



T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

TRİPLE NEGATİF MEME KANSERİNDE WNT/B-KATENİN SİNYAL YOLAĞININ İNHİBİSYONUNUN TERAPÖTİK ETKİSİ

AHMET TARIK HARMANTEPE

UZMANLIK TEZİ

GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

Doç. Dr. ENİS DİKİCİER

2022-SAKARYA

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**TRİPLE NEGATİF MEME KANSERİNDE WNT/B-KATENİN
SİNYAL YOLAĞININ İNHİBİSYONUNUN TERAPÖTİK ETKİSİ**

AHMET TARIK HARMANTEPE

UZMANLIK TEZİ

GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

Doç. Dr. ENİS DİKİCİER

2022-SAKARYA

TEZ ONAYI

Kurum : Sakarya Üniversitesi/Tıp Fakültesi
Program türü : Uzmanlık Tezi
Anabilim Dalı : Genel Cerrahi
Tez Sahibi : Ahmet Tarık HARMANTEPE
Sınav Tarihi : **Saat:**
Tez Başlığı : Triple Negatif Meme Kanseriinde Wnt/B-Katenin Sinyal Yolağının İnhibisyonunun Terapötik Etkisi

Bu çalışma, içerik ve kalite bakımından Uzmanlık Tezi olarak Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

	Ünvan, Adı-Soyadı (Kurum adı)	İmza	Kabul/Red*
Danışman (Üye)			
Üye			
Üye			

* Red kararının gerekçesi onay sayfasının arkasında belirtilmelidir.

ONAY

“Bu tez ../../202.. tarihinde yukarıdaki jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.”

../../202..
Tıp Fakültesi Dekanı

BEYAN

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

*Bu çalışma T.C. Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan 29/01/2021 tarihinde onay alarak hazırlanmıştır.

*Bu çalışma, Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyonu Başkanlığı tarafından 2021-7-25-9 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Tarih:
12/02/2022
Adı-Soyadı
İmza

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitim süresince bilgisi, hoşgörüsü ve engin deneyimleri ile her zaman desteğini gördüğüm, mesleki gelişimime çok değerli katkıları bulunan aynı zamanda tez danışmanım olan emeklerini hiçbir zaman ödeyemeyeceğim saygıdeğer hocam Doç. Dr. Enis DİKİCİER'e teşekkürlerimi sunarım.

Cerrahi asistanlığımın ilk yıllarında temel cerrahi eğitimi almamda, klinisyenliğimin ve cerrahi el becerimin gelişmesinde çok büyük katkıları olan; analitik düşünmemi sağlayan Klinik Eğitim Sorumlularım Prof. Dr. Havva Belma KOÇER'e, Prof. Dr. Fehmi ÇELEBİ'ye ve Prof. Dr. Fatih ALTINTOPRAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Cerrahi deneyim ve bilgilerinden yararlanma fırsatı bulduğum Prof. Dr. Metin ERCAN'a, Prof. Dr. Kerem KARAMAN'a, Doç. Dr. Zülfü BAYHAN'a, Yard. Doç. Dr. Adem YÜKSEL'e, Dr. Öğr. Üyesi Necattin FIRAT'a teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlık dönemimde destek olan bir aile olduğumuz ve benden sonra da kliniğin yükünü omuzlayacak tüm arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim.

Tez projemin çıkış noktasındaki fikirsel katkıları, tezimin olgunlaşma süreci ve tez projemin büyük bir bölümünü oluşturan laboratuvar kısmındaki önemli desteklerinden dolayı Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalından Doç Dr Gamze Güney ESKİLER'e ve Dr Asuman Deveci ÖZKAN'a teşekkür ederim.

Her an yanımda olan beni maddi ve manevi anlamda her türlü destekleyen ve bugüne gelmemde sonsuz özveride bulunan, hayattaki en değerli varlıklarım olan anneme babama ve bu zorlu süreçteki desteklerini asla unutamayacağım hayatımın en önemli parçaları olan sevgili eşime ve canım kızıma da çok teşekkür ederim.

Saygılarımla

Dr. Ahmet Tarık HARMANTEPE

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
ÖZET.....	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Memenin Gelişimi, Fizyolojisi ve Anatomisi.....	3
2.1.1 Meme gelişimi.....	3
2.1.2. Meme anatomisi.....	3
2.1.2.1. Memenin arterleri	4
2.1.2.2. Memenin venleri.....	5
2.1.2.3. Memenin lenfatik drenajı	5
2.2. Meme Kanseri.....	8
2.2.1. İnsidans – epidemiyoloji.....	8
2.2.2. Risk faktörleri.....	12
2.2.2.1. İleri yaş.....	12
2.2.2.2. Aile öyküsü.....	12
2.2.2.3. Üreme faktörleri.....	12
2.2.2.4. Östrojen.....	12
2.2.2.5. Yaşam tarzı	13
2.2.3. Meme kanserinde evreleme ve prognoz	13
2.2.3.1. Tümör boyutu.....	18
2.2.3.2. Aksiller lenf nodu tutulumu.....	18
2.2.3.3. Metastaz.....	18
2.2.3.4. Histolojik tip.....	18

2.2.3.5. Lenfovasküler invazyon.....	19
2.2.3.6. Hormon reseptörleri.....	19
2.2.3.7. Her2 reseptör.....	20
2.2.3.8. Ki-67.....	20
2.2.3.9. Moleküler subtipler.....	20
2.2.3.9.1 Triple negatif meme kanseri.....	21
2.2.4. Etiyopatogenez.....	24
2.2.5. Wnt/ β -katenin sinyal yolağı ve TNIK.....	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	33
3.1. Hücre Kültürü.....	33
3.2. Hücre Canlılık Testi (WST-1) Analizi.....	33
3.3. Annexin-V Analizi.....	33
3.4. Hücre Döngüsü Analizi.....	34
3.5. Akridin-Oranj/Etidyum Bromür (AO/EB) Boyama.....	34
3.6. RNA İzolasyonu.....	34
3.7. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Analizi.....	35
3.8. İstatistiksel Analiz.....	35
4.BULGULAR.....	36
4.1 NCB-0846'nın Sitotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi.....	36
4.2. NCB-0846'nın Apoptotik Etkinin Değerlendirilmesi.....	39
4.3. NCB-0846'nın Hücre Döngüsünde Neden Olduğu Değişimlerin Değerlendirilmesi	41
4.4. NCB-0846'nın Hücreler Üzerinde Neden Olduğu Morfolojik Değişimlerin Belirlenmesi.....	44
4.5. <i>CTNNB1</i> Gen Ekspresyon Düzeyinde Değişimlerin Değerlendirilmesi.....	47
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	49
6. KAYNAKLAR.....	58

KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ

TNMK	: Triple negatif meme kanseri
TRAF2	: TNF reseptör ilişkili faktör 2
TNIK	: Nck etkileşimli kinaz
SEER	: Surveillance, Epidemiology and Results
HRT	: Hormon replasman tedavisi
AJCC	: Amerikan Ortak Kanser Komisyonu
LDİ	: Lenfatik vasküler invazyon
KDİ	: Kan damarı invazyonu
ÖR	: Östrojen reseptörü
PR	: Progesteron reseptörü
AR	: Androjen reseptörü
HER2	: İnsan epidermal büyüme faktörü 2
KKH	: Kanser kök hücreleri
PTY	: Patolojik tam yanıt
IHC	: İmmünohistokimya
EMT	: Epithelial-mesenchymal transition
BL1	: Bazal-like 1
BL2	: Bazal-like 2
MSL	: Mezenkimal stem like
LAR	: Luminal androjen reseptör

BLIS	: Basal-like immunosuppressed
BLIA	: Basal-like imm�n-activated
PARP	: Poli (ADP-riboz) polimeraz
BRCA	: Breast cancer gene
DHP	: Düzlemsel hücre polaritesi
LRP	: D���k dansiteli lipoprotein
DVL	: Disheveled
TCF	: T hücreye özgü faktör
LEF	: Lenfoid güçlendirici faktör
ROCK	: Rho ile ilişkili kinaz
JNK	: N-terminal kinaz
APC	: Adenomatöz Polipozis Koli
WST-1	: Water soluble tetrazolium-1
AO/EB	: Akridin-Oranj / Etidyum Bromür
EGFR	: Epidermal büyüme faktör reseptörü

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Türkiye’de 2020 yılında görülen kanser tiplerinin insidans mortalite ve prevalans değerleri.....	11
Tablo 2.2. Meme kanserinde TNM sınıflaması.....	16
Tablo 2.3. Wnt sinyal yolağında teröpatik hedefler.....	29
Tablo 4.1. NCB-0846’nın doza ve zamana bağlı hücrelerdeki canlılık yüzdeleri.....	36
Tablo 4.2. 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda NCB-0846 uygulanan MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerindeki kat değişimleri.....	47

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Memenin arterleri.....	5
Şekil 2.2. Memenin lenfatik drenajı.....	6
Şekil 2.3. Memenin lenfatik drenajıyla ilişkili başlıca lenf nodu grupları.....	7
Şekil 2.4. Yaşa göre standardize edilmiş mortalite ve insidans sıralamasında ilk on kanser tipi ve yüzdeleri.....	9
Şekil 2.5. Türkiye 2020 yılında görülen kanser türleri, sayısı ve oranları.....	9
Şekil 2.6. Türkiye 2020 yılında görülen kanser türleri, sayısı ve oranların cinsiyete göre dağılımı.....	10
Şekil 2.7. Klinik Prognostik Evre, verilen tedavinin türüne bakılmaksızın tüm hastalara uygulanır.....	17
Şekil 2.8. Patolojik Prognostik Evre, cerrahi uygulanan hastalara uygulanır.....	17
Şekil 2.9. Meme kanserinin ilerlemesinin varsayımsal modeli.....	25
Şekil 2.10. Wnt yolu, kanonik ve kanonik olmayan olarak sınıflandırılabilir.....	27
Şekil 2.11. Kanonik Olmayan Wnt Yolu ve Notch and Sonic Hedgehog Yolu.....	28
Şekil 2.12. Kanonik Wnt Yolu ve Wnt/beta-Katenin Sinyal Yolunun İnhibitörleri....	32
Şekil 4.1. NCB-0846'nın MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde uygulama süresine bağlı sitotoksik etkisi.....	38
Şekil 4.2. 72 saat NCB-0846 uygulanan MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde Annexin V analizi histogramları.....	40
Şekil 4.3. NCB-0846'nın farklı konsantrasyonlarının neden olduğu erken ve geç apoptoz yüzdelerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması.....	41

Şekil 4.4. 72 saat NCB-0846 uygulanan MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde hücre döngüsü analizi histogramları.....	43
Şekil 4.5. NCB-0846'nın farklı konsantrasyonlarının hücre döngüsünde etkisinin istatistiksel olarak karşılaştırılması.....	44
Şekil 4.6. MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinin NCB-0846 konsantrasyonuna bağlı olarak morfolojik değişimlerin değerlendirilmesi.....	46
Şekil 4.7. 72 saat boyunca 1uM, 2uM ve 3uM NCB-0846 uygulanan MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde <i>CTNNB1</i> gen ekspresyon seviyesindeki değişimler.....	48



ÖZET

GİRİŞ VE AMAÇ: Wnt/ β -katenin sinyal yolağının aktivatör kinazı olan TNİK' in NCB-0846 ile inhibisyonunun triple negatif meme kanseri üzerindeki terapötik etkisinin moleküler düzeyde araştırılması amaçlanmıştır.

YÖNTEM: Triple negatif meme kanseri hücre hattı olarak MDA-MB-231, kontrol hücre hattı olarak ise MCF-10A hücreleri kullanılmıştır. WST-1 analizi ile NCB-0846'nın sitotoksik etkisi, Annexin V analizi ile apoptotik etkisi, hücre döngüsü analizi ile hücre döngüsüne etkisi ise , Akridin Oranj boyama ile hücre morfolojisine olan etkisi gösterilmiştir. Ayrıca *CTNNB1* (β -katenin) gen ekspresyonu üzerindeki etkisi RT-PCR analizi gösterilmiştir. Tüm analizlerde hücrelere 1, 2 ve 3 μ M dozlarda NCB-0846 uygulanmış ve NCB-0846 uygulanmayan hücre hatları negatif kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir ve deneyler üçer kez tekrar edilmiştir.

BULGULAR: NCB-0846, MDA-MB-231 hücrelerindeki canlılık oranları zaman ve doz bağımlı olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p<0,01$). MDA-MB-231 hücreleri için en düşük canlılık oranları 72 saat inkübasyon sonrasında 3 μ M dozda %42,20 olarak belirlenmiştir. MCF-10A hücrelerinde 72 saat inkübasyon sonrasında 3 μ M dozda canlılık oranı %53,92 olarak belirlenmiştir ($p<0,01$). Apoptotik hücre oranları, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde 3 μ M NCB-0846 inkübasyon için sırasıyla %60,5 ve % 39,33 olarak tespit edilmiştir. MDA-MB-231 hücrelerinde NCB-0846'nın artan konsantrasyonuna bağlı olarak G2/M evresinde hücre tutulmasına neden olduğu belirlendi ($p<0,01$). Ayrıca morfolojik olarak, MDA-MB-231 hücrelerinde DNA fragmentasyonu, kromatin yoğunlaşması ve hücre büzülmesi gözlemlendi. RT-PCR analizinde ise MDA-MB-231 hücrelerinde *CTNNB1* ekspresyon seviyesi azalırken, MCF-10A hücrelerinde anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir.

SONUÇ: NCB-0846'nın, MDA-MB-231 hücrelerinde hücre canlılığını inhibe ederken, apoptozu indüklediği gösterildi. Sonuçlarımız, NCB-0846'nın kanser tedavisi için uygun bir aday olabileceğini, ancak moleküler düzeyde etki mekanizmalarını daha iyi anlamak için daha ileri *in vitro* ve *in vivo* çalışmaların gerekli olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: NCB-0846, TNİK, Triple negatif meme kanseri, Wnt/ β -katenin

ABSTRACT

Therapeutic effect of inhibition of Wnt/ β -catenin signal pathway in triple negative breast cancer

AIM: It was aimed to investigate the therapeutic effect of NCB-0846 inhibition of TNIK, which is the activator kinase of Wnt/ β -catenin signaling pathway, on triple negative breast cancer at the molecular level.

MATERIAL AND METHOD: MDA-MB-231 cells were used as triple negative breast cancer cell line and MCF-10A cells were used as control cell line. WST-1 analysis showed the cytotoxic effect of NCB-0846, Annexin V analysis showed its apoptotic effect, cell cycle analysis showed its effect on cell cycle, and Acridine Orange staining showed its effect on cell morphology. In addition, the effect of NCB-0846 on CTNNB1 (β -catenin) gene expression was demonstrated by RT-PCR analysis.

RESULTS: The viability rates in NCB-0846, MDA-MB-231 cells decreased significantly in a time and dose dependent manner ($p < 0.01$). The lowest viability rates for MDA-MB-231 cells were determined as 42,20% at the 3 μ M dose after 72 hours of incubation. After 72 hours of incubation in MCF-10A cells, the viability rate was determined as 53,92% at 3 μ M dose ($p < 0.01$). Apoptotic cell rates were determined as 60,5% and 39,33% for 3 μ M NCB-0846 incubation in MDA-MB-231 and MCF-10A cells, respectively. It was determined that NCB-0846 caused cell uptake in the G2/M phase due to the increasing concentration in MDA-MB-231 cells ($p < 0.01$). In the RT-PCR analysis, while the expression level of CTNNB1 was decreased in MDA-MB-231 cells, it was determined that it increased significantly in MCF-10A cells.

CONCLUSION: NCB-0846 was shown to induce apoptosis while inhibiting viability in MDA-MB-231 cells. Our results suggest that NCB-0846 may be a suitable candidate for cancer therapy, but further in vitro and in vivo studies are required to better understand its mechanisms of action at the molecular level.

Keywords: NCB-0846, TNIK, Triple negative breast cancer, Wnt/ β -catenin

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Meme kanseri, tüm dünyada görülen kanserlerin en sık, kadınlarda kansere bağlı mortalitenin birinci nedenidir. 2020 Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre (GLOBOCAN) meme kanseri yılda 2,3 milyon (%11,7) yeni vaka ile en sık teşhis edilen kanserdir. Kadınların tüm yaşamı boyunca meme kanserine yakalanma riski, Amerika Birleşik Devletleri'nde 8 kadında bir, Avrupa'da ise 10 kadında birdir (Siegel ve ark., 2021).

Triple negatif meme kanseri (TNMK), diğer kanser subtipleri içinde en mortal seyredenidir. Trastuzumab (Herceptin) gibi HER2 pozitif meme kanserlerine karşı, tamoksifen gibi ER-pozitif meme kanserlerine karşı hedeflenen terapiler mevcut iken, TNMK' nde bu reseptörler olmadığından bu gibi terapötik ajanlar kullanılamamaktadır. Şu an için cerrahi müdahale ve sistemik sitotoksik kemoterapi, TNMK için başlıca tedavi yolları olmuştur.

WNT/ β -Katenin sinyal yolağı, hücre çoğalması, farklılaşma, hücre göçü, genetik stabilite, apoptoz ve kök hücre yenilenmesi gibi temel hücresel işlevlerinin düzenlenmesinde görev alan temel sinyal yolağıdır. Bu sinyal yolağının düzenlenmesinde pek çok molekül rol oynamaktadır. Bu moleküllerde meydana gelebilecek mutasyonlar ve konjenital malformasyonlar, çeşitli kanser türlerinin ve osteoporoz gibi çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir (MacDonald ve ark., 2009).

Wnt/ β -katenin sinyal yolağındaki değişimlerin kolon, pankreas, akciğer ve meme kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde rolüne dair literatürde farklı çalışmalar bulunmaktadır (Cheng ve ark., 2019; Pan ve ark., 2020; X. Xu ve ark., 2020; Zhou ve ark., 2020). Bu kapsamda, Wnt/ β -katenin sinyal yolağının farklı basamaklarındaki inhibisyonunun kolorektal kanser, akciğer kanseri ve meme kanserindeki terapötik etkisi farklı çalışmalarla ortaya konmuş ve bu nedenle kanser tedavisinde potansiyel bir hedef olarak önemi vurgulanmaktadır (Huang ve ark., 2019; Larriba ve ark., 2013; Zhang ve Wang, 2020).

Traf2 (TNF reseptör ilişkili faktör 2) ve TNIK (Nck etkileşimli kinaz), WNT/ β -Katenin sinyal yolağının önemli bir düzenleyici bileşenleridir. TNIK, nükleus düzeyinde β -Katenin/TCF4 kompleksi ile etkileşime girerek TCF4'ü fosforile etmektedir. Aktive olan β -Katenin/TCF4 kompleksi, transkripsiyonu başlatarak hedef genleri aktive etmektedir. Dolayısıyla bu sinyal yolağının aşırı aktivitesine bağlı oluşan tümör genezisi inhibe etmek için TNIK terapötik bir hedef haline gelmiştir (Mahmoudi ve ark., 2009).

TNIK inhibisyonunun kolorektal kanser ve akciğer kanseri üzerinde anti-kanser terapötik etkisi araştırılmıştır (Sugano ve ark., 2021). Ancak meme kanseri hücreleri üzerinde TNIK inhibitörlerinin etkisine dair henüz bir çalışma mevcut değildir. NCB-0846, yeni tanımlanmış küçük molekül bir TNIK inhibitörüdür (Masuda ve ark., 2016; Yamada ve Masuda, 2017). NCB-0846, anti-WNT/ β -Katenin aktivitesine sahiptir. Aktif olmayan bir konformasyonda TNIK'a bağlanan NCB-0846, Wnt/ β - Katenin yolunu inhibe etmektedir.

Bu kapsamda bizim çalışmamızda, TNIK inhibitörü olarak NCB-0846'nın TNMK'de terapötik etkisinin moleküler düzeyde araştırılması amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Memenin Gelişimi, Fizyolojisi ve Anatomisi

2.1.1 Meme gelişimi

Meme dokusu ektodermal orjinli apokrin özellikte bir salgı bezidir. Embriyonun 5-6. haftasında, aksilladan inguinal bölgeye uzanan, gövdenin önünde, kalınlaşmış ektoderm çizgisinden gelişir. Bu çizgi üzerinden meme ve meme başı gelişmektedir.

Doğum yapmamış kadınlarda meme gelişimi tamamlanmamıştır. Bu dönemde, duktus epiteli daha fazla, alveol epiteli daha azdır. Meme süt vermek üzere hamilelikte hazırlanır. Duktal, lobüller ve alveollerdeki gelişmeye bağlı olarak hamileliğin sonlarında meme boyutu normalden iki kat daha artabilir. Doğumla beraber plasental laktojen, östrojen ve progesteron azalarak hipofiz kaynaklı prolaktin salınımı ile süt üretimi sağlanmaktadır.

Menapoz döneminde memede glandüler doku azalmaktadır ve yerini yağ dokusu almaktadır. Menapoz sonrası meme dokusunun yapısı büyük oranda yağ dokusu, bağ dokusu ve duktuslardan oluşmaktadır. Bu dönemde yağ dokusu az ise memeler pitotik olmaktadır.

2.1.2. Meme anatomisi

Farklı boyutlardaki yetişkin kadın memesi, toraks ön duvarında, üst ve altta II-VI. kostalar ile, lateralde ön aksiller çizgi ve medialde sternum arasındadır. Memenin üst lateral kısmı aksillaya doğru uzanmaktadır. Bazen aksiller fossa anterioruna kadar ilerleyen, aksiller proses veya Spence Kuyruğu olarak adlandırılan yapı görülebilir (Okubo ve ark., 2013). Meme dokusu, pektoral fasianın anteriorunda lokalizedir ve pektoral fasiadan submammarian bir alan ile ayrılmaktadır. Submammarian alanın varlığı, serratus anterior, eksternal oblik kaslar ve pektoralis majör ile ilişkili olarak memenin mobilitesini sağlamaktadır.

Her memede 15-20 adet meme lobu bulunmaktadır ve her lob 20-40 adet lobül içermektedir. Her lob, majör duktus içerisine açılmaktadır. Dar bir ağızla majör

duktuslar meme başının ampullasına açılmaktadır. Meme başı/aerola kompleksinin altında her bir majör duktusun genişlemiş kısmı laktiferöz sinüste yer almaktadır.

2.1.2.1. Memenin arterleri:

Lateralde - Arteria axillaris

- Arteria thoracia superior

- Arteria thoracoacromialis

- Arteria thoracica lateralis

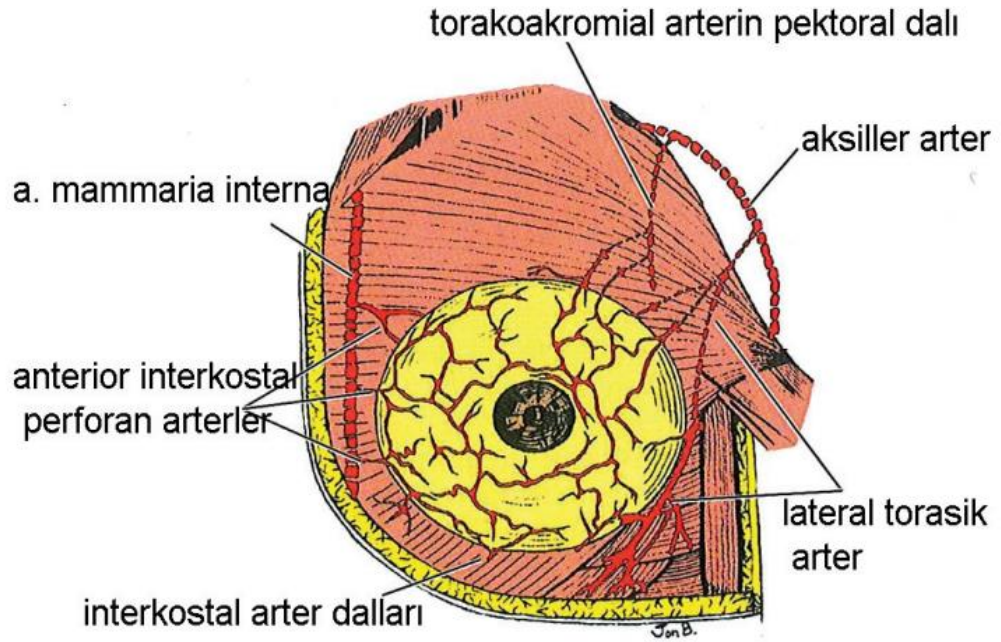
Arteria subscapularis

Medialde

- Arteria thoracica internanın dalları

Posteriorda

-II-IV. arteria interkostalislerden gelen perforan damarlar (Şekil 2.1.)



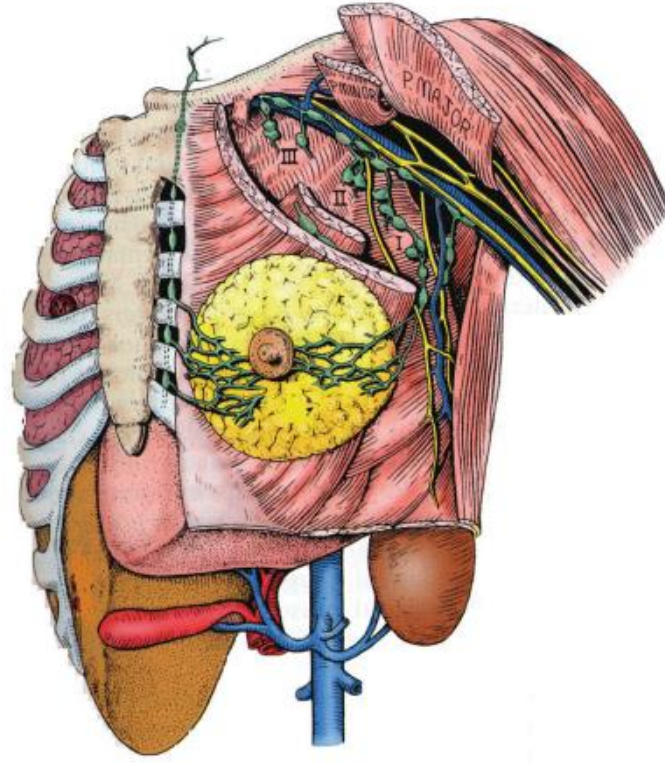
Şekil 2.1. Memenin arterleri (Bland ve ark., 2018’ den değiştirilerek kullanılmıştır).

2.1.2.2. Memenin venleri:

Memenin venöz akımı, periareolar pleksustan başlar ve arterlere eşlik eder. Ayrıca bunlara ek yüzeysel venöz bir pleksus da vardır (Ricbourg, 1992).

2.1.2.3. Memenin lenfatik drenajı:

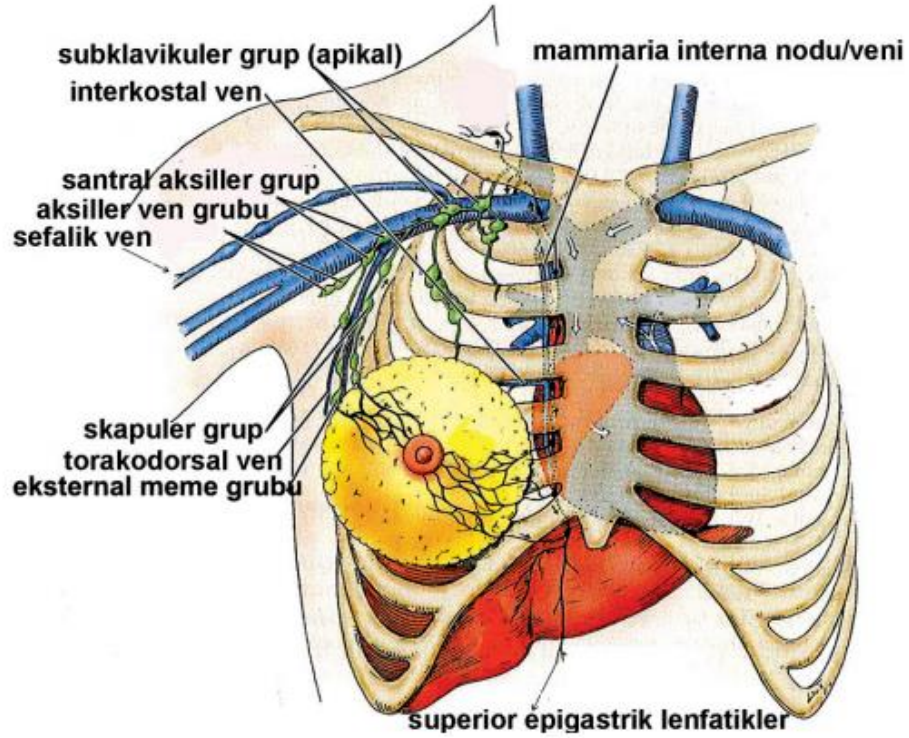
Memenin lenfatik akımı başlıca aksiller lenf nodlarına olmaktadır. Bunun yanısıra non-aksiller lenf nodları olan mammaria interna lenf nodları, mammaria interna arteri ve veni boyunca lokalizedir ve bunlara da drenaj mevcuttur (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Memenin lenfatik drenajı(Bland ve ark., 2018’ den kullanılmıştır)

Çalışmalarda sadece aksillaya akım %80-97, aksillaya ve mamma interna lenf nodlarının her ikisine akım %20-25 oranda ve yalnızca mamma internaya lenfatik drenaj ise %3-6 oranda gerçekleşmektedir (Cody, 2010). Bazı lenfatikler pektoral majorun lateralinden aksilladaki lenf nodların pektoral grubuna drene olurken, bazıları da pektoral majorun arasından direk apikal lenf nodlarına olmaktadır. Bunlar dışında diğer lenfatikler de pektoral majorun arasından mamma interna lenf nodlarına drene olmaktadır. Mamma interna lenf nodları parietal plevra önünde ve interkostal aralıklarda lokalizedir (Johnson, 2010). Kollateral memeye geçiş lenfatikler arasındaki bağlantılarla olmaktadır. (Nathanson ve ark., 2001).

Aksillada pektoral minörün komşuluğuna göre sınıflandırılan lenf nodları vardır. Level 1 lenf nodları pectoral minör kasının laterali ve inferiorunda, Level 2 lenf nodları pektoral minörün posteriorunda , Level 3 ise pektoral minörün üst kenarının medialinde tanımlanmaktadır (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Memenin lenfatik akımıyla ilişkili lenf nodu grupları : pektoral minörün komşuluklarına göre belirtilmiştir (Bland ve ark., 2018’ den değiştirilerek kullanılmıştır).

Memede lenfatik pleksuslar, interlobüler bağ dokusunda, laktifer kanalların duvarlarında ve memenin subareoler bölgesinde bulunmaktadır. Lenfatik akım subareoler lenfatik pleksustan kontralateral memeye, mammaria internaya ve aksiller lenf nodlarına olmaktadır (Johna, 2006). Hem dermal hem parankim içi lenfatikler %20-86 olguda aynı koltuk altı lenf nodlarına drene olmaktadır (Vendrell-Torné ve ark., 1972). Kadavra incelemelerinde lenfatik duktuslara boya enjeksiyonu sonrası tüm yüzeysel lenfatik duktuslarından Level I lenf nodlarına akım olduğu gösterilmiştir. Yüzeysel lenfatik kanallar dermiş ve parankim arasındadır ve bazıları parankim içi mammaria interna veya intramammarian lenf nodlarına drene olmaktadır (Suami ve ark., 2008). Küçük memelerde, genç ve zayıf bayanlarda mammaria internaya drenajın daha fazla olduğu bildirilmiştir (Krynycky ve ark., 2004). Peritümöral derin intraparakimal boya enjeksiyonu, subdermal, yüzeysel ve intradermal

enjeksiyonlardan daha fazla mamma interna lenf nodlarına drenaj göstermektedir (Mudun ve ark., 2008).

2.2. Meme Kanseri

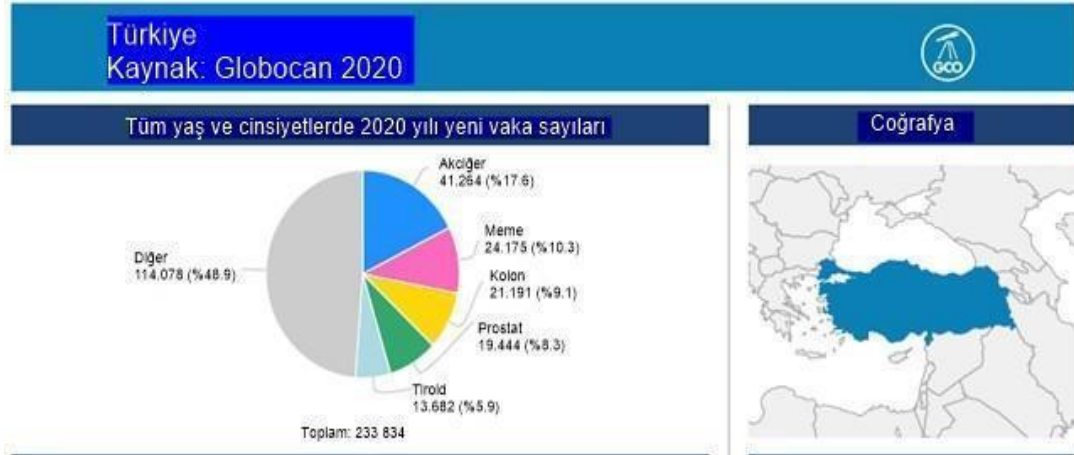
2.2.1 İnsidans – epidemiyoloji

Kadınlar arasında meme kanseri en sık teşhis edilen kanser türüdür ve kanserden kaynaklı ölümlerin başında gelmektedir. Dünya Sağlık Örgütü öncülüğünde dünyanın farklı bölgelerinde ‘Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı’ tarafından oluşturulan “GLOBOCAN 2020” kılavuzuna göre her yıl teşhis edilen yaklaşık 19,3 milyon yeni kanser vakasının %11,7’sini meme kanserleri oluşturmaktadır (Sung ve ark., 2021). En mortal kanserler arasında ise akciğer, kolorektal, karaciğer, mide kanserinin ardından 5.sırada yer almaktadır (Şekil 2.4.). Gelişmiş tarama ve görüntüleme modaliteleri ve erken teşhis sayesinde gelişmiş ülkelerde meme kanseri daha yüksek bir insidans gösterirken, göreceli mortalite ise daha düşük olmaktadır (Ghoncheh ve ark., 2016). Kanser taramalarının ve ortalama yaşam süresinin artması nedeniyle tanısı konulan meme kanseri sıklığı da artmıştır.

Ülkemizde ise 2020 yılında kanser tanısı alan 233.000 kişinin %10,3’ünü meme kanseri oluşturmaktadır (Şekil 2.5.). Kadın popülasyonda bu oran %23,9’a kadar çıkmaktadır (Şekil 2.6.). Tüm yaş gruplarındaki 5 yıllık meme kanseri prevalansı her 100.000 kişide 196.64 olarak tespit edilmiştir (Tablo 2.1).

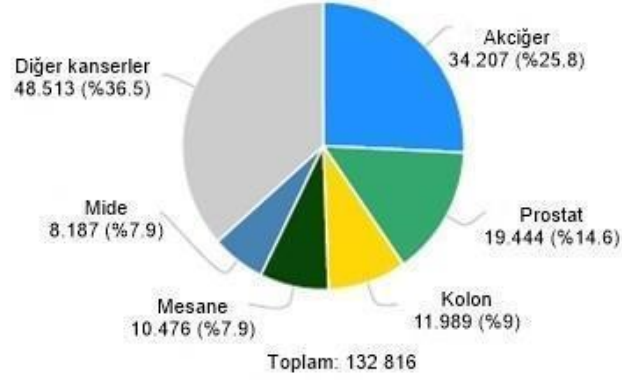


Şekil 2.4. Yaşa göre standardize edilmiş insidans ve mortalite sıralamasında ilk 10 kanser tipi ve yüzdeleri (Sung ve ark., 2021’ den değiştirilerek kullanılmıştır).

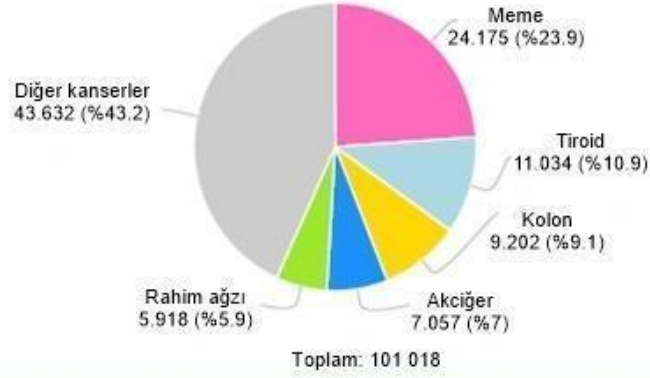


Şekil 2.5. Türkiye 2020 yılında görülen kanser türleri, sayısı ve oranları (Sung ve ark., 2021’ den değiştirilerek kullanılmıştır).

Tüm yaşlarda erkeklerde 2020 yılında yeni vaka sayıları



Tüm yaşlarda kadınlarda 2020 yılında yeni vaka sayıları



Şekil 2.6. Türkiye 2020 yılında görülen kanser türleri, sayısı ve oranların cinsiyete göre dağılımı (Sung ve ark., 2021' den değiştirilerek kullanılmıştır).

Tablo 2.1. Türkiye’de 2020 yılında görülen kanser türlerinin prevalans, insidans ve mortalite değerleri (Sung ve ark., 2021’ den değiştirilerek kullanılmıştır).

Kanser	Yeni Vakalar				Ölümler				5 yıllık prevalans (tüm yaşlarda)	
	Sayı	Sıra	%	Kümülatif risk	Sayı	Sıra	%	Kümü latif risk	Sayı	Oran (Her 100 000)
Akciğer	41 264	1	17,6	4.82	37 070	1	29,3	4.47	45 607	54.08
Meme	24 175	2	10,3	4.89	7 161	4	5,7	1.39	83 973	196.64
Prostat	19 444	3	8,3	5.26	5 464	6	4,3	0.85	69 682	167.36
Tiroid	13 682	4	5,9	1.41	795	21	0,63	0.09	47 883	56.77
Mide	13 075	5	5,6	1.46	10 789	2	8,5	1.18	19 781	23.45
Mesane	12 248	6	5,2	1.47	3 771	11	3.0	0.36	35 857	42.52
Kolon	12 217	7	5,2	1.41	6 545	5	5,2	0.66	31 660	37.54
Rektum	8 741	8	3,7	1.03	4 178	10	3,3	0.46	24 796	29.40
Pankreas	8 392	9	3,6	0.94	8 214	3	6,5	0.92	6 392	7.58

2.2.2. Risk faktörleri

2.2.2.1. İleri yaş

Yaşlanma ve cinsiyet, meme kanserinin en önemli risk faktörlerindendir. Meme kanseri görülme sıklığı, artan yaşla önemli oranda ilişkilidir. 2016 yılında yapılan çalışmada, Amerika Birleşik Devletleri'nde meme kanserine bağlı mortalitenin %99,3'ü ve %71,2'si sırasıyla 40 ve 60 yaşın üzerindeki kadınlarda bildirilmiştir (Siegel ve ark., 2017). Bu nedenle 40 yaş ve üzeri kadınlarda her yıl mamografi taraması yaptırmak gerekmektedir.

2.2.2.2. Aile öyküsü

Meme kanserlerinin 1/4'ü aile öyküsü ile ilişkilidir (Brewer ve ark., 2017). Özellikle annesi ve/veya kız kardeşine meme kanseri teşhisi konulmuş olan kadınlarda risk oranı fazladır. İngiltere'de 113.000'den fazla kadından oluşan bir kohort çalışması, birinci derece akrabalarında meme kanseri saptanan kadınların akrabalarında meme kanserine yakalanma riski, saptanmayan kadınlara göre 1,75 kat daha fazla bulunmuştur. İki tane veya daha fazla birinci derece akrabada saptandığında risk en az 2,5 kat artmaktadır (Brewer ve ark., 2017).

2.2.2.3. Üreme faktörleri

İlk gebeliğin geç yaşta olması, düşük parite, erken menarş ve geç menopoz gibi faktörler meme kanseri riskini arttırmaktadır. Menopozdaki her 1 yıllık gecikme, meme kanseri riskinde %3 artışa neden olmaktadır. Her ilave doğum veya menarşta her bir yıllık gecikme meme kanseri riskini sırasıyla %5 veya %10 oranında azaltmaktadır (Dall ve Britt, 2017; Ghoncheh ve ark., 2016). Norveç'te yapılan bir kohort çalışmada, ilk doğumun erken (<20 yaş) veya geç (≥ 35 yaş) yaşlarda olmasının meme kanseri riskini 1.54 kat arttırdığı bulunmuştur (Horn ve ark., 2013).

2.2.2.4. Östrojen

Eksojen ve endojen östrojen, meme kanseri riskindeki artış ile ilişkilidir. Endojen östrojen genellikle menopoz öncesi kadınlarda overlerde üretilmektedir.

Ooforektomili hastalarda bu nedenle meme kanseri riskinin düşük olduğu gözlemlenmiştir (Kauff ve ark., 2008). Hormon replasman tedavileri (HRT) ve oral kontraseptif tedavileri eksojen östrojenin ana kaynaklarıdır. Oral kontraseptifler 1960'lardan bu yana yaygın olarak kullanılmaktadır. Tedavisinin üzerinden 10 yıldan uzun süre geçmiş oral kontraseptif kullanan kişilerde meme kanseri risk faktörü olmaktan çıkmaktadır (Bethea ve ark., 2015).

HRT, menopoz yada postmenopozal kadınlar için östrojen veya diğer hormonların replasmanıdır. Bazı çalışmalar, HRT'nin meme kanseri için risk faktörü olabileceğini bildirmiştir. Birleşik Krallık'taki bir milyon kadın üzerinde yapılan bir çalışmada, HRT uygulananlar ile hiç uygulanmayanlar arasında 1,66 oranında artmış risk bildirilmiştir. Asya'da 22.929 kadın üzerinde yapılan bir kohort çalışmasında ise; sırasıyla 4 ve 8 yıl süreyle HRT aldıktan sonra sırasıyla 1,48 ve 1,95 oranlarında risk artışı bildirilmiştir. (Beral ve Million Women Study Collaborators, 2003).

2.2.2.5. Yaşam tarzı

Yağlı diyet ve aşırı alkol tüketimi meme kanseri riskini artırabilmektedir. Alkol, östrojeni yükselttiği, folat emilimini azalttığı ve hücre DNA' sına zarar verdiği için meme kanseri riskini arttırmaktadır. Elli üç epidemiyolojik araştırmayı kapsayan bir meta-analiz, günde 35-44 gram alkol tüketmenin riski %32 arttırdığını ve bu miktardan günlük 10 gram daha fazla tüketmenin riski %7,1 oranında arttırdığını bildirmiştir (Hamajima ve ark., 2002; Jung ve ark., 2016). Meme kanserli hastalarda doymuş yağlar olmak üzere, aşırı yağ tüketimi kötü prognoz ile ilişkilidir (Makarem ve ark., 2013). Meme kanseri riski ve sigara arasındaki ilişki tartışmalı olsada, sigara dumanında bulunan mutajenler emzirmeyen kadınlarda memeden alınan aspirasyon örneklerinde tespit edilmiştir. Sigaranın meme kanseri riskinin yaklaşık 1,55 kat arttırdığını yapılan meta-analiz ve derlemeler göstermektedir (Jones ve ark., 2017; Knight ve ark., 2017; Macacu ve ark., 2015). Meme kanserine yakalanma riskinin özellikle erken yaşta sigara içenlerde arttığı bilinmektedir (Catsburg ve ark., 2015).

2.2.3. Meme kanserinde evreleme ve prognoz

Amerikan Ortak Kanser Komisyonu (AJCC) tarafından, meme kanseri için TNM sınıflandırması; tümör derecesi, proliferasyon hızı, östrojen reseptörü (ÖR) ve

progesteron reseptörü (PR) ekspresyonu, insan epidermal büyüme faktörü 2 (HER2) ekspresyonu ve gen ekspresyonu gibi biyolojik faktörlerin evreleme sistemine dahil edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Belirlenen biyo-belirteçler ile TNM evreleme sistemine yalnızca patolojik evreyi değil, aynı zamanda farklı biyo-belirteçlerin de sağ kalımı etkileyebileceğini gösteren geniş kohort çalışmalarının sonuçları da kullanılmıştır (Edition ve ark., 2017; Yi ve ark., 2011). AJCC 8. baskı, anatomik evrelemeyi tümör derecesi, hormon reseptör durumu ve HER2 durumu ile birleştiren klinik ve patolojik prognostik evreleri tanımlamaktadır (Şekil 2.7. ve Şekil 2.8.).

AJCC' nin 8. baskısında T belirlenirken en büyük invaziv karsinomun boyutu göz önünde bulundurulur, karsinoma in situ odakları göz ardı edilir.

TNM sınıflaması aşağıda gösterilmiştir (Tablo 2.2.).

Tx: Primer tümör değerlendirilemiyor

T0: Primer tümör yok

Tis: İn situ kanser

*Tis (DKIS): Duktal karsinoma in situ

*Tis (Paget): Altta yatan invaziv karsinom yada DKIS olmayan Paget hastalığı

T1: Tümör 2 cm' den küçük

*T1mi : $\leq 0,1$ cm

*T1a : $> 0,1$ cm , $< 0,5$ cm

*T1b : $> 0,5$ cm, ≤ 1 cm

*T1c : > 1 cm, ≤ 2 cm

T2: Tümör 2 cm.den büyük, 5 cm.den küçük

T3: Tümör 5 cm.den büyük

T4: Göğüs duvarına veya deriye direk yayılım gösteren tümör tümör herhangi bir boyutta olabilir;

*T4a : Pektoralis majör kası da dahil olmak üzere göğüs duvarına invazyon. Yalnızca pektoral kas invazyonu T4a olarak değerlendirilmez.

*T4b : Ödem, portakal kabuğu görünümü, ülserasyon, ipsilateral memede makroskopik satellit cilt nodülleri (inflamatuvar karsinom olmadan)

*T4c : T4a + T4b

*T4d : İnflamatuvar meme kanseri

Meme cildinin üçte birinden fazlasını tutmuş tipik cilt lezyonları olan vakalar inflamatuvar karsinomdur. Dermal lenfatikleri yayılmış invaziv karsinononun histolojik varlığı tanıyı destekler.

Bölgesel lenf nodlarının klinik sınıflandırması (cN)

NX: Primer tümör değerlendirilemiyor

N0: Lenf nodu tutulumu yok

N1: Hareketli ipsilateral, level I-II lenf nodu

N2: Fikse ya da konglomere level I-II lenf nodu veya internal mammarian lenf nodları

*N2a: Fikse ya da konglomere level I-II lenf nodu

N2b: Internal mammarian lenf nodları (aksillada metastaz yok)

N3: İpsilateral infraklavikular lenf nodu (level3) veya internal mammarian lenf nodu + level I-II aksiller lenf nodu veya, supraklavikular lenf nodu metastazı

*N3a: İpsilateral infraklavikular lenf nodu (level3) tutulumu

*N3b: Internal mammarian lenf nodu + level I-II aksiller lenf nodu metastazı

*N3c: Supraklavikular lenf nodu tutulumu

Mx : Uzak metastaz bilinmiyor

M0 : Uzak metastaz yok

M1 : Uzak metastaz var

Tablo 2.2.: Meme kanserinde TNM sınıflaması (Sobin ve ark., 2011’ den değiştirilerek kullanılmıştır).

EVRE 0	Tis	N0	M0
EVRE 1A	T1	N0	M0
EVRE 1B	T0	N1 mi	M0
	T1	N1 mi	M0
EVRE 2A	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
EVRE 2B	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
EVRE 3A	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
EVRE 3B	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T4	N2	M0
EVRE 3C	Her T	N3	M0
EVRE 4	Her T	Her N	M1

			ER+, PR+, HER2+	ER+, PR+, HER2-	ER+, PR-, HER2+	ER-, PR+, HER2+	ER-, PR-, HER2+	ER+, PR-, HER2-	ER-, PR+, HER2-	ER-, PR-, HER2-	Anatomik evre
TisN0	M0	G1-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T1N0		G1	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IB	IA
T0N1mi		G2	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IB	IA
T1N1mi		G3	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IB	IB	IA
T0N1		G1	IB	IB	IIA	IIA	IIA	IIA	IIA	IIA	IIA
T1N1		G2	IB	IB	IIA	IIA	IIA	IIA	IIA	IIIB	IIA
T2N0		G3	IB	IIA	IIA	IIA	IIA	IIIB	IIIB	IIIB	IIA
T2N1		G1	IB	IIA	IIA	IIA	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB
T3N0		G2	IB	IIA	IIA	IIA	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB
T3N1		G3	IB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB
T0N2		G1	IIA	IIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIB	IIIA
T1N2		G2	IIA	IIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIB	IIIA
T2N2		G2	IIA	IIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIB	IIIA
T3N1		G2	IIA	IIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIB	IIIA

Şekil 2.7. Klinik Prognostik Evre, verilen tedavinin türüne bakılmaksızın tüm hastalara uygulanır. (ER = östrojen reseptör, G = grade, mi = mikrometastaz, PR = progesteron reseptör, Tis = in situ) (Koh ve Kim, 2019' dan değiştirilerek kullanılmıştır).

			ER+, PR+, HER2+	ER+, PR+, HER2-	ER+, PR-, HER2+	ER-, PR+, HER2+	ER-, PR-, HER2+	ER+, PR-, HER2-	ER-, PR+, HER2-	ER-, PR-, HER2-	Anatomik evre
TisN0	M0	G1-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T1N0		G1	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IA
T0N1mi		G2	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IB	IA
T1N1mi		G3	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IB	IA
T0N1		G1	IA	IA	IB	IB	IIA	IB	IB	IIA	IIA
T1N1		G2	IA	IA	IB	IB	IIA	IIA	IIA	IIA	IIA
T2N0		G3	IA	IB	IIA	IIA	IIA	IIA	IIA	IIA	IIA
T2N1		G1	IA	IA	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB
T3N0		G2	IB	IB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB
T3N1		G3	IB	IIA	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIA	IIIB
T0N2		G1	IB	IB	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA
T1N2		G2	IB	IB	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIB	IIIA
T2N2		G2	IB	IB	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIB	IIIA
T3N1		G3	IIA	IIIB	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIA	IIIC	IIIA
T4N0		G1	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB
T4N1		G2	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIC	IIIB
T4N2		G3	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIC	IIIC	IIIC	IIIC	IIIB
Any N3		G3	IIIB	IIIB	IIIB	IIIB	IIIC	IIIC	IIIC	IIIC	IIIB
Any	M1	Any	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV	IV

Şekil 2.8. Patolojik Prognostik Evre, cerrahi uygulanan hastalara uygulanır. (Ek olarak, pT1, pT2, pN0, M0, ER+ ve HER2 - kanserleri, Oncotype DX nüks skoru 11'den az olduğunda Patolojik Prognostik Evre grubu IA olarak atanır.) (Koh ve Kim, 2019' dan değiştirilerek kullanılmıştır)

2.2.3.1. Tümör boyutu

Tümör boyutu nodal durumdan bağımsız olarak çok önemli prognostik bilgiler sağlamaktadır. Aksillası negatif 13.000'den fazla kadından oluşan Surveillance,

Epidemiology and End Results (SEER) veri tabanında, 1 cm'den küçük tümörü olan hastalarda 5 yıllık ortalama sağ kalım %99'a yakınken, 1–3 cm tümörü olanlarda %89 ve tümörü 3-5 cm olanlarda %86'dır (Carter ve ark., 1989). Diğer çalışmalarda, 20 yılı aşan takiplerde bile benzer sonuçlar elde edilmiştir (Quiet ve ark., 1995; Rosen ve ark., 1993).

2.2.3.2. Aksiller lenf nodu tutulumu

Adjuvan sistemik tedavi alan hastalarda, histopatolojik kanıtlanan lenf nodu metastazlarının varlığı veya yokluğu, şimdiye kadar yapılmış hemen hemen her çalışmada güçlü bir prognostik faktördür. Amerika' da SEER veri tabanında 5 yıllık sağ kalım, aksiller lenf nodu negatif olanlarda %92, 1-3 lenf nodu pozitif olanlarda %81, 4 veya daha fazla lenf nodu pozitif olanlarda %57 olarak saptanmıştır (Carter ve ark., 1989).

2.2.3.3. Metastaz

Uzak organ metastazı kötü prognostik faktördür. Klinik veya radyolojik tanı almış olmasına bakılmaksızın bu hastaların takip ve tedavisi buna göre şekillenmektedir.

2.2.3.4. Histolojik tip

İnvaziv ductal karsinom meme kanserleri içinde en sık görülen tiptir. Meme kanserlerinin yaklaşık %70-80 ini oluşturmaktadır. Tüm meme kanserlerinin yaklaşık %5-10 'nu invaziv lobüler karsinom oluşturur. Duktal ve lobüler karsinomların daha önceleri benzer prognozda olduğu düşünülüyor olmasına rağmen, son çalışmalarda duktal karsinomların prognozunun lobüler karsinoma (bazı varyantları hariç) göre daha kötü olduğu görülmektedir (C. I. Li ve ark., 2003). Geriye kalan %10'u oluşturan; tübüler, müsinöz, medullar, metaplastik, invaziv mikropapiller karsinomlardır. Bunlardan metaplastik karsinom ve mikropapiller karsinom kötü prognoz ile ilişkilidir (Hashmi ve ark., 2018; Luna-Moré ve ark., 1994).

2.2.3.5. Lenfovasküler invazyon

Peritümöral lenfatik damar invazyonu (LDİ) ve kan damar invazyonu (KDI), hem yerel hem de uzak nüksü öngörmek için farklı çalışmalar tarafından gösterilmiştir

(Neville ve ark., 1992; Rosen ve ark., 1989). Örneğin, 20 yıllık bir çalışmada, evre-1 461 kadında nüks oranı LDİ pozitif için %38 ve LDİ-negatif hastalar için %22 olarak belirlenmiştir ($p = 0.05$) (Rosen ve ark., 1989).

2.2.3.6. Hormon reseptörleri

ÖR ve PR, meme dokusunda hücrelerin büyümesinde, proliferasyonunda ve diferansiyasyonunda görevli olan nükleer transkripsiyon faktörleridir. İmmünohistokimyasal yöntemlerle tespit edilebilirler ve tümöral dokuda %1'i ve fazlası, hormon reseptör için pozitif kabul edilmektedir. ÖR ve PR pozitif hasta grubunda hedefe yönelik tedavi mümkündür ve hormon tedavisine iyi yanıt vermektedir (H. Mohammed ve ark., 2015). ÖR pozitif hasta grubu genelde daha iyi prognozludur (Lamb ve ark., 2019). ÖR pozitif tümörlerde hormonal tedaviye yanıt %55-60 iken, ÖR negatiflerde %8 civarındadır (Ruhi, 2010). ÖR ve PR pozitif tümörlerde hormonal tedaviye yanıt %75-80'e ulaşmaktadır (Tavassoli, 1993). Tanı sonrası ilk 3 yılda nüks, ÖR negatif tümörlerde ÖR pozitif tümörlerden daha fazla oranda görülmüştür. ÖR pozitif tümörlerin, yumuşak doku ve kemikte, ÖR negatif olanların ise beyinde ve karaciğerde daha sık metastaz yaptığı bilinmektedir. Hastalık nüksünde PR, ÖR'ne göre daha belirleyici role sahiptir (Allred ve ark., 1998).

2.2.3.7. Her2 reseptör

İnsan epidermal büyüme faktörü-2 (HER2) onkogeni, epidermal büyüme faktörü reseptörünü kodlar. Prognoz belirteçidir ve en çok lenf nodu pozitif hastalarda yararlıdır, ancak lenf nodu negatif hastalarda bu belirtecin kullanımı çelişkilidir (Ross ve ark., 2003). HER2 invaziv meme kanserli tüm hastalarda ölçülmelidir. HER2'yi ölçmenin temel amacı, Trastuzumab ile tedavi edilebilecek meme kanserli hastaları seçmektir (Piccart-Gebhart ve ark., 2005; Romond ve ark., 2005; Slamon ve ark., 2001). HER2 ayrıca antrasiklin bazlı adjuvan kemoterapiden fayda görebilecek hastaları da belirleyebilir (Duffy, 2005; Gennari ve ark., 2008; Yamauchi ve ark., 2001). Meme kanserlerinde HER2'yi saptamak için iki ana tahlil, immünohistokimyasal analiz ve fluorescence in situ hybridization (FISH) testidir (Bartlett ve ark., 2003).

2.2.3.8. Ki-67

Ki-67 indeksi, meme kanseri için prognostik bir biyobelirteçtir, çünkü daha yüksek Ki-67, daha yüksek tümör derecesi ile ilişkilidir. (Hashmi ve ark., 2019)

2.2.3.9. Moleküler subtipler

2011 yılında meme kanseri için uluslararası uzman birliğinin (St.Gallen International Expert Consensus for Breast Cancer) çalışmasıyla moleküler sınıflama yapılmıştır (Goldhirsch ve ark., 2011). Beş farklı immünohistokimyasal tanım yapılmıştır.

*Luminal A (ÖR pozitif ve/veya PR pozitif, HER-2 negatif ve Ki-67 $\leq$ %14)

*Luminal B (ÖR pozitif ve/veya PR pozitif HER-2 negatif veya pozitif ve Ki67 > %14)

*HER-2 pozitif (ÖR negatif, PR negatif, HER-2 pozitif)

*Triple negatif (ÖR negatif, PR negatif, HER-2 negatif) (Goldhirsch ve ark., 2011)

Luminal A tip tümörlerde ÖR ve PR ilişkili genlerde yüksek ekspresyona sahiptir. Ki-67 düzeyi düşüktür. Hormonoterapi uygulandığından prognozu en iyi grup olarak kabul edilmektedirler.

Luminal B tip de ÖR pozitifdir ancak ilgili genlerin ekspresyonu düşüktür. İki tiptir :HER-2 pozitif ve HER-2 negatif. Luminal kanserler meme kanserlerinin yaklaşık dörtte üçünü oluşturmaktadır.(Brenton ve ark., 2005)

HER-2 pozitif tümör grubunda ÖR ve PR negatif olup tümör büyümesini sağlayan HER-2 genin yüksek ekspresyonu mevcuttur ve agresiftir. (Geyer ve ark., 2006; Gianni ve ark., 2011)

TNMK' de, ÖR, PR ve HER-2 negatiftir. TNMK' nin diğer subtiplere göre daha genç yaşta görüldüğü, tümör boyutunun daha büyük saptandığı, yüksek gradeli olduğu ve daha sık lenf nodu metastazının olduğu gözlenmiştir. Ölüm oranının 3 kat fazla görülmesi ise tümörün kötü prognozunu göstermektedir. (Nielsen ve ark., 2004).

2.2.3.9.1 Triple negatif meme kanseri

TNMK, tüm meme kanseri tanılarının yaklaşık %15-20'sini oluşturan bir meme kanseri alt kümesidir (Perou ve ark., 2000). Klinik olarak ER/PR ve HER2 ekspresyonunun olmaması olarak tanımlanan TNMK, diğer meme kanseri alt tipleriyle karşılaştırıldığında agresif ve daha kötü prognoz ile karakterizedir (Dent ve ark., 2007). Smid ve arkadaşları, 344 primer lenf nodu negatif meme kanseri arasında uzak nüks bölgesinin meme kanseri alt tipine göre farklılık gösterdiğini bildirdi (Smid ve ark., 2008). Bu analizde, akciğer ($p = 0,01$) ve beyin metastazları ($p = 0,0035$) dahil olmak üzere viseral relapslar, bazal-like tümörleri olan hastalarda daha yaygın olarak gözlemlendi. Buna karşılık, kemik nüksü lüminal alt tipte daha yaygın olarak görüldü ($p = 0,0031$) ve HER2+ kanseri olanlarda karaciğerde daha sık nüksetti ($p = 0,17$). Ayrıca, Harrell ve arkadaşları, yaklaşık 1.000 insan meme tümöründen oluşan bir veri kümesini kullanarak tümör gen ekspresyonunu değerlendirdi ve HER2+ tümörlerin daha yaygın olarak karaciğere yayıldığını, basal-like and claudin-low meme kanserlerinin ise akciğer ve beyine metastaz yaptığını bildirmiştir (Harrell ve ark., 2012). İleri evre TNMK hastalarının %50'sinde beyin metastazları gözlenmiştir (Lin ve ark., 2008).

Kemoterapiye yanıt meme kanseri alt tipine göre de farklılık gösterir; ileri evre TNMK tipik olarak preoperatif kemoterapiye daha fazla yanıt verir, ancak daha yüksek genel nüks oranlarına sahiptir (Carey ve ark., 2007; Liedtke ve ark., 2008). Bu durum "triple negatif paradoks" olarak adlandırılır (Carey ve ark., 2007). Neoadjuvan kemoterapiyi takiben TNMK'li hastalarda daha yüksek uzak rekürrens oranı, muhtemelen rezidüel hastalığa bağlanmaktadır (J. Li ve ark., 2017). Birden fazla çalışma, neoadjuvan tedaviye yanıt veren hastalarda, yanıt vermeyenlere göre daha uzun sağ kalım olduğunu bildirmiştir (Liedtke ve ark., 2008; J. Li ve ark., 2017). Neoadjuvan kemoterapiye yeni kemoterapi kombinasyonları (Platin grubu kemoteropatik ajanlar) ve yeni hedefli tedaviler (poli ADP-riboz) eklenmesi patolojik tam yanıt oranlarını arttırdığı gözlenmiştir (Sikov ve ark., 2015, 2016; von Minckwitz ve ark., 2014). Bununla birlikte, patolojik tam yanıt (PTY) oranlarındaki artışın hastalıksız sağ kalımda iyileşmeye dönüşeceği belirsizdir (Cortazar ve ark., 2014).

TNMK' nin nüks paternleri ve doğal seyri, meme kanserinin diğer alt tiplerinden farklıdır. Dent ve arkadaşları, 1601 meme kanseri tanılı hastada, TNMK' nin doğal seyri ve klinik davranışını diğer meme kanseri subtipleri ile karşılaştırdı (Dent ve ark., 2007). 8 yıllık medyan takipte bu analiz, TNMK'li kadınların uzak bir nüks yaşama olasılığının daha yüksek olduğunu göstermiştir ($p < 0.0001$); TNMK'li hastalar için sağ kalım, tanıdan sonraki 5 yıl içinde diğerlerine kıyasla daha düşüktü ($p < 0,001$). İlginç bir şekilde, TNMK olmayan meme kanserli hastalarla karşılaştırıldığında, nüks riski 3 yılda zirve yaptı ve ondan sonra azaldı. Diğer subtiplerde ise ilk 3 yıllık izlemde nüks riskinin düşük olduğu ve sonra zamanla sabit kaldığı gözlenmiştir.

Son on yılda, TNMK heterojen bir hastalık olarak kabul edilmiştir. Birkaç grup, immünohistokimya (IHK), gen ekspresyonu ve dizileme araçlarını kullanarak TNMK'nin biyolojisini incelemeye çalışmıştır. Tüm meme kanserleriyle karşılaştırıldığında, gen ekspresyonuna göre TNMK' nin belki de en iyi bilinen sınıflandırması bazal-like alt tiptir. Tüm meme kanserlerinin %15-20'sini temsil eden bazal-like alt tip, orijinal olarak keratin 5, keratin 17, integrin- β 4 ve laminin içeren bir bazal epitel hücre gen ekspresyon kümesi ile sınıflandırılır (Perou ve ark., 2000). Bazal-like meme kanseri, TNMK'nin IHK sınıflandırması ile yaklaşık %80 uyumludur (Livasy ve ark., 2006). Claudin-low olarak adlandırılan daha nadir bir meme kanseri alt tipi de genellikle TNMK' dir (Prat ve ark., n.d.). Claudin-low alt tipi, lümen farklılaşma belirteçlerinin düşük ya da hiç ekspresyonu olmaması, epithelial-mesenchymal transition (EMT) belirteçleri için zengin, bağışıklık tepkisi genleri ve kanser kök hücre benzeri özellikler ile karakterize edilir. Yüksek metaplastik ve medüller farklılaşma sıklığına sahip bu meme kanseri alt tipi, bazal-like ve luminal meme kanseri alt tipleri arasında orta düzeyde olan bir tedaviye yanıtı gösterir.

Benzersiz terapötik etkileri olan farklı biyolojik alt tipleri ortaya çıkarmak için gen ekspresyonu ve dizileme araçları kullanılarak yalnızca TNMK' lerin alt tiplendirildiği farklı ancak tamamlayıcı bir yaklaşım benimsenmiştir (M. D. Burstein ve ark., 2015; Lehmann ve ark., 2011). Lehmann ve arkadaşları 500'den fazla TNMK tümöründen gen ekspresyonunu analiz ettiler ve altı farklı alt tip belirlediler: Bazal-like (iki alt tip, BL1 ve BL2), immünomodülatör (IM), mezenkimal (M), mezenkimal stem like (MSL), ve luminal androjen reseptörü (LAR) (Lehmann ve ark., 2011). Her bir alt tipi

temsil eden hücre hattı modelleri belirlendi ve terapötik olarak hedeflendi. Sonuçlar, hücre döngüsü ve DNA hasar tepki genlerinin daha yüksek ekspresyonuna sahip olan BL1 ve BL2 alt tiplerinin hücre hatlarının sisplatine duyarlı olduğunu gösterdi. EMT ve büyüme faktörü yolları için zenginleştirilmiş mezenkimal ve MSL alt tipi hücre hatları, ikili PI3K/mTOR inhibisyonuna ve Src inhibisyonuna duyarlılığı gösterdi. Son olarak, LAR alt tipi hücre hatları, klinik alanda erken başarı gösteren bir strateji olan bir androjen reseptörü (AR) antagonistine duyarlıydı (Gucalp ve ark., 2013). Buna paralel olarak, Burnstein ve arkadaşları, bağımsız veri kümelerinde doğrulama ile yaklaşık 200 TNMK tümöründe DNA ve RNA dizilimi gerçekleştirdi ve dört alt tip tanımladı: LAR, mezenkimal (MES), basal-like immunosuppressed (BLIS) ve basal-like immune-activated (BLIA) (M. D. Burnstein ve ark., 2015). BLIS alt tipi, hem hastaliksız hem de hastalığa özgü sağ kalım için en kötü prognozlu olarak değerlendirilirken, BLIA ise en iyi prognozlu olarak değerlendirildi.

TNMK tedavisinde sıklıkla antrasiklin ve taksan türevleri kullanılmıştır. Tek başına Antrasiklinler ile %14 ila %47 arasında PTY oranları rapor edilmiştir (Bidard ve ark., 2008; Le Tourneau, 2007). Antrasiklin ve taksan türevleri ile kombine tedavide % 17 ila 39 arasında, PTY oranları rapor edilmiştir (Fernandez-Morales ve ark., 2006; Straver ve ark., 2010). GeparTrio (Alman meme grubu faz3 çalışması, 2008), neoadjuvan antrasiklinler, siklofosfamid ve taksanlarla tedavi edilen TNMK için %57'ye varan PTY oranları bildirdi (Huober ve ark., 2010).

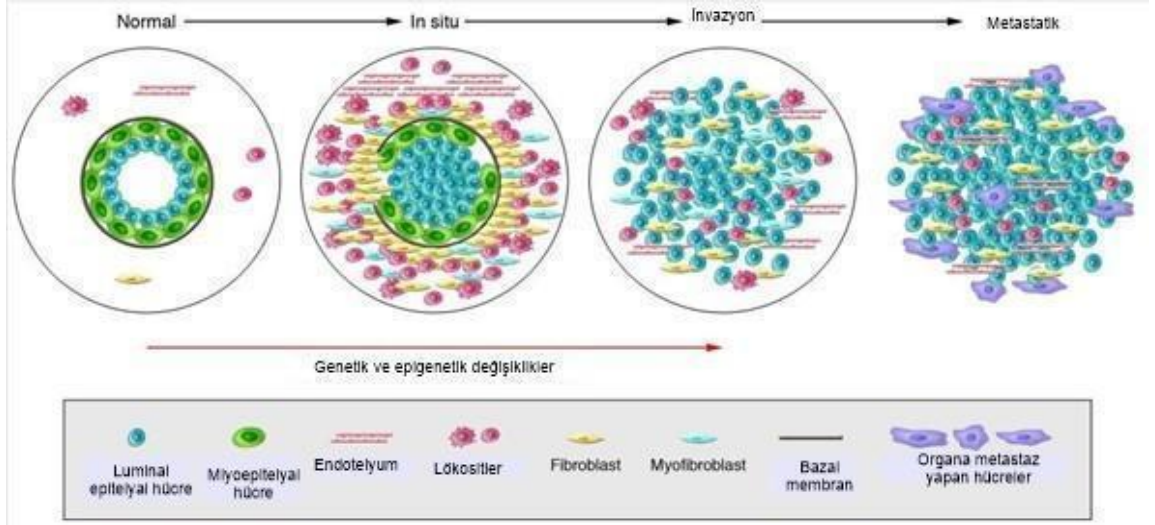
BRCA1 ve BRCA2 germline mutant tümörlerinin neoadjuvan kombine tedavisine poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) inhibitörleri eklenmiştir. PARP inhibitörleri, BRCA işlevine sahip hücreleri korurken, BRCA eksikliği olan hücrelerde sentetik öldürücülüğü indükleyerek etki eder. Faz 3 BrighTness klinik çalışması, PARP inhibitörü olan veliparib' in yerine karboplatinde daha iyi PTY iyileşmesi gördü (Loibl ve ark., 2018). Faz 2 gemsitabin, karboplatin ve iniparib klinik deneyi olan PrECOG 0105, %36'lık umut verici bir PTY verdi (Telli ve ark., 2015, 2016). İniparib artık gerçek bir PARP inhibitörü olarak kabul edilmese de, bu sonuçlar ikna edicidir (Liu ve ark., 2012; Pierce ve ark., 2013). PARP tuzağı nedeniyle farklı PARP ajanlarının farklı etkinliğe sahip olması mümkündür (Tutt, 2018). Sadece talozparib ile germline

BRCA mutasyonlu erken evre meme kanserli hastalarda umut verici PTY oranları görülmüştür (Litton ve ark., 2018).

Randomize faz 3 GeparQuinto çalışmasında, bevacizumab ilavesiyle PTY oranlarında değişiklik saptanmıştır (von Minckwitz ve ark., 2012).

2.2.4. Etyopatogeneze

Normal meme kanalları, bazal membran, lümen epitel ve miyoepitelyal tabakalardan oluşmaktadır. Stromayı oluşturan hücreler arasında çeşitli lökositler, endotel hücreleri, fibroblastlar ve miyofibroblastlar mevcuttur. İn situ karsinomlarda miyoepitelyal hücreler epigenetik ve fenotipik olarak değişiklik göstermekte ve potansiyel olarak bazal membranın bozulması nedeniyle sayıları azalmaktadır. Aynı zamanda stromal fibroblast, miyofibroblast, lenfosit ve endotel hücrelerinin sayısında artış olabilmektedir. Miyoepitelyal hücrelerin ve bazal membranın kaybı, tümör hücrelerinin çevre dokuları istila edebildiği ve uzak organlara göç edip sonunda metastazlara yol açabildiği invaziv karsinomlarla sonuçlanmaktadır (Şekil 2.9.). Meme kanserinin doğal seyri, duktal hiperproliferasyonla başlayan, ardından in situ ve invaziv karsinomlara ve son olarak metastatik hastalığa dönüşen sürecin patolojik ve klinik aşamalarını içermektedir (Allred ve ark., 2001; H. J. Burstein ve ark., 2004). Makrofajlar veya stromal etkiler, meme kanserinin başlamasında ve ilerlemesinde önemli rol oynamaktadır. Sıçanların meme bezleri üzerinde yapılan çalışmada, epitelden ve ekstraselüler matriksden bağımsız olarak yalnızca stromanın kanserojen etkisinde kalmasının da neoplaziye neden olabileceği gösterilmiştir (Maffini ve ark., 2004; Sonnenschein ve Soto, 2016) . Makrofajlar, anjiyogeneze neden olarak kanser hücrelerinin immün sistemden kaçmasını sağlayan mutajenik inflamatuvar bir mikro ortam oluşturabilmektedir (Dumars ve ark., 2016; Qian ve Pollard, 2010).



Şekil 2.9.: Meme kanserinin ilerlemesinin varsayımsal modeli (Polyak, 2007' den değiştirilerek kullanılmıştır).

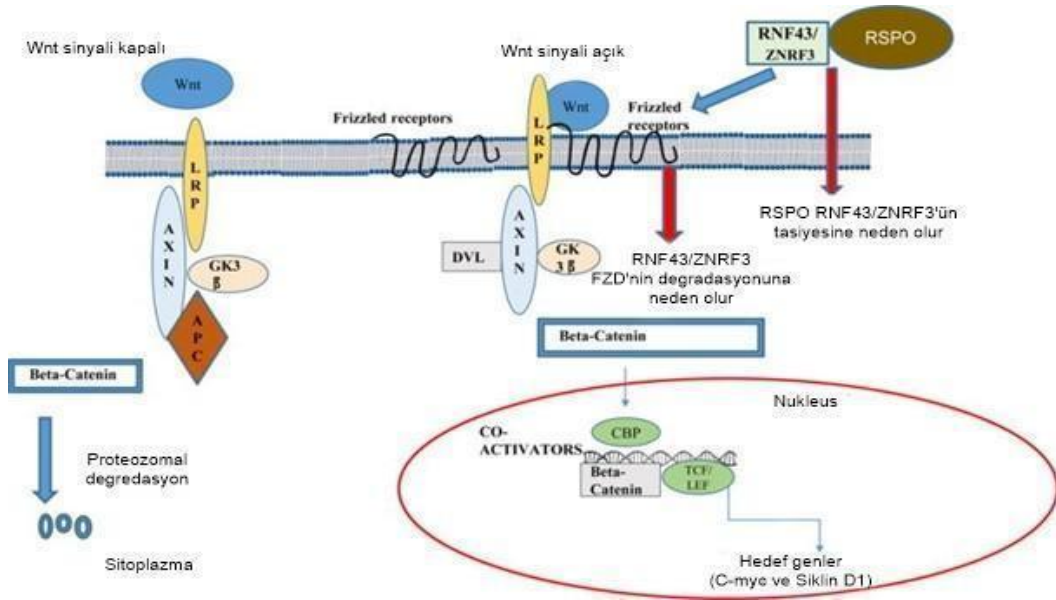
2.2.5. Wnt/ β -katenin sinyal yolağı ve TNIK

Wnt sinyali, kök hücre pluripotensi dahil olmak üzere hücrenin proliferasyonunu farklılaşmasını, ve polaritesini etkileyen çeşitli hücresel süreçleri düzenlemektedir. Wnt sinyal yolağının aşırı aktivitesi birçok hastalık tipiyle ilişkili olduğundan terapötik bir hedef olarak dikkat çekmektedir Wnt ligandları, hücre yüzeyi reseptörleri yoluyla ekstrasellüler ortamdan hücreye sinyal ileten, endoplazmik retikulumda üretilen 19 adet glikoproteinden oluşan geniş bir ailedir (Komiya ve Habas, 2008). Wnt sinyal yolağının aktivitesi kanonik ve kanonik olmayan yolak olarak olarak iki şekilde düzenlemektedir. Kanonik yolak tipik olarak β -katenin bağımlıyken, kanonik olmayan yolak ise β -katenin'e bağımlı değildir ve morfogenez sırasında hücre hareketinin kontrolünden sorumludur (Veeman ve ark., 2003) . Her iki yolakta malignite oluşumunda, ilerlemesinde ve gelişiminde rol oynamaktadır (Giles ve ark., 2003). Bu kapsamda TNMK gelişiminde ve metastazda hem kanonik hem de kanonik olmayan yolakların aktivitesinin olduğu belirlenmiştir (M. K. Mohammed ve ark., 2016; J. Xu ve ark., 2015).

Kanonik olmayan yolakta Wnt/ Ca^{2+} yolunun yanı sıra Düzlemsel Hücre Polarite (DHP) yolu yer almaktadır (MacDonald ve ark., 2009). LRP-5/6 (düşük dansiteli lipoprotein) reseptörü ve Frizzled reseptörleri, başta Wnt sinyal yolağı olmak üzere diğer sinyal yolaklarıyla ilişkili atipik bir G-protein bağlı reseptör ailesidir. Kanonik

sinyal yolağı Wnt ligandının LRP-5 ve Frizzled reseptörlerine bağlanmasıyla tetiklenmektedir. Bu reseptörlerin uyarılması sitozolde Disheveled'in (DVL) aktivitesini sağlayarak kompleksin (Axin, GSK-3 β , CK1, APC) reseptöre bağlanmasında rol oynamaktadır (Gordon ve Nusse, 2006; Wu ve Pan, 2010) .

Wnt-Frizzled-Axin-LRP-5/6 kompleksi sitozolik GSK-3 β 'yı sekestre ederek β -katenin'in fosforilasyonunu inhibe etmektedir. Sitozolde fosforile edilmemiş β -katenin çekirdeğe göç ederek T hücreye özgü faktör (TCF)/lenfoid güçlendirici bağlayıcı faktör (LEF) ve Pygopus (Pygo) gibi yardımcı aktivatörler ile etkileşime girmektedir. Bu etkileşim sonrasında Bcl-9, c-Myc, siklin D1 ve Cdkn1a gibi Wnt hedef genleri aktive olmaktadır (Gordon ve Nusse, 2006).

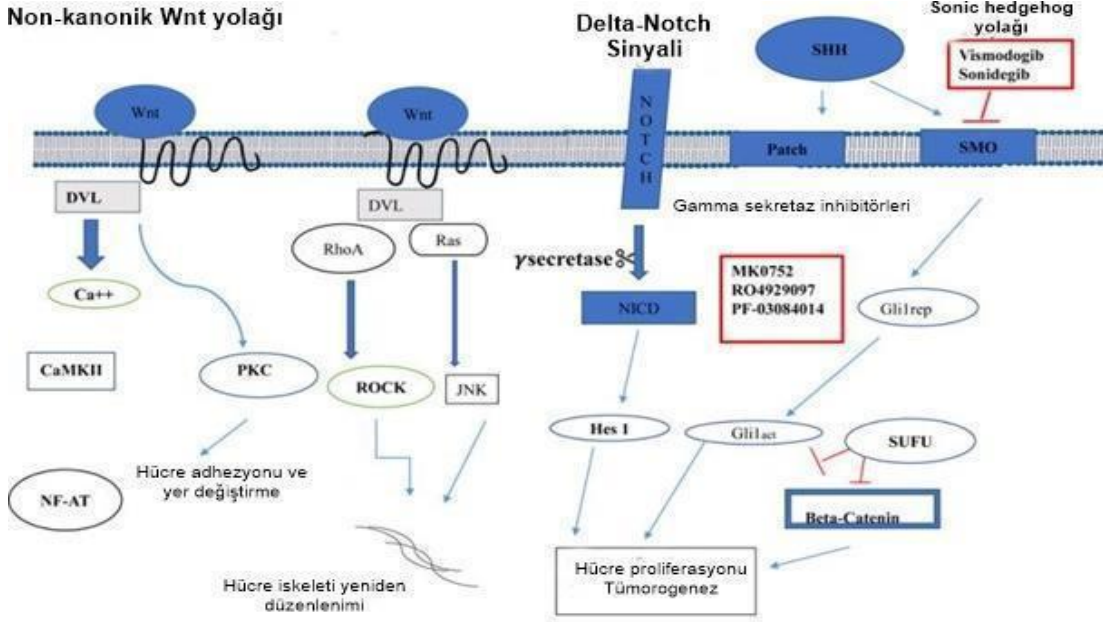


Şekil 2.10. Wnt yolu, kanonik ve kanonik olmayan olarak sınıflandırılabilir. (Krishnamurthy ve Kurzrock, 2018' den değiştirilerek kullanılmıştır)

Wnt olmadan sitozoldeki β -katenin, GSK-3 β ve CK1 tarafından fosforile edilmekte ve ardından β -katenin yıkım kompleksinde (APC, GSK-3 β , CK1, Axin) yıkıma uğramaktadır. Bu fosforile edilmiş kompleks, β -TrCP adı verilen E3 ubiquitin ligazının β -katenin'e bağlanmasına izin vererek onun ubiquitinasyonu arttırmakta ve

proteazomal degradasyona yol açmaktadır (Kohn ve Moon, 2005; Spiegelman ve ark., 2000) (Şekil 2.10.).

Kanonik olmayan Wnt yollarından biri, DHP yolağını içermektedir. Frizzled reseptörler ile Wnt etkileşimi hücre iskeletinin yeniden şekillenmesinde rol oynayan RhoA gibi küçük GTPazların aktivitesini kontrol eden ko-reseptörler RYK ve ROR ile başlatılabilmektedir (Kohn ve Moon, 2005) (Şekil 2.11.). Frizzled ile Wnt sinyalizasyonu Dvl aktivasyonuna yol açmaktadır (Kohn ve Moon, 2005). Miyozin ve Rho ile ilişkili kinaz (ROCK), aktin ve hücre iskeleti yeniden düzenleme mekanizmasını değiştirerek Rho GTPaz tarafından aktive edilmektedir. Rho GTPaz'ın aktivasyonu ile aktive edilmiş Ras daha sonra c-Jun N-terminal kinaz (JNK) aktivitesini uyarmaktadır (Topol ve ark., 2003).



Şekil 2.11. Kanonik Olmayan Wnt Yolu ve Notch and Sonic Hedgehog Yolu- Kanonik olmayan iki ana yol, Wnt/kalsiyum ve Düzlemsel Hücre Polaritesi (DHP) yollarıdır. (Krishnamurthy ve Kurzrock, 2018’ den değiştirilerek kullanılmıştır)

Sonuç olarak Wnt/β-katenin sinyal yolağının aktivitesinde değişimler nükleus düzeyinde aşırı transkripsiyona yol açmaktadır. Örneğin Wnt/β-katenin sinyal yolağının negatif düzenleyici olan APC'nin işlev kaybının kolorektal kanser gelişimine neden olduğu bildirilmiştir (Vermeulen ve ark., 2010). Küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde, Wnt sinyalinin negatif düzenleyicilerinin inhibisyonu

ile β -katenin aracılı Wnt aktivitesini artırarak akciğer kanseri gelişimine neden olmaktadır (Teng ve ark., 2010). Meme kanserlerinin ise yarısından fazlasında Wnt sinyal yolağının aşırı aktivitesi vardır ve daha düşük genel sağ kalım ile ilişkilidir (Khramtsov ve ark., 2010). Meme kanseri kök hücrelerinde, aktiveleştirilmiş β -katenin protein ekspresyonunun artmasıyla aktif Wnt sinyal yolağı, AXIN2 ve LEF1'i hedefleyerek Wnt nin negatif regülatörü olan DKK1 proteininin ekspresyonunun azalmasına neden olmaktadır (Khramtsov ve ark., 2010; Schade ve ark., 2013). Diğer bir çalışmada HER2 aşırı eksprese eden tümör hücrelerinin selektif bir β -katenin/CBP inhibitörü ile tedavisi, proliferasyonu ve HER2 ekspresyonunu önemli oranda azalttığı görülmüştür (Tablo 2.3.) (Schade ve ark., 2013).

Tablo 2.3. Wnt sinyal yolağında teröpatik hedefler. (CBP, cAMP response element binding protein (CREB); CK, casein kinase; Dvl, disheveled; FZD, frizzled; LRP6, low-density lipoprotein receptor-related protein 6; PPI, protein-protein interaction; TNK, Traf2 and Nck-interacting protein kinase) (Yamada ve Masuda, 2017’ den değiştirilerek kullanılmıştır)

Hedef molekül	Lokalizasyon	Ajan	Klinik
Hedgehog	hücre dışı	LGK974/Wnt974	Faz 1
Wnt5a	hücre dışı	Foxy-5 (Wnt5a mimic	Faz 1
FZD reseptörü 8	hücre dışı	OMP-54F28(decoy	Faz 1
FZD reseptörleri (1, 2, 5, 7, 8)	Membran	OMP-18R5 (vanitutumab)	Faz 1
LRP6 yardımcı reseptörü	Membran	salinomisin	preklinik
		niklosamid	Faz 1
		salinomisin	preklinik
		niklosamid	Faz 1
Dvl	sitoplazma	NSC668036	preklinik
		FJ9	klirik öncesi
		3289-8625	preklinik
TNKS1/2	sitoplazma	XAV939	preklinik
		NVP-TNK656	preklinik
		JW55	preklinik
CK1 α	sitoplazma	pirvinyum	klirik öncesi
CK1 δ/ϵ	sitoplazma	TAK-715	klirik öncesi
		AMG-548	klirik öncesi
β -katenin ve CBP arasındaki ÜFE	çekirdek	ICG-001	klirik öncesi
		PRI-724	Faz 2
TNIK	çekirdek/sitoplaz	NCB-0846	klirik öncesi

Wnt sinyali en sık olarak adenomatöz polipozis kolinin (APC) mutasyonu ile aktive olur. APC proteinin yeniden yapılandırılması doğru bir teröpatik yaklaşım olarak görülmemiştir (Yamada ve Masuda, 2017). Bu nedenle daha aşağı akış yönündeki Wnt sinyal molekülleri teröpatik hedef olarak benimsenmiştir (Yamada ve Masuda, 2017).

Son zamanlarda keşfedilen yeni bir protein olan Traf2 ve Nck etkileşimli kinaz (TNIK), WNT/ β -Katenin sinyal yolağının önemli bir düzenleyici bileşenidir. TNIK, Wnt sinyalinin T-hücre faktörü-4 (TCF4) ve β -katenin transkripsiyonel kompleksi ile bağlantılı proteinlerin, kütle spektrometrisi analizleri yoluyla iki araştırma grubu tarafından bağımsız olarak tanımlanmıştır (Mahmoudi ve ark., 2009; Shitashige ve ark., 2010).

TCF4, bağırsak epitel hücrelerinin farklılaşmamasını ve kendini yenilemesini sürdürmek için gerekli bir transkripsiyon faktörüdür. TNIK, TCF4'ü fosforile ederek bu yolaktaki etkinliğini göstermektedir. TNIK'in TCF4 için aktive edici bir kinaz olduğu ve kolorektal kanser gelişimi için gerekli olduğu bilinmektedir (Masuda ve ark., 2016). Bu nedenle, anormal Wnt sinyali ile TCF4'ün aktivasyonunun, kolorektal karsinogenez temelinde rol aldığı belirtilmiştir (Morin ve ark., 1997). Ayrıca, TNIK eksikliği olan farelerde tümör gelişiminde azalma olduğu gözlenmiş, TNIK'in tümörijenizin başlatılmasında rol oynadığını belirtilmiştir (Masuda ve ark., 2016). Bu nedenle antikanser çalışmalarda TNIK inhibisyonu hedef haline gelmiştir.

ATP-competitive küçük moleküllü kinaz inhibitörleri kanser tedavisinde başarıyla uygulanması nedeniyle TNIK, bahsedilen diğer moleküllerden daha avantajlıdır. (Mahmoudi ve ark., 2009)

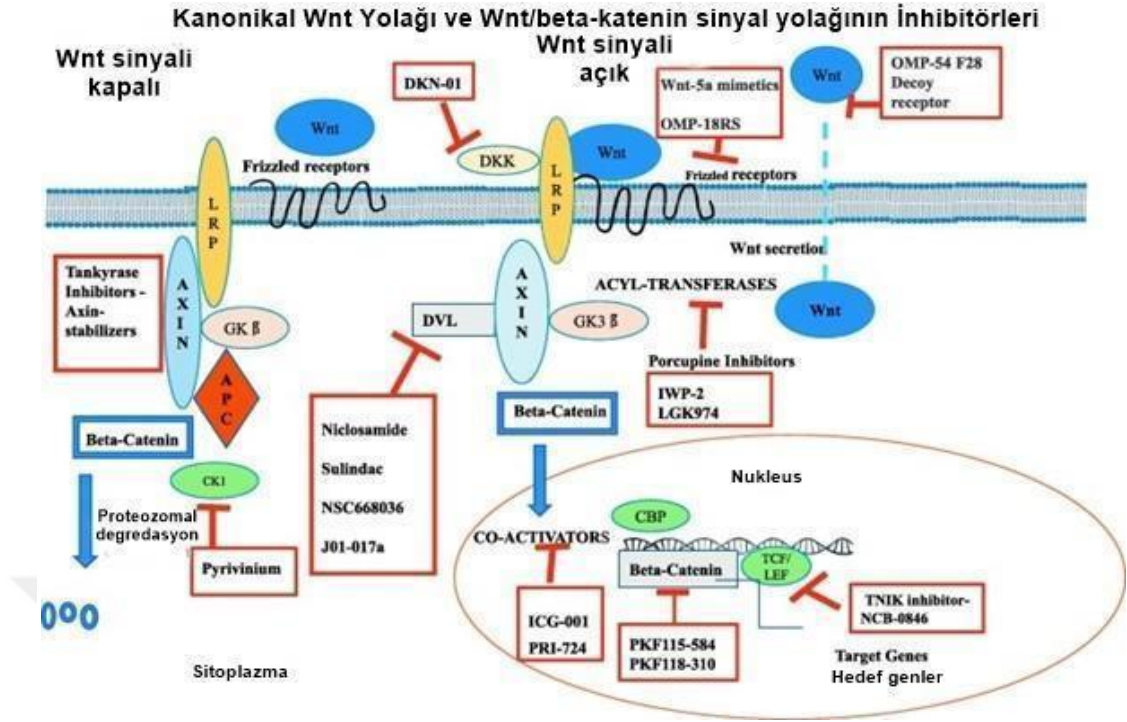
TNIK inhibisyonunun osteosarkom kök hücrelerini inhibe ettiği ve aynı anda osteosarkom hücrelerinin PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor) indüksiyonu yoluyla adiposit benzeri hücrelere dönüşmesini sağladığı gösterilmiştir (Hirozane ve ark., 2021). Başka bir çalışmada TNIK inhibisyonunun, skuamöz hücreli akciğer kanserinde apoptozisi arttırarak antitümör etkisi olduğu gösterilmiştir (Torres-Ayuso ve ark., 2021).

NCB-0846, Compound 3, ON-1081050/ON-108600, PF-794 gibi farklı kimyasal yapılara sahip TNIK inhibitörleri geliştirilmiştir (Bujak ve ark., 2015; Wang ve ark.,

2016). TNIK'e karşı güçlü antagonist etkiye sahip bir dizi 4-fenil-2-fenilaminopiridin analogu da bildirilmiştir (Ho ve ark., 2013). CK2 (kazein kinaz-2)/TNIK' ın ikili inhibitörü olan ON108600'ın, kanser kök hücrelerini hedeflediği ve paklitaksel dirençli TNMK hücrelerinin apoptozunu indüklediği gösterilmiştir (Padgaonkar ve ark., 2015). Ayrıca, TNIK' ın, multipl miyelom tedavisinde kullanılan dovitinib'in anti-kanser mekanizmasında yer aldığı belirlenmiştir (Chon ve ark., 2016).

FDA onaylı bir antihelmintik ilaç olan mebendazol, yakın zamanda selektif bir TNIK inhibitörü olarak tanımlandı (Tan ve ark., 2016). Mebendazolün kolorektal ve meme kanseri gibi farklı kanser tiplerinin ön-klinik çalışmalarında geniş bir anti-tümör etkinliği olduğu gösterildi (Mukhopadhyay ve ark., 2002).

NCB-0846, yeni tanımlanmış küçük moleküllü bir TNIK-inhibitörüdür ve anti-WNT/ β -Katenin aktivitesine sahiptir. NCB-0846 ayrıca FMS benzeri tirozin kinaz 3 (FLT3), trombosit kaynaklı büyüme faktörü- α (PDGFR α) ve sikline bağımlı kinaz 2 (CDK2)/siklin A2 (CycA2) dahil olmak üzere birçok diğer onkogenik proteini de inhibe etmektedir (Yamada ve Masuda, 2017). NCB-0846, aktif olmayan bir konformasyonda TNIK'a bağlanmakta ve bu bağlanma ile Wnt/ β - Katenin yolağını inhibe etmektedir (Şekil 2.12.).



Şekil 2.12. Kanonik Wnt Yolu ve Wnt/beta-Katenin Sinyal Yolunun İnhibitörleri (Krishnamurthy ve Kurzrock, 2018' den değiştirilerek kullanılmıştır).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

T.C. Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan 71522473/050.01.04/6061 sayı ile 29/01/2021 tarihinde onay alındı.

3.1. Hücre Kültürü

MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26TM) insan TNMK hücre hattı Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (ATCC)'den ticari olarak satın alındı. MDA-MB-231 hücre hattı Dulbecco Modified Eagle Media (DMEM) besiyerinde %10 Fetal Bovine Serum (FBS) ve %1 Penisilin/Streptomisin ilave edilerek 37 °C' de %5 CO₂ inkübatöründe T 75 flaskta kültüre edildi. Adherent hücre kültürü büyüme ortamında konfluent olduktan sonra kaldırma işlemi için fosfat tamponlu tuz (PBS) solüsyonunda yıkanarak %0.25 Trypsin-EDTA (Gibco, ABD) ile yaklaşık 2 dakika inkübatörde bekletildi. Bu işlemler MDA-MB-231 hücre hattı için 2 pasaj olacak şekilde tekrar edildi .

3.2. Hücre Canlılık Testi (WST-1) Analizi

MDA-MB-231 hücreleri üzerine NCB-0846'nin sitotoksik etkisinin saptanması amacıyla Water Soluble Tetrazolium-1 (WST-1) analizi yapıldı. WST-1 analizi için hücreler 96 kuyucuklu plakalara her kuyuda 2×10^4 hücre olacak şekilde 100 µL besiyeri ile ekildi ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, MDA-MB-231 hücre hattına farklı konsantrasyonlarda (1 µM, 2 µM ve 3 µM) NCB-0846 uygulandıktan sonra 24 saat, 48 saat ve 72 saat muamele edildi. Muamelenin ardından her bir kuyuya 10 uL WST-1 reaktifi eklenerek 1 saat 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Muamele sonrası absorbans değerleri mikroparka okuyucusunda (Allsheng, Çin) 450nm dalga boyunda ölçüldü. NCB-0846 ile muamele edilmeyen kontrol grubunun canlılığı %100 kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları kontrole kıyasla % olarak ifade edildi. İleri analizlerde NCB-0846 maddesinin Wst-1 analiz sonuçlarından elde edilen en uygun doz ve saat aralıkları kullanıldı.(Masuda ve ark., 2016)

3.3. Annexin-V Analizi

MDA-MB-231 hücre hattı üzerine NCB-0846'nın apoptotik etkisinin belirlenmesi amacıyla Annexin-V Analizi gerçekleştirildi. Hücreler 6 kuyulu plakalara 1×10^5

hücre olacak şekilde ekildi. Wst-1 analizinden elde edilen veriler doğrultusunda en etkin doz ve saat NCB-0846 ile muamele edilen hücreler tripsinizasyon ile kaldırıldı. Kaldırılan hücreler santrifüj edilerek 2 kere PBS ile yıkandı. Elde edilen hücre pelleti Muse Annexin V; Dead Cell Assay Kit (Merck, Almanya) boyası ile 20 dakika oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübe edildi. Boyanan hücreler inkübasyon sonrası Muse® Cell Analyzer (Merck Millipore, Almanya) cihazında analiz edilerek apoptotik ölüm oranları belirlendi.

3.4. Hücre Döngüsü Analizi

NCB-0846 'nın MDA-MB-231 hücre hattında hücre döngüsünün hangi fazında etkin olduğunun tespiti amacıyla hücre döngüsü analizi yapıldı. WST-1 analizine göre NCB-0846'nın etkin doz ve saati ile muamele edilen MDA-MB-231 hücre hattı büyüme ortamından kaldırıldı ve 1 mL %70 soğuk etanol ile -20°C'de en az 3 saat boyunca fiks edildi. Fiksasyon sonrasında, hücre pelletleri Muse® Cell Cycle Kit (Merck Millipore, Almanya) protokolüne göre 200 µL Muse® Cell Cycle Reagent ile boyanarak 30 dakika oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. Ardından Muse® Cell Analyzer (Merck Millipore, Almanya) cihazında analiz edildi.

3.5. Akridin-Oranj/Etidyum Bromür (AO/EB) Boyama

NCB-0846'nın MDA-MB-231 hücre hattında neden olduğu morfolojik değişimlerin gözlemlenmesi amacıyla AO/EB boyama yapıldı. Bu amaçla eşit sayıda hücre (5x10⁶) 6 kuyulu plakalara ekildi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonundan WST-1 analizinden elde edilen verilerce belirlenen etkin doz ve saatte NCB-0846 ile muamele edildi. Muamele sonrası besiyeri uzaklaştırılarak %4 Paraformaldehit (PFA) ile hücreler fiks edildi. Fiksasyon sonrası hücreler Akridin Oranj (Sigma-Aldrich, ABD)/Etidyum Bromür (BioVision, ABD) solüsyonu ile 30 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta boyamaya alındı. Boyanan hücreler üç kez PBS tamponu ile yıkandıktan sonra EVOS™ FLoid (Life Technologies, ABD) hücre görüntüleme sistemi ile görüntülendi.

3.6. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için 1x10⁶ hücrenin 6 kuyulu plakalara ekimi gerçekleştirildi ve 24 saat inkübe edildi. NCB-0846'nın WST-1 analizi ile belirlenen en uygun doz ve

saatlerde muamelesi sonrası hücreler tripsinizasyon ile kaldırılarak TRIzol™ Reagent (Invitrogen, ABD) kit protokülüne uygun olarak liziz edildi. Ardında hücre lizatı faz ayrımı için kloroform (Sigma-Aldrich, ABD) ile inkübe edildi. Elde edilen üst faza (aqueous faz) eklenen izopropil alkol (Sigma-Aldrich, ABD) ile çöktürülen RNA pelleti %75 etanol ile yıkandı. Daha sonra alkolün uzaklaştırılması ile elde edilen total RNA, RNaz içermeyen su ile dilüe edilerek saflık ve miktar tayini için Qubit™ 4 Fluorometer (Invitrogen, ABD) cihazı ile nicel olarak analiz edildi. Örnekler daha sonra cDNA'ya çevrilmek üzere -70°C'de saklandı.

3.7. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Analizi

MDA-MB-231 hücre hattında Wnt/ β -Katenin yolağı ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri WST-1 sonuçlarına göre belirlenen en etkin doz ve saatte NCB-0846 maddesinin muamelesi sonrası belirlendi. İzole edilen RNA örneklerinden High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Hücrelerin mRNA ekspresyon seviyeleri, RNA izolasyonu ile elde edilen cDNA'ların The StepOnePlus Real-Time PTY System (Applied Biosystems, ABD) ile gerçek zamanlı RT-PCR işlemiyle belirlendi. RT-PCR, 100ng cDNA, TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, ABD), 1uL ticari olarak temin edilen CTNNB-1 (β -catenin) (Hs00355045_m1) primer ve son hacime 6uL RNaz içermeyen su eklenerek hazırlanan mix ile gerçekleştirildi. Kontrol geni olarak ACTB (actin β) (Hs99999903_m1) kullanıldı. CTNNB-1'in mRNA ekspresyon seviyesi $\Delta\Delta$ -Ct yöntemiyle analiz edildi ve her deney en az üç kez tekrarlandı. Veri analiz programları (REST (2009 V2.0.13)) kullanılarak genlerin ekspresyon düzeylerinde değişiklikler belirlendi.

3.8. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler SPSS 21.0 programı kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi. $p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Ekspresyon değişimindeki farklılıklar Paired Sample t-Test (Bağımlı Örneklem t-Testi) ile belirlendi.

4.BULGULAR

4.1 NCB-0846'nın Sitotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi

NCB-0846'nın MDA-MB-231 ve MCF-10A hücreleri üzerindeki doza ve zamana bağlı sitotoksik etkisi WST-1 analizi ile değerlendirilerek elde edilen bulgular Şekil 4.1.'de gösterilmiştir. Ayrıca canlılık yüzdeleri Tablo 4.1.'de özetlenmiştir.

Tablo 4.1. NCB-0846'nın doza ve zamana bağlı hücrelerdeki canlılık yüzdeleri.

Konsantrasyon	MDA-MB-231			MCF-10A		
	24 saat	48 saat	72 saat	24 saat	48 saat	72 saat
Kontrol	%100,00	%100,00	%100,00	%100,00	%100,00	%100,00
1 μM	%90,48	%83,42	%68,89	%96,49	%83,09	%39,74
2 μM	%92,65	%76,12	%58,84	%90,32	%83,33	%40,36
3 μM	%87,80	%70,88	%42,20	%83,91	%86,53	%53,92

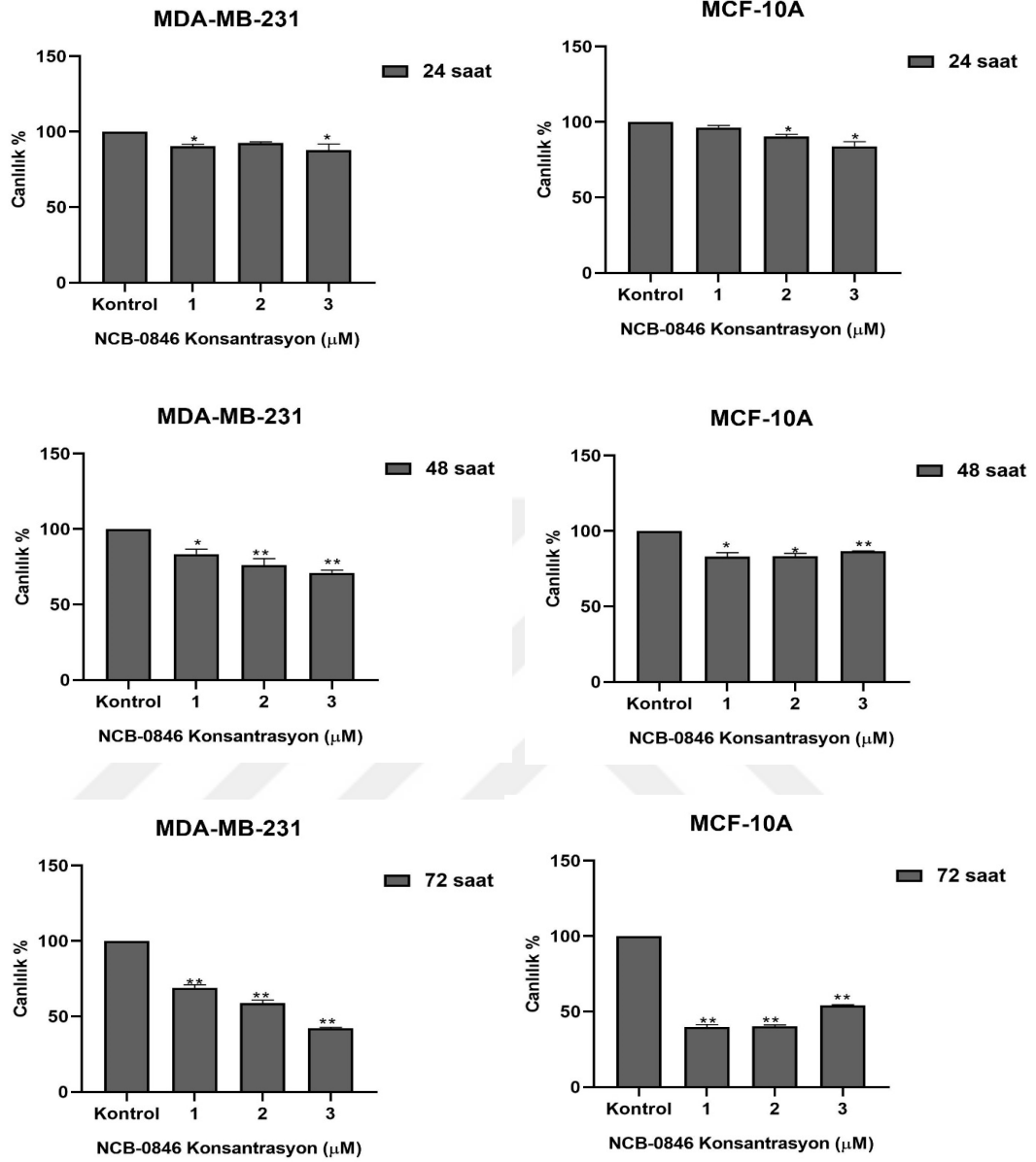
MDA-MB-231 hücrelerinin 24 saat boyunca 1 μ M, 2 μ M ve 3 μ M NCB-0846 uygulanması sonucunda, kontrol grubu canlılığı %100 kabul edilerek canlılık oranları sırasıyla %90,48, %92,65, %87,80 iken, 48 saat uygulama sonrasında sırasıyla %83,42, %76,12 ve %70,88 olarak saptanmıştır ($p<0,01$). 72 saat boyunca NCB-0846 uygulaması sonrasında ise sırasıyla canlılık oranlarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde %68,89, %58,84 ve %42,20'ye azaldığı belirlendi ($p<0,01$).

MCF-10A hücrelerinin belirtilen doz ve saatlerde NCB-0846 uygulaması sonrasında doz grupları arasındaki canlılık oranları Şekil 4.1.'de gösterilmiştir. 24 saat boyunca 1 μ M, 2 μ M ve 3 μ M NCB-0846 uygulanması sonucunda, kontrol grubu canlılığı %100 kabul edilerek canlılık oranları sırasıyla %96,49, %90,32 ve %83,91 iken, 48 saat sonunda sırasıyla %83,09, %83,33 ve %86,53 olarak belirlendi. 72 saat sonunda ise

MCF-10A canlılık oranlarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde %39,74, %40,36 ve %53,92'ye azaldığı tespit edildi ($p<0,01$).

Sonuç olarak, NCB-0846'nın MDA-MB-231 TNMK hücrelerinde canlılık oranında anlamlı bir azalışa neden olduğu belirlenmesine rağmen, 72 saat uygulaması sonucunda MCF-10A kontrol hücrelerinde toksik etkiye sahip olduğu analiz edilmiştir. WST-1 bulgularına göre belirlenen en etkin uygulama süresinde (72 saat) 1 μ M, 2 μ M ve 3 μ M NCB-0846'nın apoptotik etkisi MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde ileri analizler ile araştırıldı.





Şekil 4.1. NCB-0846'nın MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde uygulama süresine bağlı sitotoksik etkisi.

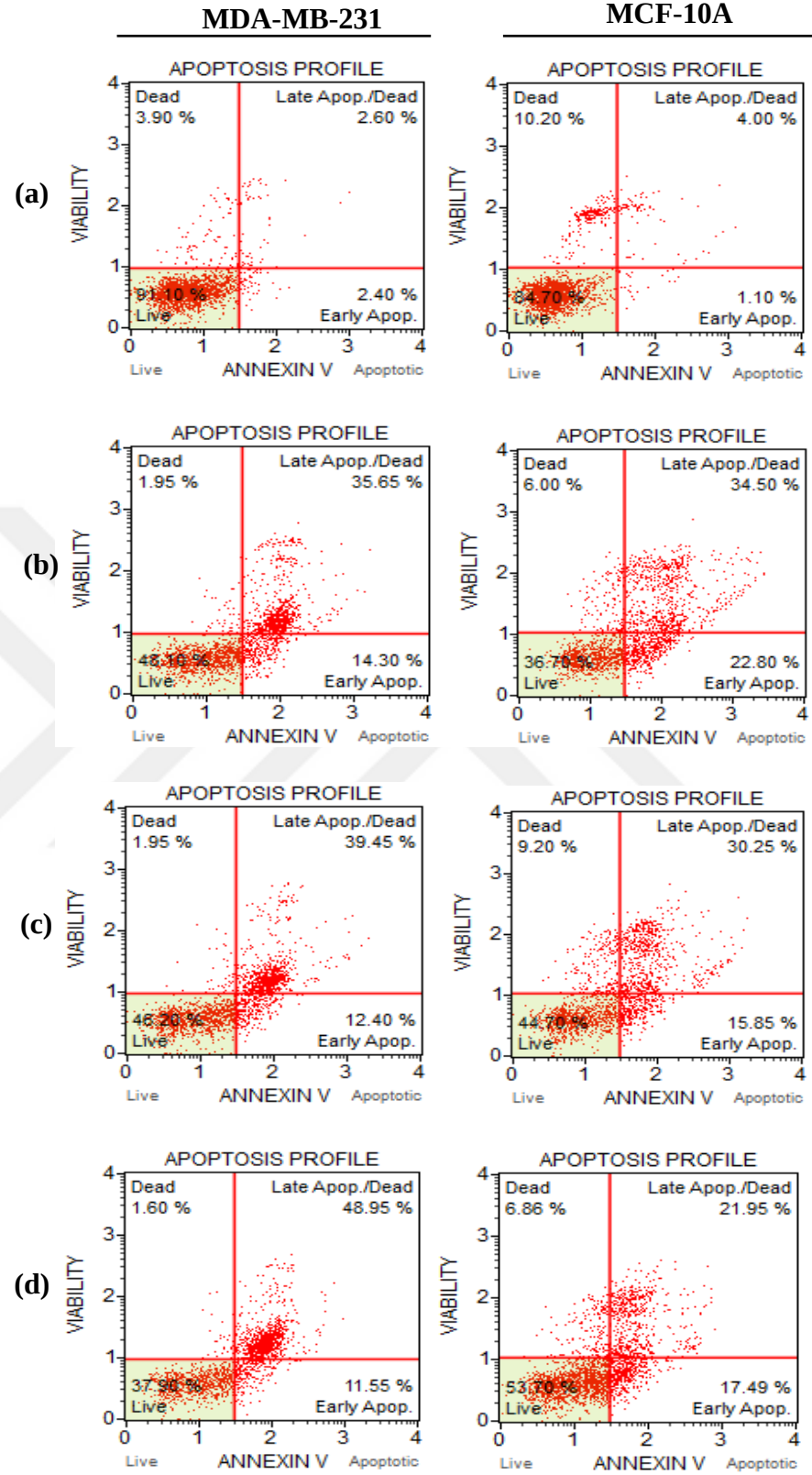
4.2. NCB-0846'nın Apoptotik Etkinin Değerlendirilmesi

NCB-0846'nın MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerindeki apoptotik etkisini belirlemek için gerçekleştirilen Annexin V analizi sonucunda elde edilen histogramlar ve istatistiksel analiz sonuçları Şekil 4.2. ve Şekil 4.3.'de verilmiştir.

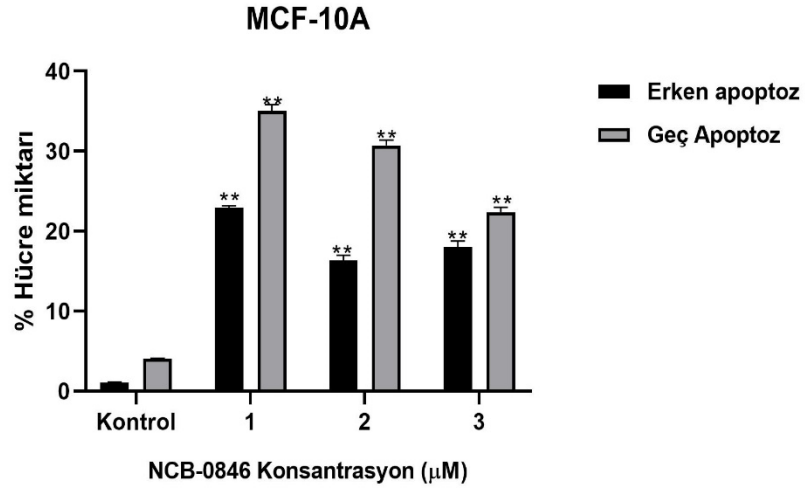
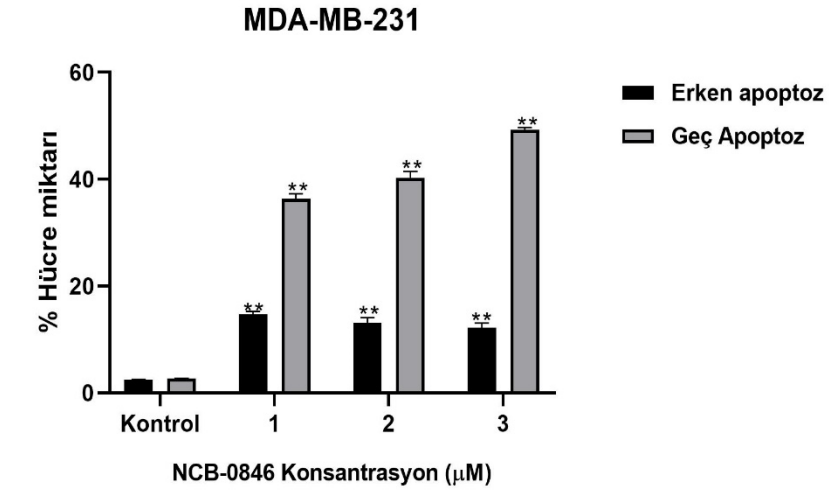
MDA-MB-231 hücrelerinde gerçekleştirilen analizlerde 72 saat boyunca 1 μ M, 2 μ M ve 3 μ M NCB-0846 uygulanan deney gruplarında toplam apoptotik hücre ölüm oranları kontrol grubuna göre (%5,0) kıyaslandığında sırasıyla %49,95, %51,85 ve %60,5 olarak belirlendi (Şekil 4.2.). Ayrıca kontrol grubuna göre toplam apoptotik ölüm miktarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı analiz edildi (Şekil 4.3., $p<0,01$).

MCF-10A hücrelerinde ise 72 saat boyunca NCB-0846'nın 1 μ M, 2 μ M ve 3 μ M konsantrasyonlarındaki toplam apoptotik hücre ölüm oranları kontrol grubuna göre (%5,10) kıyaslandığında sırasıyla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde %57,30, %46,10 ve %39,44'e arttığı olarak belirlendi (Şekil 4.2.- Şekil 4.3., $p<0,01$).

Sonuç olarak, 3 μ M NCB-0846 konsantrasyonunun MDA-MB-231 hücreleri üzerinde en yüksek apoptotik etkinlik gösterirken, MCF-10A hücrelerinde diğer doz gruplarına kıyasla daha az apoptotik etkisi belirlenmiştir.



Şekil 4.2. 72 saat NCB-0846 uygulanan MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde Annexin V analizi histogramları a) Kontrol b) 1 μ M c) 2 μ M d) 3 μ M NCB-0846



Şekil 4.3. NCB-0846'nın farklı konsantrasyonlarının neden olduğu erken ve geç apoptoz yüzdelerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması (*p<0.05, **p<0.01).

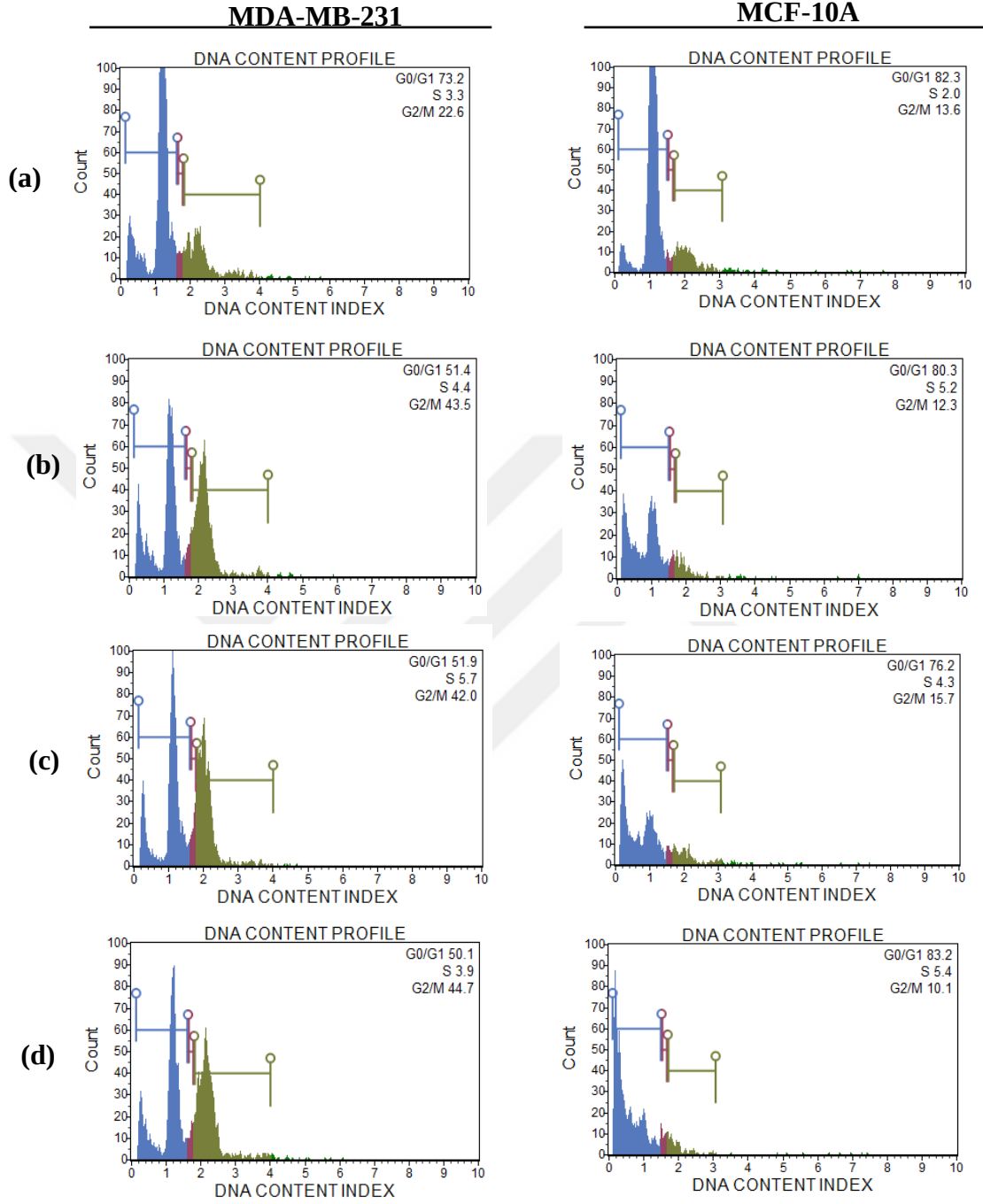
4.3. NCB-0846'nın Hücre Döngüsünde Neden Olduğu Değişimlerin Değerlendirilmesi

NCB-0846'nın MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerindeki hücre siklusu üzerinde etkisini belirlemek için gerçekleştirilen hücre siklusu analizi sonucunda elde edilen histogramlar ve istatistiksel analiz sonuçları Şekil 4.4. ve 4.5.'de verilmiştir.

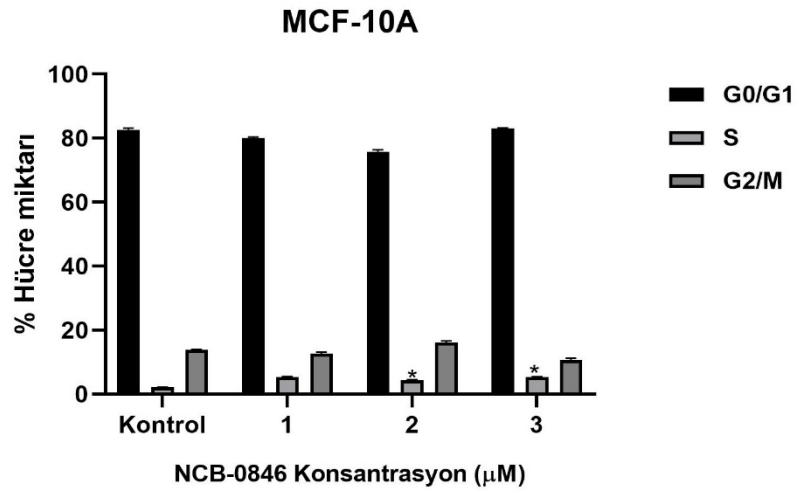
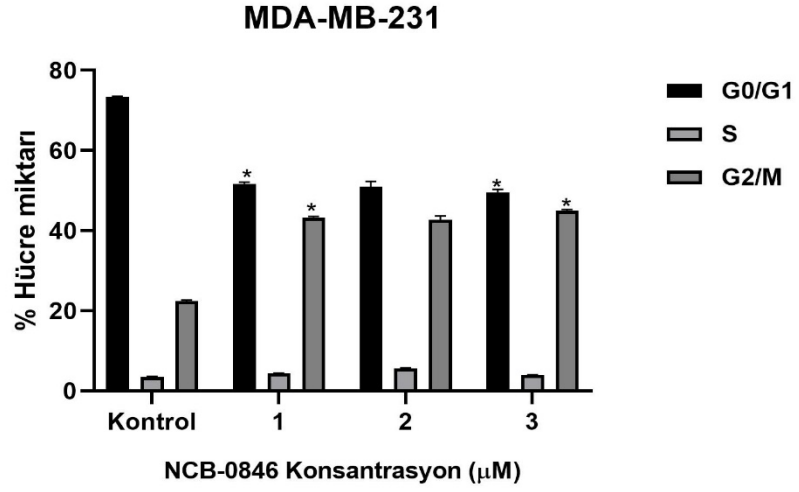
MDA-MB-231 hücrelerinde kontrol grubunda G0/G1 evresinde hücre oranı %73,2 iken; 72 saat 1 μ M, 2 μ M ve 3 μ M konsantrasyonlarda NCB-0846 uygulanan hücrelerde sırasıyla %51.4 ($p<0.01$), %51.9 ve %50.1 ($p<0.01$) olarak belirlendi. NCB-0846'nin 1 μ M, 2 μ M ve 3 μ M dozları uygulanan deney gruplarında G2/M evresinde tutulan hücre miktarı kontrol grubuna göre (%22,6) sırasıyla %43.5 ($p<0.01$), %42.0 ve %44.7 ($p<0.01$) anlamlı bir şekilde arttığı tespit edildi (Şekil 4.4. ve 4.5.).

MCF-10A hücrelerinde G0/G1 evresinde hücre popülasyonu kontrol grubunda %82,3 iken, 1 μ M, 2 μ M ve 3 μ M NCB-0846 uygulanan hücrelerde sırasıyla %80,3, %76,2 ve %83,2 olarak bulundu (Şekil 4.5.). 1 μ M, 2 μ M ve 3 μ M NCB-0846 uygulanan deney gruplarında G2/M fazında hücre oranı kontrol grubunda %13,6 iken, 1 μ M, 2 μ M ve 3 μ M NCB-0846 dozlarında sırasıyla %12,3, %15,7 ve %10,1 arttığı tespit edildi (Şekil 4.4. ve 4.5., $p<0.01$).

Sonuç olarak, MDA-MB-231 hücrelerinde NCB-0846'nın artan konsantrasyonuna bağlı olarak G2/M evresinde hücre tutulmasına neden olduğu belirlendi. Ancak, MCF-10A hücrelerinde toksik etkisine rağmen, NCB-0846'nın hücre siklusunda G2/M fazında belirgin bir artışa neden olmadığı analiz edildi.



Şekil 4.4. 72 saat NCB-0846 uygulanan MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde hücre döngüsü analizi histogramları A) Kontrol B) 1 µM C) 2 µM D) 3 µM NCB-0846



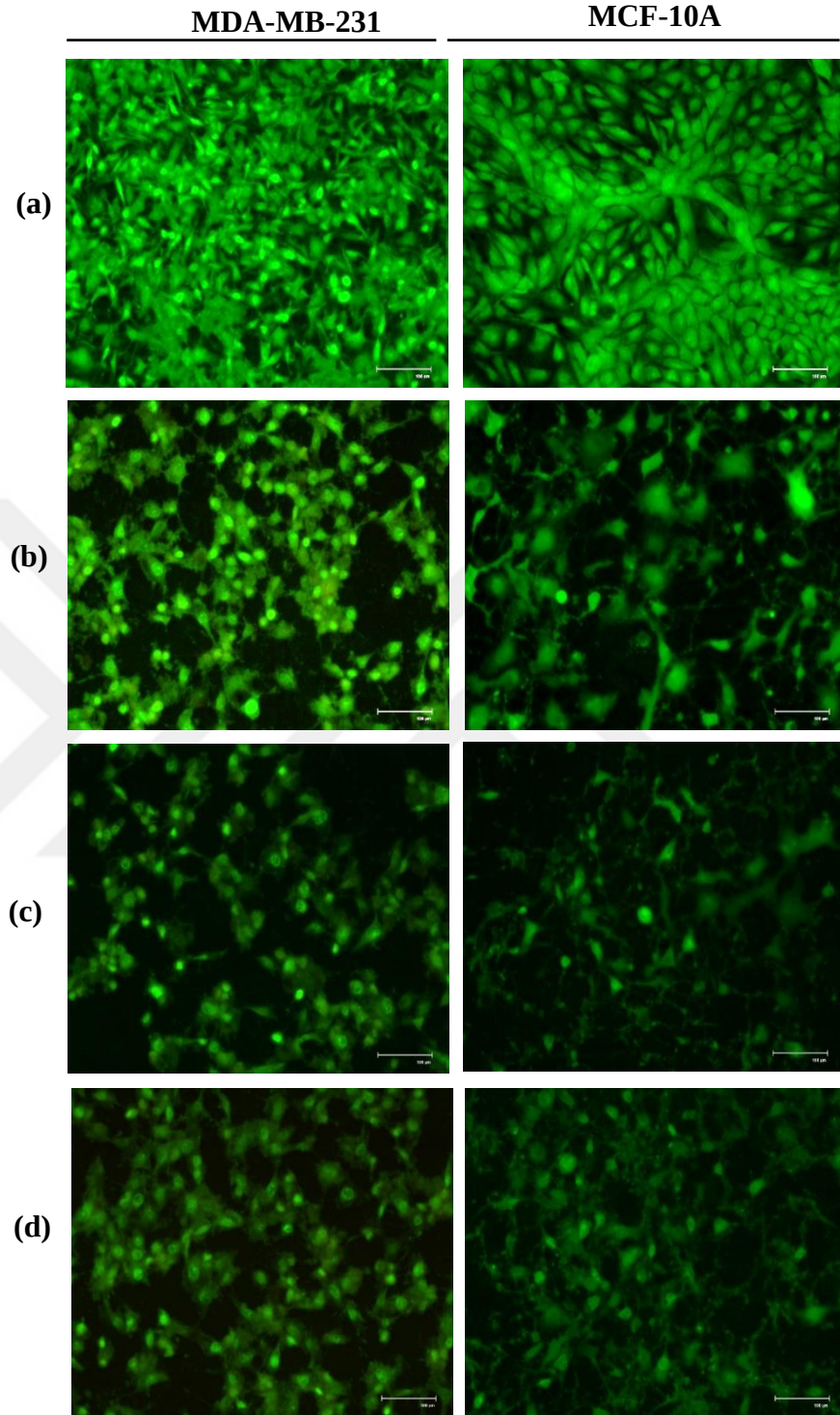
Şekil 4.5. NCB-0846'nın farklı konsantrasyonlarının hücre döngüsünde etkisinin istatistiksel olarak karşılaştırılması (* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

4.4. NCB-0846'nın Hücreler Üzerinde Neden Olduğu Morfolojik Değişimlerin Belirlenmesi

NCB-0846'nın MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde neden olduğu morfolojik değişimler AO/PI boyama ile görüntülendi (Şekil 4.6.).

MDA-MB-231 hücrelerinde NCB-0846 artan dozuna bağlı olarak DNA fragmentasyonu, kromatin yoğunlaşması ve hücre büzülmesi gözlemlendi. Ayrıca adherent bağlantılarını hedef alan yolaklar üzerinde etkin olan NCB-0846'nın (Masuda ve ark., 2016) konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak sitoplazmada dejeneratif değişimlerin yanısıra hücre membranında kopmalar (apoptotik body) oluşumları görüldü.

MCF-10A hücrelerinde ise özellikle 2 μ M NCB-0846 uygulanan hücrelerde kontrol grubuna göre hücre morfolojisinin bozulduğu ve hücre bağlantılarında kopmalar ve nükleer parçalanmalar görüntülendi. 3 μ M NCB-0846 uygulanan hücrelerde ise diğer dozlara göre daha az hasar gözlemlendi. Ancak, NCB-0846'nın toksik etkisinden dolayı genel olarak MCF-10A hücrelerinde hasar meydana geldiği belirlendi.



Şekil 4.6. MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinin NCB-0846 konsantrasyonuna bağlı olarak morfolojik değişimlerin değerlendirilmesi a) Kontrol b) 1 μ M c) 2 μ M d) 3 μ M NCB-0846

4.5. *CTNNB1* Gen Ekspresyon Düzeyinde Değişimlerin Değerlendirilmesi

Hücre adezyonunda etkin rol alan NCB-0846'nın MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde *CTNNB1* (β -catenin) gen ekspresyonu üzerindeki etkisi RT-PCR analizi ile belirlenmiş ve elde edilen bulgular Şekil 4.7.'de sunulmuştur. Ayrıca, NCB-0846'nın farklı konsantrasyonlarının MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde gen ekspresyonu üzerine etkileri, her grup için *ACTB* geni ile $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduyla normalize edilerek elde edilen veriler Tablo 4.2.'de sunulmuştur.

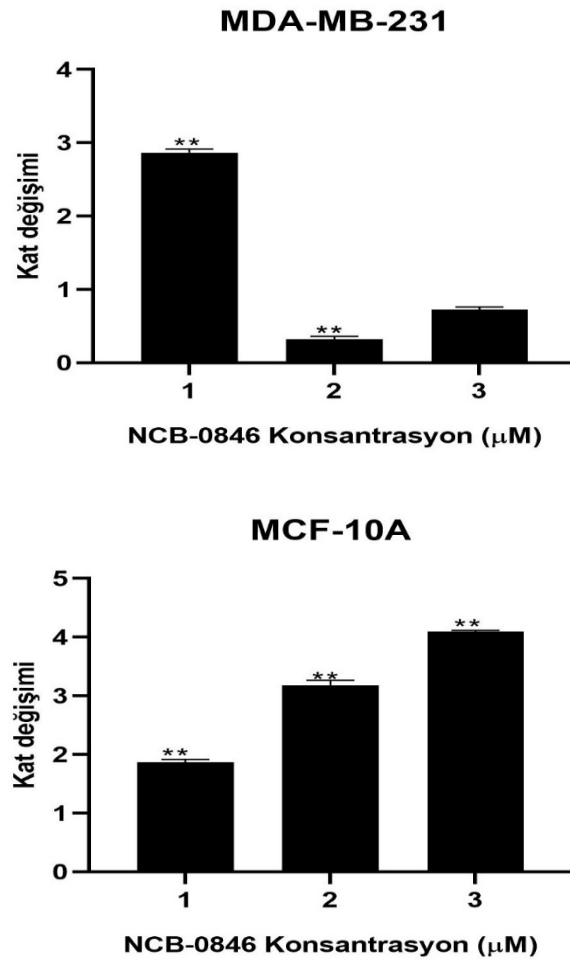
Tablo 4.2. 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda NCB-0846 uygulanan MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerindeki kat değişimleri. (**p<0.01)

	Konsantrasyon	$2^{-\Delta\Delta CT}$	Kat Değişimi	p
MDA-MB-231	1 μ M	3.294	2.83	0,0046**
	2 μ M	0.336	0.29	0,0008**
	3 μ M	0.816	0.70	0,2697
MCF-10A	1 μ M	0.141	1.83	0,0066**
	2 μ M	0.259	3.12	0,0001**
	3 μ M	0.578	4.08	0,0042**

Wnt yolağının önemli bir hedefi olarak β -katenin proteinini kodlayan *CTNNB1* geninin MDA-MB-231 hücrelerinde 72 saat boyunca 1 μ M NCB-0846 uygulaması sonrasında ekspresyon seviyesi 2.83-kat artmasına rağmen (p<0.01), 2 μ M ve 3 μ M NCB-0846 uygulaması sonrasında sırasıyla 0.29 ve 0.70-kat olarak belirlenmiştir.

MCF-10A hücrelerinde 72 saat boyunca 1 μ M, 2 μ M ve 3 μ M NCB-0846 uygulanması sonrasında *CTNNB1* geninin mRNA düzeyi sırasıyla 1.83, 3.12 ve 4.08-kat olarak belirlenmiştir (* p <0.01).

Sonuç olarak, NCB-0846 artan dozuna bağlı olarak MDA-MB-231 hücrelerinde *CTNNB1* ekspresyon seviyesinde azalış belirlenmesine rağmen, MCF-10A hücrelerinde *CTNNB1* mRNA seviyesinin anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.7. 72 saat boyunca 1 μ M, 2 μ M ve 3 μ M NCB-0846 uygulanan A) MDA-MB-231 ve B) MCF-10A hücrelerinde *CTNNB1* gen ekspresyon seviyesindeki değişimler (** p <0,01).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

TNIK inhibisyonunun meme kanserindeki etkisine dair literatürde sınırlı sayıda çalışma mevcuttur (Sato ve ark., 2021). Bizim çalışmamızda ilk defa NCB-0846 ile TNIK inhibisyonunun TNMK hücresindeki sitotoksik, morfolojik ve apoptotik etkisi, kontrol hücre hattı ile karşılaştırılarak *in vitro* olarak gözlenmiştir. Bulgular TNIK inhibisyonunun TNMK hücrelerinde canlılık oranlarını azalttığını ve apoptotik hücre yüzdesini arttırdığını göstermiştir.

TNMK, diğer meme kanseri subtipleri içinde prognozu en kötü olanıdır. Cerrahi tedavi, radyoterapi, adjuvan ve neoadjuvan tedaviler için endikasyonlar diğer meme kanseri subtipleri ile benzerdir. Fakat diğer meme kanserleri subtiplerinde medikal tedavide hedefe yönelik tedavi mevcut iken, TNMK’de ER(-), PR(-), HER-2(-) olduğundan dolayı reseptör hedefli tedavi mevcut değildir. Bu nedenle TNMK tedavisinde, sistemik sitotoksik ajanlar kullanılmaktadır. Moleküler terapi, hücre yapısını hedef alan terapiler, migrasyonu hedef alan terapiler, hücre çoğalması ve vaskülarizasyonu hedef alan terapiler, immunoterapiler ve aşı gibi çalışmalar hala devam etmektedir.

Neoadjuvan kemoterapiden sonra yüksek PTY oranlarının gösterildiği TNMK, kemoterapiye duyarlıdır (Liedtke ve ark., 2008; Straver ve ark., 2010). Neoadjuvan tedavi, ameliyattan önce terapötik müdahaleyi, yani tümörün boyutunu küçülterek ameliyatın gerçekleştirilmesine izin vermeyi tanımlar. Ameliyat edilebilir tümörler için neoadjuvan tedavi, mastektomi ihtiyacını ortadan kaldırarak meme koruyucu cerrahiye izin vermektedir. Büyük klinik çalışmaların retrospektif analizi, ÖR ekspresyonu eksikliğinin, ÖR pozitif tümörlere kıyasla kemoterapiye daha iyi bir yanıt verdiğini göstermiştir. (Berry ve ark., 2006; Early Breast Cancer Trialists’ Collaborative Group (EBCTCG), 2008)

TNMK’de neoadjuvan kemoterapi üzerine yapılan çeşitli çalışmalar, PTY’nin uzun vadeli yanıt ve sağ kalım için bir belirteç olarak kullanılabileceğini doğrulanmıştır (Rastogi ve ark., 2008). Ancak bu, yalnızca PTY’nin hem memede hem de aksillada rezidüel hastalık olmaması olarak tanımlandığı zaman geçerlidir.

Liedtke ve ark. 1118 meme kanseri hastasını içeren bir çalışmada, TNMK'li hastalarda neoadjuvan tedavi ile PTY oranlarının, TNMK olmayanlara göre daha yüksek olduğu bulundu (%22'ye karşı %11; $p = 0.034$) (Liedtke ve ark., 2008). TNMK'de neoadjuvan tedaviye yanıtın, sadece iki tedavi döngüsünden sonra bile çok hızlı olabileceği de kanıtlanmıştır (Huober ve ark., 2010).

Neoadjuvan veya adjuvan tedavide belirli bir meme kanseri fenotipinde herhangi bir kemoterapötik ajanın üstünlüğüne dair bir kanıt yoktur (Straver ve ark., 2010). Antrasiklin ve taksan bazlı rejimler meme kanseri hastaları için günümüzün standart tedavisini oluşturur (Metzger-Filho ve ark., 2012). Bunların TNMK' de oldukça etkili olduğu kanıtlanmıştır (Rouzier ve ark., 2005). Huober ve arkadaşları TAC (dosetaksel/doksorubisin/siklofosfamid) veya TAC-NX (TAC-vinorelbin/kapesitabin) ile tedavi edilen TNMK' li 509 hastada %39'luk bir PTY oranı bildirmiştir; bu, çok merkezli bir çalışmada bildirilen en yüksek PTY oranlarından biridir (Huober ve ark., 2010).

Ayrıca bazı yazarlar tarafından TNMK/bazal-like meme kanserlerinin, diğer meme kanseri alt tipleriyle karşılaştırıldığında antrasiklin bazlı tedaviye daha zayıf bir yanıt gösterdiği bildirilmiştir (Martin ve ark., 2010, 2011). Tersine, TNMK/bazal-like meme kanseri olan hastalar, diğer alt tiplere göre taksan bazlı tedavilere daha iyi yanıt vermektedir (Martin ve ark., 2011). Bu nedenle ilişkili kardiyotoksitesi göz önüne alındığında gereksiz antrasiklin tedavisinden kaçınmak gerekir (Smith ve ark., 2010).

TNMK'li hastalarda platin içeren tedaviler taksanlarla birleştirildiğinde, TNMK olmayanlara kıyasla daha iyi yanıtlar bildirilmiştir, ancak bunlar küçük örneklem grubu içeren tek merkezli çalışmalardır (Chang ve ark., 2010; Sikov ve ark., 2009). 94 TNMK hastasını içeren daha büyük bir faz II çalışması, antrasiklin/taksan bazlı bir tedaviye karboplatin eklenmesinin, PTY oranlarını artırmadığını göstermiştir (Alba ve ark., 2011).

GeparSixto çalışmasında (TNMK ve HER2 pozitif meme kanseri için neoadjuvan tedaviye karboplatin eklenmesinin etkisinin araştırılan faz 2 çalışma), TNMK'li 315 hasta, 3 hafta boyunca haftada bir kez bevacizumab ile paktitaksel ve doksorubisin uygulandı. Bu hastaların bir kısmına 18 hafta boyunca haftada bir kez karboplatin uygulandı. Hematolojik toksisite, karboplatin eklenen grupta daha yüksekti ve bu

tedavinin erken sonlandırılmasına neden oldu (kontrol grubunda %36.9, karboplatin grubunda % 53.2). Buna rağmen, kontrollerde PTY meme/aksilla (T0/N0) %36.9 idi ve karboplatin ile %53,2'ye yükseldi ($p = 0,005$) (Alba ve ark., 2011).

Randomize bir faz II çalışması olan Cancer and Lösemi Group B (CALGB) 40603 çalışmasında, neoadjuvan haftalık paklitaksele karboplatin ve/veya bevacizumab ve ardından doksorubisin ve siklofosfamid eklenmesinin, evre II-III TNMK'de patolojik tam yanıt oranları üzerindeki etkisini değerlendirdi (n=443). Neoadjuvan kemoterapiye karboplatin veya bevacizumab eklenmesinin PTY oranlarını artırdığı gözlemlendi.

Yukarıda belirtildiği üzere, antrasiklin ve taksan bazlı rejimler meme kanseri hastaları için günümüzün standart rejimini oluşturmaktadır (Metzger-Filho ve ark., 2012). Yine de, TNMK'li hastalar için optimal bir neoadjuvan/adjuvan kemoterapi rejimi oluşturulamamıştır ve sonuçları iyileştirmek için hem neoadjuvan hem de adjuvan tedaviler için daha yeni ilaçlar ve kombinasyonlar araştırılmaktadır (Joensuu ve Gligorov, 2012).

TNMK'de metastatik nüks ile ilgili olarak, ER/PR/HER2 hedeflerinin olmaması nedeniyle tedavi seçenekleri yetersizdir. Kemoterapi, TNMK tedavisinde sistemik nüks için temel tedavi olmaya devam etmektedir ve tedavinin amacı, sağ kalımı uzatmak ve semptomların hafifletilmesidir. Ne yazık ki, sistemik tedaviye verilen yanıtlar kalıcılıktan yoksundur ve prognoz diğer alt tiplere kıyasla daha kötüdür (Carey ve ark., 2007; Kennecke ve ark., 2010). Meme kanseri bir kez metastatik hale geldiğinde, belirli bir meme kanseri alt tipinde bazı kemoterapötik ajanların diğerlerinden daha üstün olduğuna dair hiçbir kanıt yoktur. Tek ajanlı kemoterapi genellikle mantıklıdır, ancak bazen acil yanıt gerektiğinde kombinasyon kemoterapisi tercih edilebilir. TNMK' deki tek ajanlı kemoterapi seçenekleri arasında antrasiklinler (doksorubisin, epirubisin, vb.), taksanlar (paklitaksel, dosetaksel vb.), anti-metabolitler (kapesitabin, gemesitabin) ve diğer mikrotübül inhibitörleri ve/veya stabilizatörler (vinorelbin, iksabepilon, eribulin) veya platin ajanları (sisplatin, karboplatin) bulunur.

Bir mikrotübül inhibitörü olan eribulin, bir antrasiklin ve bir taksan içeren en az iki kemoterapötik rejim almış ileri meme kanseri hastaları için FDA tarafından onay

almıştır. EMBRACE (metastik meme kanserinde eribulin monoterapisine karşın hekim tercihinine bağı tedavi karşılaştırılması ,2011) çalışmasından elde edilen alt grup analizleri, eribulinin, hekim tercihinine göre düzenlenen herhangi bir monoterapi veya yalnızca palyatif tedaviye kıyasla ÖR negatif hastalarda ve TNMK'li hastalarda daha etkili olduğunu göstermiştir. Kapesitabin ile önceden tedavi edilmemiş hastalarda eribulinin daha az etkili olduğu dikkate alınmalıdır (Twelves ve ark., 2010).

Genel olarak, standart kemoterapi rejimleri, erken evre TNMK' li bir hasta alt grubu için etkili olabilir. Bununla birlikte, ilerlemiş hastalığı olan hastalar tipik olarak mevcut kemoterapötik ajanlara zayıf yanıt verir veya hızlı hastalık progresyonu vardır. Bu nedenle yeni, daha hedefe yönelik tedavi yaklaşımları, tanı anındaki hastalığın evresi ne olursa olsun, TNMK'li bu hasta popülasyonu için acil ve karşılanmamış bir tıbbi ihtiyaçtır.

TNMK'nde hedeflenen çeşitli moleküler yolaklar arasında; vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), yetersiz DNA onarım mekanizmaları (PARP gibi), epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR), mammalian target of rapamycin (mTOR), src onkojen yolu, histon deasetilaz (HDAC) ve AR vardır. Ancak bu moleküller için öngörücü biyobelirteç eksikliği var. İmmunhistokimyasallar tarafından tespit edilen, TNMK'de aşırı eksprese edilen proteinler EGFR, cKIT, sitokeratinler 5/6, 14 ve 17, p53, p15 ve siklin E'dir ve bunlar daha kısa sağ kalım ile ilişkilidir (Cheang ve ark., 2008).

Randomize faz 3 çalışmalarında VEGF inhibitörleri, tümör neovaskülarizasyonunun büyümesini bloke eder. Anti-VEGF monoklonal antikoru olan bevacizumab, birinci basamak kemoterapiye eklendiğinde metastatik meme kanserli hastaların yanıt oranını ve progresyonsuz sağ kalımı artırmaktadır (Miller ve ark., 2007; Robert ve ark., 2011). Ulusal Cerrahi Adjuvan Meme ve Bağırsak Projesi (NSABP) B-40 çalışmasında, antrasiklin-taksan bazlı neoadjuvan kemoterapiye bevacizumab eklenmesinin TNMK grubunda etkili olmadığı gösterilmiştir (Bear ve ark., 2012). Faz III BEATRICE (Triple Negatif Meme Kanserinde Bevacizumab Adjuvan Tedavisi) çalışması, rezeke edilmiş TNMK'de bevacizumab ile adjuvan tedavi için 3 yıllık hastalıksız sağ kalım için bir fark bulamamıştır (Cameron ve ark., 2013).

PARP inhibisyonu, BRCA1 eksikliği olan TNMK tümörleri için çekici bir hedeftir ve PARP inhibitörü olan iniparib ile ilgili ilk çalışmalar cesaret verici olmuştur (O'Shaughnessy ve ark., 2011). Ancak daha sonraki çalışmalar ne spesifik inhibisyonu ne de klinik ilişkiyi doğrulayamamıştır (Kumar ve Aggarwal, 2016). BRCA mutasyonları olmayan TNMK hastalarının tedavisinde PARP inhibitörü olaparib kullanımının etkisiz olduğu gösterilmiştir (Gelmon ve ark., 2010). PARP inhibitörleri şu anda sadece BRCA1/2 mutasyonu olan hastaları içeren çeşitli çalışmalarda kemoterapötik ajanlarla kombinasyon halinde değerlendirilmektedir (Kumar ve Aggarwal, 2016).

EGFR inhibitörü olan monoklonal antikor setuksimab, karboplatin ile kombine edildiğinde TNMK'li hastaların %20' sinden azında etki göstermiştir (Carey ve ark., 2012). Randomize bir faz II çalışmasında, metastatik hastalık için daha önce birden fazla kemoterapi almamış metastatik TNMK'li 173 hastaya setuksimab ile birlikte veya setuksimabsız sisplatin verildi. Setuksimabın eklenmesi, aktivitede ılımlı bir iyileşme ile sonuçlanmıştır (Baselga ve ark., 2013).

Src, C-kit ve Platellet Derivated Growth Factor Receptor Beta' nın (PDGFR- β) oral inhibitörü olan dasatinib, bazal-like meme kanseri ve TNMK hücre hatlarının büyümesini inhibe eder (Finn ve ark., 2007; Tryfonopoulos ve ark., 2011). Tek ajan dasatinib, tek kollu bir faz I çalışmasında antrasiklin ve taksan ile neoadjuvan tedavi görmüş metastatik TNMK'li hastalarda değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, günde iki kez 70 mg'lık bir dozda dasatinib, %9,3'lük bir hastalısız sağkalım oranları sağlamıştır (Fornier ve ark., 2011).

Son yıllarda yeni geliştirilen aşı çalışmaları TNMK tedavisinde umut verici olmaktadır. GLV-1h153, replikasyon yetkin bir onkolitik aşı virüsüdür. Gholami ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, bu aşı virüsünün TNMK hücre hattındaki etkinliği, hem in vitro hem de in vivo ortamda kanıtlanmıştır. Ayrıca GLV-1h153'ün metastatik TNMK'yi önlemek ve tedavi etmek için umut verici bir terapötik ajan olduğu sonucuna varılmıştır (Gholami ve ark., 2012).

Hücre iskeletini etkileyen ve EMT belirteçlerini etkileyen mutasyonlar TNMK'de nispeten sık gözlenmiştir (Jeong ve ark., 2012). Hem bazal-like hem de özellikle claudin-low tümörler, EMT sürecinde yer alan proteinlerin yüksek ekspresyon

seviyelerine sahiptir (Dutta ve ark., 2012). Wnt/ β -katenin sinyal yolunun aktivasyonunun, EMT'nin karakteristiği, invazyonu ve çoğalma potansiyeli ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Jiang ve ark., 2007).

TNMK'nde yeni tedavi çalışmalarında Wnt/ β -katenin sinyal yolağındaki teröpatik hedefler mevcuttur. Küçük moleküllü β -katenin/TCF inhibitörü olan CWP232228 ile tedavi, β -katenin aracılı transkripsiyonu inhibe ederek, sırasıyla TNMK hücre dizilerinde ve TNMK hastadan türetilen ksenograft modellerinde, kök hücre proliferasyonunun inhibisyonuna ve tümör kütlelerinde azalmaya yol açmıştır (Jang ve ark., 2015). CBP (CREB bağlayıcı protein) inhibitörü olan PRI-724 ve bir Porcupine inhibitörü olan LGK-974, şu anda klinik geliştirme aşamasında olan iki küçük moleküldür. Her iki molekül de şu anda TNMK hastalarında devam eden faz I klinik denemelerinde tek ajan kullanımı için araştırılmaktadır (Takebe ve ark., 2015). En son *in vitro* çalışmalar, LGK-974'ün PI3K/AKT/mTOR inhibitörü BKM120 ile kombinasyon halinde, TNMK hücre kültüründe hücre canlılığını azaltmak ve antitümör etkinliğini artırmak için sinerjistik olarak çalıştığını göstermiştir (Solzak ve ark., 2015). Wnt sinyal yolundaki Frizzled reseptör antagonisti olan vantictumab'ın, TNMK hücre kültüründe paklitaksel ile sinerjik etki göstererek mitotik hücre ölümünü arttırdığı gözlenmiştir (Fischer ve ark., 2017). Bu çalışmada Wnt antagonistlerinin taksel grubu ile en iyi sinerjik etkiyi gösterdiği belirtilmektedir (Fischer ve ark., 2017). Benzer bir çalışmada, FZD7' ye bağlanan ve yanıt olarak β -katenin sinyalini bloke eden OMP-18R5 antikorunun, kemoterapik ajanlarla kombine edildiğinde, hem pankreas hem de meme tümörlerinde tümör gelişimini 10 kat azalttığı gözlenmiştir (Gurney ve ark., 2012). Başka bir çalışmada Wnt sinyal yolu antagaonisti olan Frizzled ile ilişkili protein 1' in (sFRP1), MDA-MB-231' de kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Matsuda ve ark., 2009)

β -katenin ve TCF-4 transkripsiyonel kompleksinin düzenleyici bir bileşeni olarak tanımlanan TNIK, Wnt sinyalini en aşağı basamakta, nükleus düzeyinde düzenlediğinden, son zamanlarda terapötik hedef haline gelmiştir (Yamada ve Masuda, 2017). Fakat TNIK inhibisyonu ile sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır. Bir çalışmada TNIK inhibitörü NCB-0846'nın osteosarkom hücre kültüründe PPARy indüksiyonu yoluyla tümör hücrelerinin adiposit benzeri hücrelere dönüşmesini sağladığı gösterildi. Pedro T. ve arkadaşlarının akciğer skuamoz hücreli karsinom

hücre kültüründe NCB-0846 ile yaptığı çalışmada tümör hücrelerini inhibe olduğu gözlenmiştir (Torres-Ayuso ve ark., 2021).

TNMK, erken evrede, standart kemoteraplere iyi yanıt vermektedir . Fakat ileri evrede ve nükslerde standart kemoterapiye ilaveten hedefe yönelik tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır . Bu nedenle çalışmalarda tümör migrasyonu, invazyonu ve metastazında rol alan EMT ve Wnt/ β -katenin sinyal yolu ile TNMK inhibisyonu hedeflenmiştir. Ayrıca NCB-0846' nın TNİK inhibisyonunun TNMK' ne etkilerini araştıran bir çalışma mevcut değildir.

Çalışmamızda, NCB-0846'nin sitotoksik etkilerinin değerlendirildiği WST-1 canlılık analizi sonuçlarında, MDA-MB-231 hücrelerinde 72 saat sonundaki canlılık oranları 48 saate göre daha düşük bulunmuştur ve NCB-0846'nin zaman bağımlı olarak TNMK hücre hattında canlılığı azalttığı tespit edilmiştir. Ayrıca uygulanan NCB-0846 dozları ile canlılık oranları değerlendirildiğinde, MDA-MB-231 hücrelerinde en etkin doz 3 μ M olarak saptanmıştır. Kontrol hücrelerimiz olan MCF-10A hücrelerinde de ise NCB-0846'nin sitotoksik etkisinin olduğu saptanmıştır. 3 μ M dozda 72 saat sonunda MDA-MB-231' de canlı hücre %42,20 iken MCF-10A ise %53.92 idi. NCB-0846, 3 μ M dozda kanser hücrelerine daha fazla toksik etki göstermiştir. NCB-0846, MDA-MB-231 hücreleri üzerinde doz ve zaman bağımlı iken, MCF-10A hücreleri üzerinde sadece zaman bağımlı idi. NCB-0846' nın MCF-10A hücreleri üzerindeki en sitotoksik dozu 1 μ M olarak saptanmıştır. Tetsuya S. ve arkadaşlarının 2020 yılında yayınlanmış çalışmasında, snovyal sarkom kanseri hücre hattı olan HS-SY-II ve SYO-1 hücrelerinde NCB-0846' nın inhibitör etkisinin olduğunu, bu etkinin konsantrasyon ve zaman bağımlı olarak arttığını bildirmişlerdir (Sekita ve ark., 2020). Bir diğer in vitro çalışmada, Masuda ve arkadaşları, insan kolon kanser hücre hattında (HCT116), NCB-0846' nın inhibitör etkisinin konsantrasyon ve zaman bağımlı olarak arttığını göstermişlerdir (Masuda ve ark., 2016).

NCB-0846' en etkin süresi olan 72 saatlik uygulamasının MDA-MB-231' deki apoptotik etkisi değerlendirildi. MDA-MB-231 hücrelerinde kontrol grubuna göre tüm dozlarda apoptotik hücre oranlarının daha yüksek olduğu saptandı. MDA-MB-231 hücrelerinde en yüksek apoptoz 3 μ M dozda saptandı. Morfolojik değişiklikler değerlendirildiğinde konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak sitoplazmada dejeneratif

değişimlerin yanısıra hücre membranında kopmalar (apoptotik body) oluşumları gözlemlendi. Morfolojik değişiklikler ve WST-1 canlılık analizi apoptoz ile uyumluydu.

Bu durum TNMK' nin apoptoz hedefli tedavilere duyarlı olabileceğini düşündürmektedir. MCF-10A hücrelerinde ise 72 saat boyunca NCB-0846, en yüksek apoptoz ölüm oranını 1 μ M da göstermiştir, 3 μ M dozda daha düşük bulunmuştur.. NCB-0846'nin apoptotik etkilerini gösteren bir çalışmada, HCT-116 hücre hattında PARP-1 ile apoptozun indüklendiği tespit edilmiştir (Masuda ve ark., 2016). Toru H. ve ark. (2021), osteosarkom hücrelerinde NCB-0846 uygulamasının apoptozu arttırdığını PARP-1 yıkımındaki artış ile göstermiştir (Hirozane ve ark., 2021).

Sato ve arkadaşları CK2 α , DYRK1A ve TNIK fosforilasyonunu inhibe eden 108600 multikinaz inhibitörünün, MDA-MB-231 hücre hattındaki uygulamasında kanser hücrelerini inhibe ettiğini, hücre siklusunda G2M fazında duraklattığını ve apoptozu indüklediğini göstermişlerdir (Sato ve ark., 2021).

Hücre siklusuna yönelik araştırmada MDA-MB-231 hücrelerinde NCB-0846'nın artan konsantrasyonuna bağlı olarak G2/M evresinde hücre tutulmasına neden olduğu belirlendi. Başka çalışmada NCB-0846' nın osteosarkom hücre hattında sub-G1 fazında tutuluma neden olduğu bildirildi (Hirozane ve ark., 2021). Yine Mari M. ve arkadaşlarının çalışmasında, NCB-0846' nın HCT116 hücre hattında sub-G1 fazında tutuluma neden olduğu gösterilmiştir (Masuda ve ark., 2016).

Wnt yolağının önemli bir hedefi olarak β -katenin proteinini kodlayan *CTNNB1* geninin NCB-0846' nın artan dozuna bağlı olarak MDA-MB-231 hücrelerinde ekspresyon seviyesinde azalış belirlenmesine rağmen, MCF-10A hücrelerinde *CTNNB1* mRNA seviyesinin anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir. Toru H. ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada NCB-0846' nın uygulandığı fareler SOX2 , *NANOG* ve *MYC* gen ekspresyon düzeylerinde azalma saptanmıştır (Hirozane ve ark., 2021).

TNMK kanserinde apoptoz hedefli tedavi ile ilgili çeşitli çalışmalar mevcuttur. Apoptozun hem intrinsik hem de ekstrinsik yolağı mevcuttur. (Carneiro ve El-Deiry, 2020). Apoptozun intrinsik yolağındaki ana hedef anti-apoptotik olan Bcl-2' nin inhibisyonudur. Bir Bcl-2 inhibitörü olan ABT-199, doksorubisinin MDA-MB-231

hücre hattındaki etkisini sinerjik arttırdığı ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Inao ve ark., 2018). İçsel yoldaki bir diğer hedef olan BCLXL' in inhibitörü WEHI-539' dur ve bunun sisplatin ile kombinasyonunda TNMK hücre hatlarında sinerjik aktivite gösterdi (Lucantoni ve ark., 2018). Ekstrinsik yolak inhibisyonu ile tedavide TRAIL, FAS-L, TNF gibi bilinen üç ölüm reseptöründen birinin aktivasyonu ile kaspaz-8 aracılı apoptozis indüksiyonu hedeflenmektedir .TRAIL agonistinin meme kanseri hücre hatları üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, hormon reseptörü pozitif olan hücre hatlarının TRAIL agonistine dirençli olduğu, TNMK hücre hatlarında ise kaspaz bağımlı apoptozun indüklendiği görüldü (Rahman ve ark., 2009).

Sonuç olarak çalışmamızda TNMK' ndeki etkinliğini araştırdığımız TNIK inhibitörü olan olan NCB-0846'nın, apoptozu indükleyerek, hücre sağkalımını azaltarak ve proliferasyonu baskılayarak MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır. Çalışmamızda, NCB-0846'nın TNMK hücrelerinde apoptotoza neden olduğu yollar belirlenememiş olsa da, bildiğimiz kadarıyla, NCB-0846'nın MDA-MB-231 hücrelerinde apoptotik ve antiproliferatif yeteneği üzerine ilk rapordur. Bu yönüyle çalışmamızın gelecekte yapılacak araştırmalara ışık tutacağı düşünülmektedir. Çalışmamız, TNIK inhibisyonunun TNMK tedavisinde yeterli etkinliğe ulaşabileceğini düşündürmektedir. Kombin kemoterapi ilaçları ile birlikte kullanıldığında tedavi etkinliği artabilir, yan etkileri azalabilir. Ayrıca sistemik kemoterapiklerle kombinasyonunda doz azalmasını sağlayarak yan etkilerin azalmasına neden olabilir. Sonuçlarımız, NCB-0846' nın TNMK tedavisi için uygun bir aday olabileceğini göstermektedir. Ancak etki mekanizmalarını daha iyi anlamak için daha ileri düzey in vitro ve in vivo çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

6. KAYNAKLAR

Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(1):7–33.

MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell.* 2009;17(1):9–26.

Cheng X, Xu X, Chen D, Zhao F, Wang W. Therapeutic potential of targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in colorectal cancer. *Biomed Pharmacother.* 2019;110:473–81.

Pan J, Fang S, Tian H, Zhou C, Zhao X, Tian H, et al. lncRNA JPX/miR-33a-5p/Twist1 axis regulates tumorigenesis and metastasis of lung cancer by activating Wnt/ β -catenin signaling. *Mol Cancer.* 2020;19(1):9.

Zhou C, Yi C, Yi Y, Qin W, Yan Y, Dong X, et al. LncRNA PVT1 promotes gemcitabine resistance of pancreatic cancer via activating Wnt/ β -catenin and autophagy pathway through modulating the miR-619-5p/Pygo2 and miR-619-5p/ATG14 axes. *Mol Cancer.* 2020;19(1):118.

Xu X, Zhang M, Xu F, Jiang S. Wnt signaling in breast cancer: biological mechanisms, challenges and opportunities. *Mol Cancer.* 2020;19(1):165.

Huang P, Yan R, Zhang X, Wang L, Ke X, Qu Y. Activating Wnt/ β -catenin signaling pathway for disease therapy: Challenges and opportunities. *Pharmacol Ther.* 2019;196:79–90.

Larriba MJ, González-Sancho JM, Barbáchano A, Niell N, Ferrer-Mayorga G, Muñoz A. Vitamin D Is a Multilevel Repressor of Wnt/ β -Catenin Signaling in Cancer Cells. *Cancers* . 2013;5(4):1242–60.

Zhang Y, Wang X. Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in cancer. *J Hematol Oncol.* 2020;13(1):165.

Mahmoudi T, Li VSW, Ng SS, Taouatas N, Vries RGJ, Mohammed S, et al. The kinase TNIK is an essential activator of Wnt target genes. *EMBO J*. 2009;28(21):3329–40.

Sugano T, Masuda M, Takeshita F, Motoi N, Hirozane T, Goto N, et al. Pharmacological blockage of transforming growth factor- β signalling by a Traf2- and Nck-interacting kinase inhibitor, NCB-0846. *Br J Cancer*. 2021;124(1):228–36.

Yamada T, Masuda M. Emergence of TNIK inhibitors in cancer therapeutics. *Cancer Sci*. 2017;108(5):818–23.

Masuda M, Uno Y, Ohbayashi N, Ohata H, Mimata A, Kukimoto-Niino M, et al. TNIK inhibition abrogates colorectal cancer stemness. *Nat Commun*. 2016;7(1):1–14.

Okubo M, Tada K, Niwa T, Nishioka K, Tsuji E, Ogawa T, et al. A case of breast cancer in the axillary tail of Spence - enhanced magnetic resonance imaging and positron emission tomography for diagnostic differentiation and preoperative treatment decision. *World J Surg Oncol*. 2013;11:217.

Bland KI, Copeland EM, Klimberg VS. 2 - Anatomy of the Breast, Axilla, Chest Wall, and Related Metastatic Sites. In: Bland KI, Copeland EM, Klimberg VS, Gradishar WJ, editors. *The Breast (Fifth Edition)*. Elsevier; 2018. p. 20–36.e2.

Ricbourg B. Applied anatomy of the breast: blood supply and innervation. *Ann Chir Plast Esthet*. 1992;37(6):603–20.

Cody HS 3rd. Clinical significance and management of extra-axillary sentinel lymph nodes: worthwhile or irrelevant? *Surg Oncol Clin N Am*. 2010;19(3):507–17.

Johnson MC. Anatomy and Physiology of the Breast [Internet]. *Management of Breast Diseases*. 2010. p. 1–36. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-69743-5_1

Nathanson SD, Wachna DL, Gilman D, Karvelis K, Havstad S, Ferrara J. Pathways of lymphatic drainage from the breast. *Ann Surg Oncol*. 2001;8(10):837–43.

Johna S. Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice Elsevier / Churchill Livingstone, 2005, ISBN 0-443-06676-0 [Internet]. Vol. 30, World Journal

of Surgery. 2006. p. 1624–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00268-006-0109-2>

Vendrell-Torné E, Setoain-Quinquer J, Doménech-Torné FM. Study of normal mammary lymphatic drainage using radioactive isotopes. *J Nucl Med.* 1972;13(11):801–5.

Suami H, Pan W-R, Mann GB, Taylor GI. The lymphatic anatomy of the breast and its implications for sentinel lymph node biopsy: a human cadaver study. *Ann Surg Oncol.* 2008;15(3):863–71.

Krynyckyi BR, Shim J, Kim CK. Internal mammary chain drainage of breast cancer. *Ann Surg.* 2004;240(3):557; author reply 558.

Mudun A, Sanli Y, Ozmen V, Turkmen C, Ozel S, Eroglu A, et al. Comparison of different injection sites of radionuclide for sentinel lymph node detection in breast cancer: single institution experience. *Clin Nucl Med.* 2008;33(4):262–7.

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries [Internet]. Vol. 71, CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2021. p. 209–49. Available from: <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21660>

Ghoncheh M, Pournamdar Z, Salehiniya H. Incidence and Mortality and Epidemiology of Breast Cancer in the World. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2016;17(S3):43–6.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(1):7–30.

Brewer HR, Jones ME, Schoemaker MJ, Ashworth A, Swerdlow AJ. Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. *Breast Cancer Res Treat.* 2017;165(1):193–200.

Dall GV, Britt KL. Estrogen Effects on the Mammary Gland in Early and Late Life and Breast Cancer Risk. *Front Oncol.* 2017 ;7:110.

Horn J, Åsvold BO, Opdahl S, Tretli S, Vatten LJ. Reproductive factors and the risk of breast cancer in old age: a Norwegian cohort study. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;139(1):237–43.

Kauff ND, Domchek SM, Friebel TM, Robson ME, Lee J, Garber JE, et al. Risk-reducing salpingo-oophorectomy for the prevention of BRCA1- and BRCA2-associated breast and gynecologic cancer: a multicenter, prospective study. *J Clin Oncol.* 2008;26(8):1331–7.

Bethea TN, Rosenberg L, Hong C-C, Troester MA, Lunetta KL, Bandera EV, et al. A case-control analysis of oral contraceptive use and breast cancer subtypes in the African American Breast Cancer Epidemiology and Risk Consortium. *Breast Cancer Res.* 2015;17:22.

Beral V, Million Women Study Collaborators. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet.* 2003 ;362(9382):419–27.

Hamajima N, Hirose K, Tajima K, Rohan T, Calle EE, Heath CW Jr, et al. Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. *Br J Cancer.* 2002 ;87(11):1234–45.

Jung S, Wang M, Anderson K, Baglietto L, Bergkvist L, Bernstein L, et al. Alcohol consumption and breast cancer risk by estrogen receptor status: in a pooled analysis of 20 studies. *Int J Epidemiol.* 2016 ;45(3):916–28.

Makarem N, Chandran U, Bandera EV, Parekh N. Dietary fat in breast cancer survival. *Annu Rev Nutr.* 2013 ;33:319–48.

Jones ME, Schoemaker MJ, Wright LB, Ashworth A, Swerdlow AJ. Smoking and risk of breast cancer in the Generations Study cohort. *Breast Cancer Res.* 2017 ;19(1):118.

Knight JA, Fan J, Malone KE, John EM, Lynch CF, Langballe R, et al. Alcohol consumption and cigarette smoking in combination: A predictor of contralateral breast cancer risk in the WECARE study. *Int J Cancer.* 2017 ;141(5):916–24.

Macacu A, Autier P, Boniol M, Boyle P. Active and passive smoking and risk of breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2015 ;154(2):213–24.

Catsburg C, Miller AB, Rohan TE. Active cigarette smoking and risk of breast cancer. *Int J Cancer.* 2015;136(9):2204–9.

Edition S, Edge SB, Byrd DR, Others. *AJCC cancer staging manual.* *AJCC cancer staging manual* [Internet]. 2017; Available from: <https://www.thastro.org/wp-content/uploads/refresher-2018-Breast.pdf>

Yi M, Mittendorf EA, Cormier JN, Buchholz TA, Bilimoria K, Sahin AA, et al. Novel staging system for predicting disease-specific survival in patients with breast cancer treated with surgery as the first intervention: time to modify the current American Joint Committee on Cancer staging system. *J Clin Oncol.* 2011;29(35):4654–61.

Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours.* John Wiley & Sons; 2011. 336 p.

Koh J, Kim MJ. Introduction of a New Staging System of Breast Cancer for Radiologists: An Emphasis on the Prognostic Stage. *Korean J Radiol.* 2019;20(1):69–82.

Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer.* 1989;63(1):181–7.

Rosen PP, Groshen S, Kinne DW, Norton L. Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol.* 1993;11(11):2090–100.

Quiet CA, Ferguson DJ, Weichselbaum RR, Hellman S. Natural history of node-negative breast cancer: a study of 826 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol.* 1995;13(5):1144–51.

Li CI, Moe RE, Daling JR. Risk of mortality by histologic type of breast cancer among women aged 50 to 79 years. *Arch Intern Med.* 2003 ;163(18):2149–53.

Hashmi AA, Aijaz S, Mahboob R, Khan SM, Irfan M, Iftikhar N, et al. Clinicopathologic features of invasive metaplastic and micropapillary breast carcinoma: comparison with invasive ductal carcinoma of breast. BMC Res Notes. 2018 ;11(1):531.

Luna-Moré S, Gonzalez B, Acedo C, Rodrigo I, Luna C. Invasive micropapillary carcinoma of the breast. A new special type of invasive mammary carcinoma. Pathol Res Pract. 1994 ;190(7):668–74.

Neville AM, Bettelheim R, Gelber RD, S  ve-S  derbergh J, Davis BW, Reed R, et al. Factors predicting treatment responsiveness and prognosis in node-negative breast cancer. The International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. J Clin Oncol. 1992 ;10(5):696–705.

Rosen PP, Groshen S, Saigo PE, Kinne DW, Hellman S. Pathological prognostic factors in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma: a study of 644 patients with median follow-up of 18 years. J Clin Oncol. 1989 ;7(9):1239–51.

Mohammed H, Russell IA, Stark R, Rueda OM, Hickey TE, Tarulli GA, et al. Progesterone receptor modulates ER   action in breast cancer. Nature. 2015 ;523(7560):313–7.

Lamb CA, Vanzulli SI, Lanari C. Hormone receptors in breast cancer: more than estrogen receptors. Medicina . 2019;79(Spec 6/1):540–5.

Ruhi HI. Meme Kanserinde Farmakogenetik/Pharmacogenetics in Breast Cancer. Türkiye Klinikleri Tip Bilimleri Dergisi. 2010;30(2):S16.

Tavassoli FA. Pathology of the breast. Int J Gynecol Pathol. 1993 ;12(4):366.

Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. Mod Pathol. 1998 ;11(2):155–68.

Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, et al. The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. Oncologist. 2003;8(4):307–25.

Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after Adjuvant Chemotherapy in HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2005;353(16):1659–72.

Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Davidson NE, et al. Trastuzumab plus Adjuvant Chemotherapy for Operable HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2005;353(16):1673–84.

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 2001;344(11):783–92.

Duffy MJ. Predictive markers in breast and other cancers: a review. *Clin Chem*. 2005;51(3):494–503.

Gennari A, Sormani MP, Pronzato P, Puntoni M, Colozza M, Pfeffer U, et al. HER2 Status and Efficacy of Adjuvant Anthracyclines in Early Breast Cancer: A Pooled Analysis of Randomized Trials [Internet]. Vol. 100, JNCI: Journal of the National Cancer Institute. 2008. p. 14–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/djm252>

Yamauchi H, Stearns V, Hayes DF. When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2001 ;19(8):2334–56.

Bartlett J, Mallon E, Cooke T. The clinical evaluation of HER-2 status: which test to use? *J Pathol*. 2003;199(4):411–7.

Hashmi AA, Hashmi KA, Irfan M, Khan SM, Edhi MM, Ali JP, et al. Ki67 index in intrinsic breast cancer subtypes and its association with prognostic parameters. *BMC Res Notes*. 2019;12(1):605.

Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn H-J. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol*. 2011;22(8):1736–47.

Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J Clin Oncol*. 2005 ;23(29):7350–60.

Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu CG, Pienkowski T, et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 2006 ;355(26):2733–43.

Gianni L, Dafni U, Gelber RD, Azambuja E, Muehlbauer S, Goldhirsch A, et al. Treatment with trastuzumab for 1 year after adjuvant chemotherapy in patients with HER2-positive early breast cancer: a 4-year follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2011 ;12(3):236–44.

Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004 ;10(16):5367–74.

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 ;406(6797):747–52.

Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*. 2007 ;13(15 Pt 1):4429–34.

Smid M, Wang Y, Zhang Y, Sieuwerts AM, Yu J, Klijn JGM, et al. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res*. 2008 ;68(9):3108–14.

Harrell JC, Prat A, Parker JS, Fan C, He X, Carey L, et al. Genomic analysis identifies unique signatures predictive of brain, lung, and liver relapse. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 ;132(2):523–35.

Lin NU, Claus E, Sohl J, Razzak AR, Arnaout A, Winer EP. Sites of distant recurrence and clinical outcomes in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *Cancer*. 2008 ;113(10):2638–45.

Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res*. 2007;13(8):2329–34.

Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(8):1275–81.

Li J, Chen S, Chen C, Di G, Liu G, Wu J, et al. Pathological complete response as a surrogate for relapse-free survival in patients with triple negative breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Oncotarget*. 2017;8(11):18399–408.

Sikov WM, Berry DA, Perou CM, Singh B, Cirrincione CT, Tolaney SM, et al. Impact of the addition of carboplatin and/or bevacizumab to neoadjuvant once-per-week paclitaxel followed by dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide on pathologic complete response rates in stage II to III triple-negative breast cancer: CALGB 40603 (Alliance). *J Clin Oncol*. 2015;33(1):13–21.

Sikov WM, Berry DA, Perou CM, Singh B, Cirrincione CT, Tolaney SM, et al. Abstract S2-05: Event-free and overall survival following neoadjuvant weekly paclitaxel and dose-dense AC+/-carboplatin and/or bevacizumab in triple-negative breast cancer: Outcomes from CALGB 40603 (Alliance). 2016; Available from: <https://institutionalrepository.aah.org/onc/70/>

von Minckwitz G, Schneeweiss A, Loibl S, Salat C, Denkert C, Rezai M, et al. Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2014;15(7):747–56.

Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet*. 2014;384(9938):164–72.

Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol*. 2006;19(2):264–71.

Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI. and Perou, CM (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 12:R68.

Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest.* 2011;121(7):2750–67.

Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, Covington KR, Contreras A, Fuqua SAW, et al. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2015;21(7):1688–98.

Gucalp A, Tolaney S, Isakoff SJ, Ingle JN, Liu MC. Phase II trial of bicalutamide in patients with androgen receptor–positive, estrogen receptor–negative metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2013; Available from: <https://clincancerres.aacrjournals.org/content/19/19/5505.short>

Bidard F-C, Matthieu M-C, Chollet P, Raoefils I, Abrial C, Dômont J, et al. p53 status and efficacy of primary anthracyclines/alkylating agent-based regimen according to breast cancer molecular classes. *Ann Oncol.* 2008;19(7):1261–5.

Le Tourneau C. 47% pathologic complete response rate to anthracyclines-based associated with high cyclophosphamide doses neoadjuvant chemotherapy in basal-like and triple negative breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2007;106. Available from: <https://ci.nii.ac.jp/naid/10026601291/>

Fernandez-Morales LA, Dalmau E, Martinez S, Arcusa A, Pericay C, Lain JM, et al. Analysis of the pathological response to primary chemotherapy in patients with locally advanced breast cancer (LABC) grouped according to ER, PR and HER2 status. *J Clin Orthod.* 2006;24(18_suppl):626–626.

Straver ME, Glas AM, Hannemann J, Wesseling J, van de Vijver MJ, Rutgers EJT, et al. The 70-gene signature as a response predictor for neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;119(3):551–8.

Huober J, von Minckwitz G, Denkert C, Tesch H, Weiss E, Zahm DM, et al. Effect of neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy in different biological breast cancer phenotypes: overall results from the GeparTrio study. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 ;124(1):133–40.

Loibl S, O'Shaughnessy J, Untch M, Sikov WM, Rugo HS, McKee MD, et al. Addition of the PARP inhibitor veliparib plus carboplatin or carboplatin alone to standard neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer (BrighTNess): a randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2018 ;19(4):497–509.

Telli ML, Jensen KC, Vinayak S, Kurian AW, Lipson JA, Flaherty PJ, et al. Phase II study of gemcitabine, carboplatin, and iniparib as neoadjuvant therapy for triple-negative and BRCA1/2 mutation-associated breast cancer with assessment of a tumor-based measure of genomic instability: PrECOG 0105. *J Clin Oncol.* 2015 ;33(17):1895–901.

Telli ML, Timms KM, Reid J, Hennessy B, Mills GB, Jensen KC, et al. Homologous Recombination Deficiency (HRD) Score Predicts Response to Platinum-Containing Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2016 ;22(15):3764–73.

Liu X, Shi Y, Maag DX, Palma JP, Patterson MJ, Ellis PA, et al. Iniparib nonselectively modifies cysteine-containing proteins in tumor cells and is not a bona fide PARP inhibitor. *Clin Cancer Res.* 2012 ;18(2):510–23.

Pierce A, McGowan PM, Cotter M, Mullooly M, O'Donovan N, Rani S, et al. Comparative antiproliferative effects of iniparib and olaparib on a panel of triple-negative and non-triple-negative breast cancer cell lines. *Cancer Biol Ther.* 2013;14(6):537–45.

Tutt A. Inhibited, trapped or adducted: the optimal selective synthetic lethal mix for BRCAness. *Ann Oncol.* 2018 ;29(1):18–21.

Litton JK, Scoggins M, Hess KR, Adrada B, Barcenas CH, Murthy RK, et al. Neoadjuvant talazoparib (TALA) for operable breast cancer patients with a BRCA mutation (BRCA+). *J Clin Oncol.* 2018;36(15_suppl):508–508.

von Minckwitz G, Eidtmann H, Rezai M, Fasching PA, Tesch H, Eggemann H, et al. Neoadjuvant Chemotherapy and Bevacizumab for HER2-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(4):299–309.

Allred DC, Mohsin SK, Fuqua SA. Histological and biological evolution of human premalignant breast disease. *Endocr Relat Cancer*. 2001;8(1):47–61.

Burstein HJ, Polyak K, Wong JS, Lester SC, Kaelin CM. Ductal carcinoma in situ of the breast. *N Engl J Med*. 2004;350(14):1430–41.

Maffini MV, Soto AM, Calabro JM, Ucci AA, Sonnenschein C. The stroma as a crucial target in rat mammary gland carcinogenesis. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 8):1495–502.

Sonnenschein C, Soto AM. Carcinogenesis explained within the context of a theory of organisms. *Prog Biophys Mol Biol*. 2016 ;122(1):70–6.

Dumars C, Ngyuen J-M, Gaultier A, Lanel R, Corradini N, Gouin F, et al. Dysregulation of macrophage polarization is associated with the metastatic process in osteosarcoma. *Oncotarget*. 2016 ;7(48):78343–54.

Qian B-Z, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010;141(1):39–51.

Polyak K. Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest*. 2007;117(11):3155–63.

Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*. 2008;4(2):68–75.

Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT. A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell*. 2003 ;5(3):367–77.

Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1653(1):1–24.

Mohammed MK, Shao C, Wang J, Wei Q, Wang X, Collier Z, et al. Wnt/ β -catenin signaling plays an ever-expanding role in stem cell self-renewal, tumorigenesis and cancer chemoresistance. *Genes Dis.* 2016;3(1):11–40.

Xu J, Prosperi JR, Choudhury N, Olopade OI, Goss KH. β -Catenin is required for the tumorigenic behavior of triple-negative breast cancer cells. *PLoS One.* 2015;10(2):e0117097.

Gordon MD, Nusse R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem.* 2006;281(32):22429–33.

Wu D, Pan W. GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling. *Trends Biochem Sci.* 2010;35(3):161–8.

Krishnamurthy N, Kurzrock R. Targeting the Wnt/ β -catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors. *Cancer Treat Rev.* 2018;62:50–60.

Kohn AD, Moon RT. Wnt and calcium signaling: β -catenin-independent pathways. *Cell Calcium.* 2005;38(3-4):439–46.

Spiegelman VS, Slaga TJ, Pagano M, Minamoto T, Ronai Z, Fuchs SY. Wnt/ β -catenin signaling induces the expression and activity of β -TrCP ubiquitin ligase receptor. *Mol Cell.* 2000;5(5):877–82.

Topol L, Jiang X, Choi H, Garrett-Beal L, Carolan PJ, Yang Y. Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent β -catenin degradation. *J Cell Biol.* 2003;162(5):899–908.

Vermeulen L, De Sousa E Melo F, van der Heijden M, Cameron K, de Jong JH, Borovski T, et al. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol.* 2010;12(5):468–76.

Teng Y, Wang X, Wang Y, Ma D. Wnt/ β -catenin signaling regulates cancer stem cells in lung cancer A549 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 ;392(3):373–9.

Khramtsov AI, Khramtsova GF, Tretiakova M, Huo D, Olopade OI, Goss KH. Wnt/beta-catenin pathway activation is enriched in basal-like breast cancers and predicts poor outcome. *Am J Pathol*. 2010;176(6):2911–20.

Schade B, Lesurf R, Sanguin-Gendreau V, Bui T, Deblois G, O'Toole SA, et al. β -Catenin signaling is a critical event in ErbB2-mediated mammary tumor progression. *Cancer Res*. 2013;73(14):4474–87.

Shitashige M, Satow R, Jigami T, Aoki K, Honda K, Shibata T, et al. Traf2- and Nck-interacting kinase is essential for Wnt signaling and colorectal cancer growth. *Cancer Res*. 2010;70(12):5024–33.

Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, et al. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science*. 1997;275(5307):1787–90.

Hirozane T, Masuda M, Sugano T, Sekita T, Goto N, Aoyama T, et al. Direct conversion of osteosarcoma to adipocytes by targeting TNIK. *JCI Insight* [Internet]. 2021;6(3). Available from: <http://dx.doi.org/10.1172/jci.insight.137245>

Torres-Ayuso P, An E, Nyswaner KM, Bensen RC, Ritt DA, Specht SI, et al. TNIK Is a Therapeutic Target in Lung Squamous Cell Carcinoma and Regulates FAK Activation through Merlin. *Cancer Discov*. 2021;11(6):1411–23.

Bujak A, Stefaniak F, Zdzalik D, Grygielewicz P, Dymek B, Zagozda M, et al. Discovery of TRAF-2 and NCK-interacting kinase (TNIK) inhibitors by ligand-based virtual screening methods. *Med Chem Commun*. 2015;6(8):1564–72.

Wang Q, Amato SP, Rubitski DM, Hayward MM, Kormos BL, Verhoest PR, et al. Identification of Phosphorylation Consensus Sequences and Endogenous Neuronal Substrates of the Psychiatric Risk Kinase TNIK. *J Pharmacol Exp Ther*. 2016;356(2):410–23.

Ho K-K, Parnell KM, Yuan Y, Xu Y, Kultgen SG, Hamblin S, et al. Discovery of 4-phenyl-2-phenylaminopyridine based TNIK inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013;23(2):569–73.

Padgaonkar A, Cosenza S, Pallela V, Reddy MVR. The dual CK2/TNFK inhibitor, ON108600 targets cancer stem cells and induces apoptosis of paclitaxel resistant triple-negative breast cancer cells. 2015; Available from: https://cancerres.aacrjournals.org/content/75/15_Supplement/4453.short

Chon HJ, Lee Y, Bae KJ, Byun BJ, Kim SA, Kim J. Traf2- and Nck-interacting kinase (TNFK) is involved in the anti-cancer mechanism of dovitinib in human multiple myeloma IM-9 cells. *Amino Acids*. 2016;48(7):1591–9.

Tan Z, Chen L, Zhang S. Comprehensive Modeling and Discovery of Mebendazole as a Novel TRAF2- and NCK-interacting Kinase Inhibitor. *Sci Rep*. 2016;6:33534.

Mukhopadhyay T, Sasaki J-I, Ramesh R, Roth JA. Mebendazole elicits a potent antitumor effect on human cancer cell lines both in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res*. 2002;8(9):2963–9.

Sato K, Padgaonkar AA, Baker SJ, Cosenza SC, Rechkoblit O, Subbaiah DRCV, et al. Simultaneous CK2/TNFK/DYRK1 inhibition by 108600 suppresses triple negative breast cancer stem cells and chemotherapy-resistant disease. *Nat Commun*. 2021;12(1):4671.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Adjuvant chemotherapy in oestrogen-receptor-poor breast cancer: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet*. 2008;371(9606):29–40.

Berry DA, Cirincione C, Henderson IC, Citron ML, Budman DR, Goldstein LJ, et al. Estrogen-receptor status and outcomes of modern chemotherapy for patients with node-positive breast cancer. *JAMA*. 2006;295(14):1658–67.

Rastogi P, Anderson SJ, Bear HD, Geyer CE, Kahlenberg MS, Robidoux A, et al. Preoperative chemotherapy: updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-27. *J Clin Oncol*. 2008;26(5):778–85.

Metzger-Filho O, Tutt A, de Azambuja E, Saini KS, Viale G, Loi S, et al. Dissecting the heterogeneity of triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2012 May 20;30(15):1879–87.

Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2005;11(16):5678–85.

Martin M, Romero A, Lopez Garcia-Asenjo J, Cheang MC, Oliva B, Garcia Saenz J, et al. Molecular and genomic predictors of response to single-agent doxorubicin (ADR) versus single-agent docetaxel (DOC) in primary breast cancer (PBC). *J Clin Orthod*. 2010;28(15_suppl):502–502.

Martin M, Romero A, Cheang MCU, López García-Asenjo JA, García-Saenz JA, Oliva B, et al. Genomic predictors of response to doxorubicin versus docetaxel in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;128(1):127–36.

Smith LA, Cornelius VR, Plummer CJ, Levitt G, Verrill M, Canney P, et al. Cardiotoxicity of anthracycline agents for the treatment of cancer: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMC Cancer*. 2010;10:337.

Chang HR, Glaspy J, Allison MA, Kass FC, Elashoff R, Chung DU, et al. Differential response of triple-negative breast cancer to a docetaxel and carboplatin-based neoadjuvant treatment. *Cancer*. 2010;116(18):4227–37.

Sikov WM, Dizon DS, Strenger R, Legare RD, Theall KP, Graves TA, et al. Frequent Pathologic Complete Responses in Aggressive Stages II to III Breast Cancers With Every-4-Week Carboplatin and Weekly Paclitaxel With or Without Trastuzumab: A Brown University Oncology Group Study [Internet]. Vol. 27, *Journal of Clinical Oncology*. 2009. p. 4693–700. Available from: <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2008.21.4163>

Alba E, Chacon JJ, Lluch A, García-Estevez L, Anton A, Cirauqui B, et al. Chemotherapy (CT) with or without carboplatin as neoadjuvant treatment in patients with basal-like breast cancer: GEICAM 2006-03—A multicenter, randomized phase II study. *J Clin Oncol*. 2011;29(15_suppl):1015–1015.

Joensuu H, Gligorov J. Adjuvant treatments for triple-negative breast cancers. *Ann Oncol*. 2012 Suppl 6:vi40–5.

Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MCU, Voduc D, Speers CH, et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*. 2010 ;28(20):3271–7.

Twelves C, Akerele C, Wanders J, Cortes JA. Eribulin mesylate (E7389) vs treatment of physician's choice (TPC) in patients (pts) with metastatic breast cancer (MBC): subgroup analyses from the EMBRACE study. In: *Annals of Oncology*. OXFORD UNIV PRESS GREAT CLARENDON ST, OXFORD OX2 6DP, ENGLAND; 2010. p. 96–96.

Cheang MCU, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res*. 2008;14(5):1368–76.

Miller K, Wang M, Gralow J, Dickler M, Cobleigh M, Perez EA, et al. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2007;357(26):2666–76.

Robert NJ, Diéras V, Glaspy J, Brufsky AM, Bondarenko I, Lipatov ON, et al. RIBBON-1: randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab for first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative, locally recurrent or metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(10):1252–60.

Bear HD, Tang G, Rastogi P, Geyer CE Jr, Robidoux A, Atkins JN, et al. Bevacizumab added to neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(4):310–20.

Cameron D, Brown J, Dent R, Jackisch C, Mackey J, Pivot X, et al. Adjuvant bevacizumab-containing therapy in triple-negative breast cancer (BEATRICE): primary results of a randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2013;14(10):933–42.

O'Shaughnessy J, Osborne C, Pippen JE, Yoffe M, Patt D, Rocha C, et al. Iniparib plus chemotherapy in metastatic triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2011;364(3):205–14.

Kumar P, Aggarwal R. An overview of triple-negative breast cancer. *Arch Gynecol Obstet.* 2016;293(2):247–69.

Gelmon KA, Hirte HW, Robidoux A, Tonkin KS, Tischkowitz M, Swenerton K, et al. Can we define tumors that will respond to PARP inhibitors? A phase II correlative study of olaparib in advanced serous ovarian cancer and triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(15_suppl):3002–3002.

Carey LA, Rugo HS, Marcom PK, Mayer EL, Esteva FJ, Ma CX, et al. TBCRC 001: randomized phase II study of cetuximab in combination with carboplatin in stage IV triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2012;30(21):2615–23.

Baselga J, Gómez P, Greil R, Braga S, Climent MA, Wardley AM, et al. Randomized phase II study of the anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab with cisplatin versus cisplatin alone in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2013;31(20):2586–92.

Finn RS, Dering J, Ginther C, Wilson CA, Glaspy P, Tchekmedyian N, et al. Dasatinib, an orally active small molecule inhibitor of both the src and abl kinases, selectively inhibits growth of basal-type/“triple-negative” breast cancer cell lines growing in vitro. *Breast Cancer Res Treat.* 2007;105(3):319–26.

Tryfonopoulos D, Walsh S, Collins DM, Flanagan L, Quinn C, Corkery B, et al. Src: a potential target for the treatment of triple-negative breast cancer. *Ann Oncol.* 2011;22(10):2234–40.

Fornier MN, Morris PG, Abbruzzi A, D’Andrea G, Gilewski T, Bromberg J, et al. A phase I study of dasatinib and weekly paclitaxel for metastatic breast cancer. *Ann Oncol.* 2011;22(12):2575–81.

Gholami S, Chen C-H, Lou E, De Brot M, Fujisawa S, Chen NG, et al. Vaccinia virus GLV-1h153 is effective in treating and preventing metastatic triple-negative breast cancer. *Ann Surg.* 2012;256(3):437–45.

Jeong H, Ryu Y-J, An J, Lee Y, Kim A. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer correlates with high histological grade and triple-negative phenotype. *Histopathology*. 2012;60(6B):E87–95.

Dutta B, Pusztai L, Qi Y, André F, Lazar V, Bianchini G, et al. A network-based, integrative study to identify core biological pathways that drive breast cancer clinical subtypes. *Br J Cancer*. 2012;106(6):1107–16.

Jiang Y-G, Luo Y, He D-L, Li X, Zhang L-L, Peng T, et al. Role of Wnt/beta-catenin signaling pathway in epithelial-mesenchymal transition of human prostate cancer induced by hypoxia-inducible factor-1alpha. *Int J Urol*. 2007;14(11):1034–9.

Jang G-B, Hong I-S, Kim R-J, Lee S-Y, Park S-J, Lee E-S, et al. Wnt/ β -Catenin Small-Molecule Inhibitor CWP232228 Preferentially Inhibits the Growth of Breast Cancer Stem-like Cells. *Cancer Res*. 2015;75(8):1691–702.

Takebe N, Miele L, Harris PJ, Jeong W, Bando H, Kahn M, et al. Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;12(8):445–64.

Solzak JP, Atale R, Hancock B, Radovich M. Dual PI3K and Wnt pathway inhibition is a synergistic combination against triple-negative breast cancer. 2015; Available from: https://cancerres.aacrjournals.org/content/75/15_Supplement/5340.short

Fischer MM, Cancilla B, Yeung VP, Cattaruzza F, Chartier C, Murriel CL, et al. WNT antagonists exhibit unique combinatorial antitumor activity with taxanes by potentiating mitotic cell death. *Sci Adv*. 2017;3(6):e1700090.

Gurney A, Axelrod F, Bond CJ, Cain J, Chartier C, Donigan L, et al. Wnt pathway inhibition via the targeting of Frizzled receptors results in decreased growth and tumorigenicity of human tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(29):11717–22.

Matsuda Y, Schlange T, Oakeley EJ, Boulay A, Hynes NE. WNT signaling enhances breast cancer cell motility and blockade of the WNT pathway by sFRP1 suppresses MDA-MB-231 xenograft growth. *Breast Cancer Res*. 2009;11(3):R32.

Sekita T, Yamada T, Kobayashi E, Yoshida A, Hirozane T, Kawai A, et al. Feasibility of Targeting Traf2-and-Nck-Interacting Kinase in Synovial Sarcoma. *Cancers* [Internet]. 2020;12(5). Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers12051258>

Carneiro BA, El-Deiry WS. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2020;17(7):395–417.

Inao T, Iida Y, Moritani T, Okimoto T, Tanino R, Kotani H, et al. Bcl-2 inhibition sensitizes triple-negative human breast cancer cells to doxorubicin. *Oncotarget*. 2018;9(39):25545–56.

Lucantoni F, Lindner AU, O'Donovan N, Düsselmann H, Prehn JHM. Systems modeling accurately predicts responses to genotoxic agents and their synergism with BCL-2 inhibitors in triple negative breast cancer cells. *Cell Death Dis*. 2018;9(2):42.

Rahman M, Pumphrey JG, Lipkowitz S. The TRAIL to targeted therapy of breast cancer. *Adv Cancer Res*. 2009;103:43–73.