

MELEK ARU

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2023



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

GALEKTİN-3 GEN VARYANTLARININ VE SERUM
DÜZEYLERİNİN MEME KANSERİ HASTALARDA
ARAŞTIRILMASI

MELEK ARU

DANIŞMAN
PROF.DR. İLHAN YAYLIM

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP PROGRAMI

İSTANBUL-2023

İTHAF

Beyzam'a ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar DETAE (Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü) Moleküler Tıp A.D. kurucu ve emekli Öğretim Üyesi Prof. Dr. Turgay İşbir'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca danışmanlığımı yapan ve desteğini esirgemeyen değerli Hocam İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar DETAE Moleküler Tıp A.D. Başkanı Prof. Dr. İlhan Yaylım'a ve Moleküler Tıp A.D. tüm Öğretim Üyeleri ve Çalışanlarına,

Tezim için gereken hasta numunelerinin sağlanması ile klinik değerlendirme sürecindeki destek ve katkılarından dolayı Prof. Dr. Soykan Arıkan ve Doç. Dr. Nihat Aksakal'a,

Tez çalışmalarım süresince göstermiş oldukları anlayış ve destekleri için değerli yöneticilerim İSÜ Tıp Fak. Dekanı Prof. Dr. Mustafa Ayberk Kurt ve Dekan Yardımcısı Prof. Dr. Ozan Özkaya'ya,

Yüksek Lisans tezimin yapım ve yazım sürecindeki yardım ve destekleri için, Öğr.Gör. M.Tolgahan Hakan'a, Dilara Sönmez'e, İslim Kaleler'e, PhD. Şeyda Demirkol'a ve PhD. Saime Turan Sürmen'e,

Yıllar sonra yüksek lisansa başlamamda çok büyük katkısı olan, her zaman bilgisi ve tecrübelerinden feyz aldığım can dostum Tıbbi Biyokimya Uzmanı Hümeysra Öztürk Emre'ye,

Destek ve sevgileriyle her zaman yanımda olan ve hayatıma anlam katan, annem Nuray Atan, ablam Dilek Atan, sevgili eşim Hüseyin Aru ve biricik canım kızım Beyza Aru'ya yürekten teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 38792

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xi
ÖZET	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Memenin Anatomik, Histolojik ve Fizyolojik Yapısı.....	3
2.2. Meme Kanseri.....	4
2.2.1. Meme Kanseri Epidemiyolojisi	5
2.2.2. MK nin Risk Faktörleri	6
2.2.2.1. Kadın Cinsiyet.....	7
2.2.2.2. Cins ve Irk	7
2.2.2.3. Aile Öyküsü	8
2.2.2.4. Beslenme Tarzı ve Obezite	8
2.2.2.5. Hormonların Etkisi.....	9
2.2.2.6. Doğurganlık.....	9
2.2.2.7. Yaşlılık	9
2.2.3. Meme Kanseri ve Sınıflandırma	10
2.2.4. Meme Kanseri ve Evreleri	12
2.2.5. Meme Kanseri ve İlişkili Sinyal Yolakları	13
2.2.5.1. Meme Kanseri ve Wnt Sinyal Yolağı	16
2.2.5.2. Meme Kanseri ve Siklin Kinazlar	17
2.2.5.3. Meme Kanseri ve Notch Sinyal Yolağı	18
2.2.5.4. Meme Kanseri ve Hedgehog (HH) Sinyal Yolağı	20
2.2.5.5. ER (Östrojen Reseptörü) Sinyal Yolu ve ER-Pozitif Meme Kanseri	23
2.2.5.6. HER2 Sinyal Yolu ve HER2-Pozitif Meme Kanseri	24
2.2.5.7. Meme Tümörü Kinazı (BRK)	25

2.2.5.8. NF- κ B Sinyal Yolu ve Meme Kanseri	26
2.2.6. Meme Kanseri Prognostik Biyobelirteçler	28
2.2.6.1. Östrojen Reseptörü	28
2.2.6.2. Progesteron Reseptörü	28
2.2.6.3. HER2	28
2.2.6.4. Antijen Ki-67	28
2.2.6.5. Mib1	29
2.2.6.6. E-Kaderin	29
2.2.6.7. Dairesel RNA	29
2.2.6.8. P53	30
2.2.6.9. mikroRNA	30
2.2.7. Meme Kanseri Metastazı	30
2.2.7.1. Meme Kanserinin Kemik Metastazı Aşamaları	32
2.2.7.1.1. İnvazyon	32
2.2.7.1.2. Migrasyon (Göç)	33
2.2.7.1.3. Adhezyon (Yapışma)	33
2.2.7.1.4. Hayatta kalma	33
2.2.8. Meme Kanseri Nüksü	34
2.2.9. Meme Kanseri Tedavi Seçenekleri	35
2.2.9.1. Ameliyat	35
2.2.9.2. Kemoterapi	35
2.2.9.3. Radyasyon Tedavisi	36
2.2.9.4. İmmünoterapi	36
2.2.9.5. Endokrin (Hormonal) Tedavi	38
2.2.9.6. Hedef Odaklı Tedaviler	38
2.2.9.7. Meme Kanseri Kombinasyon Tedavileri	39
2.3. Gen Polimorfizmi ve Kanseri İlişkisi	41
2.4. Galektinlerin Yapısı ve Sınıflandırılması	42
2.4.1. Galektin-3	43
2.4.2. Karsinogenez ve Galektin-3 İlişkisi	44
3. GEREÇ VE YÖNTEM	49
3.1. Gereçler	49

3.1.1. Çalışılan Numunelerin Seçilmesi ve Saklanması.....	49
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	49
3.1.3. Kullanılan Kimyasal ve Kitler	50
3.1.4. Kullanılan Tampon Solüsyonları ve Çözeltiler.....	50
3.1.4.1. DNA İzolasyonu ve Kullanılan Solüsyonlar.....	50
3.1.4.1.1. Lysis Buffer - Eritrosit Parçalama Solüsyonu	50
3.1.4.1.1.1. 1 N NaOH çözeltisinin hazırlanışı	50
3.1.4.1.1.2. 0,5 M EDTA çözeltisinin Hazırlanışı	50
3.1.4.1.1.3. Eritrosit Parçalama Tamponunun Hazırlanışı.....	51
3.1.4.1.2. Lökositleri Parçalama Tamponu.....	51
3.1.4.1.2.1. 4 M Sodyum Klorür (NaCl) Çözeltisi.....	51
3.1.4.1.2.2. 0,5 M EDTA çözeltisinin Hazırlanışı	51
3.1.4.1.2.3. Lökositleri Parçalama Tamponu (WBL) hazırlanışı.....	52
3.1.4.1.3. Proteinaz K	52
3.1.4.1.4. Amonyum Asetat Hazırlanması.....	52
3.1.4.1.5. SDS	52
3.1.4.1.6. Tris Tamponu.....	52
3.1.4.1.7. Tris EDTA	53
3.1.4.1.8. 5 X TBE Hazırlanışı	53
3.1.4.2. Elektroforezde Kullanılan Solüsyonlar,Tamponlar ve Çözeltiler	53
3.1.4.2.1. Yükleme Tamponu	53
3.1.4.2.2. Etidyum Bromür	53
3.1.4.2.3. 5X TBE Hazırlanışı	53
3.2. Yöntemler	54
3.2.1. DNA izolasyonu (Tuzla Çöktürme).....	54
3.2.2. DNA'nın Konsantrasyon Tayini ve Saflık Kontrolü	55
3.2.3. PZR-Polimeraz Zincir Reaksiyonu	55
3.2.3.1. Galektin-3 Gen Bölgelerinin (rs4644 ve rs4652) PZR İle Çoğaltılması.....	55
3.2.3.1.1. Gal-3 Gen Bölgelerinin Çoğaltılması İçin Gereken Primer Dizileri	55
3.2.3.1.2. PZR'da Kullanılan Kimyasal ve Çözeltiler	56
3.2.3.1.3. PZR Şartlarının ve Karışımının Hazırlanışı.....	56
3.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi	57
3.2.4.1. Elektroforez Yöntemi İçin Gerekli Malzemeler	57

3.2.4.1.1. Stok Tampon Hazırlanışı	57
3.2.4.1.2. Yükleme Tamponu	57
3.2.4.1.3. AgaroZ Jel Hazırlanışı (% 2).....	57
3.2.4.2. Galektin-3 PZR Ürünlerini Jelde Yürütmek İçin Yapılan Yükleme İşlemi.	58
3.2.4.3. Galektin-3 rs4644 ve rs4652 Gen Polimorfizmlerinin Kontrol Edilmesi	58
3.2.5. Restriksiyon Fragmanı Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) Yöntemi.....	58
3.2.5.1. Gen Polimorfizmlerinin Enzimlerle Kesim İşlemleri	59
3.2.5.1.1. rs4644/Gal-3 Gen Polimorfizminde Kullanılan Kimyasallar/Enzimler	59
3.2.5.1.2. rs4652/Gal-3 Gen Polimorfizminde Kullanılan Kimyasallar/Enzimler	59
3.2.5.1.3. rs4644/ Gal-3 Gen Polimorfizmi Yorumlanması.....	59
3.2.5.1.4. rs4652 / Gal-3 Gen Polimorfizmi Yorumlanması.....	59
3.2.6. ELISA Yöntemi	60
3.2.6.1. sGal-3 Seviyesinin ELISA ile Tespiti	60
3.2.7. İstatistiksel Analizler.....	60
4. BULGULAR.....	61
4.1. İstatistiksel Veriler Sonrasındaki Bulgular	61
4.2. PZR Ürünlerinin Bulguları	64
4.2.1. Gal-3 PZR Ürünlerinin Bulguları	64
4.2.1.1. Gal-3 rs4644 C>A Polimorfizmine Ait Bulgular.....	64
4.2.1.2. Gal-3 rs4652 A>C Polimorfizmine Ait Bulgular.....	65
4.3. Haplotipleme Analizi	69
4.4. sGal-3 Düzeylerinin Sonuçları.....	71
5. TARTIŞMA	73
KAYNAKLAR	76
HAM VERİLER	105
FORMLAR	107
PATENT HAKKI İZNİ	108
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	109

TABLolar LİSTESİ

- Tablo 2-1.** Meme kanserinin değıştirilebilen ve değıştirilemeyen risk faktörleri
- Tablo 2-2.** Kadın kanserlerinde SHH yollarını hedefleyen klinik araştırmalar
- Tablo 2-3.** Kemoterapide tedavisinde kullanılan güncel ilaçların etki mekanizmaları
- Tablo 2-4.** İmmünoterapi tedavisinde kullanılan güncel ilaçların etki mekanizmaları
- Tablo 2-5.** Hormon/Endokrin tedavide kullanılan güncel ilaçlar ve etki mekanizmaları
- Tablo 2-6.** Hedef odaklı tedavide kullanılan güncel ilaçlar ve etki mekanizmaları
- Tablo 3-1.** Galektin-3 İçin PZR karışımında kullanılan malzemeler
- Tablo 3-2.** Galektin-3 gen polimorfizmleri için PZR koşulları
- Tablo 4-1.** MK hastalarındaki klinik ve patolojik parametrelere göre dağılım
- Tablo 4-2.** MK hasta ve SK grubu Gal-3 gen polimorfizmlerinin allel ve genotip dağılımları
- Tablo 4-3.** Gal-3 genotiplerinin klinik parametrelere göre dağılımı
- Tablo 4-4.** rs4644 c>Ave rs4652 polimorfizmlerine ait haplotip frekansları, X^2 ve p değerleri
- Tablo 4-5.** MK hasta ve SK grubunda Galektin-3 serum düzeyleri (ng/ml)

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1. Memenin Anatomisi

Şekil 2-2. Dünya'daki her yaştan kadınların 2020 yılındaki kanser vaka sayısı

Şekil 2-3. Meme kanseri tarihsel karakterizasyonu

Şekil 2-4. Memenin Histolojik ve Moleküler Tipleri

Şekil 2-5. Analiz edilen moleküler alt tipler dahil olmak üzere kohorttaki kanser türlerinin dağılımı (9.125 kanser numunesi)

Şekil 2-6. Sinyal yollarındaki değişim frekansları

Şekil 2-7. Kanonik Wnt/ β -katenin sinyal yolu

Şekil 2-8. Meme kanseri ile ilişkili Notch sinyal yolağı inhibitörü 3-O-(E)-p-Coumaroylbetulinic Asit'in etki mekanizması

Şekil 2-9. Meme kanseri türlerinde Notch sinyal inhibitörlerinin etkileri

Şekil 2-10. TNBC'de Hedgehog sinyal aktivasyonu: ligand bağımlı ve ligand bağımsız mekanizmaların etkileşimi

Şekil 2-11. ER sinyal yolağı ve reseptör-ligand ilişkisi

Şekil 2-12. HER2 sinyal yolunun meme kanseri gelişimi için aktif hale getirdiği diğer sinyal yolları

Şekil 2-13. BRK'nın ilgili sinyal yollarıyla etkileşimlerinin şematik gösterimi

Şekil 2-14. Kanonik ve kanonik olmayan NF- κ B yolları

Şekil 2-15. Meme kanseri EMT ve metastaz aşamalarının şematik gösterimi

Şekil 2-16. Meme kanseri tedavisinde kullanılan HER reseptör-ligand ilişkisi

Şekil 2-17. Meme kanserinde kullanılan güncel ilaç kombinasyon tedavilerinin şematik gösterimi

Şekil 2-18. Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) şematik gösterimi

Şekil 2-19. Galektinlerin tipleri ve membrana bağlanma şekilleri

Şekil 2-20. Galektin-3'ün yapısı ve galektin-3 dimerizasyonunun monomerik yapısının, bağlayıcı ligandın yokluğunda C-terminali yoluyla ve karbonhidrat bağlayıcı ligandların varlığında N-terminali yoluyla polimerizasyonun şematik temsiller

Şekil 2-21. Galektin-3'ün çeşitli kanser türlerindeki değişimler

Şekil 2-22. Gal-3 serum düzeylerinin çeşitli kanser türlerinde yükseldiğini gösteren grafikler

Şekil 3-1. Gal-3 gen polimorfizmlerinin (rs4644) jel görüntüsü

Şekil 3-2. Gal-3 gen polimorfizmlerinin (rs4652) jel görüntüsü

Şekil 4-1. StyI enzimi ile kesilen PZR ürünlerinin jel görüntüsü

Şekil 4-2. BsaWI enzimi ile kesilen PZR ürünlerinin jel görüntüsü

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

MK	: Meme Kanseri
SK	: Sağlıklı Kontroller
GAL-3	: Galektin-3
LGALS3	: Galektin-3 kodlayan gen
sGal-3	: Galektin-3 serum düzeyleri
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi
BRCA1/BRCA2: Breast Cancer Susceptibility-Meme Kanseri Duyarlılık Genleri	
BCSC	: Meme kanseri kök hücreleri
TCGA	: The Cancer Genome Atlas Program
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
TNBC	: Triple-negative breast cancer-Üçlü negatif meme kanseri
HER2	: Epidermal büyüme reseptörü-2
ER	: Östrojen reseptörü
PR	: Progesteron reseptörü
HR	: Hormon reseptörü
NF κ B	: Nükleer faktör kappa B
HIF-1 α	: Hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa
TNM	: T- N - M evreleme sistemi
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EMT	: Epitelyal-Mezenkimal Geçiş
EMT-TF	: Epitelyal-Mezenkimal Geçiş Transkripsiyon Faktörleri
PFS	: Progression-free survival-İlerlemesiz sağkalım
ECM	: Ekstraselüler Matriks
CXCL12	: C-X-C kemokin ligand 12
CXCR4	: C-X-C kemokin reseptörü tip 4
PD-1/PD-L1	: Programlı hücre ölümü-1/Programlı ölüm ligand-1
CTLA-4	: T-lenfosit ile ilişkili protein 4
RFLP	: Restriksiyon Fragmanı Uzunluk Polimorfizmi
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ELISA	: Enzim bağlantılı İmmünosorbent deneyi
NH ₄ Cl	: Amonyum klorür
KHCO ₃	: Potasyum bikarbonat
gr	: Gram
ml	: mililitre
L	: Litre
mg	: miligram
ng	: nanogram



ÖZET

Aru M. Galektin-3 Gen Varyantlarının ve Serum Düzeylerinin Meme Kanseri Hastalarda Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp A.D. Yüksek Lisans. İstanbul. 2023.

Meme kanseri kadında en çok görülen kanser türü olup, kanserden ölümlerin başlıca nedenidir. GLOBOCAN 2020 verilerine göre dünyada 2,3 milyon yeni vaka ile şu anda en yaygın teşhis edilen kanserlerden biridir. Galektinler meme morfogenezinde rol oynar ve tüm dokularda eksprese edilirler. Galektin-3'ün SNP'leri ile MK ne ait risk ve progresyonu arasında bilgi eksikliği tespit edilmiştir. Bu sebeple çalışmamızda, meme kanseri 76 hasta ve 50 sağlıklı kontrolde Gal-3 genindeki rs4644 ve rs4652 SNP lere ait genotip frekansları ve çalışma gruplarındaki serum Gal-3 düzeyleri arasındaki olası ilişkiyi saptamayı ve hastalığın riski, prognozu üzerine olası etkilerini, hastalık klinik ve patolojik parametrelerle birlikte incelemeyi amaçladık. Çalışmamızda, hasta ve kontrol gruplarının DNA örneklerinden RFLP yöntemi ile SNP (rs4644 ve rs4652) genotipleme yapılmış ve ELISA ile serum örneklerindeki Galektin-3 seviyeleri tespit edilmiştir. Çalışmamız sonucunda, Gal-3 rs4644 hasta grubunda CC genotipi frekansı (%5,3) sağlıklı kontrol grubuna (%50) göre daha düşük olduğu gözlemlenmiştir ve aradaki fark istatistiksel olarak çok ileri derecede anlamlıdır ($p<0,001$; OR=0.105; 95% CI=0.039-0.284). Ayrıca meme kanseri hasta grubunda CA genotipi frekansı (%82,9) ise kontrol grubuna (%34) göre istatistiksel çok ileri düzeyde anlamlı ve yüksek bulunmuştur ($p<0,001$; OR=2,438; 95% CI=1,635-3,635). rs4644 için allel dağılımına bakıldığında ise, C allelinin MK hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre değerlendirildiğinde istatistiksel ileri düzeyde anlamlı olarak düşük frekansta olduğu saptanmıştır ($p=0,015$). Galektin-3 rs4652 genotipi açısından incelendiğinde MK hasta ve SK grubu arasındaki allel ve genotip dağılımında istatistiksel bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$). Göze çarpan bir bulgu olarak, rs4652 e ait CC genotipinin hasta grubunda (%27,6) sağlıklı kontrol grubuna (%14) göre istatistiksel anlamlılığa yakın olarak yüksek frekansta olduğu gözlemlenmiştir ($p=0,072$). Hastaların sGal-3 düzeyleri SK ile karşılaştırıldığında MK hastalarında sGal-3 düzeyleri SK e göre yüksek bulunmuş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Bu sonuçlar, Gal-3 varyasyonlarının, meme kanseri gelişim ve progresyon süreçlerinde rol oynayabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler : Galektin-3, meme kanseri, polimorfizm, RFLP, Elisa

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 38792



ABSTRACT

Aru M. Investigation of Galectin-3 Gene Variants and Serum Levels in Breast Cancer Patients. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Molecular Medicine. Master Degree. İstanbul. 2022.

Breast cancer is the most common type of cancer in women and is the main cause of death from cancer. It is currently one of the most commonly diagnosed cancers, with 2.3 million new cases worldwide, according to GLOBOCAN 2020 data. Galectins are involved in mammary morphogenesis and are expressed in all tissues. There was a lack of information between the SNPs of galectin-3 and the risk and progression of MC. Therefore, in our study, we aimed to determine the possible relationship between the genotype frequencies of rs4644 and rs4652 SNPs in the Gal-3 gene in 76 breast cancer patients and 50 healthy controls and the serum Gal-3 levels in the study groups and their possible effects on the risk and progression of the disease, and to analyze the clinical and pathological parameters of the disease. We aimed to review together in our study, SNP (rs4644 and rs4652) genotyping was performed with RFLP management from DNA samples of patient and control groups, and Galectin-3 levels in serum samples were determined by ELISA. As a result of our study, it was observed that the frequency of CC genotype (5.3%) in Gal-3 rs4644 patient group was lower than that of the healthy control group (50%), and the difference was statistically very significant ($p < 0.001$; OR=0.105; 95% CI=0.039-0.284). In addition, the frequency of CA genotype in the breast cancer patient group (82.9%) was statistically very significant and higher than the control group (34%) ($p < 0.001$; OR=2.438; 95% CI=1.635-3.635). When the allele distribution for rs4644 was examined, it was found that the C allele was at a significantly lower frequency in the MC patient group when compared to the healthy control group ($p = 0.015$). When galectin-3 was analyzed in terms of rs4652 genotype, no statistical difference was found in genotype and allele distribution between breast cancer patient group and healthy control group ($p > 0.05$). As a striking finding, the CC genotype of rs4652 was observed to be at a higher frequency in the patient group (27.6%), close to statistical significance, compared to the healthy control group (14%) ($p = 0.072$). When the sGal-3 serum levels of the patients were compared with the healthy control group, sGal-3 levels were found to be higher in MC patients than in the healthy control group, and it was not statistically significant

($p>0.05$). These conclusions suggest that galectin-3 variations likely play a role in breast cancer development and progression.

Key Words: Breast cancer, Galectin-3, polymorphism, RFLP, Elisa

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 38792



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, kalp hastalıklarından sonra ölüm sebebi 2.sırada gelen önemli bir global halk sağlığı sorunudur¹. DSÖ tarafından kanser istatistikleri en son 2020'de kamuoyu ile paylaşılmış ve bu verilere göre kanser vakaları gün geçtikçe hızla artmaktadır. 2020 verilerine göre 84.339.067 nüfuslu Türkiye'de 233.834 kişi kanser tanısı almış, bunun 132.816 sı erkeklerde olup % 56,6 oranında, 101.018 i ise kadınlardadır ve % 43,4 oranında olduğu belirtilmiştir. 101.018 yeni kanser tanısı almış kadının %23.9 u yani 24.175 kadın meme kanserine yakalanmış olup kanserler arasında ilk sırada yer almaktadır².

Global olarak her iki cinste de en fazla görülen kanser çeşidi akciğer kanseridir ancak kadınlarda en sık görüleni meme kanseridir^{2,3}. 2020'de tahmini olarak 19,3 milyon yeni vaka tespit edilmiştir ve meme kanseri tüm kanserlerin %11.7'sini oluşturmaktadır⁴. Bu yüksek insidans, bu hastalığın tedavisinin karmaşıklığı ve ekonomik maliyetleri de düşünürsek meme kanserini toplumdaki en önemli sağlık sorunlarından biri haline getirmektedir.

Evrimsel olarak korunmuş bir glikan bağlayıcı protein ailesi olan Galektinler, bağışıklık hücreleri, endotel hücreleri ve fibroblastlar dahil olmak üzere kanser veya stromal hücrelerde hücre içi ve hücre dışı sistemleri yeniden düzenleyerek tümörün ilerlemesinde geniş bir etkiye sahiptir⁵. Galektin-3'ün çok çeşitli kanser hücresi aktivitelerinin önemli bir düzenleyicisi olduğu ve kanser hücresi büyümesi, transformasyonu, apoptoz, anjiyogenez, adezyon, istila ve metastazda önemli roller oynadığı giderek daha fazla kabul edilmektedir. Galektin-3, üçlü negatif meme kanserlerinde nispeten yüksek bir ifade düzeyine sahiptir ve bu hastalık için potansiyel bir belirteçtir. Galektin-3, integrin olmayan β -galaktosit bağlayıcı lektin familyasının 30 kD'lik bir proteindir ve adhezyon, göç, büyüme, döngünün düzenlenmesi, apoptoz ve hücrel onarımı gibi birçok süreçte rol oynar⁶⁻⁸. Gal-3'ün bir çalışmada, TNC meme kanserinin diğer meme kanserlerine kıyasla daha yüksek seviyelerde eksprese edildiği⁹ ve meme kanseri hücrelerinde nitrik oksit neden olduğu apoptozu önlediği¹⁰ gösterilmiş, bu da meme kanseri gelişiminde ve meme kanseri gelişiminde rolü olduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte, meme kanserinde galektin-3 ekspresyonunun klinik ve prognostik etkileri hala belirsizliğini koruyor¹¹.

Çeşitli kanser türleri ile ilişkili çok sayıda gen, tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) içerir. SNP'ler gen promotörlerinde, ekzonlarda, intronlarda ve 5' ve 3' çevrilmemiş bölgelerde bulunurken gen ekspresyonunu da farklı mekanizmalarla etkiler¹². SNP'ler, insan genomunda bulunan en sık varyasyonlardan biridir. Klinik bir perspektiften bakıldığında, SNP'ler kanser için tanısal biyobelirteçlerdir¹³.

Meme kanseri ile bağlantılı olabilecek genetik polimorfizmler, popülasyonda yüksek penetrasyonlu kansere yatkınlık genlerinden çok daha yaygındır¹⁴. Bu çalışmamızda bir biyobelirteç adayı olarak düşündüğümüz Galektin-3 genine ait polimorfizmleri araştırmayı amaçlıyor, meme kanserinin teşhisine ve tedavisine büyük katkı sağlayacağına inanıyoruz.

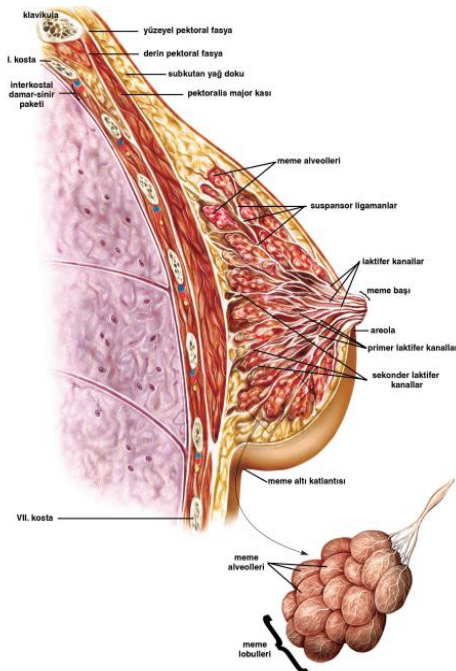


2. GENEL BİLGİLER

Meme ile ilgili hastalıkları, patolojisini ve tedavi süreçlerini iyi anlayabilmek için öncelikle memenin anatomisi, histolojisi ve fizyolojisi hakkında bilgi edinmek gerekir.

2.1. Memenin Anatomik, Histolojik ve Fizyolojik Yapısı

Memeler göğüs kafesinin ön ve kısmen yan taraflarında bulunur. Her meme üstte ikinci kaburgaya, altta altıncı kaburga kırırdağına, medialde sternuma ve lateralde midaksiller çizgiye uzanır¹⁵. Pektoralis majör kası, yaşamın erken dönemlerinde ikinci ve altıncı kaburga arasında uzanmasına rağmen memeler olgunlaşıp büyüdükçe bu kas altıncı kaburganın altına kadar uzanır ve memenin tabanını oluşturur^{16,17}. Pektoralis major, ön göğüs duvarının en üstündeki en büyük kası olup meme dokusunun altında uzanan ve aksillanın ön duvarını oluşturan kalın, yelpaze şeklinde bir kastır. Meme, Cooper bağları ile pektoralis majör kasının fasyasına bağlı olup, bu bağlar esnek olduğundan memenin hareket etmesine izin verir¹⁸. Meme bezinin üst lateral kısmı, pektoralis majörünün alt sınırı boyunca aksillaya doğru uzanır ve Spence'in aksiller kuyruğunu oluşturur¹⁹. Meme başı-areola kompleksi (NAC), nullipar kadınlarda dördüncü ve beşinci kaburgalar arasında yer alır. Meme ucuna 15-20 adet süt kanalı açılır²⁰ (Şekil 2-1). Hem meme başı hem de areola, yoğun bazal melanin birikimi ile keratinize çok katlı yassı epitelden oluşur. Melanositler meme başı ve areolanın derisinde oldukça fazladır ve bu onlara memenin geri kalanından daha koyu bir renk verir²¹.



İnsanda meme dokusu, fetal yaşamın yaklaşık 5-6. haftasında gelişmeye başlar. Tek bir ektodermal tomurcuktan ilerler ve aksilladan pelvise uzanan süt çizgileri adı verilen kalınlaşmış ektodermin uzunlamasına bantlarında embriyonun ventral tarafı boyunca gelişmeye başlar. Sekizinci haftanın sonunda kalınlaşan beyaz çizgiden ilkel meme oluştuğundan sonra olgun meme oluşur. Embriyogenez boyunca, bazal hücrelerin proliferasyonu sonucunda yaklaşık 30. haftada, papiller torbanın tıkanması ile

Sekil 2-1. Memenin anatomisi⁸

meme başı areolar kompleksinin oluşur. Nihai meme ucu yaklaşık 38 ila 40. hafta arasında ortaya çıkmaktadır^{16,22}.

Memenin büyük bir kısmı glandüler (süt üreten) ve yağ dokusundan oluşur. Yağın salgı bezine oranı yaşa, menopoz sonrası, doğum sonrası veya hamilelik durumuna bağlı olarak değişir. Menopoz başlangıcında, östrojen seviyelerindeki düşüş, glandüler dokuda azalmaya ve yağ dokusunda bir artışa neden olur^{17,23}. Meme bezi, memelilere özgü olup süt üreten ektodermal kökenli bir organdır. Meme bezinin iç yapısı, sütün yapıldığı, meme ucuna giden kanallara bağlanan lobüllerden oluşan epitelyal bileşenlerden oluşur. Bu lobüller ve kanallar, memenin ana kütesini oluşturan fibröz doku ve yağ dokusu boyunca yayılırlar¹⁶. Meme bezi, interlobüler yağ ve fibröz doku ile birlikte terminal duktal-lobüler üniteler (TDLU'lar) olarak adlandırılan bir duktal sistemden oluşur²⁴.

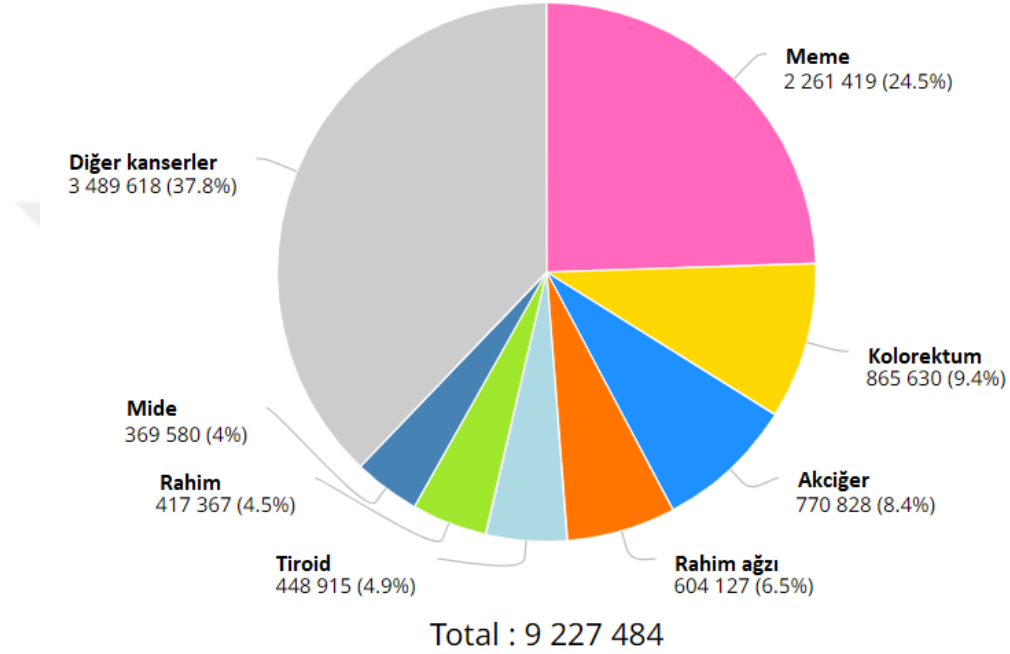
Memede luminal, miyoepitelyal ve bazal hücreler olmak üzere 3 çeşit hücre bulunur²⁵. İnsan memesinin kanalları, bir dış miyoepitelyal hücre tabakası tarafından desteklenen bir iç lümen hücreleri tabakasından oluşur. İnsan memesinin kanalları, esas olarak iki katmanlı bir yapıdaki iki hücresel elemandan oluşur: merkezi duktal boşluk etrafında polarize bir tabaka oluşturan luminal epitel hücreleri ve bazal membran ile luminal epitel tabakası arasında konumlanan miyoepitelyal hücreler. Bu miyoepitelyal hücreler, lümen hücrelerinin doğru polaritesi için gerekli olan hücre dışı matriks bileşenlerini salgılar ve ayrıca sütü duktal kanallar boyunca ilerletmek için laktasyon sırasında kasılır^{26,27}. Erken evre duktal karsinom in situ'da, kanserli lümen hücreleri sağlam bir miyoepitelyal tabaka ile duktal boşlukla sınırlıdır. Kanser gelişiminde miyoepitelyal ve luminal hücreler arasındaki ilişkiyi anlamak, yeni tedavilerin ve prognostik belirteçlerin geliştirilmesi için kritik öneme sahiptir²⁸.

2.2. Meme Kanseri

Karsinogenez, öncelikle hem genetik yatkınlıklar hem de çevresel nedenler tarafından uyarılan çok faktörlü bir süreçtir. Kansere bağlı ölümlerin sayısı her yıl rahatsız edici bir şekilde artıyor ve onları dünya çapında başlıca ölüm nedenlerinden biri yapıyor. Önemli sayıda kanserin her zaman ölümle sonuçlanması gerekmeseyse de, yaşam kalitesini önemli ölçüde düşürür ve genel olarak daha yüksek maliyetler gerektirir²⁹. MK, kadınlarda en sık görülen kanser türü olup, kanser ölümlerinin başlıca nedenidir⁴. MK'den ölüm, birincil tümörün kendisinden değil vücuttaki diğer organlara yaptığı metastaz sonucudur³⁰.

2.2.1. Meme Kanseri Epidemiyolojisi

MK, kadın sağlığını olumsuz yönde etkileyen yaygın bir hastalıktır ve kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir. Meme kanseri, GLOBOCAN 2020 verilerine göre dünya çapında tahmini 2,3 milyon yeni vaka ile şu anda en yaygın teşhis edilen kanserlerden biridir. Kadındaki tüm kanserlerin %24.5'ini ve kansere bağlı ölümlerin %6.9'unu oluşturur.



Şekil 2-2. Dünya'daki her yaştan kadınların 2020 yılındaki kanser vaka sayısı

(https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents-&population-=900&populations=900&key=total&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmssc=1&include_nmssc_other=1&half_pie=0&donut=0 Erişim tarihi: 25.10.2022)

MK, 2020'de 2.26 milyon [%95 UI, 2.24–2.79 milyon] yeni vaka ile globaldeki tüm kadınlarda en sık teşhis edilen türdür (Şekil 2-2). 2018 GLOBOCAN verileri, meme kanserinin yaşa göre standardize edilmiş insidans oranlarının İnsani Gelişme Endeksi (HDI) ile güçlü ve pozitif bir şekilde ilişkili olduğunu göstermektedir. 2020 verilerine göre standardize edilmiş insidans oranları, çok yüksek İGE ülkelerinde (100.000'de 75,6) en yüksek iken, orta ve düşük İGE ülkelerinde %200'den fazla düşüktü (100.000'de 27.8

ve 100.000'de 36,1). Küresel olarak meme kanseri, yaşa göre düzeltilmiş 13.6/100.000 oranında 684.996 ölümden [%95 UI, 675.493-694.633] sorumluydu.

2020'de meme kanseri ölüm-insidans oranı (MIR), 5 yıllık sağkalım oranlarının temsili bir göstergesi olarak küresel olarak 0.30'du³¹. Meme kanserinin klinik yaygınlığı göz önüne alındığında, gelişmiş sağlık hizmeti verilen yerlerde (Hong-Kong, Singapur, Türkiye) 5 yıllık sağkalım lokalize kanser için %89,6 ve bölgesel kanser için %75,4 idi. 1990 ve 2016 arasında meme kanseri insidansı 60/102 ülkede (örneğin Afganistan, Filipinler, Brezilya, Arjantin) iki katından fazla artarken, ölümler 43/102 ülkede (örneğin Yemen, Paraguay, Libya, Suudi Arabistan) iki katına çıkmıştır. Meme kanseri insidans oranları en yüksek Avustralya/Yeni Zelanda, Avrupa ve Kuzey Amerika'dadır.³². Mevcut tahminler, 2040 yılına kadar dünya çapında teşhis edilen yeni vaka sayısının yılda 3,2 milyona, ölüm sayısının ise 1,04 milyona ulaşacağını göstermektedir³³. Düşük ve orta gelirli ülkelerde, yaşam tarzlarının batılaşması (örneğin, gecikmiş gebelikler, emzirmenin azalması, menarşta düşük yaş, fiziksel aktivite eksikliği ve kötü beslenme) ile kanserin tespiti ve kayıtlarının daha iyi tutulması nedeniyle meme kanseri insidansının daha da artması beklenmektedir³⁴. Meme kanserinin etyopatogenezi, genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimini içerebileceği göz önüne alındığında çok karmaşıktır³⁵.

2.2.2. MK nin Risk Faktörleri

MK deki risk faktörlerinde sayı önemlidir ve hem değiştirilebilen hem de değiştirilemeyen faktörleri içerir (Tablo 2-1).

Tablo 2-1. MK deki risk faktörleri²⁹.

Değiştirilemez	Değiştirilebilir
Kadın olmak	Hormonal replasman tedavisi
Yaşlılık	Dietilstilbestrol
Aile öyküsü	Fiziksel aktivite
Mutasyonlar	Kilo/obezite

Değiştirilemez	Değiştirilebilir
İrk / etnik	Alkol alımı
Hamilelik ve emzirme	Sigara içmek
Adet dönemi ve menopoz	Yetersiz vitamin takviyesi
Memenin yoğunluğu	Işık
MK öyküsü	Sağlıksız beslenme
Diğer meme hastalıkları	Kimyasallar
Radyasyon	Uyuşturucu

2.2.2.1. Kadın Cinsiyet

Kadın cinsiyeti, öncelikle artan hormonal uyarım nedeniyle meme kanseri riskinin artmasıyla ilişkili ana faktörlerden birini oluşturur. Önemsiz östrojen seviyeleri sergileyen erkeklerin aksine, kadınların hormonlara (özellikle östrojen ve progesteron) ve ayrıca dengelerindeki herhangi bir bozulmaya karşı çok hassas olan meme hücreleri vardır. Dolaşan östrojenler ve androjenler, meme kanseri riskinin artmasıyla pozitif olarak ilişkilidir³⁶. Endojen seks hormonlarının fizyolojik seviyelerindeki değişimler, premenopozal ve postmenopozal kadınlarda meme kanseri riskinin daha yüksek olmasına neden olur; bu gözlemler Endojen Hormonlar ve Meme Kanseri İşbirlikçi Grubu (Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group) tarafından da desteklenmiştir³⁷⁻³⁹.

Erkeklerde meme kanseri nadir görülen bir hastalık olup %1'den az görülmektedir ve kadınlara göre daha ileri düzeyde iken tanı almaktadır. Erkeklerin tanı anında ortalama yaşı yaklaşık 67'dir.

2.2.2.2. Cins ve İrk

Meme kanserinden etkilenen bireyler arasında ırk ve etnik kökene ilişkin farklılıklar yaygın olarak gözlenmektedir; ancak bu fenomenle ilişkili mekanizmalar henüz anlaşılamamıştır. Genel olarak, meme kanseri insidans oranı, hispanik olmayan beyaz kadınlar arasında en yüksek olmaya devam etmektedir^{40, 41}. Buna rağmen, bu maligniteye

bağlı ölüm oranı siyahi kadınlarda önemli ölçüde daha yüksek olup, bu grup aynı zamanda en düşük hayatta kalma oranlarıyla da bilinmektedir⁴².

2.2.2.3. Aile Öyküsü

Ailede MK öyküsü, meme kanseri riskinin artmasıyla önemli ölçüde ilişkili bir faktördür. Meme kanseri teşhisi konan hastaların yaklaşık %13-19'unda, aynı durumdan etkilenen birinci derece bir akrabanın da olduğu bildirilmektedir⁴³. Ayrıca, etkilenen birinci derece akrabaların sayısı arttıkça meme kanseri riski de önemli ölçüde artmaktadır; hatta etkilenen akrabalar 50 yaşın altında olduğunda risk daha da yüksek olabilir⁴⁴⁻⁴⁶. Aile öyküsü olan hastaların tümünde meme kanseri insidansı anlamlı olarak daha yüksektir. Bu ilişki, epigenetik değişikliklerin yanı sıra potansiyel tetikleyiciler olarak hareket eden çevresel faktörler tarafından da yönlendirilir⁴⁷. Ailede yumurtalık kanseri öyküsü, özellikle de *BRCA1* ve *BRCA2* mutasyonları ile karakterize olanlar varsa, daha fazla meme kanseri yakalanma riskine neden olabilir⁴⁸.

Bazı genler, meme karsinogenezi riskinin artmasıyla bağlantılı olup otozomal dominant olarak kalıtılırlar⁴⁹. Diğer yüksek penetran meme kanseri genleri arasında *TP53*, *CDH1*, *PTEN* ve *STK11* bulunmaktadır. Artan meme kanseri riski dışında, bu tür mutasyonların taşıyıcıları yumurtalık kanserine karşı da duyarlıdır⁵⁰.

2.2.2.4. Beslenme Tarzı ve Obezite

Diyet, insan meme kanseri gelişimini hem desteklemede hem de engellemede rol oynayabilir. Bazı çalışmalarda, meme kanseri ile ilişkili diyetel yağ, et, lif ve alkol tüketimi ile fitoöstrojen, D vitamini, demir ve folat alımı gibi beslenme risk faktörleri incelenmiştir. Yapılan çalışma ile, miristoleik, erusik asitler, palmitik, margarik, linoleik asit ve stearik asitlerin alımının meme kanseri riskinde artış ile ilişkili olduğunu, trans yağ asitleri ve PUFA alımının ise meme kanseri riski ile ilişkili olmadığını bildirmiştir⁵¹. Eikosapentaenoik ve dokosaheksaenoik asitler balıktan alınan PUFA'nın MK riski ile ters orantılı olduğunu gösteren çalışma vardır⁵².

Kronik inflamasyon, obezite ile ilişkili klinik ve biyokimyasal komplikasyonlarda ve ayrıca meme tümörü biyolojisi ve nedenselliğinde önemli bir aracı olarak kabul edilmektedir. Makrofajların infiltrasyonu ile adipoz dokuda iltihaplanma, obezitenin iyi bilinen bir özelliğidir ve memedeki varlığı, meme epitel hücre dönüşümünü, kanser hücresi çoğalmasını ve istilasını artırır⁵³.

2.2.2.5. Hormonların Etkisi

Epidemiyolojik ve deneysel kanıtlar, östrojenlerin meme kanseri etiyolojisinde rol oynadığını açıkça göstermektedir. İnsanlarda meme kanseri için yerleşik risk faktörlerinin çoğu muhtemelen hormonla ilişkili yollar aracılığıyla etki eder ve dolaşımdaki östrojen konsantrasyonlarının artmasının, menopoz sonrası kadınlarda meme kanseri riskinin artmasıyla güçlü bir şekilde ilişkili olduğu bulunmuştur^{54,55}. Artan endojen östrojen konsantrasyonları, postmenopozal kadınlarda meme kanseri riskinin artmasıyla güçlü bir şekilde ilişkilidir³⁹ ve anti-östrojenler tamoksifen ve raloksifen meme kanseri insidansını azaltır⁵⁶.

2.2.2.6. Doğurganlık

Yapılan çalışmalarda, endojen hormonlara (özellikle östrojen ve progesteron) maruz kalmanın kadınlardaki MK ile bağlantısı olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, hamilelik, emzirme, ilk adet görme ve menopoz gibi olayların meydana gelmesi, süreleri ve buna eşlik eden hormonal dengesizlik, meme mikroçevresinde potansiyel kanserojen olayların indüklenmesi açısından çok önemlidir. Erken yaşta (özellikle yirmili yaşların başında) ilk tam süreli hamilelik ve ardından artan doğum sayısı, meme kanseri riskinin azalmasıyla ilişkilidir^{57,58}. Ayrıca hamileliğin kendisi potansiyel kansere karşı koruyucu etkiler sağlar⁵⁹. Yapılan bir çalışmada, hamilelik sırasında preeklampsi öyküsü olan veya preeklampşik gebelikten doğan çocukların meme kanseri geliştirme riski daha düşüktür⁶⁰. Emzirme süresinin daha uzun olması hem ER/PR pozitif hem de negatif kanser riskini azaltır⁶¹. Erken yaşta adet görme MK için bir risk faktörüdür; tümör derecesi ve lenf nodu tutulumu ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir⁶². Ayrıca, ilk adetin daha erken yaşı, genel olarak daha kötü bir prognoza neden olabilir. Aksine, doğal veya cerrahi olmasına rağmen erken menopoz meme kanseri riskini azaltır⁶³.

2.2.2.7. Yaşlılık

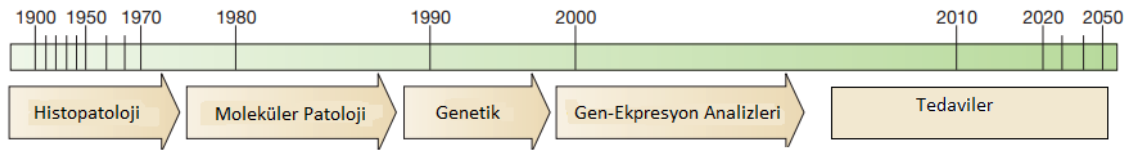
Meme kanserli hastaların yaklaşık %80'i 50 yaş üzeri, %40'tan fazlası ise 65 yaşın üzerindeki bireylerdir⁶⁴⁻⁶⁶. Meme kanseri gelişme riski, 40 yaşında %1.5, 50 yaşında %3 ve 70 yaşında %4'ten fazla oranlarda artmaktadır⁶⁷. Yapılan bir çalışmada ilginç bir şekilde, kanserin belirli bir moleküler alt tipi ile hastanın yaşı arasında bir ilişki gözlemlenmiştir. Agresif dirençli üçlü negatif meme kanseri alt tipi en sık 40 yaşın altındaki gruplarda teşhis edilirken, >70 hastalarda bu luminal A alt tipi görülmektedir⁶⁴. Genel olarak ileri yaşlarda kanserin ortaya çıkması sadece meme kanseri

için geçerli değildir. Çok sayıda hücreyel değişimin birikmesi ve potansiyel karsinojenlere maruz kalma sebebiyle yaşlılık karsinogenezin artmasına neden olur²⁹.

2.2.3. Meme Kanseri ve Sınıflandırma

Meme kanseri sınıflandırılmasında histoloji, moleküler patoloji, genetik ve gen ekspresyon analizi dahil olmak üzere çeşitli yaklaşımlar vardır²⁸. Meme kanserinin alt tiplendirilmesi, tedaviye yanıtın ve prognoz tahmin edilmesini sağlayabilir. Meme kanserinin alt tipleri, normal meme bezinde bulunan farklı kök hücre ve progenitör hücre popülasyonlarından kaynaklanabilir⁶⁸.

Meme kanserlerini alt tiplere ayırmanın nedeni, tümör davranışları (örneğin metastaz yapma eğilimi) ile ilgili prognostik bilgi verip vermediğini veya çeşitli terapilere yanıt tahmin etmektir. Alt tiplendirme yöntemleri arasında standart histopatoloji, moleküler patoloji, genetik analiz ve gen ekspresyonu profillemesi çeşitleri bulunur (Şekil 2-3).



Şekil 2-3. Meme kanseri alt tiplerinin tarihsel karakterizasyonu ⁶⁸

Meme kanseri kendine has moleküler, histopatolojik ve klinik özellikler içeren bir grup hastalıktan oluşur. Meme kanserinin genetik, epigenetik ve transkriptom değişiklikleri nedeniyle farklı histolojik ve biyolojik özelliklere sahip, klinik bulguları ve tedavi yanıtları farklı, birden çok etkene bağlı olan heterojen bir hastalık olduğu açıktır. Bu fenotipik farklılık meme kanseri tanısını, tedavisini ve dolayısıyla prognozu etkilemektedir⁶⁹. MK nin morfolojik çalışmalarında, tümörün epitel katmanıyla sınırlı olup olmadığını ve çevresindeki stromayı istila edip etmediğini anlamalıyız. Meme kanseri bazal membran ile ilişkisine göre invaziv veya non-invaziv olabilir. Memenin noninvaziv kanserleri genelde lobüler karsinoma in situ (LCIS) ve duktal karsinoma in situ (DCIS) olmak üzere iki tipe ayrılır (Şekil 2-4).

Üçlü negatif MK (TNBC), HER2 (-) PR (-) ER (-) şeklinde karakterize edilen heterojen bir meme kanserleri topluluğudur. Tüm meme kanserlerinin yaklaşık %20'sini oluştururlar. BRCA1 germ hattı mutasyonunda ortaya çıkan meme kanserlerinin çoğunluğu (yaklaşık %80) TNBC iken, tüm TNBC'nin %11-16'sı BRCA1 veya BRCA2 germ hattı mutasyonlarını barındırır. TNBC biyolojik olarak agresif olma eğilimindedir ve genellikle daha kötü bir prognozla ilişkilidir. TNBC'de görülen en yaygın histoloji infiltrate duktal karsinomdur⁷⁷. Üçlü negatif meme kanseri (TNBC), hızla büyüyen yayılması, sınırlı tedavi seçenekleri ve tipik olarak daha kötü prognozu olması nedeniyle diğer invaziv meme kanseri türlerinden farklıdır. TNBC östrojen veya progesteron reseptörlerini eksprese etmediğinden ve çok az insan epidermal büyüme faktörü reseptörü (HER2) proteini mevcut olduğundan veya hiç bulunmadığından, hormon tedavisi ve HER2'yi hedefleyen ilaçlar yardımcı olmaz.

Claudin-düşük (CL) meme kanserleri, çoğunlukla ER-negatif, PR-negatif ve HER2-negatif olan kötü prognozlu tümörlerdir. CL tümörleri, tüm invaziv meme kanserlerinin %7-14'ünü oluşturur⁷⁸.

2.2.4. Meme Kanseri ve Evreleri

Meme kanserinin evrelemesi için en sık kullanılan sistem, TNM Amerikan Kanser Komitesi'nin sistemidir. AJCC Evreleme Kılavuzu'nun 7.baskısı, klinik ve patolojik değerlendirmelere dayalı olarak primer tümör boyutunu (T), nodal tutulumu (N) ve metastazı (M) kullanan tamamen anatomik bir evreleme yöntemi idi. Hala güncel olan AJCC Evreleme Kılavuzu'nun 2018' deki 8.baskısında ise, tümör biyolojisindeki ve Ki-67, ER, HER2/neu ve PR gibi prognostik biyolojik belirteçlerdeki gelişmeler, klinisyenlerin benzer şekilde evrelenen hastaların neden önemli ölçüde farklı sonuçlara sahip olduğunu anlamalarına olanak sağlamıştır. Evreleme sistemine yapılan en son güncelleme, prognozun daha iyi tahmin edilmesi için moleküler belirteçleri hastalık boyutuyla bütünleştirir. Bu değişiklik meme kanseri hastalarının prognozunu iyileştirmekte ve doktorları tedavilerin planlanmasında daha iyi bilgilendirmektedir⁷⁹. Meme kanseri evresini belirleme süreci, tümör gelişiminin birkaç önemli parametresine sahiptir: büyüklüğü, çevre dokuya dağılımı, memedeki veya çevresindeki lenf bezlerine yayılıp yayılmadığı, diğer organlara yayılıp yayılmadığı. Bu verilere göre evre ve tedavi stratejisi belirlenir. Hayatta kalma oranı her zaman 5 yıl önce kanser tedavisi görmüş kişilerin gözlemlerine dayanarak hesaplanır⁸⁰.

Ocak 2018'de yürürlüğe giren en son AJCC sistemi, MK klinik ve patolojik evreleme özelliklerini içerir:

- Patolojik (cerrahi aşama): Çıkarılan dokunun incelenmesi,
- Ameliyat yapılması mümkün değilse, klinik bir aşama verilir . Bu, fizik muayene, biyopsi ve görüntüleme testlerinin sonuçlarına dayanmaktadır. Klinik aşama, tedavinin planlanmasına yardımcı olmak için kullanılır.

Her iki evreleme sisteminde de 7 temel bilgi kullanılır:

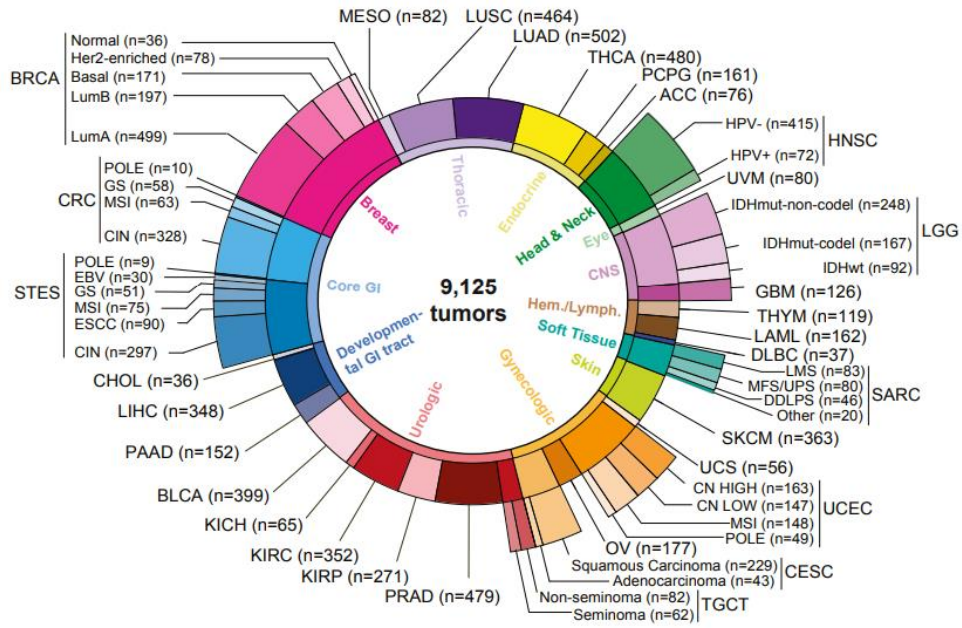
- Kapsam (T): Büyüklüğü ve yayılması
- Lenf nodlarına yayılma (N)
- Uzak metastaz (M): Organ tutulumu
- ER +/- varlığı
- PR +/- varlığı
- HER2 +/- varlığı
- Benzerlik durumu: Normal hücrelerden ne kadar farklı

AJCC 8. baskı kılavuzu, proliferatif indeks, hormon reseptör ekspresyonu ve gen ekspresyon profilleri gibi diğer faktörlerle birlikte derecenin tümör farklılaşmasının önemli bir değerlendirmesi olduğunu ve bunun da prognoz için önemli bir araç olduğunu vurgulamaktadır. Kılavuzda evreleme için kullanılan tümör derecesi, Scarff, Bloom ve Richardson'ın histolojik derecelendirme sistemi tarafından tanımlanır ve Nottingham grubu tarafından standardize edilir⁸¹. Meme kanseri için evreleme sistemindeki en önemli değişiklik, prognostik evreler oluşturmak için biyobelirteçlerin anatomik evrelemeye dahil edilmesidir. Tümör derecesi, hormon reseptörü (östrojen reseptörü; progesteron reseptörü) durumu ve HER2 durumuna göre aynı anatomik evrelere sahip tümörlere farklı prognostik evreler atanır. Kullanılan tedavinin türüne bakılmaksızın tüm hastalara bir Klinik Prognostik Aşama atanır; aksine, cerrahinin ilk tedavi olduğu hastalara bir Patolojik Prognostik Aşaması atanır. 8. baskıda lobüler karsinoma in situ, in situ karsinom (pTis) kategorisinden çıkarılmış ve iyi huylu bir tümör olarak sınıflandırılmıştır⁸².

2.2.5. Meme Kanseri ve İlişkili Sinyal Yolakları

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünme ve büyüme yeteneği kazandığı multifaktöriyel bir hastalıktır^{83,84}. Çoğunlukla belirli genlerdeki genetik değişiklikler sonucu oluşmaktadır. Son on yılda DNA dizilemesindeki gelişmeler, bu genetik

değişiklikleri sistematik olarak incelemeyi mümkün kılmış ve kanserin gelişmesine ve ilerlemesine sebep olan sinyal yollarını daha iyi anlamamıza fırsat vermiştir²⁸. Hücre döngüsü ilerlemesini, apoptozu ve hücre büyümesini kontrol eden sinyal yollarındaki genetik değişiklikler, her kanserde görülen ortak özelliklerdir, ancak bu yollarındaki değişikliklerin kapsamı, mekanizmaları ve birlikte ortaya çıkması ile bireysel tümörler ve tümör tipleri arasında farklılıklar ortaya çıkmaktadır⁸⁵. The Cancer Genome Atlas (TCGA) tarafından yapılan bir çalışmada, 9.125 tümör numunesinin 10 onkojenik sinyal yolağındaki (Notch, Hücre döngüsü, PI-3-Kinaz/Akt, TGF- β sinyali, p53, Myc, Nrf2, β -katenin/Wnt, RTK-RAS ve Hippo) mutasyonlar, kopya sayısı değişiklikleri, mRNA ekspresyonu, gen füzyonları ve DNA metilasyonu gibi genetik değişiklikleri incelenmiş ve bu genetik değişikliklerin mekanizma ve modelleri analiz edilmiştir (Şekil 2-5).

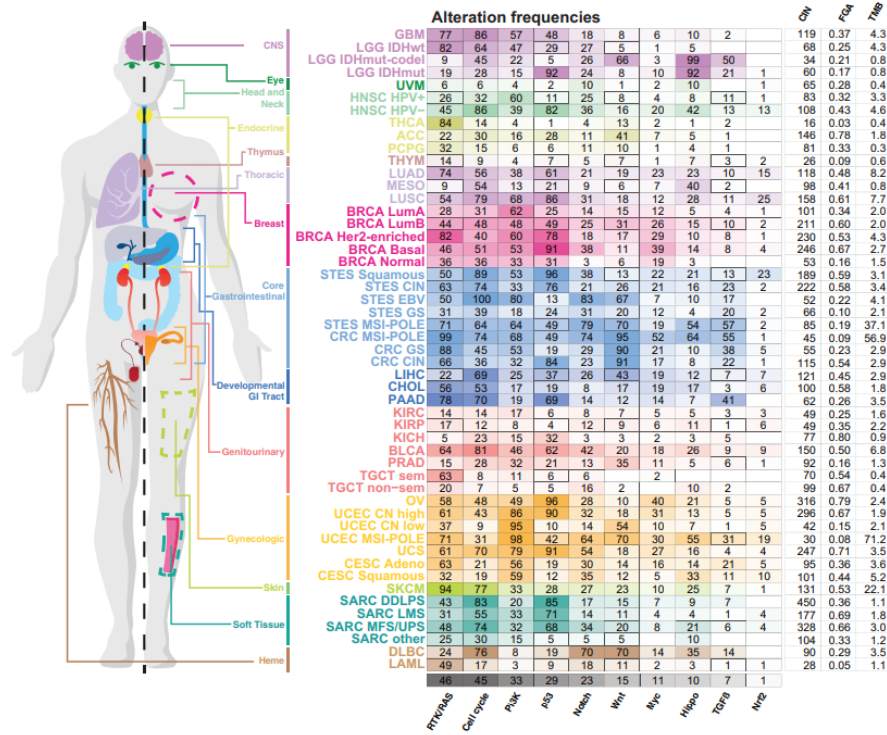


Şekil 2-5. Analiz edilen moleküler alt tipler dahil olmak üzere kohorttaki kanser türlerinin dağılımı (9.125 kanser numunesi) ⁸⁵

Çalışma sonunda, tümörlerin %89'unun bu sinyal yollarından en az birinde ve tümörlerin %57'sinde şu anda mevcut ilaçlar tarafından potansiyel olarak hedeflenebilen en az bir genetik değişiklik saptanmıştır. Tümörlerin %30'unda birden fazla hedeflenebilir değişiklik olup, bu da kombinasyon tedavi için fırsat yaratmaktadır.

Kanserde en sık genetik değişikliğin meydana geldiği sinyal yolları RTK/RAS/MAP-Kinaz ve PI3K/Akt sinyal yolağıdır⁸⁶. RAS geninin mutasyonları, insan kanserinde en yaygın ortak özelliklerden biridir. HRAS, KRAS ve NRAS proteinleri, kanser hücrelerinde yapısal olarak aktiftir ve çeşitli tümörlerde sürekli proliferasyonu teşvik eder⁸⁵. Hem Gal1 hem de Gal3, hücre yüzeyinde onkojenik RAS proteinleri ile etkileşime girebilir, RAS membran aktivasyonunu indükleyebilir ve tümör hücresi proliferasyonunu etkileyebilir^{87,88}. Meme kanserinde Gal-3, KRAS'ı doğrudan aktive ederek NRAS'tan KRAS'a moleküler bir geçişi destekler⁸⁹.

TCGA tarafından yapılan çalışmada RTK-RAS yolu, tüm kanser türleri arasında en yüksek medyan değişiklik sıklığına (örneklerin %46'sı) sahip sinyal yolu olarak tespit edilmiştir. Bu yoldaki en yüksek değişiklik fraksiyonuna sahip tümör alt tiplerinden biri de %82 ile Her2 ile zenginleştirilmiş meme kanseri (BRCA Her2 ile zenginleştirilmiş) dir (Şekil 2-6).



Şekil 2-6. Sinyal yollarındaki değişim frekansları⁸⁵

Yapılan başka bir çalışmada ise, meme kanserli 43 hasta ve 10 sağlıklı birey karşılaştırıldı ve meme kanseri hastalarının %44.2'sinde fonksiyon kaybı ile ilişkili PTEN mutasyonlarına sahip olduğunu gösterildi⁹⁰. Diğer bir çalışmada ise, PTEN'de germ hattı

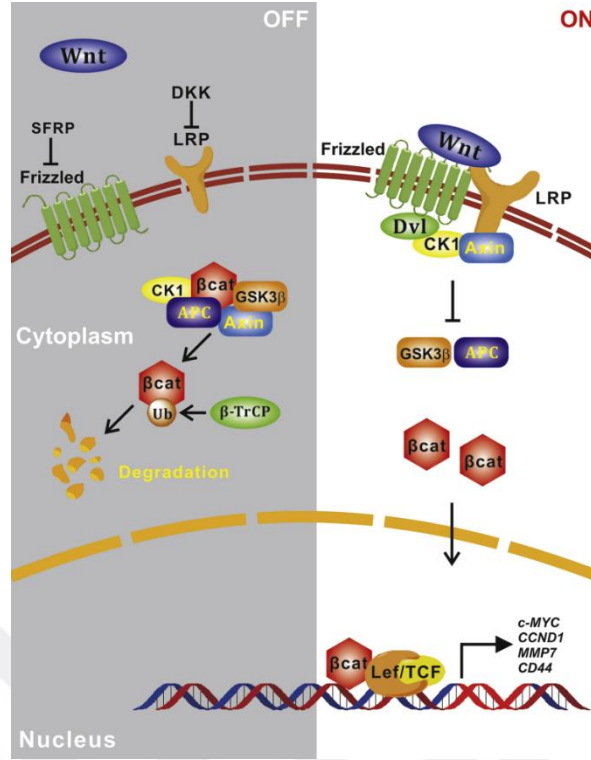
mutasyonları olan hastaların meme kanseri riskinin arttığı gösterildi⁹¹. Aynı çalışmada PTEN promotör metilasyonunun ayrıca PTEN'in aşağı regülasyonu ve PI3K/Akt sinyalleşmesinin Mgat5 aracılı aktivasyonunda karşılık gelen artış yoluyla meme kanserinin ilerlemesini etkilediği de gösterilmiştir.

Meme epitelyal tümör hücrelerinde Mgat5 ekspresyonunun, sitokin reseptörleri üzerindeki dallı N-glikanları artırarak, galektinlere reseptör bağlanmasıyla sonuçlanmış ve galektine bağımlı hücre dışı matris yeniden şekillenmesini teşvik ederek EMT'de hız sınırlayıcı bir faktör olduğu gösterilmiştir⁹¹.

2.2.5.1. Meme Kanseri ve Wnt Sinyal Yolağı

Wnt sinyali, embriyonik ve organ gelişiminin yanı sıra kanser ilerlemesini kontrol etmede kritik bir rol oynayan yüksek oranda korunmuş bir sinyal yoludur. Genom çapında dizileme ve gen ekspresyon profili analizleri, Wnt sinyalinin esas olarak meme kanseri proliferasyonu ve metastaz süreçlerinde yer aldığını göstermiştir. En son yapılan çalışmalar, Wnt sinyalinin meme kanseri bağışıklık mikroçevresinde de çok önemli olduğunu göstermiştir. Wnt/ β -Catenin, Wnt–düzlemsel hücre polaritesi (PCP) ve Wnt–Ca²⁺ sinyali, bileşenleri ortak olan ve meme kanseri ilerlemesinde farklı roller oynayan üç köklü Wnt sinyal yollarıdır⁹².

Meme kanseri, Wnt sinyali ile ilişkilendirilen ilk kanserdir. Çok sayıda çalışma, Wnt sinyalinin kurucu bileşenlerinin meme kanseri hücrelerinde değiştiğini göstermiştir. Bu değişiklikler, DNA seviyesinde meydana gelen mutasyonları, amplifikasyonları, delesyonları ve metilasyonları, mRNA seviyesinde meydana gelen transkripsiyon sonrası modifikasyonları ve protein seviyesinde meydana gelen translasyon sonrası modifikasyonları içerir. Bu değişiklikler, özellikle β -Katenin'in hücrede lokalizasyondaki değişiklikleri içerir. β -Katenin'i kodlayan CTNNB1'in mutasyonu meme kanserinde nadirdir⁹³. Bununla birlikte, Wnt sinyalinin aktivasyonunun yine de meme tümörü oluşumunda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir⁹⁴(Şekil 2-7).



Şekil 2-7. Kanonik Wnt/β-katenin sinyal yolu ⁹⁵

Wnt proteinleri (Wnts) çeşitli reseptörlere bağlanır ve böylece farklı akış yollarını aktive eder⁹⁶. Wnt-reseptör etkileşimi, Axin ve Dishelved proteinlerinin hücre zarına alınmasına yol açar ve glikojen sentaz kinaz (GSK)-3β proteininin inhibisyonunu indükler. (GSK)-3β proteini, fosforilasyon ile indüklenen proteasomal bozunmaya β-katenin tarafından sürülen Wnt yolunun negatif bir düzenleyicisidir⁹⁷.

GSK-3β'nin inhibisyonu, sitoplazmada β-katenin birikimine ve ardından CREB bağlayıcı protein (CBP) ve T-hücre faktörü/lenfoid arttırıcı faktör (TCF/LEF) transkripsiyon faktörleri ve düzenleyici onkogenler (MYC, CCND1 ve diğer hedef genler gibi) ile birlikte transkripsiyonel aktivatör olarak görev yapmak üzere çekirdeğe translokasyonuna yol açar⁹⁸.

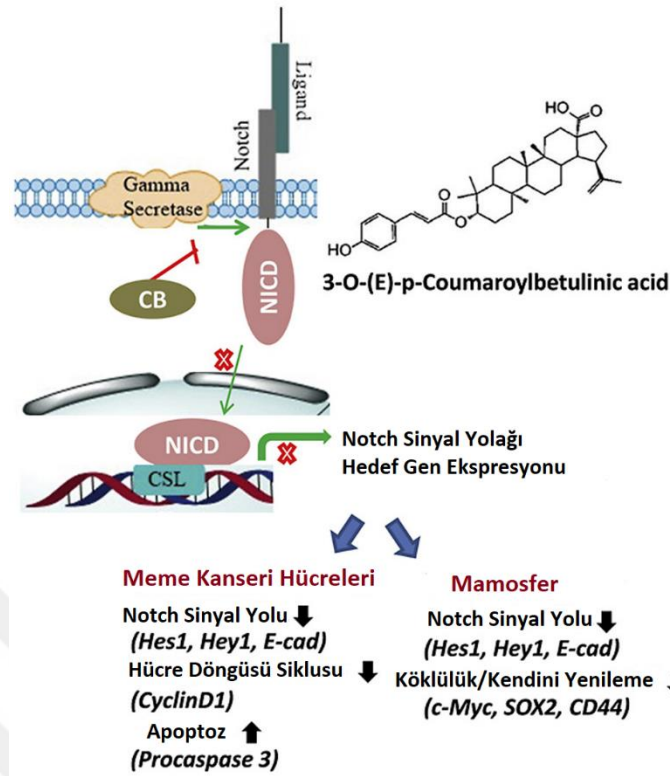
2.2.5.2. Meme Kanseri ve Siklin Kinazlar

Hücre gelişiminde hücre döngü çok önemlidir ve döngü ilerlemesinin ana denetleyicileri endojen CDK inhibitörleri, sikline bağımlı kinazlar (CDK'ler) ve siklinlerdir. Mitojenik sinyale yanıt olarak, siklin D üretilir ve aktive edilmiş CDK4/CDK6 nedeniyle retinoblastoma proteini (Rb) fosforile edilir. Bu, hücre döngüsü ilerlemesinde gerekli olan çeşitli proteinlerin üretilmesine neden olur. Ek olarak, bu ilerlemenin her aşamasında

CDK1-siklin A/B, CDK2-siklin E/A ve CDK4/CDK6-siklin D kompleksleri gereklidir. Hücre döngüsü düzensizliği kansere yol açma yeteneğine sahiptir⁹⁹. Kanserler, yaşamlarını sürdürebilmek için hücre döngüsünü aktive ederler. İnsan meme kanserinde, siklin D1 ve siklin E'nin aşırı ekspresyonunun yanı sıra CDKI p27Kip1'in azalmış ekspresyonu tespit edilmiştir¹⁰⁰. Siklin D1'in yüksek tümör ekspresyonu ve HER2'nin aşırı ekspresyonunun, rekürrenssiz hayatta kalma ve tamoksifen yanıtının azalması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir¹⁰¹. Palbosiklib ve ribosiklib, meme kanseri tedavilerinde fulvestrant veya letrozol ile birlikte klinik kullanımına izin verilen iki CDK4/CDK6 inhibitörüdür¹⁰². Oral CDK4/6 inhibitörü Palbosiklibin tek başına, palbosiklibin büyüme inhibisyonuna en duyarlı olan HER2 amplifikasyonuna sahip olanlar da dahil olmak üzere hücre döngüsü ilerlemesini ER-pozitif hücre hatlarını inhibe ettiği, lümen dışı/bazal alt tiplerin ise en dirençli olduğu gösterilmiştir¹⁰³. Bu nedenle Palbocyclib, meme kanserinde ümit verici bir terapötiktir ve hormon reseptörü pozitif, HER2 negatif metastatik meme kanserinin tedavisi için fulvestrant ile bir kombinasyon olarak onaylanmıştır^{104,105}.

2.2.5.3. Meme Kanseri ve Notch Sinyal Yolağı

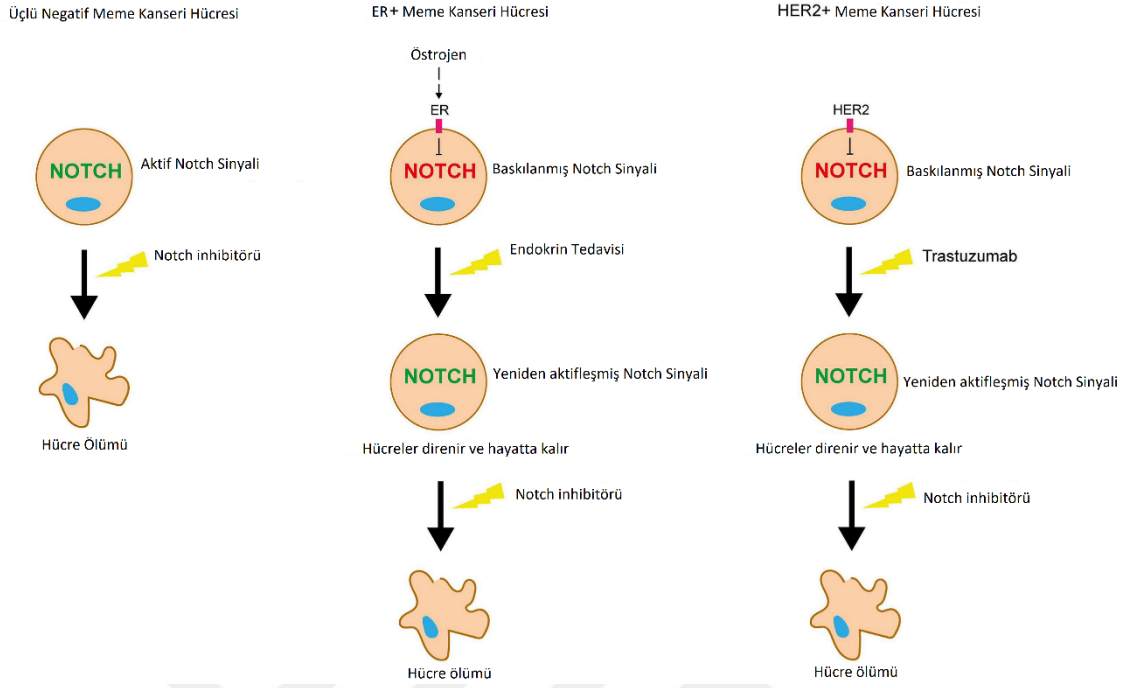
Çentik sinyali, hücre-hücre iletişimi, hücre farklılaşması ve nöronal gelişim dahil olmak üzere çeşitli işlevleri nedeniyle kanser gelişiminde en önemli sinyal zinciridir. Notch sinyal yolu, meme kanserinin patogenezinde yer aldığı için yeni bir terapötik hedefi temsil edilmektedir¹⁰⁶. NICD, transkripsiyonel bir faktör olarak işlev görür ve akış aşağı hedef genleri düzenler¹⁰⁶. Tümörlerde yüksek düzeyde Jag1 (Jag1 Yüksek) ve/veya Notch1 (Notch1 Yüksek) ekspresyonunun, kötü sonuç ile ilişkili olduğu ve birincil insan meme kanserlerinde bağımsız bir prognostik gösterge olduğu bildirilmiştir^{107, 108}. Notch sinyalinin aktivasyonu, meme kanseri hastalarında tümör agresifliği, kötü klinik sonuç ve ilaç direnci ile ilişkilidir¹⁰⁹.



Şekil 2-8. Meme kanseri ile ilişkili Notch sinyal yolağı inhibitörü 3-O-(E)-p-coumaroylbetulinic asit'in etki mekanizması¹¹⁰.

Küçük molekül inhibitörleri ile Notch sinyalini hedeflemek, antikanser ilaç geliştirme için daha iyi bir strateji olabilir. 3-O-(E)-p-Coumaroylbetulinic asit'i (CB) bir öncü bileşik ve Notch sinyal yolunun güçlü bir inhibitörü olarak tanımlanmıştır¹¹⁰ (Şekil 2-8). Mammosferin kendini yenilemesi, Notch 4 bloke edici antikor veya γ -sekretaz enziminin bir inhibitörü tarafından inhibe edilmiş ve Notch sinyali inhibe edildiğinde DCIS'den türetilen mammosphere üretiminin etkinliği önemli ölçüde azalmıştır.

Notch sinyal inhibisyonu, tedaviye dirençli meme kanseri hücrelerini hedeflemek için geçerli bir strateji olabilir. ER ve HER2 sinyali, sırasıyla ER⁺ ve HER2⁺ meme kanseri hücrelerinde Notch'u inhibe eder. Endokrin veya trastuzumab tedavisi, Notch sinyali üzerindeki blokajı serbest bırakarak bu yolları inhibe eder. Hayatta kalma ile sonuçlanan Notch aktivitesi, hücrelerin hedeflenen tedavilerde hayatta kalmasını sağlar. Çentik inhibitörleri, bu dirençli hücreleri hedeflenen tedaviye duyarlı hale getirmek için kombinasyon halinde kullanılabilir. Üçlü negatif meme kanseri hücreleri, ER ve HER2 reseptörlerinden yoksundur, yani endokrin terapi veya trastuzumabdan etkilenmezler, ancak Notch inhibitörlerine duyarlıdır¹¹¹ (Şekil 2-9).



Şekil 2-9. Meme kanseri türlerinde Notch sinyal inhibitörlerinin etkileri ¹¹¹

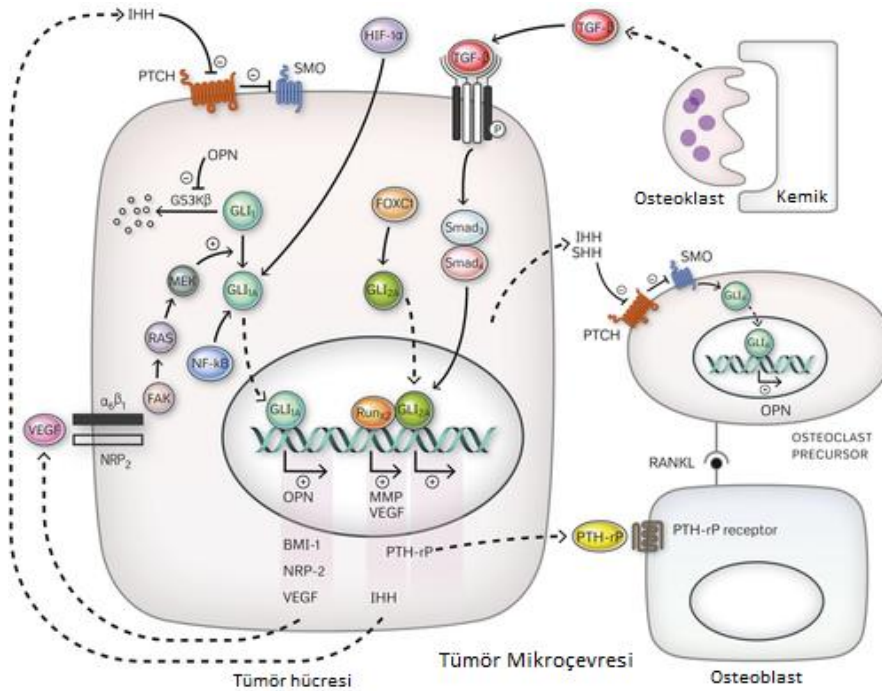
2.2.5.4. Meme Kanseri ve Hedgehog (HH) Sinyal Yolağı

Kirpi (Hh) yolu yüksek oranda korunur ve normal embriyogenez için kritiktir. Embriyonik gelişimin yanı sıra doku homeostazını da içeren birçok olayda çok önemli rol oynayan bir sinyal zinciridir. Hh yolu, embriyonik meme bezi indüksiyonunun düzenlenmesinde, duktal yapının geliştirilmesinde ve laktasyonda farklılaşmada rol oynamıştır. Yolun düzensizliği, meme kanserinin gelişmesinde ve çoğalmasında rol oynar^{112, 113}. Hh protein ailesi, hücre yüzeyi transmembran reseptörü PTCH (Cell Surface Transmembrane Receptor Patched) ü bağlayan Hh ligandlarından (Sonic-SHH, Indian-IHH ve Desert-DHH) oluşur. PTCH, SMO (transmembrane receptor like protein Smoothened) gibi transmembran reseptörünün aktivitesini inhibe eder, ancak ligandlara (SHH, IHH, DHH) bağlandığında, GLI-çinko-parmak transkripsiyon faktörlerinin posttranslasyonu sonrası işlenmesiyle sonuçlanan SMO'yu serbest bırakır. Şimdiye kadar üç memeli GLI proteini tanımlanmıştır; GLI1 ve GLI2 genellikle transkripsiyonel aktivatörler olarak işlev görür ve GLI3, transkripsiyonel bir baskılayıcı olarak işlev görür¹¹⁴.

TGF- β , RAS/MAPK sinyal yolları, hücre dışı matriks proteini osteopontin (OPN) ve NF- κ B, FOXC1 ve HIF-1 α gibi transkripsiyon faktörleri düzensiz Hh sinyaline katkıda

bulunur ve böylece mezenkimal fenotipin kazanılmasına, büyümenin artmasına ve TNBC'de invazyona yol açar¹¹⁵⁻¹¹⁷. GLI transkripsiyon faktörlerinin Hh'ye bağlı gen transkripsiyonu, Hh ligand/reseptör sinyal aktivasyonundan bağımsız olarak gerçekleşir^{115,118}. TGF- β /SMAD sinyaline yanıt olarak artan GLI2 ekspresyonu ve hedef geni PTH-rP'nin yukarı regülasyonu, TNBC'de osteolitik metastazların patogenezinde önemli bir rol oynar^{117,119}.

TGF- β /SMAD sinyaline yanıt olarak artan GLI2 ekspresyonu ve hedef geni PTH-rP'nin yukarı regülasyonu, TNBC'de osteolitik metastazların patogenezinde önemli bir rol oynar^{117,119}. Osteomimetik Runx2 ekspresyonu, GLI2 aracılı PTH-rP yukarı regülasyonunu artırır ve IHH transkripsiyonunu teşvik ederek, TGF- β /GLI2'nin aracılık ettiği tümör büyümesi ve osteolizin kısır döngüsünü daha da güçlendirir¹²⁰. Üçlü negatif BCSC (meme kanseri kök hücreleri)'de VEGF Neuropilin 2 (NRP2) sinyalinin, integrin aracılı FAK sinyali ve aşağı akış RAS/MAPK aktivasyonu yoluyla GLI1'i doğrudan aktive ettiği gösterilmiştir¹¹⁵. TNBC'de kök hücre benzeri tümör hücrelerinin NF- κ B ve FOXC1 ile indüklenen genişlemesinin altında yatan Hh yolu aktivasyonu, sırasıyla NF- κ B ve FOXC1 tarafından GLI1 ekspresyonu ve GLI2 aktivitesinin doğrudan güçlendirilmesi yoluyla liganddan bağımsız bir şekilde gerçekleşir^{116,121} (Şekil 2-10).



Şekil 2-10. TNBC'de Hedgehog sinyal aktivasyonu: ligand bağımlı ve ligand bağımsız mekanizmaların etkileşimi ¹²².

Tümör mikroçevresi, tümör büyümesine ve ilerlemesine önemli bir katkıda bulunur ve meme kanseri hücrelerinde de epitelial-mezenkimal plastisitenin düzenlenmesinde stromal sinyalleme'nin önemi giderek daha fazla bilinmektedir^{123,124}. Tümör mikroçevresinin hipoksisine yanıt olarak HIF-1α'nın salgılanması, Hh sinyal aktivasyonu yoluyla TNBC hücrelerinde mezenkimal geçişi desteklemektedir¹²⁵. Hücre dışı matris proteini OPN, Hh yolunu aktive ederek TNBC hücrelerinde epitelial-mezenkimal plastisiteyi modüle eder¹¹⁸.

TNBC hücreleri tarafından salgılanan Hh ligandının, komşu kemik iliği stromal hücrelerinde pro-tümörijenik sitokinlerin ve osteoklast öncüllerinin salınmasını teşvik ederek parakrin Hh sinyalini aktive ettiği ve böylece osteoklastogenez ve osteolize katkıda bulunduğu gösterilmiştir^{126, 127}.

Hh sinyal yolu, hormon reseptörü (HR+) pozitif ve üçlü negatif meme kanseri (TNBC) dahil olmak üzere diğer malignitelerde de etkilidir. İnsan meme kök hücrelerinde aktive olan Hh sinyali, glioma ile ilişkili onkogen (GLI) transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile sonuçlanır. Yüksek GLI1 ekspresyonu, meme kanserinde daha kötü sonuçlarla ilişkilidir. Kanonik olmayan GLI1 aktivasyonu, östrojen maruziyetinin meme kanseri kök hücre proliferasyonunu ve epitelial-mezenkimal geçişi teşvik ettiği bir mekanizmadır. Tamoksifen dirençli hücre hatları, Hh sinyallemesinde anormal aktivasyon göstererek Hh yolunun yıkılmasını sağlar ve tamoksifene dirençli hücrelerin büyümesini inhibe eder. Diğer kanserlerde olduğu gibi, bu endokrin dirençli hücre hatlarında Hh sinyali PI3K/AKT yolu ile aktive edilir. Hh yolu aktivasyonunun, tümör mikro ortamına parakrin sinyal iletimi ve kanser kök hücrelerinin seçici proliferasyonu dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla TNBC'de kemoterapi direncine aracılık ettiği de bildirilmiştir. Hh ve Wnt sinyal yollarının birlikte aktivasyonu, TNBC'de kötü bir prognostik belirteçtir. Erken faz klinik deneyleri, TNBC'de düzleştirilmiş (SMO) inhibitörleri ve kemoterapi kombinasyonunu değerlendirmektedir¹²⁸.

Meme kanserinde HH yolunun hedeflenmesinin birkaç klinik çalışmada umut verici sonuçlar verdiği bildirilmektedir (Tablo 2-2).

Tablo 2-2. Kadın kanserlerinde SHH yollarını hedefleyen klinik araştırmalar ¹²⁹.

Hedef	İlaç	Kanser Tipi	Doz	Alınma şekli	Faz	Clinical Trials no
-------	------	-------------	-----	--------------	-----	--------------------

SMO	Vismodegib	Meme ca	400 mg	Oral	II	NCT01757327
SMO	Sonidegib	Meme ca	Bilinmiyor	Oral	I	NCT01576666
SMO	Vismodegib	Meme ca	150 mg	Oral	I	NCT01071564
SMO	Vismodegib	Meme ca	Bilinmiyor	Oral	Ib	NCT03878524
SMO	Vismodegib	Meme ca	150 mg	Oral	II	NCT02694224
SMO	Vismodegib	Meme,yumurtalık, servikal,endomet.ca	Bilinmiyor	Oral	II	NCT02465060

Vismodegib, SMO'yu etkisiz hale getirerek umut verici sonuçlar gösteren küçük bir moleküldür ve aşağı yönde hedef gen ekspresyonunun azalmasına neden olur¹³⁰. Ancak, vismodegib direncine yol açabilen bilinen iki SMO mutasyonu (D473 ve E518) vardır, bu nedenle Vismodegib'in SMO'ya bağlanma yeteneğini azaltarak etkililiğin azalmasına yol açar^{131,132}.

Sonidegib, bir antagonist gibi hareket ederek SMO ile etkileşime girerek HH yolu sinyal yolunun aşağı akış aktivasyonunu önler¹³³⁻¹³⁵. Ancak Q476 ve D473'teki SMO mutasyonları Sonidegib bağlanmasını engellemektedir. S533 ve W535 dahil olmak üzere diğer mutasyonlar, Sonidegib'e direnç kazanmasını sağlar^{135,136}.

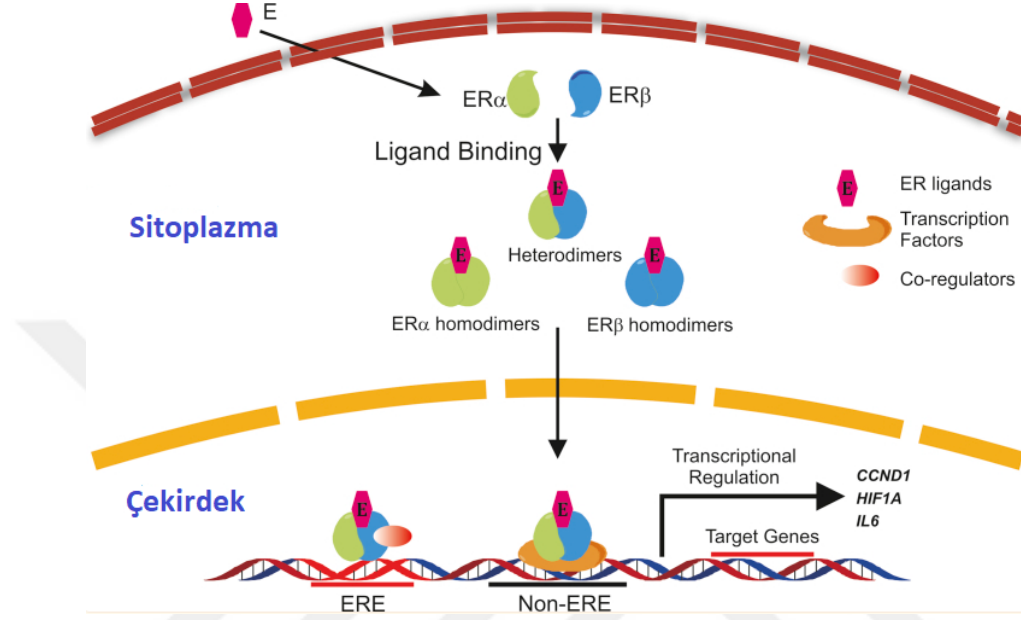
2.2.5.5. ER (Östrojen Reseptörü) Sinyal Yolu ve ER-Pozitif Meme Kanseri

Östrojen, çekirdekteki gen transkripsiyonunu düzenlemek veya sitoplazmada kinazları aktive etmek için ER'ye bağlanır. Östrojen, hücresel eylemlerine "nükleerle başlatılan steroid sinyali" ve "membranla başlatılan steroid sinyali" olarak sınıflandırılan iki sinyal yolu aracılığıyla aracılık eder. "Nükleer" yolda, östrojen ya ER α 'ya ya da ER β 'ya bağlanır, bu da çekirdeğe yer değiştirir, DNA'yı ERE elemanlarına bağlar ve ERE'ye bağlı genlerin ekspresyonunu aktive eder. "Membran" yolunda Östrojen, etkilerini plazma zarında (mER) bir ER alt popülasyonu veya yeni G-proteinine bağlı E2 reseptörleri (GPER) yoluyla gösterebilir. Bu reseptörlerin aktivasyonu üzerine, çeşitli sinyal yolları (yani Ca²⁺ , cAMP, protein kinaz kaskadları) hızla aktive edilir ve sonuçta aşağı akış transkripsiyon faktörlerini etkiler.

Östrojen, sitoplazmik ve nükleer ER'yi aktive eder. Sitoplazmik ER, PI3K gibi büyüme faktörü sinyali bileşenlerine, Akt ve RAS gibi anahtar sinyal moleküllerini aktifleştirerek

ve hücre çoğalmasını ve sağkalımını teşvik eden mTOR , Raf ve MAPK gibi aşağı akış moleküllerine bağlanır¹³⁷.

ER α ve ER β olmak üzere 2 reseptörden oluşan östrojen reseptörlerine^{138–141} uygun ligand bağlanınca hedef genler ekspresyona uğrar. (Şekil 2-11).

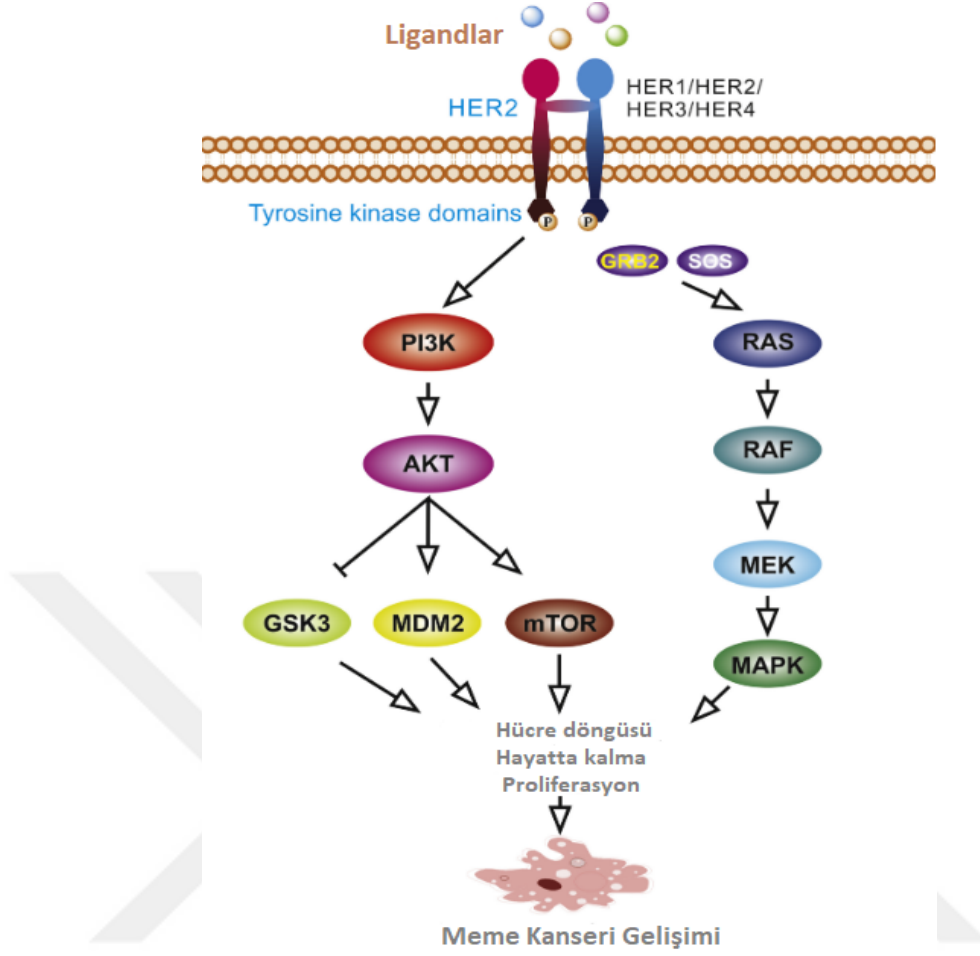


Şekil 2-11. ER Sinyal Yolağı ve Reseptör-Ligand İlişkisi⁹⁵

ER α 'nın meme tümörü hücrelerinin büyümesini desteklediği en iyi karakterize edilen mekanizmalardan biri, siklin D1 ile etkileşimidir. ER α ve siklin D1 geri bildirim döngüsü içindeki sinerjizm, antiöstrojen terapi direncinin mekanizmasını kısmen açıklayabilir ve ER+ hastalarında seçici CDK4/6 inhibitörleri ile hormonal terapi ajanlarının birlikte kullanımı için gerekçe sağlayabilir. En yaygın olarak kullanılan ER α antagonisti Tamoksifen'dir¹⁴². ER α meme kanseri hastalarında en sık incelenen parametrelerden biri iken, ER β de giderek dikkatleri üzerine çekmeye başlamıştır. Normal meme dokusu sıklıkla ER β eksprese eder ve meme tümörlerinin ilerlemesiyle birlikte seviyesi düşer¹⁴³.

2.2.5.6. HER2 Sinyal Yolu ve HER2-Pozitif Meme Kanseri

HER2 ,hücre zarında bulunan ve çeşitli ligandlara bağlanan reseptör tirozin kinazdır¹⁴⁴. Ligand bağlanması ve dimerizasyon , HER2' nin fosforile olmasını uyararak, MAPK ve PI3K yolları gibi birçok sinyal yollarının aktif hale gelmesini sağlar^{145–147}. Bu sinyal yolları, meme tümörjenezisi ile büyük ölçüde ilişkilidir (Şekil 2-12).



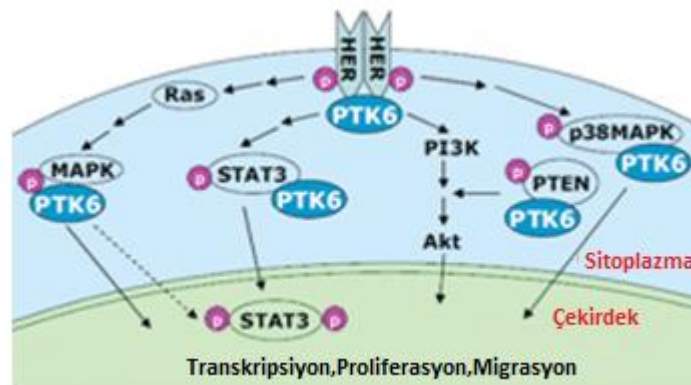
Şekil 2-12. HER2 sinyal yolunun meme kanseri gelişimi için aktif hale getirdiği diğer sinyal yolları ⁹⁵.

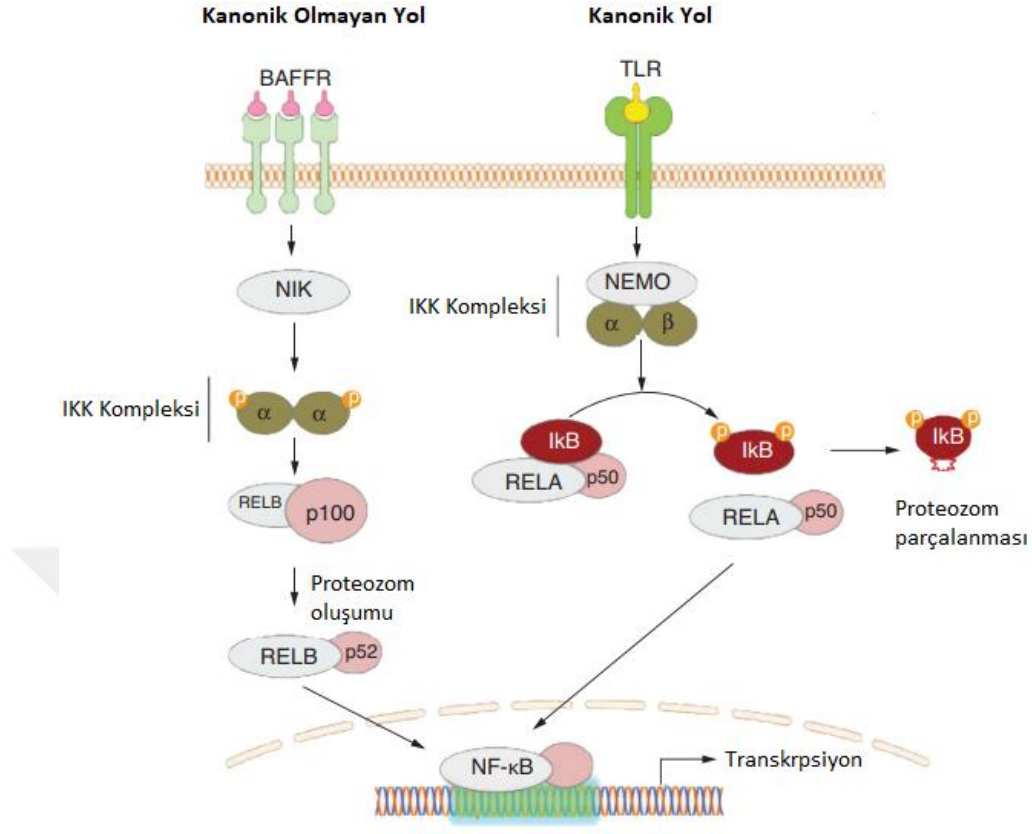
2.2.5.7. Meme Tümörü Kinazı (BRK)

Protein tirozin kinaz 6 (PTK6) olarak da bilinen meme tümörü kinazı (BRK), normal meme bezinde düşük ekspresyona sahipken meme karsinomlarında yüksek oranda eksprese edilen reseptör olmayan bir tirozin kinazdır.¹⁴⁸⁻¹⁵⁰. BRK, insanlarda 20q13.3 kromozomu üzerinde bulunan 8.93 kb uzunluğunda bir DNA tarafından kodlanır¹⁵¹. Her ikisi de protein-protein etkileşimlerinde yer alan klasik bir Src homoloji 3 (SH3) alanı ve bir Src homoloji 2 (SH2) alanı ve bir tirozin kinaz (SH1) alanı olmak üzere 3 bölümden oluşan 451 amino asitli bir kinazdır¹⁵². Çalışmalar BRK'nın aşırı ekspresyonunun meme kanserinde daha kötü genel sağkalım ile ilişkili olduğunu göstermiştir¹⁵³. Yapılan çalışmalar, BRK'nın p38 mitojenle aktive olan protein (MAP) kinazların ve hücre dışı

sinyalle düzenlenen kinaz 5'in (ERK5) yukarı akışına ve ayrıca epidermal büyüme faktörü reseptörü (ErbB) ekspresyonunun aşağı akışına katkıda bulunduğunu gösterdi.

PTK6 (BRK), MAPK, PTEN, HER2, p38 MAPK ve STAT3 'ı fosforile eder. BRK'nın yıkımı, bunların fosforilasyonunun azalmasına ve dolayısıyla siklin E'nin ekspresyonunun azalmasına yol açar¹⁵⁴ (Şekil 2-13).





Şekil 2-14. Kanonik ve kanonik olmayan NF-κB yolları¹⁵⁹.

Nükleer faktör kappa B (NF-κB), aktivitesi kBa (IκBa) kinaz (IKK'ler) inhibitörü tarafından düzenlenen Rel ailesinin dimerik üyelerinden oluşan bir transkripsiyon faktörüdür. Memelilerde NF-κB ailesi öncü genler ve işlenmiş ürünleri dahil olmak üzere 5 adet üyeden oluşur: p65, RelB, cRel, Nfkb1 ve Nfkb2 (p52 ve öncüsü p100). Bu proteinler homodimerik ve heterodimerik kompleksler oluşturur ve aktiviteleri iki ana yolla düzenlenir: RelA–p50 kompleksini aktive eden klasik veya kanonik aktivasyon yolu ve RelB–p52 kompleksini aktive eden alternatif veya kanonik olmayan yol^{160,161} (Şekil 2-14). Kanonik yol ilk olarak nükleer p65/p50'den oluşur ve IκBa'nın fosforilasyonu ve IKKa/β tarafından parçalanmasının ardından aktive edilir. Alternatif NF-κB yolu (p100/p52), transkripsiyonel düzenlemeye aracılık etmek için RelB ile çekirdeğe yer değiştiren olgun p52'ye kısmi proteolitik işleme sinyalini vermek için p100'ü fosforile eden IKKa homodimerleri tarafından düzenlenir¹⁶². Her iki NF-κB yolu da anormal şekilde aktive edildiğinde tümör gelişimine neden olur^{163,164}. Yapılan çalışmalar, hormondan bağımsız meme kanseri hücrelerinin yapısal NF-κB aktivasyonu

sergilediğini ve NF- κ B aktivasyonunda yer alan bir kinazı kodlayan IKBKE geninin amplifiye olduğunu ortaya çıkarmıştır. NF- κ B sinyalinin anormal aktivasyonunun, TNBC hücrelerinin sık görülen bir özelliği olduğuna dair artan kanıtlar vardır^{165,166}. Gen ekspresyonu profillemeye analizleri ile yapılan çalışmalar, NF- κ B yolunun, hücre proliferasyonunu etkilediği, apoptozu baskıladığı ve ankrajdan bağımsız büyümeyi teşvik ettiği belirli TNBC'lerin patogeneğinde güçlü bir şekilde rol oynadığını ortaya koymuştur¹⁶⁷.

2.2.6. Meme Kanseri Prognostik Biyobelirteçler

2.2.6.1. Östrojen Reseptörü

ER ekspresyonu ile ailede meme kanseri öyküsü arasında bir ilişki gözlemlenmiş ve bu, özellikle ailesel risk durumlarında meme kanserinin tanısal bir biyobelirteç olarak ER ekspresyonunun kullanımını daha da kolaylaştırmıştır¹⁶⁸. Ayrıca Konan ve ark. ER α -36 ekspresyonunun PR-pozitif kanserlerin potansiyel hedeflerinden birini ve aynı zamanda bir prognostik belirteci oluşturabileceğini bildirmiştir¹⁶⁹.

2.2.6.2. Progesteron Reseptörü

Hem ER hem de PR, meme kanseri hücrelerinde bol miktarda eksprese edilir ve her ikisi de meme kanserinin tanısal ve prognostik biyobelirteçleri olarak kabul edilir (özellikle ER-pozitif olanlar)¹⁷⁰. Daha yüksek PR ekspresyonu, genel sağkalım, nüks kadar geçen süre ve tedavinin başarısızlığına veya ilerlemesine kadar geçen süre ile pozitif ilişkilidir, düşük PR seviyeleri genellikle hastalığın daha agresif seyri ve daha kötü nüks ve prognoz ile ilişkilidir¹⁷¹.

2.2.6.3. HER2

HER2 nin ekspresyonu, MK nin %15-25'inde bulunur. HER2'nin çok fazla ekspresyonu MK sürecindeki olaylardan biridir¹⁷¹. Ayrıca HER2, metastatik veya tekrarlayan meme kanserlerinin tespit oranını %50'den %80'in üzerine çıkarır¹⁷². Serum HER2 seviyeleri, tümör mevcudiyeti veya nüksünün umut verici bir gerçek zamanlı belirteci olarak kabul edilmektedir¹⁷³.

2.2.6.4. Antijen Ki-67

Ki-67 proteini, çoğalmanın hücresel bir belirteçidir ve Ki-67 çoğalma indeksi, özellikle meme kanseri durumunda kanserli hücrelerin çoğalması hakkında bilgi sağlamak için mükemmel bir belirteçtir. Ki-67 tarafından belirlenen proliferatif aktiviteler, tedaviye

yanıt ve nüks süresi ile birlikte kanserin agresifliğini yansıtır¹⁷⁴. Bu nedenle Ki-67, uygun tedavi tedavisinin seçimi ve nüks nedeniyle olası takipler açısından çok önemlidir. Ki-67 immünohistokimyasının analitik geçerliliğinin çeşitli sınırlamaları nedeniyle, kesin tedavi kararları açısından Ki-67 ekspresyon düzeylerinin iyi düşünülmesi gerekir. Ki-67 potansiyel bir prognostik faktör olarak da düşünülebilir; 12.155 hastayı kapsayan 68 çalışmanın Meta analizine göre, Ki-67'nin aşırı ekspresyonu hastaların daha kötü klinik sonuçları ile ilişkilidir¹⁷⁵. Ki-67'nin yüksek ekspresyonu, meme kanseri hastalarının daha kötü sağkalım oranlarını da yansıtır¹⁷⁶.

2.2.6.5. Mib1

Mib1 (Ki-67'ye karşı antikor) proliferasyon indeksi, Ki-67'ye benzer şekilde meme kanserinin güvenilir bir tanısal biyobelirteç olmaya devam etmektedir. Hem Mib1 hem de Ki-67 ekspresyon düzeylerinde bir azalma, meme kanseri hastalarının ameliyat öncesi tedaviye iyi yanıt vermesiyle ilişkilidir¹⁷⁶. Mib1 seviyeleri, eşlik eden p53 mutasyonları olan hastalarda anlamlı olarak daha yüksektir¹⁷⁷. Mib1 değerlendirmesi, ne mitotik indeks ne de S-faz fraksiyon değerlendirmesi için uygun olmayan küçük boyutlu biyopsi örneklerinin olduğu durumlarda özellikle yararlı olabilir¹⁷⁸.

2.2.6.6. E-Kadherin

E-kadherin, epitelyal-mezenkimal geçişte (EMT) kritik bir proteindir; ekspresyonunun kaybı, artan metastaz riski ile daha da ilişkili olan mezenkimal fenotipe kademeli dönüşüme yol açar. E-kadherinin bir meme biyobelirteç olarak kullanımı henüz sorgulanabilir, ancak bazı araştırmalar, ekspresyonunun tümör boyutu, TNM evresi veya lenf nodu durumu gibi çeşitli meme kanseri özellikleri ile potansiyel olarak ilişkili olduğunu göstermiştir¹⁷⁹. Düşük E-kadherin ekspresyonu, pozitif olarak lenf nodu metastazı ile ilişkilidir¹⁸⁰.

2.2.6.7. Dairesel RNA

Dolaşan dairesel RNA'lar (circRNA'lar), kodlamayan RNA grubuna aittir ve yapılan çalışmalarla apoptoz, artmış proliferasyon veya artmış metastatik potansiyel dahil olmak üzere meme karsinogenezinin birkaç ayırt edici özelliği açısından çok önemli oldukları gösterilmiştir¹⁸¹. Çoğunlukla meme kanserine özgü olan ve en kapsamlı şekilde incelenen circRNA'lardan biri, potansiyel bir tanısal biyobelirteç olarak da önerilen circFBXW7'nin yanı sıra üçlü negatif meme kanserli (TNBC) hastalar için terapötik bir araç olarak

önerilmiştir, ayrıca hsa_circ_0072309'da bolca eksprese edilir ve genellikle daha kötü sağkalım oranları ile ilişkilidir¹⁸². Has_circ_0001785 ise, meme kanserinin tanısal bir biyobelirteci olarak umut verici olarak kabul edilir¹⁸³.

2.2.6.8. P53

TP53 (P53) genindeki fonksiyon kaybı mutasyonları, osteosarkomlar, lösemi, beyin tümörleri, adrenokortikal karsinomlar ve meme kanserleri dahil olmak üzere çok sayıda kanser türünde bulunmuştur^{184,185}. P53 geninin susturucu mutasyonu, kanser ilerlemesinin erken bir aşamasında belirgindir. Meme kanserinde, TP53 mutasyonlarının prevalansı, TNBC'li hastaların yaklaşık %80'inde ve Luminal A hastalığı olan hastaların %10'unda mevcuttur¹⁸⁶.

2.2.6.9. mikroRNA

MikroRNA'lar (miRNA), çoklu yollarda düzenleyici rollere sahip olan, kodlama yapmayan endojen RNA moleküllerinin (19-25 nükleotid) ana sınıfıdır¹⁸⁷. Birkaç çalışma, meme kanseri doku örneklerinde biyobelirteçler olarak anormal şekilde eksprese edilen miRNA'ları araştırmıştır. Adhami ve arkadaşlarının meta analizine göre iki miRNA (miRNA-21 ve miRNA-210) tutarlı bir şekilde yukarı regüle edilmiş ve bazı miRNA lar (miRNA-145, miRNA-195, miRNA-497) da tutarlı bir şekilde aşağı regüle edilmiştir¹⁸⁸.

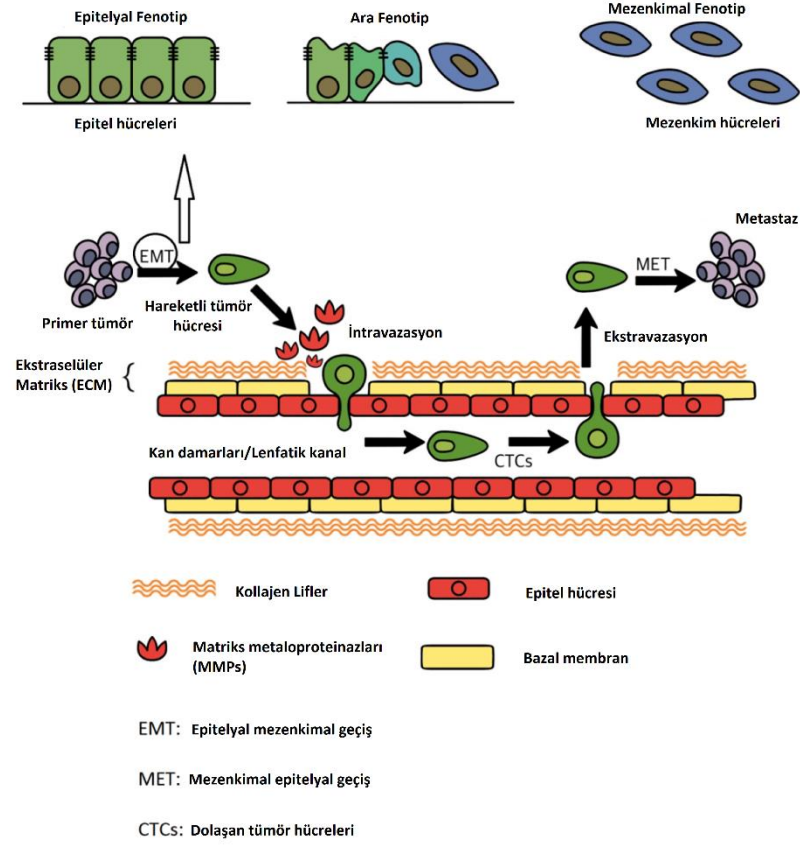
2.2.7. Meme Kanseri Metastazı

Metastaz, meme kanseri hastaları arasındaki yüksek ölüm oranının ana nedenlerinden biridir. Meme kanseri için yaygın metastatik bölgeler kemikler, karaciğer, akciğerler ve beyindir. Son araştırmalara göre en sık metastatik organ kemik, en az ise beyindir^{189,190}. Ayrıca farklı meme kanseri alt tiplerinin değişken metastaz geliştirme olasılıkları vardır. Örneğin, HER+ meme kanseri ve TNBC daha agresiftir ve metastaz geliştirme olasılığı daha yüksektir¹⁹¹. Kemik metastazı, kemik ağrısı ve tümör kaynaklı kırık gibi iskeletle ilişkili olayları tetikleyerek hastaların yaşam kalitesini etkiler ve sağkalımı azaltır¹⁹². Lokal ve metastatik rekürrensi olan hastalarda ortalama beş yıllık sağkalım oranları sırasıyla %80 ve %25'tir¹⁹³. Meme kanseri ölümlerinin yaklaşık % 90'ı tümör hücrelerinin lokal invazyonu ve uzak metastazından kaynaklanır. Tümör hücreleri, çok aşamalı tümörjenez ve metastaz sürecini yürütmek için EMT programını kullanır. Bu olaylarda çeşitli transkripsiyon faktörleri ve sinyaller yer alır¹⁹⁴. Epitelyal-mezenkimal

geçiş (EMT), epitel hücrelerinin komşularıyla temas halinde kalmasını sağlayan yapışık ve sıkı bağlantılarını kaybettiği, fibroblastoid morfolojisi, karakteristik gen ekspresyonu değişiklikleri ve artan hareketlilik potansiyeli gibi mezenkimal özellikler kazandığı ve bazal membranı parçalayarak uzun bir mesafe boyunca göç etmelerini sağladığı bir süreçtir^{194,195}. EMT'nin meme kanserindeki rolü, normal ve malign meme epitel hücrelerinde yapılan in vitro çalışmalar ve meme kanserlerinin fare modellerini kullanan in vivo çalışmalar yoluyla çok sayıda çalışmayla gösterilmiştir^{196,197}. Tümör hücreleri çevredeki konak dokuyu işgal etmişse, lenfatik veya kan damarlarına, diğer organ ve dokulara yayılabilirler¹⁹⁸. Kemik, meme kanseri için en yaygın metastaz bölgesidir¹⁹⁹. Kanserde metastatik süreç, bir dizi ardışık olayların meydana gelmesiyle oluşan kanser hücrelerinin bulunduğu ortamdan yayılmasıdır.²⁰⁰ Bu kavramın en iyi örneği olarak, 1889 yılında ünlü “tohum ve toprak” hipotezi ile James Ewing tarafından önerilen “mekanik mekanizmalar” hipotezi, kanser metastazında yer alan faktörleri daha iyi anlamak için entegre edilmelidir. Tohum ve toprak hipotezi, metastatik tümör hücrelerinin, tıpkı bir tohumun ancak verimli toprağa indiğinde büyüyeceği gibi, yerel mikro ortamın uygun olduğu bir yere metastaz yapacağını belirtir²⁰¹. Mekanik mekanizmalar hipotezi, metastazın kan akışı modeli tarafından belirlendiğini belirtir²⁰². Artan kanıtlar, hem mekanik mekanizmaların hem de elverişli toprağın metastatik yayılmayı etkilemede tamamlayıcı roller oynadığını göstermiştir²⁰³⁻²⁰⁵. Tümör hücreleri uygun “toprak” ile temas ettiklerinde çoğalırlar²⁰¹. Tümör mikroçevresinin metastazı etkilediği düşünülmektedir²⁰⁶. Metastatik tümör hücrelerinin hayatta kaldığı mikro ortam, onların çoğalma yeteneklerini etkiler. Tümör büyümesi ve ilerlemesi için uygun bir mikro çevre gereklidir²⁰⁷. Fibroblastları, bağışıklık hücrelerini, endotel hücrelerini ve ECM'yi içeren mikro çevre, tümör büyümesini düzenler²⁰⁸. Tümör vasküler büyümesi de metastaz için gereklidir. Anjiyogenez, metastazın başlaması ve ilerlemesi için esastır²⁰⁹. Kanser ayırt edici bir özelliğidir ve maligniteler için mikroçevreye gerekli bir adaptasyondur⁸⁴. Metastaz yapan meme kanseri hücreleri, doku tropizminin kanıtı olarak kemik iliğini ve akciğerleri tercih eder^{210,211}. Ayrıca, tümör hücreleri metastazdan önce toprağı zenginleştiren kemokinler adı verilen kimyasallar üreterek metastaz öncesi nişler yaratır²¹².

2.2.7.1. Meme Kanserinin Kemik Metastazı Aşamaları

Meme kanseri metastaz süreci birkaç karmaşık adım içerir: metastatik bölgelerde tümör hücrelerinin invazyonu, göçü, adhezyonu ve hayatta kalması (Şekil 2-15).



Şekil 2-15. Meme kanseri EMT ve metastaz aşamalarının şematik gösterimi ²¹³

2.2.7.1.1. İnvazyon

Metastaz gelişiminde, primer tümör bölgesindeki meme kanseri hücreleri, proliferasyon için besinlere erişim sağlamak üzere önce anjiyogenezi indüklerler. Yeni geliştirilen kan damarları ayrıca tümör hücrelerinin kan ve lenfatik damarlara girmesi için de bir yol sağlar²¹⁴. Normal epitel doku hücreleri gibi, komşu meme kanseri hücreleri de aralarında hücre hareketine ve invazyona elverişli olmayan çok sayıda sıkı hücre bağlantısı içerir. Bu nedenle, meme kanseri hücrelerinin epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) sürecine girerek bazı epitel fenotiplerini kaybetmesi gerekir²¹⁵. E-kadherin, normal hücrelerin hücresel polaritesini ve epitelyal morfolojisini koruyan, hücre-hücre adezyonuna aracılık eden epitelyal-spesifik bir transmembran glikoproteindir. Bu glikoprotein, epitel fenotipinin korunmasında önemli bir rol oynar ve E-kadherin kaybı,

tümör hücrelerine göç ve invazyon özellikleri vermektedir²¹⁶. Primer tümör bölgesinde bulunan meme kanseri hücreleri, tümör hücresi invazyonu için gerekli olan majör bir matriks metaloproteinaz (MMP) sınıfının salgılanmasını indükler. MMP'lerin etkisi altında, tümör hücreleri bazal membranı parçalayıp hücre dışı matrise ve çevredeki normal diğer dokulara girer²¹⁷.

2.2.7.1.2. Migrasyon (Göç)

İnvazyondan sonra, tümör hücreleri kan dolaşımına girer ve kan damarları veya lenfatik damarlar yoluyla kemiğe yayılan dolaşımdaki tümör hücreleri (CTC'ler) haline gelir²¹⁸. CTC'ler kemiğe ulaştıktan sonra vasküler bazal membranı bozarlar ve kan damarına nüfuz ederek parankimal dokuya girerler. Kemik mikro ortamında, CTC'ler yayılmış tümör hücreleri (DTC'ler) haline gelirler²¹⁹.

2.2.7.1.3. Adhezyon (Yapışma)

DTC'ler, genellikle kemik metastazı için kemik iliği olan uygun metastatik mikro ortama yapışırlar²²⁰. Bu adıma esas olarak integrin ve kaderin aracılık eder. İntegrin, heterodimerik transmembran glikoprotein ailesine ait bir izodiglikan proteinidir. İntegrinler, meme kanseri hücrelerinin hücre dışı matrise yapışmasına aracılık edebilir. Tüm ailede $\alpha\beta3$ integrin, in vitro nektin, osteosialin ve osteopontin bulunan bir tripeptide (Arg-Gly-Asp) bağlanarak meme kanseri hücrelerinin trabeküler kemiğe göçünün düzenlenmesinde hayati bir rol oynar^{221,222}.

2.2.7.1.4. Hayatta kalma

Kemik dokusuna yapıştıktan sonra, kemikte meme kanseri hücrelerinin çoğalması, metastazın son ama hayati aşamasıdır²²³. Kemik mikro ortamında, meme kanseri hücreleri ilk önce paratiroid hormonu ile ilişkili proteini (PTHrP) aşırı eksprese eder, bu daha sonra RANKL ekspresyonunu uyarır ve OPG ekspresyonunu baskılar²²³. OPG ve RANKL arasındaki denge bozulduğunda, osteoklastların işlevi desteklenir ve bu da kemik erimesine neden olur. Bu süreçte kemikte TGF- β , VEGF, IGF'ler, BMP'ler ve kalsiyum gibi büyüme faktörlerinin mikro ortamda salınımı devam etmektedir²²⁴.

Yapılan bir çalışmada, EMT aşamalarında etkili olan ZEB1 transkripsiyon faktörünün meme kanserinin ilerlemesini ve ER α + meme kanseri hücrelerini invazyona ve metastaza yönlendirdiği gösterilmiştir²²⁵. ER α , normal meme gelişimi ve meme tümörijenizi sırasında spesifik hedef genlerin transkripsiyonel düzenlemesine aracılık

eden bir nükleer hormon reseptörüdür. ER α , meme kanserlerinin üçte ikisini tetiklediğinden, önemli bir prognostik belirteç ve terapötik bir hedef olarak kabul edilmiştir^{226,227}. ZEB1/2, SNAIL1/2 ve TWIST1/2, farklı EMT aşamaları arasındaki geçişleri birbirine bağlı bir şekilde düzenleyen temel EMT–TF'lerdir^{228,229}. Meme kanseri dokusunda bulunan CXCL12 sebebiyle metastatik meme kanserinin CXCL12 üreten organlara yayılma olasılığı daha yüksektir^{230,231}. Muller ve arkadaşlarına göre, kanser hücreleri, CXCL12 ve reseptörü olan CXCR4 arasındaki bir bağlantı yoluyla ortak metastaz bölgelerine göç edebilirler²³⁰.

2.2.8. Meme Kanseri Nüksü

Meme kanseri nüksü, bu kanserden tüm ölümlerin yarısından sorumludur²³². Meme kanseri nüksü uzmanları, nedenleri belirlemek için dünya çapında çalışıyorlar. TNBC ve östrojen, progesteron ve HER2/ErbB2 reseptörü negatif meme tümörleri gibi diğer meme kanseri alt tipleri de incelenmiştir. Bir araştırmaya göre, meme kanseri alt tiplerinin nüks oranları farklıdır^{233, 234}. Tanıdan sonraki ilk beş yıl içinde, ER-negatif meme kanserlerinin nüks oranları, ER-pozitif meme kanserinden daha yüksektir. Tanıdan on yıl sonra, ER-pozitif meme tümörü nüks oranları, meme kanserinin her iki alt tipi için 15 yılda dengelenmeden önce, sonraki on yıl için kademeli olarak artar²³⁵. Bir hastaya mastektomi yapılmış olsun ya da olmasın, nüks şansı aynıdır. Bir meta-analize göre, radyasyon tedavisi nüks olasılığını azaltır. Radyasyon tedavisi alan ilerlemiş meme kanserli hastaların nüks ve ölüm oranlarında %50'lik bir azalma olduğu gösterilmiştir²³⁶. Bir araştırmaya göre mastektomi ve meme koruyucu cerrahi (BCS) sonrası nüks oranları moleküler alt tipe göre değişmektedir. Çalışmaya katılan 12.592 katılımcının yüzde 57'si meme koruyucu cerrahi (BCS) ve yüzde 43'ü mastektomi oldu. TNBC ve HER2 pozitif kanserler, meme koruyucu cerrahi (BCS)den sonra daha düşük nüks oranlarına sahipti. Postmastektomi nüksü, ER ve PR pozitif hastalar TNBC ve HER2'den daha iyi performans gösterdi. HER2 aşırı ekspresyonu olan hastalarda meme koruyucu cerrahi sonrası TNBC hastalarına göre daha yüksek nüks riski vardı. HER2 pozitif mastektomi hastalarında nüks riski TNBC hastalarından daha yüksek değildi. Bu nedenle, meme kanseri hastalarının tedavisinde moleküler alt gruplara odaklanmak kritik öneme sahiptir²³⁷.

2.2.9. Meme Kanseri Tedavi Seçenekleri

2.2.9.1. Ameliyat

Meme kanserli dokuların çıkarılmasını sağlayan iki ana cerrahi prosedür türü vardır ve bunlar meme koruyucu cerrahi (BCS) ve mastektomidir. Kısmi/segmental mastektomi, lumpektomi, geniş lokal eksizyon veya kadranektomi olarak da adlandırılan BCS, genellikle onkoplasti adı verilen plastik cerrahi teknikleriyle birlikte, sağlam meme dokusunun eş zamanlı korunmasıyla kanserli dokunun çıkarılmasını sağlar. Mastektomi, memenin tamamen çıkarılmasıdır ve genellikle hemen meme rekonstrüksiyonu ile ilişkilendirilir. Etkilenen lenf düğümlerinin çıkarılması, sentinel lenf düğümü biyopsisini (SLNB) ve aksiller lenf düğümü diseksiyonunu (ALND) içerir. BCS hastalar için çok daha faydalı görünse de, bu teknikle tedavi edilenler sıklıkla tam bir mastektomiye daha fazla ihtiyaç duyma eğilimi gösterirler²³⁸.

2.2.9.2. Kemoterapi

Kemoterapi, meme kanserinin sistemik bir tedavisidir ve neoadjuvan veya adjuvan olabilir. En uygun olanını seçmek meme tümörünün özelliklerine göre bireyselleştirilir; kemoterapi ikincil meme kanserinde de kullanılabilir. Neoadjuvan kemoterapi, lokal olarak ilerlemiş meme ca, inflamatuvar meme kanserleri için, büyük tümörlerin BCS'ye izin vermesi için veya daha kötü prognostik moleküler alt tiplere (HER2 veya TNBC) sahip küçük tümörlerde, prognostikleri ve yanıtın öngörücü faktörlerini tanımlamaya yardımcı olabilen ve intravenöz olarak sağlanabilen küçük tümörlerde kullanılır. Şu anda tedavi, karboplatin, siklofosamid, 5-florourasil/kapesitabin, taksanlar (paklitaksel, dosetaksel) ve antrasiklinler (doksorubisin, epirubisin) gibi ilaçların eş zamanlı uygulamasını içermektedir²³⁹ (Tablo 2-3). Preoperatif kemoterapi, postoperatif kemoterapiye kıyasla daha etkilidir²⁴⁰.

Tablo 2-3. Kemoterapi tedavisinde kullanılan güncel ilaçlar ve etki mekanizmaları²⁴¹

No.	Kemoterapi	İlaç Grubu	Mekanizması
1	Paclitaxel, Docetaxel	Taksanlar	Hücre bölünmesinin önlenmesi ²⁴²
2	Doxorubicin, Epirubicin	Antrasiklinler	Kanser hücrelerinde DNA hasarını teşvik ederek apoptoza yol açarlar ²⁴³ .
3	Cisplatin, Carboplatin	Platin ajanlar	DNA sentezine müdahale, dolayısıyla hücre bölünmesini inhibe ederler ²⁴⁴ .

2.2.9.3. Radyasyon Tedavisi

Radyoterapi, tipik olarak cerrahi ve/veya kemoterapiden sonra sağlanan meme kanserinin lokal tedavisidir. Meme kanseri nüks olasılığını en aza indirerek, kanserli hücrelerin tamamının yok edilmesini sağlamak için yapılır. Ayrıca, metastatik veya rezeke edilemeyen meme kanseri durumunda radyasyon tedavisi uygundur²⁴⁵. Radyasyona maruz kalan ciltte tahriş ve koyulaşma, yorgunluk ve lenfödem meme kanseri hastalarında uygulanan radyasyon tedavisinin en sık görülen yan etkilerinden biridir. Bununla birlikte, radyasyon tedavisi, hastaların genel sağkalım oranlarının iyileştirilmesi ve nüks riskinin azalması ile önemli ölçüde ilişkilidir²⁴⁶. Spesifik hedeflere yönlendirilen ilaçların, kemoterapi ve radyasyon terapisi gibi standart terapilerle karşılaştırıldığında genellikle daha etkili olduğu ve daha az toksisiteye sahip olduğu gösterilmiştir²⁴⁷.

2.2.9.4. İmmünoterapi

Günümüzde meme kanserini, özellikle TNBC'yi tedavi etmek için çeşitli immünoterapi ilaçları kullanılmaktadır. TNBC'de ER, PR ve HER2 ekspresyonu bulunmadığından, TNBC hastaları endokrin tedavisinden veya HER2 hedefli tedaviden fayda göremezler. Diğer tedavilerden farklı olarak immünoterapi, hastanın kendi bağışıklık sistemi yoluyla anormal hücreleri yok ederek tümör büyümesinin baskılanmasına yol açan bir stratejidir^{248,249}. İmmünoterapiler, bağışıklık kontrol noktası inhibitörlerini, T-hücre transfer tedavisini, monoklonal antikörleri, tedavi aşılarını ve bağışıklık sistemi modülatörlerini içerirler. Yaygın olarak kullanılan immün kontrol noktası inhibitörleri, Avelumab, Atezolizumab, Tezolizumab ve Pembrolizumab gibi PD-1/PD-L1 antagonistleri ve Tremelimumab ve Ipilimumab gibi CTLA-4 leridir^{250, 251} (Tablo 2-4).

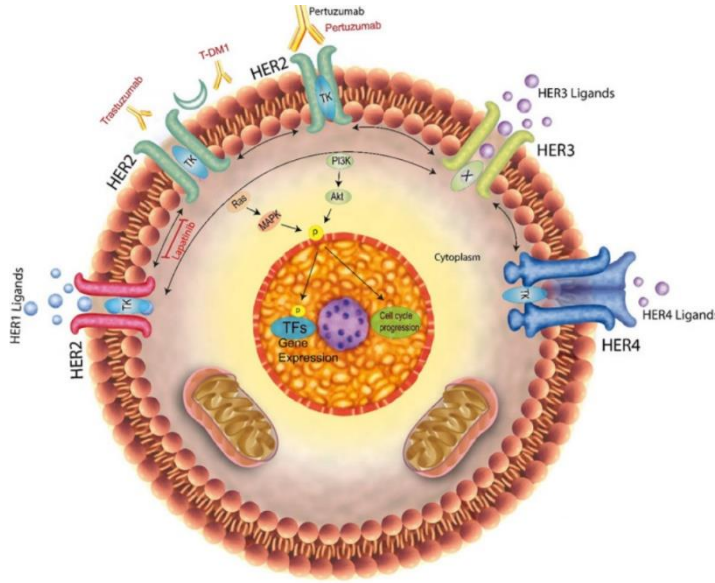
Tablo 2-4. İmmünoterapi tedavisinde kullanılan güncel ilaçlar ve etki mekanizmaları²⁴¹

No.	İmmünoterapi	İlaç Grubu	Mekanizması
1	durvalumab, pembrolizumab, atezolizumab	PD-1/PD-L1 inhibitörü	Bağışıklık düzenleyici kontrol noktalarının inhibisyonu, böylece T hücreleri ve tümör hücreleri arasındaki etkileşimi bloke ederler ^{252, 253} .

2	pertuzumab, trastuzumab	İmmünoterapi hedefli HER2	HER2 sinyal yolunun inhibisyonu ve HER2 aşırı ekspresyonuna karşı immün bağlantılı yanıtların aktivasyonu ^{254, 255, 256} .
---	----------------------------	------------------------------	--

İmmünoterapinin özellikle öne çıktığı bir alan, HER2+ meme kanserinin tedavisidir. HER2'ye karşı Trastuzumab (Herceptin), Trastuzumab-DM1 (T-DM1) ve Pertuzumab gibi monoklonal antikorların kullanılması önemli bir gelişmedir²⁵⁵. Günümüzde Trastuzumab, HER2+ metastatik meme kanserinin birinci basamak tedavisinde monoterapi veya kemoterapi ile kombinasyon halinde kullanım için FDA tarafından onaylanmıştır²⁵⁷. FDA'ya göre, HER2+ meme kanserini tedavi etmek için onaylanmış HER2 hedefli ilaçlar trastuzumab, pertuzumab, trastuzumab-DMT-1 ve lapatinib'dir²⁵⁸ (Şekil 2-16).

Trastuzumab gibi monoklonal antikorlar, bir bağışıklık tepkisini teşvik ederek (T hücrelerinin, doğal öldürücü hücrelerin ve makrofajların aktivasyonu) ve hastalarda sitotoksik antitümör hücre etkileri üreterek olumlu sonuçlar göstermiştir^{259,260}. T-DM1, Trastuzumab ve Emtansine'nin (DM1, bir sitotoksik ajan) bir kombinasyonudur. Trastuzumab ile karşılaştırıldığında T-DM1, HER2+ erken meme kanseri olan hastalarda invaziv hastalıksız sağkalımı önemli ölçüde iyileştirmiştir. Dolayısıyla T-DM1, invaziv Her2+ meme kanserinde nüksü azaltmada tek başına Trastuzumab'tan daha etkilidir^{261,262}.



Şekil 2-16. Meme kanseri tedavisinde kullanılan HER reseptör-ligand ilişkisi²⁵⁸

2.2.9.5. Endokrin (Hormonal) Tedavi

ABD'de meme kanseri hastalarının %70'inden fazlası yüksek östrojen reseptör-alfa (ER α) ekspresyonu sergiler²⁵⁰. Endokrin tedavisi olarak da adlandırılan hormon tedavisi, hormon reseptörü (HR)-pozitif meme kanseri olan hastaların sağkalımını artırır²⁶³. Endokrin tedavisi, östrojen seviyelerini düşürmeyi veya meme kanseri hücrelerinin östrojen tarafından uyarılmasını önlemeyi amaçlar²⁶⁴. ER'leri bloke eden ilaçlar arasında spesifik östrojen reseptörü düzenleyicileri (SERM'ler) (tamoksifen, toremifen) ve seçici östrojen reseptörü aşağı düzenleyicileri (SERD'ler) (fulvestrant) bulunurken, östrojen seviyelerini düşürmeyi amaçlayan tedaviler arasında aromataz inhibitörleri (AI'ler) (letrozol, anastrozol, eksemestan) bulunur²⁶⁵ (Tablo 2-5).

Tablo 2-5. Hormon/Endokrin tedavide kullanılan güncel ilaçlar ve etki mekanizmaları²⁴¹

No.	Endokrin/Hormon Terapi	İlaç Grubu	Mekanizması
1	Letrozole, Anastrozole, Exemestane	AI	Aromataz enzim inhibisyonu, Östrojen üretiminin inhibisyonu ²⁶⁶
2	Tamoksifen	SERM	Östrojen/ER etkileşiminin inhibisyonu ^{267,268}
3	fulvestrant	SERD	Meme kanseri hücrelerinde ER'nin bozulması ^{268,264}

Kemoterapi ile kombine edilen endokrin tedavi, meme kanseri hastaları arasında ölüm oranlarının azalmasıyla ilişkilidir²³⁴. Bazı hormon reseptör pozitif meme kanserleri progesteron hormonu için de pozitifdir. Birçok ER-pozitif meme kanseri aynı zamanda PR-pozitif olduğundan, ER'yi bloke eden tedaviler genellikle ER+/PR+ meme kanserini tedavi etmek için kullanılır. Az sayıda vakada, tümörler PR pozitif ancak ER negatif olabilir²⁶⁹⁻²⁷¹.

2.2.9.6. Hedef Odaklı Tedaviler

Çeşitli moleküler hedefli tedaviler, meme kanserinin çeşitli alt tiplerini hedeflemek için kullanılmakta ve araştırılmaktadır. Bu tür tedaviler arasında Metformin ve Demethoxycurcumin gibi PI3K/AKT/mTOR inhibitörleri ve AMPK aktivatörleri (mTOR yolunu inhibe eden)²⁷²⁻²⁷⁴, pan-PI3K inhibitörleri (Alpelisib, Taselisib, Buparlisib, Pictilisib), PARP inhibitörleri (Talazoparib, Iniparib, Veliparib, Olaparib), mTOR

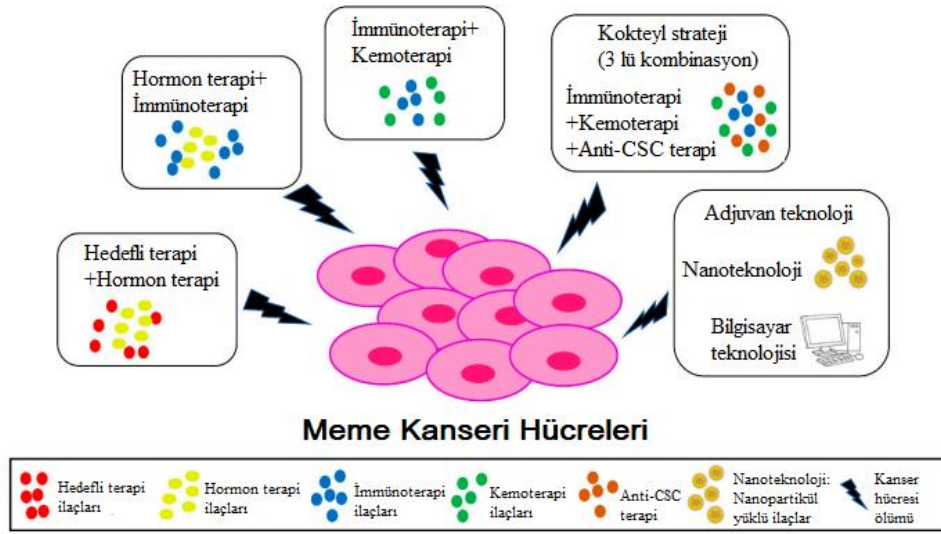
inhibitörleri (Everolimus), CDK4/6 inhibitörleri (Abemaciclib, Ribociclib, Palbociclib), diğer tümöre özgü moleküler hedef ilaçlar (Deubiquitinases) ve mikroRNA'lar (miR-185-5p, miRNA-21, miRNA -200c) yer alır^{247,275-277} (Şekil 2-6). BRCA1 ve BRCA2 ile HER2-negatif metastatik meme kanserinde mutasyonları olan hastalar, Olaparib (oral PARP inhibitörü) ile tedavi edilmiştir. Olaparib ile tedavi edilen hastaların medyan progresyonsuz sağkalımı (PFS), kemoterapi ile tedavi edilen hastalardan 2,8 ay daha uzadığı görülmüştür. Hastalığın ilerlemesi veya ölüm riski ise kemoterapiden %42 daha düşük gözlenmiştir²⁷⁸.

Tablo 2-6. Hedef odaklı tedavide kullanılan güncel ilaçlar ve etki mekanizmaları²⁴¹

No.	Hedef Odaklı Tedavi	İlaç Grubu	Mekanizması
1	Abemaciclib, Ribociclib, Palbociclib	CDK 4/6 Inhibitörü	Rb fosforilasyonunun düzenlenmesi, hücre döngüsü ilerlemesinin kontrolü ²⁷⁹
2	capivasertib	akt inhibitörü	
3	everolimus	mTOR inhibitörü	
4	Pilaralisib, Alpelisib	PI3K inhibitor	PI3K/AKT/mTOR sinyalinin inhibisyonu, hücre çoğalmasının düzenlenmesi ^{248,280-282}
5	voxtalisib	PI3K ve mTOR inhibitörü	
6	bevacizumab	VEGF inhibitorü	Anti VEGF monoklonal antikor, kan damarı büyümesinin inhibisyonu ²⁸³⁻²⁸⁵
7	Olaparib, Talazoparib, Niraparib	PARP inhibitor	PARP inhibisyonu, DNA onarım sürecinin bozulması, kanser hücresi ölümünün artması ²⁷⁹

2.2.9.7. Meme Kanserinde Kombinasyon Tedavileri

İlaça dirençli kanser hücreleri, meme kanseri ölümlerinin çoğundan sorumludur. Bilim adamları, kanser hücresi direncinin üstesinden gelmek için yeni kemoterapötik ilaçlar ve hedefe yönelik tedavi kombinasyonları geliştiriyorlar. Yeni ve ümit verici bir gelişme, hastalığı tedavi etmek için iki veya daha fazla ajanın kullanıldığı kombinasyon terapisinin kullanılmasıdır. Şu anda klinikte ve klinik deneylerde çeşitli tiplerde kombinasyon tedavisi kullanılmaktadır. Ayrıca, farklı kombinasyon yaklaşımlarını optimize etmek için nanoteknoloji, DNA dizileme teknolojileri ve hesaplamalı analiz gibi destekleyici veriler kullanılabilmektedir²⁴¹(Şekil 2-17).



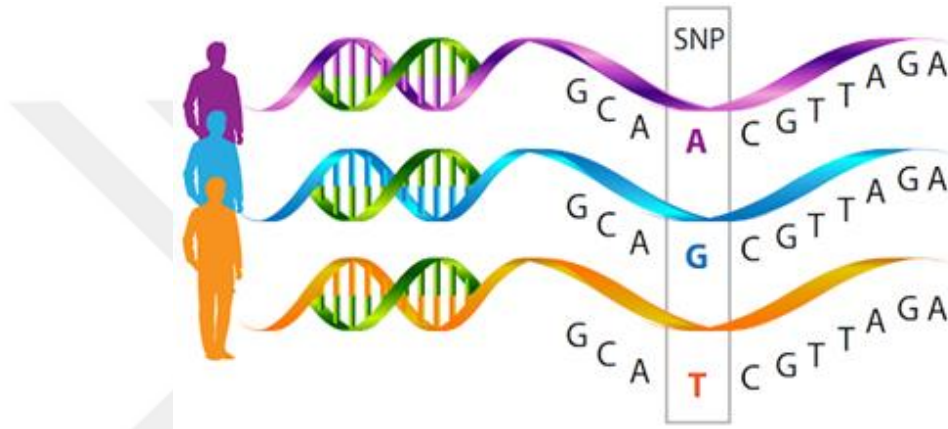
Şekil 2-17. Meme kanseri güncel ilaç kombinasyon tedavilerinin şematik gösterimi ²⁴¹

Hormon tedavisinin birçok meme kanseri hastasında yararlı etkiler ortaya çıkardığı gösterilmiş olsa da, uzun süreli östrojen stimülasyonu nedeniyle belirli dokulara (örn. kemik, kalp ve beyin) zararlı olabilir²⁶³. Ayrıca, bazı hastalarda hormon tedavisine karşı antagonist reaksiyonlar olabilmektedir. Bu nedenle, yan etkiler hormon tedavisinin yararlılığını sınırlar ve daha yeni kombinasyon tedavilerinin geliştirilmesi için çalışmalar devam etmektedir²⁸⁶. Endokrin tedavisinin yanı sıra moleküler hedefli tedavi ile birlikte kullanımı da araştırılmaktadır. Özellikle moleküler hedefleme bileşikleri ile birleştirilmiş endokrin tedavisi düşünülmektedir. Örneğin, mTOR, PI3K, CDK4/6 ve PI3K/mTOR inhibitörlerini hedefleyen bileşikler içermektedir²⁴¹. Bir başka düşünülen kombinasyon ise endokrin tedaviyle birleştirilmiş hedefe yönelik tedavidir. Endokrin tedaviyle birleştirilmiş hedefe yönelik tedavi, endokrin tedavilere direnç geliştirmiş ileri evre meme kanseri olan HR+ hastalarında değerlendirilmiştir²⁸⁷. Aromataz inhibitörü olan Letrozol ile yapılan bir çalışmada, Letrozol tek başına ve selektif bir mTOR inhibitörü olan Everolimus ile birlikte verilmiştir. Faz-2 klinik çalışması olan bu çalışmada, tek başına verilen Letrozol kombinasyon tedavisiyle birlikte verildiğinde sağkalımı (PFS- the median progression-free survival) 9 aydan 22 aya yükseltmiştir²⁸⁷⁻²⁸⁹. Bu çalışmanın sonuçları, mTOR sinyal yolunun ve östrojen reseptörünün kombine inhibisyonunun, ilerlemiş meme kanseri olan hastalarda endokrin tedaviye direnci baskılayabileceğini veya geciktirebileceğini göstermiştir²⁸⁷. Bir başka çalışmada da, endokrin dirençli HR+, HER2- meme kanserli postmenopozal kadınlarda Everolimus endokrin tedavisi ile

kombine edilmiştir. Tek başına endokrin tedavisi ile karşılaştırıldığında, sağkalım (PFS) ve objektif yanıt oranında önemli bir iyileşme ile sonuçlanmıştır²⁹⁰. Aromataz inhibitörü ve CDK 4/6 inhibitörünün kombinasyonu yapılan bir çalışmada da sağkalım 14,9 aydan 28 aya çıkarılmıştır²⁹¹.

2.3. Gen Polimorfizmi ve Kanser İlişkisi

SNP'ler, genomdaki en sık varyasyon türleridir. DNA hasar onarımını, hücre döngüsü regülasyonunu, metabolizmayı ve immün sistemini regüle eden genlerin SNP'leri, kansere karşı yatkınlıkla ilişkilidir^{292,293}.



Şekil 2-18. Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) şematik gösterimi²⁹⁴

(<https://www.creative-biolabs.com/drug-discovery/diagnostics/single-nucleotide-polymorphisms-analysis.htm> den uyarlanmıştır. Erişim tarihi: 10.12.2022)

SNP'ler, insanlar arasında en yaygın genetik varyasyon biçimleri olan tek genetik kod varyasyonlarıdır. Genellikle, SNP'ler bialeliktir (iki alternatif baz) ve popülasyonda minimum frekansa (>%1) sahiptir²⁹⁴(Şekil 2-18). Çeşitli kanser türleri ile ilişkili çok sayıda gen, tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) içerir. SNP'ler gen promotörlerinde, ekzonlarda, intronlarda ve 5' ve 3' çevrilmemiş bölgelerde bulunur ve gen ekspresyonunu farklı mekanizmalarla etkiler²⁹⁵.

Araştırmalar, SNP nin , bireyin MK olup olmadığını daha iyi tahmin edebileceğini ve hastalık yönetimine rehberlik edebileceğini gösteriyor^{296,297}. Bazı SNP'ler meme kanserine yatkınlığı etkiler²⁹⁸. *BRCA1* ve *BRCA2* gen mutasyonlarını^{299,300} ve yüksek mobilite grubu kutu proteini 1 (HMGB1) ve fascin-1 (FSCN1)^{301,302} gibi genetik polimorfizmleri taşıyanlarda meme kanseri riski daha yüksektir. Yüksek mobilite grubu kutu proteini 1 (HMGB1), tüm memeli ökaryotik hücrelerinde bulunan ve tümör

ilerlemesi, göçü ve metastazına katılan her yerde bulunan bir nükleer proteindir. HMGB1 nin aşırı ekspresyonu meme kanseri hastalarında gözlemlenmiştir³⁰².

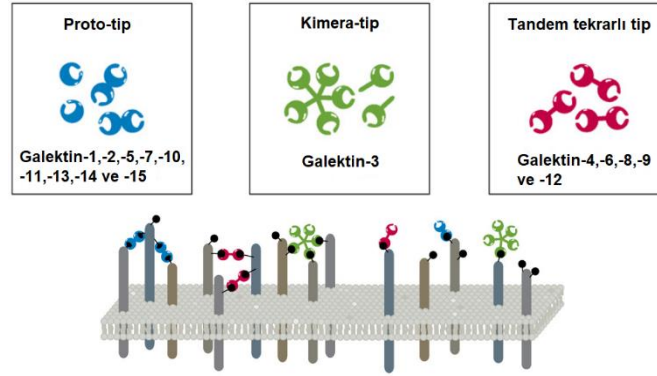
Galektin-3'ün en çok bilinen (rs4644 ve rs4652) iki tek nükleotid polimorfizmi (SNP) lokusu vardır. rs4644 polimorfizminde Gal-3 kodlayan genin 64. konumundaki histidin kalıntısıyla prolin kalıntısı değiştirilir. Bu arada, SNP rs4652'de Gal-3 kodlayan genin 98. konumundaki treonin kalıntısıyla prolin değiştirilir^{303,304}.

2.4. Galektinlerin Yapısı ve Sınıflandırılması

Galektinler, karakteristik ~130 amino asit (aa) karbonhidrat tanıma alanları (CRD'ler) içinde bulunan korunmuş p-galaktozid bağlama bölgelerine dayanan bir protein ailesi olarak tanımlanmaktadır³⁰⁵. Yapılan çalışmalarda, galektinlerin sitozolik proteinler olarak sentezlendikleri, yaşamlarının büyük bir bölümünde sitozol veya çekirdekte kaldıkları ve galaktozid ligandlarına ancak Golgi kompleksini atlayan klasik olmayan sekresyondan sonra ulaştığı anlaşılmıştır³⁰⁶. 1975 yılında, elektrikli yılan balığının organlarından 15 kDa'lık yeni bir lektin izole edilmiş ve "elektrolektin" olarak adlandırılmıştır³⁰⁷. Bu kovalent olmayan şekilde bağlı homodimer, b-galaktozidler tarafından inhibe edilebilen tripsinize tavşan eritrositlerine karşı hemagglütinasyon aktivitesi sergilemiştir. Kısa bir süre sonra, 1976'da, benzer b-galaktozid bağlayıcı lektinler, tavuk kasından, buzağı kalbi ve akciğeri ekstraktlarından da izole edilmiş olup, 15 kDa; büyüklüğündeki bu lektin galektin-1 olarak adlandırılmıştır³⁰⁸.

Galektinler, glikoproteinlere (integrinler, büyüme faktörleri, fibronektin, vb.) kovalent olarak bağlanan dallı N-glikanlar üzerindeki N-asetillaktozamin kalıntılarını bağlar. Bu çok değerlikli glikoproteinler, protein başına N-glikan sayısında değişiklik gösterir ve bazı galektinlerin oligomerizasyonunu indükleyebilir³⁰⁹.

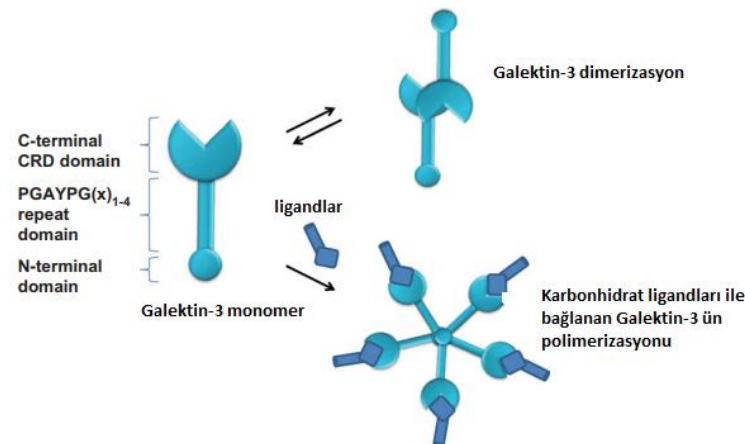
Galektinler, glikokonjugatlar üzerindeki β -galaktozid kalıntılarına bağlanan çözünür lektinlerdir³¹⁰. Yüksek oranda korunmuş karbonhidrat tanıma alanlarını (CRD'ler) paylaşan bir memeli β -galaktoside bağlayıcı protein ailesidir³⁰⁵. Bugüne kadar 15 galektin üyesi tanımlanmıştır ve bunlar yapısal farklılıklarına ve polipeptit zincirlerindeki CRD sayısına göre üç alt gruba ayrılır³¹¹. Galektin 1,2,5,7,10,11,13,14 den oluşan Prototip grubu, tandem tekrar galektinler (Galektin-4, -6, -8, -9 ve -12) ve kimera galektinler-Galektin-3³¹² (Şekil 2-19). Galektin-3'ün yapısı, N-terminal alanında bir araya gelerek homodimerlere veya oligomerlere dönüşür. Bu nedenle, oligomer formu nedeniyle galektin-3, diğer galektinlerden benzersiz biyolojik özelliklere sahiptir^{311,313,314}.



Şekil 2-19. Galektinlerin tipleri ve membrana bağlanma şekilleri³¹⁵

2.4.1. Galektin-3

Galektin-3; hücre dışı, sitoplazma ve çekirdek olmak üzere hücrenin çeşitli bölümlerinde lokalize olan ve çeşitli insan hücreleri tarafından eksprese edilen bir memeli b-galaktozit bağlayıcı proteindir³¹⁶. Yaklaşık 30 kDa'lık bir beta-galaktozid bağlayıcı hayvan lektinidir ve evrimsel olarak yüksek oranda korunmuştur³¹⁷⁻³¹⁹. Galektin-3, C-terminalinde bir CRD'den ve alışılmadık bir esnek 110-130 amino asitten, N-terminal alanından (ND) oluşur^{320,321} (Şekil 2-20). Galektin-3 ND, 9 amino asit dizisinin 7-14 tekrarından oluşur: ProGlyAlaTyrProGlyXXX ve Kolajen $\alpha 1$ (II) zincirine homolojisinden dolayı kolajen benzeri bir ND olarak anılır³²². Galektin-3'ün ND'si, galektin-3 multimerizasyonu için esastır ve MMP-2 ve MMP-9 matris metalloproteinazları tarafından proteolize duyarlıdır^{323,324}.



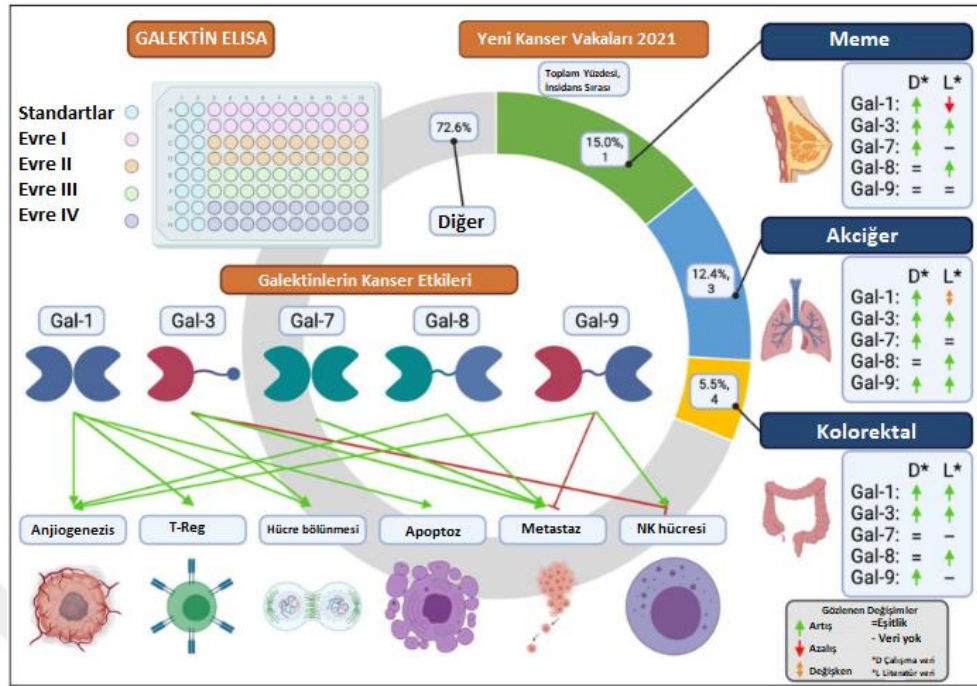
Şekil 2-20. Galektin-3'ün yapısı ve galektin-3 dimerizasyonunun monomerik yapısının, bağlayıcı ligandın yokluğunda C-terminali yoluyla ve karbonhidrat bağlayıcı ligandların varlığında N-terminali yoluyla polimerizasyonun şematik temsilleri³¹⁶.

Galektin-3 ND'nin ilk 12 amino asidi, galektin-3 salgılanmasının yanı sıra galektin-3 nükleer translokasyonu için gereklidir, yüksek oranda korunan Ser6 kalıntısı, galektin-3'ün anti-apoptotik aktivitesinde yer alır³²⁵.

Galektin-3, galaktoz sonlu glikanlara basit galaktoza göre daha güçlü bağlanır. Örneğin, laktoz (Lac) ve N-asetillaktozamin (LacNAc), galektin-3 için galaktozdan çok daha güçlü ligandlardır. LacNAc ayrıca galektin-3 için Lac'tan 5 kat daha yüksek afiniteye sahip olduğunu gösterir^{326,327}. Galektin-3 ayrıca karbonhidrattan bağımsız bir şekilde protein-protein etkileşimleri yoluyla birçok hücre içi protein ile de etkileşime girebilir^{88,328,329}. Galektin-3'ün hücre büyümesi, hücre yapışması, hücre-hücre etkileşimi, apoptoz, anjiyogenez ve mRNA işleme gibi sayısız biyolojik işlevi düzenlediği rapor edilmiştir³³⁰. Galektin-3, biyolojik aktiviteleri ve yapısı bakımından hayvan lektinlerinin galektin ailesi arasında benzersizdir. Galektin-1 dahil galektin ailesinin çoğu üyesi apoptotik aktivitelere sahipken, galektin-3 anti-apoptotik aktiviteye sahiptir. Galektin-3 aynı zamanda tek kimera tipi galektindir ve lektin olmayan bir N-terminal alanından ve bir C-terminal karbonhidrat bağlama alanından oluşur³¹⁴. Galektin-3 salgı sinyal dizisi olmadan hücre yüzeyine, hücre dışı boşluğa ve dolaşıma taşınır³³¹. Galektin-3'ün hücrelerde substratlarla bağlandığını bildiren birçok çalışma yapılmıştır. Örneğin, hücre içi Bcl-2, T hücre apoptozu^{332,88,333} inhibe etmek için galektin-3 ile bağlanır. Ayrıca, galektin-3, TCR ekspresyonunu kısıtlamak ve aşağı regüle etmek için hücre yüzeyindeki T-hücre reseptörü (TCR) ile bağlanır, böylece T hücrelerinin TCR aracılı erken aktivasyonunun inhibisyonu ile sonuçlanır^{334,335}. Galektin-3 hücre dışı boşluğa ulaştığında, hücre dışı matris (ECM) veya hücre yüzeyi polilaktozamininden zengin moleküller ile reaksiyona girer ve hücre dışı olarak tümör ilerlemesini düzenlemede anahtar rol oynar^{336,337}.

2.4.2. Karsinogenez ve Galektin-3 İlişkisi

Galektinlerin karbonhidrat bağlama özellikleri, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerinin ve kanserin ilerlemesinin temelini oluşturur. Galektinlerin meme, kolon ve akciğer kanseri gibi çeşitli kanser hastalarında dolaşımdaki seviyelerinin özellikle artış gösterdiğini ve genel olarak değiştiğini gösteren birçok çalışma mevcuttur^{338,339} (Şekil 2-21).



Şekil 2-21. Galektin-3'ün çeşitli kanser türlerinde gösterdiği artış³³⁸.

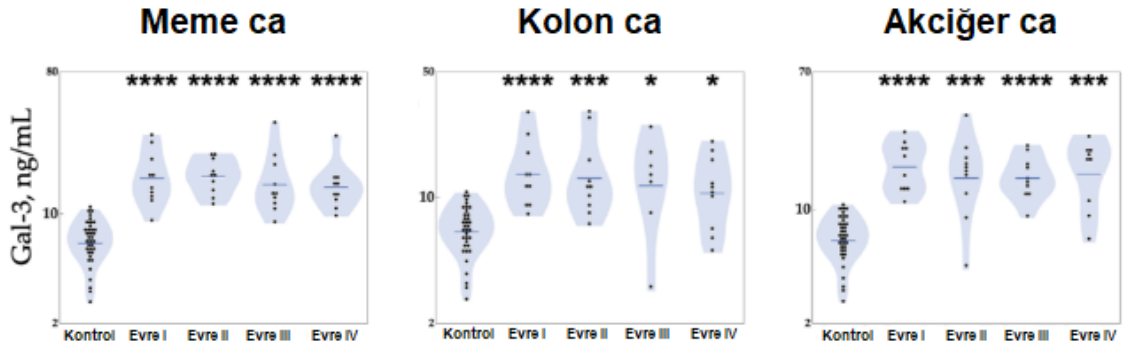
Galektin-3'ün çok çeşitli kanser hücresi aktivitelerinin önemli bir düzenleyicisi olduğu ve kanser hücresi büyümesi, transformasyonu, apoptoz, anjiyogenez, adezyon, istila ve metastazda önemli roller oynadığı giderek daha fazla kabul edilmektedir. Galektin-3'ün kanser hücresi aktiviteleri üzerindeki böyle farklı bir etkisi, bir dizi farklı bağlanma ortağı ile etkileşime girdiği çoklu hücreler arası ve hücre altı lokalizasyonlarından kaynaklanır³¹⁶. Galektin-3 en çok çalışma yapılan ve karakteri anlaşılan galektindir. Metastatik meme kanserine aracılık eden moleküler mekanizmaların modülasyonunda yer almaktadır³⁴⁰. Galektin-3'ün ayrıca $\beta 1$ integrin üzerindeki glikanları bağladığı ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde fibronektin yeniden şekillenmesini, hücre göçünü ve ilaç direncini düzenlediği gösterilmiştir^{341,342}. Gal-3'ün tümörlerde ekspresyonu ile hastalarda prognostik değer arasındaki ilişkiyi gösteren birçok rapor vardır. Bununla birlikte, Gal-3'ün prognostik değeri, tümör tipine bağlı görünmektedir. Genel olarak, Gal-3'ün ekspresyonu birçok kanser türünde yukarı regüle edilir, ancak hayatta kalma oranlarının arttığını veya azaldığını bildiren çalışmalarda değişken sonuçlar vardır³⁴³. Galektin-3, tümör mikroçevresinde (TME) de önemli bir rol oynar. TME'de hücre içi ve hücre dışı galektin-3'ün farklı işlevleri vardır. Ek olarak, galektin-3'ün tümörlerde glikoliz ve mitokondriyal metabolizma ile ilişkili olduğu ve ilgili sinyal yollarının düzenlenmesinde yer aldığı ve böylece TME'ye uyum sağlayarak

kanser hücresinin hayatta kalmasını desteklediği bildirilmiştir³⁴⁴. Makrofajlar, tümör dokusunda bulunan en bol immün hücre popülasyonudur ve bu hücreler, tümörle ilişkili makrofajlar (TAM'ler) olarak adlandırılır^{345,346}. TAM'lerin yoğunluğunun kötü bir prognoz ile ilişkili olduğu ve birkaç çalışmada tümörün ilerlemesi ile pozitif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir. Gal-3, CCL-22, TGF- β , CCL-17, arginaz 1 ve IL-10 gibi diğer sitokinler ve proteinler gibi TAM'ler tarafından eksprese edilir³⁴⁵. Gal-3, tümör stromasına salgılanır ve tümörün ilerlemesine katkıda bulunan tümör mikroçevresinde önemli bir rol oynar. Gal-3 aynı zamanda vasküler endotelial büyüme faktörünü düzenleyerek tümör anjiyogenezini de etkiler³⁴⁷. Kanser hastalarının hayatta kalma ve prognozu sadece kanser hücreleri ile değil, aynı zamanda kanser hücreleri, bağışıklık hücreleri, stromal hücreler, ECM ve diğer bileşenlerden oluşan tümör mikro-ortamı (TME) ile de ilişkilidir. Ayrıca TME, tümör büyümesine, istilasına, metastazına ve immünosupresyona katkıda bulunur. Örneğin, tümörle ilişkili makrofajlar, fibroblastlar ve tümör hücrelerinin, bağışıklık tepkisinde yer alan baskılayıcı sitokinler ve kemokinler salgıladığı iyi bilinmektedir. Ayrıca, inhibitör metabolitlerin üretimi, katı ECM'ye bağlı migrasyon başarısızlığı, zayıf antijen ekspresyonu ve azalmış TCR sinyalinin tümü, tümörün ilerlemesine katkıda bulunur³⁴⁸. Tümör tarafından salgılanan galektin-3'ün, TME'de interferon- γ (IFN- γ) geçişini engellediği, böylece CXC motifli kemokin ligand 9 içeriğinin azalmasına ve CD8⁺ T hücrelerinin tümöre alımının azalmasına neden olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, galektin-3 inhibitörleri ile tedavi, TME'de IFN- γ ve kemokinlerin içeriğini geri kazanırken, bağışıklık hücresi infiltrasyonu arttırdığı gösterilmiştir³⁴⁹.

Gal-3 aktivitesini azaltan RAS inhibitörü Salirasib ve modifiye bir narenciye pektinini kullanan yeni bir ilaç kombinasyonu, kanseri tedavi etmek için potansiyel sinerjistik hedefler olarak KRAS ve Gal-3'ün önemini vurgulamaktadır³⁵⁰. Gal-3'ün, metastatik kaskadın ilk adımları sırasında, inflamasyonu ve endotel geçirgenliğini birbirine bağlayan önemli bir pro-inflamatuar aracı olduğu öne sürülmüştür. Gal-3, IL-6 ve G-CSF salgılanmasını uyararak, integrin $\alpha_5\beta_1$, vasküler hücre adhezyon molekülü-1 ve E-selektin dahil olmak üzere metastazla ilişkili yapışma moleküllerinin yukarı regüle ekspresyonuna yol açar³⁵¹. TGF- β sinyali, TGF- β reseptörünün ve diğer sitokin reseptörlerinin ekspresyonunu düzenler ve reseptörler üzerine dallı N-glikanların eklenmesini destekler. Bu sitokin reseptörlerinin aşağı akış sinyalinin, bir EMT fenotipini korumak için Mgat5'in transkripsiyonunu düzenlediği gösterilmiştir. Reseptör endositozunun düzenlenmesi,

hücre zarı ve hücre dışı matristeki glikoproteinler üzerindeki dallı N-glikanlarla galektin-3'ün bağlanmasına ve oligomerizasyonuna bağlıdır³⁴⁰. Dallanmış N-glikanlar, hücre göçüne ve matrisin yeniden şekillenmesine aracılık eder³⁵². Mgat5'e galektin bağlanması meme tümörü hücre çoğalmasını, göçünü, fibronektin matrisinin yeniden şekillenmesini ve metastazı teşvik eder³⁵²⁻³⁵⁴. Mgat5 kanserde yüksek oranda eksprese edilirken, malignitede rol oynayan tek glikoziltransferaz değildir. Golgi'de bulunan glikosiltransferazlar, glikoproteinlerin translasyon sonrası modifikasyonuna katılır. SKBR-3 meme kanseri hücrelerindeki N-glikan profili, monoklonal antikor olan trastuzumabın bağlanmasını bloke eder ve ayrıca doksorubisine duyarlılığın azalmasını gösterir³⁵⁵. N-bağlı glikosilasyonun bir inhibitörü olan tunikamisin ile tedaviyi takiben, SKBR-3 hücreleri doksorubisine karşı artan bir duyarlılık ve buna karşılık olarak mitojenik büyüme faktörlerine karşı azalan duyarlılık sergiledi³⁵⁵. Bu nedenle, glikokaliksin antikanser tedavilerinin etkisini yapısal olarak engellediği görülmektedir. Glikokaliksin yukarı regülasyonu, kanser hücresi yapışmasını, büyümesini ve hayatta kalma sinyalini artırır³⁵⁶. Spesifik olarak, glikokaliks kondroitin sülfatın kondroitinaz ABC sindirimi, MCF-7 meme kanseri hücresel yapışmasında bir azalmaya yol açar, bu da glikokaliksin integrinleri yapışma bölgelerine alarak integrin ligasyonunu ve aktivasyonunu düzenlediğini düşündürür³⁵⁶. Bu mümkündür, çünkü integrinler kondroitin sülfat glikozaminoglikan için aktif bir bağlanma bölgesi içerir³⁵⁷. Galektinler, glikan bağlanmasına ve galektin oligomerizasyonuna bağlı olan epitel hücreleri için transselüler bir bariyer oluşturmak üzere müsinlerle etkileşime girdikleri glikokalikte lokalizedir.^{358,359} Galektinlerin, kondroitin sülfat (-A, -B ve -C) ile tümör hücrelerinin hareketliliğini modüle etmede rol oynamak için glikokaliksin diğer bileşenleri ile etkileşime girdiği de gösterilmiştir^{360,361}.

Galektin-3 serum düzeylerinin kanserli olmayan bireylerle karşılaştırıldığında meme kanserli hastalarda önemli ölçüde yüksek olduğu gösterilmiştir, bu da galektin-3'ün kanser hücrelerinin damar içi ve damar dışına çıkışında bir rolü olduğunu düşündürmüştür³⁶². Galektin-3, hipoksik koşullar sırasında yukarı regüle edilir ve EMT'yi, göçü ve nihayetinde meme kanseri metastazını teşvik etmek için hareket etmektedir³⁶³⁻³⁶⁵. Sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında meme kanseri hastalarının serum numunelerindeki Galektin-3 seviyelerinde önemli bir artış bulgusu saptanan birçok çalışma yapılmıştır. Meme kanserinin yanı sıra akciğer ve kolon kanserinde de dolaşımda artış gösterdiği görülen bir çalışma mevcuttur³³⁸ (Şekil 2-22).



Şekil 2-22. Gal-3 serum düzeylerinin çeşitli kanser türlerinde yükseldiğini gösteren grafikler³³⁸

Yukarıda bahsedildiği gibi neoplazmalarda, özellikle habis tümörlerde Gal-3 ekspresyonu karmaşıktır. Gal-3, yalnızca tümör hücreleri tarafından değil aynı zamanda TAM'ler dahil tümörle ilişkili bağışıklık hücreleri tarafından da üretilir. sGal-3, kanser hastalarındaki patolojik durumlara göre değişen farklı klinik faktörler tarafından etkilendiğinden, kendisi kansere spesifik biyobelirteç değildir fakat birçok hastalığın erken evre dönemini hedeflemek için potansiyel olarak görülmektedir³⁶⁶.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Çalışılan Numunelerin Seçilmesi ve Saklanması

Bu çalışmada SK ve MK grubu olmak üzere iki örnek grubu kullanılmıştır. SK grubu, kendinde ve ailesinde kanser öyküsü olmayan sağlıklı 50 bireyi içermektedir. Hasta grubu ise, İ.Ü. Tıp Fakültesi Cerrahi Kliniği ve Çam ve Sakura Şehir Hastanesi'nde takip edilen 76 meme kanserli kadın hastadan oluşmaktadır. Projemizde çalışılan, meme kanserli hasta grubunun, klinik ve patolojik değerlendirmeleri ile örnek alımları ilgili klinikler tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya katılan her hasta ve kontrol grubuna bilgilendirilmiş ve onam formu imzalatılmıştır. Çalışmaya İÜ Tıp Fakültesi'nin Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun izniyle başlanmış olup onay belgesi ekte paylaşılmıştır. Sağlıklı ve MK bireylerinden alınan kanlar EDTA katkılı tüplere konulmuş ve polimorfizm çalışmak amacıyla DNA izolasyonları yapılmıştır. Çalışma süresine kadar numuneler -20 °C sıcaklıktaki uygun soğutucularda saklanmıştır. 76 MK hasta ve 50 SK de Gal-3'e ait olan gen polimorfizm analizlerinin yanı sıra sGal-3'ün düzeylerine de bakılmıştır. Çalışmanın deneysel aşamaları İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar DETAE Moleküler Tıp Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Derin Dondurucu (Daihan Scien.-20°C), Buzdolabı (+4°C Beko,Arçelik), PCR cihazı (Thermal cycler- T100™ Biorad ve 96 well Veriti-Applied Biosystems) , Hassas Terazı (Scaltec SBA 53) , Analitik Terazı (Shimadzu AX200), Vorteks (Microspin FV-2400 Biosan) , pH/mV metre (Selectra Lab PHS-25 CW), Jel Elektroforez Sistemi&Yürütme Tankı (EC250-90 E-C Apparatus Corporation), Çeker Ocak , Etidyum Bromür Çalışma Kabini, Saf Su Cihazı (Elektro-Mag), Su Banyosu (Elektro-Mag) , Mikrodalga Fırın (Philco), Etüv-Sterilizatör (FN 400) , Spektrofotometre cihazı (Nanodrop-Maestrogen MN-913), Otomatik mikropipetler (Thermo,Eppendorf), Soğutmalı santrifüj (Hettich Universal 320R), Jel Görüntüleme Sistemi (Kodak Transluminatör GEL-Logic 100 Imaging System), Isıtıcı blok (Hotplate Assistant), Otoklav, Manyetik Karıştırıcı.

3.1.3. Kullanılan Kimyasal ve Kitler

Galectin 3 Human ELISA Kit 96 Test (Thermo Fisher) , Primerler (Thermo Fisher-50 nmol), StyI kesim enzimi (ECO130I (STYI) EA Thermo Fisher), BsaI kesim enzimi (NEB-Recombinant), Taq Polimeraz (i-StarTaq DNA Polymerase-500 Unit Introbio), Borik asit (Biotechnology Grade 1 kg-Bioshop Canada), Tris-Base (Ultrapure 500 g-Bioshop) , Borik asit (B-6768/ Sigma marka), Etidyum Bromür (Sigma E-8751-10mg/ml), Amonyum klorür (A-5666/Sigma marka), Potasyum bikarbonat (Merck marka K-126223552), Etilendiamintetraasetikasit (9884/Sigma marka), Bromfenol blue (Sigma marka B-6896), Sodyum hidroksit (C754962/Merck marka), Hidroklorik asit (Sigma, H1758), Amonyum asetat (Sigma A-8920), PBS (Fosfat tampon çözeltisi), Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (Sigma, L4390), Proteinaz K (Sigma, P2308), Ultrapure Agaroz (Promega MBG), DNA Marker (Generuler 50bp ve 100bp DNA Ladder-Thermo Fisher-50 ug), Etil alkol (%99 ve %70) (Merck), Asetik asit (K-04134156/Merck marka), Ksilen siyanol (X4126/Sigma marka) , Sodyum Klorid (S3014/ Sigma marka).

3.1.4. Kullanılan Tampon Solüsyonları ve Çözeltiler

3.1.4.1. DNA İzolasyonu ve Kullanılan Solüsyonlar

3.1.4.1.1. Lysis Buffer - Eritrosit Parçalama Solüsyonu

İlk olarak 1N NaOH çözeltisi ve 0,5 M EDTA aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı.

3.1.4.1.1.1. 1 N NaOH çözeltisinin hazırlanışı

NaOH'in molekül ağırlığı =40g/mol olduğu için 1 N NaOH hazırlamak için, 1 litre distile suya 40 g NaOH eklenmesi ile çözelti hazırlanır. Ancak laboratuvarında kullanılan NaOH %99 luk olduğu için $40 \times 100 / 99 = 40,40$ g NaOH tartıldı ve distile suda çözündürülerek 1 litreye tamamlandı ve çözelti hazırlandı.

3.1.4.1.1.2. 0,5 M EDTA çözeltisinin Hazırlanışı

- 186,1 gram EDTA (disodyum etilendiamin tetraasetat.2H₂O)
- 800 ml distile su
- Sodyum Hidroksit (NaOH) çözeltisi veya katı (pH'ı ayarlamak için)

Bir cam şişeye 186.1g disodyum etilendiamin tetraasetat (EDTA) tartılarak üzerine 800 ml distile su eklendi. Oluşan çözelti manyetik karıştırıcıda karıştırılıp iyice çözüldüğünden emin olduktan sonra çözeltinin pH değerini 8.0'a getirmek için NaOH eklenmiştir. pH'ı aşmamak için NaOH çözeltisi yavaş yavaş eklenmiştir. pH ayarı pH metre ile kontrol edildikten sonra çözelti distile suyla 1 lt olacak şekilde üzeri tamamlanmış ve 120 °C sıcaklıkta 15 dakika süreyle otoklavlanmıştır.

3.1.4.1.1.3. Eritrosit Parçalama Tamponunun Hazırlanışı

Bir erlene 8,74 gr NH_4Cl , 1 gram KHCO_3 ve 200 µl 0.5 M EDTA (Etilen diaminetetraasetat) konulmuştur. Daha sonra 900 ml distile su eklendikten sonra 1N NaOH çözeltisi ile çözeltinin pH değeri 7.4'e ayarlanmıştır. pH metre ile kontrolü yapıldıktan sonra balon jojeye alınarak çözelti toplamda 1 litre olacak şekilde hazırlanmıştır. Oluşan çözeltiyi laboratuvarıda çalışmaya uygun ısı dayanımı olan cam şişelere aktardıktan sonra 120 °C sıcaklıkta 15 dakika süreyle otoklavlanmıştır ve +4 °C sıcaklıktaki uygun soğutucularda saklanmıştır.

3.1.4.1.2. WBL (White Blood Cell Lysis Buffer) Lökositleri Parçalama Tamponu

İlk olarak 4 M NaCl ve 0,5 M EDTA (Etilen diaminetetraasetat) aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

3.1.4.1.2.1. 4 M Sodyum Klorür (NaCl) Çözeltisi

233.6 gr sodyum klorür hassas terazide tartılmış ve cam erlene konulmuştur. Tartım işleminden sonra 800 ml su eklenmiş ve manyetik karıştırıcı cihazında güzelce çözünmesi sağlanmıştır. Cam şişeye alınan karışım toplamda 1 litre olacak şekilde hazırlanmıştır. 120 °C sıcaklıkta ve 15 dakika süreyle otoklav cihazında steril edilmiştir ve çıkarıldıktan sonra oda ısısında saklanmıştır.

3.1.4.1.2.2. 0,5 M EDTA çözeltisinin Hazırlanışı

- 186,1 gram EDTA (disodyum etilendiamin tetraasetat.2H₂O)
- 800 ml distile su
- Sodyum Hidroksit (NaOH) çözeltisi veya katı (pH'ı ayarlamak için)

Bir cam şişeye 186.1g disodyum etilendiamin tetraasetat (EDTA) tartılarak üzerine 800 ml distile su eklendi. Oluşan çözelti manyetik karıştırıcıda karıştırılıp iyice çözüldüğünden emin olduktan sonra çözeltinin pH değeri 8.0 olacak şekilde dikkatlice

NaOH çözeltisi eklenmiştir. pH'ı aşmamak için NaOH çözeltisi yavaş yavaş eklendi. pH ayarı ph metre ile kontrol edildikten sonra çözelti suyla 1 lt ye tamamlanmış ve 120 °C sıcaklıkta 15 dakika süreyle otoklavlanmıştır.

3.1.4.1.2.3. Lökositleri Parçalama Tamponu (WBL) hazırlanışı

4 M sodyum klorürden 25 ml ve 0.5 M'lık Etilendiaminasetattan 50 ml alınarak cam şişeye konulmuştur. Suyla 1 litreye tamamlandıktan sonra 120 °C sıcaklıkta ve 15 dakika süreyle otoklavlanmıştır. Oda sıcaklığında daha sonra kullanmak amacıyla saklanmıştır.

3.1.4.1.3. Proteinaz K

Hassas terazide ve steril kapta olacak şekilde 20 mg proteinaz K tartılmış ve steril su eklenerek 1 ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Uygun soğutucuda -20 °C sıcaklığında saklanmıştır.

3.1.4.1.4. Amonyum Asetat Hazırlanması

9,5 M amonyum asetat hazırlamak için öncelikle 73,22 gr alınarak hassas terazide tartılmış ve uygun bir cam beher içine konulmuştur. Daha sonra 100 ml bidistile su eklenmiş ve 40 °C sıcaklığa ayarlanmış ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda iyice eritilmiştir. Daha sonra çözelti gözenek çapı 0,22 mikron büyüklüğünde olan filtreden geçirilmiştir. Steril hale gelen çözelti saklanmak üzere +4 °C soğutucuya kaldırılmıştır.

3.1.4.1.5. SDS

%10 luk sodyum dodesil sülfat hazırlamak için öncelikle 10 gram terazide tartılmış ve cam behere alınmıştır. 100 ml bidistile su üzerine dikkatlice eklenmiş ve manyetik karıştırıcıda iyice çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra ph metre ölçüm kontrolleri yapılmış ve ph değeri 7.2 olacak şekilde ayarlanmıştır. Steril etmek amacıyla 0,22 mikron gözenek çapı olan filtreden geçirilmiştir. Böylelikle steril edilen çözelti çalışmada kullanılmak üzere oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.1.4.1.6. Tris Tamponu

1 M tampon hazırlamak için, 121,1 gr Tris hassas terazide tartılmıştır. Tartım işleminin ardından 42 µl HCl, 800 ml distile sui le birlikte tartılan Tris'in üstüne eklenmiştir. Manyetik karıştırıcı cihazında iyice çözünmesi sağlanan çözelti cam bir şişeye alınmış ve tamamı 1 lt olacak şekilde hazırlanmıştır. 120 °C sıcaklıkta 15 dakika süreyle otoklavlanmış ve steril hale getirilmiştir.

3.1.4.1.7. Tris EDTA

Diğer ismiyle Tris Buffer hazırlamak için 10 ml miktarında 1 M Tris HCL ile 20 ml 0.5 M EDTA dikkatlice distile su eklenerek tamamı 1 L olacak şekilde tamamlanarak hazırlanmıştır. Daha sonra otoklavlanmış olan çözelti çalışmada kullanmak üzere oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.1.4.1.8. 5 X TBE Hazırlanışı

Tris baz, EDTA ve borik asit karışımından meydana gelen 5X TBE hazırlamak için önce 54 gr Tris bazı ile 27,5 gr borik asit hassas terazide tartılmış ve cam bir beher içine konulmuştur. Tartılan bu karışımın üstüne 20 ml miktarda 0,5 M olan EDTA eklenmiştir. Sonrasında da cam bir şişeye alınarak üzerine 800 ml distile su eklenmiş ve iyice çözünene kadar manyetik karıştırıcı cihazında karıştırılmıştır. Oluşan bu çözelti tamamı 1 L olacak şekilde tamamlanmış ve 120 °C sıcaklıkta 15 dakika süreyle steril edilmek için otoklavlanmıştır.

3.1.4.2. Elektroforezde Kullanılan Solüsyonlar, Tamponlar ve Çözeltiler

3.1.4.2.1. Yükleme Tamponu

Yükleme tamponu hazırlamak için sırayla 1 gr SDS, 0,2 ml Etilen diamintetraasetat (0,5 M), 20 gr Ficoll 400, 1 ml 1M Tris, 200 miligram Xylene Cyanol ve 200 ml Bromfenol Blue hassas terazide tartılmış ve steril edilmiş distile su eklenerek tamamı 100 ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltinin saklama koşulları oda sıcaklığında olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.1.4.2.2. Etidyum Bromür

Hassas terazide 1 gr tartıldıktan sonra tamamı 10 ml olacak şekilde steril edilmiş distile su ile tamamlanmıştır.

Agaroz ve poliakrilamid jellerde DNA'yı belirlemek için fluorezan bir boya olan EtBr (Etidyum Bromür) kullanılır. Bu boya DNA baz çiftlerinin arasına bağlanarak DNA'yı görünür kılar.

3.1.4.2.3. 5X TBE Hazırlanışı

Tris baz, EDTA ve borik asit karışımından meydana gelen 5X TBE hazırlamak için önce 54 gr Tris bazı ile 27,5 gr borik asit hassas terazide tartılmış ve cam bir beher içine

konulmuştur. Tartılan bu karışımın üstüne 20 ml miktarda 0,5 M olan EDTA eklenmiştir. Sonrasında da cam bir şişeye alınarak üzerine 800 ml distile su eklenmiş ve iyice çözünene kadar manyetik karıştırıcı cihazında karıştırılmıştır. Oluşan bu çözelti tamamı 1 L olacak şekilde tamamlanmış ve 120 °C sıcaklıkta 15 dakika süreyle steril edilmek için otoklavlanmıştır.

3.2. Yöntemler

3.2.1. DNA izolasyonu (Tuzla Çöktürme)

Meme kanserli ve sağlıklı kadınlardan sağlanan kan örneklerinden DNA izolasyonu tuz çöktürme metoduyla elde edilmiş olup, amonyum asetat ve proteinaz K kullanılmıştır. Bu yöntem, hücresel proteinlerin dehidrasyon ve doymuş bir NaCl çözeltisi ile çökeltme yoluyla tuzlanmasını içerir³⁶⁷.

Araştırmamızda kullanılan numunelerden EDTA katkılı steril tüplere 10 ml miktarda periferik kan alınmış ve izolasyon analizi yapmak üzere falkon tüplerine konulmuştur. Sonrasında 1:3 oranında olacak şekilde 30 ml Lysis Buffer üstüne eklenmiştir ve +4 °C sıcaklıkta 15 dakika kadar bekletildikten sonra alınan numuneler 10 dakika süreyle 1500 rpm hızda edilmiştir. Oluşan süpernatantlar atıldıktan sonra pelletler tamamen süspanse edilmiştir. Sonrasında üzerine 15-20 ml Lysis Buffer tekrar eklenmiştir. Numuneler +4 °C sıcaklıkta 15 dakika süreyle bekletilen numuneler, daha sonra 10 dakika süreyle 1500 rpm hızda santrifüj edilmiştir. Bir önceki işlemde yapıldığı gibi tekrar süpernatantlar atılmış ve süspanse hale getirilmiştir. Sonra süspanse hale olan getirilen pelletlere %10 oranında olan 500 µl miktarda SDS, 9.4 ml WBL ve 75 µl proteinaz K eklenmiştir. Hazırlanan bu karışım, 56 °C sıcaklığındaki su banyosu cihazında tüm gece inkübe edilmiştir. İnkübe işlemi bittikten sonra her bir numune üzerine 0,37 ml miktarda amonyum asetat çözeltisi eklenmiştir. Dikkatli ve yavaşça karıştırılan karışım 25 dakika boyunca 3000 rpm hızda santrifüj edilmiş ve bu sayede proteinlerin çökmesi sağlanmıştır. Bu işlem bittikten sonra süpernatant dediğimiz kısım falkon tüpe alınmış ve 1:2 oranında olacak şekilde etanol eklenmiştir. Buraya kadar yapılan işlemler sonucunda DNA'nın presipitasyon durumu sağlanmış oldu. Presipitasyon sonucunda yoğun bir duruma gelen DNA, etil alkolün üzerine çıkana kadar beklenmiştir. Bekleme sonunda DNA lar tüpün çeperinde birikmiş ve mikropipet ucu yardımıyla toplanmıştır. Alınan bu DNA'lar alkolde (% 70 saflıktaki) yıkanmış ve Tris-EDTA ile iyice çözünmesi sağlanmıştır.

3.2.2. DNA'nın Konsantrasyon Tayini ve Saflık Kontrolü

Bir RNA veya DNA numunesinin konsantrasyonu, UV spektrofotometrisi kullanılarak kontrol edilebilir. Azotlu bazlar, ortalama 260 nm'de maksimum absorpsiyon özelliği kazanırlar. Proteinler, triptofan kalıntıları olduğu için 280 nm UV absorpsiyon özelliği gösterirler. DNA numuneleri 280 nm'de absorbans gösteriyorsa orada protein kontaminasyonu var demektir. Absorbans oranı 260 nm/280 nm şeklinde olup, bu oran DNA saflığını gösterir. Bu saflık 1.65 ile 1.85 değerler arasında olmalıdır³⁶⁸.

Eğer 260 nm/ 280 nm oran değeri 2'den büyük olursa o ortamda RNA var demektir.

Çalışmada yukarıda belirtildiği şekilde DNA konsantrasyonları belirlenmiş ve saflık kontrolleri yapılmıştır. OD ile gösterilen optik densitenin tanımı ise, 50µg/ml DNA'nın 260 nm de verdiği değer kabul edilmektedir. Bu değer aşağıda belirtilen formülle bulunmuştur (3-1).

$$\text{DNA} : 50 \mu\text{g/ml} \times \text{OD}_{260} \quad (3-1)$$

Tris-EDTA ile 1/100 olacak şekilde sulandırılan DNA örnekleri 260 ve 280 nm'de spektrofotometre cihazı ile ölçülmüştür. Saflığı formüle edilerek hesaplanan DNA lar arasında değeri 1,7-1,8 olanlar saf olarak kabul edilmişlerdir. Çalışmada kullanılan tüm numunelerin saflık değeri 1,7-1,8 arasında bulunmuştur.

3.2.3. PZR-Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PZR olarak kısaltılan bu yöntem, in vitro ortamda DNA bölgelerinin birçok kopyasının çoğaltılması için kullanılmaktadır. Bir PZR reaksiyonunun temel bileşenleri primer, *Taq* polimeraz, nükleotidler ve DNA kalıbıdır. Tüm bu bileşenler, enzimler ve kofaktörleriyle beraber bir tüpe alınarak ısıtma ve soğutma tekrar döngüleri olacak şekilde ayarlanır³⁶⁹.

3.2.3.1. Galektin-3 Gen Bölgelerinin (rs4644 ve rs4652) PZR İle Çoğaltılması

3.2.3.1.1. Gal-3 Gen Bölgelerinin Çoğaltılması İçin Gereken Primer Dizileri

Gal-3 polimorfizm gen bölgelerinin çoğaltılması için gereken primerler aşağıda belirtilmiş olup, internette sanal ortamda hazırlanmıştır³⁷⁰.

İleri Primer 5'-TTATCCTGGACAGGCACCTC-3'

Geri Primer 5'-AAGGAATGCCATCTCACCAG-3'

3.2.3.1.2. PZR'da Kullanılan Kimyasal ve Çözeltiler

Tablo 3-1. PZR karışımı için kullanılan malzemeler

Karışım İçin Malzemeler	Hacim (µl)
Su	10,075
dNTP	2,250
MgCl ₂	2,625
MgFree Buffer	3,750
F Primer	1.5
R Primer	1.5
Taq Polimeraz	0.3
DNA	3
Toplam Reaksiyon Hacmi	25

3.2.3.1.3. PZR Şartlarının ve Karışımının Hazırlanışı

Tablo 3-1’de belirtilen malzemelerden karışım oluşturmak için numune başına toplamda 25 µl olacak şekilde hacimler sırasıyla 0,2 ml ölçüsündeki steril olan tüplere alınmıştır. Bu karışımın hazırlanması süresince soğuk ve steril ortam sağlanmıştır.

Tablo 3-2. PZR koşulları

İlk Denatürasyon	95 °C	5 dakika	
Denatürasyon	94 °C	45 saniye	} 35 döngü
Primerlerin bağlanması	58.8 °C	45 saniye	
Uzama	72°C	45 saniye	
Son uzama	72°C	5 dakika	

Hazırladığımız karışıma hemen Taq polimeraz eklenmiş ve pipetleme işlemiyle karışımın güzelce karışması sağlanmıştır. MK ve SK numunelerimizin sayısı kadar olacak şekilde tüpler hazırlanmış ve içlerine 22 µl miktarında bu karışımdan konulmuştur. Sonrasında

her birine 3 er µl DNA eklenmiş ve oluşan toplam hacim pipetleme işlemine tabi tutulmuştur. 95 °C sıcaklık ayarı yapılmış ve ısıtılmış T100™ Biorad marka PZR cihazına dikkatlice yerleştirilerek çoğaltma işlemi başlatılmıştır (Tablo 3-2). İşlem sonrasında çıkan tüplerdeki numunelerin kontrolü için elektroforez sistemiyle yürütüldü ve DNA bantları UV altında görüntülenmiştir.

3.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi

Elektroforez DNA, RNA veya proteinleri büyüklük ve yük gibi fiziksel özelliklerine göre ayırmak için elektrik akımı kullanan bir tekniktir³⁷¹. DNA çıplak gözle görülmediğinden , jele sertleşme sırasında etidyum bromür (EtBr) gibi bir araya giren boya eklenir. Bu, DNA'yı bağlar ve UV ışığı altında flüoresans oluşturarak DNA parçalarının görselleştirilmesine izin verir. Ne kadar fazla DNA mevcutsa, bant o kadar parlak olur. Yükleme boyası ile karıştırılan numuneler, çalışan tampona daldırılan jelin bir ucuna yerleştirilir. Daha sonra jel tankının her iki ucundaki elektrotlar aracılığıyla jelden bir elektrik akımı geçirilir³⁷²⁻³⁷⁴.

3.2.4.1. Elektroforez Yöntemi İçin Gerekli Malzemeler

3.2.4.1.1. Stok Tampon Hazırlanışı

Tris baz, EDTA ve borik asit karışımından meydana gelen 5X TBE hazırlamak için önce 54 gr Tris bazı ile 27,5 gr borik asit hassas terazide tartılmış ve cam bir beher içine konulmuştur. Tartılan bu karışımın üstüne 20 ml miktarda 0,5 M olan EDTA eklenmiştir. Sonrasında da cam bir şişeye alınarak üzerine 800 ml distile su eklenmiş ve iyice çözünene kadar manyetik karıştırıcı cihazında karıştırılmıştır. Oluşan bu çözelti tamamı 1 L olacak şekilde tamamlanmış ve 120 °C sıcaklıkta 15 dakika süreyle steril edilmek için otoklavlanmıştır.

3.2.4.1.2. Yükleme Tamponu

Yükleme tamponu hazırlamak için % 0,25 oranında bromfenol mavisi ile % 40 oranında süktroz karıştırılmıştır.

3.2.4.1.3. Agaroz Jel Hazırlanışı (% 2)

Jel hazırlamak çok özenli çalışmayı gerektirir. Jelin hazırlanması için öncelikle hassas terazide cam bir erlenin içine 4 gr agaroz tartılmıştır. Tartım sonrasında tamamı 200 ml olacak şekilde ayarlanan 1X TBE tamponu üstüne eklenmiştir. Karışımın iyice çözünmesi için mikrodalgada kaynayana kadar bekletilmiştir. Sıcaklığı elle tutulur seviyeye

geldiğinde mesela 50-55°C sıcaklık idealdir, içine 4,5 µl miktarda 10mg/ml lük etidyum bromür eklenmiştir. Etidyum bromür kanserojen bir madde olduğundan bundan sonraki işlemler özel kabinde hazırlanmıştır. Kabin içinde bulunan ve asla başka bir bölüme alınmayan jel yatağına karışım dökülmüş, neticesinde numunelerin konulacağı kuyucuklar oluşturmak için özel tarak yerleştirilmiştir. Bir süre beklenip donması sağlandıktan sonra ise içinde kalan tarak çok dikkatlice çıkarılmış ve kontroller yapılarak uygun numunelerin sağlıklı bir şekilde yüklenmeleri için ortam hazırlanmış olur.

3.2.4.2. Galektin-3 PZR Ürünlerini Agaro Jelde Yürütmek İçin Yapılan Yükleme İşlemi

Jelin hazırlanmasından sonra yürütme tankı içine jelin üzerini 3 ml kadar geçecek şekilde dikkatlice 1X TBE tampon konmuştur. Diğer taraftan 7 µl PZR ürününe, 3 µl yükleme tamponu (6X) eklenip pipetleme yapılarak karıştırıldı. 10 µl'lik örnek karışımı kuyucuklara sırasıyla yüklendi. Yükleme işleminden sonra jel tankının kapağı kapatıldı. Güç kaynağı 500 miliamper 120 volt elektrik gücüne ayarlanarak elektroforez jel yürütülmesi gerçekleştirildi.

3.2.4.3. Galektin-3 rs4644 ve rs4652 Gen Polimorfizmlerinin Kontrol Edilmesi

Doğru gen bölgelerinin olduğu kontrollerini yapmak için 3 µl yükleme tamponu ve 7 µl örnek karıştırılmıştır. Karıştırma işleminden sonra bu karışım elektroforezde yürütülmüştür. Yürütme işlemi tamamlandığı zaman numunelerin yürüdüğü jel ultraviyole ışık altında ve 304 nm dalga boyunda incelenmiştir ve UV transillüminator cihazında resminin çekilmesi sağlanmıştır.

3.2.5. Restriksiyon Fragmanı Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) Yöntemi

1984 yılında İngiliz bilim adamı Alec Jeffreys tarafından kalıtsal hastalıklarla ilgili araştırmalar sırasında icat edilen bir tekniktir. Organizmalar arasında genetik olarak ayırım yapmak için DNA parçalarındaki benzersiz kalıpların analizi için kullanılır. Genetik polimorfizm, normal popülasyonun %1'inden fazlasındaki bireyler arasındaki kalıtsal genetik farklılıklar olarak tanımlanır. RFLP tekniği, hem tür içi hem de türler arası varyasyonu tanımak ve incelemek için DNA dizilerindeki bu farklılıklardan yararlanır. Bu yöntem, VNTR (değişken sayıda ardışık tekrar) adı verilen ve kişiden kişiye değişen kısa diziler içeren DNA parçalarını ölçer³⁷⁵.

3.2.5.1. Gen Polimorfizmlerinin Enzimlerle Kesim İşlemleri

3.2.5.1.1. rs4644/Gal-3 Gen Polimorfizminde Kullanılan Kimyasallar/Enzimler

StyI enzimiyle 37 °C sıcaklıkta ve 3 saat süreyle PZR ürünleri inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda kesim işlemi uygulanmıştır. Bunun için 0.25 µl StyI enzimi, 4 µl distile su, 5 µl PZR ürünü, 0.1 µl BSA ve 1 µl Neb3 tamponundan oluşan karışım her bir numuneye özel olarak hazırlanmıştır.

3.2.5.1.2. rs4652/Gal-3 Gen Polimorfizminde Kullanılan Kimyasallar/Enzimler

BsaWI enzimiyle 60 °C sıcaklıkta ve 3 saat süreyle PZR ürünleri inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda kesim işlemi uygulanmıştır. Bunun için 0.25 µl BsaWI enzimi, 4 µl distile su, 5 µl PZR ürünü, 0.1 µl BSA ve 1 µl Neb4 tamponundan oluşan karışım her bir numuneye özel olarak hazırlanmıştır.

3.2.5.1.3. rs4644/ Gal-3 Gen Polimorfizmi Yorumlanması

StyI enzimiyle kesim sonrası oluşan bantlar aşağıdaki şekilde gösterilmiştir: (Şekil 3-1).

Yürüme yönü Yükleme kuyusu	CC	CA	AA
201bç	■	■	
170bç		■	■
31 bç		■	■

Şekil 3-1: Gal-3'ün rs4644 Gen Polimorfizminin Jelde Yürüme Görseli

3.2.5.1.4. rs4652 / Gal-3 Gen Polimorfizmi Yorumlanması

BsaWI enzimiyle kesim sonrası oluşan bantlar aşağıdaki şekilde gösterilmiştir: (Şekil 3-2).

Yürüme yönü Yükleme kuyusu	CC	AC	AA
201bç	■	■	
134bç		■	■
67 bç		■	■

Şekil 3-2: Gal-3 rs4652 Gen Polimorfizminin Jelde Yürüme Görseli

3.2.6. ELISA Yöntemi

3.2.6.1. sGal-3 Seviyesinin ELISA ile Tespiti

ELISA ile sGal-3 seviyesinin tespiti için Thermo Fisher (Galectin 3 Human ELISA Kit 96 Test) marka hazır kitten yararlanılmıştır. Her 2 grubun numuneleri 1:1 oranında hazır kitin kutusundan çıkan numune dilüsyonu ile sulandırıldıktan sonra serumlar, 50 µl kontrol ve 100µl standart solüsyonları Gal-3 e özel antikor ile kaplı kuyucuklara dikkatli bir şekilde pipetlenmiştir. Daha sonra 50 µl miktarda Biotin konjugat eklenmiş ve çalkalama cihazında 400 rpm’de 2 saat süreyle oda ısısında inkübe edilmiştir. İnkübe edildikten sonra 350 µl miktarda yıkama solüsyonu eklenmiş ve 3 defa güzelce yıkanmıştır. Sonrasında her kuyucuğa 100 µl miktarında Gal-3 e özel antikor eklenmiştir. Çalkalama cihazında 1 saat süreyle oda ısısında inkübe edildikten sonra yıkama işlemleri tekrarlanmıştır. Cihazın kuyucuklarına 100 µl miktarda TMB substrat eklendikten sonra karanlık ortam ve oda ısısında 10 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Kuyucukların her birine 100 µl miktarda (1M’lik fosforik asit) durdurma solüsyonu eklenmiş ve ELISA da değeri bulunmuştur. Çıkan sonuçlar, 450 nm dalga boyunda okuyucuda okunmuştur ve sonuçlar ng/ml birimi ile değerlendirilmiştir. ELISA kitinin hassasiyeti 0,29 ng/ml ve ölçüm aralığı ise 0,47-30,0 ng/ml’dir.

3.2.7. İstatistiksel Analizler

Çalışmada yapılan istatistiksel analizler için, SPSS 11.0 programı kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0,05$ ’tir. Sayısal veri analizleri için student-t testi, Gal-3 polimorfizmlerinin allel ve genotiplerinin sıklık oranları için ise Fisher Exact ve Ki kare (X^2) testlerinden faydalanılmıştır. Gen sayım metodu ile allel frekansları tespit edilmiştir. MK ve SK gruplarının arasındaki sGal-3 düzeyleri Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır.

4. BULGULAR

İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Kliniği ile Çam ve Sakura Şehir Hastanesi Genel Cerrahi Kliniği'ndeki MK li 76 kadın ile çoğunluğu 50 yaş üzeri olan ve ailesinde kanser öyküsü bulunmayan 50 SK grupları çalışmamıza katılmıştır. Katılımcılar, ilgili araştırma hakkında bilgilendirilmiştir ve onam formları okunması sağlanarak imzalatılmıştır.

4.1. İstatistiksel Veriler Sonrasındaki Bulgular

Çalışmaya katılan MK hastaları ve SK grupları sadece kadınlardan oluşmaktadır, çalışma grubumuza erkekler dahil edilmemiştir. Yaşa göre değerlendirildiğinde SK grubunun yaş ortalamasının $50,2 \pm 13,64$, MK grubunun ise yaş ortalamasının $56,33 \pm 13,24$ olduğu görülmüştür. MK ve SK gruplarının yaşları arasında istatistiksel yönden anlamlı fark saptanmamıştır ($p = 0.057$).

MK grubunun kliniksel parametrelerinin dağılımları Tablo 4-1'de belirtilmiştir.

Tablo 4-1. MK hastalarının kliniksel parametrelerinin dağılımları

T Evresi	N (%)
T1	30,4
T2	51,8
T3	14,3
T4	3,6
Tis	-
Lenf Nodu Tutulumu	N (%)
N0	35,7
N1	35,7
N2	26,8
N3	1,8
Metastaz	N (%)

Pozitif (+)	25
Negatif (-)	75
Menapoz	N (%)
PRE	20,8
POST	79,2
Östrojen Reseptör	N (%)
Pozitif (+)	82,4
Negatif (-)	17,6
Progesteron Reseptör	N (%)
Pozitif (+)	76
Negatif (-)	24
Histoloji	N (%)
IDC	80
ILC	4
Kombine	16
Lenfovasküler İnvazyon	N (%)
Var	35,6
Yok	64,4
Perinödal invazyon	N (%)
Var	25,9
Yok	74,1
Perinöral invazyon	N (%)
Var	5,4
Yok	94,6
Periganglioner invazyon	N (%)
Var	18,6

Yok	81,4
Anjiolenfatik İnvazyon	N (%)
Var	37,1
Yok	62,9
Kapsül invazyon	N (%)
Var	15,3
Yok	84,7
Komedo	N (%)
Var	10,3
Yok	89,7
Multi Sentrisite	N (%)
Var	1,7
Yok	98,3
Multifokal	N (%)
Var	10,3
Yok	89,7
Tümör Nekrozu	N (%)
Var	15,5
Yok	84,5
C-erbB-2	N (%)
Negatif	74,4
Pozitif (+)	7,7
Pozitif (++)	2,6
Pozitif (+++)	15,4

MK hastalarının tümör evre parametrelerine baktığımızda, % 30,4 oranında T1, %51,8 oranında T2, %14,3 oranında T3 ve %3,6 oranında T4 evresinde oldukları görülmekte ve tis evresinde hasta bulunmamaktadır. MK hastalarının lenf nodu tutulumlarına bakıldığında ise, %35,7 oranında N0 , %35,7 oranında N1 , %26,8 oranında N2, % 1,8 oranında N3 olduğu gözlenmiştir. MK hastaları arasında %25 oranında metastaz pozitifliği bulunmaktadır. MK hastalarının % 20,8'i pre-menopozda, % 79,2'si ise postmenopozdadır. Östrojen reseptör ilişkisine bakıldığında hastaların % 82,4'ünde östrojen reseptör pozitif, % 17,6'sında östrojen reseptör negatif olduğu belirlenmiştir. Progesteron reseptör verisi ele alındığında, % 76'sı progesteron reseptör pozitif, % 24'ü de negatif idi.

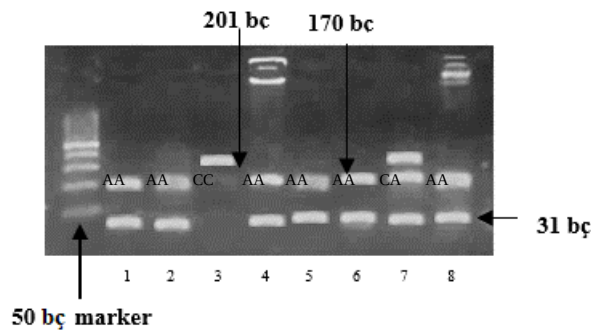
4.2. PZR Ürünlerinin Bulguları

4.2.1. Gal-3 PZR Ürünlerinin Bulguları

Galektin-3'ün gen polimorfizmlerinin PZR ürünleri, hazırlanan jelde (% 2 oranında) yürütülmüştür. Gen varyasyonlarının bulunması için 201 bç boyutundaki PZR ürününe özel bantların olduğu görülmüş ve sonrasında BsaWI ve StyI enzimleri etkisiyle kesimler yapılmıştır.

4.2.1.1. Gal-3 rs4644 C>A Polimorfizmine Ait Bulgular

Gal-3 rs4644 C>A Polimorfizmine ait StyI restriksiyon enzimi kesim ürünlerinin görüntüsü aşağıdadır: (Şekil 4-1).



Şekil 4-1. StyI enzimi ile kesilen PCR ürünlerinin jel görüntüsü

(PCR Bandı: 201 bç)

Galektin-3 rs4644 PZR ürünleri hazırlanan agaroz jele (%2 lik) yüklenmiştir. Yükleme sonucunda kontroller sağlanarak StyI enzimi etkisiyle kesim işlemi yapılmıştır. Kesim işlemi neticesinde ortaya çıkan bantlar aşağıdaki şekilde değerlendirilmektedir:

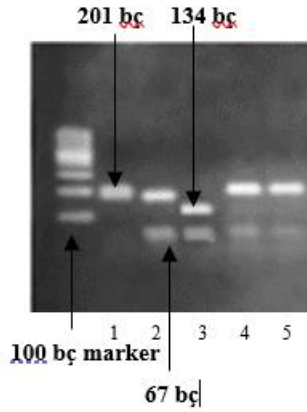
201-170-31 bç: CA genotip (Heterozigot)

170-31 bç: AA genotip (Homozigot)

201 bç: CC genotip (Homozigot)

4.2.1.2. Gal-3 rs4652 A>C Polimorfizmine Ait Bulgular

Gal-3 rs4652 A>C Polimorfizmine ait BsaWI restriksiyon enzimi kesim ürünlerinin jel görüntüsü Şekil 4-2'de verilmiştir.



Şekil 4-2. BsaWI enzimi ile kesilen PCR ürünlerinin jel görseli

(PCR Bandı: 201 bç, 1: CC 2: AC 3: AA 4: AC 5: AC)

Galektin-3 rs4652 PZR ürünleri hazırlanan agaroz jele (%2 lik) yüklenmiştir. Yükleme sonucunda kontroller sağlanarak BsaWI enzimi etkisiyle kesim işlemi yapılmıştır. Kesim işlemi neticesinde ortaya çıkan bantlar aşağıdaki şekilde değerlendirilmektedir:

201-134-67 bç: AC genotip (Heterozigot)

134-67 bç: AA genotip (Homozigot)

201 bç: CC genotip (Homozigot)

Tablo 4-2: MK hastalarda ve SK lerde Gal-3 rs4644 ile 4652 gen polimorfizmlerine ait genotip ve allel dağılımları

Genotipler ile Alleller	Meme Kanserli Hastalar n(%)	Kontrol grubu n(%)	P
Gal-3 rs4644			
CC	4 (5,3)	25 (50)	p<0,001
CA	63 (82,9)	17 (34)	
AA	9 (11,8)	8 (16)	
C Alleli	71(46,7)	67 (67)	p=0,015
A Alleli	81 (53,3)	33 (33)	
Gal-3 rs4652			
AA	25 (32,9)	21 (42)	p=0,187
AC	30 (39,5)	22 (44)	
CC	21 (27,6)	7 (14)	
A Alleli	80 (52,6)	64 (64)	P=0,074
C Alleli	72 (47,4)	36 (36)	

Gal-3 rs4644 gen polimorfizmi sonuçlarına bakıldığında, MK grubunda CC genotipi frekansı (%5,3) SK e göre (%50) düşük bulunmuştur ve aralarındaki fark istatistiksel yönden çok ileri derecede anlamlıdır (p <0 ,001; OR = 0.105; 95% , CI = 0.039-0.284). Ayrıca MK grubunda CA genotipi frekansı (%82,9) ise SK lere (%34) göre istatistiksel olarak çok ileri düzeyde anlamlı ve yüksek tespit edilmiştir (p<0,001; OR=2,438 ; %95 CI = 1,635-3,635). Gal-3 rs4644 için allel dağılımına bakıldığında, C allelinin MK grubunda (%46,7) SK lere göre (%67) istatistiksel ileri düzeyde anlamlı ve düşük frekansta olduğu saptanmıştır (p = 0,015) (Tablo 4-2).

Galektin-3 rs4652 genotipi açısından incelendiğinde, MK ve SK grupları arasında allel ve genotip dağılımlarında istatistiksel fark saptanmamıştır. Göze çarpan bir bulgu olarak genotipe ait CC genotipinin hasta grubunda (%27,6) kontrol grubuna (%14) göre istatistiksel yönden anlamlı düzeye yakın şekilde yüksek frekansta gözlenmiştir ($p = 0,072$) (Tablo 4-2).

Tablo 4-3. MK hastalarının Gal-3 Genotiplerinin Klinik Açıdan Dağılımı

	Gal-3/rs4644 (%)			Gal-3/rs4652 (%)		
	CC	CA	AA	AA	AC	CC
T Evresi						
T1+T2	5,6	80,6	13,9	27,8	38,9	33,3
T3+T4	0	100	0	42,9	28,6	28,6
Lenf Nodu Tutulumu						
N0	6,7	86,7	6,7	20,0	53,3	26,7
N1+N2+N3	3,6	82,1	14,3	35,7	28,6	35,7
Uzak Metastaz						
Var (+)	0	100	0	45,5	36,4	18,2
Yok (-)	6,2	78,1	15,6	25	37,5	37,5
Perinodal İnvazyon						
Var (+)	9,1	72,7	18,2	45,5	36,4	18,2
Yok (-)	3,2	87,1	9,7	29,0	35,5	35,5

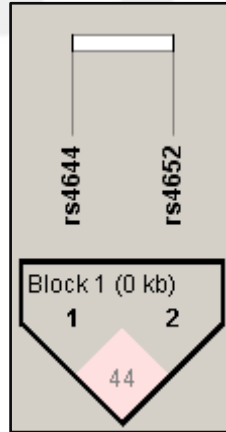
Perinöral İnvazyon						
Var (+)	0	100	0	0	100	0
Yok (-)	4,9	82,9	12,2	34,1	34,1	31,7
Lenfovasküler İnvazyon						
Var (+)	0	84,2	15,8	42,1	26,3	31,6
Yok (-)	7,4	85,2	7,4	22,2	44,4	33,3
Anjiolenfatik İnvazyon						
Var (+)	0	81,8	18,2	27,3	36,4	36,4
Yok (-)	12,5	68,8	18,8	18,8	37,5	43,8
Periganglioner İnvazyon						
Var (+)	12,5	62,5	25,0	50,0	37,5	12,5
Yok (-)	2,6	89,5	7,9	26,3	36,8	36,8
Kapsül İnvazyon						
Var (+)	0	75	25	37,5	37,5	25
Yok (-)	5,3	86,8	7,9	28,9	36,8	34,2
Komodo						
Var (+)	16,7	83,3	0	16,7	50	33,3
Yok (-)	2,6	84,6	12,8	33,3	35,9	30,8

C-erbB-2						
Pozitif	0	88,9	11,1	44,4	33,3	22,2
Negatif	3,8	92,3	3,8	26,9	30,8	42,3

MK hastalarının kliniksel parametreleri ile rs4644 ve rs4652 genotip dağılımlarına bakıldığında; perinöral/perinödal invazyon varlığı, lenf nodu tutulumu, komedo, lenfovasküler invazyon, tümör evresi, anjiolenfatik invazyon, periganglioner invazyon, kapsül invazyonu, metastaz varlığı ve C erb-b2 vb parametrelerin bu 2 polimorfizmlerin genotip dağılımlarında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4-3).

4.3. Haplotipleme Analizi

Galektin rs4644 ve rs4652 Polimorfizmlerine ait Haplotipleme Sonuçları



Tablo 4.4: Gal-3 rs4644 & rs4652 Polimorfizmlerine ait Haplotip Frekansları, p Değeri ile Ki-kare (X^2)

Haplotip İlişkili Blok	Frekans	MK, SK Grubu Oranı	X^2	p
rs4644-rs4652				
CA	0.418	0.307, 0.587	19.352	1.0872E-5
AC	0.299	0.314, 0.277	0.398	0.5283
AA	0.153	0.219, 0.053	12.768	4.0E-4
CC	0.126	0.160, 0.083	3.134	0.0767

Genotip	Allel	Hasta, Kontrol Oranı Frekans	X^2	p
rs4644	A	0.533, 0.330	10.023	0.0015
rs4652	C	0.474, 0.360	3.183	0.0744

Tabloda, Galektin-3 geni SNP'leri için Bağlantı Dengesizliği (LD: Linkage disequilibrium) sonucu özetlenmektedir. Haplotip sırası, Gal-3 rs 4644 ve Gal-4652'dir.

SNP lerin birbirleriyle olan LD-bağlantı dengesizliğini hesaplamak ve haplotip bloklarını belirlemek için Haploview 4.2 programından faydalanılmıştır. rs4644 & rs4652 ye ait CC ,CA, AA ve AC haplotip frekansları ise , Tablo 4-4'de belirtilmektedir. D' : 0.449, LOD = 5.04, $r^2 = 0.183$,

Frekanslar:

CA: % 41,8

CC: % 12,9

AC: % 29,9

AA: % 15,35

Galektin gen bölgelerinin değerlendirildiği haplotip analiz sonucu; kontrollerle karşılaştırıldığında hasta grubunda CA haplotipinin anlamlı bir şekilde düşük, AA haplotipinin yüksek olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte Galektin-3 geni rs4644

polimorfizminde SK lere göre MK hastalarında A alleli daha yüksektir ve istatistiksel yönden anlamlı bulunmuştur ($p = 0.0015$).

4.4. sGal-3 Düzeylerinin Sonuçları

MK hastalarındaki sGal-3 leri SK ler ile karşılaştırıldığında, MK hastalarındaki sGal-3 leri SK lere göre yüksektir ve istatistiksel yönden anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$) (Tablo 4-5).

Tablo 4.5: MK ve SK grubunda Gal-3 serum düzeyleri.

Serumda	Ortalama (ng/ml)	SE±	P değeri
Meme ca hasta	164,35	159,22	p>0,05
Kontrol grubu	6,99	2,02	

Gal-3 rs4644 CA genotipi taşıyan MK hastalarının Galektin-3 serum düzeyleri ($5,91 \pm 0,64$ ng/ml) , aynı genotipi taşıyan SK lere ($2,62 \pm 0,91$) göre yüksektir ve istatistiksel yönden ileri seviyede anlamlı bulunmuştur ($p=0,009$). Gal-3 rs4644 C alleli taşıyan meme kanseri hastalarının Galektin-3 serum düzeyleri, aynı alleli taşıyan kontrol grubuna göre daha yüksek olup, istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır ($p=0,091$). Gal-3 rs4644 A alleli taşıyan meme kanseri hastalarının Galektin-3 serum düzeyleri, aynı alleli taşıyan kontrol grubuna göre daha yüksek olup, istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır ($p=0,109$).

Gal-3 rs4652 AC genotipi taşıyan MK hastalarının ($5,03 \pm 0,61$ ng/ml) Galektin-3 serum düzeyleri, aynı genotipi taşıyan SK lere ($2,37 \pm 0,72$ ng/ml) göre yüksektir ve istatistiksel yönden anlamlı bulunmuştur ($p = 0,042$). Gal-3 rs4652 C alleli taşıyan meme kanseri hastalarının Galektin-3 serum düzeyleri, aynı alleli taşıyan kontrol grubuna göre daha yüksek olup, istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır ($p=0,195$). Gal-3 rs4652 A alleli taşıyan meme kanseri hastalarının Galektin-3 serum düzeyleri, aynı alleli taşıyan SK lere göre daha yüksektir ve istatistiksel yönden anlamlı bulunmamıştır ($p = 0,091$).

MK hastalarının kliniksel verilerine göre Gal-3 genotiplerinin dağılımları ile Galektin-3 serum düzeyleri arasındaki ilişkiye bakıldığında ise, Gal-3 rs4644 CA genotipi taşıyan

erken evre (T1+T2) meme kanseri hastalarda, geç evredeki (T3+T4) hastalara göre Galektin-3 serum düzeyleri daha düşük olup, istatistiksel yönden anlamlı bulunmamıştır ($p = 0,222$).

Gal-3'n rs4644 genotipinin C allelini taşıyan N0 lenf nodu tutulumu olan meme kanseri hastalarda, N+ lenf nodu tutulumu olan diğerk hastalara göre Galektin-3 serum düzeyleri daha düşük olup, istatistiksel yönden anlamlı bulunmamıştır ($p = 0,877$).

Gal-3'n rs4644 genotipinin C allelini taşıyan uzak metastazı olan MK hastalarının sGal-3 düzeyleri metastazı olmayan MK hastalara göre düşüktür ve istatistiksel yönden anlamlı bulunmamıştır ($p = 0,877$).

Gal-3 rs4644 C alleli taşıyan östrojen reseptörü negatif olan meme kanseri hastalarının Galektin-3 serum düzeyleri, pozitiflere göre yüksektir ve istatistiksel yönden anlamlı bulunmamıştır ($p = 0,288$).

Gal-3 rs4644 C alleli taşıyan progesteron reseptörü, negatif olan meme kanseri hastalarının Galektin-3 serum düzeyleri pozitiflere göre yüksektir ve istatistiksel yönden anlamlı bulunmamıştır ($p = 0,100$).

Gal-3 rs4644 C alleli taşıyan c-Erb-B2 (-) negatif olan MK hastalarının sGal-3 düzeyleri pozitiflere (+) göre yüksektir ve istatistiksel yönden anlamlı bulunmamıştır ($p = 0,452$).

5. TARTIŞMA

Meme kanserinin hem morbidite hem de mortalite oranları son on yılda önemli ölçüde arttığından, meme kanseri vakalarının azaltılmasında değiştirilebilir risk faktörlerinin çok önemli olabileceği göz önünde bulundurularak en etkili önlemenin sağlanması acil bir ihtiyaçtır. Mamografi ve sonografi, meme kanserinin oldukça erken saptanmasını sağlayan en yaygın tarama testidir. Potansiyel biyolojik tedaviler için prognostik biyobelirteçler ve hedefler için sürekli araştırma, meme kanseri hastalarının tedavisinin ve klinik sonuçlarının iyileştirilmesine önemli ölçüde katkıda bulunmuştur.

Galektinler, hücre içi veya hücre dışı olarak, hücreler arası iletişim, iltihaplanma, gelişme ve farklılaşma gibi temel biyolojik süreçler sırasında hücre yüzeyinde meydana gelen değişiklikleri izleyebilen anahtar biyolojik araçlar olarak işlev görür. Bu glikan bağlayıcı proteinlerin işlevlerini ve özelliklerini incelemek için harcanan muazzam çabalara rağmen, bu proteinlerin yapısal ve biyokimyasal özelliklerinin biyolojik fonksiyonları nasıl etkileyebileceği hakkında hala sınırlı bilgi mevcuttur.

Çalışmamızda Gal-3 rs4644 gen polimorfizmi sonuçlarına bakıldığında, MK hastalarda CC genotipi frekansı SK lere göre düşük bulunmuştur ve aradaki fark istatistiksel yönden çok ileri derecede anlamlıdır. Chen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, MK hastalarında CC genotipi frekansı SK e göre daha düşük bulunmuş ama istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır³⁰³. Terzioğlu-Uşak ve ark. yaptığı bir çalışmada, erken evre küçük hücreli akciğer kanseri hastalarında Gal-3 rs4644 gen polimorfizmine bakılmış ve CC genotipi frekansı hasta grubunda kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur³⁷⁶. Aynı şekilde Horozoğlu ve ark. yaptığı çalışmada da, larinks squamöz hücreli kanser hastalarında kontrol grubuna göre CC genotip frekansı daha düşük bulunmuştur³⁷⁷. Kanser dışında diğer hastalıklarda da Gal-3 gen polimorfizm çalışmaları yapılmıştır. Wang-Dong Xu ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, Romatoid Artrit hastaları ile kontrol grubu arasındaki rs4644 gen polimorfizm sonuçları bizim çalışmamızda olduğu gibi hasta grubunda daha düşük olarak gözlenmiştir³⁷⁸. Tam tersi olarak ise, Kovacevic ve ark. çalışmasında ESRD (Son evre böbrek hastalığı) hasta grubu ile kontrol grubu arasındaki CC genotip frekansına bakıldığında hasta grubunun frekans değerinin daha yüksek olduğu görülmektedir³⁷⁹.

Çalışmamızda MK hasta grubunda CA genotipi frekansı ise, SK lere göre istatistiksel yönden çok ileri seviyede anlamlı ve yüksek bulunmuştur. Aynı şekilde

Terzioğlu-Uşak ve ark. yaptığı çalışmada ve Wang-Dong Xu ve ark. yaptığı çalışmada da CA genotipi kontrol grubunda hastalara göre daha yüksek bulunmuştur^{376,378}. Horozoğlu ve ark. yaptığı çalışmada da , larinks squamöz hücreli kanser hastalarında kontrol grubuna göre CA genotip frekansı daha yüksek bulunmuştur³⁷⁷.

Çalışmamızda Galektin-3 rs4644 için allel dağılımına bakıldığında, C allelinin MK hastalarda SK e göre istatistiksel yönden ileri düzeyde anlamlı ve düşük frekansta olduğu bulunmuştur. Horozoğlu ile arkadaşlarının yaptığı çalışmada , larinks squamöz hücreli kanser hastalarında kontrol grubuna göre C alleli düşük frekansta olup anlamlı bulunmamıştır³⁷⁷.

Çalışmamızda Galektin-3 rs4652 genotipi açısından incelendiğinde, MK hastalar ile SK arasındaki allel ve genotip dağılımlarında istatistiksel yönden fark saptanmamıştır. Güneydoğu Çin'deki Fujian eyaletinde mide karsinomlu 479 hasta ve 458 sağlıklı kontrolü içeren bir vaka kontrol çalışmasında, Galektin-3 rs4652 genotipi incelenmiş ve her iki grup arasındaki allel ve genotip dağılımlarında istatistiksel yönden anlamlı fark saptanmıştır³⁸⁰.

Çalışmamızda göze çarpan bir bulgu olarak , rs4652 e ait CC genotipinin MK hastalarda SK e göre istatistiksel yönden anlamlılığa yakın şekilde yüksek frekansta gözlenmiştir. Yi Shi ve ekibinin yaptığı çalışmada ise, mide kanseri hastalar ile sağlıklı kontrol grubu arasındaki rs4652 e ait CC genotipi değerleri hasta grupta daha düşük olarak bulunmuştur³⁸⁰.

Çalışmamızda Gal-3 serum düzeylerinin MK hasta ile SK arasındaki karşılaştırma sonucunda istatistiksel yönden anlamlı şekilde fark bulunmamıştır. Çalışmamızda Gal-3 rs4644 CA genotipi taşıyan MK hastalarının Galektin-3 serum düzeyleri, aynı genotipi taşıyan SK e göre yüksektir ve istatistiksel yönden ileri seviyede anlamlılık bulunmuştur. Terzioğlu-Uşak ve ark. yaptığı çalışmada da, rs4644 CA genotipini taşıyan küçük hücreli akciğer kanseri hastalarının sGal-3 miktarları SK lere göre istatistiksel yönden ileri düzey olarak anlamlı bulunmuştur³⁷⁶.

Çalışmamızda Gal-3 rs4652 AC genotipi taşıyan meme kanseri hastalarının sGal-3 düzeyleri, aynı genotipi taşıyan SK e göre yüksek tespit edilmiştir ve istatistiksel yönden anlamlılık bulunmuştur. Terzioğlu-Uşak ve ark. yaptığı çalışmada da, rs4652 AC genotipini taşıyan küçük hücreli akciğer kanseri hastalarının sGal-3 miktarları SK lere göre istatistiksel yönden ileri seviyede anlamlı bulunmuştur³⁷⁶.

Çalışmamızda rs4644 C alleli taşıyan uzak metastazı olan MK hastalarının sGal-3 düzeyleri uzak metastazı olmayanlara göre daha düşük bulunmuş, istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır. Yapılan birçok çalışmada, meme dışındaki diğer dokulardan alınan tümör örneklerinde (tiroid, pankreas gibi) Gal-3 ekspresyonunu incelenmiş ve çoğunda hücre içi Gal-3 düzeylerinin metastaz ve ilerlemiş kanser ile arttığı bulunmuştur³⁸¹⁻³⁸³.

Topçu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da, meme kanseri hastalarla sağlıklı kontrol grubunda serum Gal-3 seviyelerine bakılmış ve MK hastalarında kontrollere göre anlamlı derecede yüksek olarak bulunmuştur³⁶². Grosset ile arkadaşlarının yaptığı çalışmada, MK hasta grubunda yüksek seviyedeki Galektin-3 düzeylerinin hem nüks hem de daha kötü sağkalım oranları ile ilişkili olduğunu göstermiştir³⁸⁴.

Lurisci ve ark. , sağlıklı bireylerle meme, mide-bağırsak, akciğer veya yumurtalık kanseri, melanom ve Hodgkin dışı lenfoma hastalarını karşılaştırdığında, galektin-3 serum seviyelerinin hepsinde önemli ölçüde yüksek olduğunu göstermişlerdir. Uzak metastazı olan hasta sGal-3 düzeyleri de, lokal tümöre sahip hastalardan alınan serumlardan yüksek oranda bulunmuştur³⁸⁵.

Sonuç olarak bu çalışma, Gal-3 rs4644 ve rs4652 varyantlarının meme kanserindeki rolünü araştıran literatüre, Galektin-3'ün hastalık riski ve ilerlemesinde önemli bir biyobelirteç olma olasılığını aydınlatılabilir. Serum galektin-3 seviyesi, meme kanseri hastalarının daha iyi belirlenmesi için kullanılabilir. Galektin-3'ün rs4644 ve rs4652 varyantları ile ilgili meme kanseri sinyal yollarındaki hücresel fonksiyonlarını anlayabilmek için daha ileri in vitro çalışmalara ihtiyaç vardır.

Galektin-3, hastalıklar için biyobelirteç olmasının yanı sıra, özellikle kanserin ilerlemesindeki iyi belgelenmiş rolleri nedeniyle kanser tedavisi için potansiyel bir hedeftir. Sonuçlar umut verici olmakla birlikte, Galektin-3'ün meme kanser etyopatogenezinde rolünü sağlamlaştırmak ve genişletmek için daha fazla hasta sayısında verifiye edilecek sonuçlarımızla beraber ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışma sonuçlarımız dolaşımdaki galektin-3'ün tümör ilerlemesinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Özellikle erken evre kanserde metastazı tahmin etmek için kullanma olasılığı olabilecek bir biyobelirteç olma potansiyeli için daha kapsamlı araştırmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E. & Jemal, A. Cancer statistics, 2022. *CA. Cancer J. Clin.* **72**, 7–33 (2022).
2. Globocan 2020. Globocan 2020.
3. Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **71**, 209–249 (2021).
4. Jemal, A. *et al.* Global cancer statistics. *CA. Cancer J. Clin.* **61**, 69–90 (2011).
5. Girotti, M. R., Salatino, M., Dalotto-Moreno, T. & Rabinovich, G. A. Sweetening the hallmarks of cancer: Galectins as multifunctional mediators of tumor progression. *J. Exp. Med.* **217**, (2020).
6. Bao, Q. & Hughes, R. C. Galectin-3 expression and effects on cyst enlargement and tubulogenesis in kidney epithelial MDCK cells cultured in three-dimensional matrices in vitro. *J. Cell Sci.* **108**, 2791–2800 (1995).
7. Dagher, S. F., Wang, J. L. & Patterson, R. J. Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 1213–1217 (1995).
8. Le Marer, N. & Hughes, R. C. Effects of the carbohydrate-binding protein galectin-3 on the invasiveness of human breast carcinoma cells. *J. Cell. Physiol.* **168**, 51–8 (1996).
9. Koo, J. S. & Jung, W. Clinicopathologic and Immunohistochemical Characteristics of Triple Negative Invasive Lobular Carcinoma. *Yonsei Med. J.* **52**, 89 (2011).
10. Moon, B.-K. *et al.* Galectin-3 Protects Human Breast Carcinoma Cells against Nitric Oxide-Induced Apoptosis. *Am. J. Pathol.* **159**, 1055–1060 (2001).
11. Zhang, H., Liang, X., Duan, C., Liu, C. & Zhao, Z. Galectin-3 as a Marker and Potential Therapeutic Target in Breast Cancer. *PLoS One* **9**, e103482 (2014).
12. Deng, N., Zhou, H., Fan, H. & Yuan, Y. Single nucleotide polymorphisms and cancer susceptibility. *Oncotarget* **8**, 110635–110649 (2017).
13. Devilee, P. & Rookus, M. A. A Tiny Step Closer to Personalized Risk Prediction for Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **362**, 1043–1045 (2010).
14. Coughlin, S. S., Khoury, M. J. & Steinberg, K. K. BRCA1 and BRCA2 gene mutations and risk of breast cancer: *Am. J. Prev. Med.* **16**, 91–98 (1999).
15. &NA; AESTHETIC AND RECONSTRUCTIVE SURGERY OF THE BREAST.

- Plast. Reconstr. Surg.* **84**, 1028 (1989).
16. Bistoni, G. & Farhadi, J. Anatomy and physiology of the breast. in *Plastic and reconstructive surgery* 477–485 (John Wiley & Sons, Ltd, 2015). doi:10.1002/9781118655412.ch37.
 17. Solari, F. & Burns, B. *Anatomy, Thorax, Pectoralis Major. StatPearls* (2022).
 18. Bazira, P. J., Ellis, H. & Mahadevan, V. Anatomy and physiology of the breast. *Surg.* **40**, 79–83 (2022).
 19. Zucca-Matthes, G., Urban, C. & Vallejo, A. Anatomy of the nipple and breast ducts. *Gland Surg.* **5**, 32–6 (2016).
 20. EREL, P. D. S. & ATAHAN, D. D. M. K. Memenin Anatomisi, Fizyolojisi ve Değerlendirilmesi. in *Genel Cerrahi Kitabı* (Akademisyen Kitabevi, 2019).
 21. Standring, S., Borley, N. R., & Gray, H. *Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice*. (40th ed., anniversary ed. [Edinburgh], Churchill Livingstone/Elsevier., 2008).
 22. Javed, A. & Lteif, A. Development of the Human Breast. *Semin. Plast. Surg.* **27**, 005–012 (2013).
 23. Ellis, H. & Mahadevan, V. Anatomy and physiology of the breast. *Surg.* **31**, 11–14 (2013).
 24. Smalley, M. & Ashworth, A. Stem cells and breast cancer: A field in transit. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 832–844 (2003).
 25. Dimri, G., Band, H. & Band, V. Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models. *Breast Cancer Res.* **7**, 171 (2005).
 26. Gusterson, B. A. *et al.* Distribution of myoepithelial cells and basement membrane proteins in the normal breast and in benign and malignant breast diseases. *Cancer Res.* **42**, 4763–70 (1982).
 27. Wetzels, R. H. *et al.* Detection of basement membrane components and basal cell keratin 14 in noninvasive and invasive carcinomas of the breast. *Am. J. Pathol.* **134**, 571–9 (1989).
 28. Garraway, L. A. & Lander, E. S. Lessons from the cancer genome. *Cell* vol. 153 at <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.002> (2013).
 29. Łukasiewicz, S. *et al.* Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies—An Updated Review. *Cancers (Basel)*. **13**, 4287 (2021).

30. Weigelt, B., Peterse, J. L. & van't Veer, L. J. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 591–602 (2005).
31. Asadzadeh Vostakolaei, F. *et al.* The validity of the mortality to incidence ratio as a proxy for site-specific cancer survival. *Eur. J. Public Health* **21**, 573–577 (2011).
32. Sharma, R. Breast cancer incidence, mortality and mortality-to-incidence ratio (MIR) are associated with human development, 1990–2016: evidence from Global Burden of Disease Study 2016. *Breast Cancer* **26**, 428–445 (2019).
33. Ferlay J., Laversanne M., Ervik M., Lam F., Colombet M., Mery L., Piñeros M., Znaor A., Soerjomataram I., B. F. International Agency for Research on Cancer, [(accessed on 15 Oct 2022)]. *Glob. Cancer Obs. Cancer Tomorrow. Available online <https://gco.iarc.fr/tomorrow>* (2020).
34. Porter, P. “Westernizing” Women’s Risks? Breast Cancer in Lower-Income Countries. *N. Engl. J. Med.* **358**, 213–216 (2008).
35. Cranford, T. L. *et al.* Effects of high fat diet-induced obesity on mammary tumorigenesis in the PyMT/MMTV murine model. *Cancer Biol. Ther.* **20**, 487–496 (2019).
36. Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group. Sex hormones and risk of breast cancer in premenopausal women: a collaborative reanalysis of individual participant data from seven prospective studies. *Lancet Oncol.* **14**, 1009–1019 (2013).
37. Folkert, E. & Dowsett, M. Sex hormones and breast cancer risk and prognosis. *The Breast* **22**, S38–S43 (2013).
38. Zhang, X., Tworoger, S. S., Eliassen, A. H. & Hankinson, S. E. Postmenopausal plasma sex hormone levels and breast cancer risk over 20 years of follow-up. *Breast Cancer Res. Treat.* **137**, 883–892 (2013).
39. The Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group. Endogenous Sex Hormones and Breast Cancer in Postmenopausal Women: Reanalysis of Nine Prospective Studies. *CancerSpectrum Knowl. Environ.* **94**, 606–616 (2002).
40. Hill, D. A., Prossnitz, E. R., Royce, M. & Nibbe, A. Temporal trends in breast cancer survival by race and ethnicity: A population-based cohort study. *PLoS One* **14**, e0224064 (2019).
41. Yedjou, C. G. *et al.* Health and Racial Disparity in Breast Cancer. in 31–49 (2019). doi:10.1007/978-3-030-20301-6_3.

42. ACS. Breast Cancer Facts & Figures, 2015–2016. *Am. Cancer Soc.* (2016).
43. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58 209 women with breast cancer and 101 986 women without the disease. *Lancet* **358**, 1389–1399 (2001).
44. Shiyanbola, O. O. *et al.* Emerging Trends in Family History of Breast Cancer and Associated Risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **26**, 1753–1760 (2017).
45. Baglia, M. L., Tang, M.-T. C., Malone, K. E., Porter, P. & Li, C. I. Family History and Risk of Second Primary Breast Cancer after In Situ Breast Carcinoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **27**, 315–320 (2018).
46. Brewer, H. R., Jones, M. E., Schoemaker, M. J., Ashworth, A. & Swerdlow, A. J. Family history and risk of breast cancer: an analysis accounting for family structure. *Breast Cancer Res. Treat.* **165**, 193–200 (2017).
47. Wu, H.-C. *et al.* Breast cancer family history and allele-specific DNA methylation in the legacy girls study. *Epigenetics* **13**, 240–250 (2018).
48. Çelik, A., Acar, M., Moroski Erkul, C., Gunduz, E. & Gunduz, M. Relationship of Breast Cancer with Ovarian Cancer. in *A Concise Review of Molecular Pathology of Breast Cancer* (InTech, 2015). doi:10.5772/59682.
49. Shiovitz, S. & Korde, L. A. Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Ann. Oncol.* **26**, 1291–1299 (2015).
50. Shahbandi, A., Nguyen, H. D. & Jackson, J. G. TP53 Mutations and Outcomes in Breast Cancer: Reading beyond the Headlines. *Trends in Cancer* **6**, 98–110 (2020).
51. Thiébaud, A. C. M. *et al.* Dietary intakes of ω -6 and ω -3 polyunsaturated fatty acids and the risk of breast cancer. *Int. J. Cancer* **124**, 924–931 (2009).
52. Sczaniecka, A. K., Brasky, T. M., Lampe, J. W., Patterson, R. E. & White, E. Dietary Intake of Specific Fatty Acids and Breast Cancer Risk Among Postmenopausal Women in the VITAL Cohort. *Nutr. Cancer* **64**, 1131–1142 (2012).
53. Morris, P. G. *et al.* Inflammation and Increased Aromatase Expression Occur in the Breast Tissue of Obese Women with Breast Cancer. *Cancer Prev. Res.* **4**, 1021–1029 (2011).
54. Travis, R. C. & Key, T. J. Oestrogen exposure and breast cancer risk. *Breast Cancer Res.* **5**, 239 (2003).

55. Pike, M. C., Spicer, D. V., Dahmouch, L. & Press, M. F. Estrogens, Progestogens, Normal Breast Cell Proliferation, and Breast Cancer Risk. *Epidemiol. Rev.* **15**, 17–30 (1993).
56. Cuzick, J. *et al.* Overview of the main outcomes in breast-cancer prevention trials. *Lancet* **361**, 296–300 (2003).
57. Bernstein, L. Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **7**, 3–15 (2002).
58. Albrektsen, G., Heuch, I., Hansen, S. & Kvåle, G. Breast cancer risk by age at birth, time since birth and time intervals between births: exploring interaction effects. *Br. J. Cancer* **92**, 167–175 (2005).
59. Husby, A., Wohlfahrt, J., Øyen, N. & Melbye, M. Pregnancy duration and breast cancer risk. *Nat. Commun.* **9**, 4255 (2018).
60. Innes, K. E. & Byers, T. E. Preeclampsia and Breast Cancer Risk. *Epidemiology* **10**, 722–732 (1999).
61. Ursin, G. *et al.* Reproductive factors and subtypes of breast cancer defined by hormone receptor and histology. *Br. J. Cancer* **93**, 364–371 (2005).
62. Orgéas, C. C., Hall, P., Rosenberg, L. U. & Czene, K. The influence of menstrual risk factors on tumor characteristics and survival in postmenopausal breast cancer. *Breast Cancer Res.* **10**, R107 (2008).
63. Titus-Ernstoff, L. *et al.* Menstrual factors in relation to breast cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **7**, 783–9 (1998).
64. McGuire, A., Brown, J., Malone, C., McLaughlin, R. & Kerin, M. Effects of Age on the Detection and Management of Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. **7**, 908–929 (2015).
65. Benz, C. C. Impact of aging on the biology of breast cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **66**, 65–74 (2008).
66. Siegel, R., Ma, J., Zou, Z. & Jemal, A. Cancer statistics, 2014. *CA. Cancer J. Clin.* **64**, 9–29 (2014).
67. Natl. Cancer Inst. Stat Bite: Lifetime Probability Among Females of Dying of Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **96**, 818–818 (2004).
68. Sims, A. H., Howell, A., Howell, S. J. & Clarke, R. B. Origins of breast cancer subtypes and therapeutic implications. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* **4**, 516–525 (2007).
69. Eliyatkin, N., Yalcin, E., Zengel, B., Aktaş, S. & Vardar, E. Molecular

- Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way. *J. Breast Heal.* **11**, 59–66 (2015).
70. Hergueta-Redondo, M., Palacios, J., Cano, A. & Moreno-Bueno, G. “New” molecular taxonomy in breast cancer. *Clin. Transl. Oncol.* **10**, 777–785 (2008).
 71. Erber, R. & Hartmann, A. Histology of Luminal Breast Cancer. *Breast Care* **15**, 327–336 (2020).
 72. Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–752 (2000).
 73. Prat, A. & Perou, C. M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol. Oncol.* **5**, 5–23 (2011).
 74. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **490**, 61–70 (2012).
 75. Ades, F. *et al.* Luminal B Breast Cancer: Molecular Characterization, Clinical Management, and Future Perspectives. *J. Clin. Oncol.* **32**, 2794–2803 (2014).
 76. Herschkowitz, J. I. *et al.* Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.* **8**, R76 (2007).
 77. Newman, L. A., Reis-Filho, J. S., Morrow, M., Carey, L. A. & King, T. A. The 2014 Society of Surgical Oncology Susan G. Komen for the Cure Symposium: Triple-Negative Breast Cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **22**, 874–882 (2015).
 78. Weigelt, B., Geyer, F. C. & Reis-Filho, J. S. Histological types of breast cancer: How special are they? *Mol. Oncol.* **4**, 192–208 (2010).
 79. Zhu, H. & Doğan, B. E. American Joint Committee on Cancer’s Staging System for Breast Cancer, Eighth Edition: Summary for Clinicians. *Eur. J. Breast Heal.* **17**, 234–238 (2021).
 80. American Cancer Society. American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM staging system for breast cancer. <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/stages-of-breast-cancer.html> (2018).
 81. Kalli, S. *et al.* American Joint Committee on Cancer’s Staging System for Breast Cancer, Eighth Edition: What the Radiologist Needs to Know. *RadioGraphics* **38**, 1921–1933 (2018).
 82. Koh, J. & Kim, M. J. Introduction of a New Staging System of Breast Cancer for

- Radiologists: An Emphasis on the Prognostic Stage. *Korean J. Radiol.* **20**, 69 (2019).
83. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
 84. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
 85. Sanchez-Vega, F. *et al.* Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. *Cell* **173**, 321–337.e10 (2018).
 86. Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.* **10**, 789–799 (2004).
 87. Paz, A., Haklai, R., Elad-Sfadia, G., Ballan, E. & Kloog, Y. Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. *Oncogene* **20**, 7486–7493 (2001).
 88. Elad-Sfadia, G., Haklai, R., Balan, E. & Kloog, Y. Galectin-3 Augments K-Ras Activation and Triggers a Ras Signal That Attenuates ERK but Not Phosphoinositide 3-Kinase Activity. *J. Biol. Chem.* **279**, 34922–34930 (2004).
 89. Shalom-Feuerstein, R., Cooks, T., Raz, A. & Kloog, Y. Galectin-3 Regulates a Molecular Switch from N-Ras to K-Ras Usage in Human Breast Carcinoma Cells. *Cancer Res.* **65**, 7292–7300 (2005).
 90. Kechagioglou, P. *et al.* Tumor suppressor PTEN in breast cancer: heterozygosity, mutations and protein expression. *Anticancer Res.* **34**, 1387–400 (2014).
 91. Marsh, D. Mutation spectrum and genotype-phenotype analyses in Cowden disease and Bannayan-Zonana syndrome, two hamartoma syndromes with germline PTEN mutation. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 507–515 (1998).
 92. Xu, X., Zhang, M., Xu, F. & Jiang, S. Wnt signaling in breast cancer: biological mechanisms, challenges and opportunities. *Mol. Cancer* **19**, 165 (2020).
 93. van Schie, E. H. & van Amerongen, R. Aberrant WNT/CTNNB1 Signaling as a Therapeutic Target in Human Breast Cancer: Weighing the Evidence. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, (2020).
 94. Suzuki, H. *et al.* Frequent epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer. *Br. J. Cancer* **98**, 1147–1156 (2008).
 95. Feng, Y. *et al.* Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes Dis.* **5**, 77–106 (2018).

96. Niehrs, C. The complex world of WNT receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 767–779 (2012).
97. Yang, K. *et al.* The evolving roles of canonical WNT signaling in stem cells and tumorigenesis: implications in targeted cancer therapies. *Lab. Investig.* **96**, 116–136 (2016).
98. Nusse, R. & Clevers, H. Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell* **169**, 985–999 (2017).
99. Susanti, N. M. P. & Tjahjono, D. H. Cyclin-Dependent Kinase 4 and 6 Inhibitors in Cell Cycle Dysregulation for Breast Cancer Treatment. *Molecules* **26**, 4462 (2021).
100. Sutherland, R. L. & Musgrove, E. A. Cyclins and Breast Cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **9**, 95–104 (2004).
101. Gonzalez-Angulo, A. M. *et al.* Downregulation of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p27kip1 Might Correlate with Poor Disease-Free and Overall Survival in Inflammatory Breast Cancer. *Clin. Breast Cancer* **7**, 326–330 (2006).
102. Cristofanilli, M. *et al.* Fulvestrant plus palbociclib versus fulvestrant plus placebo for treatment of hormone-receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer that progressed on previous endocrine therapy (PALOMA-3): final analysis of the multicentre, double-blind, phas. *Lancet Oncol.* **17**, 425–439 (2016).
103. Finn, R. S. *et al.* PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro. *Breast Cancer Res.* **11**, R77 (2009).
104. Nwabo Kamdje, A. H. *et al.* Signaling pathways in breast cancer: Therapeutic targeting of the microenvironment. *Cell. Signal.* **26**, 2843–2856 (2014).
105. Walker, A. J. *et al.* FDA Approval of Palbociclib in Combination with Fulvestrant for the Treatment of Hormone Receptor–Positive, HER2–Negative Metastatic Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* **22**, 4968–4972 (2016).
106. Radtke, F. & Raj, K. The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nat. Rev. Cancer* **3**, 756–767 (2003).
107. Reedijk, M. *et al.* High-level Coexpression of JAG1 and NOTCH1 Is Observed in Human Breast Cancer and Is Associated with Poor Overall Survival. *Cancer Res.* **65**, 8530–8537 (2005).
108. Dickson, B. C. *et al.* High-level JAG1 mRNA and protein predict poor outcome in

- breast cancer. *Mod. Pathol.* **20**, 685–693 (2007).
109. Kushwaha, P. P. *et al.* 3-O-(E)-p-Coumaroyl betulinic acid possess anticancer activity and inhibit Notch signaling pathway in breast cancer cells and mammosphere. *Chem. Biol. Interact.* **328**, 109200 (2020).
 110. Kushwaha, P. P. *et al.* 3-O-(E)-p-Coumaroyl betulinic acid possess anticancer activity and inhibit Notch signaling pathway in breast cancer cells and mammosphere. *Chem. Biol. Interact.* **328**, 109200 (2020).
 111. Edwards, A. & Brennan, K. Notch Signalling in Breast Development and Cancer. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, (2021).
 112. Ma, Y. *et al.* Hedgehog-Mediated Patterning of the Mammalian Embryo Requires Transporter-like Function of Dispatched. *Cell* **111**, 63–75 (2002).
 113. Sari, I. N. *et al.* Hedgehog Signaling in Cancer: A Prospective Therapeutic Target for Eradicating Cancer Stem Cells. *Cells* **7**, 208 (2018).
 114. Sasaki, H., Nishizaki, Y., Hui, C., Nakafuku, M. & Kondoh, H. Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development* **126**, 3915–3924 (1999).
 115. Goel, H. L. *et al.* GLI1 regulates a novel neuropilin-2/ α 6 β 1 integrin based autocrine pathway that contributes to breast cancer initiation. *EMBO Mol. Med.* **5**, 488–508 (2013).
 116. Colavito, S. A., Zou, M. R., Yan, Q., Nguyen, D. X. & Stern, D. F. Significance of glioma-associated oncogene homolog 1 (GLI1) expression in claudin-low breast cancer and crosstalk with the nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF κ B) pathway. *Breast Cancer Res.* **16**, 444 (2014).
 117. Johnson, R. W. *et al.* TGF- β Promotion of Gli2-Induced Expression of Parathyroid Hormone-Related Protein, an Important Osteolytic Factor in Bone Metastasis, Is Independent of Canonical Hedgehog Signaling. *Cancer Res.* **71**, 822–831 (2011).
 118. Das, S., Samant, R. S. & Shevde, L. A. Nonclassical Activation of Hedgehog Signaling Enhances Multidrug Resistance and Makes Cancer Cells Refractory to Smoothed-muscle-targeting Hedgehog Inhibition. *J. Biol. Chem.* **288**, 11824–11833 (2013).
 119. Sterling, J. A. *et al.* The Hedgehog Signaling Molecule Gli2 Induces Parathyroid Hormone-Related Peptide Expression and Osteolysis in Metastatic Human Breast

- Cancer Cells. *Cancer Res.* **66**, 7548–7553 (2006).
120. Pratap, J. *et al.* Runx2 Transcriptional Activation of Indian Hedgehog and a Downstream Bone Metastatic Pathway in Breast Cancer Cells. *Cancer Res.* **68**, 7795–7802 (2008).
 121. Han, B. *et al.* FOXC1 Activates Smoothened-Independent Hedgehog Signaling in Basal-like Breast Cancer. *Cell Rep.* **13**, 1046–1058 (2015).
 122. Habib, J. G. & O'Shaughnessy, J. A. The hedgehog pathway in triple-negative breast cancer. *Cancer Med.* **5**, 2989–3006 (2016).
 123. Yu, Y. *et al.* Cancer-associated fibroblasts induce epithelial–mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF- β signalling. *Br. J. Cancer* **110**, 724–732 (2014).
 124. Angelucci, C. *et al.* Epithelial-Stromal Interactions in Human Breast Cancer: Effects on Adhesion, Plasma Membrane Fluidity and Migration Speed and Directness. *PLoS One* **7**, e50804 (2012).
 125. Lei, J. *et al.* Gli-1 is crucial for hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition and invasion of breast cancer. *Tumor Biol.* **36**, 3119–3126 (2015).
 126. Heller, E. *et al.* Hedgehog Signaling Inhibition Blocks Growth of Resistant Tumors through Effects on Tumor Microenvironment. *Cancer Res.* **72**, 897–907 (2012).
 127. Das, S., Samant, R. S. & Shevde, L. A. Hedgehog Signaling Induced by Breast Cancer Cells Promotes Osteoclastogenesis and Osteolysis. *J. Biol. Chem.* **286**, 9612–9622 (2011).
 128. Bhateja, P., Cherian, M., Majumder, S. & Ramaswamy, B. The Hedgehog Signaling Pathway: A Viable Target in Breast Cancer? *Cancers (Basel)*. **11**, 1126 (2019).
 129. Garcia, N., Ulin, M., Al-Hendy, A. & Yang, Q. The Role of Hedgehog Pathway in Female Cancers. *J. Cancer Sci. Clin. Ther.* **04**, (2020).
 130. Von Hoff, D. D. *et al.* Inhibition of the Hedgehog Pathway in Advanced Basal-Cell Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **361**, 1164–1172 (2009).
 131. Rudin, C. M. *et al.* Treatment of Medulloblastoma with Hedgehog Pathway Inhibitor GDC-0449. *N. Engl. J. Med.* **361**, 1173–1178 (2009).
 132. Dijkgraaf, G. J. P. *et al.* Small Molecule Inhibition of GDC-0449 Refractory Smoothened Mutants and Downstream Mechanisms of Drug Resistance. *Cancer Res.* **71**, 435–444 (2011).

133. Sharpe, H. J., Wang, W., Hannoush, R. N. & de Sauvage, F. J. Regulation of the oncoprotein Smoothened by small molecules. *Nat. Chem. Biol.* **11**, 246–255 (2015).
134. Wang, C. *et al.* Structural basis for Smoothened receptor modulation and chemoresistance to anticancer drugs. *Nat. Commun.* **5**, 4355 (2014).
135. Wang, C. *et al.* Structure of the human smoothened receptor bound to an antitumour agent. *Nature* **497**, 338–343 (2013).
136. Danial, C., Sarin, K. Y., Oro, A. E. & Chang, A. L. S. An Investigator-Initiated Open-Label Trial of Sonidegib in Advanced Basal Cell Carcinoma Patients Resistant to Vismodegib. *Clin. Cancer Res.* **22**, 1325–1329 (2016).
137. Glück, S. Consequences of the Convergence of Multiple Alternate Pathways on the Estrogen Receptor in the Treatment of Metastatic Breast Cancer. *Clin. Breast Cancer* **17**, 79–90 (2017).
138. Kumar, V. *et al.* Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* **51**, 941–951 (1987).
139. Osborne, C. K., Schiff, R., Fuqua, S. A. & Shou, J. Estrogen receptor: current understanding of its activation and modulation. *Clin. Cancer Res.* **7**, 4338s-4342s; discussion 4411s-4412s (2001).
140. Renoir, J.-M., Marsaud, V. & Lazennec, G. Estrogen receptor signaling as a target for novel breast cancer therapeutics. *Biochem. Pharmacol.* **85**, 449–465 (2013).
141. Cheskis, B. J., Greger, J. G., Nagpal, S. & Freedman, L. P. Signaling by estrogens. *J. Cell. Physiol.* **213**, 610–617 (2007).
142. Wang, Q. *et al.* Tamoxifen enhances stemness and promotes metastasis of ER α 36+ breast cancer by upregulating ALDH1A1 in cancer cells. *Cell Res.* **28**, 336–358 (2018).
143. Huang, B. *et al.* Differential expression of estrogen receptor α , β 1, and β 2 in lobular and ductal breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 1933–1938 (2014).
144. Roskoski, R. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol. Res.* **79**, 34–74 (2014).
145. Burgess, A. W. EGFR family: Structure physiology signalling and therapeutic targets †. *Growth Factors* **26**, 263–274 (2008).
146. Mayer, I. A. & Arteaga, C. L. The PI3K/AKT Pathway as a Target for Cancer Treatment. *Annu. Rev. Med.* **67**, 11–28 (2016).

147. Ono, M. & Kuwano, M. Molecular Mechanisms of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Activation and Response to Gefitinib and Other EGFR-Targeting Drugs. *Clin. Cancer Res.* **12**, 7242–7251 (2006).
148. Barker, K. T., Jackson, L. E. & Crompton, M. R. BRK tyrosine kinase expression in a high proportion of human breast carcinomas. *Oncogene* **15**, 799–805 (1997).
149. Aubele, M. *et al.* PTK (protein tyrosine kinase)-6 and HER2 and 4, but not HER1 and 3 predict long-term survival in breast carcinomas. *Br. J. Cancer* **96**, 801–807 (2007).
150. Ang, H. L. *et al.* Putting the BRK on breast cancer: From molecular target to therapeutics. *Theranostics* **11**, 1115–1128 (2021).
151. Park, S.-H., Lee, K.-H., Kim, H. & Lee, S.-T. Assignment of the human PTK6 gene encoding a non-receptor protein tyrosine kinase to 20q13.3 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet. Genome Res.* **77**, 271–272 (1997).
152. Peng, M. *et al.* PTK6/BRK is expressed in the normal mammary gland and activated at the plasma membrane in breast tumors. *Oncotarget* **5**, 6038–6048 (2014).
153. Ito, K. *et al.* PTK6 regulates growth and survival of endocrine therapy-resistant ER+ breast cancer cells. *npj Breast Cancer* **3**, 45 (2017).
154. Ludyga, N. *et al.* Impact of protein tyrosine kinase 6 (PTK6) on human epidermal growth factor receptor (HER) signalling in breast cancer. *Mol. Biosyst.* **7**, 1603 (2011).
155. Sun, S.-C. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 545–558 (2017).
156. Taniguchi, K. & Karin, M. NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 309–324 (2018).
157. Lim, B., Woodward, W. A., Wang, X., Reuben, J. M. & Ueno, N. T. Inflammatory breast cancer biology: the tumour microenvironment is key. *Nat. Rev. Cancer* **18**, 485–499 (2018).
158. Wang, W., Nag, S. & Zhang, R. Targeting the NF- κ B Signaling Pathways for Breast Cancer Prevention and Therapy. *Curr. Med. Chem.* **22**, 264–289 (2014).
159. Park, Y. H. The nuclear factor-kappa B pathway and response to treatment in breast cancer. *Pharmacogenomics* **18**, 1697–1709 (2017).
160. Ghosh, S., May, M. J. & Kopp, E. B. NF- κ B AND REL PROTEINS:

- Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 225–260 (1998).
161. Hayden, M. S. & Ghosh, S. Shared Principles in NF- κ B Signaling. *Cell* **132**, 344–362 (2008).
 162. Godwin, P. *et al.* Targeting Nuclear Factor-Kappa B to Overcome Resistance to Chemotherapy. *Front. Oncol.* **3**, (2013).
 163. Karin, M. Nuclear factor- κ B in cancer development and progression. *Nature* **441**, 431–436 (2006).
 164. Inoue, J., Gohda, J., Akiyama, T. & Semba, K. NF- κ B activation in development and progression of cancer. *Cancer Sci.* **98**, 268–274 (2007).
 165. Sethi, S. *et al.* Molecular Markers of Epithelial-to-Mesenchymal Transition Are Associated with Tumor Aggressiveness in Breast Carcinoma. *Transl. Oncol.* **4**, 222–226 (2011).
 166. Piao, H. *et al.* α -catenin acts as a tumour suppressor in E-cadherin-negative basal-like breast cancer by inhibiting NF- κ B signalling. *Nat. Cell Biol.* **16**, 245–254 (2014).
 167. Barbie, T. U. *et al.* Targeting an IKBKE cytokine network impairs triple-negative breast cancer growth. *J. Clin. Invest.* **124**, 5411–5423 (2014).
 168. Tse, L. A. *et al.* Familial Risks and Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer in Hong Kong Chinese Women. *PLoS One* **10**, e0120741 (2015).
 169. Konan, H.-P. *et al.* ER α -36 regulates progesterone receptor activity in breast cancer. *Breast Cancer Res.* **22**, 50 (2020).
 170. Wu, J.-R., Zhao, Y., Zhou, X.-P. & Qin, X. Estrogen receptor 1 and progesterone receptor are distinct biomarkers and prognostic factors in estrogen receptor-positive breast cancer: Evidence from a bioinformatic analysis. *Biomed. Pharmacother.* **121**, 109647 (2020).
 171. Patani, N., Martin, L.-A. & Dowsett, M. Biomarkers for the clinical management of breast cancer: International perspective. *Int. J. Cancer* **133**, 1–13 (2013).
 172. Kontani, K. *et al.* Clinical usefulness of human epidermal growth factor receptor-2 extracellular domain as a biomarker for monitoring cancer status and predicting the therapeutic efficacy in breast cancer. *Cancer Biol. Ther.* **14**, 20–28 (2013).
 173. Kim, H.-A., Lee, J. K., Kim, E.-K., Seol, H. & Noh, W. C. Serum human epidermal growth factor receptor 2 levels as a real-time marker for tumor burden in breast

- cancer patients. *J. Surg. Oncol.* **109**, 421–425 (2014).
174. NISHIMURA, R. *et al.* Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer subtype and a predictor of recurrence time in primary breast cancer. *Exp. Ther. Med.* **1**, 747–754 (2010).
 175. de Azambuja, E. *et al.* Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12 155 patients. *Br. J. Cancer* **96**, 1504–1513 (2007).
 176. Pathmanathan, N. *et al.* The prognostic value of Ki67 in systemically untreated patients with node-negative breast cancer. *J. Clin. Pathol.* **67**, 222–228 (2014).
 177. González-Vela, M. C., Garijo, M. F., Fernández, F. & Val-Bernal, J. F. MIB1 proliferation index in breast infiltrating carcinoma: comparison with other proliferative markers and association with new biological prognostic factors. *Histol. Histopathol.* **16**, 399–406 (2001).
 178. Caly, M. *et al.* Analysis of correlation between mitotic index, MIB1 score and S-phase fraction as proliferation markers in invasive breast carcinoma. Methodological aspects and prognostic value in a series of 257 cases. *Anticancer Res.* **24**, 3283–8.
 179. Li, Z., Yin, S., Zhang, L., Liu, W. & Chen, B. Prognostic value of reduced E-cadherin expression in breast cancer: a meta-analysis. *Oncotarget* **8**, 16445–16455 (2017).
 180. Yang, L. *et al.* Significance and prognosis of epithelial-cadherin expression in invasive breast carcinoma. *Oncol. Lett.* (2018) doi:10.3892/ol.2018.8836.
 181. Zhou, S. *et al.* The emerging role of circular RNAs in breast cancer. *Biosci. Rep.* **39**, (2019).
 182. Tran, A. M. *et al.* A New World of Biomarkers and Therapeutics for Female Reproductive System and Breast Cancers: Circular RNAs. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, (2020).
 183. Yin, W.-B. *et al.* Circulating circular RNA hsa_circ_0001785 acts as a diagnostic biomarker for breast cancer detection. *Clin. Chim. Acta* **487**, 363–368 (2018).
 184. Garber, J. E. *et al.* Follow-up study of twenty-four families with Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Res.* **51**, 6094–7 (1991).
 185. Harris, C. C. & Hollstein, M. Clinical Implications of the p53 Tumor-Suppressor Gene. *N. Engl. J. Med.* **329**, 1318–1327 (1993).

186. Dumay, A. *et al.* Distinct tumor protein p53 mutants in breast cancer subgroups. *Int. J. Cancer* **132**, 1227–1231 (2013).
187. Wiemer, E. A. C. The role of microRNAs in cancer: No small matter. *Eur. J. Cancer* **43**, 1529–1544 (2007).
188. Adhami, M., Haghdoost, A. A., Sadeghi, B. & Malekpour Afshar, R. Candidate miRNAs in human breast cancer biomarkers: a systematic review. *Breast Cancer* **25**, 198–205 (2018).
189. Kennecke, H. *et al.* Metastatic Behavior of Breast Cancer Subtypes. *J. Clin. Oncol.* **28**, 3271–3277 (2010).
190. Gerratana, L. *et al.* Pattern of metastasis and outcome in patients with breast cancer. *Clin. Exp. Metastasis* **32**, 125–133 (2015).
191. Wang, H. *et al.* The prognosis analysis of different metastasis pattern in patients with different breast cancer subtypes: a SEER based study. *Oncotarget* **8**, 26368–26379 (2017).
192. Zhang, H. *et al.* Incidence, risk factors and prognostic characteristics of bone metastases and skeletal-related events (SREs) in breast cancer patients: A systematic review of the real world data. *J. Bone Oncol.* **11**, 38–50 (2018).
193. Odle, T. G. Precision Medicine in Breast Cancer. *Radiol. Technol.* **88**, 401M–421M (2017).
194. Wang, Y. & Zhou, B. P. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer progression and metastasis. *Chin. J. Cancer* **30**, 603–11 (2011).
195. Kalluri, R. & Weinberg, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* **119**, 1420–1428 (2009).
196. Blick, T. *et al.* Epithelial mesenchymal transition traits in human breast cancer cell lines. *Clin. Exp. Metastasis* **25**, 629–642 (2008).
197. Trimboli, A. J. *et al.* Direct Evidence for Epithelial-Mesenchymal Transitions in Breast Cancer. *Cancer Res.* **68**, 937–945 (2008).
198. Welch, D. R. & Hurst, D. R. Defining the Hallmarks of Metastasis. *Cancer Res.* **79**, 3011–3027 (2019).
199. Tahara, R. K., Brewer, T. M., Theriault, R. L. & Ueno, N. T. Bone Metastasis of Breast Cancer. in 105–129 (2019). doi:10.1007/978-3-030-20301-6_7.
200. Majidpoor, J. & Mortezaee, K. Steps in metastasis: an updated review. *Med. Oncol.* **38**, 3 (2021).

201. Paget, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev.* **8**, 98–101 (1989).
202. James Ewing, A. M. Neoplastic Diseases: A Treatise on Tumours. By James Ewing, A.M., M.D., Sc.D., Professor of Pathology at Cornell University Medical College, N.Y.; Pathologist to the Memorial Hospital. Third edition. Royal 8vo. Pp. 1127, with 546 illustrations. 1928. *Phil. Br. J. Surg.* **16**, 174–175 (1928).
203. Massagué, J. & Obenauf, A. C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature* **529**, 298–306 (2016).
204. Chambers, A. F., Groom, A. C. & MacDonald, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 563–572 (2002).
205. Wirtz, D., Konstantopoulos, K. & Searson, P. C. The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 512–522 (2011).
206. Wang, S. *et al.* Tumor microenvironment in chemoresistance, metastasis and immunotherapy of pancreatic cancer. *Am. J. Cancer Res.* **10**, 1937–1953 (2020).
207. Arneth, B. Tumor Microenvironment. *Medicina (B. Aires)*. **56**, 15 (2019).
208. Anderson, N. M. & Simon, M. C. The tumor microenvironment. *Curr. Biol.* **30**, R921–R925 (2020).
209. de Castro Junior, G., Puglisi, F., de Azambuja, E., El Saghir, N. S. & Awada, A. Angiogenesis and cancer: A cross-talk between basic science and clinical trials (the “do ut des” paradigm). *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **59**, 40–50 (2006).
210. Minn, A. J. *et al.* Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* **436**, 518–524 (2005).
211. Kang, Y. *et al.* A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* **3**, 537–549 (2003).
212. Psaila, B., Kaplan, R. N., Port, E. R. & Lyden, D. Priming the ‘Soil’ for Breast Cancer Metastasis: The Pre-Metastatic Niche. *Breast Dis.* **26**, 65–74 (2007).
213. Nieto, M. A., Huang, R. Y.-J., Jackson, R. A. & Thiery, J. P. EMT: 2016. *Cell* **166**, 21–45 (2016).
214. Fidler, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the ‘seed and soil’ hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 453–458 (2003).
215. D’Oronzo, S., Silvestris, E., Paradiso, A., Cives, M. & Tucci, M. Role of Bone Targeting Agents in the Prevention of Bone Metastases from Breast Cancer. *Int. J.*

- Mol. Sci.* **21**, 3022 (2020).
216. Gillett, C. E. *et al.* Retention of the expression of E-cadherin and catenins is associated with shorter survival in grade III ductal carcinoma of the breast. *J. Pathol.* **193**, 433–441 (2001).
 217. Mareel, M. & Leroy, A. Clinical, Cellular, and Molecular Aspects of Cancer Invasion. *Physiol. Rev.* **83**, 337–376 (2003).
 218. Au, S. H. *et al.* Clusters of circulating tumor cells traverse capillary-sized vessels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 4947–4952 (2016).
 219. Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R. & Weinberg, R. A. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell* **168**, 670–691 (2017).
 220. Demirkan, B. The Roles of Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) and Mesenchymal-to-Epithelial Transition (MET) in Breast Cancer Bone Metastasis: Potential Targets for Prevention and Treatment. *J. Clin. Med.* **2**, 264–282 (2013).
 221. Shao, G. *et al.* Clinical study of ^{99m}Tc-3P-RGD2 peptide imaging in osteolytic bone metastasis. *Oncotarget* **8**, 75587–75596 (2017).
 222. Chillà, A. *et al.* Effects of cilengitide in osteoclast maturation and behavior. *Exp. Cell Res.* **337**, 68–75 (2015).
 223. Kozlow, W. & Guise, T. A. Breast Cancer Metastasis to Bone: Mechanisms of Osteolysis and Implications for Therapy. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **10**, 169–180 (2005).
 224. Waning, D. L., Guise, T. A. & Mohammad, K. S. A “Connexin” Responsible for the Fatal Attraction of Cancer to Bone. *Cell Metab.* **29**, 6–8 (2019).
 225. Mohammadi Ghahhari, N. *et al.* Cooperative interaction between ER α and the EMT-inducer ZEB1 reprograms breast cancer cells for bone metastasis. *Nat. Commun.* **13**, 2104 (2022).
 226. Lin, C.-Y. *et al.* Discovery of estrogen receptor alpha target genes and response elements in breast tumor cells. *Genome Biol.* **5**, R66 (2004).
 227. Siersbæk, R., Kumar, S. & Carroll, J. S. Signaling pathways and steroid receptors modulating estrogen receptor α function in breast cancer. *Genes Dev.* **32**, 1141–1154 (2018).
 228. Yang, J. *et al.* Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 341–352 (2020).
 229. Dongre, A. & Weinberg, R. A. New insights into the mechanisms of epithelial–

- mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 69–84 (2019).
230. Müller, A. *et al.* Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* **410**, 50–56 (2001).
 231. Bruce, J., Carter, D. C. & Fraser, J. PATTERNS OF RECURRENT DISEASE IN BREAST CANCER. *Lancet* **295**, 433–435 (1970).
 232. Wang, X. *et al.* Prognostic value of depression and anxiety on breast cancer recurrence and mortality: a systematic review and meta-analysis of 282,203 patients. *Mol. Psychiatry* **25**, 3186–3197 (2020).
 233. Goss, P. E. & Chambers, A. F. Does tumour dormancy offer a therapeutic target? *Nat. Rev. Cancer* **10**, 871–877 (2010).
 234. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* **365**, 1687–1717 (2005).
 235. Houssami, N. *et al.* Meta-analysis of the impact of surgical margins on local recurrence in women with early-stage invasive breast cancer treated with breast-conserving therapy. *Eur. J. Cancer* **46**, 3219–3232 (2010).
 236. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10 801 women in 17 randomised trials. *Lancet* **378**, 1707–1716 (2011).
 237. Lowery, A. J., Kell, M. R., Glynn, R. W., Kerin, M. J. & Sweeney, K. J. Locoregional recurrence after breast cancer surgery: a systematic review by receptor phenotype. *Breast Cancer Res. Treat.* **133**, 831–841 (2012).
 238. Morrow, M. *et al.* Factors Predicting the Use of Breast-Conserving Therapy in Stage I and II Breast Carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **19**, 2254–2262 (2001).
 239. Rouzier, R. *et al.* Breast Cancer Molecular Subtypes Respond Differently to Preoperative Chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* **11**, 5678–5685 (2005).
 240. Fisher, B. *et al.* Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **16**, 2672–2685 (1998).
 241. Wang, Y. & Minden, A. Current Molecular Combination Therapies Used for the Treatment of Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 11046 (2022).

242. Willson, M. L. *et al.* Taxanes for adjuvant treatment of early breast cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.* (2019) doi:10.1002/14651858.CD004421.pub3.
243. Shah, A. N. & Gradishar, W. J. Adjuvant Anthracyclines in Breast Cancer: What Is Their Role? *Oncologist* **23**, 1153–1161 (2018).
244. Zhang, C., Xu, C., Gao, X. & Yao, Q. Platinum-based drugs for cancer therapy and anti-tumor strategies. *Theranostics* **12**, 2115–2132 (2022).
245. Yang, T. J. & Ho, A. Y. Radiation Therapy in the Management of Breast Cancer. *Surg. Clin. North Am.* **93**, 455–471 (2013).
246. Joshi, S. C., Khan, F. A., Pant, I. & Shukla, A. Role of radiotherapy in early breast cancer: an overview. *Int. J. Health Sci. (Qassim)*. **1**, 259–64 (2007).
247. Nagini, S. Breast Cancer: Current Molecular Therapeutic Targets and New Players. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **17**, 152–163 (2017).
248. Loibl, S., Poortmans, P., Morrow, M., Denkert, C. & Curigliano, G. Breast cancer. *Lancet* **397**, 1750–1769 (2021).
249. Emens, L. A. *et al.* Atezolizumab and nab -Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer: Biomarker Evaluation of the IMpassion130 Study. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **113**, 1005–1016 (2021).
250. Márquez-Garbán, D. C. *et al.* Antiestrogens in combination with immune checkpoint inhibitors in breast cancer immunotherapy. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **193**, 105415 (2019).
251. Emens, L. A. Breast Cancer Immunotherapy: Facts and Hopes. *Clin. Cancer Res.* **24**, 511–520 (2018).
252. Sun, J.-Y. *et al.* Resistance to PD-1/PD-L1 blockade cancer immunotherapy: mechanisms, predictive factors, and future perspectives. *Biomark. Res.* **8**, 35 (2020).
253. Liu, J. *et al.* PD-1/PD-L1 Checkpoint Inhibitors in Tumor Immunotherapy. *Front. Pharmacol.* **12**, (2021).
254. Murthy, R. K. *et al.* Tucatinib, Trastuzumab, and Capecitabine for HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **382**, 597–609 (2020).
255. Schneble, E., Jinga, D.-C. & Peoples, G. Breast Cancer Immunotherapy. *Maedica (Buchar)*. **10**, 185–191 (2015).
256. Maximiano, S., Magalhães, P., Guerreiro, M. P. & Morgado, M. Trastuzumab in the Treatment of Breast Cancer. *BioDrugs* **30**, 75–86 (2016).

257. Untch, M., Ditsch, N. & Hermelink, K. Immunotherapy: new options in breast cancer treatment. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **3**, 403–408 (2003).
258. Tufail, M., Cui, J. & Wu, C. Breast cancer: molecular mechanisms of underlying resistance and therapeutic approaches. *Am. J. Cancer Res.* **12**, 2920–2949 (2022).
259. Varchetta, S. *et al.* Elements Related to Heterogeneity of Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity in Patients Under Trastuzumab Therapy for Primary Operable Breast Cancer Overexpressing Her2. *Cancer Res.* **67**, 11991–11999 (2007).
260. Beano, A. *et al.* Correlation between NK function and response to trastuzumab in metastatic breast cancer patients. *J. Transl. Med.* **6**, 25 (2008).
261. von Minckwitz, G. *et al.* Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **380**, 617–628 (2019).
262. Huang, C.-S. *et al.* Trastuzumab emtansine (T-DM1) versus trastuzumab in Chinese patients with residual invasive disease after neoadjuvant chemotherapy and HER2-targeted therapy for HER2-positive breast cancer in the phase 3 KATHERINE study. *Breast Cancer Res. Treat.* **187**, 759–768 (2021).
263. Y. Maximov, P., M. Lee, T. & Craig Jordan, V. The Discovery and Development of Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs) for Clinical Practice. *Curr. Clin. Pharmacol.* **8**, 135–155 (2013).
264. Nicolini, A., Carpi, A., Ferrari, P., Mario Biava, P. & Rossi, G. Immunotherapy and Hormone-therapy in Metastatic Breast Cancer: A Review and an Update. *Curr. Drug Targets* **17**, 1127–1139 (2016).
265. Lumachi, F. *et al.* Endocrine Therapy of Breast Cancer. *Curr. Med. Chem.* **18**, 513–522 (2011).
266. Sood, A., Lang, D. K., Kaur, R., Saini, B. & Arora, S. Relevance of Aromatase Inhibitors in Breast Cancer Treatment. *Curr. Top. Med. Chem.* **21**, 1319–1336 (2021).
267. Osborne, C. K. Tamoxifen in the Treatment of Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **339**, 1609–1618 (1998).
268. Patel, H. K. & Bihani, T. Selective estrogen receptor modulators (SERMs) and selective estrogen receptor degraders (SERDs) in cancer treatment. *Pharmacol. Ther.* **186**, 1–24 (2018).
269. Fowler, A. M. *et al.* Progesterone Receptor Gene Variants in Metastatic Estrogen Receptor Positive Breast Cancer. *Horm. Cancer* **11**, 63–75 (2020).

270. Reddy, T. P. *et al.* A comprehensive overview of metaplastic breast cancer: clinical features and molecular aberrations. *Breast Cancer Res.* **22**, 121 (2020).
271. Cocco, S. *et al.* Targeting Autophagy in Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 7836 (2020).
272. Cao, L. & Niu, Y. Triple negative breast cancer: special histological types and emerging therapeutic methods. *Cancer Biol. Med.* **17**, 293–306 (2020).
273. Faria, J., Negalha, G., Azevedo, A. & Martel, F. Metformin and Breast Cancer: Molecular Targets. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **24**, 111–123 (2019).
274. Rivera Rivera, A., Castillo-Pichardo, L., Gerena, Y. & Dharmawardhane, S. Anti-Breast Cancer Potential of Quercetin via the Akt/AMPK/Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Signaling Cascade. *PLoS One* **11**, e0157251 (2016).
275. Perez, E. A. Treatment strategies for advanced hormone receptor-positive and human epidermal growth factor 2-negative breast cancer: the role of treatment order. *Drug Resist. Updat.* **24**, 13–22 (2016).
276. Wang, Y. & Minden, A. The Use of Nanomedicine to Target Signaling by the PAK Kinases for Disease Treatment. *Cells* **10**, 3565 (2021).
277. Scognamiglio, I. *et al.* Exosomal microRNAs synergistically trigger stromal fibroblasts in breast cancer. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **28**, 17–31 (2022).
278. Robson, M. *et al.* Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *N. Engl. J. Med.* **377**, 523–533 (2017).
279. Greenwalt, I., Zaza, N., Das, S. & Li, B. D. Precision Medicine and Targeted Therapies in Breast Cancer. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* **29**, 51–62 (2020).
280. Jones, R. H. *et al.* Fulvestrant plus capivasertib versus placebo after relapse or progression on an aromatase inhibitor in metastatic, oestrogen receptor-positive breast cancer (FAKTION): a multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* **21**, 345–357 (2020).
281. Martorana, F. *et al.* AKT Inhibitors: New Weapons in the Fight Against Breast Cancer? *Front. Pharmacol.* **12**, (2021).
282. Porta, C., Paglino, C. & Mosca, A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front. Oncol.* **4**, (2014).
283. Chen, D. S. & Hurwitz, H. Combinations of Bevacizumab With Cancer Immunotherapy. *Cancer J.* **24**, 193–204 (2018).
284. Sabatier, R. *et al.* Stem Cells Inhibition by Bevacizumab in Combination with

- Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer. *J. Clin. Med.* **8**, 612 (2019).
285. Kazazi-Hyseni, F., Beijnen, J. H. & Schellens, J. H. M. Bevacizumab. *Oncologist* **15**, 819–825 (2010).
 286. Pinkerton, J. V. & Thomas, S. Use of SERMs for treatment in postmenopausal women. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **142**, 142–154 (2014).
 287. Royce, M. *et al.* Everolimus Plus Endocrine Therapy for Postmenopausal Women With Estrogen Receptor–Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2–Negative Advanced Breast Cancer. *JAMA Oncol.* **4**, 977 (2018).
 288. Safra, T. *et al.* Everolimus Plus Letrozole for Treatment of Patients With HR+, HER2– Advanced Breast Cancer Progressing on Endocrine Therapy: An Open-label, Phase II Trial. *Clin. Breast Cancer* **18**, e197–e203 (2018).
 289. Mouridsen, H. *et al.* Phase III Study of Letrozole Versus Tamoxifen as First-Line Therapy of Advanced Breast Cancer in Postmenopausal Women: Analysis of Survival and Update of Efficacy From the International Letrozole Breast Cancer Group. *J. Clin. Oncol.* **21**, 2101–2109 (2003).
 290. Brufsky, A. M. Managing Postmenopausal Women with Hormone Receptor-Positive Advanced Breast Cancer Who Progress on Endocrine Therapies with Inhibitors of the PI3K Pathway. *Breast J.* **20**, 347–357 (2014).
 291. Gao, J. J. *et al.* CDK4/6 inhibitor treatment for patients with hormone receptor-positive, HER2-negative, advanced or metastatic breast cancer: a US Food and Drug Administration pooled analysis. *Lancet Oncol.* **21**, 250–260 (2020).
 292. Devilee, P. & Rookus, M. A. A tiny step closer to personalized risk prediction for breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **362**, 1043–5 (2010).
 293. Ulaganathan, V. K., Sperl, B., Rapp, U. R. & Ullrich, A. Germline variant FGFR4 p.G388R exposes a membrane-proximal STAT3 binding site. *Nature* **528**, 570–574 (2015).
 294. Creative Biolabs. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs). <https://www.creative-biolabs.com/drug-discovery/diagnostics/single-nucleotide-polymorphisms-analysis.htm> (2022).
 295. Deng, N., Zhou, H., Fan, H. & Yuan, Y. Single nucleotide polymorphisms and cancer susceptibility. *Oncotarget* **8**, 110635–110649 (2017).
 296. Yang, M.-D. *et al.* Contribution of matrix metalloproteinases-1 genotypes to gastric cancer susceptibility in Taiwan. *BioMedicine* **7**, 10 (2017).

297. Chen, C.-M., Lai, C.-H., Wu, H.-J. & Wu, L.-T. Genetic characteristic of class 1 integrons in proteus mirabilis isolates from urine samples. *BioMedicine* **7**, 9 (2017).
298. Chang, W.-S. *et al.* The contributions of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 genotypes to triple negative breast cancer risk. *BioMedicine* **6**, 4 (2016).
299. Nagy, R., Sweet, K. & Eng, C. Highly penetrant hereditary cancer syndromes. *Oncogene* **23**, 6445–6470 (2004).
300. Antoniou, A. C. Breast and ovarian cancer risks to carriers of the BRCA1 5382insC and 185delAG and BRCA2 6174delT mutations: a combined analysis of 22 population based studies. *J. Med. Genet.* **42**, 602–603 (2005).
301. Wang, C.-Q. *et al.* FSCN1 gene polymorphisms: biomarkers for the development and progression of breast cancer. *Sci. Rep.* **7**, 15887 (2017).
302. Huang, B.-F. *et al.* HMGB1 genetic polymorphisms are biomarkers for the development and progression of breast cancer. *Int. J. Med. Sci.* **15**, 580–586 (2018).
303. Chen, H. *et al.* The effect of galectin-3 genetic variants on the susceptibility and prognosis of gliomas in a Chinese population. *Neurosci. Lett.* **518**, 1–4 (2012).
304. Hu, C.-Y., Chang, S.-K., Wu, C.-S., Tsai, W.-I. & Hsu, P.-N. Galectin-3 gene (LGALS3) +292C allele is a genetic predisposition factor for rheumatoid arthritis in Taiwan. *Clin. Rheumatol.* **30**, 1227–1233 (2011).
305. Barondes, S. H. *et al.* Galectins: A family of animal β -galactoside-binding lectins. *Cell* **76**, 597–598 (1994).
306. Cummings, R. D., Liu, F.-T. & Vasta, G. R. *Galectins. Essentials of Glycobiology* (2015).
307. Teichberg, V. I., Silman, I., Beitsch, D. D. & Resheff, G. A beta-D-galactoside binding protein from electric organ tissue of *Electrophorus electricus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **72**, 1383–1387 (1975).
308. de Waard, A., Hickman, S. & Kornfeld, S. Isolation and properties of beta-galactoside binding lectins of calf heart and lung. *J. Biol. Chem.* **251**, 7581–7587 (1976).
309. Dam, T. K. *et al.* Galectins Bind to the Multivalent Glycoprotein Asialofetuin with Enhanced Affinities and a Gradient of Decreasing Binding Constants. *Biochemistry* **44**, 12564–12571 (2005).

310. Grazier, J. J. & Sylvester, P. W. Role of Galectins in Metastatic Breast Cancer. in *Breast Cancer* 115–130 (Exon Publications, 2022). doi:10.36255/exon-publications-breast-cancer-galectins.
311. Farhad, M., Rolig, A. S. & Redmond, W. L. The role of Galectin-3 in modulating tumor growth and immunosuppression within the tumor microenvironment. *Oncoimmunology* **7**, e1434467 (2018).
312. Fortuna-Costa, A., Gomes, A. M., Kozlowski, E. O., Stelling, M. P. & Pavão, M. S. G. Extracellular Galectin-3 in Tumor Progression and Metastasis. *Front. Oncol.* **4**, (2014).
313. Ahmed, H. & Alsadek, D. M. M. Galectin-3 as a Potential Target to Prevent Cancer Metastasis. *Clin. Med. Insights Oncol.* **9**, CMO.S29462 (2015).
314. Ahmad, N. *et al.* Galectin-3 Precipitates as a Pentamer with Synthetic Multivalent Carbohydrates and Forms Heterogeneous Cross-linked Complexes. *J. Biol. Chem.* **279**, 10841–10847 (2004).
315. Rabinovich, G. A., Toscano, M. A., Jackson, S. S. & Vasta, G. R. Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17**, 513–520 (2007).
316. Newlaczyk, A. U. & Yu, L.-G. Galectin-3 – A jack-of-all-trades in cancer. *Cancer Lett.* **313**, 123–128 (2011).
317. Henderson, N. C. & Sethi, T. The regulation of inflammation by galectin-3. *Immunol. Rev.* **230**, 160–71 (2009).
318. Boutas, I. *et al.* The expression of galectin-3 in breast cancer and its association with chemoresistance: a systematic review of the literature. *Arch. Gynecol. Obstet.* **300**, 1113–1120 (2019).
319. Houzelstein, D. *et al.* Phylogenetic Analysis of the Vertebrate Galectin Family. *Mol. Biol. Evol.* **21**, 1177–1187 (2004).
320. Dumić, J., Dabelić, S. & Flögel, M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim. Biophys. Acta* **1760**, 616–35 (2006).
321. Birdsall, B. *et al.* NMR Solution Studies of Hamster Galectin-3 and Electron Microscopic Visualization of Surface-Adsorbed Complexes: Evidence for Interactions between the N- and C-Terminal Domains. *Biochemistry* **40**, 4859–4866 (2001).
322. Raz, A., Pazerini, G. & Carmi, P. Identification of the metastasis-associated,

- galactoside-binding lectin as a chimeric gene product with homology to an IgE-binding protein. *Cancer Res.* **49**, 3489–93 (1989).
323. Massa, S. M., Cooper, D. N. W., Leffler, H. & Barondes, S. H. L-29, an endogenous lectin, binds to glycoconjugate ligands with positive cooperativity. *Biochemistry* **32**, 260–267 (1993).
 324. Ochieng, J. Modulation of the biological functions of galectin-3 by matrix metalloproteinases. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1379**, 97–106 (1998).
 325. Yoshii, T. *et al.* Galectin-3 Phosphorylation Is Required for Its Anti-apoptotic Function and Cell Cycle Arrest. *J. Biol. Chem.* **277**, 6852–6857 (2002).
 326. Seetharaman, J. *et al.* X-ray Crystal Structure of the Human Galectin-3 Carbohydrate Recognition Domain at 2.1-Å Resolution. *J. Biol. Chem.* **273**, 13047–13052 (1998).
 327. Agrwal, N., Sun, Q., Wang, S. Y. & Wang, J. L. Carbohydrate-binding protein 35. I. Properties of the recombinant polypeptide and the individuality of the domains. *J. Biol. Chem.* **268**, 14932–14939 (1993).
 328. Shimura, T. *et al.* Implication of Galectin-3 in Wnt Signaling. *Cancer Res.* **65**, 3535–3537 (2005).
 329. Shimura, T. *et al.* Galectin-3, a Novel Binding Partner of β -Catenin. *Cancer Res.* **64**, 6363–6367 (2004).
 330. Califice, S., Castronovo, V. & Van Den Brûle, F. Galectin-3 and cancer (Review). *Int. J. Oncol.* **25**, 983–92 (2004).
 331. Nangia-Makker, P., Hogan, V. & Raz, A. Galectin-3 and cancer stemness. *Glycobiology* **28**, 172–181 (2018).
 332. Mehul, B. & Hughes, R. C. Plasma membrane targeting, vesicular budding and release of galectin 3 from the cytoplasm of mammalian cells during secretion. *J. Cell Sci.* **110**, 1169–1178 (1997).
 333. Honjo, Y., Nangia-Makker, P., Inohara, H. & Raz, A. Down-regulation of galectin-3 suppresses tumorigenicity of human breast carcinoma cells. *Clin. Cancer Res.* **7**, 661–8 (2001).
 334. Chen, H.-Y. *et al.* Galectin-3 negatively regulates TCR-mediated CD4 + T-cell activation at the immunological synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 14496–14501 (2009).
 335. Grigorian, A. & Demetriou, M. Manipulating Cell Surface Glycoproteins by

- Targeting N-Glycan–Galectin Interactions. in 245–266 (2010). doi:10.1016/S0076-6879(10)80012-6.
336. Di Lella, S. *et al.* When Galectins Recognize Glycans: From Biochemistry to Physiology and Back Again. *Biochemistry* **50**, 7842–7857 (2011).
 337. Sato, S. & Hughes, R. C. Binding specificity of a baby hamster kidney lectin for H type I and II chains, polylactosamine glycans, and appropriately glycosylated forms of laminin and fibronectin. *J. Biol. Chem.* **267**, 6983–90 (1992).
 338. Blair, B. B. *et al.* Increased Circulating Levels of Galectin Proteins in Patients with Breast, Colon, and Lung Cancer. *Cancers (Basel)*. **13**, 4819 (2021).
 339. Nishimura. Clinical significance of circulating galectins as colorectal cancer markers. *Oncol. Rep.* **25**, (2011).
 340. Partridge, E. A. *et al.* Regulation of Cytokine Receptors by Golgi N-Glycan Processing and Endocytosis. *Science (80-.)*. **306**, 120–124 (2004).
 341. Boscher, C. & Nabi, I. R. Galectin-3– and phospho-caveolin-1–dependent outside-in integrin signaling mediates the EGF motogenic response in mammary cancer cells. *Mol. Biol. Cell* **24**, 2134–2145 (2013).
 342. Nam, K. *et al.* Binding of galectin-1 to integrin $\beta 1$ potentiates drug resistance by promoting survivin expression in breast cancer cells. *Oncotarget* **8**, 35804–35823 (2017).
 343. Dong, R. *et al.* Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy (Review). *Int. J. Mol. Med.* (2017) doi:10.3892/ijmm.2017.3311.
 344. Guo, Y. *et al.* Roles of galectin-3 in the tumor microenvironment and tumor metabolism (Review). *Oncol. Rep.* (2020) doi:10.3892/or.2020.7777.
 345. Sawa-Wejksza, K. & Kandefer-Szerszeń, M. Tumor-Associated Macrophages as Target for Antitumor Therapy. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. **66**, 97–111 (2018).
 346. Lee, C. *et al.* Targeting of M2-like tumor-associated macrophages with a melittin-based pro-apoptotic peptide. *J. Immunother. Cancer* **7**, 147 (2019).
 347. Machado, C. M. L. *et al.* Galectin-3 disruption impaired tumoral angiogenesis by reducing VEGF secretion from TGF β 1-induced macrophages. *Cancer Med.* **3**, 201–214 (2014).
 348. Anderson, K. G., Stromnes, I. M. & Greenberg, P. D. Obstacles Posed by the Tumor Microenvironment to T cell Activity: A Case for Synergistic Therapies.

- Cancer Cell* **31**, 311–325 (2017).
349. Gordon-Alonso, M., Hirsch, T., Wildmann, C. & van der Bruggen, P. Galectin-3 captures interferon-gamma in the tumor matrix reducing chemokine gradient production and T-cell tumor infiltration. *Nat. Commun.* **8**, 793 (2017).
 350. Menachem, A., Bodner, O., Pastor, J., Raz, A. & Kloog, Y. Inhibition of malignant thyroid carcinoma cell proliferation by Ras and galectin-3 inhibitors. *Cell Death Discov.* **1**, 15047 (2015).
 351. Chen, C. *et al.* Increased Circulation of Galectin-3 in Cancer Induces Secretion of Metastasis-Promoting Cytokines from Blood Vascular Endothelium. *Clin. Cancer Res.* **19**, 1693–1704 (2013).
 352. Lagana, A. *et al.* Galectin Binding to Mgat5-Modified N-Glycans Regulates Fibronectin Matrix Remodeling in Tumor Cells. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 3181–3193 (2006).
 353. Lau, K. S. *et al.* Complex N-Glycan Number and Degree of Branching Cooperate to Regulate Cell Proliferation and Differentiation. *Cell* **129**, 123–134 (2007).
 354. Handerson, T., Camp, R., Harigopal, M., Rimm, D. & Pawelek, J. β 1,6-Branched Oligosaccharides Are Increased in Lymph Node Metastases and Predict Poor Outcome in Breast Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **11**, 2969–2973 (2005).
 355. Peiris, D. *et al.* Cellular glycosylation affects Herceptin binding and sensitivity of breast cancer cells to doxorubicin and growth factors. *Sci. Rep.* **7**, 43006 (2017).
 356. Paszek, M. J. *et al.* The cancer glycocalyx mechanically primes integrin-mediated growth and survival. *Nature* **511**, 319–325 (2014).
 357. Kanyo, N. *et al.* Glycocalyx regulates the strength and kinetics of cancer cell adhesion revealed by biophysical models based on high resolution label-free optical data. *Sci. Rep.* **10**, 22422 (2020).
 358. Rapoport, E. M. *et al.* Localization of Galectins within Glycocalyx. *Biochem.* **83**, 727–737 (2018).
 359. Mauris, J. *et al.* Modulation of Ocular Surface Glycocalyx Barrier Function by a Galectin-3 N-terminal Deletion Mutant and Membrane-Anchored Synthetic Glycopolymers. *PLoS One* **8**, e72304 (2013).
 360. Talaga, M. L. *et al.* Multitasking Human Lectin Galectin-3 Interacts with Sulfated Glycosaminoglycans and Chondroitin Sulfate Proteoglycans. *Biochemistry* **55**, 4541–4551 (2016).

361. Yang, E. H. *et al.* Galectin-3 alters the lateral mobility and clustering of β 1-integrin receptors. *PLoS One* **12**, e0184378 (2017).
362. Topcu, T. *et al.* The clinical importance of serum galectin-3 levels in breast cancer patients with and without metastasis. *J. Cancer Res. Ther.* **14**, 583 (2018).
363. de Oliveira, J. T. *et al.* Hypoxia Up-Regulates Galectin-3 in Mammary Tumor Progression and Metastasis. *PLoS One* **10**, e0134458 (2015).
364. Zhao, X.-Y. *et al.* Hypoxia inducible factor-1 mediates expression of galectin-1: the potential role in migration/invasion of colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* **31**, 1367–1375 (2010).
365. Saxena, K., Jolly, M. K. & Balamurugan, K. Hypoxia, partial EMT and collective migration: Emerging culprits in metastasis. *Transl. Oncol.* **13**, 100845 (2020).
366. Hara, A. *et al.* Galectin-3 as a Next-Generation Biomarker for Detecting Early Stage of Various Diseases. *Biomolecules* **10**, 389 (2020).
367. Miller, S. A., Dykes, D. D. & Polesky, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* **16**, 1215–1215 (1988).
368. Vorlíčková, M., Kypr, J. & Sklenář, V. NUCLEIC ACIDS | Spectroscopic Methods. in *Encyclopedia of Analytical Science* 391–399 (Elsevier, 2005). doi:10.1016/B0-12-369397-7/00428-3.
369. Mullis, K. *et al.* Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**, 263–273 (1986).
370. https://bioinfo.ut.ee/.primer3_results.cgi release 0.4.0. https://bioinfo.ut.ee/cgi-bin/primer3-0.4.0/primer3_results.cgi.
371. Slater, G. W. DNA gel electrophoresis: The reptation model(s). *Electrophoresis* **30**, S181–S187 (2009).
372. Aaij, C. & Borst, P. The gel electrophoresis of DNA. *Biochim. Biophys. Acta - Nucleic Acids Protein Synth.* **269**, 192–200 (1972).
373. Krizek, D. M. & Rick, M. E. Agarose Gel Electrophoresis of Proteins. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **15**, (2002).
374. Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y. & Kim, Y. H. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *J. Vis. Exp.* (2012) doi:10.3791/3923.
375. Saiki, R. K. *et al.* Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and

- Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* (80-.). **230**, 1350–1354 (1985).
376. Terzioğlu-Uşak, Ş., Horozoğlu, C., Demirkol, Ş., Turna, A. & Yaylım, İ. The role of galectin-3 and its genetic variants in tumor risk and survival of patients with surgically resected early-stage non-small cell lung cancer. *Turkish J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **29**, 212–222 (2021).
 377. Horozoglu, C. *et al.* Is there any relationship between LGALS3 gene variations and histopathological criteria in laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC)? *Turkish J. Biochem.* **46**, 703–708 (2021).
 378. Xu, W.-D. *et al.* Gene polymorphisms of LGALS2, LGALS3 and LGALS9 in patients with rheumatoid arthritis. *Cell. Immunol.* **368**, 104419 (2021).
 379. Kovacevic, Z. *et al.* Galectin 3 (LGALS3) Gene Polymorphisms Are Associated with Biochemical Parameters and Primary Disease in Patients with End-Stage Renal Disease in Serbian Population. *J. Clin. Med.* **11**, 3874 (2022).
 380. Shi, Y. *et al.* Galectin-3 rs4652 A>C polymorphism is associated with the risk of gastric carcinoma and P-glycoprotein expression level. *Oncol. Lett.* (2017) doi:10.3892/ol.2017.7258.
 381. Lin, C.-I. *et al.* Galectin-3 Targeted Therapy with a Small Molecule Inhibitor Activates Apoptosis and Enhances Both Chemosensitivity and Radiosensitivity in Papillary Thyroid Cancer. *Mol. Cancer Res.* **7**, 1655–1662 (2009).
 382. Song, S. *et al.* Overexpressed Galectin-3 in Pancreatic Cancer Induces Cell Proliferation and Invasion by Binding Ras and Activating Ras Signaling. *PLoS One* **7**, e42699 (2012).
 383. Zhao, W. *et al.* Galectin-3 Mediates Tumor Cell–Stroma Interactions by Activating Pancreatic Stellate Cells to Produce Cytokines via Integrin Signaling. *Gastroenterology* **154**, 1524-1537.e6 (2018).
 384. Boutas, I. *et al.* The expression of Galectin-3 in breast cancer and its association with metastatic disease: a systematic review of the literature. *Mol. Biol. Rep.* **48**, 807–815 (2021).
 385. I Iurisci, N Tinari, C Natoli, D Angelucci, E Cianchetti, S. I. Concentrations of galectin-3 in the sera of normal controls and cancer patients. *Clin Cancer Res.* **6**(4):1389-93.

HAM VERİLER

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
melektezgrup * gal34644	126	85,1%	22	14,9%	148	100,0%
melektezgrup * gal4644C	126	85,1%	22	14,9%	148	100,0%
melektezgrup * gal4644A	126	85,1%	22	14,9%	148	100,0%
melektezgrup * gal4644CA	126	85,1%	22	14,9%	148	100,0%
melektezgrup * gal34652	126	85,1%	22	14,9%	148	100,0%
melektezgrup * gal4652A	126	85,1%	22	14,9%	148	100,0%
melektezgrup * gal4652C	126	85,1%	22	14,9%	148	100,0%
melektezgrup * gal4652AC	126	85,1%	22	14,9%	148	100,0%

melektezgrup * gal34644 Crosstabulation

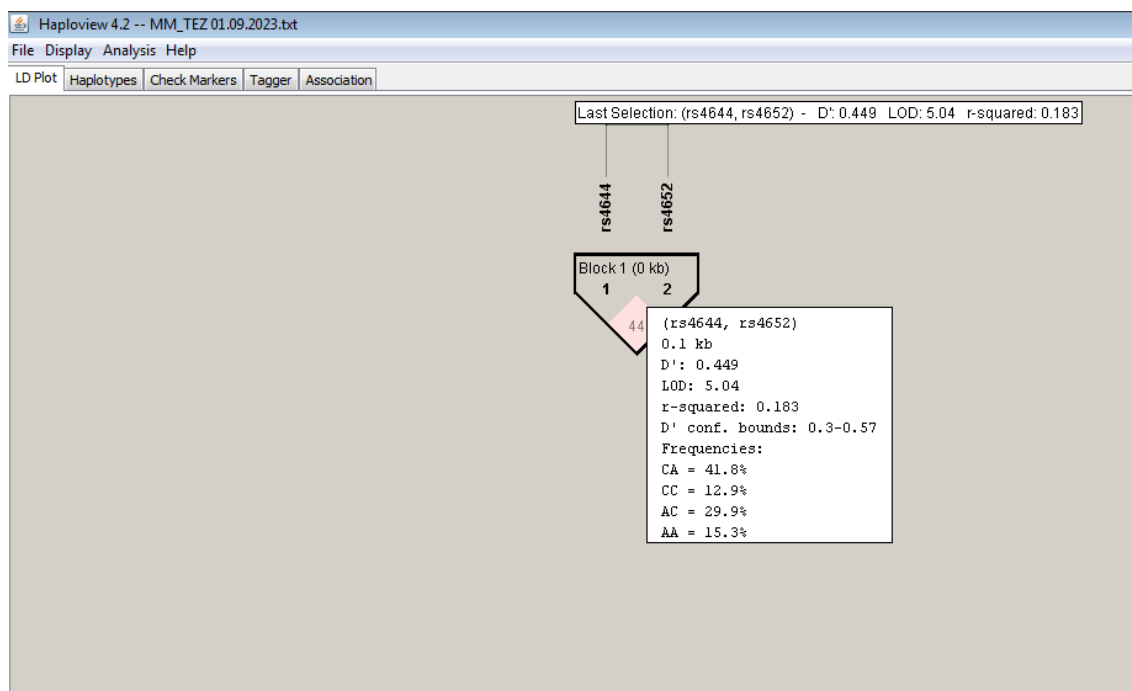
Count

		gal34644			Total
		CC	CA	AA	
melektezgrup	meme ca	4	63	9	76
	kontrol	25	17	8	50
Total		29	80	17	126

melektezgrup * gal34652 Crosstabulation

Count

		gal34652			Total
		AA	AC	CC	
melektezgrup	meme ca	25	30	21	76
	kontrol	21	22	7	50
Total		46	52	28	126



Haploview 4.2 -- MM_TEZ 01.09.2023.txt

File Display Analysis Help

LD Plot Haplotypes Check Markers Tagger Association

Single Marker Haplotypes Permutation Tests

Haplotype	Freq.	Case, Control Ratios	Chi Square	p value
Haplotype Associations				
Block 1				
CA	0.418	46.7 : 105.3, 58.7 : 41.3	19.352	1.0872E-5
AC	0.299	47.7 : 104.3, 27.7 : 72.3	0.398	0.5283
AA	0.153	33.3 : 118.7, 5.3 : 94.7	12.768	4.0E-4
CC	0.129	24.3 : 127.7, 8.3 : 91.7	3.134	0.0767

☒ Show CC counts ☐ Show CC frequencies

Haploview 4.2 -- MM_TEZ 01.09.2023.txt

File Display Analysis Help

LD Plot Haplotypes Check Markers Tagger Association

Single Marker Haplotypes Permutation Tests

#	Name	Assoc Allele	Case, Control Ratios	Chi Square	p value
1	rs4644	A	0.533, 0.330	10.023	0.0015
2	rs4652	C	0.474, 0.360	3.183	0.0744

PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

GALEKTİN-3 GEN VARYANTLARININ VE SERUM DÜZEYLERİNİN MEME KANSERİ HASTALARDA ARAŞTIRILMASI-2

ORJİNALLİK RAPORU

%6

BENZERLİK ENDEKSİ

%6

İNTERNET KAYNAKLARI

%2

YAYINLAR

%2

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

acikbilim.yok.gov.tr
İnternet Kaynağı

%3

2

Submitted to Ankara University
Öğrenci Ödevi

<%1

3

nek.istanbul.edu.tr:4444
İnternet Kaynağı

<%1

4

"Poster Özetleri / Poster Abstracts", Turkish
Journal of Biochemistry, 2015
Yayın

<%1

5

9lib.net
İnternet Kaynağı

<%1

6

Submitted to Erciyes Üniversitesi
Öğrenci Ödevi

<%1

7

Submitted to Ataturk Universitesi
Öğrenci Ödevi

<%1

8

www.utsakcongress.com
İnternet Kaynağı

<%1