlamlı bir OD düşüklüğü olduğu bulunmuştur (30 µM siklofosfamid uygulanan hücrelerde OD=0.543 ve kontrol OD=1.425 $p < 0.0001$).

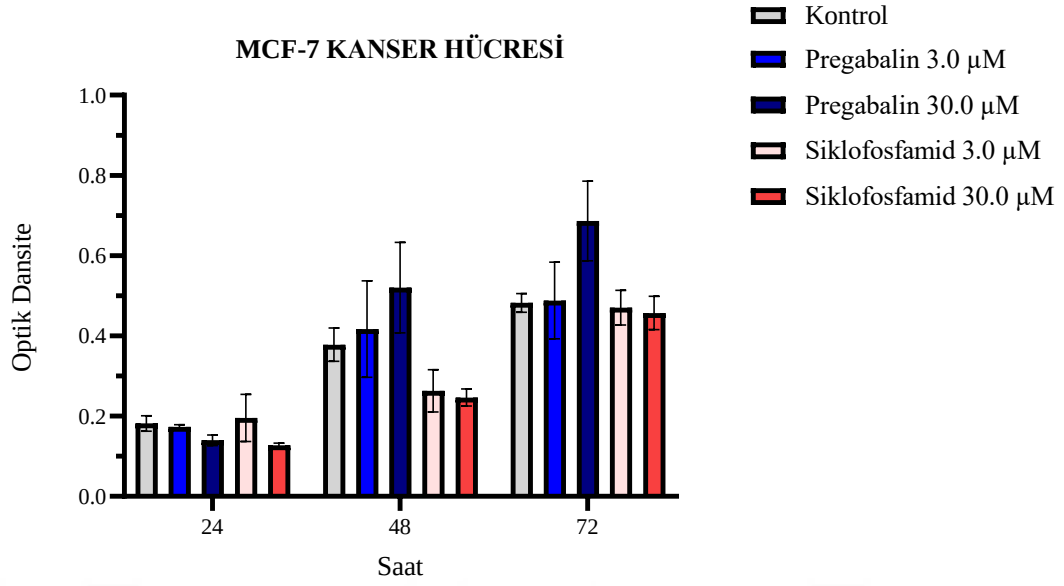


Grafik 6: Pregabalin uygulanmış MCF-7 meme kanser hücrelerinin MTT sonuçları
 α , $p < 0.001$ *, $p < 0.005$

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış Pregabalin etken maddesinin (0.3, 1, 3, 10, 30 µM) MCF-7 meme kanser hücrelerine uygulamasından 24, 48 ve 72 saat sonra hücre canlılığı bulguları OD olarak verilmiştir.

Kontrol hücrelerinin 72 saat inkübasyon sonrası OD artışı 24. saate göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.005$). 3µM Pregabalin uygulanan hücrelerde 24. saate göre 72. saatteki OD yükselmesi etkisi istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.001$).

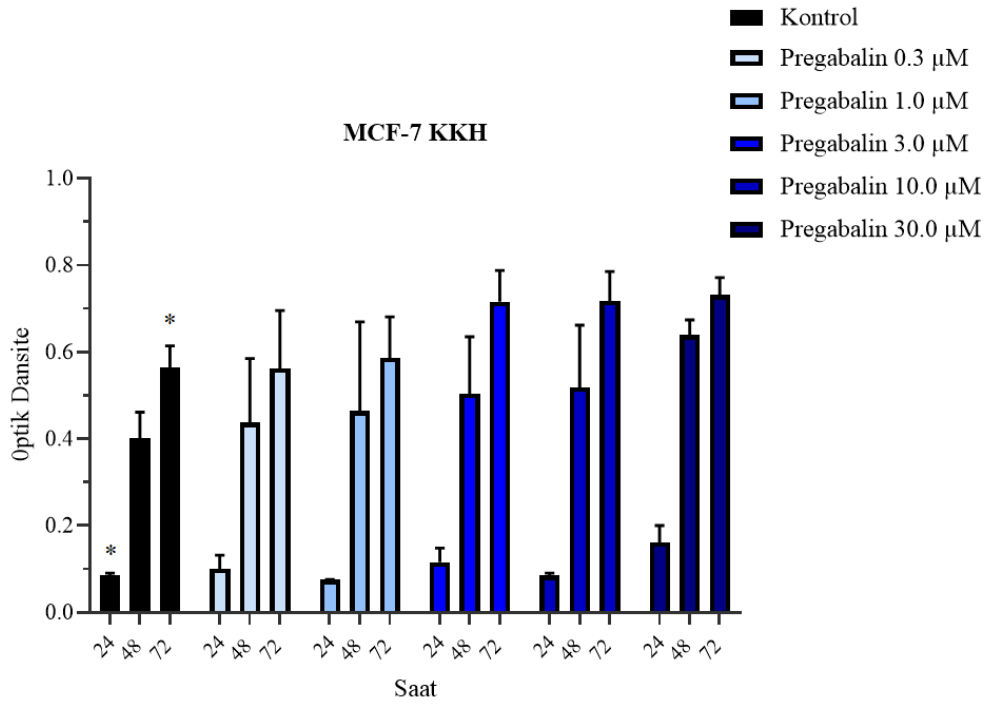
MCF-7 meme kanser hücreleri üzerinde pregabalin ilacının, $\geq 3\mu\text{M}$ konsantrasyonlarda 48. ve 72. saatte OD artışı yaptığı gözlenmektedir ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildir. Özellikle 30 µM konsantrasyondaki etken maddenin diğer dozlara göre daha etkin olduğu gözlenmektedir (kontrol ve 30 µM pregabalinin etkisi ile OD değeri sırası ile 48. saatte; 0.378 ve 0.520; 72. saatte; 0.482 ve 0.686). 48. saatte 3 µM pregabalin uygulaması ile OD=0.417 olarak bulunmuştur.



Grafik 7: MCF-7 meme kanser hücreleri üzerine uygulanmış Pregabalin ve Siklofosfamid ilaçlarının etkileri

MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde Pregabalin ve Siklofosfamid etken maddeli ilacın 30 µM dozunun etkileri karşılaştırıldığında, 48. saatte ve 72. saat OD değerlerinin Pregabalin uygulanan hücrelerde kontrol grubuna göre yüksek olduğu, siklofosfamidin ise 48. saatte hücrelerin OD'sini azalttığı bulunmuştur.

Siklofosfamid ve Pregabalin grubu sonuçları, kanser hücrelerinin proliferasyonunun 48. Saatte 3 ve 30 µM konsantrasyonda Siklofosfamid ile inhibe edildiğini, 30 µM konsantrasyonda Pregabalin uygulamasının 48. ve 72. saatlerde kanser hücrelerinde proliferasyon artışına yol açtığını göstermiştir (Grafik 7).

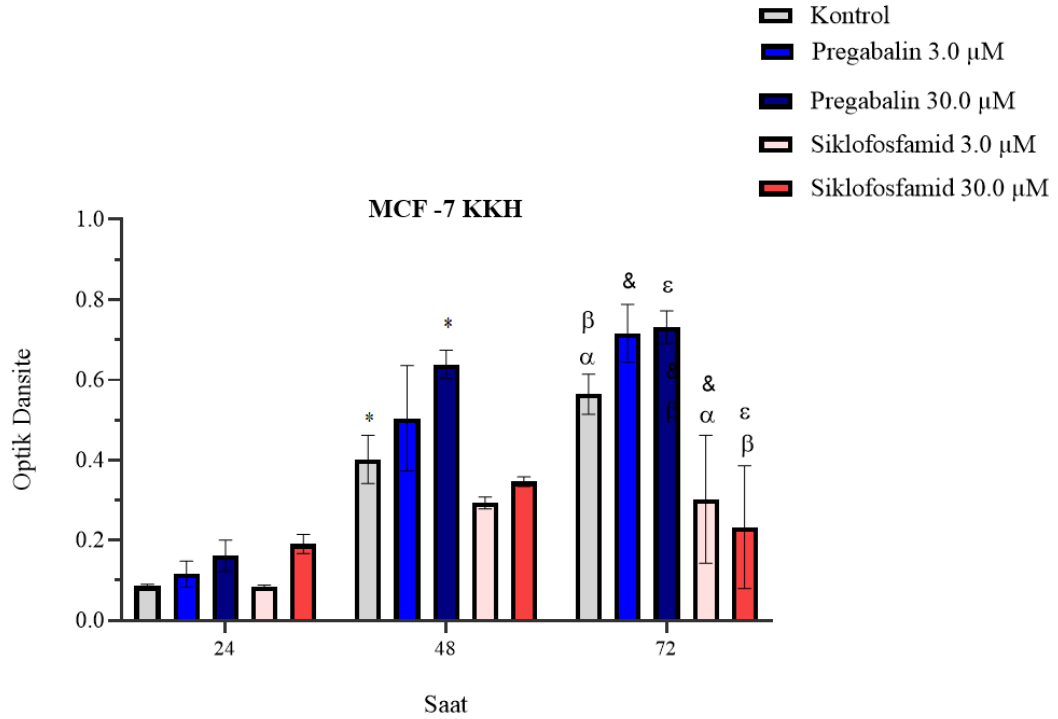


Grafik 8: Pregabalin uygulanmış MCF-7 meme KKH MTT test sonuçları

*, $p < 0.0001$ 24. saat ve 72. saat kontrol gruplarının OD farkını göstermektedir.

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış Pregabalin etken maddesinin (0.3, 1, 3, 10, 30 µM) MCF-7 meme kanser hücre dizisinden elde edilen CD44⁺/CD24⁻/CD133⁻ meme kanseri kök hücrelerine uygulamasından 24, 48 ve 72 saat sonra hücre canlılığı bulguları OD olarak verilmiştir.

MCF-7 CD44⁺/CD24⁻/CD133⁻ meme KKH üzerinde Pregabalin ilacının ≥ 3 µM dozlarında, 48 ve 72 saat sonra yapılan analizlerinde hiçbir ilaç uygulaması yapılmayan kontrol hücrelerine göre OD artışı yaptığı ve meme KKH'nin proliferasyonunu arttırdığını göstermektedir. Etken maddenin farklı konsantrasyonlarına karşı bu proliferasyon yanıtının 3, 10 ve 30 µM dozlarda 72. saatte benzer olduğu, 48. saatte 30 µM etken madde uygulanana hücrelerin OD değerinin daha fazla arttığı izlenmektedir (Grafik 8).



Grafik 9: MCF-7 meme KKH üzerine uygulanmış Pregabalin ve Siklofosfamid etken maddelerin MTT test sonuçları

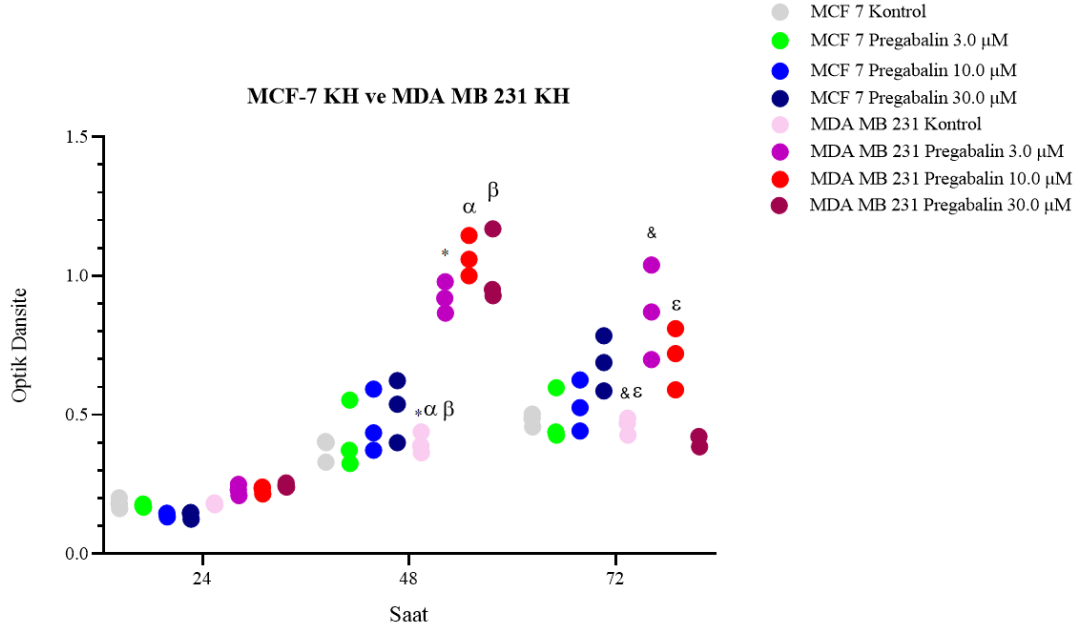
*, α , δ , $p < 0.05$ β , $p < 0.0005$ ϵ , $p < 0.0001$

MCF-7 meme kanser hücrelerinden elde edilen MCF-7 CD44⁺/CD24⁻/CD133⁻ meme kanseri kök hücrelerinin 3 ve 30 µM Pregabalin ve Siklofosfamid etken maddesine verdiği yanıtlar değerlendirilmiştir.

MCF-7 CD44⁺/CD24⁻/CD133⁻ meme KKH üzerinde, 30 µM Pregabalin uygulamasında kontrol grubuna göre 48. saatte istatistiksel olarak anlamlı OD artışı gözlenmiştir (0.401 ve 0.638, $p < 0.05$).

30 µM siklofosfamid uygulanan hücrelerde ise, özellikle 72. saatte OD değerlerinde (OD=0.232) kontrol hücrelerine (OD=0.564) göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.0005$) azalma olduğu bulunmuştur.

Bu bulgular, pregabalinin meme KKH'nin proliferasyonunu arttırırken, siklofosfamidin meme KKH'nin proliferasyonunu inhibe ederek sitotoksik etkili olduğunu göstermektedir (Grafik 9).



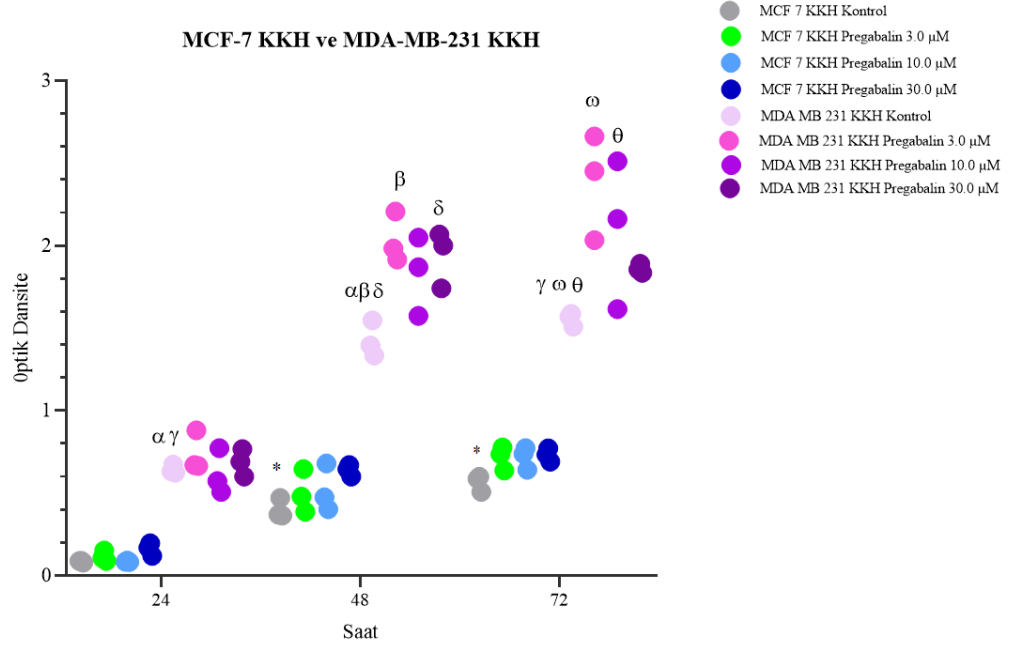
Grafik 10: MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinin, Pregabalin etken maddesinin farklı konsantrasyonlarına yanıtının karşılaştırılması

*, α , β , $\&$, $p < 0.0001$ ϵ , $p < 0.05$

3, 10, 30 μM Pregabalin uygulanan MDA-MB-231 KH'nin, 48 saat sonra kendi kontrol hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı OD artışı vardır (kontrol, 3, 10, 30 μM OD sırası ile, 0.397, 0.920, 1.068, 1.016 $p < 0.0001$) (Grafik 10).

3 μM ve 10 μM Pregabalin uygulanan MDA-MB-231 kanser hücrelerinin 72 saat sonra kendi kontrol hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı OD artışı vardır (kontrol 0.461, 3 μM 0.869 $p < 0.0001$ ve 10 μM 0.706 $p < 0.05$) (Grafik 10).

MDA-MB-231 meme KH ve MCF-7 KH 24, 48, 72 saat sonrasında kontrol grupları benzer OD değerine sahiptir (24, 48, 72 saat sırası ile, MDA-MB-231 meme KH; 0.180, 0.397, 0.461 MCF-7 meme KH; 0.181, 0.378, 0.482) (Grafik 10).



Grafik 11: MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanser kök hücrelerinin, Pregabalin etken maddesinin farklı konsantrasyonlarına yanıtının karşılaştırılması.

*, $p < 0.05$, $\beta, \delta, \theta, p < 0.005$, $\alpha, \gamma, \omega, p < 0.0001$

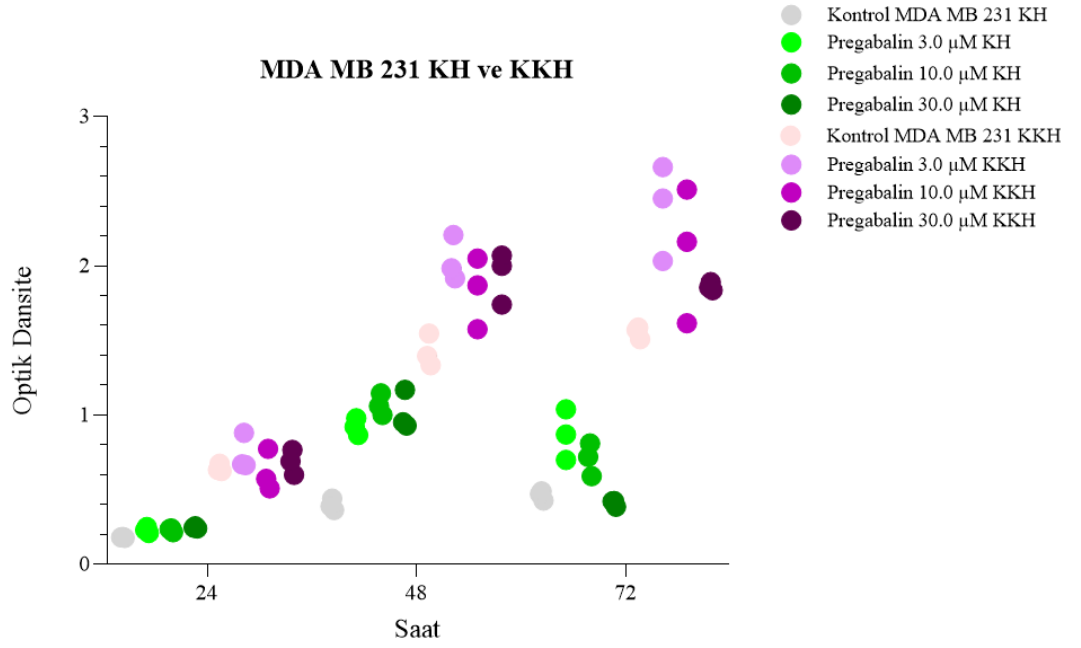
*; MCF-7 KKH'nin, 48 ve 72 saat izlemleri sonrasında etken madde uygulaması yapılmayan kontrol hücrelerinin 24 saatlik sonuçlarına göre OD farkını göstermektedir. Buna göre ilerleyen saatlerde MCF-7 KKH çoğalması devam etmiştir. İstatistiksel anlamlı fark, 48 ve 72 saatlerin 24 saate göre olan farkıdır ($p < 0.05$)

α, γ ; MDA-MB-231 KKH'de, kontrol hücrelerinin, 48 ve 72 saatlik inkübasyonları sonrası OD değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmezken, her iki sürenin sonunda oluşan OD'ler 24 saatlik inkübasyon süresi sonrası OD değerlerine göre istatistiksel olarak çok anlamlı derecede artmıştır (24, 48 ve 72 saat süreleri sonunda sırası ile; 0.643, 1.425, 1.555, $p < 0.0001$).

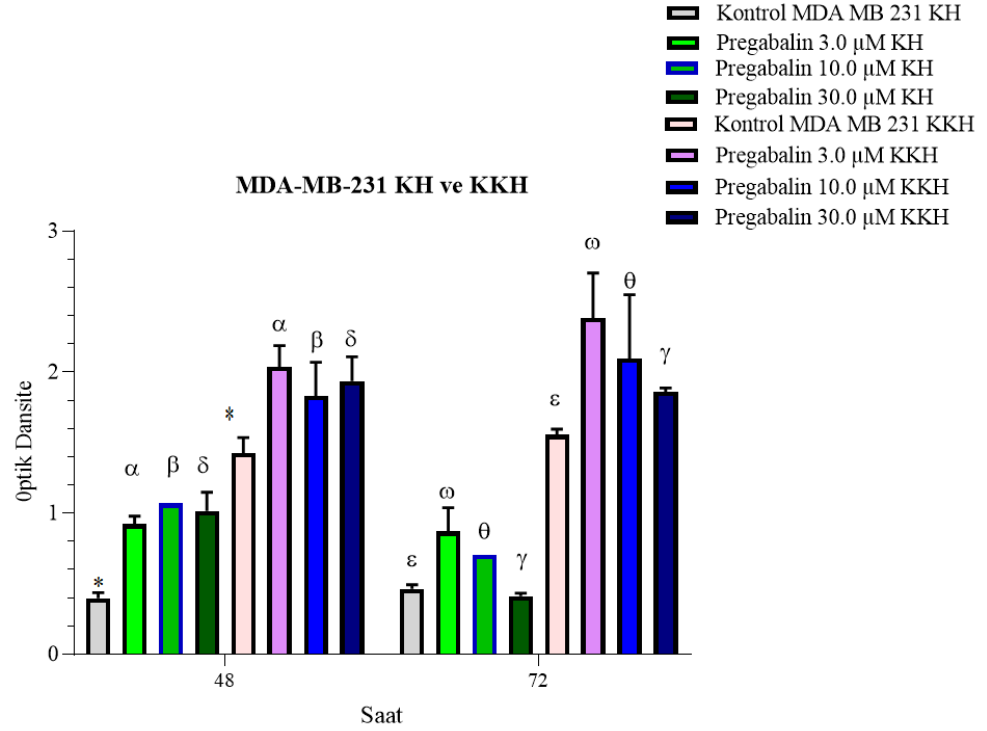
β ; MDA-MB-231 KKH'nin, 48. saatte 3 μM (OD=2.035 ve kontrol OD=1.425) ve δ ; 30 μM ilacın etkisi (OD=1.936 ve kontrol OD=1.425) istatistiksel anlamlı artış yapmıştır ($p < 0.005$).

ω ; 72. saatte 3 μM dozda uygulama (OD=2.382 ve kontrol OD=1.555) belirgin anlamlı OD artışı yapmıştır ($p < 0.0001$).

0; 72. Saatte 10 μ M (OD=2.096 ve kontrol OD=1.555) ilaç etkisi belirgin OD artışı yapmıştır ($p<0.005$).



Grafik 12: MDA-MB-231 meme kanser hücreleri ve kanser kök hücrelerinin, Pregabalin etken maddesinin farklı konsantrasyonlarına yanıtının karşılaştırılması



Grafik 13: MDA-MB-231 meme kanser hücreleri ve kanser kök hücrelerinin, Pregabalin etken maddesinin farklı konsantrasyonlarına 48. ve 72. saat yanıtının karşılaştırılması

MDA-MB-231 KH ve KKH karşılaştırıldığında,

48 saat inkübasyon sonrasında;

*, ε, β, p<0.005 α, γ, δ, ω, θ, p< 0.0001

Etken madde uygulanmayan kontrol hücreleri arasında KKH'nin (OD=1.425) KH'ne (OD=0.397) göre OD' si yüksektir (*, p<0.005).

3 µM etken maddesinin KKH üzerine etkisi (OD=2.035) KH üzerine (OD=0.920) etkisinden istatistiksel anlamlı olarak yüksektir (α, p<0.0001).

10 µM etken maddesinin KKH üzerine etkisi (OD=1.831) KH üzerine (OD=1.068) etkisinden istatistiksel anlamlı olarak yüksektir (β, p<0.005).

30 µM etken maddesinin KKH üzerine etkisi (OD=1.936) KH üzerine (OD=1.016) etkisinden istatistiksel anlamlı olarak yüksektir (δ, p<0.0001).

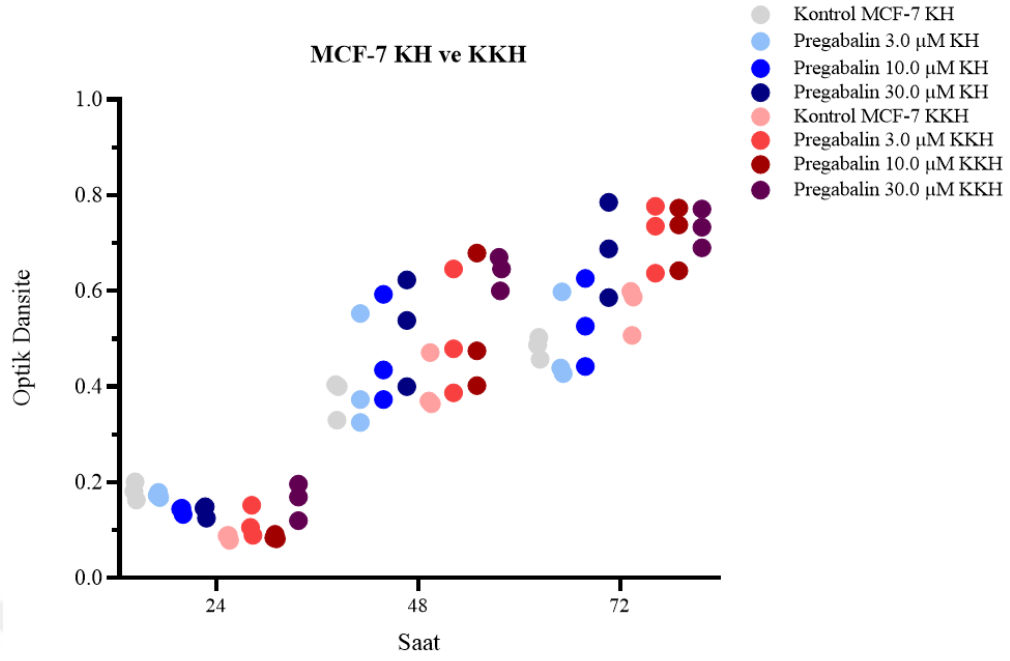
72 saat inkübasyon sonrasında, etken madde uygulanmayan kontrol hücreleri arasında KKH'nin (OD=1.555) KH'ne (OD=0.461) göre OD' si yüksektir (ϵ , $p<0.005$).

3 μM etken maddesinin KKH üzerine etkisi (OD=2.382) KH üzerine (OD=0.869) etkisinden istatistiksel anlamlı olarak yüksektir (ω , $p<0.0001$).

10 μM etken maddesinin KKH üzerine etkisi (OD=2.036) KH üzerine (OD=0.706) etkisinden istatistiksel anlamlı olarak yüksektir (ω , $p<0.0001$).

30 μM etken maddesinin KKH üzerine etkisi (OD=1.860) KH üzerine (OD=0.410) etkisinden istatistiksel anlamlı olarak yüksektir (γ , $p<0.0001$).

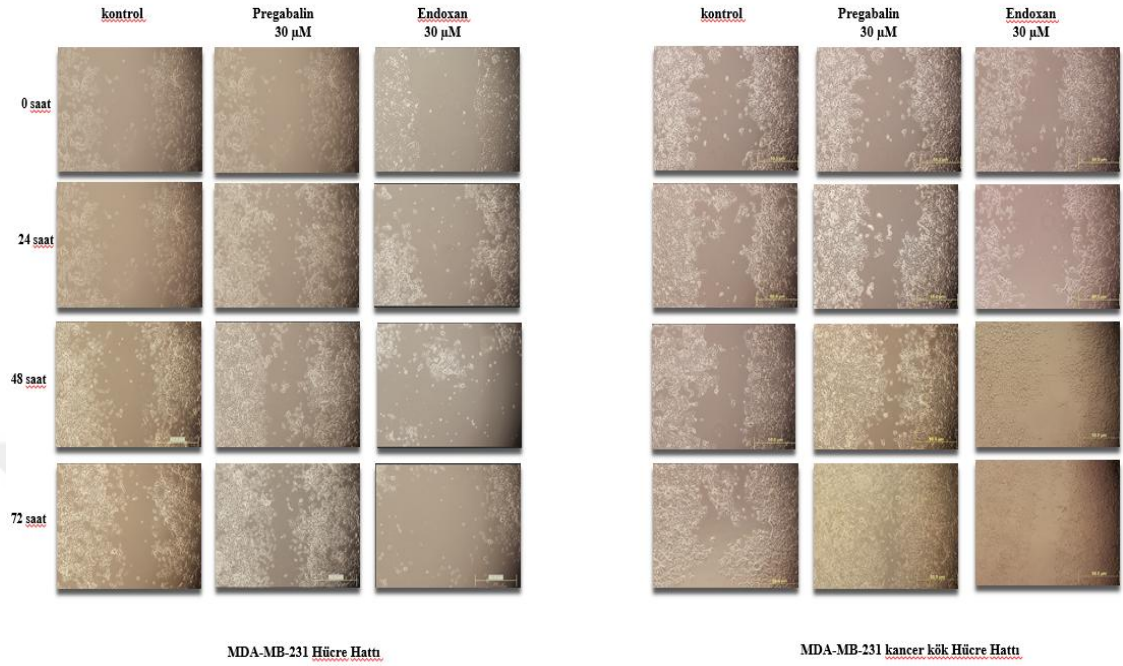




Grafik 14: MCF-7 meme kanser hücreleri ve kanser kök hücrelerinin, Pregabalin etken maddesinin farklı konsantrasyonlarına yanıtının karşılaştırılması

48. ve 72. saatte, KH ve KKH'de 3, 10 ve 30 µM konsantrasyonda pregabalin uygulaması sonrası belirgin OD artışı gözlenmiştir.

4.6. Migrasyon Testi Sonuçları

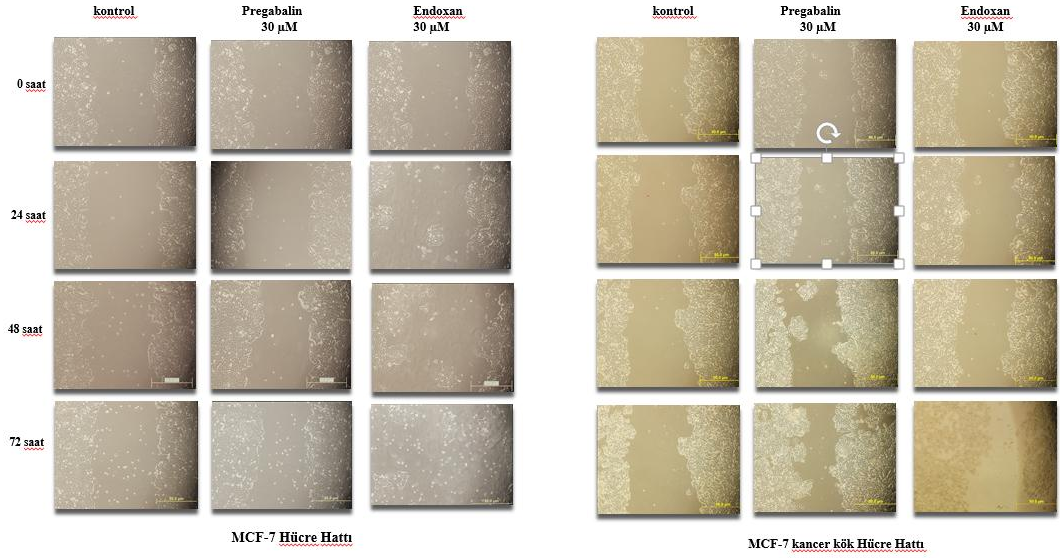


Şekil 15: MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı ve MDA-MB-231 kök hücrelerinin migrasyon testi sonuçları

30 µM Pregabalin ve Siklofosfamid (Endoxan) ilaç uygulaması sonrası migrasyon analizi sonuçları kontrol grubunun sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı üzerine, pregabalin etken maddeli ilacın 30 µM uygulama yapılan plaklardaki hücre artışı yönündeki etkisi değerlendirildiğinde, şekillerin alt bölümünde verilen skalaya göre, pregabalinin hücre migrasyonunu arttırıcı yönde etki ettiği gözlenmektedir.

MDA-MB-231 CD44⁺/CD24⁻/CD133⁻ meme kanseri kök hücrelerine aynı miktardaki ilaç uygulamasının etkisi değerlendirildiğinde, kök hücrelerdeki proliferasyon artışının, MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine göre daha fazla olduğu görülmektedir.



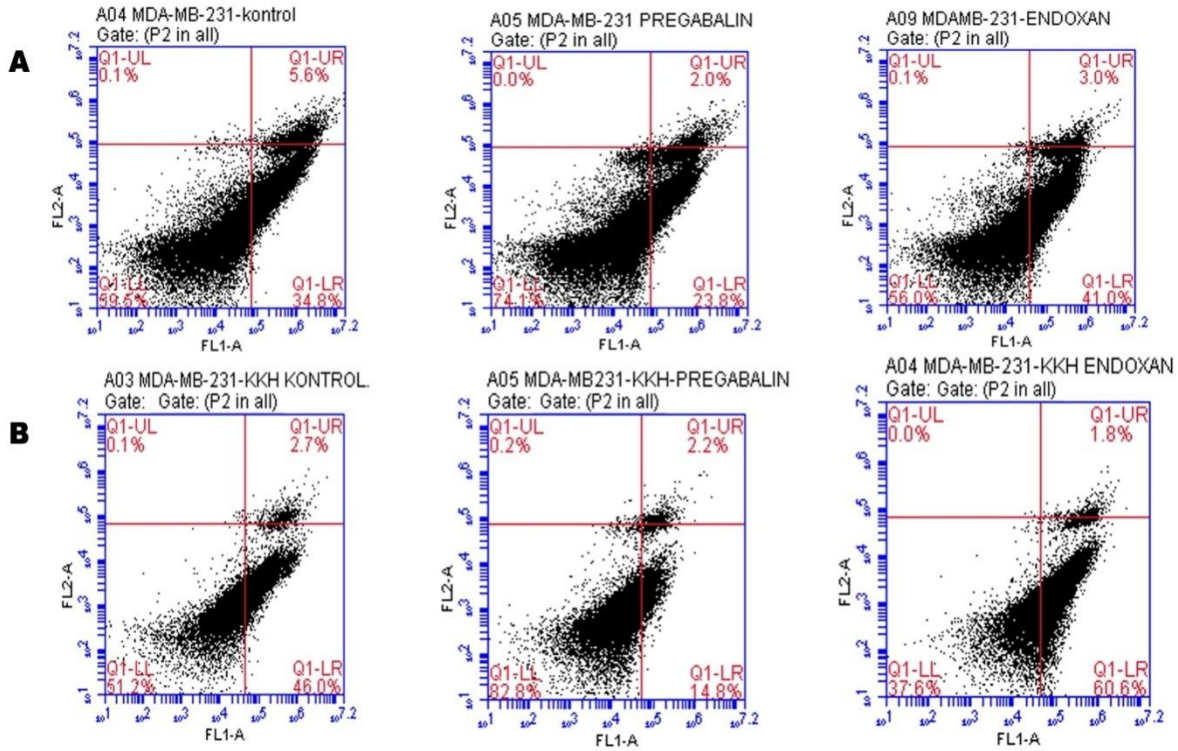
Şekil 16: MCF-7 meme kanseri hücre hattı ve MCF-7 meme kanseri kök hücrelerinin migrasyon testi sonuçları

30 µM Pregabalin ve Siklofosfamid (Endoxan) ilaç uygulaması sonrası migrasyon analizi sonuçları kontrol grubunun sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerine, pregabalin etken maddeli ilacın 30 µM uygulama yapılan plaklardaki hücre artışı yönündeki etkisi değerlendirildiğinde, şekillerin alt bölümünde verilen skalaya göre, pregabalinin hücre migrasyonunu arttırıcı yönde etki ettiği gözlenmektedir.

MCF-7 CD44⁺/CD24⁻/CD133⁻ meme kanseri kök hücrelerine aynı miktardaki ilaç uygulamasının etkisi değerlendirildiğinde, kök hücrelerdeki proliferasyon artışının, MCF-7 meme kanseri hücrelerine göre daha fazla olduğu görülmektedir.

4.7 Annexin V/PI Testi Sonuçları

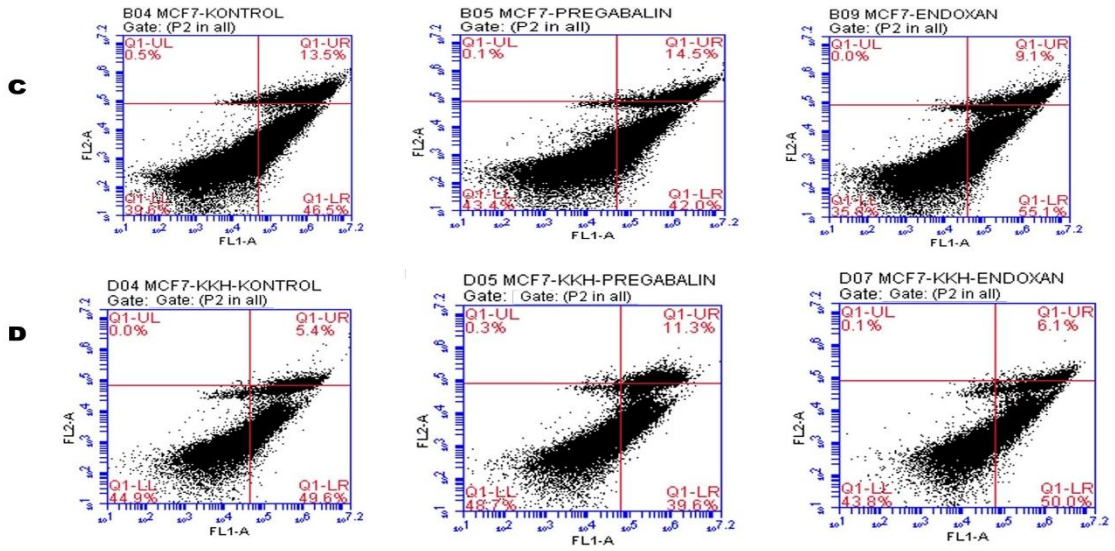


Şekil 17: MDA-MB-231 meme kanser hücreleri (A) ve MDA-MB-231 meme KKH'lerinin (B) Apoptoz testi sonuçları

MDA-MB-231 meme kanser hücreleri ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre dizisinden elde edilen MDA-MB-231 CD44⁺/CD24⁻/CD133⁻ meme kanseri kök hücrelerine, 30 µM Pregabalin ve Siklofosfamid (Endoxan) etken maddesi ile muamele sonrası Annexin V/PI testi sonuçları ile ilgili akım sitometrisi görüntüleri.

MDA-MB-231 meme kanser hücreleri (Şekil 17, A) ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre dizisinden elde edilen MDA-MB-231 CD44⁺/CD24⁻/CD133⁻ meme kanseri kök hücrelerine (Şekil 17, B), pregabalin etken maddeli ilacın apoptotik ya da nekrotik etkisinin, kontrol grubuna ve siklofosfamid uygulanan gruba göre daha az olduğu görülmektedir.

Siklofosfamidin apoptoz yönündeki etkisinin kontrol grubuna göre daha fazla olduğunun gözlenmesi, bu ilacın apoptozla hücre ölümüne yol açtığını göstermektedir.



Şekil 18: MCF-7 meme kanser hücreleri (C) ve MCF-7 meme KKH'lerinin (D) Apoptoz testi sonuçları

MCF-7 meme kanser hücreleri ve MCF-7 meme kanser kök hücrelerinden elde edilen, MCF-7 CD44⁺/CD24⁻/CD133⁻ meme kanseri kök hücrelerinin 30 µM Pregabalin ve Siklofosfamid (Endoxan) etken maddesi ile muamele sonrası AnnexinV-FITC/PI testi sonuçları ile ilgili akım sitometrisi görüntüleri.

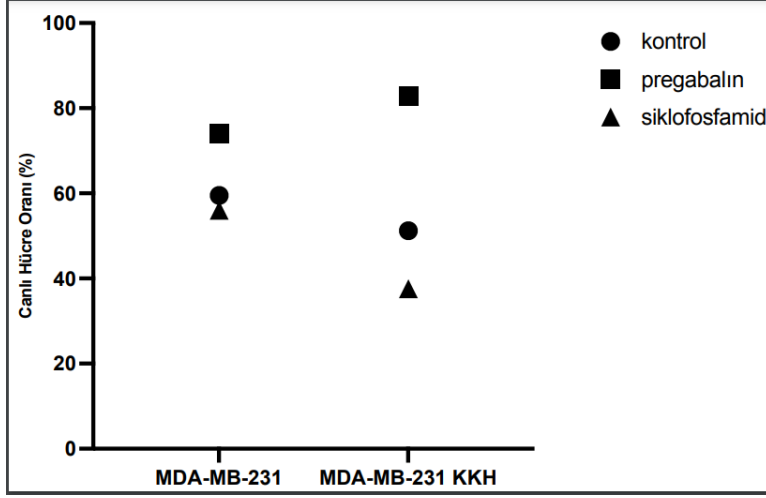
MCF-7 meme kanser hücreleri (Şekil 18, C) ve MCF-7 meme kanseri hücre dizisinden elde edilen MCF-7 CD44⁺/CD24⁻/CD133⁻ meme kanseri kök hücrelerine (Şekil 18, D), pregabalin etken maddeli ilacın apoptotik ya da nekrotik etkisinin, kontrol grubuna ve siklofosfamid uygulanan gruba göre daha az olduğu görülmektedir.

Diğer meme kanseri hücre hattına benzer bir şekilde siklofosfamidin apoptoz yönündeki etkisinin kontrol grubuna göre daha fazla olduğu görülmektedir ve bu durum siklofosfamidin sitotoksik etkisini göstermektedir ve deney ortamımızın doğru çalıştığının ispatıdır.

Tablo 9: Meme kanser hücreleri ve kanser kök hücrelerinin, 30 µM Pregabalin ve Siklofosfamid (Endoxan) ilacı uygulaması sonrası 48. saatte akım sitometrisi ile değerlendirilen canlılık oranları.

	Canlılık (%)	Erken Apoptoz (%)	Geç Apoptoz (%)	NEKROZ (%)
MDA-MB-231- Kontrol	59,5	34,8	5,6	0,1
MDA-MB-231- Pregabalin	74,1	23,8	2,0	0,0
MDA-MB-231- Endoxan (Siklofosfamid)	56,0	41,0	3,0	0,1
MDA-MB-231-KKH- Kontrol	51,2	46,0	2,7	0,1
MDA-MB-231- KKH- Pregabalin	82,8	14,8	2,2	0,2
MDA-MB-231- KKH- Endoxan (Siklofosfamid)	37,6	60,6	1,8	0,0
MCF7- Kontrol	39,6	46,5	13,5	0,5
MCF7- Pregabalin	43,4	42,0	14,5	0,1
MCF7- Endoxan (Siklofosfamid)	35,8	55,1	9,1	0,0
MCF7-KKH- Kontrol	44,9	49,6	5,4	0,0
MCF7- KKH- Pregabalin	48,7	39,6	11,3	0,3
MCF7- KKH- Endoxan (Siklofosfamid)	43,8	50,0	6,1	0,1

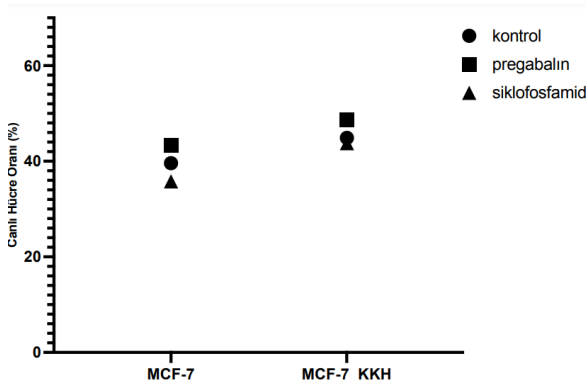
Tüm gruplarda, pregabalin etken maddesi ile muamele edilen hücrelerin akım sitometri sonuçlarında hücrelerin canlılık oranı kontrol grubuna göre daha yüksek çıkmıştır. Bununla uyumlu olarak apoptoz oranları da Pregabalin uygulanan hücrelerde kontrol grubuna göre düşüktür. Siklofosfamid uygulanan hücrelerde ise, siklofosfamid ilacının kullanılma endikasyonunu destekler biçimde hücre canlılık oranları kontrol grubundan düşük, apoptozis oranları ise yüksektir. Bu durum deney düzeneğimizin doğru çalıştığını göstermektedir.



Grafik 15: MDA-MB-231 meme KH ve MDA-MB-231 meme KKH'lerinin Apoptoz testi sonuçları

MDA-MB-231 meme kanser hücreleri ve MDA-MB-231 meme kanser hücrelerinden elde edilen MDA-MB-231 CD44⁺/CD24⁻/CD133⁻ meme kanser kök hücrelerinin Annexin-V FITC/PI ile yapılan 48. saate ait apoptozis-hücre nekrozu analizi sonrası, akım sitometrisinde saptanan canlı hücre oranları.

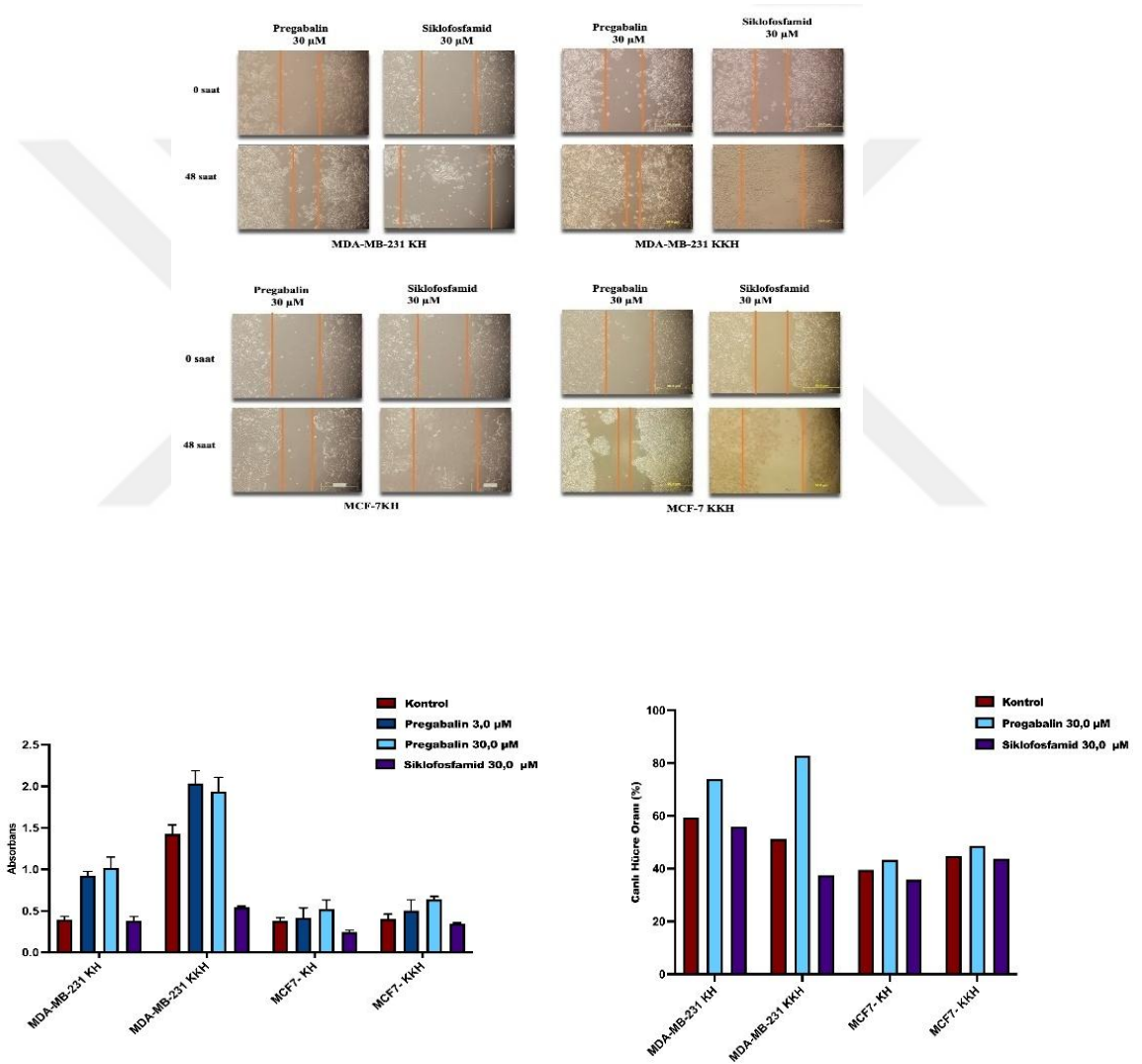
Pregabalin uygulanan gruptaki canlı hücre oranının kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu, siklofosfamid uygulanan hücre grubundaki canlılık oranının ise kontrole göre daha düşük olduğu izlenmektedir.



Grafik 16: MCF-7 meme KH ve MCF-7 meme KKH'lerinin Apoptoz testi sonuçları

MCF-7 meme kanser hücreleri ve MCF-7 meme kanser hücrelerinden elde edilen, MCF-7 CD44⁺/CD24⁻/CD133⁻ meme kanser kök hücrelerinin Annexin-V FITC/PI ile yapılan apoptozis-hücre nekrozu analizi sonrası, akım sitometrisinde saptanan canlı hücre oranları.

Pregabalin uygulanan gruptaki canlı hücre oranının kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu, siklofosfamid uygulanan hücre grubundaki canlılık oranının ise kontrole göre daha düşük olduğu izlenmektedir.



Şekil 19: Tüm hücre tiplerinde, Pregabalin ve Siklofosfamidin 48. saatteki etkileri MTT, Motilite/Migrasyon ve AnnexinV testleri ile gösterilmesi

Tartışma

Dünyada kanser görülme sıklığı giderek artmaktadır (Bray, F., 2018; Siegel, RL., 2016). Kanser için cerrahi tedavi yapılmış olsa da hastaların cerrahi bölgesinde ve/veya farklı vücut bölgelerinde kansere bağlı çeşitli ağrılar devam edebilmektedir. Bu ağrıların bir bölümü nöropatik ağrı olarak adlandırılmaktadır (Fallon, M.T., 2013; Mitsuri, S., 2021). Bu tür ağrıların giderilmesi için bu hastalara sıklıkla gabapentin ilaç grubundan olan pregabalin reçetelenmektedir (Yajima, R., 2016).

1980 yılından bugüne kadar gabapentinoid grubunda yer alan ve kanser tedavisinde ağrı kesici olarak kullanılan Pregabalinle ilgili olarak literatürde taranabilen 4900 üzerinde çalışma bulunmakla birlikte, pregabalinin, kanser hücresi üzerine etkilerini araştıran sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır (Ataizi, ZS., 2020; Mitsuri, S., 2021; Angus, J., 2021; Karabulut, GŞ., 2020). Ancak Pregabalinin kanser kök hücresi üzerine etkilerini inceleyen bir araştırmaya literatürde henüz rastlanmamıştır. Pregabalin ve kanser hücre hattı ile ilgili makalelerde, pregabalin kanser hücrelerine uygulanmış (Waganer, N., 2022), ancak kanser kök hücreleri (KKH) üzerine uygulanması ve hücre üzerine sitotoksik, proliferatif yada apoptoza gidiş yönünde etkisi olup olmadığı ile ilgili bildirimler henüz yapılmamıştır. KKH, tümör oluşumu, invazyonu, metastazı, ilaç direnci ve tümör rekurrensinden sorumlu olduklarından, (Yin, W., 2021) kanser hastasının ağrısını azaltmak amacı ile kullanılacak sentetik bir ilaç ya da bitkisel bir etken maddeye karşı KKH'nin hücresel düzeyde yanıtlarının bilinmesi kritik bir öneme sahiptir.

Bu tez çalışmamızda, kanser ağrısının giderilmesinde yaygın olarak kullanılan gabapentinoid grubu ilaçların kanser hücresi ve KKH üzerine sitotoksik/proliferatif etkilerini araştırmayı hedeflemiştik. Kanser ağrısının giderilmesi için kullanılan fentanil, morfin, tramadol gibi opioid türevi ilaçların kanser hücresi üzerine etkisini inceleyen daha çok sayıda araştırma bulunması, ve bu alanda bizim araştırmamızda kullanmakta olduğumuz pregabalinin daha önce kullanılmamış olduğunu belirlememiz bizi bu konuda araştırma yapmaya yönlendirmiştir.

Tüm dünyada en yaygın olarak görülen kanser tiplerinden biri de kadınlarda yüksek prevalansa sahip olan meme kanserleridir (Siegel, RL., 2016; Bray, F., 2018) Meme kanseri kök hücreleri (meme KKH), meme kanserinin tümör oluşumu, invazyonu, metastazı, ilaç direnci gibi etkilerinden ve hatta tümör rekurrensinden sorumlu

tutulmaktadır (El-Sahli, S., 2021; Taurin, S., 2020). Klinik olarak değerlendirildiğinde, pregabalin adlı ilacın nöropatik ağrıyı azaltıcı etkisi ile kullanımı en sık meme kanseri olgularında olduğundan, tez çalışmamız için iki farklı meme kanser hücre hattında araştırma yapılmasına karar verilmiştir. Böylece, meme kanserinin nöropatik ağrı yönetimi sürecinde kullanılan bu ilacın, meme kanseri hücresi ve meme KKH üzerine hücresel düzeyde etkilerinin araştırılması ile literatüre katkıda bulunmak amaçlanmıştır.

Bu amaçla, meme kanseri ile ilgili araştırmalarda en yaygın olarak kullanılan meme kanseri hücre hatlarından olan farklı fenotipik/histolojik yapıdaki 2 meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 ve MCF-7 temin edilmiştir. Gabapentinoid ilaçlar grubundan biri olan Pregabalinin MCF-7 ve MDA-MB-231 meme KH hattı ve bu hücre dizilerinden elde edilecek olan meme KKH üzerine uygulanması sonrası ilacın hücresel düzeyde oluşturabileceği etkilerinin belirlenmesi planlanarak tez çalışmamıza başlanmıştır. Meme kanseri ve meme KKH üzerine pregabalinin etkilerini incelemek üzere planlanan bu araştırmanın konusu ilk kez bu tez çalışması ile inceleneceğinden özgündür. Araştırmamızda, MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanser hücreleri ve bu hücrelerden FACS yöntemi kullanılarak izole edilen MCF-7 KKH ve MDA-MB-231 KKH üzerinde çalışılmıştır.

KKH, tümör progresyonu, metastaz oluşumu ve tümörün konvansiyonel tedavilere direnç göstermesinden sorumlu tutulmakta olan hücrelerdir. (El-Sahli, S., 2021; Taurin, S., 2020). Tüm tümör hücreleri arasında genellikle %0.1-1 oranında bulunmakta olan bu küçük ancak anlamlı derecede undiferansiye KKH grubu, tümör oluşumuna ve metastazlara yol açabilmektedirler (Tanei, T., 2009; Brabletz, T., 2005; Pece, S., 2010). Bizim çalışmamızda da MDA-MB-231 meme KH'si içinde, %3.5 MDA-MB-231 meme KKH, MCF-7 meme KH'si içinde, %0.07 oranında MCF-7 meme KKH'si bulunmuştur (Şekil 7,8).

Çalışmamızda, kültüre ederek çoğalttığımız (Şekil 5) 1.35×10^7 MDA-MB-231 meme KH'si içinden, %3.5 etkinlikle, $CD44^+/CD24^-$ olan toplam 4.73×10^5 MDA-MB-231 meme KKH elde edilmiştir. CD133 yüzey belirtecini tanımlamak üzere kullanılan APC ile işaretli CD133 antikoru ile meme kanser hücre topluluğunun sadece %0.2'si işaretlenmiştir. FACS ile elde edilen bu hücreler $CD44^+/CD24^-/CD133^-$ MDA-MB-231 meme KKH olarak tanımlanmıştır (Şekil 7).

Kültüre edilerek çoğaltılmış (Şekil 6), 1.8×10^7 MCF-7 meme KH'si içinden, % 0.07 etkinlikle, CD44⁺/CD24⁻ özelliklerine sahip olan 1.3×10^4 MCF-7 meme KKH elde edilmiştir. CD133 yüzey belirtecini tanımlamak üzere kullanılan APC ile işaretli CD133 antikoru ile meme kanser hücre topluluğunda hiçbir hücre işaretlenmemiştir. Tüm işlemlerin sonunda, FACS ile elde edilen hücreler CD44⁺/CD24⁻/CD133⁻ MCF-7 meme KKH olarak tanımlanmıştır (Şekil 8).

FACS ile meme kanser hücrelerinden meme KKH elde etme işlemi sırasında, FACS cihazında elde edilen CD44⁺/CD24⁻/CD133⁻ hücre sayısı MDA-MB-231 hücrelerinde, MCF-7 hücrelerine göre çok daha fazla bulunmuştur. Kök hücre izolasyonu işlemlerinde, aynı floresan işaretli antikorların, aynı miktarda kullanıldığı ve aynı laboratuvar koşullarında analiz edildiği bir deney ortamında, iki ayrı kanser hücre dizisinden farklı sayıda kök hücre elde edilmesi, bu iki hücre tipinin içerdiği kök hücre sayılarının farklı olduğunu göstermektedir.

Kök hücreler elde edildikten sonra kültüre edilerek çoğaltılmıştır (Şekil 9-13). MDA-MB-231, MCF-7 meme KH ve KKH, bundan sonraki analizlerin tamamında eş zamanlı olarak çalışılmıştır.

Kanser hücreleri ve KKH ile ilgili yapılan çalışmalarda, yaygın olarak, kanser tedavisinde kullanılmaya aday bir ilacın ya da bitki özütünün kanser hücreleri ve kanser kök hücreleri üzerine sitotoksik etkisinin araştırıldığı görülmektedir. Bu doğrultuda öncelikle, etkisi araştırılan bu etken maddenin hücrelerin yarısında beklenen etkiyi oluşturacak olan konsantrasyonunu belirlemek üzere, farklı düzeylerdeki değerleri ile uygulama sonrası canlılık analizleri yapılır ve EC50 değeri tespit edilir. Bir etken maddenin uygulandığı hücrelerin cevap vereceği optimum konsantrasyon aralığının belirlenmesi sonrasında hücre canlılığı ve proliferasyon deney setlerinin oluşturulduğu ve 24, 48, 72 saatlik izlemlerin bu şekilde belirlenen madde konsantrasyonları ile muamele edilmiş hücrelerde yapıldığı bilinmektedir. (Koçak, N.,2017; Özgürbüz, U., 2019; Çelik, F., 2019; Waganer, N., 2022). Bizim çalışmamızda da kanser tedavisi için değil, kanser olan hastanın nöropatik ağrısı için klinikte kullanılan FDA onaylı bir ağrı giderici ilacın bilinen yan etkileri dışında KH ve KKH üzerinde, bir sitotoksik etkisinin ya da kanserin agresifliği ile ilişkili olabilecek proliferatif etkisinin olup olmadığı, öncelikle *in vitro* deneylerle araştırılmak istenmiştir.

Çalışmamızda etkisi test edilecek Pregabalin adlı etken maddenin 0.3, 1, 3, 1, 30 μ M konsantrasyonları kullanılmıştır (Koçak, N., 2017; Waganer, N., 2022). Uygulanan ilaç konsantrasyonlarının MDA-MB-231 KH'ne etkisi ile ilgili doz yanıt eğrisi oluşturulmuştur (Grafik 1). PD₂ değeri 5.7 olarak saptanmıştır..

MDA-MB-231 KKH, MTT deneyleri sırasında daha kısa bir süre içerisinde diğer hücre gruplarına göre çok daha fazla miktarda formazan kristalleri oluşturmuş ve oluşan formazan kristallerinin çözünmesi de çok kısa sürede gerçekleşmiştir. Bununla paralel olarak, MTT deneyleri sonucu elde edilen OD değerleri de diğer hücrelerden yüksek olarak saptanmıştır. MTT deneyi için, 96 kuyucuklu plaklara, her kuyucuğa tüm hücre tiplerinden ortalama 0.5×10^4 hücre ekilmiştir (Özgürbüz, U., 2019).

MTT deneylerimizde (Şekil 14), pregabalin uygulanan hücre gruplarının oluşturduğu OD değerleri kontrol grubunun OD değerlerine göre yüksek bulunmuştur. Bu bulgulara göre Pregabalinin bu çalışmada kullanılan hücreler üzerine sitotoksik bir etkisinin oluşmadığı görülmüştür. Aksine, ilaç uygulaması yaptığımız 0.3, 1, 3, 1, 30 μ M konsantrasyon düzeylerinin çoğunda aynı hücre grubunda pregabalin uygulanmayan kontrol grubuna göre anlamlı istatistiksel OD artışı oluşması bu ilacın deneylerimizde kullanılan meme kanseri hücre hattı ve bu hücre hatlarından elde edilen KKH üzerinde hücre canlılığını arttırıcı bir etkisi olduğunu göstermiştir (Grafik 2, 4 ,6, 8). Aynı hücre deney düzeneğinde, hem hiç bir ilaç uygulaması yapılmamış olan kontrol grubu hücrelerinin olması, hem de sitotoksik etkisi iyi bilinen ve meme kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılan Siklofosfamid (endoxan) adlı bir kanser ilacının da hücre canlılığı üzerine olan etkisinin test edilmesi ve siklofosfamidin sitotoksik etkisi ile hücre canlılığını azalttığının görülmesi bulgularımızın güvenilirliğini arttırmaktadır (Grafik 3,5,7,9).

Benzer bulgular, çalışma hipotezimizi test etmek üzere, ön deneylerimizde de saptanmıştır. Ancak sözü edilen ön deneylerde sadece MDA-MB-231 meme kanser hücreleri çalışılmış, kanser kök hücreleri üzerine testler yapılmamıştır. Aynı hipotez farklı zamanlarda test edildiğinde bulguların birbiri ile uyumlu olduğunun gözlenmesi, deneylerde kullanılan meme kanser hücrelerinde Pregabalin etken maddesinin proliferasyon yapıcı yönde sonuçlarının tutarlılığını göstermesi açısından da oldukça önemlidir.

Tez çalışmamızın tekrar yapılan deneyleri arasında yer alan MTT canlılık/proliferasyon testinin çalışmada kullanılan hücrelerde sonuçları incelendiğinde; MDA-MB-231 meme KH'de, proliferasyon deney sonuçlarına göre, en belirgin etki, 3, 10 ve 30 μ M ilaç verilen hücrelerin 48. saat ölçümlerinde saptanmıştır. 48. saatin sonunda ilaç uygulaması yapılmayan kontrol hücrelerinin 0.397 OD değerine karşın aynı saatte 3, 10 ve 30 μ M pregabalin uygulanan hücrelerin OD değeri sırası ile ortalama 0.921, 1.068, 1.016 ($p<0.0001$) olarak bulunmuştur. Kontrol hücrelerine göre en yüksek OD değişimi 10 μ M etken madde uygulanan hücrelerde saptanmıştır (Grafik 2). 72. saatte, 3 ve 10 μ M dozlarda kontrol grubuna (OD=0.461) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede OD artışı olmuştur (sırası ile 0.869, $p<0.001$ ve 0.706, $p<0.05$) ancak 72. saatte 3, 10, 30 μ M ilaç uygulaması yapılmış hücrelerde 48. saat değerlerine göre OD azalması saptanmıştır. 72. saatte kontrol hücrelerine (OD=0.461) göre, 3 μ M siklofosfamid uygulanan hücrelerde OD=0.202 ($p<0.05$) ve 30 μ M siklofosfamid uygulanan hücrelerde OD=0.087 ($p<0.0001$) olmak üzere OD değerlerinde belirgin azalma olmuştur (Grafik 3).

MDA-MB-231 KKH'de, 3 μ M Pregabalinin kontrol grubuna göre OD ölçümünü anlamlı düzeyde yükselttiği görülmektedir (Kontrol hücreleri ve 3 μ M pregabalin uygulanan hücrelerin OD değeri sırası ile 48. saatte, 1.425 ve 2.035 $p<0.05$; 72. saatte, 1.555 ve 2.382 $p<0.005$) (Grafik 4). 30 μ M siklofosfamid uygulanan hücrelerde 48. saatte, kontrol grubuna göre anlamlı bir OD düşüklüğü olduğu bulunmuştur (sırası ile 0.543 ve 1.425 $p<0.0001$) (Grafik 5). Sitotoksik etkisi bilinen Siklofosfamid uygulaması ile optik dansitenin azalması bu ilacın uygulandığı hücrelerde hücre canlılığında azalma olduğunu ve deney ortamının doğru çalıştığını göstermektedir.

MCF-7 meme kanser hücreleri üzerinde pregabalin ilacının, $\geq 3\mu$ M konsantrasyonlarda 48. ve 72. saatte OD artışı yaptığı gözlenmektedir ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildir. Özellikle 30 μ M konsantrasyondaki etken maddenin diğer dozlara göre daha etkin olduğu gözlenmektedir (kontrol ve 30 μ M pregabalinin etkisi ile OD değeri sırası ile 48. saatte; 0.378 ve 0.520; 72. saatte; 0.482 ve 0.686) (Grafik 6).

MCF-7 meme KKH üzerinde, 30 μ M pregabalin uygulanan hücrelerde kontrol grubuna göre 48. saatte istatistiksel olarak OD artışı gözlenirken (0.401 ve 0.638) (Grafik 8), 30 μ M siklofosfamid uygulanan hücrelerde 72. saatte OD değerlerinde

kontrol hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı azalma (0.564 ve 0.232 $p < 0.0005$) olduğunun gözlenmesi, pregabalinin meme KKH'nin proliferasyonunu arttırırken, siklofosfamidin meme KKH'nin proliferasyonunu inhibe ederek sitotoksik etkili olduğunu göstermektedir (Grafik 9).

Bu bulgu, pregabalin ve siklofosfamidin kombine edilerek uygulandıkları bir deney ortamında pregabalinin olası proliferatif etkisinin, Siklofosfamidin tümör hücrelerinin hücre öldürücü etkisini azaltabileceği ile ilgili yeni araştırma sorularını akla getirmektedir (Grafik 9).

İki ayrı meme KH karşılaştırıldığında, tüm saatlerde, her iki kanser hücre hattında da ilaç uygulanmayan kontrol hücrelerinin benzer çoğalma yanıtı verdiği görülmüştür. Pregabalin maddesi uygulanmasından 48 ve 72 saat sonra MDA-MB-231 KH hücre gruplarında kontrol gruplarına göre belirgin OD artışı vardır. MDA-MB-231 kanser hücre gruplarının ilaç uygulamasına verdiği proliferasyon yanıtı MCF-7 hücrelerine göre yaklaşık iki kat daha fazladır (Grafik 10). Bu sonuçlar, aynı dokuya ait farklı kanser hücrelerinin kullanılan ilaçlara da farklı yanıt verebileceğini düşündürmektedir. İlaç etkisine hücre düzeyinde yanıtın farklı oluşu, kanser hücre tiplerinin, fenotipik/histolojik özelliklerinin ve/veya moleküler yapılarının farklı olmasından da kaynaklanabilir. *In vitro* olarak planlanan yeni çalışmalarda bu etki mekanizmasının moleküler düzeyde aydınlatılması yararlı olabilir.

Ayrıca, elde ettiğimiz sonuçlar, kanser tedavisinin gelecekte kişiye özel tedaviye dönüştürülüp, hastaların operasyonda çıkarılan dokusundan elde edilen kanser hücrelerinde ve kanser kök hücrelerinde, tedavide kullanılacak olan ilaçların etkinliğinin ve birbirleri ile etkileşimlerinin incelenmesinin kanser hastalarının sağ kalımını arttırmada ve invazyon, metastaz ve rekürrensten korunmasını sağlamada yararlı olabileceğini düşündürmektedir. Bu alanda yeni çalışmalara gereksinim vardır.

İki ayrı meme KKH karşılaştırıldığında (Grafik 11), MDA-MB-231 KKH'nin ilaç uygulaması yapılmayan kontrol hücrelerinde de proliferasyon yanıtının MCF-7 KKH'ne göre çok yüksek olduğu görülmüştür. Her iki kök hücre grubunda da birinci günün sonunda bulunan hücre yoğunluğuna paralel olarak saptanan OD değerleri, inkübasyon süresi uzadığında artmıştır. Ancak 48. saatte görülen bu OD artışı oranının 72. saatte düştüğü görülmüştür. Bu durum çok hızlı çoğalan MDA-MB-231 KKH'nin,

ilerleyen saatlerde plakta yer kalmaması nedeniyle çoğalmaya devam edememiş olabileceğini de düşündürmektedir. Ortamda bulunan besin maddelerinin de hücre sayısı artışı ile ilişkili olarak tükenmiş olabileceği ve hücrelerin besin bulamaması nedeni ile hücre sayısının daha fazla artış gösteremediği de düşünülebilir. Bu bulgulara dayanılarak, bu tür çalışmalarda aynı kuyucuklara daha az sayıda hücre ekilerek, veya daha büyük hacimde olan 24 kuyucuklu plaklar kullanılarak deney ortamının değişkenlerinin değiştirilmesi ve deneylerin bu ortamlarda tekrarlanması gerektiği söylenebilir.

MDA-MB-231 KKH ve MDA-MB-231 KH karşılaştırıldığında, KKH'nin daha fazla çoğaldığı görülmüştür. Etken maddenin, $\geq 3 \mu\text{M}$ olan tüm konsantrasyonlarında istatistiksel olarak çok anlamlı bir fark oluşmuştur (Grafik 12, 13). Bu hücre tipinde bulduğumuz bu bulgular, kanser kök hücrelerinin kanser hücresine göre, bazı ilaçlardan daha fazla etkilenebileceği ve daha fazla proliferere olabileceği ile ilişkili hipotezimizi desteklemektedir. Etken maddenin, 48 saat inkübasyon sonrasında KKH ve KH üzerine etkileri karşılaştırılırsa, $3 \mu\text{M}$ ilaç uygulaması ile, sırası ile KKH OD=2.035 ve KH OD=0.920 ($p<0.0001$), $10 \mu\text{M}$ ilaç uygulaması ile KKH OD=1.831 ve KH OD=1.068 ($p<0.005$), $30 \mu\text{M}$ ilaç uygulaması ile KKH OD=1.936 ve KH OD=1.016 ($p<0.0001$) olarak bulunmuştur. 72 saat inkübasyon sonrasında, ilaç uygulanmayan kontrol hücrelerinin arasında KKH'nin (OD=1.555) KH'ne (OD=0.461) göre OD'si yüksek bulunmuştur ($p<0.005$). 72. saatte, farklı konsantrasyondaki etken maddenin KKH ve KH üzerine etkisi, tamamında istatistiksel anlamlılık $p<0.0001$ düzeyinde olmak üzere, sırası ile $3 \mu\text{M}$ etken madde ile KKH OD=2.382 ve KH OD=0.869, $10 \mu\text{M}$ ile KKH OD=2.036 ve KH OD=0.706, $30 \mu\text{M}$ ile KKH OD=1.860 ve KH OD=0.410 olarak bulunmuştur (Grafik 12, 13).

MCF-7 KKH ve KH karşılaştırıldığında ise, KKH'nin Pregabaline verdiği yanıt KH'nin yanıtından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptanmamıştır (Grafik 14).

Pregabalinin proliferatif etkisi, *wound healing* (WH) test adı verilen yara iyileşmesi ya da hücre motilitesi/migrasyonu göstergesi olan deneyler ile de test edilmiş ve özellikle $30 \mu\text{M}$ konsantrasyonlarda uygulanan pregabalinin, 24. saatten itibaren ilaçsız kontrol grubuna göre anlamlı hücre çoğalması yaptığı, yara oluşturulmak üzere plak tabanına çizilen çizgi hattını hücrelerin göç ederek doldurmaya başladığının gözlenmesi ile

belirlenmiştir. Nitekim, aynı deney koşullarında, ilaçsız kontrol grubu yanısıra pozitif kontrol grubu olarak da sitotoksik etkili siklofosfamidin uygulandığı bir grup da oluşturduğumuzdan, siklofosfamid uygulanan plakta oluşturulan yaranın açık kalması/kapanmaması kanser hücrelerinin çoğalarak göç edip boşluğu dolduramadığını göstermekte ve ilacın sitotoksik etkisini kanıtlamaktadır (Şekil 15,16).

WH olarak adlandırılan, migrasyon/motilite testlerinde, 30 μ M pregabalinin 24. saatten itibaren meme kanser hücreleri ve CD44⁺/CD24⁻/CD133⁻ MDA-MB-231 KKH ve CD44⁺/CD24⁻/CD133⁻ MCF-7 KKH'lerinin proliferasyonunu arttırırken, sitotoksik kanser ilacı siklofosfamidin aynı dozda (30 μ M) 72. saatte maksimum olmak üzere, 48. saatten itibaren artan oranlarda, kanser kök hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir (Şekil 15,16). Bu bulgu da, klinikte pregabalinin siklofosfamid ile kombine edilerek kullanıldığı tedavi uygulamalarında, pregabalinin siklofosfamidin antitümoral etkisini etkileyebileceği konusundaki yeni hipotez sorumuzu destekler görünmektedir. Bu konunun araştırılması gerekliliği aşıkardır.

WH deneyimizin bulgularına göre, deneyimizde çalışılan kanser kök hücrelerinin motilitesi/migrasyonu ve yarayı kapatma eğiliminin kanser hücrelerinden daha fazla oluşu da KKH'nin metastaz ve invazyondan sorumlu olduğunu bildiren çalışmalarla (Taurin, S., 2020; El Sahli, S., 2021) uyumludur (Şekil 15,16).

Programlanmış hücre ölümü apoptozun gösterilmesi için kullanılan AnnexinV ve hücrelerdeki nekroz varlığını tanımlamak üzere kullanılan PI ile yapılan, AnnexinV/PI apoptosis-nekroz testinin sonuçlarına göre, 30 μ M Pregabalin uygulaması ile hücrelerde nekroz saptanmamış, kontrol gruplarına göre daha az olmak üzere erken apoptozis bulgularına rastlanmıştır. Pregabalin uygulanan gruplarda, canlı hücre oranları kontrol grubundan daha yüksek olarak saptanmıştır (Şekil 17, 18, Tablo 9, Grafik 15, 16). Kontrol grubu ve pregabalin uygulanan gruplarla kıyaslanınca, 30 μ M Siklofosfamid uygulaması ile hücrelerde apoptozis oranının yüksek bulunması kanser tedavisinde kullanılan bu ilaç için beklenen bir bulgudur. Pregabalin uygulanan hücrelerde AnnexinV/PI sonuçlarına göre canlı hücre oranının kontrol ve siklofosfamid gruplarına göre daha yüksek oluşu pregabalinin, hücreler üzerinde canlılığı/proliferasyonu arttırıcı etkisinin olduğunu desteklemektedir (Grafik 15,16, Tablo 9).

Çalışmalarımız sırasında yapılan MTT, WH ve apoptoz deneylerinin 48. saatteki sonuçları birlikte değerlendirildiğinde Pregabalin etken maddesinin hücreler üzerine etkisi ile ilgili test sonuçları uyumlu olarak bulunmuştur (Şekil 19).

İlaç uygulamalarının ardından, 24 saat inkübasyon süresi sonunda, pregabalin ilaç uygulaması yapılan hücrelerin, hiç ilaç verilmeyen kontrol hücre grubuna göre MTT sitotoksikite/canlılık testi sonucunda spektrofotometrik olarak bulunan OD değerlerinin benzer olması, bu ilaçların bu konsantrasyonlarda hücre üzerine sitotoksik etkisi ya da apoptotik etkisinin 24 saatte oluşmadığını düşündürmektedir (Grafik 2,4, 6,8).

48 saatlik inkübasyon sonrasında pregabalinin özellikle 3, 10, 30 μ M konsantrasyonlarının hücre canlılığı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırıcı yönde etkisi olması (Grafik 2,4, 6,8) bu çalışmaların farklı konsantrasyonlarda pregabalin uygulanarak tekrarlanmasının, tekrarlanabilirliğinin kanıtlanmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır. 72 saatlik ilaç etkisine maruz kalma süresinde ise MDA-MB-231 KH ve KKH'de pregabalinin 30 μ M konsantrasyonunda ilaç uygulaması yapılan hücre gruplarında, hücre canlılığının azalmaya başlaması, bu hücreler üzerinde yüksek konsantrasyonda uzun süre maruziyetin hücre canlılığını azaltmaya başladığını düşündürebilmektedir (Grafik 2,4).

Pregabalin ve kök hücre çalışmaları ile ilişkili olarak Waganer ve arkadaşları tarafından kanser hastalarında pregabalinin ağrı kesici olarak kullanılması ve etkileri ile ilgili yapılan bir çalışmada, pregabalinin osteoblastlar, mezenkimal kök hücreler ve osteosarkom hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin olup olmadığı araştırılmıştır. Bu çalışmada, pregabalin ve diğer gabapentinlerin özellikle kemik fraktürüne sebep olma potansiyeli üzerine araştırmalar yapılmıştır. Osteoblastik aktivitenin göstergesi olarak Alkalen Fosfataz analizi yapılırken hücre üzerine etkilerinin değerlendirilmesi için çalışmamıza benzer şekilde XTT ile sitotoksikite analizi yapılmıştır. Proliferasyon göstergesi olarak hücre sayımı yapılmıştır, osteojenik diferansiyasyon histokimyasal olarak incelenmiştir (Waganer, N., 2022).

Wagener ve arkadaşlarının bu çalışmasında pregabalin etken maddesinin kemikte osteoblastları prolifer edici yönde metabolik etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada, osteoblast hücreleri, terapötik plazma konsantrasyonları olarak tanımladıkları 0.0-40.0 μ g/mL pregabalin ile inkübe edilmiştir. Bizim çalışmamızda kullanılan ilaç düzeylerine göre (0.3-30 μ M ilaç düzeyi=0.047-4.761 μ g/mL) hem

benzer aralıktaki dozları hem de yaklaşık on kat daha fazla konsantrasyonlardaki ilaç uygulama dozlarını kullanmışlardır. Waganer ve arkadaşlarının çalışmasında insanlardan elde edilen osteoblastik hücreler ve mezenkimal kök hücreler üzerinde ilaç etkileri araştırılmıştır. Pregabalinle muamele edilen mezenkimal kök hücrelerde ve diğer osteoblastik hücrelerde günler içerisinde ilacın hücre sayılarını arttırdığı belirlenmiştir. Bu çalışmada, tezimizden farklı olarak, mezenkimal kök hücreler üzerinde çalışılmış, kanser kök hücreleri kullanılmamıştır. Çalışmamızın sonuçlarına benzer şekilde Pregabalinin hücreler üzerinde proliferatif etkisi olduğu bildirilmiştir (Waganer, N., 2022).

Ratlarda yapılmış bir *in vivo* çalışmada, nöropatik ağrı tedavisinde pregabalin ile birlikte mezenkimal kök hücrelerin uygulanmasının ağrıyı gidermede tek başına pregabalin kullanımına göre üstünlüğünün olup olmadığı araştırılmıştır (Muhammed YS., 2021). Bu çalışmaların her ikisi de pregabalinin kanser kök hücresi ve kanser hücresi üzerine sitotoksik ya da proliferatif etkisi araştırılmamış ve tartışılmamış olduğundan bizim çalışmamız bu alanda yapılan ilk kanser kök hücresi araştırmasıdır. Türk araştırmacılar tarafından yapılan bir başka çalışmada, insan glioblastoma hücreleri üzerine oxaliplatinin oluşturabileceği sinir hasarı ve pregabalinin nöroprotektif etkisi araştırılmıştır (Ataizi, ZS., 2020). Bu çalışmada oxaliplatin ve oxaliplatin-pregabalin uygulanan glioblastoma hücre hattında transient reseptör vanilloid 1 kanalları araştırılmıştır. Glioblastoma hücreleri üzerine pregabalinin sitotoksik ya da proliferatif etkisi ile ilgili değerlendirmeler bu çalışmada bulunmamaktadır.

Çalışmamızda bizden önceki bu çalışmalardan farklı olarak pregabalin maddesinin, hücre ölümü/nekrozu ya da çoğalması üzerine etkisi araştırılmak istenilmiştir. Cerrahi prosedüre girmiş olsa bile cerrahi olarak tam alınamamış ve bazı tümör hücrelerinin halen mevcut olduğu, ya da kanser kök hücrelerinin doku ya da dolaşımda halen mevcut olduğu vakalarda, bu ilaçların klinik olarak nöropatik ağrıyı azaltma etkisi için kullanılırken güvenilirliğini belirleyebilmek amaçlanmıştır. Bu konuda kanser hücresi ve özellikle kanser kök hücresi üzerinde Pregabalin etken maddesinin etkisini gösteren daha önce yapılmış benzer çalışma bulunmadığından, uygulanmış olan ilaç konsantrasyonları öncelikle geniş bir aralığı kapsayacak şekilde 0.3, 1, 3, 10 ve 30 μM olarak belirlenmiştir. Manandhar ve Waganer'in çalışmasında da benzer konsantrasyonlar kullanılmıştır (Manandhar, P., 2021; Waganer, N., 2022).

Ancak, literatürde, Pregabalinden farklı bazı etken maddelerin meme kanseri hücreleri ve kök hücreleri üzerindeki sitotoksik ya da proliferatif etkilerini belirlemek üzere çalışmalar yapıldığı görülmüştür (Koçak, N., 2017; Çelik, F., 2019).

Koçak ve arkadaşları, meme kanseri kök hücrelerinde fentanilin apoptozisi indükleyerek tümör oluşumunu baskıladığı yönündeki veriler elde ettikleri çalışmalarında, meme kanser hücreleri üzerine fentanilin 10, 15, ve 20, μM dozlarını uygulamışlardır (Koçak, N., 2017). Koçak ve arkadaşlarının çalışmalarında bizim çalışmamıza benzer şekilde FACS Aria III cihazı ve hücre yüzey belirteci CD44 ve CD24'e karşı antikolar kullanılarak meme kanser hücrelerinden meme KKH elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada fentanilin meme kanser hücreleri üzerine EC50 dozunu 20.0 μM olarak tanımlamışlardır. Apoptoz testlerinde ise Fentanil uygulanan meme kanser hücrelerinin % 8.15 oranında apoptozise uğradığını, kontrol grubunda apoptosis değerinin % 4.5 olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda, ilaç etken maddesi olarak Pregabalinin apoptosis değerleri Koçak ve arkadaşlarının çalışmalarına göre daha yüksek çıkmıştır. Ancak kontrol grubumuzun apoptosis değerleri de Koçak ve ekibinin kontrol grubu sonuçlarına göre yüksek olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, Koçak ve arkadaşlarının bulgularından farklı olarak, bizim çalışmamızda Pregabalinin apoptotik etkilerinin ön planda olduğu söylenemez.

Pregabalin ve gabapentinin etkilerini insan μ reseptörü ile transfekte edilmiş HEK 293 hücrelerinde değerlendirilen bir makalede, gabapentinoid ilaç grubundan olan pregabalin ve gabapentin ilaçlarının her biri 1 μM ve 100 μM dozlarda uygulanmıştır. Sonuçta, Gabapentinin 1 μM pregabalinin forskolin uyarılı cAMP üretiminin inhibisyonunu etkilemediği, bununla birlikte, 100 μM pregabalinin forskolin aracılı cAMP üretimini güçlendirdiği görülmüştür (Manandhar, P., 2021). Bu makalenin sonuçları, pregabalinin cAMP üretimini arttırdığını göstermektedir. Hücrede cAMP düzeyinin artışının hücrenin metabolik aktivitelerini artırma ve hücre canlılığını ve proliferasyonunu artırma yönünde etkileri olabilir. Bizim çalışmamızda da MTT testlerinde 1 μM pregabalinin hücreler üzerinde kontrol grubuna kıyasla absorbans artışı ya da azalması yönünde bir etkisi olmadığının belirlenmesi bu çalışma ile uyumludur.

Çalışmamızın bulguları, pregabalinin kanser hücreleri ve kanser kök hücreleri üzerine proliferatif etkisi var mıdır yönündeki hipotezimizi desteklemektedir. Bundan sonra, bu konu ile ilgili devam edecek yeni çalışmalarda, meme kanseri ve diğer kanser hücre

dizileri ve kanser kök hücreleri üzerine, farklı pregabalin konsantrasyonları uygulanarak yeni verilerin elde edilmesi pregabalinin kanser hücreleri ve kök hücreleri üzerine proliferatif etkisi var mıdır sorusunun yanıtını kesinleştirmek için uygun olacaktır ve daha sonra *in vivo* hayvan çalışmalarına geçilerek test edilmesi gerekliliği de söz konusu olabilecektir.

Xavier ve arkadaşlarının çalışmalarında, oral kaviteye uygulamak üzere jel formunda hazırlanan pregabalin preparatının, fibroblast hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermediği ve güvenli olduğu ile ilgili bir bildirim yapılmıştır (Xavier, GMB., 2024). Pregabalinin kansere bağlı nöropatik ağrı tedavisinde kullanıldığı birkaç çalışmada (Lyndon, A., 2017; Morrison, EE., 2017; Lacobucci, G., 2017), pregabalinin ağrının bazı semptomlarını gidermede yararlı olduğu bildirilmiştir. Wang ve arkadaşları 2017 yılında yayımladıkları bir çalışmalarında, pregabalinin nöropatik ağrıda ilk tercih edilen ağrı kesici olduğunu, bunun yanında klinisyenlerin bu ilaçla tedavi yönetimleri sırasında, artan yan etki bildirimlerine dikkat etmeleri gerektiğini vurgulamışlardır (Wang, Y., 2017).

Bu nedenle, pregabalini kanser hücrelerinde farklı bir açıdan değerlendiren ve proliferasyon ya da apoptoza yönlendirme yönünde etkisi olup olmadığını meme kanser hücreleri ve meme KKH üzerinde *in vitro* modelde araştıran ilk çalışma olması çalışmamızın özgünlüğünü göstermektedir.

Pregabalinin Akt/GSK3 β /Katenin sinyal yolu aracılığı ile retinal iskemi/reperfüzyon hasarında retinal ganglion hücrelerinin canlı kalmasını sağladığını bildiren Xu ve arkadaşlarını çalışmasına göre pregabalin retinal iskemiden korumaktadır. Bu etkinin pregabalinin retina üzerinde hücreleri koruyucu potansiyeli ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Xu, J., 2022). Pregabalinin kanser ve kanser kök hücreleri üzerine etkisini incelemek üzere planlayacağımız yeni çalışmalarımızda, moleküler düzeyde etki mekanizmalarını aydınlatacak deney düzeneklerinin de kurulması hedeflenmektedir. Apoptozis, anjiyogenez ve neo vaskülarizasyon, invazyon, metastaz kanıtlarını sağlayabilecek olan P53, Bax, Bcl, VGEF, TGF, WNT ve katenin ve bunun gibi sinyal yollarının pregabaline verdikleri yanıtların araştırılması, pregabalinin proliferatif etkisi konusundaki soruların yanıtı için farklı kanser hücre hatlarında da çalışma yapılması yararlı görünmektedir.

Agresif kök hücrelerden zengin meme kanseri olgularında kullanılacak pregabalinin *in vivo* olarak uygun dozunun belirlenerek, hastaların meme kanseri nöropatik ağrısı için yarar sağlarken kanser hücrelerinin artışına yol açılarak zarar verilmemesi önemlidir. Bu çalışmanın sonuçları bu konuda bir farkındalık oluşturmak üzere kullanılabilir.

Bu araştırmamızda, meme kanserinde iki farklı hücre hattı kullanılarak ve aynı anda bu hücrelerden izole edilen kanser kök hücrelerinin üzerinde de eş zamanlı olarak, pregabalinin hücre canlılığı, migrasyonu, çoğalması üzerine etkileri değerlendirilerek kanser hücresi ve kök hücresi üzerindeki deney sonuçlarının bir arada yorumlanabilmesi sağlanmıştır.



Sonuç ve Öneriler

Tez çalışmamızda, kanser ağrısının giderilmesinde yaygın olarak kullanılan gabapentinoid grubu ilaçların kanser hücresi ve KKH üzerine etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Pregabalin etken maddesi saf madde olarak temin edilebildiğinden, deneylerimizde gabapentinoid grubu ilaçlardan sadece Pregabalin etken maddesinin iki farklı meme kanser hücre dizisi ve bu hücrelerden elde edilen meme kanser kök hücreleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Deneylerimizde, pregabalin adlı etken maddenin 0.3, 1, 3, 10 ve 30 μ M konsantrasyonları kullanılmış, böylece ilk konsantrasyona göre 100 kat artan geniş bir aralıkta etken maddenin etkisi test edilebilmiştir. Ayrıca, hücre canlılığı ile ilgili testler 24, 48 ve 72 saatlerde yapılmış, böylece hücre üzerindeki etkisinin zaman içindeki değişimi gözlenebilmiştir. Bunun yanında, deneylerde iki ayrı meme kanser hücresi ve bunlardan elde edilen kök hücreler kullanılarak, dört ayrı hücre grubunda etken maddenin test edilmesi sağlanmıştır. Çalışmamız sırasında kanser hücrelerinden kanser kök hücrelerinin elde edilmesi ve pregabalinin kök hücreler üzerindeki etkinliğinin ilk kez gösterilebilmesi özgün bir çalışma olması açısından önemlidir. Araştırmamızda kullanılan meme kanseri kök hücrelerinin Pregabaline verdiği yanıtın kanser hücrelerinden farklı olması da hipotezimizi desteklemekte ve ilaç etkilerini araştırmada kanser kök hücresi üzerine etkilerinin de incelenmesi gerekliliğine işaret etmektedir.

Çalışmamızın sonuçlarına göre, pregabalin etken maddesinin farklı konsantrasyonlarında ve farklı inkübasyon sürelerinde hücre topluluğu üzerine etkisi ile oluşturduğu metabolik etki, ilaç uygulaması yapılmamış olan kontrol grubu hücrelerine göre canlılığın artması yönündedir. Bu durum, hücre canlılığının bu ilacın bazı konsantrasyonları ile arttığını, dolayısı ile proliferatif bir etkisi var mıdır yönündeki hipotezimizi desteklediğini göstermektedir. Ancak, mutlaka, etken maddenin daha dar konsantrasyon aralıklarında ve farklı konsantrasyonlarda kullanıldığı yeni deneyler yaparak hipotezin ardışık çalışmalarla test edilmesi yararlı olacaktır.

Deneylerimiz sırasında, aynı ortam koşulları altında hücre kültürü yapılan kanser kök hücrelerinin ve MDA-MB-231 ve MCF-7 kanser hücrelerinin kültür plaklarındaki çoğalma yanıtları da farklı olmuştur. İki farklı kanser hücresinden elde edilen kök hücrelerin de çoğalma hızlarının birbirinden farklı olduğu belirlenmiştir. MDA-MB-231 kanser kök hücreleri daha fazla proliferasyon olduğundan, hücre kültürleri sırasında daha fazla pasaj gerektirmiştir.

Proliferatif etkisinin doz artışı ile uyumlu olarak daha da arttığının gözlenmesi, nöropatik ağrı gibi kansere bağlı ağrıların tedavisinde kullanılan Pregabalin gibi ilaçların kanser hücreleri ve KKH üzerindeki güvenilirliğinin test edilmesi gerekliliğini göstermiştir. Bu alanda yapılacak yeni çalışmalarla kanıta dayalı bilgilerin artırılması ve klinik yararlanıma sunulması gerekli görünmektedir.

Farklı fenotiplere sahip hücreler Pregabalin etken maddesine farklı düzeyde çoğalma yanıtları oluşturmuştur. MDA-MB-231 KH ve KKH'nin proliferasyon yanıtları MCF-7 KH ve KKH'ne göre daha anlamlı olarak yüksektir. Bunun yanında MDA-MB-231 KKH'nin KH'ne göre yanıtı da daha fazladır. Bu bulgu kök hücrelerin proliferasyon kabiliyetinin ve dolayısı ile invazyon, metastaz özelliğinin daha fazla olması ile ilgili bilgileri desteklemektedir.

Bu bulgulara dayanılarak özellikle bazı kanser kök hücrelerinin ilaç etkilerine daha duyarlı oldukları söylenebilir. Bizim çalışma sonuçlarımızda olduğu gibi, kullanılacak etken maddenin hücre metabolizmasını hızlandırıcı yönde bir etkisi var ise, tedavinin güvenliği açısından bu durumun açıklığa kavuşturulması oldukça önemlidir. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış Pregabalin etken maddesinin, aynı kanser hücre hattında tekrar çalışılması yanısıra, farklı kanser hücre hatları ve onlardan ayrıştırılan KKH'leri üzerinde de yeni çalışmalar yapılmasına gereksinim vardır.

Tez çalışması olarak yaptığımız çalışmamızın bulgularına dayanılarak, bu konu üzerinde yapılan çalışmalarımızın devam etmesi gerektiği, hipotezimizin verilerle desteklendiği, bu alanda yapılacak çalışmaların sonuçlarının tıp alanında klinisyenin tedavi yaklaşımına katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Yeni planlanacak olan çalışmalarımıza proliferasyon ve neovaskülarizasyon ile ilgili moleküler düzeyde araştırmaların da eklenmesi ile etiopatogenezin aydınlatılması hedeflenmektedir.

Meme kanseri hastasında nöropatik ağrı tedavisinde klinik yaklaşım için önerimiz, hastada bulunan meme kanserinin histolojik tipi, yüzey belirteçleri, mutasyona uğrama özelliklerinin belirlenmesi ve bunların dikkate alınarak, Pregabalin kullanılmasına karar verilmesi yönündedir.



Kaynaklar

Abdel Shaheed, C., Hayes, C., Maher, CG., Ballantyne, JC., Underwood, M., McLachlan, AJ., Martin, JH., Narayan, SW., Sidhom, MA. 2024. "Opioid analgesics for nociceptive cancer pain: A comprehensive review" *CA Cancer J Clin.* 74(3):286-313. doi: 10.3322/caac.21823. Epub 2023 Dec 18. PMID: 38108561 Free article. Review.

Abou-Kassem, D., Kurita, GP., Sjøgren, P., Diasso, PDK. 2022. "Long-term opioid treatment and endocrine measures in patients with cancer-related pain: a systematic review." *Scand J Pain.* 22;22(3):421-435. doi: 10.1515/sjpain-2021-0196. Print 2022 Jul 26. PMID: 35316595 Free article.

Ades, F., Zardavas, D., Bozovic-Spasojevic, I., Pugliano, L., Fumagalli, D., De Azambuja, E., Viale, G., Sotiriou, C., Piccart, M. 2014. "Luminal B breast cancer: molecular characterization, clinical management, and future perspectives". *J Clin Oncol*, 32 :2794–803 .

Al-Hajj, M., Wicha, MS., Benito-Hernandez, A., Morrison, SJ., Clarke, MF. 2003. "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells", *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(7), 3983-8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12629218> doi: 10.1073/pnas.0530291100. Epub 2003 Mar 10.

Allison, MR., Lim, SM., Nicholson, LJ. 2011. "Cancer stem cells: problems for therapy?", *J Pathol*, 223(2), 147-161.

Allison, KH., Hammond, MEH., Dowsett, M., Mc Kernin, SE., Carey, L., Fitzgibbons, PL., Hayes, DF., Lakhani, SR., Chavez-MacGregor, M., Perlmutter, J. 2020. "Estrogen and progesterone receptor testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Update". *J. Clin. Oncol.* 2020; 38 (12):1346–66 .

Anderson, WF., Jatoi, I., Tse, J., Rosenberg, PS. 2010. "Male breast cancer: a population-based comparison with female breast cancer". *J Clin Oncol*, 28 :232–9 .

Angus, J., Cumpston, A., Veltri, L., Ross, KG., Wen, S., Dillaman, M. 2021. "Toxicity assessment of concurrent gabapentin/pregabalin administration with high-dose melphalan in autologous hematopoietic cell transplant recipients". *Support Care Cancer*, 29(12):7925-7930. doi:10.1007/s00520-021-06385-5

Ataizi, Z.S., Ertlav, K. 2020. "Pregabalin reduces oxaliplatin-induced oxidative neurotoxicity through modulation of TRPV1 channels in DBTRG neuronal cell line", *Anti-Cancer Drugs*, 31(7),728-36.

Awasthi, H., Vohra, A. 2023. "Delirium following pregabalindiscontinuation in an individual with no psychiatric or substance use history." *BMJ Case Rep.* 17;16(11):e258104. doi: 10.1136/bcr-2023-258104.PMID:37977830

Azmi, S., ElHadd, KT., Nelson, A., Chapman, A., Bowling, FL., Perumbalath, A., Lim, J., Marshall, A., Malik, RA., Alam, U. 2019. "Pregabalin in the Management of Painful Diabetic Neuropathy: A Narrative Review. " *Diabetes Ther.* 10(1):35-56. doi: 10.1007/s13300-018-0550-x. Epub 2018 Dec 18.PMID: 30565054.

Baccelli, I., Trumpp, A.J. 2012. "The evolving concept of cancer and metastasis stem cells." *Cell Biol*, 6;198(3):281-93. doi:10.1083/jcb.201202014.PMID: 22869594

Balic, M., Thomssen, W., Würstlein, R., Gnant, M., Harbeck N. 2019. St. Gallen/Vienna 2019: a brief summary of the consensus discussion on the optimal primary breast cancer treatment. *Breast Care*, 14 :103–10 .

Bao, S., Wu, Q., McLendon, RE., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D, Rich, J.N. 2006. "Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response", *Nature*, 7;444(7120),756-60. doi: 10.1038/nature05236. Epub 2006 Oct 18.

Barltrop, J.A., Owen, T.C., Cory, A.H., Cory, J.G. 1991. "5-(3-carboxymethoxyphenyl)- 2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1,611-614.

Bensimon, J., Altmeyer-Morel, S., Benjelloun, H., Chevillard, S., Lebeau, J. 2012. "CD24⁺/low stem-like breast cancer marker defines the radiation-resistant cells involved in memorization and transmission of radiation-induced genomic instability". *Oncogene* (32), 251-258.

Bertucci, F., Finetti, P., Birnbaum, D. 2012. "Basal breast cancer: a complex and deadly molecular subtype." *Curr Mol Med.* 12(1):96-110. doi: 10.2174/156652412798376134. PMID: 22082486

Bialik, S., Zalckvar, E., Ber, Y., Rubinstein, AD., Kimchi, A. 2010. "Systems biology analysis of programmed cell death." *Trends Biochem Sci*, 35(10):556-64. doi: 10.1016/j.tibs.2010.04.008. Epub 2010 May 28. PMID: 20537543 Review.

Boesch, M., Zeimet, A.G., Fiegl, H., Wolf, B., Huber, J., Klocker, H., Gastl, G., Sopper, S., Wolf, D. 2016. "High prevalence of side population in human cancer cell lines", *Oncoscience*, 3(3-4),85-87.

Bonnet, U., Scherbaum, N. 2017. "How addictive are gabapentin and pregabalin?" A systematic review, *Eur Neuropsychopharmacol*, 27,1185-1215.

Brabletz, T., Jung, A., Spaderna, S., Hlubek, F., Kirchner, T. 2005. "Opinion: Migrating cancer stem cells-Anintegrated concept of malignant tumour progression". *Nat. Rev. Cancer*, 5, 744–749.

Bray F , Ferlay J , Soerjomataram I , Siegel RL , Torre LA , Jemal A . 2018. "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality world wide for 36 cancers in 185 countries". *CA Cancer J Clin* 68 :394–424.

Brozović, G., Lesar, N., Janev, D., Bošnjak, T., Muhaxhiri, B. 2022. "Cancer Pain And Therapy". *Acta Clin Croat.* 61(Suppl 2):103-108. Doi:10.20471/Acc.2022.61.S2.13. Pmid: 36824638 Free Pmc Article. Review.

Bruce, W.R., Van Der Gaag, H. 1963. "A Quantitative Assay For The Number Of Murine Lymphoma Cells Capable Of Proliferation In Vivo", *Nature*, 199:79–80. Available from

<http://www.nature.com/nature/journal/v199/n4888/abs/199079a0.html>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1404795414>;32(21),2255-2269.

Calandre, E.P., Villademoros, F.R., Slim, M. 2016. "Alpha2delta ligands, gabapentin, pregabalin and mirogabalin: A review of their clinical pharmacology and therapeutic use." *Expert Rev Neurother*,16(11),1263-1277. doi: 10.1080/14737175.2016.1202764. Epub 2016 Jul 7

Cancer CGoHFiB. 2019. "Type and timing of menopausal hormone therapy and breast cancer risk: individual participant meta-analysis of the worldwide epidemiological evidence". *Lancet*, 394 :1159–68 .

Carioli, G., Malvezzi, M., Rodriguez, T., Bertuccio, P., Negri, E., La Vecchia, C. 2017. "Trends and predictions to 2020 in breast cancer mortality in Europe". *Breast*, 36 :89–95 .

Chapman, EJ., Edwards, Z., Boland, JW., Maddocks, M., Fettes, L., Malia C, Mulvey MR., Bennett, MI. 2020. "Practice review: Evidence-based and effective management of pain in patients with advanced cancer." *Palliat Med*. 34(4):444-453. doi: 10.1177/0269216319896955. Epub Jan 24. PMID: 31980005 Free article. Review.

Charafe-Jauret, E., Ginestier, C., Iovino, F., Wicinski, J., Cervera, N., Finetti, P., Hur, M.-H., Diebel, M.E., Monville, F., Dutcher, J., et al. 2009. "Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature". *Cancer Res*. (69), 1302-1313.

Chavez, KJ., Garimella, SV., Lipkowitz. 2010. "Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer". *Breast Dis*, 2010. 32(1-2):35–48.

Chen, WY., Rosner, B., Hankinson, SE., Colditz, GA., Willett, WC. 2011. "Moderate alcohol consumption during adult life, drinking patterns, and breast cancer risk". *JAMA*. 306 :1884–90

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast C Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet Oncol*, 2012,13 :1141–51 .

Collins, A.T., Berry, P.A., Hyde, C., Stower, M.J., Maitland, N.J. 2005. “Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells”, *Cancer Res*, 65(23),10946-10951.

Crabtree, J.S., Miele, L. 2018. “Breast cancer stem cells”. *Biomedicines* (6), 77.

Cserni G. 2010. “ Histological type and typing of breast carcinomas and the WHO classification changes over time”. *Pathologica-J Ital Soc Anat Pathol Diagn Cytopathol*. 112 :25–41 .

Cumpston, A.J.A., Veltri, L., Ross, K.G., Wen, S., Dillaman, M. 2021. “Toxicity assessment of concurrent gabapentin/pregabalin administration with high-dose melphalan in autologous hematopoietic cell transplant recipients.” *Supportive Care in Cancer*, 29(12),7925-7930.doi: 10.1007/s00520-021-06385-5. Epub 2021 Jun 30.

Çelik, F., Duran, T. 2019. “Effect of fentanyl on pancreatic cancer cell proliferation and cancer stem cell differentiation”. *Cellular and Molecular Biology*, 65(7),21-25.

Dai, J., Teng, L., Zhao, L., Zou, H. 2021. “The combined analgesic effect of pregabalin and morphine in the treatment of pancreatic cancer pain, a retrospective study.” *Cancer Med*, 10(5):1738-1744. doi: 10.1002/cam4.3779. Epub 2021 Feb 16.PMID: 33594813 Free PMC article.

Davies, C., Godwin, J, Gray, R., Clarke, M., Cutter, D., Darby, S., Mc Gale, P., Pan, H.C., Taylor, C., Wang, Y.C., Dowsett, M., Ingle, J., Peto, R. 2011. “Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials”, *Lancet*, 27;378(9793),771-784.

De Beça, F.F., Caetano, P., Gerhard, R., Alvarenga, C.A., Gomes, M., Paredes, J., Schmitt, F. 2013. “Cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1 in breast cancer special histological types”. *J. Clin. Pathol.* (66), 187-191.

Dick, J.E. 2009. "Looking ahead in cancer stem cell research." *Nat Biotechnol*, 27,44-46.

Dohr, O., C Vogel, C., Abel, J. 1995. Different response of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-sensitive genes in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB 231 cells. *Arch Biochem Biophys*. 20;321(2):405-12. doi: 10.1006/abbi.1995.1411.

Done SJ., 2011. "Preface. In *Breast Cancer - Recent Advances in Biology, Imaging and Therapeutics*". Rijeka, InTech, p IX, 2011.

Driot, D., Jouanous, E., Oustric, S., Dupouy, J., Lapeyre-Mestre, M. 2019. "Patterns of gabapentin and pregabalin use and misuse: results of a population-based cohort study in France." *Br J Clin Pharmacol*, 85(6),1260-1269. Published online

Duffy, SW., Morrish, OWE ., Allgood, PC., Black, R., Gillan, MGC., Willsher, Cooke J., Duncan, KA., Michell, MJ., Dobson, HM. 2018. "Mammographic density and breast cancer risk in breast screening assessment cases and women with a family history of breast cancer". *Eur J Cancer* 2018; 88 :48–56 .

Eisenberg-Lerner, A., Bialik, S., Simon, HU., Kimchi, A. 2009. "Life and death partners: Apoptosis, autophagy and the cross-talk between them." *Cell Death Differ*, 16(7),966-75.

El-Sahli, S., Hua, K., Sulaiman, A., Chambers, J., Li, L., Farah, E., McGarry, S., Liu, D., Zheng, P., Lee, SH., Cui, J., Ekker, M., Côté, M., Alain, T., Li, X., D'Costa, VM., Wang, L., Gadde, S. 2021. "A triple-drug nanotherapy to target breast cancer cells, cancer stem cells, and tumor vasculature." *Cell Death Dis*, 4;12(1):8. doi: 10.1038/s41419-020-03308-w. PMID: 33414428

Erdoğan, G., Ceyhan, D., Güleç, S. 2011. "Pregabalin Kullanımı Sonrası Gelişen Muhtemel Kalp Yetmezliği-Olgusu Sunumu." *Ağrı Dergisi*, 23(2),80-83. jag.journalagent.com DOI: 10.5505/ agri.2011.35119.

Evoy, KE., Sadrameli, S., Contreras, J., Covvey, JR., Peckham, AM., Morrison, MD. 2021. "Abuse and Misuse of Pregabalin and Gabapentin: A Systematic Review Update." *Drugs*. 81(1):125-156. doi: 10.1007/s40265-020-01432-7. PMID: 3321535

Ewertz, M., Duffy, SW., Adami, HO , Kvale, G ., Lund, E., Meirik, O., Mellemegaard, A., Soini I ., Tulinius H. 1990. "Age at first birth, parity and risk of breast cancer:a meta-analysis of 8 studies from the Nordic countries." *Int J Cancer* 46 :597–603 .

Fallon, M.T. 2013. "Neuropathic pain in cancer." *Br J Anaesth*, 111(1),105-11.doi: 10.1093/bja/aet208. DOI:10.1093/bja/aet208

Fragomeni, S.M., Sciallis, A., Jeruss, J.S. 2018. "Molecular subtypes and local-regional control of breast cancer." *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* (27), 95-120.

Gaber, S., Saleh, E., Elshaikh, S., Reyad, R., Elramly, M., Mourad, I., Fattah, MA. 2019. "Role of Perioperative Pregabalin in the Management of Acute and Chronic Post-Thoracotomy Pain", ID Design Press, Skopje, Republic of Macedonia Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences, 30,7(12),1974-1978. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2019.556>.

Gallego, MA., Ballot, C., Kluza, J., Hajji, N., Martoriati, A., Castéra, L., Cuevas, C., Formstecher, P., Joseph, B., Kroemer, G., Bailly, C., Marchetti, P. 2008. "Overcoming chemoresistance of non-small cell lung carcinoma through restoration o an AIF-dependent apoptotic pathway", *Oncogene*, 27(14),1981–92. Doi: 10.1038/sj.onc.1210833. Epub 2007 Oct 1.

Gest, C., Joimel, U., Huang, L., Pritchard, LL., Petit, A., Dulong, C., Buquet, C., Hu, CQ., Mirshahi, P., Lauren, M., Fauvel-Lafève, F., Cazin, L., Vannier, JP., Lu, H., Soria, J., Li, H., Varin, R., Soria, C. 2013. "Rac3 induces a molecular pathway triggering breast cancer cell aggressiveness: differences in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines". *BMC Cancer* 13: 63.

Gomes, T., Juurlink, D.N., Antoniou, T., Mamdani, M.M., Paterson, J.M., Van den Brink, W. 2017. "Gabapentin, opioids, and the risk of opioid-related death: a population-based nested case-control study". *PLoS Med*, 14:e1002396. [PMID: 28972983] doi:10.1371/journal.pmed.1002396.

Hanahan, D., Weinberg, R.A. 2011. "Hallmarks of cancer: The next generation" *Cell*, 144(5),646-74.

Harrell, JC., Pfefferle, AD., Zalles, N., Prat, A., Fan, C., Khramtsov, A., Olopade OI., Troester MA., Dudley AC, Perou CM. 2014. “Endothelial-like properties of claudin-low breast cancer cells promote tumor vascular permeability and metastasis.” *Clin Exp Metastasis*, 31(1):33–45.

Hermann, P.C., Bhaskar, S., Cioffi, M., Heeschen, C. 2010. “Cancer stem cells in solid tumors”. *Semin Cancer Biol*, 20(2),77-84.

Hiatt, RA., Brody, JG. 2018. “Environmental determinants of breast cancer.” *Annu RevPublic Health*. 39:113–33 .

Holiday, DL., Speirs, V. 2011. “Choosing the right cell line for breast cancer research”.*Breast Cancer Res*,13(14):215.

Honeth, G., Bendahl, P-O., Ringnér, M., Saal, L.H., Gruvberger-Saal, S.K., Lövgren, K., Grabau, D., Fernö, M., Borg, Å., Hegardt, C. 2008. “The CD44⁺/CD24⁻ phenotype is enriched in basal-like breast tumors”. *Breast Cancer Res*. (10), 1-12.

Hopp, TA., Weiss, HL., Hilsenbeck, SG., Cui, Y., Allred, DC., Horwitz, KB., Fuqua, SA. 2004. Breast cancer patients with progesterone receptor PR-A-rich tumors have poorer disease-free survival rates. *Clin Cancer Res*, 10 :2751–60 .

Hu, K., Ding, P , Wu Y , Tian W , Pan T , Zhang S. 2019. “Global patterns and trends in the breast cancer incidence and mortality according to sociodemographic indices: an observational study based on the global burden of diseases.” *BMJ Open* 9:e028461

Kahlenborn, C., Modugno, F., Potter, DM , Severs, WB. 2006. “Oral contraceptive use asa risk factor for premenopausal breast cancer: a meta-analysis.” *Mayo Clin. Proc*. 81 :1290-302 .

Karabulut, G.Ş., Tepetam, H., Gül, H.L. 2020. “Duloxetine and pregabalin in neuropathic pain of lung cancer Patients.” *Brain and Behavior*, 10(3):e01527, doi:10.1002/brb3.1527.<https://doi.org/10.1002/brb3.1527>, Epub 2020 Jan 22.

Kastner P., Krust ,A., Turcotte B , Stropp U , Tora L , Gronemeyer H , Chambon P . 1990. “Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the

twofunctionally different human progesterone receptor forms A and B.” *EMBO J.* 9 :1603-14 .

Koçak, N., Ozen,F., Yildirim, IH., Duran, Y. 2017. “Fentanyl Inhibits tumorigenesis from human Breast Stem cells by Inducing Apoptosis.” *Asian Pac J Cancer Prev*, 1;18(3):735-739. doi: 10.22034/APJCP.2017.18.3.735.

Krause, D.S. 2002. “Plasticity of marrow-derived stem cells.” *Gene Ther*, 9(11),754-8.

Kuchenbaecker, KB., Hopper JL., Barnes DR., Phillips KA., Mooij TM., Roos-Blom MJ , Jervis S., Van Leeuwen FE., Milne RL., Andrieu N. 2017. “Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers.” *JAMA*. 317:2402-16 .

Lacobucci, G. 2017. “UK government to reclassify pregabalin and gabapentiafter rise in deaths.” *BMJ*, 25,358:j4441. doi: 10.1136/bmj.j4441.

Lehmann, BD., Jovanović, B., Chen, X., Estrada, MV., Johnson, KN., Shyr, Y., Moses, HL., Sanders, ME., Pietenpol, JA. 2016. “Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection.” *PLoS One*,16;11(6):e0157368. doi: 10.1371/journal.pone.0157368. eCollection 2016. PMID: 27310713

Lexi-Drugs. Lexicomp. Hudson: Wolters Kluwer Health, Inc. <http://online.lexi.com>. Accessed 6/12/16.

Li, W., Ma, H., Zhang, J., Zhu, L., Wang, C., Yang, Y. 2017. “Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis.” *Sci Rep*, 23;7(1):13856. doi: 10.1038/s41598-017-14364-2. PMID: 29062075.

Liu, H., Zang, C., Fenner, MH., Possinger, K., Elstner, E. 2003. “PPARgamma ligands and ATRA inhibit the invasion of human breast cancer cells in vitro.” *Breast Cancer Res Treat*, 79(1):63-74.

Liu, T.J., Sun, B.C., Zhao, X.L., Zhao, X.M., Sun, T., Gu, Q., Yao, Z., Dong, X.Y., Zhao, N., Liu, N. 2013. “CD133+ cells with cancer stem cell characteristics associates with vasculogenic mimicry in triple-negative breast cancer.” *Oncogene*, (32), 544553

Loibl, S , Gianni, L. 2017.“HER2-positive breast cancer”. *Lancet*, 389:2415-2429

Luo, H., Zeng, C., Fang, C., Seeruttun, SR., Lv, L., Wang, W. 2014. “A new strategy using ALDHhigh-CD8+T cells to inhibit tumorigenesis.” *PLoS One*. 8;9(8):e103193. doi: 10.1371/journal.pone.0103193. eCollection 2014.

Lyndon, A., Audrey, S., Wells, C., Burnell ES., Ingle, S., Hill, R., Hickman, M. Henderson, G. 2017. “Risk to heroin users of polydrug use of pregabalin or gabapentin.” *Addiction*, 112,1580-9.

Malhotra, G.K., Zhao, X., Band, H., Band, V. 2010. “Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers”, *Cancer Biol Ther*, 10(10), 955-960
Manandhar, P., Murnion, BP., Grimsey, NL., Connor, M., Santiago, M. 2021.“Do gabapentin or pregabalin directly modulate the receptor?” *Peer J*, 12;9:e11175. doi: 10.7717/peerj.11175. eCollection 2021.?

Martinotti, G. 2012. “Pregabalin in clinical psychiatry and addiction: pros and cons.” *Expert Opin Investig Drugs*, 21(9),1243-5.

McDonagh, M.S., Selph, S.S., Buckley, D., Holmes, RS., Mauer, K., Ramirez, S., Hsu, F.C., Dana, T., Fu, R., Chou, R. et al. 2020. “Nonopioid Pharmacologic Treatments for Chronic Pain” [Internet]. Agency for Healthcare Research and Quality (US), Report No:20-EHC010.

Megdal, SP., Kroenke, CH., Laden, F., Pukkala, E., Schernhammer, ES. 2005. “Night work and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis.” *Eur J Cancer*, 41:2023–32 .

Meijers-Heijboer, H., Van den Ouweland, A., Klijn J., Wasielewski M., de Snoo, A., Oldenburg, R., Hollestelle, A., Houben, M., Crepin, E., Van Veghel-Plandsoen, M., et al. 2002. “Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations.” *Nat. Genet.* 31 :55–9 .

Mestdagh, F., Steyaert, A., Lavand'homme, P. 2023. "Cancer Pain Management: A Narrative Review of Current Concepts, Strategies, and Techniques." *Curr Oncol.* 18;30(7):6838-6858. doi: 10.3390/curroncol30070500

Mitsuru, S., Tadayuki, T., Rei, S., Naoki, K., Hiroyuki, A. 2021. "Mirogabalin vs pregabalin for chemotherapy-induced peripheral neuropathy in pancreatic cancer patients." *BMC Cancer*, 21,1319 <https://doi.org/10.1186/s12885-021-09069-9>

Mohammad, Y.S., ElSayed, D.A., El-Baz, A.A., Sallam, H.S., Abbas, F. 2021. "Combined Treatment of Adipose Derived-Mesenchymal Stem Cells and Pregabalin Is Superior to Monotherapy for the Treatment of Neuropathic Pain in Rats." *Hindawi Stem Cells International*, Article ID 8847110, 9 pages <https://doi.org/10.1155/2021/8847110>

Monninkhof, EM., Elias, SG., Vlems, FA., Van der Tweel, I., Schuit, AJ., Voskuil, DW., Van Leeuwen, FE. 2007. "Physical activity and breast cancer: a systematic review". *Epidemiology* 18:137–57 .

Morrison, EE., Sandilands, EA., Webb, DJ. 2017. "Gabapentin and pregabalin: do the benefits outweigh the harms?" *J R Coll Physicians Edinb*, 47,310–3.

Mulvey, MR., Paley, CA., Schuberth, A., King, N., Page, A., Neoh, K. 2024. "NeuropathicPain in Cancer: What Are the Current Guidelines"?*Curr Treat Options Oncol*, 25(9):1193-1202. doi: 10.1007/s11864-024-01248-7. Epub 2024 Aug 5.

Murnion, B., Conigrave, KM. 2018. "Pregabalinmisuse: the next wave of prescription medication problems." *Med J Aust.* 210(2):72-73. doi: 10.5694/mja2.12056. Epub 13.PMID:30712309

Muzio, G., Maggiora, M., Paiuzzi, E., Oraldi, M., Canuto, R. 2012. "Aldehyde dehydrogenases and cell proliferation." *Free Radic. Biol. Med.* (52), 735-746.

Mylona, E., Giannopoulou, I., Fasomytakos, E., Nomikos, A., Magkou, C., Bakarakos, P., Nakopoulou, L. 2008. "The clinicopathologic and prognostic significance of CD44⁺/CD24⁻/low and CD44⁻/CD24⁺ tumor cells in invasive breast carcinomas." *Hum. Pathol*, (39), 1096-1102.

O'Brien, C.A., Pollett, A., Gallinger, S., Dick, J.E. 2007. "A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice". *Nature*. 445(7123),106-110.

Onakpoya, I.J., Thomas, E.T., Lee, J.J., Goldacre, B., Heneghan, C.J. 2019. "Benefits and harms of pregabalin in the management of neuropathic pain: a rapid review and meta-analysis of randomised clinical trials." *BMJ Open*, 21;9(1):e023600. 9:e023600. doi:10.1136/bmjopen-2018-023600

Oskarsson, T., Batlle, E., Massagué, J. 2014. "Metastatic stem cells: sources, niches, and vital pathways." *Cell Stem Cell*, 6;14(3),306-21.

Özgürbüz, U., Gencür, S., Özdal Kurt, F., Özkalkanlı, M., Vatansever, S. 2019. "The effect of tramadol on cancer stem cells and metabolic changes in colon carcinoma cell lines." *Gene*, 718,144030, p,1-8

Palmer, J.R., Wise, L.A., Hatch, E.E., Troisi, R., Titus-Ernstoff, L., Strohsnitter, W., Kaufman, R., Herbst, A.L., Noller, K.L., Hyer, M., et al. 2006. "Prenatal diethylstilbestrol exposure and risk of breast cancer." *Cancer Epidemiol Biomark Prevent*, 15:1509-14.

Pareja, F., Brown, D.N., Lee, J.Y., Paula, A.D.C., Selenica, P., Bi, R., Geyer, F.C., Gazzo, A., Da Silva, E.M., Vahdatinia, M. 2020. "Whole-exome sequencing analysis of the progression from non-low grade ductal carcinoma in situ to invasive ductal carcinoma." *Clin Cancer Res*. 26 :3682–93

Pece, S., Tosoni, D., Confalonieri, S., Mazzarol, G., Vecchi, M., Ronzoni, S., Bernard, L., Viale, G., Pelicci, P.G., Di Fiore, P.P. 2010. "Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content." *Cell*, 140, 62-73.

Perou, C.M., Sørlie, T., Eisen, M.B., Van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., et al. 2000. "Molecular portraits of human breast tumours." *Nature* 406:747–52 .

Polat, CS., Konak, HE., Akıncı, MG., Onat, SS., Altas, EU. 2023. “Misuse of gabapentinoids (pregabalin and gabapentin) in patients with neuropathic pain related to spinal cord injury.” *J Spinal Cord Med.* 46(5):859-864. doi: 10.1080/10790268.2021.2024709. Epub 2022 Feb 2.

Prayogo, AA., Wijaya, AY., Hendrata, W., Looi, I'tishom, R., Lukman H., Fedik Abdul Rantam, FA., I Ketut Sudiana, IK., Abdurachman. 2020. “Dedifferentiation of MCF-7 Breast Cancer Continuous Cell Line, Development of Breast Cancer Stem

Rakha, EA., Ellis, IO. 2011. “Modern classification of breast cancer: should we stick with morphology or convert to molecular profile characteristics.” *Adv Anat Pathol*, 18:255-67 expression and correlation with HER2 amplification in invasive breast carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2017; 25 :553–8 .

Rahman, N., Seal, S., Thompson, D., Kelly, P., Renwick, A., Elliott, A., Reid, S., Spanova, K., Barfoot, R., Chagtai, T., et al. 2007. “PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene”. *Nat. Genet.* 39 :165-7.

Raimondi, S., Maisonneuve, P., Lowenfels, A.B. 2009. “Epidemiology of pancreatic cancer”. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology.* 6, 699–708 (2009)

Renwick, A., Thompson, D., Seal, S., Kelly, P., Chagtai, T., Ahmed, M., North, B., Jayatilake, H., Barfoot, R., Spanova, K , et al. 2006. “ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles”. *Nat. Genet.* 38 :873-5 .

Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., Weissman, I.L. 2001. “Stem cells, cancer, and cancer stem cells”. *Nature* [Internet]. 414(6859),105-11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11689955>

Ricardo, S., Vieira, A.F., Gerhard, R., Leitão, D., Pinto, R., Cameselle-Teijeiro, J.F., Milanezi, F., Schmitt, F., Paredes, J. 2011. “Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: Expression distribution within intrinsic molecular subtype”. *J. Clin. Pathol.* (64), 937-946.

Rodríguez-Rodero, S., Delgado-Álvarez, E., Fernández, AF., Fernández-Morera, JL., Menéndez-Torre, E., Fraga, M. 2014. Epigenetic alterations in endocrine-related cancer. *Endocr. Relat. Cancer*, 21 :R319–30 .

Schifano, F., Chiappini, S., Corkery, J.M., Guirguis, A. 2018. "Abuse of prescription drugs in the context of novel psychoactive substances (NPS)", A Systematic Review. *Brain Sci*, 8: E73.

Schwan, S., Sundström, A., Stjernberg, E., Hallberg, E., Hallberg, P. 2010. "A signal for an abuse liability for pregabalin-results from the Swedish spontaneous drug reaction reporting system". *Eur J Clin Psychopharmacol*, (66), 947-53.

Shieh, Y., Scott, CG., Jensen, MR., Norman, AD., Bertrand, KA., Pankratz, VS., Brandt, KR., Visscher, DW., Shepherd, JA., Tamimi, RM. 2019. "Body mass index, mammographic density, and breast cancer risk by estrogen receptor subtype." *Breast Cancer Res*. 21 :48.021 Apr 5.

Shirazi, FH., 2011. "Remarks in Successful Cellular Investigations for Fighting Breast Cancer Using Novel Synthetic Compounds. In: Breast Cancer-Focusing Tumor Microenvironment, Stem Cells and Metastasis." (Gunduz M, Gunduz E (eds.). Rijeka, InTech, pp. 85-102, 2011.

Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. 2016. "Cancer statistics." *CA Cancer J. Clin*, (66), 7–30.

Sin, W.C.; Lim, C.L. 2017. "Breast cancer stem cells-From origins to targeted therapy". *Stem Cell Investig*. (4), 96.

Sivakumar, A., Bryson, E.B., Hall, K.H., Maples, K.T., Goyal, S., Joseph, N.S., Hofmeister, C.C., Kaufman, J.L., Lonial, S., Nooka, A.K., Harvey, R.D. 2022. "Impact of concurrent gabapentin or pregabalin with high-dose melphalan in patients with multiple myeloma undergoing autologous hematopoietic stem cell transplant". *Pharmacotherapy*, 42(3), 233-240. doi: 10.1002/phar.2667. Epub 2022 Feb 14.

Siziopikou, KP. 2013. "Ductal carcinoma in situ of the breast: current concepts and future directions". *Arch. Pathol. Lab. Med*. 137 :462–6 .

Sørli, T., Perou, CM., Tibshirani, R., Aas T , Geisler, S., Johnsen, H ., Hastie T., Eisen MB., Van de Rijn, M., Jeffrey, SS., et al. 2001. Gene expression patterns of breast

carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98:10869-74.

Soule, HD., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., Brennan, M. 1973. "A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma". *J Natl Cancer Inst* 51:1409-1416.

Spence, D. 2010. "Bad medicine: gabapentin and pregabalin. *BMj*, 347,f6747. OpenPrescribing.net. High-level prescribing trends for Pregabalin(BNF code 0408010AE) across all GP practices in NHS England". [https:// openprescribing. net/ chemical/ 0408010AE/](https://openprescribing.net/chemical/0408010AE/) (accessed8th Mar 2018).

Spillane, B., Henderson, M.A. 2007. "Cancer stem cells: a review", *ANZ J Surg*, 77(6),464-468.

Stahl, S.M. 2012. "Stahl'ın Temel Psikofarmakolojisi" (Çev. Ed. İT Uzbay). İstanbul Tıp Kitabevi, İstanbul.

Sugimoto, M., Takagi,T., Suzuki, R., Konno, N., Asama, H., Sato, Y., Irie, H., Okubo, Y., Nakamura J., Takasumi,M., Hashimoto, M., Kato, T., Kobashi R., Ohira H. 2021. "Mirogabalin vs pregabalin for chemotherapy-induced peripheral neuropathy in pancreatic cancer patients". *BMC Cancer*, 21,1319 <https://doi.org/10.1186/s12885-021-09069-9>

Szczepaniak, A., Fichna, J., Zieliński, M. 2020. "Opioids in Cancer Development, Progression and Metastasis: Focus on Colorectal Cancer", *Curr. Treat. Options in Oncol*, 21,6 DOI 10.1007/s11864-019-0699-1

Şerban, C., Cîmpean, A.M., Raica, M. 2015. "The Story Of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 Years Of Experience İn Research." *Anticancer Research* 35: 3147-3154

Takagi, Y., Sato, J., Yamamoto, Y., Matsunuma R., Watanabe, H., Mori, M., Hasegawa, T., Matsuda, Y., Kako, J., Kasahara, Y., Goya S, Kohara, H., Nakayama, T., Yamaguchi, T. Opioids for the management of dyspnea in cancer patients: a systematic review and meta-analysis..*Int J Clin Oncol*. 2023 Aug;28(8):999-1010. doi:

10.1007/s10147-023-02362-6. Epub 2023 Jun 20.PMID: 37338727 Free PMC article. Review.

Takeshima, H., Ushijima, T. 2019. Accumulation of genetic and epigenetic alterations in normal cells and cancer risk. NPJ Precis Oncol. 3 :7 .

Tanei, T., Morimoto, K., Shimazu, K., Kim, S.J., Tanji, Y., Taguchi, T., Tamaki, Y., Noguchi, S. 2009. “Association of breast cancer stem cells identified by Aldehyde Dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers”. Clin. Cancer Res., (15), 4234-4241.

Tang, D.G. 2012. “Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity”, Cell Res [Internet]. Nature Publishing Group; 22(3),457-72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22357481>

Taurin, S., Alkhalifa, H. 2020. “Breast cancers, mammary stem cells, and cancer stem cells, characteristics, and hypotheses.” Neoplasia, 22(12):663-678. doi: 10.1016/j.neo.2020.09.009. Epub 2020 Oct 23. PMID: 33142233

Tegeder, I., Grösch, S., Schmidtko, A., Schmidt, H., Niederberger, E., Klaus Scholich, K., Geisslinger, G.G. 2003. “Protein-independent G1 cell cycle block and apoptosis with morphine in adenocarcinoma cells: involvement of p53 phosphorylation.” Cancer Res, 15;63(8),1846-52.PMID: 12702572

Terzioğlu, G., Keskin, A.Ü., Demirel, G.Y. 2013. “Hücre Proliferasyonu Ölçüm Yöntemleri ve Çeşitli Ticari Proliferasyon Kitlerinin Karşılaştırılması.” Turkish J Immunol, 1(3),74-89.

Tian, M., Jin, L., Li, R., Zhu, S., Ji, M., Li, W. 2016. “Comparison of oxycodone and morphine on the proliferation, apoptosis and expression of related molecules in the A549 human lung adenocarcinoma cell line”. Exp Ther Med, 12(2),559-66.

Tokur, O., Aksoy, A. 2017. “ In Vitro Sitotoksikite Testleri”. Harran Üniv Vet Fak Derg, 2017; 6 (1): 112-118

Toss, A., Cristofanilli, M. 2015. "Molecular characterization and targeted therapeutic approaches in breast cancer". *Breast Cancer Res.* (17), 1–11.

Van Seijen, M., Lips, EH., Thompson, AM., Nik-Zainal, S., Futreal, A., Hwang, ES., Verschuur, E., Lane, J., Jonkers, J., Rea DW . 2019. "Ductal carcinoma in situ: to treat or not to treat, that is the question". *Br. J. Cancer.* 121 :285–92

Van Pham, P., Phan, N.L.-C., Nguyen, N.T., Truong, N.H., Duong, T.T., Le, D.V., Truong, K.D., Phan, N.K. 2011. "Differentiation of breast cancer stem cells by knockdown of CD44: Promising differentiation therapy". *J. Transl. Med.* (9), 209.

Verma, V., Singh, N., Jaggi, A. 2014. "Pregabalin in neuropathic pain: evidences and possible mechanisms". *Curr Neuropharmacol*, 12,44-56.

Villas, B.H. 1998. "Flow cytometry: an overview". *Cell Vis*, 5(1),56-61

Waganer, N., Fazio, PD., Böker, KO., Matziolis, G. 2022. "Osteogenic Effect of Pregabalin in Human Primary Mesenchymal Stem Cells, Osteoblasts, and Osteosarcoma Cells", *Life*, 12,496. <https://doi.org/10.3390/life12040496>

Wang, F., Shu, X., Meszoely, I., Pal., Mayer, IA., Yu, Z., Zheng, W., Bailey, CE., Shu, X-O. 2019. "Overall mortality after diagnosis of breast cancer in men vs women". *JAMA Oncol*, 5 :1589–96 .

Wang, Q., Dong, J., Ye, X., Ren, YF. 2023. "A Meta-Analysis Showing the Quantitative Evidence Base of Preemptive Pregabalin for Postoperative Pain from Cancer-Related Surgery". *Medicina (Kaunas)*. 59(2):280. doi: 10.3390/medicina59020280.PMID: 36837482

Wang, M., Xiong, HP., Sheng, K., Sun, XB., Zhao, XQ., Liu, QR. 2023. "Drug Des Devel Ther. (8)17:1699-1706. doi: 10.2147/DDDT.S413273. e Collection 2023.

Wang, Y., Yang, H., Shen, C., Luo J. 2017. "Morphine and pregabalin in the treatment of neuropathic pain." *Exp Ther Med*, 13,1393-7.

Was, H., Borkowska, A., Bagues, A., Tu, L., Liu, JYH., Lu, Z., Rudd, JA., Nurgali, K., Abalo, R. 2022. "Mechanisms of Chemotherapy-Induced Neurotoxicity". *Front*

Pharmacol. 2022 Mar 28;13:750507. doi: 10.3389/fphar.2022.750507. eCollection. PMID: 35418856 Free PMC article. Review.

Wolff, AC., Hammond, MEH., Schwartz, JN., Hagerty, KL., Allred, DC., Cote, RJ. , Dowsett, M., Fitzgibbons, PL., Hanna, WM., Langer, A. 2007. “American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing inbreast cancer.” Arch. Pathol. Lab. Med, 131:18-43.

Wood, H., Dickman, AA., Star, A., Boland, DJW. 2018. “Updates in palliative care-overview and recent advancements in the pharmacological management of cancer pain.” Clinical Medicine. 18,1: 17-22

Wu, C.P., Zhou, L., Xie, M., Tao, L., Zhang, M., Tian, J. 2011. “Isolation and *in vitro* characterization of CD133(+) side population cells from laryngeal cancer cell line”. Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi, 46(9),752-757.

Xavier, GMB., Ferreira, LMMC., Passos, MF., Rodrigues, APD., Franco, FTC., Silva, CM., Silva Júnior, JOC., Ribeiro-Costa, RM., Araújo, JLN. 2024. “Characterization and Evaluation of the Cytotoxicity of PregabalinGels for Oral Application. Pharmaceuticals” (Basel). (4;17(9):1168. doi: 10.3390/ph17091168.PMID: 39338331

Xiaoli, Z., Kimerly, P., Li, L. 2020. “Breast Cancer Stem Cells: Biomarkers, Identification and Isolation Methods, Regulating Mechanisms.” Cellular Origin, and Beyond Cancers. 12, 3765; doi:10.3390/cancers12123765

Xu, Y.J., Li, S.Y., Cheng, Q., Chen, W.K., Wang, S.L., Ren, Y., Miao, C.H. 2016. “Effects of anaesthesia on proliferation, invasion and apoptosis of LoVo colon cancer cells *in vitro*”. Anaesthesia, 71(2),147-54.

Xu, J., Guo, Y., Liu, Q., Yang, H., Ma, M., Yu, J., Çen, L., Ou, Ç., Xiaohui Liu, X., Wu, J. 2022.”Pregabalin Mediates Retinal Ganglion Cell Survival From Retinal Ischemia/Reperfusion Injury Via the Akt/GSK3 β / β -Catenin Signaling Pathway”. IOVS, 2022, 63:12.

Yajima, R., Matsumoto, K., Ise, Y., Suzuki, N., Yokoyama, Y., Junko Kizu, J., Katayama, S. 2016. Pregabalin prescription for terminally ill cancer patients receiving specialist palliative care in an acute hospital. *J Pharm Health Care Sci*, 2016 Nov 5;2:29. doi: 10.1186/s40780-016-0063-6

Yin, W., Wang, J., Jiang, L., Kang, YJ. 2021. Cancer and stem cells, 246(16):1791-1801. doi: 10.1177/15353702211005390. Epub 2021 Apr 5.

Zhou, L., Sheng, D., Wang, D., Ma, W., Deng, Q., Deng, L., Liu, S. 2019. “Identification of cancer-type specific expression patterns for active aldehyde dehydrogenase (ALDH) isoforms in ALDEFLUOR assay”, *Cell Biol Toxicol*,



Ekler

Etik kurul onay belgesi : İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 21.03.2024 tarihinde 0170 karar numarası ile etik kurul onayı alınmıştır.



Teşekkür

Öncelikle, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde Kök Hücre Anabilim Dalında öğrenci olduğum süre içinde emeği geçen herkese teşekkür ederim. Bu yolda yürürken destek veren tüm sevdiklerime, tüm hocalarıma, arkadaşlarıma, memurlarımıza, personelimize sonsuz teşekkürlerimi bildirmek isterim.

Her zaman yorulmadan çalışıyor oluşunu, yenilikleri takip edişini, hipotez geliştirme ve bilgileri özümseyerek birleştirme becerisini ve insan sevgisini örnek aldığımız sayın Prof. Dr. Gülinnaz Ercan'a, benim kendisine sık sık danışabilmeme olanak sağlayan ve bu yolculukta sonuna kadar birlikte olduğumuz, birlikte emek verdiğimiz tez danışmanıma en içten teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım. Doktora sürecim boyunca kendisinden çok şey öğrendim.

Sevgili doktora arkadaşım, bu araştırmadaki ekip arkadaşım, Rozita Tamjidifer'e çok çok teşekkür ederim. Zamanını ve emeğini paylaştığı için, bana laboratuvarında çok şey öğrettiği için ve kardeşlik yaptığı için, çalışmayı, araştırmayı çok sevdiği ve bilgilerini, deneyimlerini paylaştığı için kendisine çok şey borçluyum.

Sevgili kızım Ayşe Defne Aksun'a, Defnem'e kendisinden aldığım, ona zaman ayıramadığım saatler için ve beni her zaman anladığı için teşekkür ederim.

Çalışmalarımız sırasında klinik olarak ağırlı hasta takibindeki tedavi yaklaşımlarını bizimle paylaşan sevgili eşim İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı öğretim üyesi ve başkanı Prof. Dr. Murat Aksun'a hem çalışma ekibimizin bir parçası olması hem de evdeki sonsuz hoşgörüsü, stresli durumların yönetimi ve desteği için çok teşekkür ederim.

Canım annem, canım babam, canım kardeşim Semra'ya ve İsmet'e beni hep destekledikleri ve anlayışla karşıladıkları için, beni çok sevdikleri için, araştırma yapmanın verdiği mutluluğa inandıkları, moral verdikleri için çok teşekkür ederim.

Sayın hocamız, Kök Hücre Anabilim Dalı Başkanımız, Prof. Dr. Yiğit Uyanıkgil'e, doktora öğrenimim boyunca hem öğretirken hem de sorunlar ve sorular karşısında sergilediği çözümçül yaklaşımları için sonsuz teşekkür ederim.

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç Dr. Mümin Alper Erdoğan'a ve İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Fadime Aydın Köse'ye, tez projemiz ile ilgili hipotezimizi ve planlarımızı dinleyip önerilerde bulundukları, hücre hattı sağlama konusunda yardımcı oldukları, çalışma ve analiz yöntemleri konusunda fikir verdikleri için çok teşekkür ederim.

Doktora öğrenimim boyunca, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim dalına yaptığım ziyaretler sırasında, beni güler yüzle karşılayan Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı başkanı değerli hocamız Prof. Dr. Hakan Aydın'a ve tüm öğretim üyesi hocalarıma destekleri için çok teşekkür ederim. Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında uzmanlık öğrencisi ve doktora öğrencisi olarak çalışan tüm arkadaşlarımıza ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvar teknisyenlerine, sekreterlerine, idari hizmetlerde çalışan personellerine çok teşekkür ederim.

Bilimsel ve moral desteği için, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi sevgili arkadaşım Prof. Dr. Buket Demirci'ye çok teşekkür ederim.

Sevgili hocamız, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Çığır Biray Avcı'ya bilimsel katkıları için çok teşekkür ederim.

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında Flow Sitometre cihazını kullanmamıza olanak sağlayan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Cumhur Gündüz hocamıza çok teşekkür ederim.

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında flow sitometre cihazını kullanabilme konusunda destek olan doktora öğrencisi arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Ege Üniversitesi Araştırma ve Eğitim laboratuvarında (AREL) yaptığımız laboratuvar çalışmaları sürecinde laboratuvarı rahat ve güvenli bir şekilde kullanmamız için gerekli düzenlemelerin yapılmasına yardımcı olan sayın Serap Güven Top'a çok teşekkür ederim.

Araştırmalarımı, deneylerimi yaptığım süre içinde moral desteğini hissettiğim, her zaman çalışmalarımız ve başarılarımızdan övgüyle söz eden İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı başkanımız sevgili hocam

sayın Prof. Dr. Figen Narin'e, öğretim üyesi arkadaşlarıma, İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesinde birlikte görev yaptığımız Tıbbi Biyokimya uzmanı arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Barış Karadaş ve Prof. Dr. İsmail Yılmaz'a bilimsel ve moral destekleri için çok teşekkür ederim.

Tez savunma jürimde bulunan Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Yasemin Delen Akçay ve İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı öğretim üyesi, algoloji uzmanı Doç. Dr. Birzat Emre Gölboyu'na çok teşekkür ederim.

Tezimin basılı eser olarak dizgisi için yardımını esirgemeyen, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı uzmanlık öğrencimiz Furkan Oğuz Karalar ve her zaman destek veren tüm uzmanlık öğrencilerimize çok teşekkür ederim.

Doktora sürecim boyunca, her zaman güleryüzlü ve anlayışlı olan, sorularımızı yanıtlayan, çözümler sunan, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitümüzde idari kadroda çalışan tüm sevgili arkadaşlarıma, sevgilerimi, saygılarımı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ben bu yolda yürürken çok öğrendim ve çok keyif aldım, yolda beraber olduğumuz, gülümseyen ve gülümseten, öğreten, paylaşan herkese çok teşekkürler.

İzmir, 24.02.2025

Dr. Saliha AKSUN

Özgeçmiş

SALIHA AKSUN

Öğrenim Bilgisi

Tıpta Uzmanlık: Ege Üniversitesi / Tıp Fakültesi / Temel Tıp Bilimleri Bölümü / Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı / 1998 - Şubat 2002

Tez Adı: Tıp 2 Diyabetes Mellitus'ta Glomerüler Filtrasyon-Nitrik Oksid İlişkisi ve Glomerüler Filtrasyon Hızının Belirlenmesinde Yeni Göstergeler (2001). Tez Danışmanı: Prof. Dr. Dilek Özmen

Yüksek Lisans: Dokuz Eylül Üniversitesi / Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Sağlıkta Kalite Geliştirme Ve Akreditasyon (YI) (Tezli) 2013 - Temmuz 2019

Tez Adı: Klinik Laboratuvarlarda, Preanalitik Süreç İle İlgili Hemşire Farkındalığının Değerlendirilmesi (2019) Tez Danışmanı: Doç.Dr. Nevcivan Güldaş

Lisans: Ege Üniversitesi / Tıp Fakültesi / Tıp Pr. 1988-Haziran 1994

Önlisans: Anadolu Üniversitesi / Açıköğretim Fakültesi / Yönetim ve Organizasyon Bölümü / Sağlık Kurumları İşletmeciliği Pr. (Açıköğretim), 2004-Haziran 2006

Akademik Görevler

Doçent Dr. İzmir Katip Çelebi Üniversitesi / Tıp Fakültesi / Temel Tıp Bilimleri Bölümü / Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, 2020

Doktor Öğretim Üyesi İzmir Katip Çelebi Üniversitesi / Tıp Fakültesi / Temel Tıp Bilimleri Bölümü / Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, 2014-2020

Tıbbi Biyokimya Başasistan: İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi (Başasistanlık sınavı sonrası bu hastaneye başladım. Kadro: Başasistan), 2013-2014

Tıbbi Biyokimya Uzmanı: İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi geçici görevlendirme ile (İzmir Dr. Ekrem Hayri Üstündağ Kadın Hastalıkları Ve Doğum Hastanesinde Kadrolu), 2011-2013

Tıbbi Biyokimya Uzmanı: İzmir Dr.E.Hayri Üstündağ Kadın Hastalıkları ve Doğum Hastanesi (Sağlık Bakanlığı Tıbbi Biyokimya Uzmanı Kadrosu), 2002-2013

Araştırma Görevlisi: Ege Üniversitesi / Tıp Fakültesi (Tus ile Ege Üniv. Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında Uzmanlık Öğrencisi), 1998-2002

YÖNETTİĞİ TEZLER

1. Hasip Çağatay, (2023). “Alkol Kullanım Bozukluğunun Takibinde Bir Biyobelirteç Olarak Fosfatidil Etanol (Peth)'ün Yararlılığının, Karbonhidrat Deficient Transferrin (CDT) ile Karşılaştırılarak Değerlendirilmesi”. İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı ve İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi-Tıbbi Biyokimya Kliniği (Tamamlandı)
2. Üge Mert, (2022). “İdiyopatik Hiperandrojenemili Hastalarda Endokrin Bozucu Kimyasalların Etkisinin İncelenmesi”. İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı ve İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi-Tıbbi Biyokimya Kliniği (Tamamlandı)
3. Erbak Yılmaz Huriye, (2017). “Mefv Geninin Farklı Ekzonlarında Homozigot Veya Heterozigot Mutasyon Tespit Edilen Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarında Soluable Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor (SuPAR) ve Serum Amiloid-A Düzeylerinin Diagnostik Ve Prognostik Değerinin Saptanması.” İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı ve İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi-Tıbbi Biyokimya Kliniği (Tamamlandı)
4. Saraç Gül Zakire, (2017). “Uyuşturucu Madde Analizlerinde Ölçüm Belirsizliği Ve Test Performansının Değerlendirilmesi.” İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı ve İzmir Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi-Tıbbi Biyokimya Kliniği (Tamamlandı)

PROJELERDE YAPTIĞI GÖREVLER:

Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalarında Soluble Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor (Supar) Ve Serum Amiloid A Düzeylerinin Diagnostik Ve Prognostik Değerinin Belirlenmesi, Yükseköğretim Kurumları Tarafından Destekli Bilimsel Araştırma Projesi,

Yürütücü:Aksun Saliha, Danışman:Aksun Saliha.

01/05/2017 - 28/12/2017 (Ulusal)

Sıçanlarda Sisplatin İle Oluşturulmuş Akut Böbrek Hasarının Tedavisinde Eksojen Follistatin'in Etkilerinin Araştırılması, Yükseköğretim Kurumları Tarafından Destekli Bilimsel Araştırma Projesi, Araştırmacı:Aksun Saliha,

Araştırmacı:Yiğittürk Gürkan, Pazarlar Azak Burcu, Bilister Cansu, Köken Ebru, Uyanıkgil Yiğit. Yürütücü:Öz Oyar Eser, 04/04/2017 - 24/05/2018 (Ulusal)

Postmenopozal D Vitamini Düzeyinin, Menopoz Semptomları ve Cinsel Fonksiyonlar İle İlişkisi. Yükseköğretim Kurumları Tarafından Destekli Bilimsel Araştırma Projesi, Araştırmacı:Aksun Saliha, Soyöz Mustafa, Aydoğmuş Serpil, Baştürk Meryem, Sözmen Melih Kaan, Yürütücü:Koç Esra Meltem, 10/02/2018 - 10/05/2022 (Ulusal)

Uyuşturucu Madde Analizlerinde Ölçüm Belirsizliği Ve Test Performansının Değerlendirilmesi, Yükseköğretim Kurumları Tarafından Destekli Bilimsel Araştırma Projesi, Yürütücü:Aksun Saliha. Araştırmacı: Saraç Gül Zakire, 01/07/2017 - 28/12/2017 (Ulusal)

Polikistik Over Sendromu Oluşturulmuş Sıçanlarda D Vitamini İle Kombine Edilen Aronia Melanocarpa'nın Ovaryum Dokusu Üzerine Etkilerinin Ultrastrüktürel Ve Histopatolojik İncelenmesi. Yükseköğretim Kurumları Tarafından Destekli Bilimsel Araştırma Projesi, Araştırmacı: Meltem Kuruş, Saliha Aksun, Erdi Keselik, Fatma

Şimşek, Sinem Kara, Prof. Dr. Mehmet Gül, Doçent Doktor Nurten Akdeniz, ,
Yürütücü;Selen Akyol, 01/03/2018 - 01/06/2020 (Ulusal)

Son Dönem Kronik Böbrek Yetmezliği Olan Hemodiyaliz Hastalarında
Kardiyovasküler Riskin Omentin Ve Kalp Tipi Yağ Asidi Bağlayıcı Protein (H-
Fabp) İle Değerlendirilmesi, Yükseköğretim Kurumları Tarafından Destekli Bilimsel
Araştırma Projesi. Araştırmacı:Saliha Aksun

65 Yaş Üzeri Diyabeti Olan Ve Olmayan Bireylerde Beslenme Durumu Ve Yaşam
Kalitesinin Değerlendirilmesi, Yükseköğretim Kurumları Tarafından Destekli
Bilimsel Araştırma Projesi, Araştırmacı; Gülşah Kaner Tohtak, Esra Meltem Koç,
Saliha Aksun, Özden Peköz, Meryem Baştürk, Barış Önder Pamuk. Yürütücü;
Gülseren Pamuk, 24/01/2017 - 24/01/2018 (Ulusal)

İdiopatik Hirsutizmli Hastalarda Endokrin Bozucu Kimyasalların Etkisinin
İncelenmesi, Yükseköğretim Kurumları Tarafından Destekli Bilimsel Araştırma
Projesi, Yürütücü: Aksun Saliha, Danışman:Aksun Saliha.
Araştırmacı;Barış Önder Pamuk, Figen Narin, Mert Üge, Barış Önder Pamuk,
06/04/2018 - 06/04/2021 (Ulusal)

Akne Vulgaris Hastalarında Dinamik Thiol/Disülfid Homeostazının
Değerlendirilmesi, Yükseköğretim Kurumları Tarafından Destekli Bilimsel Araştırma
Projesi. Araştırmacı;Saliha Aksun, Merve Velioğlu, Mert Üge. Yürütücü;Kıymet
Handan Kelekçi 27/02/2020 - 27/12/2020 (Ulusal)

Alkol Kullanım Bozukluğunun Takibinde Bir Biyobelirteç Olarak Fosfatidil Etanol
(Peth)'ün Yararlılığının, Karbonhidrat Deficient Transferrin (Cdt) İle Karşılaştırılarak
Değerlendirilmesi, Yükseköğretim Kurumları Tarafından Destekli Bilimsel Araştırma
Projesi, Yürütücü:Saliha Aksun. 02/05/2023 (Tamamlandı) (Ulusal)

İnaktif Hepatit B Taşıyıcılarında D Vitamini Düzeyi Ve Vitamin D reseptör (Vdr) Gen
Polimorfizminin İncelenmesi, Yükseköğretim Kurumları Tarafından Destekli
Bilimsel Araştırma Projesi, Araştırmacı:Çetin Hasan Orhan, Soyöz Mustafa, Aksun

Saliha, Albaş Süleyman, Sözmen Melih Kaan, Demirdal Tuna, Nemli Salih Atakan.
Yürütücü:Koç Esra Meltem, 10/02/2017 - 10/08/2017 (Ulusal)

Covid-19 Hastalarında Serum TMAO Düzeyi Erken Bir Biyobelirteç Olabilir Mi?,
Yükseköğretim Kurumları Tarafından Destekli Bilimsel Araştırma Projesi,
Araştırmacı; Betül Rabia Erdoğan, Saliha Aksun, Murat Aksun, Nagihan Altıncı
Karahan, Nergiz Hacer Turgut, Tijen Temiz, Cüneyt Kemal Buharalıoğlu. Yürütücü;
Zinnet Şevval Aksoyalp, Araştırmacı; 03/12/2020 - 03/06/2021 (Ulusal)

Aspirin Ve İndometazinin Ooferektomili Yaşlı Sıçanlarda Böbrek Ve Karaciğer
Üzerine etkisinin biokimyasal parametrelerle değerlendirilmesi, yükseköğretim
kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Araştırmacı: Demir Ömer,
Demirci Buket, Aksun Murat. Yürütücü:Aksun Saliha, 22/04/2014 - 15/10/2015
(ulusal)

Ratlarda arjinin, glutamin ve β -hidroksi β -metil bütirat desteği verilmesinin akciğer
parankim hasarının iyileşmesi üzerine etkilerinin belirlenmesi, tübitak projesi,
araştırmacı: Saliha Aksun, Mehmet Ensari Güneli, İzzetiye Ebru Çakır. 01/02/2020 –
Yürütücü: Ersöz Hasan 01/03/2020 (ulusal)

Kronik Statin Kullanımı Sırasında Parasetamol Maruziyetinin Karaciğer ve Böbrek
Dokularına Etkisi, Tübitak Projesi, Yürütücü: Gökçimen Alpaslan,
Araştırmacı:Demirci Buket, Aksun Saliha. Bursiyer:Kahyaoğlu Fadime. 01/11/2014 -
01/11/2015 (Ulusal)

Vocational Sign Language On Medicine”, **Avrupa Birliği, Proje**
Koordinatörü:Saliha Aksun. 31/12/2023 (Devam Ediyor) (Uluslararası)

İDARİ GÖREVLER

Komisyon Üyeliği

2022-2025 İzmir Katip Çelebi Üniversitesi/Tıp Fakültesi Eğitimi Akreditasyon ve
Özdeğerlendirme Kurulu Üyeliği

2019-2019 İzmir Katip Çelebi Üniversitesi/Rektörlük Komisyon Üyeliği
2019-2019 İzmir Katip Çelebi Üniversitesi/Tip Fakültesi Fakülte Kurulu Üyeliği
2016-2019 İzmir Katip Çelebi Üniversitesi/Tip Fakültesi Fakülte Yönetim Kurulu Üyeliği
2016-2019 Diğer (Kurumlar, Hastaneler Vb.)/Kurumlar/Sağlık Bakanlığı Bölgesel Danışma Sistemi
2015-2018 İzmir Katip Çelebi Üniversitesi/Tip Fakültesi Eğitim Koordinatörü
2014-2017 İzmir Atatürk Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Komisyon Üyeliği
2012-2012dr.E.Hayri Üstündağ Kadın Hastalıkları Ve Doğum Hastanesi Kalite Koordinatörlüğü, Kalite Birim Sorumlusu
2008-2009 Dr.E.Hayri Üstündağ Kadın Hastalıkları Ve Doğum Hastanesi Kalite Kurulu Üyeliği

BİLİMSEL KURULUŞLARA ÜYELİKLER

1. Hücre Ölümü Araştırma Derneği, Üye, 2014
2. Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği, Üye, 2012
3. Büyüyen Çocuk Derneği, Üye, 2012
4. Türk Biyokimya Derneği, Üye, 1998
5. Türk Klinik Biyokimya Derneği, Üye, 1998

ULUSLARARASI DERGİLERDE YAYIMLANAN MAKALELER

Aksoyalp, ZŞ., Erdoğan, BR., **Aksun, S.**, Sözmen, MK., Aksun, M., Buharalıoğlu, CK., Altıncı-Karahan, N., Turgut, NH., Kaya-Temiz, T. Trimethylamine N-oxide as a potential prognostic biomarker for mortality in patients with COVID-19 disease. Adv Med Sci. 2025 Feb 5;70(1):174-183. doi: 10.1016/j.advms.2025.02.002. Online ahead of print.

Akpınar, K., **Aksun, S.**, Kemal Akpınar, K. 2024. Evaluation of the Urine Drug Abuse Screening Tests. 2024 Clin Lab. Mar 1;70(3). doi:10.7754/Clin.Lab.2023.230812

Erbak Yılmaz Huriye, **Aksun Saliha**, Günay Süleyman, Elmalı Ferhan, Çekiç Cem (2023). Evaluation Of Plasma Soluble Urokinase Plasminogen Activator Receptor (Supar) Levels In Ulcerative Colitis. Elsevier Bv, 24, 175-179., Doi: 10.1016/J.Ajg.2023.03.001 (Yayın No: 8793914)

Aksoyalp Zinnet Şevval, Erdoğan Betül Rabia, **Aksun Saliha** (2023). Optimization Of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit Protocol To Detect Trimethylamine N-Oxide Levels In Humans. Excli Journal, 22, 263-273., Doi: 10.17179/Excli2022-5617 (Yayın No: 8794106)

Eroğlu Filibeli Berna, Karabulut Bayraktar Melike, **Aksun Saliha**, Çatli Gönül, Yildirim Duman Jülide Gülizar, Dünder Bumin Nuri (2022). The Effect Of Breast Milk Nesfatin-1 And Ghrelin Levels On Growth In Infants With Sga. The Turkish Journal Of Pediatrics, 64(2), 239-245., Doi: 10.24953/Turkjp.2021.1075 (Yayın No: 8168952)

Aksun, M., **Aksun, S.**, Coşar, MA., Neziroğlu Gür, E., Girgin, S., Balıkoğlu, E., Karahan, N., Gürbüz, A. (2021). “The Impact of Perioperative Viscoelastic Test Application on Blood Product Usage and Outcome in Cardiac Surgery Regional Cardiac Surgery Center Experience. Journal of Cardio-Vascular-Thoracic Anaesthesia and Intensive Care Society, vol. 27, no. 4, pp. 233–240.

Pamuk Gülseren, Kaner Gülşah, Koç Esra Meltem, Toşur Tuncay, Dasdelen Sumeyra, **Aksun Saliha**, Pamuk Barış Önder (2021). Assessment Of Nutritional Status And Quality Of Life In Individuals With And Without Diabetes Over 65 Years Of Age. International Journal Of Diabetes In Developing Countries, 41(1), 141-147., Doi: 10.1007/S13410-020-00855-Y (Yayın No: 6691547)

Aşkin Meryem, Koç Esra Meltem, Sözman Melih Kaan, Turan Muzaffer Onur, Soypaçacı Zeki, **Aksun Saliha** (2021). Evaluation Of Dipper And Non-Dipper Blood Pressure Patterns And Quality Of Life Among Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Arquivos Brasileiros De Cardiologia, 116(2), 295-302., Doi: 10.36660/Abc.20190536 (Yayın No: 7528857)

Pamuk Gülseren, Kaner Tohtak Gülşah, Koç Esra Meltem, Toşur Tuncay, Daşdelen Sumeyra, **Aksun Saliha**, Pamuk Barış Önder (2021). Assessment Of Nutritional Status And Quality Of Life In Individuals With And Without Diabetes Over 65 Years Of Age. International Journal Of Diabetes In Developing Countries, 41, 141-147., Doi: 10.1007/S13410-020-00855-Y (Yayın No: 7528688)

Çakir Adem, Payza Umut, **Aksun Saliha**, Kayali Ahmet, Karakaya Zeynep, Topal Fatih Esad (2021). Validity Of Signal Peptide-Cub-Egf Domain-Containing Protein-1 (Scube-1) In The Diagnosis Of Aortic Dissection. Signa Vitea, 17(1), 112-116., Doi: 10.22514/Sv.2020.16.0043 (Yayın No: 6403822)

Seyhanli Zeynep, Seyhanli Ahmet, **Aksun Saliha**, Pamuk Barış Önder. (2021). Evaluation Of Serum Angiopoietin-Like Protein 2 (Angptl-2), Angiopoietin-Like Protein 8 (Angptl-8), And High-Sensitivity C-Reactive Protein (Hs-Crp) Levels In Patients With Gestational Diabetes Mellitus. The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine.

Albaş Süleyman, Koç Esra Meltem, Nemli Salih Atakan, Demirdal Tuna, Soyöz Mustafa, **Aksun Saliha**, Sözman Melih Kaan, Avşar Candegir, Gürbüz Burcu Çerçi (2021). Vitamin D Levels And Vitamin D Receptor (Vdr) Gene Polymorphisms In Inactive Hepatitis B Virus Carriers. Journal Of The College Of Physicians And Surgeons Pakistan, 31(04), 391-398., Doi: 10.29271/Jcsp.2021.04.393 (Yayın No: 7528851)

Ersöz Hasan, Ağababaoğlu İsmail, Taylan Ibrahim, Çakir İzzetiye Ebru, **Aksun Saliha**, Güneli Mehmet Ensari (2020). Do Oral Amino Acid Supplements Facilitate The Healing Of Rat Lung Injuries?. European Journal Of Cardio-Thoracic Surgery, 58, 983-990., Doi: 10.1093/Ejcts/Ezaa206 (Yayın No: 6901049)

Gediz Füsün, Örük Gonca, Korkmaz Ub, **Aksun Saliha**, Çalan Mehmet, Savaşoğlu Kaan, Yılmaz Af, Payzin Kadriye Bahriye (2020). A Possible Connection Between Circulating 25-Hydroxy-Vitamin D And Molecular Response In Chronic Myeloid

Leukemia. Bratislava Medical Journal, 121, 366-369., Doi: 10.4149/Bll_2020_059 (Yayın No: 6900417)

Köken Ebru, Öz Oyar Eser, Uyanıkgil Yiğit, Azak Pazarlar Burcu, Bilister Cansu, **Aksun Saliha**, Yiğittürk G, Köken Ec (2020). Exogenous Follistatin Administration Ameliorates Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury Through Anti-Inflammation And Anti-Apoptosis Effects. Bratislava Medical Journal, 121, 143-150., Doi: Doi: 10.4149/Bll_2020_020 (Yayın No: 6900711)

Kalemci Serdar, Tanriverdi Özgür, Şimşek Abdullah, **Aksun Saliha**, Çelik Özgür I, Barutça Sabri, Zeybek Arife, Demirci Buket (2019). Evaluation Of Oxaliplatin-Induced pulmonary Toxicity In Rats. Contemporary Oncology, 23(3), 151-156. (Yayın No: 5446643)

Topal Fatih Esad, Karakaya Zeynep, Akyol Pinar Yeşim, Payza Umut, Çalışkan Murat, Topal Firdevs, **Aksun Saliha**, Erdoğan Serpil, Neşelioğlu Salim (2019). Increased Thiol/Disulphide Ratio In Patients With St Elevation-Acute Coronary Syndromes. Cukurova Medical Journal, 44, 20-25., Doi: 10.17826/Cumj.527542 (Yayın No: 5360162)

Aşkin Meryem, Koç Esra Meltem, Soyöz Mustafa, **Aksun Saliha**, Aydoğmuş Serpil, Sözmen Melih Kaan (2019). Relationship Between Postmenopausal Vitamin D Level, Menopausal Symptoms And Sexual Functions. Journal Of The College Of Physicians And Surgeons Pakistan, 29(09), 823-827., Doi: 10.29271/Jcsp.2019.09.823 (Yayın No: 5305830)

Aksun Murat, **Aksun Saliha**, Kestelli Mert, Kuru V, Tanyeli HF, Girgin Senem, Damar Ertan, Gölboyu BE, Karahan N (2019). The Postoperative Effects Of Use Of Trimetazidine Before The Coronary Artery Bypass Graft Surgery. Nigerian Journal Of Clinical Practice, 22(7), 997, Doi: 10.4103/Njcp.Njcp_587_18 (Yayın No: 5305868)

S. AKSUN *et al.*, "Comparison of Blood Gas Measurements Drawn with Synchronous Dried and Liquid Heparinized Injector and Biochemical Analyzes," *Journal of Cardio-*

Vascular-Thoracic Anaesthesia and Intensive Care Society, vol. 24, no. 3, pp. 118–123, Jan. 2018.

Aksun Saliha, Gökçimen Alpaslan, Kahyaoğlu Fadime, Demirci Buket (2019). The Effect Of Paracetamol Exposure On Hepatic And Renal Tissues During Statin Usage. *Turkish Journal Of Biochemistry-Turk Biyokimya Dergisi*, 44(1), 113-120., Doi: 10.1515/Tjb-2018-0252 (Yayın No: 4967154)

Eryilmaz Ufuk, **Aksun Saliha**, Demirci Buket (2018). Protective Effect Of Pycnogenol On Cisplatin Induced-Cardiotoxicity In Rats. *Meandros Medical And Dental Journal*, 19(3), 192-197., Doi: 10.4274/Meandros.85856 (Yayın No: 4950920)

Çolak Hülya, Cömert Şule, Bahar Engin, **Aksun Saliha**, Ersan Sibel, Değirmenci Papatya (2018). Evaluation Of Smoking As An Additional Risk Factor Forcardiovascular Diseases Among Hemodialysis Patients Byincreased Levels Of Il-6, Tnf-Alpha, Hscrp And Endothelin-1. *Revista De Nefrologia, Dialisis Y Transplante*, 38(2), 103-110. (Yayın No: 4505216)

Değirmenci Bayrak Papatya, **Aksun Saliha**, Altin Z, Bilgir F, Arslan IB, Çolak Hülya, Ural B, Solakoğlu Kahraman D, Diniz Ünlü Ayşe Güliden, Özdemir B, Kirmaz Cengiz (2018). Allergic Rhinitis And Its Relationship With Il-10, Il-17, Tgf-B, Ifn-Γ, Il 22, And Il-35. *Disease Markers*, 2018, 1-6., Doi: 10.1155/2018/9131432 (Yayın No: 4981710)

Eryilmaz Ufuk, **Aksun Saliha**, Demirci Buket (2018). The Effect Of Oxaliplatin On Heart Tissue Of The Rats. *Journal Of Clinical And Analytical Medicine*, 9(1), 9-12., Doi: 10.4328/Jcam.5223 (Yayın No: 4968324)

Temur Muzafer, Özbay Pelin Özün, **Aksun Saliha**, Yılmaz Özgür, Çift Tayfur, Üstünel Sibel, Calan Mehmet (2017). Elevated Circulating Levels Of Xenopsin-Related Peptide-1 Are Associated With Polycystic Ovary Syndrome. *Archives Of Gynecology And Obstetrics*, 296(4), 841-846., Doi: 10.1007/S00404-017-4493-7 (Yayın No: 4112320)

Temur Muzafer, Yilmaz Özgür, **Aksun Saliha**, Çalan Mehmet, Özbay Pelin Özün, Kumbasar Serkan, Sever Erman (2016). The Relationship Of Urocortin-2 With Insulin Resistance Patients Having Pcos. Gynecological Endocrinology, 33(2), 124-127., Doi: 10.1080/09513590.2016.1240772 (Yayın No: 3362513)

Eryilmaz Ufuk, Demirci Buket, **Aksun Saliha**, Boyacioğlu Murat, Akgüllü Çağdaş, İlgenli Tevfik Fikret, Yalinkilinç Hande Sultan, Bilgen Mehmet (2015). S100a1 As A Potential Diagnostic Biomarker For Assessing Cardiotoxicity And Implications For The Chemotherapy Of Certain Cancers. Plos One, 10(12), 1-7., Doi: 10.1371/Journal.Pone.0145418 (Yayın No: 2008345)

Temur Muzafer, Yilmaz Özgür, **Aksun Saliha**, Özün Özbay Pelin, Çalan Mehmet, Küme Tuncay, Karakulak Murat, Korkmaz Hüseyin Anil (2015). Increased Circulating Urocortin-3 Levels Is Associated With Polycystic Ovary Syndrome. Gynecological Endocrinology, 32(3), 218-222., Doi: 10.3109/09513590.2015.1110135 (Yayın No: 2008376)

Temiz Can, Kalemci Serdar, Cilaker Miçili Serap, Tekmen Işıl, Yıldız Gülserap, Acar Tolgahan, Ayik Sibel, **Aksun Saliha**, Yilmaz Osman, Akkoçlu Atilla (2015). The Effect Of Methyl Palmitate On Treatment Of Experimental Asthma. Journal Of The Pakistan Medical Association, 65(6), 632-636. (Yayın No: 2344097)

Aksun Murat, Girgin Senem, **Aksun Saliha**, Kestelli Mert, Bozok Şahin, Yürekli İsmail, Derya Kuyucu, Şencan Atilla, Gürbüz Ali, Karahan Nagihan (2015). Comparison Of Intermittent Antegrade Cardioplegia And Antegrade Retrograde Continuous Cardioplegia In Terms Of Myocardial Protection In Cardiac Surgery. Turk Gogus Kalp Damar Cerrahisi Dergisi-Turkish Journal Of Thoracic And Cardiovascular Surgery, 23(1), 26-31., Doi: 10.5606/Tgkdc.Dergisi.2015.10182 (Yayın No: 2341012)

Kadriye Bahriye Payzin, Kaan Savasoglu, Inci Alacacioglu, Fusun Ozdemirkiran, Belgin Berber Mutlu, Sadi Bener, Aylin Orgen Calli, Betul Bolat Kucukzeybek, **Aksun Saliha** (2014). Jak2 V617f Mutation Status Of 232 Patients Diagnosed With

Chronic Myeloproliferative Neoplasms. Clinical Lymphoma Myeloma Leukemia, 14(6), 525-533., Doi: 10.1016/J.Clm1.2014.02.013 (Yayın No: 2250964)

Dirican Ahmet, Levent Fatih, Alacacioğlu Ahmet, Küçükzeybek Yüksel, Varol Umut, Kocabaş Uğur, Şenöz Oktay, Emren Sadik Volkan, Demir Lütfiye, Çoban Eyüp, **Aksun Saliha**, Sütcü Recep, Tarhan Mustafa Oktay (2014). Acute Cardiotoxic Effects Of Adjuvant Trastuzumab Treatment And Its Relation To Oxidative Stress. Angiology, 65(10), 944-949., Doi: 10.1177/0003319714523112 (Yayın No: 2345151)

Dirican Ahmet, Küçükzeybek Yüksel, Alacacioğlu Ahmet, Varol Umut, **Aksun Saliha**, Bayoğlu İbrahim Vedat, Demir Lütfiye, Çoban Eyüp, Sütcü Recep, Tarhan Mustafa Oktay (2014). Impact Of Pre Angiogenic Factors On The Treatment Effect Of Bevacizumab In Patients With Metastatic Colorectal Cancer. Medical Oncology, 31(905), 1-7., Doi: 10.1007/S12032-014-0905-8 (Yayın No: 2344691)

Atay Ayşenur, Demir Leyla, Çuhadar Serap, Sağlam Gülcan, Ünal Hülya, **Aksun Saliha**, Arslan Banu, Özkan Asuman, Sütcü Recep (2014). Clinical Biochemistry Laboratory Rejection Rates Due To Various Types Of Preanalytical Errors. Biochemia Medica, 24(3), 376-382., Doi: 10.11613/Bm.2014.040 (Yayın No: 2008468)

Kalemci Serdar, Dirican Nermin, Sakalli Çetin Esin, Sözen Hamdi, Üner Aykut G, Yaylali Asli, **Aksun Saliha**, Karaçam Volkan, Ülger Esin, Sütcü Recep, Dirican Ahmet (2013). The Efficacy Of Minocycline Against Methotrexate Induced Pulmonary Fibrosis In Mice. European Review For Medical And Pharmacological Sciences, 17(24), 3334-3340. (Yayın No: 2380349)

Kalemci Serdar, Zeybek Arife, İntepe YS, Uner AG, Acar Tolgahan, Yaylali A, **Aksun Saliha**, Can C, Gülaydin A, Sütcü Recep (2013). Methyl Palmitate Attenuates Lipopolysaccharide Induced Acute Lung Injury In Mice. Clin Ter, 164(6), 413-419., Doi: 107417/Ct.2013.163 (Yayın No: 2345241)

Kalemci Serdar, Yıldız Gülserap, Zeybek Arife, Ayık Sibel, Sakalli Çetin Esin, Cilaker Miçili Serap, Bağriyanik Hüsnü Alper, **Aksun Saliha**, Ersöz Hasan, Yılmaz Osman (2013). Mistletoe Extract Helixor Treatment Attenuates Allergic Airway Remodeling A Mouse Model Of Asthma. Acta Medica Mediterranea, 29(2), 183-189. (Yayın No: 4974449)

Kestelli Mert, Güzeloğlu Mehmet, Yürekli İsmail, Çakır Habib, Yılmaz Yeliz, Erdi Eda, **Aksun Saliha**, Tulukoğlu Engin, Ortaç Ragıp (2013). Investigation Of The Direct Hepatic Effects Of Intramuscular Interleukin 8 Injection In An Experimental Rabbit Model. Medical Science Monitor Basic Research, 19, 241-245., Doi: 10.12659/MSmbr.889347 (Yayın No: 2344954)

Ulman Cevval, Aydemir Ömer, Taneli Fatma, **Aksun Saliha**, Öztin Ayça, Şafak Öztürk Cennet, Laçın Selman (2011). Parental Attitude In Women With Hyperprolactinemia A Controlled Cross Sectional Study. Turkish Journal Of Biochemistry-Türk Biyokimya Dergisi, 36(1), 68-72. (Yayın No: 2381365)

Apakkan Aksun Saliha, Özmen Dilek, Özmen Bilgin, Parıldar Zuhal, Mutaf Mehmet Işıl, Turgan Nevbahar, Habif Sara, Kumanlioğlu Kamil, Bayindir Oya (2004). B2-Microglobulin And Cystatin C In Type 2 Diabetes: Assessment Of Diabetic Nephropathy. Experimental And Clinical Endocrinology Diabetes, 112(04), 195-200., Doi: 10.1055/S-2004-817933 (Yayın No: 2380138)

Apakkan Aksun Saliha, Özmen Bilgin, Özmen Dilek, Parıldar Zuhal, Şenol Belgin, Habif Sara, Mutaf Mehmet Işıl, Turgan Nevbahar, Bayindir Oya (2003). Serum And Urinary Nitric Oxide In Type 2 Diabetes With Or Without Microalbuminuria. Journal Of Diabetes And Its Complications, 17(6), 343-348., Doi: 10.1016/S1056-8727(02)00196-4 (Yayın No: 2380009)

Turgan Nevbahar, Boydak Bahar, Habif Sara, **Apakkan Saliha**, Özmen Dilek, Mutaf Mehmet Işıl, Bayindir Oya (1999). Plasma Homocysteine Levels In Acute Coronary Syndromes. Japanese Heart Journal, 40(6), 729-736., Doi: 10.1536/Jhj.40.729 (Yayın No: 2380641)

ULUSAL DERGİLERDE YAYIMLANAN MAKALELER

Üge, M., **Aksun, S.**, Ertürk, MS., Öncel Van, T., Demir, L., Pamuk, BÖ., Narin, F. (2024). Investigation Bisphenol A and Phthalate Levels in Idiopathic Hyperandrogenemia. *Türk Klinik Biyokimya Derg*, DOI:<https://dx.doi.org/10.56615/tkbd.2024.13>

L. Demir, S. Çuhadar, T. Öncel, **S. Aksun**. (2023). “Laboratory Tests to Distinguish COVID-19 Intensive Care Patients.” *Adnan Menderes University*, vol. 7, no. 1, pp. 208–216.

S. Acar Şahan, B. Karadaş, S. Aydın Akfırat, N. Aydemir, **S. Aksun**, And Y. C. Kaplan. (2023). “False positive ecstasy MDMA urine drug screening test results due to bupropion use A case report,” *Cumhuriyet Medical Journal*, vol. 45, no. 4, pp. 96–99.

Demir, L., **Aksun, S.** (2023). “Laboratuvarımızda Çalışılan Prenatal Tarama Testlerinde Ölçüm Belirsizliği,” *Turkish Society of Clinical Biochemistry*, vol. 21, no. 2, pp. 94–101.

Burcu Ceylan, **Aksun, S.**, Akbıyık Ayşe, Derya Uzelli, Akın Esra. (2022). Examining the Effect of Venipuncture Technique with Vacutainer and Injector on the Rate of Hemolysis. *İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*

Mert Üge, Leyla Demir, **Saliha Aksun**. (2022). İzmir İli Birinci ve İkinci Trimester Prenatal Tarama Testi Güncel Medyan Verilerinin Değerlendirilmesi. *Türk Kadın Sağlığı ve Neonatoloji Dergisi*

Saliha Aksun, Başak Bağcı, Leyla Demir, Oğuz Karalar, Murat Aksun. (2022). Yasadışı Madde Analizlerinde Preanalitik Evre. Derleme Makale. *Turkish Society of Clinical Biochemistry*. DOI:<https://dx.doi.org/10.56615/tkbd.2022.18>

Aksun Saliha, Öncel Tuğba (2019). Takrolimus Kan Düzeyinin Doğru Raporlanmasının önemi: Bir Biyokimya Laboratuvar Takrolimus Ölçüm yönteminin Performansı. *Smyrna Tıp Dergisi (Smyrna Medical Journal)*, 2, 13-18. (Yayın No: 5367791)

Aksun Saliha, Avşar Candeğer (2019). Madde Bağımliliği Analizleri Ve İdrar Bütünlüğünün Önemi. Medical Science, 14(1), 22-32., Doi: 10.12739/Nwsa.2019.14.1.1b0063 (Yayın No: 4966668)

Aksun Saliha, Öncel Tuğba, Avşar Candeğer, Demir Leyla, Tengiz Funda İfakat, Narin Figen (2019). Daha Etkin Tıbbi Biyokimya Eğitimi İçin Durum Değerlendirme Çalışması. Condition Assessment Study For More Effective Medical Biochemistry Education. Smyrna Tıp Dergisi, 1, 1-8. (Yayın No: 4980501)

Saliha Aksun, Banu Pınar Şarer Yürekli, Köksal Dönmez, Habib Çakır, Senem Girgin, Ertan Damar, Mert Kestelli, Murat Aksun, İsmail Yürekli. (2019). “The Relationship Between Taurin, Glycated Hemoglobin And C-Reactive Protein In Diabetic Patients With Heart Surgery”. Journal of Cardio-Vascular-Thoracic Anaesthesia and Intensive Care Society.

Saliha Aksun, Leyla Demir, Fevziye Burcu Şirin, Ayşenur Atay. (2016). Hemolysis and test rejection:are we following a reliable process? Doi:Https://Dx.Doi.Org/10.1111/Febs.1380.

Saliha Aksun, Alperen İhtiyar, Hasan Orhan Çetin, Gamze Kıvrak, Fidan Bulut, Hakkı Mert Keklik, Can Hepduman, Bülent Özkan, Recep Sütcü (2016). “Evaluation Of Vitamın D Vitamın B12 Iron Levels In Asmall Group Of Medical Faculty Students”. Turkish Journal Of Biochemistry-Turk Biyokimya Dergisi.

H. Ünal, A. Atay, E. Söğüt, L. Demir, **S. Aksun**, And R. Sütcü, “Beta Talasemi Taşıyıcılığına Eşlik Eden Demir Eksikliği Anemisi,” *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, Vol. 13, No. 1, Pp. 29–34, Mar. 2015.

F. D. İnce, N. Doğan, N. K. Eren, H. Solmaz, **S. Aksun**, And R. Avci. (2015). “The Diagnostic Value Of Ultra Troponin I In Patients Admitted To Emergency Department With Chest Pain And Performed Coronary Angiography,” The Journal Of Tepecik Education And Research Hospital, 25, No. 1, Pp. 33–37.

S. Ayık, M. Apaydin, **S. Aksun**, G. Akhan, And M. Bahçeci, “Hypothyroidism In Patients With Obstructive Sleep Apnea Syndrome,” *Dicle Medical Journal / Dicle Tıp Dergisi*, Vol. 41, No. 3, Pp. 512–517, Sep. 2014.

B. Arslan, T. Yiğitbaşı, **S. Aksun**, And M. Öney. (2012). “Nöral Tüp Defekti Riskinin Saptanması açısından İkinci Trimester Tarama Testi Gerekli Midir,” *İzmir Atatürk Eğitim Hastanesi Tıp Dergisi*, 50 (2) 59-62, Vol. 50, No. 2, Pp. 59–62.

Belgin Şenol, Ceyda Kabaroğlu, **Saliha Aksun**, Sara Habif, Mehmet Işıl Mutaş, Nevbahar Turgan, Dilek Özmen, Kadir Hakan Kültürsay, Oya Bayındır. 2003. “Akut Koroner Sendromlarda Akut Faz Reaktanları Nitrik Oksid Ve Östrojen,” *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, Vol. 1, No. 3, Pp. 133–141, Sep

Saliha Aksun, Dilek Özmen, Oya Bayındır. (2001). “Metalloproteinazlar, İnhibitörleri ve İlişkili Fizyolojik ve Patolojik Durumlar”. Derleme Makale. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*.