

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

MEME KARSİNOMLARINDA PRİMER ODAK VE LENF
NODU METASTAZLARINDA TWİST-1 VE ÖSTROJEN
RESEPTÖR-BETA EKSPRESYONU

Dr. Melis Emine SİREL

Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR

2014

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

MEME KARSİNOMLARINDA PRİMER ODAK VE LENF
NODU METASTAZLARINDA TWİST-1 VE ÖSTROJEN
RESEPTÖR-BETA EKSPRESYONU

Dr. Melis Emine SİREL

Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Serap IŞIKSOY

ESKİŞEHİR

2014

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA;

Dr. Melis Emine SİREL'e ait "Meme Karsinomlarında Primer Odak ve Lenf Nodu Metastazlarında Twist-1 ve Östrojen Reseptör-Beta Ekspresyonu" adlı çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Patoloji Anabilim Dalında Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih: 24/03/2014

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Sare KABUKÇUOĞLU

Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı

Üye

Prof. Dr. Serap IŞIKSOY

Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı

Üye

Prof. Dr. Emine DÜNDAR

Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun Tarih ve.....Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Bekir YAŞAR

Dekan

TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda yapmış olduğum uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren değerli öğretim üyelerine, tezimin hazırlanmasında büyük emeği olan Prof. Dr. Serap IŞIKSOY'a, istatistiksel değerlendirmeyi yapan Biyoistatistik Anabilim Dalı'ndan Yrd. Doç. Dr. Cengiz BAL'a destekleri için teşekkür ederim.

ÖZET

Sirel, M.E. Meme Karsinomlarında Primer Odak ve Lenf Nodu Metastazlarında Twist-1 ve Östrojen Reseptör-Beta Ekspresyonu. Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, 2014. Meme kanser gelişimindeki en önemli risk faktörlerinden biri östrojen maruziyetidir. Östrojen, meme dokusundaki etkilerini ER- β ve ER- α ile gerçekleştirir. Östrojen reseptör- α 'nın meme kanserindeki klinikopatolojik önemi günümüzde bilinmekte olup, östrojen reseptör- β ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. Twist-1 meme tümörlerinde tümör invazyonu ve metastazı ile epitelyal-mezenkimal dönüşümde önemli olduğu düşünülen bir transkripsiyon faktörü olup, meme karsinogenezinde ve meme kanserinin prognozunda rolü olduğuna dair çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmada lenf nodu metastazı olmayan (grup 1) ve olan (grup 2) 50'şer olguda ER- β ve Twist-1 ekspresyonlarının; tümör grade'i, boyutu ve lokalizasyonu, hormon durumu ve lenf nodu durumu gibi klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi değerlendirildi. Tüm olguların % 89.8'inde normal meme dokusunda nükleer östrojen reseptör- β ekspresyonu görüldü. Nükleer ER- β ekspresyonu tüm olguların % 63.4'ünde pozitif bulunmuş lenf nodu durumu, tümör grade'i ve lokalizasyonu ile arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ($p>0.05$). Östrojen reseptör- β 'nin primer tümör ve lenf nodu metastazındaki ekspresyonu karşılaştırıldığında aralarında düşük uyum saptandı ($p=0.019$). Grup 2'deki grade 2 ve 3 olan olgularda nükleer ER- β pozitif olgu sayısı daha fazladır (% 56). Grade 1 tümörlerde ER- β ekspresyon sıklığı daha azdı ($p=0.03$). Tüm olgular ele alındığında ER- β 'nin sitoplazmik ekspresyonu lenf nodu pozitif olgularda daha sıktı ($p=0.008$). Twist-1 ekspresyonu (nükleer) olguların % 80.3'ünde saptanmış olup normal meme dokusunda % 93.1'inde pozitifdir. Grup 2 olgularda Twist-1 ekspresyonu daha çok sağ memeye lokalize tümörlerde izlenmiştir ($p=0.016$). Twist-1 ekspresyonunun diğer klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi izlenmemiştir ($p>0.05$).

Anahtar Kelimeler: Twist-1, ER- β , lenf nodu metastazı, invaziv meme kanseri, grade

ABSTRACT

Sirel, M.E. The Expression of Twist-1 and Estrogen Receptor-Beta in Primary Breast Carcinoma and Its Lymph Node Metastasis. Osmangazi University Faculty of Medicine, Department of Pathology, Thesis, Eskişehir, 2014. Estrogen exposure is the most important risk factor in breast cancer development. Estrogen reveals its effects in breast tissue with ER- α and ER- β . The clinicopathologic importance of ER- α has been known at the present time but the reports about ER- β is limited in literature. Twist-1 which is a transcription factor, has an important role in epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion/metastasis, has an important role in breast carcinogenesis and is associated with poor prognosis, as it has already shown in the previous studies. We researched the relation between ER- β and Twist-1 expression with clinicopathologic parameters which include tumour grade, tumour localization, tumour size, lymph node status and hormonal status at 50 breast cancer patients who didn't have axillary lymph node metastasis (group 1) and 50 breast cancer patients who had axillary lymph node metastasis (group 2). The estrogen receptor- β was positive 63.4 % of breast cancer patients in primary tumor and in 89.9 % of normal breast tissue. We compared the expression of ER- β in primary tumour and lymph node metastasis. We found weak inter-rater agreement between primary and metastatic foci as regarding expression of ER- β ($p=0.019$). There was no association between nuclear expression of ER- β and lymph node status, tumour grade, tumour localization in all patients ($p>0.05$). In group 2, the number of patients who has grade 2 and grade 3 tumour and show more frequent nuclear ER- β expression ($p= 0.03$). Cytoplasmic ER- β expression is frequent in lymph node positive group ($p=0.008$). Twist-1 was positive in 80.3 % of all breast cancer patients and in 93.1% of normal breast tissue. In group 2, Twist-1 nuclear expression is frequent at right sided breast carcinomas ($p=0.016$). There was no significant difference between Twist-1 expression and other clinicopathologic parameters ($p>0.05$).

Key Words: Twist-1, ER- β , lymph node metastasis, invasive ductal carcinoma, grade

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLULAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Meme Kanseri İnsidansı	6
2.2. Meme Kanseri Risk Faktörleri	6
2.3. Meme Kanseri Progresyonu ve Karsinogenezis	8
2.4. Meme Kanseri Prognostik Faktörler	9
2.5. Meme Kanseri Lokalizasyonu	11
2.6. Meme Kanseri Histolojik Sınıflaması	11
2.7. Meme Kanseri Tanı	15
2.8. Meme Kanseri Yayılma Yolları	15
2.9. Meme Kanseri Patolojik Prognostik Faktörler	16
2.10. Meme Kanseri Moleküler Prognostik Faktörler	18
2.11. Meme Kanseri Patolojik Evreleme	19

	Sayfa
2.12. Normal Meme Dokusunda Östrojenin Rolü ve Östrojen Reseptör Ekspresyonları	20
2.13. ER- β ve ER- α 'nın Moleküler Yapıları	24
2.14. Östrojen Reseptörlerinin Meme Karsinogenezindeki Rollerini	27
2.15. ER- β ve ER- α 'nın Memenin Benign, Pre-malign ve Malign Lezyonlarında Ekspresyonları	29
2.16. ER- β ve ER- α 'nın Meme Kanserinde Prognozla İlişkisi	30
2.17. Twist-1 Nedir?	31
2.18. Twist-1'in Metastazla İlişkisi	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM	36
3.1. Boyanma Yöntemi	36
3.2. İstatistiksel Değerlendirme	38
4. BULGULAR	39
4.1. Klinik Parametreler	39
4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular	39
4.2.1. ER- β Ekspresyonu	39
4.2.2. Twist-1 Ekspresyonu	59
4.2.3. Primer Odakta ER- β ve Twist-1'in Nükleer Ekspresyonları	76
4.2.4. Primer Odakta ER- β ve Twist-1'in Sitoplazmik Ekspresyonları	77
4.2.5. Metastatik Lenf Nodunda ER- β ve Twist-1'in Nükleer Ekspresyonları	80
4.2.6. Metastatik Lenf Nodunda ER- β ve Twist-1'in Sitoplazmik Ekspresyonları	80
5. TARTIŞMA	90
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	108
KAYNAKLAR	114

SİMGELER VE KISALTMALAR

bHLH	basic-helix-loop-helix
BRCA1	Breast cancer gene-1
BRCA2	Breast cancer gene-2
CANNTG	Hekzanukleotid
DKIS	Duktal karsinoma in situ
DNA	Deoksiribonükleikasit
E-BOXE	Çift taraflı DNA bağlayıcı domain
EGFR	Epidermal growth faktör reseptörü
EMT	Epitelyal-mezenkimal dönüşüm
ERE	Östrojene yanıt veren element
ER- α	Östrojen reseptör- α
ER- β	Östrojen reseptör- β
HER2	Human epidermal growth factor-2
LKIS	Lobuler karsinoma in situ
m-RNA	Messenger-ribonükleikasit
PR	Progesteron reseptörü
RNA	Ribonükleikasit
RT-PCR	Reverse-transkripsiyon protein zincir reaksiyonu

ŞEKİLLER

	Sayfa
4.1. ER- α ve ER- β 'nin yapısı	25
4.2. Genomik ve non-genomik yolak	27
4.3. Twist-1 ve Twist-2'nin yapısı	32
4.4. Grup 1'de primer odakta tümörde ve endojen kontrolde orta şiddette nükleer ER- β ekspresyonu, tümörde ve endojen kontrolde negatif sitoplazmik ER- β ekspresyonu	82
4.5. Grup 1'de primer odakta tümörde ve endojen kontrolde orta şiddette nükleer ER- β ekspresyonu, tümörde ve endojen kontrolde negatif sitoplazmik ER- β ekspresyonu	82
4.6. Grup 1'de primer odaktaki hiperplastik meme glandlarını içeren endojen kontrolde kuvvetli şiddette nükleer ve negatif sitoplazmik ER- β ekspresyonu	83
4.7. Grup 1'de primer odaktaki tümörde kuvvetli şiddette nükleer ve negatif sitoplazmik ER- β ekspresyonu	83
4.8. Grup 2'de primer odakta tümörde zayıf, endojen kontrolde kuvvetli şiddette nükleer ER- β ekspresyonu, tümörde ve endojen kontrolde negatif sitoplazmik ER- β ekspresyonu	84
4.9. Grup 2'de metastatik lenf nodundaki tümöral dokuda orta şiddette nükleer ve sitoplazmik negatif ER- β ekspresyonu.	84
4.10. Grup 2'de metastatik lenf nodundaki tümöral dokuda orta şiddette nükleer ve negatif sitoplazmik ER- β ekspresyonu	85
4.11. Grup 2'de metastatik lenf nodundaki tümöral dokuda zayıf şiddette nükleer ve negatif sitoplazmik ER- β ekspresyonu	85

	Sayfa
4.12. Grup 2'de, primer odakta tümörde zayıf şiddette nükleer ve sitoplazmik ER- β ekspresyonu	86
4.13. Grup 2'de, metastatik lenf nodundaki tümörde negatif nükleer ve sitoplazmik ER- β ekspresyonu	86
4.14. Grup 1'de, primer odakta, tümörde zayıf şiddette nükleer ve sitoplazmik Twist-1 ekspresyonu	87
4.15. Grup 1'de, primer odakta, tümörde zayıf şiddette nükleer ve sitoplazmik Twist-1 ekspresyonu.	87
4.16. Grup 1'de, primer odakta, tümörde orta şiddette nükleer ve zayıf-orta şiddette sitoplazmik Twist-1 ekspresyonu	88
4.17. Grup 2'de, primer odakta, tümörde çok zayıf şiddette nükleer ve sitoplazmik Twist-1 ekspresyonu	88
4.18. Grup 2'de, metastatik lenf nodundaki tümörde çok zayıf nükleer ve sitoplazmik Twist-1 ekspresyonu	89

TABLOLAR

	Sayfa
2.1. ER- α ve ER- β 'nin normal dokulardaki lokalizasyonu	22
4.1. Grup 1 ve 2'de ER- β 'nin nukleer ekspresyonunun boyanma şiddetine göre dağılımı	41
4.2. Tümör grade'ine göre ER- β 'nin nukleer ekspresyonunun tüm olgulardaki dağılımı	41
4.3. Tümör lokalizasyonuna göre tüm olgularda ER- β 'nin nukleer ekspresyonunun dağılımı	42
4.4. Grup 1 olgularda tümör grade ve ER- β 'nin nukleer ekspresyonunun boyanma şiddetine göre dağılımı	43
4.5. Grup 1 olgularda tümör lokalizasyonuna göre ER- β 'nin nukleer ekspresyonu	43
4.6. Grup 2 olgularda tümör grade ve ER- β 'nin nukleer ekspresyonunun boyanma şiddetine göre dağılımı	44
4.7. Grup 2 olgularda tümör lokalizasyonuna göre ER- β 'nin nukleer ekspresyonu	45
4.8. Tüm olgularda ER- β 'nin sitoplazmik ekspresyonunun boyanma şiddetine göre dağılımı	46
4.9. Grup 1 ve 2 olgularda tümör grade'ine göre ER- β 'nin sitoplazmik ekspresyonunun boyanma şiddetine göre dağılımı	46
4.10. Grup 1 ve 2 olgularda tümör lokalizasyonuna göre ER- β 'nin sitoplazmik ekspresyonu	47
4.11. Grup 1 olgularda tümör grade'ine göre ER- β 'nin sitoplazmik ekspresyonu	48
4.12. Grup 1 olgularda tümör lokalizasyonuna göre ER- β 'nin sitoplazmik ekspresyonu	48

	Sayfa
4.13. Grup 2 olgularda tümör grade'ine göre ER- β 'nin sitoplazmik ekspresyonu	49
4.14. Grup 2 olgularda tümör lokalizasyonuna göre ER- β 'nin sitoplazmik ekspresyonu	49
4.15. Tüm olgularda ER- α ile nükleer ER- β ekspresyonlarının tüm olgulardaki dağılımı	50
4.16. Tüm olgularda PR ile nükleer ER- β ekspresyonları	51
4.17. Metastatik lenf nodunda ER- β 'nin boyanma şiddetine göre nükleer ve sitoplazmik ekspresyonu	51
4.18. Grup 2 olgularda ER- β 'nin tümör ve metastatik lenf nodunda nükleer ekspresyonu	52
4.19. Grup 2 olgularda ER- β 'nin tümör ve metastatik lenf nodunda sitoplazmik ekspresyonu	53
4.20. Tüm olgularda hormonal duruma göre ER- β 'nin nükleer ekspresyonu	55
4.21. Tüm olgularda hormonal duruma göre ER- β 'nin sitoplazmik ekspresyonu	55
4.22. Grup 1 olgularda ER- β nükleer ekspresyonunun hormonal duruma göre vaka dağılımları	56
4.23. Grup 1 olgularda ER- β 'nin sitoplazmik ekspresyonunun hormonal duruma göre vaka dağılımı	57
4.24. Grup 2 olgularda ER- β 'nin nükleer ekspresyonunun hormonal duruma göre vaka dağılımı	57
4.25. Grup 2 olgularda ER- β 'nin sitoplazmik ekspresyonunun hormonal duruma göre dağılımı	58

	Sayfa
4.26. Tüm olgularda tümör boyutu ile ER- β 'nın nükleer ekspresyon ilişkisi	58
4.27. Twist-1'in nükleer ekspresyonunun tüm olgularda boyanma şiddetine göre dağılımı	59
4.28. Tüm olgularda tümör grade'ine göre Twist-1'in nükleer ekspresyonunun dağılımı	60
4.29. Tüm olgularda tümör lokalizasyonuna göre Twist-1'in nükleer ekspresyonunun dağılımı	60
4.30. Grup 1 olgularda tümör grade'ine göre Twist-1'in nükleer ekspresyonu	61
4.31. Grup 1 olgularda tümör lokalizasyonuna göre Twist-1'in nükleer ekspresyonu	61
4.32. Grup 2 olgularda tümör grade'ine göre Twist-1'in nükleer ekspresyonu	62
4.33. Grup 2 olgularda tümör lokalizasyonuna göre Twist-1'in nükleer ekspresyonu	62
4.34. Tüm olgularda Twist-1'in sitoplazmik ekspresyonunun boyanma şiddetine göre dağılımı	63
4.35. Tüm olgularda tümör grade'ine göre Twist-1'in sitoplazmik ekspresyonu	64
4.36. Tüm olgularda tümör lokalizasyonuna göre Twist-1'in sitoplazmik ekspresyonu	64
4.37. Grup 1 olgularda tümör grade'ine göre Twist-1'in sitoplazmik ekspresyonu	65
4.38. Grup 1 olgularda tümör lokalizasyonuna göre Twist-1'in sitoplazmik ekspresyonu	65
4.39. Grup 2 olgularda tümör grade'ine göre Twist-1'in sitoplazmik ekspresyonu	66

	Sayfa
4.40. Grup 2 olgularda tümör lokalizasyonuna göre Twist-1'in sitoplazmik ekspresyonu	66
4.41. Metastatik lenf nodunda Twist-1'in boyanma şiddetine göre nükleer ve sitoplazmik ekspresyonları	67
4.42. Grup 2 olgularda Twist-1'in tümör ve metastatik lenf nodunda nükleer ekspresyonu	68
4.43. Grup 2 olgularda Twist-1'in tümör ve metastatik lenf nodunda sitoplazmik ekspresyonu	68
4.44. Tüm olgularda ER- α ile Twist-1'in nükleer ekspresyonu	69
4.45. Tüm olgularda ER- α ile Twist-1'in sitoplazmik ekspresyonu	69
4.46. Tüm olgularda PR ile Twist-1'in nükleer ekspresyonu	70
4.47. Tüm olgularda PR ile Twist-1'in sitoplazmik ekspresyonu	70
4.48. Tüm olgularda Twist-1'in nükleer ekspresyonunun hormonal duruma göre dağılımı	72
4.49. Tüm olgularda Twist-1'in sitoplazmik ekspresyonunun hormonal duruma göre dağılımı	72
4.50. Grup 1 olgularda Twist-1'in nükleer ekspresyonunun hormonal duruma göre dağılımı	73
4.51. Grup 1 olgularda Twist-1'in sitoplazmik ekspresyonunun hormonal duruma göre dağılımı	73
4.52. Grup 2 olgularda Twist-1'in nükleer ekspresyonunun hormonal duruma göre dağılımı	74

	Sayfa
4.53. Grup 2 olgularda Twist-1'in sitoplazmik ekspresyonunun hormonal duruma göre dağılımı	74
4.54. Tüm olgularda Twist-1 nükleer ekspresyonunun boyuta göre dağılımı	75
4.55. Tüm olgularda ER- β ile Twist-1 nükleer ekspresyonu	76
4.56. Grup1 olgularda ER- β ile Twist-1 nükleer ekspresyonu	77
4.57. Grup 2 olgularda ER- β ile Twist-1 nükleer ekspresyonu	77
4.58. Tüm olgularda ER- β ile Twist-1 sitoplazmik ekspresyonu	78
4.59. Grup1 olgularda ER- β ile Twist-1 sitoplazmik ekspresyonu	79
4.60. Grup 2 olgularda ER- β ile Twist-1 sitoplazmik ekspresyonu	79
4.61. Metastatik lenf nodunda ER- β ile Twist-1 nükleer ekspresyonları	80
4.62. Metastatik lenf nodunda ER- β ile Twist-1 sitoplazmik ekspresyonu	81

1.GİRİŞ

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen malign tümör olup, bu kadınların yaklaşık üçte biri meme karsinomu nedeniyle ölmektedir. Dünya çapında yılda 1,000,000'dan daha fazla kadın meme kanseri tanısı almaktadır (1). Meme kanseri, kansere bağlı ölümlerde akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır ve kadınlarda kansere bağlı ölümlerin % 17'sinden sorumludur (2). Meme kanseri insidansı, görüntüleme yöntemlerinin gelişmesiyle birlikte 1980'li yıllardan itibaren artmaya başlamıştır (3). Meme kanser gelişimi için en önemli risk faktörleri cinsiyet, artmış östrojen maruziyeti ve genetik yatkınlık olup, diğer risk faktörleri yaş, diet, obezite, çevresel toksinler, radyasyon maruziyeti, alkol kullanımı, karşı memede ya da endometriyumda karsinom varlığı, sigara'dır. Meme kanserlerinin sadece % 1'i erkeklerde görülür. Herediter meme karsinomları tüm meme kanserlerinin % 12'sini oluşturur ve BRCA1 ve BRCA2 genlerinde mutasyon mevcuttur. Sporadik meme kanserleri ise en sık artmış östrojene maruziyet sonucu ortaya çıkarlar (3). Meme kanserinin çeşitli histopatolojik alt tipleri olmakla birlikte tüm tiplerde tedavi protokolleri benzerdir. Uygun tedavi yöntemini seçmek ve hastanın klinik gidişini belirlemede önemli prognostik ve prediktif faktörler vardır. Bu faktörlerden en önemlileri; invaziv karsinoma eşlik eden in situ hastalık, uzak metastaz, lenf nodu metastazı, tümör boyutu, lokal ileri hastalık, inflamatuvar karsinom varlığıdır. Diğer minor prognostik ve prediktif faktörler ise; histolojik sub-tip, histolojik grade, östrojen (ER) ve progesteron (PR) reseptörlerinin durumu, HER2 onkoprotein ekspresyonu, lenfovasküler invazyon, proliferasyon oranı, neoadjuvan tedaviye yanıt, DNA içeriği ve gen ekspresyon proliferidir (3).

Meme dokusu kişinin hayatı boyunca puberte, menstürel siklus, gebelik ve menopozal dönemlerdeki östrojenik dalgalanmalardan etkilenir (4). Östrojen memedeki biyolojik etkilerini iki östrojen reseptör sub-tipine bağlanarak gösterir. Bunlar östrojen reseptör- α (ER- α) ve östrojen reseptör- β (ER- β)'dir (5-7). İlk östrojen reseptörü olan ER- α 1967, ikinci östrojen reseptörü olan ER- β 1996 yılında tanımlanmıştır (8-10). Östrojen reseptör- α ve ER- β proteinleri birbiriyle örtüşen yapısal özellikler içermekte olup, değişik dokularda değişik biyolojik görevler üstlenmektedir (7, 11-21). Östrojenin tümorojenik etkisi 2 hipotezle açıklanmıştır; (1) genotoksik olan östrojen metabolitleri direkt DNA hasarı oluşturması, (2)

östrojenle indüklenmiş östrojen reseptörleri proliferasyonu indükleyerek, DNA replikasyonunun arttırılması. Artmış replikasyon da DNA mutasyon riskini arttırır. Östrojen reseptör- α ve ER- β ekspresyon sıklıkları benign ve malign hastalıklarda farklıdır. Östrojen reseptör- α daha sık malign dokularda bulunurken, ER- β ise daha sıklıkla benign dokularda izlenir (22).

Östrojen reseptör- α ve ER- β arasındaki dengenin, tümör gelişimi sırasında değiştiği öne sürülmüştür. Östrojen reseptör- α normal meme dokusunda epitelyal hücrelerin % 7-10'unda eksprese edilir ve ekspresyonu menstrüel sıklusa göre değişkenlik gösterir (23-25). Östrojen reseptör- β ise normal meme dokusundaki hücrelerde % 80-85 oranında eksprese edilir ve ekspresyonu menstrüel sıklustan etkilenmez (26-28). Östrojen, bu iki reseptörüyle bağlanarak normal meme gelişimini regüle etmekle birlikte anormal östrojen sinyalizasyonu sonucu anormal hücre proliferasyonu ve kanser progresyonuna yol açabilir. Bu konuda yapılan bir çalışmada normal meme dokusunun tümörojenik hale gelmesinde ER- α m-RNA miktarındaki artış ve ER- β miktarındaki azalmanın etkili olduğunu gösterilmiştir (22). Bu fenomenon meme kanseri ile birlikte kolon ve prostat gibi diğer tümörlerde de izlenmiştir (29, 30).

Literatürde ER- β 'nin meme kanser gelişim basamaklarındaki rolü ve önemini araştıran çalışmalarda normal meme dokusu ve memenin pre-invaziv lezyonlarında ER- β 'nin immunohistokimyasal yöntemle ekspresyonu değerlendirilmiştir. Bu çalışmalarda ER- β 'nin ekspresyon sıklığının normal meme dokusundan, pre-invaziv lezyonlara ve invaziv kansere gidildikçe azaldığı gösterilmiştir (29, 31). Meme karsinomlu olgular ile normal meme dokusundaki ER- β ekspresyon sıklığının immunohistokimyasal ve RT-PCR ile değerlendirdiği bir çalışmada, invaziv kanserli olgularda ER- β ekspresyon sıklığının normal meme dokusuna göre azaldığı saptanmıştır (32). Östrojen reseptör- β 'nin normal gland yapıları ve benign meme lezyonlarındaki ekspresyonunun ER- α 'ya göre daha sık saptanmış olması normal meme dokusunda fonksiyonu olduğunu düşündürmüştür (29, 31).

Östrojen reseptör- β 'nin tümör supressör aktivitesinin olduğu hipotezi yukarıda bahsedilen birçok çalışmayla desteklenmiş olsa da Shaw ve ark.'nın (26) yaptığı çalışmada invaziv meme kanserlerinde ER- β ekspresyonunun sıklığı (RT-PCR ile %

85) diğerk çalışmalara göre daha yüksek saptanmıştır. Bu paradoksu çözebilmek için birçok çalışmaya ihtiyaç vardır.

Östrojen reseptör- β ekspresyonunun meme kanser prognozu ile ilişkisi hakkında literatürde farklı sonuçları olan yayınlar vardır. Bu çalışmalarda prognostik değerlendirme ER- α /PR durumu, tümör grade'i, tümör boyutu, lenf nodu durumu gibi klinikopatolojik parametrelerle ER- β 'nın ekspresyonunun arasındaki ilişki değerlendirilerek yapılmıştır. Yapılan bazı çalışmalarda düşük grade'li olgularda ER- β ekspresyonu daha sık saptanmış ve prognostik önemli bir belirteç olabileceği öne sürülmüştür (27, 33, 34). Bir grup çalışmacı da anlamlı sonuçlar elde edememiştir (26, 35-37). Östrojen reseptör- β ekspresyonu ile tümör boyutu arasındaki ilişkinin değerlendirildiği çalışmalarda ise tümör boyutunun büyük olduğu olgularda ER- β ekspresyon sıklığının arttığı gösterilmiştir (34, 38). Östrojen reseptör- β ekspresyonu ile lenf nodu durumu arasındaki ilişkinin değerlendirildiği çalışmalarda ise metastatik lenf nodu içermeyen olgularda daha sık ER- β ekspresyonu olduğu bildirilmiştir (27, 34).

Östrojen reseptör- β 'nın prognostik önemine yönelik daha geniş kapsamlı araştırmalara ihtiyaç vardır.

Twist-1, *Drosophila*'nın embriogenez sürecinde dorsoventral/mezodermal yapılarının oluşumunda, vertebralılarda ise nöral krest migrasyonundan sorumlu zigotik genlerinden biridir (39, 40-42). Twist-1 geni basic-helix-loop-helix (bHLH) motifi içeren yani bHLH protein ailesine mensup bir transkripsiyon faktörüdür (40, 43). Birçok hücre serisinde genlerin regülatör elemanı olduğu gibi negatif ya da pozitif regülatör olarak birçok diferansiyasyon prosesinde transkripsiyon faktörü olarak ve nörogenesis/myogenezis gibi farklı gelişimsel basamaklarda anahtar rol oynar (42).

Vertebralılarda Twist-1 ve Twist-2 (Dermo-1) olmak üzere iki Twist geni vardır (42, 44). Bu iki Twist geni % 90 oranında yapısal olarak benzerlik gösterir (42). Twist-1 ve Twist-2 genleri mezoderm ve ektoderm orijinli kas, kıkırdak ve osteojenik hücre serileri gibi birçok hücre serisinin diferansiyasyonu ile ilişkilidir (42, 45, 46).

Twist-1'in meme karsinomu, prostat karsinomu, mide karsinomu, sarkom, gliom, nöroblastom ve melanomlar gibi birçok solid insan tümöründe artmış seviyelerde eksprese edildiği gösterilmiştir (42, 45, 47-55). Twist-1'in tümör invazyon ve metastazında E-kaderin ilişkili hücre-hücre adezyon kaybını indüklediği ve epitelyal hücrelerde epitelyal-mezenkimal dönüşümünü sağladığı öne sürülmüştür (42). Tümör metastaz ve invazyonundaki mekanizmalardan biri epitelyal-mezenkimal dönüşüm olarak tanımlanmaktadır. Yani epitelyal hücreler invazyon ve metastaz yeteneği kazandıkları zaman mezenkimal hücrelere dönüşürler (42, 56). Watanabe ve ark.'nın (54) yaptığı bir çalışmada ise Twist-1'in meme kanserlerinde artmış ekspresyonla karakterize olduğunu göstermiştir. Twist-1'in daha önce yapılan çalışmalarda meme kanserinde, metastatik davranışta EMT üzerinden etkili olduğu gösterilmiştir. Evron ve ark.'nın (57) yaptığı çalışmada metastatik hücrelerden oluşan duktusların luminal sınırlarında, sağlıklı hücrelerden oluşan duktusların luminal sınırlarında bulunandan daha fazla Twist-1 olduğu gösterilmiştir. Fackler ve ark.'nın (58) yaptığı çalışmada invaziv duktal karsinomlarda Twist-1'in hipermetile olduğu izlenmiştir.

Meme kanserinde hastalar primer kanserden değil, sistemik tedaviye direçli olan metastatik hastalıktan kaybedilir. Metastaz ve invazyon gelişiminde artmış ekspresyonla karakterize bir transkripsiyon faktörü olan Twist-1 meme kanserinde bu nedenle önem arz etmektedir. Riaz ve ark. (59) meme kanserli ER pozitif, lenf nodu negatif olgularda RT-PCR ile yaptıkları çalışmada Twist-1'in kötü prognozu belirlemede prognostik bir faktör olduğu sonucuna ulaşmıştır. Wang ve ark.'nın (60) yaptığı çalışmada ise Twist-1'in kemoterapiye dirençli meme kanser gelişiminde rol aldığı gösterilmiştir.

Biz bu çalışmada normal meme dokusunda da eksprese edilen ve meme kanser gelişimi, progresyonu ve prognozundaki rolü günümüzde hala araştırılmakta olan ER- β 'nin normal meme dokusunda, primer meme tümöründe ve metastaz odağındaki ekspresyonunu, lenf nodu negatif ve pozitif olgularda ER- β ekspresyon farklılığı olup olmadığını, metastatik davranışla ilişkisini ve tümör grade'i, tümör boyutu, tümör lokalizasyonu ve lenf nodu durumu gibi klinikopatolojik özelliklerle ilişkisini araştırmayı amaçladık.

Bununla birlikte hakkında literatürde az sayıda çalışma bulunan, değişik tümör tiplerinde malign hücrelerin invaziv ve metastatik potansiyel kazanmasında önemli rolü olduğu gösterilmiş Twist-1'in meme kanserli olgularımızda metastatik davranışla olan ilişkisini, tümör grade'i, tümör boyutu, lokalizasyonu ve lenf nodu durumu gibi klinikopatolojik özelliklerle ilişkisini de değerlendirdik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Meme Kanseri İnsidansı

Meme kanser insidansı 1980'li yıllarda düzenli tarama yöntemlerinin yaygın kullanımıyla artmaya başlamış olup, erken tanı alan ve tedavi edilen olguların artmasıyla 1990'lı yıllarda insidans düşmeye başlamıştır. Ancak ölüm oranları göreceli olarak sabit kalmıştır (3). Meme kanseri, günümüzde kadınlar arasında kansere bağlı ölümlerde ilk sırada olup yılda dünya çapında 1.000.000 yeni vaka tanımlanmaktadır (1). Meme kanseri çocukluk dönemi hariç herhangi bir yaş grubunda görülebilse de bazı ailesel olgular dışında 25 yaşın altında nadiren ortaya çıkar. İnsidans yaşla birlikte artış gösterir ve dördüncü on yılda 231'de 1 iken, yedinci on yılda 29'da 1'e ulaşır (2).

2.2. Meme Kanseri Risk Faktörleri

Cinsiyet: En önemli risk faktörü cinsiyettir. Meme kanserli olguların sadece % 1'i erkek cinsiyette izlenir (4).

Yaş: Meme kanseri 25 yaşın altında nadir olup; risk bir kadının tüm hayatı boyunca giderek artar ve 75-80 yaşta yüksek düzeye ulaşır (4).

Menarş Yaşı: 11 yaşından daha erken bir dönemde menarşa ulaşan olgular, 14 yaşından sonra menarşa ulaşanlarla karşılaştırıldığında meme kanseri riski % 20 oranında daha yüksektir (4).

İlk Doğum Yaşı: İlk doğumu 20 yaşından önce yapanlarda risk; nullipar ve ilk doğumu 35 yaşından sonra yapanlarda karşılaştırıldığında yarı yarıya azalmıştır (4).

Meme Kanserli Birinci Derece Akraba: Birinci derecede akrabada (anne, kız çocuğu, kız kardeş) meme kanseri varlığı özellikle erken yaşta meme kanseri riskini arttırır. Meme kanserli kadınların sadece % 13'ünde birinci derecede akrabada meme kanser öyküsü vardır (4).

Atipik Hiperplazi: Atipik hiperplazi tanısı olan kadınlarda risk artmıştır. Atipi içermeyen diğer proliferatif meme lezyonlarında meme kanseri gelişim riski çok azdır (4).

İrk/Köken: Meme kanserinin görülme oranı ülkeler ve ırklar arasında farklılık gösterir. Asya ve diğer ülkelere kıyasla kanserin en yüksek görülme oranına sahip ABD ve Avrupa ülkelerinde meme kanseri insidansı 4-7 kat daha fazladır. Burada spesifik faktörler saptanamamıştır (2).

Eksojen Östrojen: Postmenopozal kanama replasman tedavisi meme kanseri riskini 1.2-1.7 oranında artırır (4). Oral kontraseptiflerin meme kanseri gelişiminde risk faktörü olarak rol oynadığı tartışmalıdır (2, 4).

Meme Yoğunluğu: Yüksek meme radiodansitesitesi meme kanser gelişiminde güçlü bir risk faktörüdür (4).

Radyasyon Maruziyeti: Radyasyon, DNA hasarına yol açarak karsinogenezisin erken evrelerinde etkili olur (2). Başka bir sebeple ya da tedavi nedeniyle göğüs duvarına radyasyon maruziyeti, atom bombası, nükleer kazalar meme kanser riskini artırır. Risk özellikle genç yaşta (< 20-25 yaş) ve yüksek dozda radyasyona maruziyetle % 30 oranında artar. Yaşı > 25 üstü kadınlarda bu oran düşüktür (4).

Karşı Memede ya da Endometriumda Kanser Varlığı: Meme kanserli olguların % 1'inde her yıl 2. kontralateral meme kanseri gelişmektedir. BRCA-1 ve BRCA-2 germ-line mutasyonları olan meme kanseri ile birlikte ikinci bir kanser gelişim riski artmıştır. Meme ve endometrial karsinomlar birçok ortak risk faktörüne sahiptir (2,4).

Diet: Kafein tüketimi meme kanser riskini azaltırken; yüksek alkol tüketimi riski artırır (4).

Obezite: Anovuluar sikluslu ve siklusun geç döneminde düşük PR seviyelerine sahip 40 yaş altı şişman genç kadınlarda düşük risk vardır. Postmenopozal şişman kadınlarda ise risk artmıştır ve bundan yağ depolarındaki östrojen sentezi sorumlu tutulmaktadır (2, 4).

Egzersiz: Egzersiz premenopozal kadınlarda riski azaltır (4).

Emzirme: Ne kadar uzun dönem emzirme gerçekleşmişse, risk de o oranda azalır. Laktasyon, ovulasyonu suprese eder (4).

Çevresel Toksinler: Organochlorine pestisid benzeri çevresel kontaminasyonlar insanlarda östrojenik etkilere sebep olarak riski arttırdığı düşünülmektedir. Ancak yeterli kanıtlar henüz yoktur (4).

Sigara: Meme kanseriyle ilişkisi tam olarak gösterilmemekle birlikte, preduktal mastit (subereolar apse) gelişiminde rol almaktadır (4).

Genetik Yatkınlık: Meme kanserli hastaların ortalama % 20'si meme kanserinin ailesel öyküsüne sahiptir. Bu vakaların ortalama % 5-10'undan otozomal dominant bir genin geçişi sorumlu tutulur. Meme kanserine yatkınlığı arttıran 6 gen ve gen bölgesi tanımlanmıştır. Bunlar meme kanseri geni (BRCA-1, BRCA-2), P53, Cowden, AR (Androjen Reseptör Geni), AT (Ataksi-Telenjiektazi Geni)'dir. BRCA-1 ve BRCA-2 herediter meme kanserlerinin büyük bir kısmından sorumludur. P53 gen çizgi mutasyonu kompleks ailesel sendromların bir nedeni olarak ilk kez 1990'da keşfedilmiştir. Bu mutasyonlar hedef hücre ve organlarının geniş bir çeşidiyle malignitelere yol açar. Organlar arasında en çok tutulan memedir. Kromozom 17q 13-1'de lokalizedir. Otozomal dominant geçişe sahip Cowden hastalığı (Multiple hamartom sendromu) birçok muko-kutanöz lezyon, dudakta ve orofarinkste papillomatozis, çene hipoplazisi, tiroid adenomu, santral sinir sistemi anomalileri, memede fibrokistik değişiklikler ve meme kanseri ile karakterizedir. Androjen reseptör gen, erkek meme kanseri risk faktörleri arasında yer alır.

Ataksi-telenjiektazi, otozomal resesif geçişli bir multi-sistem bozukluğudur. İlerleyici nörolojik bozukluklar ve özellikle malign lenfoproliferatif hastalıklar meme kanser riskinde artmaya yol açan immunolojik problemler ile birliktelik gösterir (2).

2.3. Meme Kanseri Progresyonu ve Karsinogenezis

Normal ya da non-proliferatif değişiklikler içeren meme dokusunda epitelyal hiperplazi ya da sklerozan adenozis ile sonuçlanan hücre sayısının normal regülasyonunun kaybıdır. Bunu histolojik olarak atipik hiperplazi ile sonuçlanan hücrelerin klonal popülasyonunda ortaya çıkan genetik instabilite izler (2, 3). Atipik

hiperplaziyi düşük/orta derecede nükleer atipili DKIS izler. En son olarak da low/moderate grade invaziv karsinom (östrojen pozitif yolak) gelişir. Östrojen negatif yüksek grade'li invaziv karsinom yolağında ise, normal/non-proliferatif değişiklikler içeren meme dokusunun yüksek dereceli nükleer atipili DKIS'a dönüşümünde etkili olan prekürsörler identifiye edilememiştir (3).

Karsinomun progresyonundan sonra çok sayıda sellüler değişiklikler ortaya çıkabilir ve bu sellüler değişiklikler içerisinde onkojen ekspresyonunda artma (örneğin C-erb B2, C-ras, C-myc), tümör supresör genlerinin fonksiyonları ya da ekspresyonunda kayıp (örneğin NM 23, P53, RB), hücre yapısındaki değişiklikler (örneğin vimentin ekspresyonunda artma, fadrin ekspresyonunda azalma) hücre adezyon kaybı (örneğin lobüler karsinomlarda görülen integrinlerdeki kayıp), hücre siklus proteinlerinin ekspresyonundaki artma (örneğin siklinler, kinin 67, proliferasyonu sağlayan hücre nükleer antijeni) anjiogenetik faktörlerin ekspresyonunda artma (örneğin vasküler endotelyal büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü-1 ve proteaz ekspresyonunda artma (örneğin katepsin-D sitromelinler) vardır (2).

2.4. Meme Kanserinde Prognostik Faktörler

Prognoz, primer karsinom ve aksiller lenf nodlarının patolojik incelenmesi ile belirlenebilir. Prognostik bilgi hastalığın seyri, tedavi protokolleri ve klinik özellikleri belirleyebilmek için gereklidir. Prognostik faktörler "America Joint Committee on Cancer (AJCC)" tarafından major ve minor olmak üzere iki ana başlık altında belirlenmiştir (3).

2.4.1. Major Prognostik Faktörler

- 1- İnvaziv karsinoma eşlik eden in situ hastalık
- 2- Uzak metastaz varlığı
- 3- Lenf nodu metastazı varlığı: Uzak metastaz olmadığı durumda lenf nodu metastaz varlığı en önemli prognostik faktördür. Lenf nodu metastazı olmayan olgularda 10 yıllık sağ-kalım % 70-80 iken; 1-3 adet pozitif lenf nodu varlığında oran

% 35-40, 10'dan fazla pozitif lenf nodu varlığında oran % 10-15'tir. Lenf nodunda bulunan > 0.2 cm'den büyük makrometastazlar prognostik açıdan önemlidir. Ancak < 0.2 cm'den olan mikrometastazların klinik önemi henüz belli değildir (3).

4- Tümör Boyutu: İkinci en önemli prognostik faktördür. Aksiller lenf nodu metastaz riski; primer tümörün boyutu ile doğru orantılı olarak artar. Her ikisi de bağımsız prognostik faktörlerdir. Lenf nodu negatif, tümör boyutu < 1 cm olan olgularda 10 yıllık sağ kalım % 90'nın üzerinde iken tümör boyutu > 2 cm olan olgularda 10 yıllık sağ kalım % 77'ye düşmektedir (3).

5- Lokal ileri hastalık: Cilde veya iskelet kaslarına invaze tümörler genellikle büyük boyutlu tümörlerdir ve cerrahi tedavileri zordur. Meme kanseri hakkındaki farkındalık toplumda ve hekimler arasında arttığından; günümüzde bu tip tümörler daha az oranlarda karşımıza çıkmaktadır (3).

6- İnflamatuvar Karsinom: Dermal lenfatiklerin tutulumuna bağlı meme cildinde lezyon ve ciltte kalınlaşma bulguları kötü prognozla ilişkilidir. Üç yıllık sağ-kalım oranları % 3-10'dur. Bu tip tümörler Afrika-Amerikan kökenli genç kadınlarda izlenir (3).

2.4.2. Minör Prognostik Faktörler

- 1- Histolojik sub-tip
- 2- Histolojik grade
- 3- ER/PR durumu
- 4- HER2/neu
- 5- Lenfovasküler invazyon
- 6- Proliferatif oran
- 7- DNA içeriği
- 8- Neoadjuvan tedaviye yanıt
- 9- Gen ekspresyon profili

2.5. Meme Kanseri Lokalizasyonu

Meme kanseri sol memede, sağ memeye göre biraz daha sık görülür. Hastaların % 4'ünde iki taraflı primer tümör vardır ya da sonradan ikinci bir tümör gelişir. Meme kanserlerinin ortalama % 50'si üst dış kadranda lokalize iken; diğer kadrantların her birinde ortalama % 10 oranında görülür. Bu tümörlerin ortalama % 20'si santral veya subareolar bölgede izlenir. Tümörün lokalizasyon yerini saptamak son derece önemlidir. Çünkü tümör lokalizasyon yeri, lenf nodu metastazlarının ortaya çıkmasını önemli derecede etkilidir (2).

2.6. Meme Kanseri Histolojik Sınıflaması

Meme malignansilerinin > % 95'ten fazlası karsinomlardan oluşur ki bu karsinoma in situ karsinom ve invaziv karsinom olarak ikiye ayrılır. Karsinoma in situ terimi duktus ve lobüllerle sınırlı bazal membranı geçmemiş neoplastik hücre proliferasyonunu ifade eder. İnvaziv karsinom ise bazal membranı penetre etmiş ve stromaya geçmiş neoplastik hücre proliferasyonunu ifade eder. Bu grup tümörler terminal duktus-lobüler unitlerden köken alır (3). En yaygın olarak kullanılan WHO-2003 histolojik klasifikasyonunda çok çeşitli tümörler görülebilir (61). Meme tümörlerinin WHO 2003 histolojik klasifikasyonundaki epitelyal malign tümörlerin sınıflandırması aşağıdadır:

1. İnvaziv duktal karsinom (özellik göstermeyen tip)

Mikst tipte karsinomlar

Pleomorfik karsinom

Osteoklastik dev hücreler içeren karsinom

2. İnvaziv lobüler karsinom

3. Tubüler karsinom

4. İnvaziv kribriform karsinom

5. Medüller karsinom

6. Müsinöz karsinom ve belirgin müsin içeren diğer**karsinomlar**

Müsinöz karsinom

Kistadenokarsinom ve kolumnar hücreli müsinöz
karsinom

7. Taşlı yüzük hücreli karsinom**8. Nöroendokrin tümörler**

Solid nöroendokrin karsinom

Atipik karsinoid tümör

Küçük hücreli / oat cell karsinom

Büyük hücreli nöroendokrin karsinom

9. İnvaziv papiller karsinom**10. İnvaziv mikroapiller karsinom****11. Apokrin karsinom****12. Metaplastik karsinomlar**

Saf epitelyal metaplastik karsinomlar

Skvamöz hücreli karsinom

İğsi hücre metaplazili adenokarsinom

Adenoskuamöz karsinom

Mukoepidermoid karsinom

Mikst epitelyal/mezenkimal metaplastik karsinom

13 Lipidden zengin karsinom**14. Sekretuar karsinom****15. Onkositik karsinom****16. Adenoid kistik karsinom**

17. Asinüs hücreli karsinom**18. Glikojenden zengin berrak hücreli karsinom****19. Sebaceöz karsinom****20. İnflamatuvar karsinom****21. Lobüler neoplazi****22. Meme başının Paget hastalığı****23. Metastatik tümörler**

Çalışmamızda invaziv duktal karsinom olgularında değerlendirme yapıldığından sadece bu tip anlatılacaktır.

2.6.1. İnvaziv Duktal Karsinom (Özellik Göstermeyen Tip)

İnvaziv meme kanserlerinin en sık görülen özellik göstermeyen tipi olup, invaziv meme kanserlerinin % 70-75'ini oluşturur. Patolojik ve klinik özellikleri açısından heterojen bir gruptur. Mammografik anormallik eşlik edebilir. Makroskopik olarak irregüler sınırlara sahip, sert kıvamlı, yer yer küçük foküsler şeklinde kalsifikasyon içerebilen tümörlerdir (3, 62). Mikroskopik olarak iyi forme olmuş glandüler yapılar, yuvalanmalar, kordonlar veya değişik boyutta trabeküler yapılar oluşturan, belirgin sellüler pleomorfizm ve nükleer atipi ve mitoz içeren malign hücrelerle karakterizedir. Stromal desmoplazi ve DKIS eşlik edebilir. Büyük hücre kümeleri olduğu zaman nekroz izlenebilir. Mitoz değişkendir. Luminal ya da intrasellüler müsin izlenebilir. Epitelde fokal olarak apokrin veya skuamöz metaplazi görülebilir (2). Minimal ve orta düzeyde veya belirgin lenfoplazmositik reaksiyon olabilir. Bu reaksiyon değişik oranlarda plazma hücreleri ve makrofajların da izlendiği esas olarak matür lenfositlerden oluşan bir infiltrasyon şeklindedir (62). Lenf nodu durumu, histolojik grade ve lenfovasküler invazyon prognozu etkiler (62). 2003 World Health Organization (WHO) Klasifikasyonunda; mikst tipte karsinom, pleomorfik karsinom, osteoklastik dev hücreler içeren karsinom, melanositik özellikler içeren karsinom şeklinde dört sub-tipi bulunmaktadır (2).

Histolojik Derecelendirme (Grade)

Birkaç sistem tanımlanmış olmasına rağmen yaygın olarak kullanılan Bloom-Richardson sistemi ya da Fisher ve arkadaşlarının sistemidir. Bloom-Richardson histolojik derecelendirme sistemi meme karsinomlu hastalarda prognozla yakın ilişkilidir. Bu derecelendirme sisteminde histolojik yapı (Tübül formasyonu) yanı sıra nükleer özellikler (pleomorfizm) ve mitoz sayısı esas alınır (63).

Modifiye Bloom-Richardson Histolojik Derecelendirmesi;

Bu derecelendirme sisteminde tümörün üç farklı morfolojik özelliği değerlendirilerek, skorlar verilir. Bu skorlar toplanır ve tümörün histolojik grade'i belirlenir (63).

Tübül Formasyonu

Skor 1: Tübül formasyonu % 75'in üzerinde

Skor 2: Tübül formasyonu % 10-75 arasında

Skor 3: Tübül formasyonu < % 10'un altında

Nükleer Pleomorfizm

Skor 1: Küçük, düzgün, uniform

Skor 2: Boyut ve şekil orta derecede farklılık

Skor 3: Boyut ve şekil belirgin derecede farklılık

Mitotik Sayım (10 Büyük büyütme alanı)

0.59 mm alan çapı / 0.274 mm² alan:

Skor 1: 0-9

Skor 2: 10-19

Skor 3: >20

0.44 mm alan çapı / 0.152 mm²alan:

Skor 1: 0-5

Skor 2: 6-10

Skor 3: >11

Skorların Toplamına göre: 3-5 → Grade 1 (iyi diferansiye)

6-7 → Grade 2 (orta derecede diferansiye)

8-9 → Grade 2 (kötü diferansiye)

2.7. Meme Kanserinde Tanı

Meme kanseri tanısında klinik, görüntüleme ve patolojik yaklaşımların birlikte değerlendirilmesi gerekir. Memede kitle meme kanserinin ilk belirtisidir. Buna ilişkin olarak memedeki tüm kitlelerin araştırılması gerekir. Kitlenin meme kanserini düşündüren özellikleri, hastanın 30 yaşın üzerinde olması, kitlenin son zamanlarda ortaya çıkması veya boyutunda artma görülmesi ve kitlenin tek ve solid olmasıdır. Ancak meme kanserinin bazı tipleri palpabl bir kitle oluşturmaz. Buna örnek olarak lobüler karsinoma in situ verilebilir (2).

Memenin mamografi ile tarama programları sırasında mikrokalsifikasyon ya da memedeki diğer yapısal değişikliklerin görüntülenmesi, meme kanseri tanısına yardım eder. Ek olarak ultrasonografi, solid ve kistik lezyonların ayırımında çok yararlı bir yöntemdir (2). Memedeki kitleden çeşitli yöntemlerle alınan örneklemelerin patolojik incelemesiyle kesin tanı konur. Yapılan biyopsi genellikle kor iğne biyopsi, açık insizyonel ya da eksizyonel biyopsi şeklindedir (63).

2.8. Meme Kanserinde Yayılma Yolları

Lokal yayılım gösteren tüm invaziv kanserler lenfatik ve lenfohematojen yollarla yayılım gösterirler. Olguların üçte ikisinde tanı sırasında lenf nodu metastazları vardır. Lenfatik yayılım mümkün olan tüm yönlere doğrudur. Lateral yayılımlar aksillaya, süperior yayılımlar diğer memeye, inferior yayılımlar

abdominal organlara ve lenf nodlarına ve derin yayılımlar iç meme arterleri boyunca yerleşmiş göğüs içi lenf nodlarına doğru olur (2).

Lenfatik drenajın en sık görüldüğü iki yayılım yeri; aksiller lenf nodları ve internal meme arteri boyunca yerleşen nodlardır. Kan yoluyla yayılıma bağlı olarak vücudun herhangi bir organında uzak metastaz gelişir (2).

Meme kanserinin en çok metastaz yaptığı organlar kemik, karaciğer, sürrenal, beyin ve meninkslerdir. Bu bölgelerde yayılmış olan tümörlerde plevral, peritoneal kavite ya da serebrospinal sıvıdan elde edilen örneklerin sitolojik incelenmesi ile kanser hücreleri saptanabilir (2).

2.9. Meme Kanserinde Patolojik Prognostik Faktörler

Meme kanserinde çok sayıda klinik ve patolojik özelliklerden temel alan, biyolojik davranışını etkileyen prognostik faktörler tanımlanmıştır. Bunlardan günümüzde de kabul gören en önemli prognostik faktörler; aksiller lenf nodu durumu, tümör boyutu, histolojik tipi, histolojik grade ve lenfovasküler invazyon varlığı, ER ve PR durumudur (2).

- Aksiller Lenf Nodu Durumu

Hastaliksız sağ kalımı ve total sağ kalımı gösteren en önemli prognostik faktördür. Aksiller lenf nodu metatazi makrometastaz (> 2mm), mikrometastaz (> 0.2 mm, < 2 mm) ve izole tümör hücreleri (tek hücreler veya boyutu 0.2 mm'yi geçmeyen küçük tümöral hücre grupları) şeklinde kategorize edilmiştir. Makrometastaz varlığı kötü klinik gidişle ilişkili olup; mikrometastaz ve tek hücrelerin prognozla ilişkisi netlik kazanmamıştır (63). Dört ve 4'ten fazla lenf nodu tutulumunda prognoz kötüdür. Metastatik lenf nodu sayısı kadar, metastatik lezyonun çapı, lenf nodu çevresi yumuşak dokuya yayılım da prognozu olumsuz etkileyen faktörlerdir (2).

-Tümör Boyutu

Lenf nodu durumundan sonra en önemli bağımsız prognostik faktörlerden biridir. Nodal tutulum ve metastatik durum ile birlikte evrelemede kullanılan 3

özellikten birini oluşturmaktadır. Artan tümör boyutu ile birlikte lenf nodu tutulum oranı artmakta ve 5 yıllık sağ kalım oranı da düşmektedir (2, 63).

-Histolojik Tip

Tübüler, kolloid, adenoid kistik, müsinöz, kribriform, medüller, lobüler ve papiller gibi özel histolojik tipteki invaziv kanserlerde 30 yıllık survey oranı % 60'ın üzerinde iken; bu oran duktal karsinomlarda % 20'nin altındadır. Agresif davranan tipler içerisinde taşlı yüzük hücreli karsinom, invaziv mikropapiller karsinom ve inflamatuvar meme kanseri sayılabilir (2).

-Tümör Derecesi

Histolojik derecenin prognozla ilişkisi sayısız çalışmada gösterilmiştir. Histolojik derecelendirmenin tüm invaziv meme karsinom tiplerinde kullanımı önerilmektedir (2, 63).

-Lenfovasküler İnvazyon

-ER ve PR Durumu

Meme kanserli olgularda östrojen ve progesteron reseptör durumu zayıf prognostik faktörlerden olup; endokrin tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde güçlü prediktif faktör olduğundan tüm invaziv meme kanserlerinde değerlendirilmelidir (2).

-HER 2 Patern Ekspresyonu ve Gen Amplifikasyonu

Meme kanseri spesmenlerinde HER 2 protein over ekspresyonu ve/veya gen amplifikasyonu analizleri, özellikle transtuzumab (Herceptin) ile tedavi olacak hastaların seçimi ve uygulanacak diğer kemoteropötiklerin belirlenmesi için yapılmaktadır (63).

-Diğer Faktörler

Proliferasyon oranı

Kan damarı invazyonu

Tümör nekrozu

Mononükleer inflamatuvar hücre infiltratı

Perinöral invazyon

DKIS yaygınlığı

2.10. Meme Kanserinde Moleküler Prognostik Faktörler

A. Onkogenler

Bunlar C-erb B2, INT, C-ras, C-myc, epidermal büyüme faktörü reseptörü, transforme edici büyüme faktör- α (TGF- α)'dır (2).

B. Supresör Genler

Bunlar P53 geni, retinoblastom geni (Rg), nm 23'dür. Bunlar arasında üzerinde en çok durulan P53 genidir. Tümör hücrelerinde P53 proteinin fazla birikimi meme kanserli hastalarda özellikle kısa sağkalım süresi ile birliktelik göstermektedir. Bunun dışında P53, özellikle lenf nodu negatif meme kanserli hastalarda yararlı bir prognostik belirleyici olarak da görülmektedir (2).

C. Diğerleri

Stromal proteazlar, ekstrasellüler matriksi parçalayarak tümör invazyonunda önemli roller üstlenmiştir. Bazı çalışmalar bu proteazların meme kanserlerinde de kötü prognozla birliktelik gösterdiği yönündedir. Bunlar içinde en önemlileri Katepsin-D, ürokinaz tip plazminojen aktivatörüdür. Katepsin-D asidik lizozomal bir proteazdır ve meme kanseri hücreleri tarafından salgılanır. Büyümeyi hızlandırıcı ve ekstrasellüler proteolitik aktivite sağlayıcı bir etkiye sahiptir. Bu enzimin ekspresyonunun başlangıçta agresif tümör davranışı ve kısa hastalıklı sağ kalım süresi ile birliktelik gösterdiği saptanmıştır (2).

2.11. Meme Kanserinde Patolojik Evreleme (TNM) (64)

Primer Tümör (İnvaziv Karsinom) (pT)

pTX: Primer tümör bulunamadığı için değerlendirilemedi.

pT0: Primer tümör izlenmedi.

pTis (DKIS): Duktal karsinoma in situ

pTis (LKIS): Lobüler karsinoma in situ

pTis (Paget): Alttaki meme parenkimindeki invaziv karsinom ve/veya karsinoma in situ (DKIS/LKIS) ilişkili olmayan meme başının Paget hastalığı

pT1: Tümörün en büyük boyutu ≤ 20 mm

pT1mi: Tümörün en büyük boyutu ≤ 1 mm (mikroinvazyon)

pT1a: Tümörün en büyük boyutu > 1 mm ve ≤ 5 mm

pT1b: Tümörün en büyük boyutu > 5 mm ve ≤ 10 mm

pT1c: Tümörün en büyük boyutu > 10 mm ve ≤ 20 mm

pT2: Tümörün en büyük boyutu > 20 mm ve ≤ 50 mm

pT3: Tümörün en büyük boyutu > 50 mm

pT4: Boyuttan bağımsız olarak, ülserasyon ya da cilt nodülleri şeklinde göğüs duvarı ve/veya cilde direkt uzanan tümör (tek başına dermis tutulumu pT4 olarak kabul edilmemelidir.)

pT4a: Göğüs duvarına uzanım, sadece pektoralis kasını içermeyen tümör tutulumu ya da invazyonu şeklinde

pT4b: Ciltte ülserasyon ve/veya ipsilateral satellit nodül ve/veya ödem (portakal kabuğu görünümü)

pT4c: T4a ve T4b'nin birlikte olduğu durum

pT4d: İnflamatuvar karsinom

Rejyonel Lenf Nodları (pN)

pNX: Rejyonel lenf nodu izlenmedi (daha önce eksize edilmiş ya da operasyon sırasında çıkarılmamış).

pN0: Histolojik olarak metastaz içeren lenf nodu izlenmedi.

pN0 (i-): negatif immunohistokimya

pN0 (i+): Malign hücrelerin lenf nodunda <0.2 mm'den küçük boyutta ve 200 hücreden fazla olmaması (Hematoksilen&eosin veya immunohistokimya)

pN0 (mol-): Histolojik olarak metastaz içeren lenf nodu izlenmedi, negatif moleküler bulgular (RT-PCR)

___ pN0 (mol+): Pozitif moleküler bulgular (RT-PCR), ama histolojik ve immunohistokimyasal olarak metastaz içermeyen rejyonel lenf nodu

___ pN1mi: Mikrometastaz (> 0.2mm ve/veya >200 hücre).

___ pN1a: Bir veya üç aksiller lenf nodunda metastaz, bunlardan en az biri >2 mm

___ pN2a: 4- 9 aksiller lenf nodunda metastaz (en az bir tümör depoziti >2mm)

___ pN3a: ≥10 metastatik aksiller lenf nodu (en az bir tümör depoziti >2mm)

Uzak Metastaz (pM) (varsa belirtilir)

Araştırılmadı.

pM1: >2mm histolojik olarak kanıtlanmış uzak metastaz varlığı

2.12. Normal Meme Dokusunda Östrojenin Rolü ve Östrojen Reseptör Ekspresyonu

Meme dokusu vasküler ve stromal doku ile hormonal olarak aktif adipöz dokudan ve epitelyal-glandüler elemanlardan oluşmaktadır (65). Meme dokusu

kişinin hayatı boyunca puberte, menstürel siklus, gebelik ve menopozal dönemlerdeki östrojenik dalgalanmalardan etkilenir (4).

Steroid bir hormon olan 17- β -östrodiol (östrojen, E2) puberte, gebelik ve laktasyonda meme gland gelişim ve büyümesinde önemli role sahiptir (66). Meme gland gelişimi fonksiyonel östrojen sinyalizasyonuna bağımlı bir süreçtir. Östrojen reproduktif dokularda olduğu kadar akciğer, kolon, prostat ve kardiyovasküler sistem gibi non-reproduktif dokularda da normal büyüme ve fonksiyon görmeye etkilidir (12, 67, 68).

Erken menarş ve geç menopoz ile artmış östrojene maruziyet artmış meme kanser riskiyle ilişkilidir (69). Östrojen biyolojik etkilerini iki östrojen reseptör sub-tipine bağlanarak gösterir. Bunlar ER- β ve ER- α 'dır (5-7). Östrojen reseptör- α ve ER- β birbiriyle örtüşen özellikler içermekte olup değişik dokularda, hücre büyümesi ve transkripsiyonunun düzenlenmesi, hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu gibi birçok değişik hücresel süreçte biyolojik rolü vardır (7, 13-21, 68).

İlk olarak ER- α 1967'de, ER- β ise 1996 yılında tanımlanmıştır (8-10). Östrojen, ER- α ve ER- β aracılığı ile sinyal iletimini indükler (7). Östrojen reseptör- α meme karsinogenezinde özellikle de östrojen varlığında, hücre proliferasyonunun önemli bir mediyatördür (7, 68). Östrojen reseptör- β ise ER- α 'nın mediyatörlüğünü yaptığı hücre proliferasyonunu inhibe ederek ER- α 'nın tam tersi etkiler göstermektedir (7).

Meme dokusunda her iki östrojen sub-tipi de eksprese edilmektedir (5-7, 23, 24). Östrojen reseptör- α normal insan meme dokusundaki epitelyal hücrelerin % 7-10'unda eksprese edilir (25). Östrojen reseptör- β % 80-85'inde eksprese edilmektedir (26-28, 31).

Shabaan ve ark.'nın (29) yaptığı çalışmada ER- β ekspresyon sıklığını normal meme dokusunda % 94.3, duktal hiperplazili olgularda % 76.7, DKIS'lı olgularda % 70 ve invaziv meme kanserlerinde % 60 olarak bulmuştur.

Östrojen reseptör- β aynı zamanda prostat, tükrük bezi, testis, over, periferik sinir sistemi ile vasküler endotel, düz kas, santral sinir sistemi nöronlarında da eksprese edilmektedir (13-21).

Bu iki reseptör birbirinden farklı ligand afinitesine ve antagonist etkiye sahiptir (70). Her iki reseptör uterus, meme, akciğer, kalp, beyin, ince ve kalın barsak dokusunda bulunur (12). Hepatositlerde sadece ER- α eksprese edilirken, korpus luteum, medulla oblongata, epididim, vas deferens ve oral dokularda sadece ER- β ekspresyonu izlenir (72). Üçüncü östrojen sub-tipi olan östrojen gama ise ilk defa vertebralı bir balık olan teleosti'de tanımlanmıştır ve ER- β 'nin duplikasyonu ile oluştuğu gösterilmiştir (71).

Östrojen reseptör- α ve ER- β 'nin hangi dokularda eksprese edildiği tablo 2.1' de izlenecektir.

Tablo 2.1. ER- α ve ER- β 'nin normal dokulardaki lokalizasyonu [Balfé ve ark.'ın makalesinden alınmıştır (72)]

	ER- α	ER- β
Meme	+	+
Kardiovasküler Sistem		
-kalp	+	+
-damarlar	+	+
Solunum Sistemi		
-akciğerler (bronşiole)	+	+
Gastrointestinal Sistem		
-özofagus	+	+
-mide	+	+
-ince ve kalın barsaklar, rektum	+	+
-karaciğer	+	-

Tablo 2.1. (devamı) ER- α ve ER- β 'nin normal dokulardaki lokalizasyonu [Balfe ve ark.'ın makalesinden alınmıştır (72)]

Kadın Genital Sistemi		
-vajina, serviks, uterus	+	+
-over ve tubalar	+	+
-korpus luteum	-	+
Santral sinir sistemi		
-serebral korteks	+	+
-serebellum	+	+
-medulla oblongata	-	+
-pons	+	+
Endokrin Sistem		
-hipofiz	+	+
-tiroid	+	+
-adrenal	+	+
Genito-üriner Sistem		
-böbrek	+	+
-mesane	+	+
Erkek Genital Sistem		
-testis	+	+
-epididim	-	+
-vas deferens	-	+
-prostat	+	+
İmmun Sistem		
-natural killer hücreleri	+	+
Göz, kulak	+	+
Adipöz Doku	+	+
Oral Dokular	-	+
Kemik	+	+
Cilt	+	+

Östrojen reseptör- α meme duktus ve lobullerinin sadece luminal epitel hücrelerinin nukleuslarında saptanmıştır (32). Östrojen reseptör- β ise luminal epitelyal hücreler yanısıra myoepitelyal hücreler ve stromada endotelyal hücreler, lenfoid hücreler ile fibroblastların da nukleuslarında saptanmıştır (26, 32, 33).

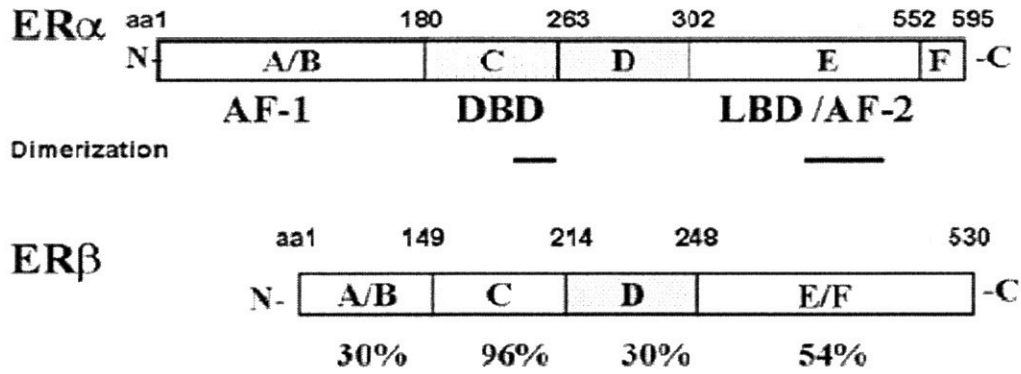
Her iki östrojen reseptörü de hücre proliferasyonu, morfolojisi ve motilitesi üzerine etkilidir. Östrojen reseptör- α etkilerini ligand bağımlı olarak gerçekleştirirken, ER- β ise ligand bağımsızdır. Östrojen reseptör- β hücre motilite ve migrasyonunu inhibe eder (72).

Östrojenin yapısı ile normal dokulardaki fonksiyonel görev ve yolları aşağıda anlatılmaktadır.

2.13. ER- α ve ER- β 'nin Moleküler Yapıları

Östrojen reseptör- α (595 aa) ve östrojen reseptör- β (530 aa) farklı genlerdeki farklı kromozomlar tarafından kodlanan nukleer reseptör ailesinin iki üyesidir (68, 73, 74). Östrojen reseptör- α 6. kromozomda kodlanırken, ER- β 14. kromozomda yer alır (73,74). Şekilde de görüldüğü gibi her iki östrojen reseptörü de yapısal olarak beş farklı bölgeye sahiptir (68, 75) (Şekil 4.1). N-terminal ligand bağımsız reseptör aktivasyon fonksiyonu (AF-1) A/B alanında temsil edilir (68, 75). Östrojen reseptör- α 'nın AF-1 bölgesi ligandan bağımsız olarak transkripsiyonu aktive ederken, ER- β 'nin AF-1 bölgesi önemsiz olarak nitelendirilmektedir (68). Östrojen reseptör- α ve ER- β AF-1 bölgesi sadece % 30 oranında benzerlik içermektedir (68, 75). C-terminal ligand bağımlı reseptör aktivasyon (AF-2) bölgesi ise E alanında temsil edilmekte olup ligand bağlayıcı domain (LBD) burada bulunur (68). Östrojen reseptör- α ve ER- β E alanı için % 54 oranında benzerlik içermektedir. E alanı ayrıca heat-shock proteinlerle ilişkilidir, reseptör dimerizasyonu, nukleer lokalizasyon ve kofaktörlerle reaksiyonda da önemli görevleri vardır (75). C alanında temsil edilen DNA bağlayıcı domain (DBD) ise korunmuş iki adet zinc finger bulunan bölge olup, en çok korunan yani değişime uğramamış bölgedir (5, 75). Reseptörler benzer DNA sekansına sahip olan hedef genlerdeki düzenleyici bölgelerdeki östrojene yanıt veren elementlere (ERE) bu alandan bağlanırlar (68). Östrojen reseptör- α ve ER- β 'nin C alanı için benzerliği % 96'dır (75). D alanı ise ligand bağlayıcı alan (LBD) ve DNA

bağlayıcı alan (DBD) arasında temsil edilir ve nükleer lokalizasyon sinyalini alır (68, 75). C ve E alanları reseptör dimerizasyonunu kontrol eder (68). Ayrıca C terminal uçta protein-protein etkileşiminde ve dimerizasyonda rol alan kısa bir F alanı daha vardır (6, 68, 76-79) (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. ER- α ve ER- β 'nin yapısı

[Fox ve ark.'nın makalesinden alınmıştır(5).]

Östrojen reseptör- β reseptörünün yapılan mRNA çalışmaları sonucunda ER- β (1-5) olmak üzere 5 farklı isoformu tanımlanmıştır (73, 80). Östrojen reseptör- β tam uzunlukta (full-length) bir protein olup ER- β 2'nin şimdilerde Ogawa tarafından tanımlanan ER- β cx ile aynı olduğu gösterilmiştir (73). Östrojen reseptör- β 4 ve 5 ise N-terminal uçları olmayan, 'kesilmiş' olarak tabir edilmiş ancak günümüzde tam uzunlukta oldukları gösterilen isoformlardır (81). ER- β 3 ise testis spesifik olan ancak son yapılan çalışmalarda memede de gösterilen isoformdur (81). Az sayıda meme kanserli olgularda yapılan çalışmada ER- β 1, 2, 3 ve 5'in daha sık, ER- β 4'ün ise daha az sıklıkla bulunduğu gösterilmiştir (81). ER- β 2 ve 5'in daha sıklıkla büyük tümör boyutu ve yüksek proliferasyon aktivitesiyle ilişkili olduğu; ER- β 3'ün ise lenf nodu metastazıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (81, 82).

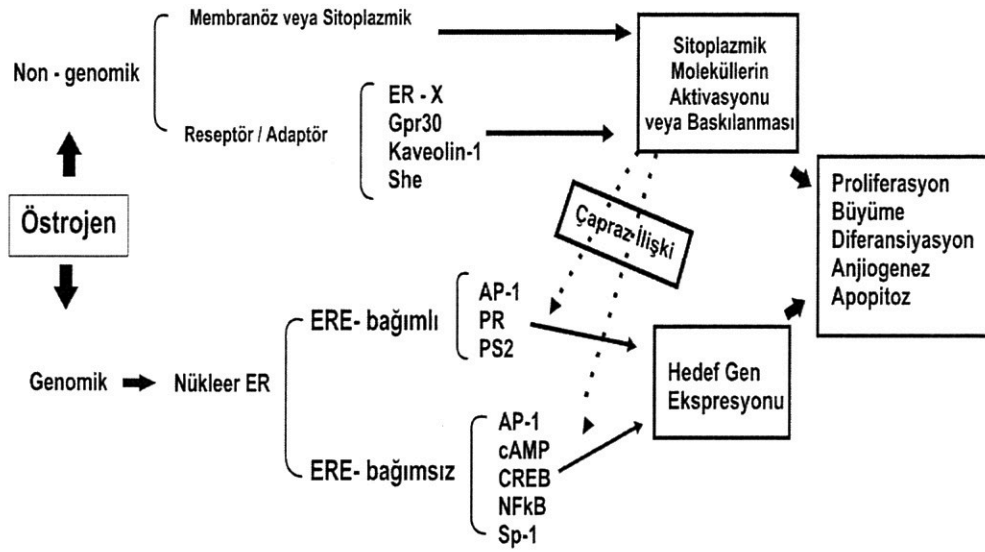
Östrojen, reseptörleriyle bağlandığı zaman hücre fonksiyonlarında değişiklikler ortaya çıkarmaktadır (67). Bunu genomik ve non-genomik yollar olmak üzere 2 farklı şekilde gerçekleştirmektedir (67) (Şekil 4.2)

1-Genomik Yolak

Genomik yolakta östrojen, nükleer yerleşimli östrojen bağımlı reseptörlerin homo- ve heterodimerlerine bağlanır. Nükleer östrojen-östrojen reseptör kompleksi östrojene yanıt oluşturan genlerin promotör bölgesindeki östrojene yanıt veren element (ERE) dizisine bağlanır. Bu bağlanma sonucu promotör alanındaki katılımcı proteinlerin (ko-aktivatör ya da ko-represör) aktivasyonu ile ilgili protein sentezinde rol alan mRNA seviyeleri artar ya da azalır. Protein senteziyle de fizyolojik cevap gelişir. Östrojen reseptör- α ve ER- β , bazı genlerin transkripsiyonunu, diğer DNA bağımlı transkripsiyon faktörleriyle bağlanarak, ERE genlerinden bağımsız olarak ve direkt DNA'ya bağlanmaksızın regüle edebilir. AP-1, SP-1, forkhead box (Fox), oct, nuklear factors kappaB (NF-kB) ve GATA-3 olarak bilinen östrojen reseptörleriyle bağlanan non-ERE DNA bağlayıcı transkripsiyon faktörleridir (83-85) (Şekil 4.2).

2-Non-Genomik Yolak

Non-genomik yolakta östrojen, plazma membranında ya da membrana komşu reseptörlere bağlanarak veya plazma membran ilişkili östrojen-bağlayıcı proteinlere bağlanarak etki gösterir. Bu bağlanma sonucu artmış kalsiyum ve nitrik oksit seviyeleri ile mitojen-aktive protein kinaz (MAPK), protein kinaz C (PKC), fosfoiyodinaz 3-kinaz (PI3K) ve protein kinaz A (PKA) gibi birçok multipl intrasellüler kinaz kaskad aktivasyonunu içeren birçok nükleer yanıt ortaya çıkar. Östrojen, caveolin-1 veya Shc (SH-2 içeren proto-onkogene) gibi adaptör proteinlerle plazma membranını hedefler ve bağlanır (67). Östrojen ve AP-1 transkripsiyon faktörleri c-fos ve c-jun arasındaki etkileşim ile AP-1 cevap elementleri indirekt olarak aktive olurlar. Diğer bir taraftan östrojenin sitoplazmik reseptörüne bağlanması sonucu AP-1 bağımlı transkripsiyon direkt ve etkili bir şekilde aktive olur. Bu aktivasyon sonucu SRC-1, p300, ubiquitin ligaz E6-AP, Mdm-2, Carm ve pol II gibi kompleksler oluşur (67). Transkripsiyon faktörleri, proliferasyon, diferansiyasyon, hücre motilitesi ve apoptozis gibi birçok hücrel süreçte rol alan genleri regüle ederler. Non-genomik etkiler birkaç dakika içinde ve hızlı bir şekilde ortaya çıkar. RNA veya yeni proteinlerin biyosenteziyle kontrol edilir (86, 87) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Genomik ve Non-genomik Yolak

[Chen ve ark.'nın makalesinden alınmıştır (67).]

2.14. Östrojen Reseptörlerinin Meme Karsinogenezindeki Rollerini

Östrojen ve östrojen reseptörlerinin meme kanserindeki rolleri geniş çapta araştırılmaktadır (67). Epidemiyolojik olarak hormon replasman tedavisi alan özellikle de uzun dönem tedavi almış postmenopozal kadınlarda meme kanser insidansı önemli düzeyde yüksek bulunmuştur (88). Bu sonuç bize meme tümörlerinin lokal östrojen sentezi yapmayı sağlayan aromatazı yüksek seviyelerde eksprese ettiğini göstermektedir (7, 89). Yüksek aromataz seviyeleri varlığında, tümör otokrin olarak lokal östrojen üretir. Böylece tümöral doku, non-tümöral doku ve sistemik dolaşıma göre daha fazla östrojen içerir (7, 89). Östrojenin meme kanserindeki rolü aromataz inhibitörleri ile yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. Aromatazın kimyasal inhibitörleri ya da si-RNA ile baskılanması sonucu kültürdeki meme kanser hücrelerinin proliferasyonu da baskılanmıştır (7, 89). Meme kanserine benzer şekilde östrojenin servikal, endometriyal ve ovaryan kanserleri içerecek şekilde jinekolojik kanserler gelişiminde etkili olduğu gösterilmiştir.

Östrojenin karsinojenik etkisi en az 3 şekildedir. Birincisi; östrojenler hücre proliferasyonuna östrojen reseptör ilişkili genomik/non-genomik yollarla etki ederler. Östrojen ilişkili mediyatörlerin sayıca artması hücre proliferasyonu, büyümesini artırırken, apoptotik stimulusa sensitiviteyi azaltır, invazivliği artırır. Örneğin östrojen (E2) meme kanserinde, ER- α reseptörü vasıtasıyla LRP16 gen ekspresyonunu stimule eder. Artmış LRP16, ER- α ilişkili E-kaderin transkripsiyonunu engeller. E-kaderinin azalması da meme ve endometriyal kanserde invaziv büyümeye yol açar (90). Benzer şekilde östrojen (E2) meme kanserinde, östrojen reseptörlerinden bağımsız olarak Wnt-1 seviyesini upregüle eder (91). Artmış Wnt-1 seviyeleri tümör hücrelerinin apoptozise olan rezistansını artırır (92). İkincisi; östrojen, hücre membran ilişkili ancak östrojen reseptöründen bağımsız olarak hedef molekülleri fosforile eder ve böylece hücre proliferasyonunu artırır. Bu yolk ilk defa östrojen reseptör negatif meme kanserlerinde gösterilmiştir. Üçüncüsü; östrojen metabolitlerinin direkt genotoksik etkileri DNA hasarı, mutasyonlar ve hücre transformasyonuna yol açmaktadır. Bu toksisite östrojen reseptöründen bağımsız olarak oluşmaktadır (7, 89, 93).

Östrojen reseptör- α ve ER- β arasındaki ilişki ve denge tümör gelişimi ve tedavisinde çok önemli role sahiptir (22). İlk çalışmalar normal meme dokusunun tümörojenik hale gelmesinde ER- α RNA miktarındaki artış ve ER- β miktarındaki azalışın etkili olduğunu göstermiştir (22). 2000'li yılların başında ER- β 'nın tümörlerdeki prognostik önemi araştırılmaya başlanmış ve bazı çalışmalarda meme kanserinde iyi prognostik faktör olduğu gösterilmiştir (22).

Borgquist ve ark.'nın (35) yaptığı 512 meme kanserli olguyu içeren bir çalışmada olguların % 78' ER- α pozitifken, % 50'si ER- β pozitifdir. Fonksiyonel olarak ER- α nin aktivasyonu tümör hücre proliferasyonu ve büyümesiyle (15, 92), ER- β aktivasyonu ise apoptozisin, malign transformasyonun ve tümör hücre büyümesinin baskılanması ile ilişkili olarak bulunmuştur (92, 94). Aynı zamanda ER- β , ER- α 'nın transaktivasyonunu da negatif yönde regüle etmekle görevlidir (95, 96).

Östrojen reseptör- α ve ER- β reseptör oranları benign ve malign hastalıklarda farklıdır. Malign dokularda ER- α predominansı varken, benign dokularda ER- β

predominansı vardır (22). Alfa / beta oranı tümörögenesis boyunca değişir, ER- α artarken, ER- β azalır (22, 29, 31). Kolon ve prostat kanserinde de reseptör oranları meme kanserine benzerdir (30).

2.15. ER- α ve ER- β 'nin Memenin Benign, Pre-Malign ve Malign Lezyonlarında Ekspresyonu

Meme kanserinin disregüle östrojen sentezi sonucu ortaya çıkan anormal hücre proliferasyonu ile oluştuğu düşünülmektedir (5). Östrojen reseptör- α ve ER- β 'nin her ikisi de primer olarak prolifer olmayan hücrelerde eksprese edilmektedirler (5). Meme kanser geliştirme riski düşük, duktal hiperplazi, sklerozing adenozis, radyal skar gibi benign meme lezyonlarında ER- α ekspresyon sıklığı fazladır (97). Ancak atipik duktal hiperplazi gibi pre-malign bir lezyonda ER- α ekspresyonu yaştan bağımsız olarak yüksektir (97). Duktal karsinoma in situ lezyonları ise grade ile ilişkili olacak şekilde ER- α ekspresyonu gösterirler. Düşük grade ve intermediate grade'li DKIS artmış sayıda ER- α pozitif prolifer hücreye sahip olduğundan yüksek seviyelerde ER- α ekspresyonu içerir (29, 31).

Meme tümörlerinde ER- α ekspresyonunun, normal dokuyla karşılaştırıldığında arttığı gösterilmiştir. Ayrıca düşük derecede nükleer gradeli DKIS'larda hücrelerin % 75'inde artmış ER- α ekspresyonu izlenirken, yüksek derecede nükleer grade'li DKIS'larda hücrelerin % 30'unda yani daha düşük ER- α ekspresyonu izlenmektedir (98, 22).

Normal ve düşük riskli meme lezyonlarındaki ER- α pozitif prolifer olmayan hücre fenotipinin, yüksek riskli lezyonlardaki ya da düşük dereceli DKIS'lardaki yüksek ER- α ekspresyonu ve ER- α pozitif prolifer hücre fenotipine dönüşmesi meme kanseri gelişmesinde önemli bir basamaktır (97). Östrojen reseptör- β ekspresyonu ise normal meme dokusundan → duktal hiperplazi → DKIS → invaziv karsinoma gittikçe progresif olarak azalır (31, 33).

Duktal karsinoma in situ lezyonları normal epitelle karşılaştırıldığında azalmış ER- β ekspresyonu göstermektedir (31). Yüksek derecede nükleer atipili DKIS lezyonlarında bu azalma daha belirgindir (31). Günümüzde meme kanserlerinde ER- α ekspresyonunun arttığı, ER- β ekspresyonunun ise azaldığı

gösterilmiştir. Bu durum ER- β 'nin supresör bir etkisi olduğunu düşündürmüştür (99, 100). Artmış ER- β 'nin promotör bölgesinin metilasyonunun, premalign lezyonlarda ve invaziv meme tümörlerinin 2/3'ünde düşük gen ekspresyonunun bir göstergesi olduğu kabul edilmektedir ve kötü klinik prognozla ilişkili olduğu öne sürülmüştür (101).

2.16. ER- α ve ER- β Ekspresyonunun Meme Kanserinde Prognozla İlişkisi

Yapılan çalışmalarda ER- α ekspresyonu ile düşük tümör grade'i ve negatif lenf nodu durumuyla ilişkili bulunmuştur. Östrojen reseptör- α pozitif tümörler daha iyi hastalısız ve tüm yaşam süresine sahiptirler (27, 82). Östrojen reseptör- α pozitif tümörler genellikle daha az invaziv olup daha iyi prognoza sahiptir. Ancak ER- β ekspresyonu ve invazivlik arasındaki ilişki henüz tam netliğe kavuşmamıştır (5). Başka araştırmacılar ER- β ekspresyonunun düşük tümör grade ile anlamlı ilişki gösterdiğini savunmaktadır (27, 102).

Literatürde ER- β ekspresyonunun prognozla ilişkisi hakkında çok sayıda farklı sonuçlara sahip çalışma mevcuttur. Örneğin bir çalışmada ER- β 'nin meme kanserinde iyi prognostik bir belirteç ve adjuvan tamoksifen tedavisi alan olgularda daha iyi survey ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (103). Başka bir çalışmada ise ER- β ekspresyonunun aksiller lenf nodu metastazı olmaması ve düşük tümör grade'li tümör ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (27). Östrojen reseptör- β ekspresyonu olan olgular daha iyi hastalısız sağkalım oranına sahiptir (12). Bu çalışmalar bize ER- β 'nin meme kanserinde koruyucu bir role sahip olduğunu göstermektedir.

Diğer taraftan ER- β ekspresyonunun kötü prognostik bir faktör olduğuna dair kanıtlar da mevcuttur. Östrojen reseptör- β ve ER- α eksprese eden tümörlü olgularda; aksiller lenf nodunun pozitif, tümör grade'nin yüksek olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (32,102).

Sonuç olarak çalışmaların çoğuna bakıldığında ER- β varlığı meme kanserinde iyi prognozla ilişkilidir (27, 33, 37). Normal meme dokusu tümörojenik hale geldikçe ER- α miktarı artarken, ER- β miktarı azalmaktadır (22, 29, 31).

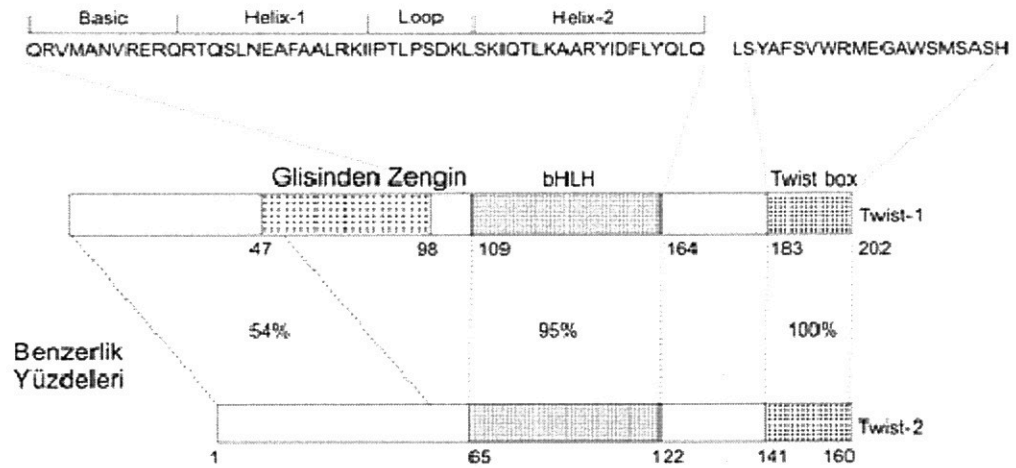
Yapılan çalışmalarda ER- β ekspresyonu ile aksiller lenf nodu durumu arasında anlamlı ilişki bulunmazken (38, 82), birkaç çalışmada ER- β ekspresyonu negatif lenf nodu durumu ile ilişkili olarak bulunmuştur (27).

Östrojen reseptörü pozitif olgulara bakıldığında, ER- α ekspresyonu yaşlı ve/veya postmenopozal olgularda daha yüksektir. Ancak literatürde ER- β ekspresyonu ile yaş ve menopozal durum arasında ilişki bulunamamıştır. Farklı 2 çalışmada ER- β ekspresyonu premenopozal durumla önemli oranda ilişkili bulunmuştur (5). Sonuç olarak yapılan çok sayıdaki fonksiyonel çalışmada ER- α ve ER- β 'nin meme kanserinde tamamen farklı rollere sahip oldukları; ER- α tümör oluşumunu teşvik ederken, ER- β tam tersine tümör supresör olduğu sonucuna varılmıştır (67).

2.17. Twist-1 Nedir ?

Twist-1, *Drosophila*'nın embriyogenез sürecinde dorsoventral/mezodermal yapılarının oluşumunda, vertebralılarda ise nöral krest migrasyonundan sorumlu zigotik genlerinden biridir (39, 40, 42). Twist-1 geni basic-helix-loop-helix (bHLH) motifi içeren yani bHLH protein ailesine mensup bir transkripsiyon faktörüdür (40, 43). bHLH proteinleri yapısal ve fonksiyonel olarak interhelikal loop tarafından ayrılmış, iki amfipatik α -heliks komşu iki temel aminoasit içeren domainden oluşur (42). Alfa-heliksler ikinci bHLH faktör ile dimerizasyona olanak sağlar ve sonuç olarak heksanükleotid (CANNTG) ile bağlanan çift taraflı DNA-bağlayıcı domain oluşur ki buna E-BOXE denir (42). Fonksiyonel E-BOXE birçok hücre serisinde spesifik genlerin regülatör elemanı olduğu gibi negatif ya da pozitif regülatör olarak birçok diferansiyasyon prosesinde transkripsiyon faktörü olarak ve nörogenез/myogenез gibi farklı gelişimsel basamaklarda anahtar rol oynar (42).

Vertebralılarda Twist-1 ve Twist-2 (Dermo-1) olmak üzere iki Twist geni vardır (42, 44). Bu iki Twist geni % 90 oranında yapısal olarak benzerdir (42). Twist-1 ve Twist-2'nin C-terminal kısımları anti-osteojenik olarak fonksiyon gösterirken (42), N-terminal kısmı daha değişken fonksiyonlar oluşturur. Twist-2 geninde Twist-1'de bulunan glisinden zengin bölge yoktur (44) (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Twist-1 ve Twist-2'nin yapısı

[Puisieux ve ark.'nın makalesinden alınmıştır (42).]

Twist-2 genleri mezoderm ve ektoderm orijinli kas, kıkırdak ve osteojenik hücre serileri gibi birçok hücre serisinin diferansiyasyonu ile ilişkilidir (42, 45, 46); Twist-1 sarkom, gliom, nöroblastom ve melanomlar gibi birçok solid insan tümöründe aşırı ekspresyon edilir (45, 47-52). Diferansiyasyondaki önemli rolleri yanısıra programlı hücre ölümünde regülatör görevleri de vardır (42).

2.18. Twist-1'in Metastazla İlişkisi

Epitelyal hücrelerin mezenkimal hücrelere transdiferansiyasyonuna epitelyal mezenkimal dönüşüm (EMT) denir (104). Epitelyal mezenkimal dönüşüm karsinom progresyonunda ve omurgalı embriyoların gelişiminde önemli bir mekanizmadır (41, 42, 104). Gastrulasyon gibi gelişimin erken dönemlerinde görülür. Aynı zamanda kalp, kas-iskelet sistemi, kraniofasyal yapılar ve periferik sinir sistemi formasyonu boyunca da majör role sahiptir (41, 42).

Epitelyal-mezenkimal dönüşüm çok basamaklı bir süreçtir: apikobazal polaritede bozukluk, bazal laminanın bütünlüğünün yokluğu, hücre şekil plastisitesi,

hücrelerin iğsi morfoloji kazanmaları şeklinde özetlenebilir (104, 105). Tüm bunlar artmış migrasyon yeteneğine izin verir (105).

Epitelyal mezenkimal dönüşüm boyunca epitelyal hücreler kendi epitelyal özelliklerini kaybedip, fibroblast benzeri morfoloji kazanırlar (106). Sitoskeletal reorganizasyon, mezenkimal belirleyicilerin upregülasyonu, artmış motilite ile birlikte invaziv/metastatik davranış yeteneği kazanmış olurlar (106).

Bu süreçler E-kaderin'nin N-kaderine dönüşmesi ile ilişkilidir. E-kaderin homotipik hücre-hücre adezyon molekülüdür. Epitelyal hücrelerde ekspresyonu daha fazladır. N-kaderin ise homotipik homofilik etkileşimle forme olabilen geç dönem embriyoda daha sıklıkla nöral doku, lens gibi mezodermal dokularda, daha az sıklıkla epitelyal dokularda (42, 107); erişkinlerde ise nöral doku, retina, endotelial hücreler, fibroblastlar ve myositlerde bulunan bir moleküldür (42, 105).

Metastaz kanser hastalarında ölümün en sık sebeplerindendir. Metastaz, primer tümörden uzak bir organda sekonder tümör oluşmasına kadar geçen çok basamaklı bir süreçtir. Karsinomlarda ilk basamak invazyondur. İnvazyon; neoplastik epitelyal hücrelerin hücre-hücre adezyonlarını kaybederek, motilite kazanmaları ve komşu dokuya invaze olmalarıdır. İkinci basamak ise tümör hücrelerinin kan veya lenfatik damar endotellerini penetre ederek sistemik dolaşıma katılmalarıdır (intravazasyon). Üçüncü basamak sistemik dolaşımdan distal alanlara geçiştir (ekstavazasyon) (56). En son olarak da neoplastik hücreler gittikleri alanlarda uygun çevreyi de sağladıktan sonra çoğalmaya ve büyümeye başlarlar (56).

Kanser hücrelerinin invaziv ve metastatik davranışları benzerlik göstermektedir. İnvaziv davranışta komşu çevre dokuya göç söz konusudur, metastatik davranışta ise neoplastik hücreler uzak mesafelere göç eder (106). Epitelyal hücreler genellikle tek ya da çok tabakalı şekilde bazal membran üzerinde düzenlenim göstererek, vücuttaki kavite ya da yüzeyleri döşerler ve aynı zamanda koruyucu bir bariyer oluştururlar. Bu hücreler birbirine adezyon molekülleriyle (örneğin E-kaderin) sıkıca bağlı olup, apiko-bazal şekilde polarizasyon gösterirler. Bu hücreler sitokeratin gibi epitelyal belirleyicileri eksprese ederler (106). Mezenkimal hücreler ekstrasellüler matriks ile beraber interstisyel alanları doldururlar ve bunlar büyüme faktörleri için de kaynak teşkil ederler (106).

Mezenkimal hücrelerde hücre-hücre adezyonu olmayıp migratuvar davranış gösterirler. Vimentin gibi mezenkimal belirleyicileri eksprese ederler (106).

Tümör metastazında Twist-1'in rolü E-kaderin ilişkili hücre-hücre adezyon kaybını indüklemek ve epitelyal hücrelerde epitelyal-mezenkimal dönüşümü sağlamaktır. Twist-1 ile indüklenmiş EMT boyunca E-kaderin transkripsiyonu baskılanır. E-kaderin ekspresyon kaybı da EMT için kritik öneme sahip bir olaydır. Twist-1 bu yolda E-kaderin ekspresyonundan bağımsızdır. Ektopik E-kaderin ekspresyonu Twist-1 ilişkili EMT'yi geri çeviremez (56).

Birçok çalışmada Twist-1'in meme, prostat ve mide karsinomu gibi çok sayıdaki epitelyal tip kanserde upregüle olduğu gösterilmiştir (42, 53-55). Fonksiyonel çalışmalar Twist-1'in tümör oluşum ve progresyonunda, diferansiyasyon inhibisyonunda, p53 tümör supresyon yolağında, hücre ömrünün uzamasında, ve/veya EMT'da aktif ve önemli roller üstlendiğini göstermiştir (42). Yang ve ark. (56) meme invaziv lobüler karsinomlarında Twist-1 overekspresyonun invaziv duktal karsinomlardan daha sık olduğunu ve ilgi çekici olarak lobüler karsinomların % 50'sinden fazlasında E-cadherin mutasyonu olduğunu belirtmişlerdir. Twist-1 meme invaziv lobüler karsinomlarda, invaziv duktal karsinomlara göre daha az metilasyona uğrar ve sonuç olarak da invaziv duktal karsinomlarda daha fazla supresedir. Yine aynı çalışmada Twist-1'in kanser gelişimi boyunca hücrenin kendini koruma programlarının inhibisyonu, hücre-hücre adezyon mekanizmasının deregülasyonu (E- ve N-kaderin ekspresyonu üzerinden) ve diferansiyasyonun deregülasyonu gibi birçok önemli süreci modüle ettiği, sonuç olarak da hücre ömrünü uzattığı ve hücreye invazyon yeteneği kazandırdığı sonucuna ulaşılmıştır.

Yang ve ark. (56) fareler üzerinde yaptıkları bir çalışma sonucunda, meme kanser hücrelerinin intravazasyon ve akciğer metastazı yapabilmesi için Twist-1'in gerekliliğini ve Twist-1 ekspresyonunun inhibisyonuyla sirkülasyondaki tümör hücrelerinin azaldığını göstermişlerdir. Aynı grup araştırmacı, ektopik Twist-1 ekspresyonunun hücre motilite indüksiyonu, E-kaderin ilişkili hücre-hücre adezyonunun kaybı ve mezenkimal belirteçlerin aktivasyonu gibi moleküler ve morfolojik özelliklerin EMT ile ilişkisini göstermiştir. Benzer gözlemler, yakın

zamanda Kwok ve ark. (55) tarafından androjen-bağımsız prostat kanserlerinde gösterilmiştir.

Meme kanserinin belli moleküler subtiplerinde farklı biyolojik davranış ve metastatik paternin görülmesi meme tümörlerinde farklı invazyon ve metastaz mekanizmaları olduğunu gösterir (108). Meme tümörlerinin invazyon ve metastazında EMT önemli rol oynar (41). Epitelyal mezenkimal dönüşümü Snail1, Slug (Snail2), SIP-2 ve Twist-1 gibi çok sayıda spesifik transkripsiyon faktörü, E-kaderin supresyonu yaparak kontrol eder (108).

Twist-1'in insan kanserlerindeki aktivasyonun gösterilmesiyle beraber, akıllara klinik sonuçları, prognostik ve prediktif önemiyle birlikte yeni bir tıropatik hedef olabilirliği gelmiştir (42).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma ESOGÜ Etik kurul 22 Kasım 2011 258 no'lu sayı kararı ile onaylanmış olup Osmangazi Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalında Ocak 2002 ve Aralık 2012 tarihleri arasında modifiye radikal mastektomi/subkutan mastektomi ve aksiller disseksiyon uygulanmış, invaziv duktal karsinom tanılı, aksiller lenf nodu metastazı olmayan meme karsinomlu 50 olgu (Grup 1) ve aksiller lenf nodu metastazı olan meme karsinomlu 50 olgu (Grup 2), toplam 100 olgu dahil edildi. Her olgunun primer tümörüne ve lenf nodu metastazı olan olguların metastaz içeren bir lenf noduna ait parafin bloklarından kesitler hazırlanarak anti-östrojen reseptör- β (Leica, clone EMR02) ve anti-twist-1 (Biorbyt, poliklonal) antikoları kullanılarak labelled streptavidin-biotin peroksidaz immunohistokimyasal boyama yöntemi ile boyama yapıldı. Çalışmamızda normal doku ile tümördeki boyanmalar karşılaştırılacağından normal meme dokusunun da olduğu tümör kesitleri seçildi.

3.1. Boyama Yöntemi

1. Poly-L-Lysinli lamlara parafin bloklardan 3-4 μ 'luk kesitler alındı.
2. Deparafinizasyon ve dehidratasyon işlemi için kesitler etüvde 60 C'de 1 saat bekletildikten sonra sırasıyla 5'er dakika süre ile 3 kez taze ksilolden, 3'er dakika süre ile 2'şer kez absolü ve % 96'lık alkoller ile distile sudan geçirildi.
3. Oda sıcaklığında hidrojen peroksit (% 3) ile 15 dakika inkübe edildi.
4. İşlem aralarında yıkama solüsyonu olarak Twist-1 için fosfat buffer saline (PBS) (pH:7,4), ER- β için tris buffer (TBS) (pH: 7,4) kullanılarak kesitler 5'er dakika süreyle 2 kez yıkandı.
5. Sitrat buffer (pH:6) içerisine konan kesitler yüksek basınçlı ortamda kaynatılarak maskelenmiş antijenleri açığa çıkartma işlemi 5 dakika süreyle uygulandı.
6. Basınçlı ortamdan çıkarılıp, 20 dakika oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı.
7. Kesitler distile suda 10 saniye, Twist-1 ve ER- β için hazırlanan yıkama solüsyonları ile 5'er süreyle dakika yıkandı.

8. Kesitler protein bloke edici ajan (Ultra V. Block) ile Twist-1 için 15 dakika, ER- β için 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

9. Kesitlere primer antikor, ER- β (1/75 dilüsyonda) ve Twist-1 (1/350 dilüsyonda) damlatılıp sırasıyla 24 saat ve 19 saat +4 C'de inkübe edildi.

10. Kesitler Twist-1 ve ER- β için hazırlanan yıkama solüsyonları ile süreyle 5 dakika 2 kez yıkandı.

11. Sekonder antikor (Biotinylated/LINK) ile oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi.

12. Twist-1 için fosfat buffer saline (PBS) (pH:7,4), ER- β için tris buffer (TBS) (pH: 7,4) ile 5'er dakika 2 kez yıkandı.

13. Kesitlere streptavidin damlatıldı ve 20 dakika inkübe edildi.

14. Twist-1 için fosfat buffer saline (PBS) (pH:7,4), ER- β için tris buffer (TBS) (pH:7,4) ile 5 dakika 2 kez yıkandı.

15. Tarife göre hazırlanan DAB (Thermo Fisher Corporation, USA) kromojen solüsyonu damlatılıp oda sıcaklığında 5-10 dakika bekletildikten sonra 5 dakika akan suda yıkandı, 2'ser kez 3 dakika süreyle distile suyla yıkandı.

16. Hematoksilen solüsyonunda 45 saniye bekletilerek zıt boyanma yapıldı.

17. Kesitler 3 dakika süreyle 2'ser kez akan çeşme suyunda yıkandı, 10 saniye süreyle amonyak (% 1) solüsyonunda bekletildikten sonra 3 dakika süreyle 2 kez distile suda yıkandı.

18. Preparatlar sırasıyla % 96 - % 96 - % 99'luk alkol ve daha sonra 3 aşamalı ksilenden geçirildikten sonra lamel ile kapatıldı.

Östrojen reseptör- β ve Twist-1 ile boyanma nükleer ve sitoplazmik idi. ER- β ile boyama literatürdeki çalışmalar dikkate alınarak (27, 29, 38) nükleer boyanan hücrelerin oranı % 20'nin altında ise negatif; % 20 ve üstünde ise pozitif olarak kabul edildi. Östrojen reseptör- β , normal meme duktuslarındaki epitelyal ve myoepitelyal hücrelerde, lenfositlerde ve damar endotel hücrelerinde de pozitiflik gösteriyordu. Twist-1 için boyanma Watanabe ve ark'nın (54) çalışması dikkate alınarak hücrelerin oranı % 10'nun altında ise negatif; % 10'nun üstüneyse pozitif

kabul edildi. Twist-1 ile normal meme dokusunun duktal epitel hücrelerinde, stromal hücrelerde ve lenfositlerde de nükleer pozitiflik izlendi. Östrojen reseptör- β ve Twist-1 ekspresyon yönünden çok zayıf, zayıf, orta ve kuvvetli olarak kategorize edildi. İstatistiksel değerlendirmelerde kuvvetli boyanan olgu sayısı az olduğu için orta ve kuvvetli derecede boyanmalar birarada ele alındı. Yine çok zayıf ve zayıf boyanmalar da zayıf kategorisinde ele alınmıştır. Normal meme dokusundaki ER- β ve Twist-1 ekspresyonu değerlendirilirken boyanan hücre yüzdesi dikkate alınmadı.

Patoloji raporlarındaki ER- α ve PR hormon reseptörler sonuçları için literatürdeki çalışmalar göz önüne alınarak cut-off değeri % 10 olarak kabul edildi (29, 35, 37, 103).

İstatistiksel değerlendirme için tümör boyuları ≤ 2 cm ve > 2 cm şeklinde kategorize edildi (27, 33, 35, 37, 38).

Olgularımızdaki yaşam durumu survey analizi için uygun olmadığından istatistiksel değerlendirme yapılamadı. Grup 1 ve grup 2 olguların herbirinde sadece üçer olgu exitus olup istatistiksel değerlendirme için her bir grupta exitus olan en az 7 olgunun bulunması gerekliydi.

3.2. İstatistiksel Değerlendirme

Grup 1 ve grup 2 olgularda, primer tümör odağında ve metastatik lenf nodunda ER- β ve Twist-1 ekspresyonlarının karşılaştırılması ve bu ekspresyonların tümör boyutu, tümör grade'i, lokalizasyonu, lenf nodu durumu ve hormon durumu (ER- α , PR) ile ilişkileri, istatistiksel olarak SPSS 21.0 paket programı kullanılarak değişkenlerden oluşan veri setlerine Ki Kare analizi ile, yaş analizi T testi (ort +/- SD) ile, ER- β ve Twist-1'in primer odak ve metastatik lenf nodundaki ekspresyonları arasındaki uyum analizi kappa katsayısı hesaplanarak değerlendirilmiştir (p<0.05 anlamlı olarak kabul edilmiştir).

4. BULGULAR

Hastaların 97'sine modifiye radikal mastektomi ve aksiller disseksiyon; 3'üne subkutan mastektomi ve aksiller disseksiyon uygulanmıştır.

4.1. Klinik Parametreler

Yaş: Çalışmaya alınan tüm hastaların yaşları 24 ile 82 arasında değişmekte idi ve yaş ortalaması 54.64'tü. Hastaların menopoz durumları bilinmediğinden menopoz öncesi ve sonrası dönemde ER- β ekspresyon özellikleri değerlendirilemedi.

Tümör lokalizasyonu: Olguların % 49'unda sağ meme; % 51'inde sol meme idi.

Tümör boyutu: 0.6 cm ile 7 cm arasında değişmekte olup, grup 1 olgularda tümör boyutu 2.27 cm; grup 2 olgularda 2.74 cm idi.

Tümörün derecelendirilmesi: İnvaziv duktal karsinom tanılı olguların % 24'ü (24/100) Grade 1, % 53'ü (53/99) Grade 2, % 23'ü (23/99) Grade 3 idi.

4.2. İmmunohistokimyasal Değerlendirme

Grup 1 ve 2'deki olgularda normal meme dokusu ve primer tümörde; grup 2'deki olguların metastatik aksiller lenf nodunda ER- β ve Twist-1 ekspresyonları değerlendirilmiştir. Grup 1'deki olgulardan ikisinde tümör kesitinde, grup 2'deki olguların da birisinde lenf nodu kesitinde immün boyada tümöral doku tükendiğinden değerlendirmeye alınamamıştır.

4.2.1. ER- β Ekspresyonu

ER- β 'nin Normal Meme Dokusunda Nükleer Ekspresyonu

Tümör komşuluğunda izlenen normal meme dokusunda nükleer ER- β ekspresyonu 89 olguda değerlendirilmiştir. Bu olguların % 89.8'inde (80/89) nükleer ER- β pozitifliği görülmüştür.

Grup 1'deki olguların 46'sı, grup 2'deki olguların 43'ünde tümör komşuluğunda normal meme dokusu değerlendirilebilmiş olup, grup 1'deki olguların % 89.1'i (41/46), grup 2'deki olguların % 90.6'sı (39/43) nükleer ER- β pozitifdir.

ER- β 'nin Primer Tümör Odağında Nükleer Ekspresyonu

Tüm olguların % 18.4'ünde (18/98) ER- β orta-kuvvetli derecede pozitif, % 50'sinde (49/98) zayıf pozitif, % 31.6'sında (31/98) negatifdir.

Grup 1'deki 48 olgunun 16'sı ER- β ile negatif, 21'i zayıf pozitif, 11'i orta-kuvvetli derecede pozitifdir.

Grup 2'deki 50 olgunun 7'si ER- β ile orta-kuvvetli derecede, 28'i zayıf derecede pozitif, 15'i negatifdir (Tablo 4.1).

Östrojen reseptör- β 'nin negatif olduğu 31 olgunun 20'si pür negatif iken, 11 olguda (grup 1'e ait 5 olgu, grup 2'ye ait 6 olgu) tümöral hücrelerde % 10'un altında zayıf ya da çok zayıf pozitiflik izlendi.

Tüm olgularda ER- β 'nin nükleer ekspresyonu ile aksiller lenf nodu durumu, tümör grade'i ve tümör lokalizasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (sırasıyla p değerleri= 0.390, 0.225, 0.872) (Tablo 4.1- 4.3).

Tablo 4.1. Tüm olgularda nükleer ER- β ekspresyonunun boyanma şiddetine göre dağılımı

Ekspresyon	LN (-) Grup 1	LN (+) Grup 2	TOPLAM
Negatif	16	15	31
Zayıf (+)	21	28	49
Orta-kuvvetli (+)	11	7	18
TOPLAM	48	50	98

Tablo 4.2. Tüm olgularda tümör grade'ine göre ER- β 'nin nükleer ekspresyonun dağılımı

Ekspresyon	Tümör Derecelendirmesi			TOPLAM
	Grade 1	Grade 2	Grade 3	
Negatif	5	19	7	31
Zayıf (+)	11	26	12	49
Orta-kuvvetli(+)	8	6	4	18
TOPLAM	24	51	23	98

Tablo 4.3. Tümör lokalizasyonuna göre ER- β 'nin nükleer ekspresyonunun tüm olgulardaki dağılımı

Ekspresyon	Lokalizasyon		
	Sağ meme	Sol meme	TOPLAM
Negatif	15	16	31
Zayıf (+)	24	25	49
Orta-kuvvetli (+)	10	8	18
TOPLAM	49	49	98

Grup 1 ve grup 2'deki olgular, ER- β 'nin nükleer ekspresyonu ile tümör grade'i ve lokalizasyonu arasındaki ilişki açısından değerlendirildiğinde, grup 1'deki olgularda ER- β 'nin nükleer ekspresyonu ile tümör grade'i ve lokalizasyonu arasında istatistiksel anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (sırasıyla p değerleri 0.803 ve 0.150) (Tablo 4.4-4.5).

Tablo 4.4. Grup 1 olgularda tümör grade'ine göre ER- β 'nin nükleer ekspresyonunun dağılımı

Ekspresyon	Tümör Derecelendirmesi			
	Grade 1	Grade 2	Grade 3	TOPLAM
Negatif	1	13	2	16
Zayıf (+)	8	9	4	21
Orta-kuvvetli (+)	4	6	1	11
TOPLAM	13	28	7	48

Tablo 4.5. Grup 1 olgularda tümör lokalizasyonuna göre ER- β 'nin nükleer ekspresyonu

Ekspresyon	Lokalizasyon		
	Sağ meme	Sol meme	TOPLAM
Negatif	7	9	16
Zayıf (+)	9	12	21
Orta-kuvvetli(+)	6	5	11
TOPLAM	22	26	48

Grup 2'deki olgularda ER- β 'nin nükleer ekspresyonu ile tümör lokalizasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamış olup, tümör grade'i ile anlamlı bir ilişki saptanmıştır (sırasıyla p değerleri=0.984 ve 0.03). Grup 2'deki 50 olgunun tümör lokalizasyonu ve grade göre ER- β ekspresyonunun dağılımı Tablo 4.6 ve tablo 4.7'de görülmektedir. Grade 1 olguların sayısı daha az olmakla birlikte, grade 2 ve 3 olan olgularda ER- β pozitif olgu sayısı daha fazladır.

Tablo 4.6. Grup 2 olgularda tümör grade'ine göre ER- β 'nin nükleer ekspresyonu

Ekspresyon	Tümör Derecelendirmesi			
	Grade 1	Grade 2	Grade 3	TOPLAM
Negatif	4	6	5	15
Zayıf pozitif(+)	3	17	8	28
Orta-kuvvetli (+)	4	0	3	7
TOPLAM	11	23	16	50

Tablo 4.7. Grup 2 olgularda tümör lokalizasyonuna göre ER- β 'nin nükleer ekspresyonu

Ekspresyon	Lokalizasyon		
	Sağ meme	Sol meme	TOPLAM
Negatif	8	7	15
Zayıf (+)	15	13	28
Orta-kuvvetli (+)	4	3	7
TOPLAM	27	23	50

ER- β 'nin Primer Odakta Sitoplazmik Ekspresyonu

Tüm olguların % 46.9'unda (46/98) ER- β zayıf pozitif, % 53.1'inde (52/98) negatifti. Tüm olgularda ER- β 'nin sitoplazmik ekspresyonu ile aksiller lenf nodu durumu arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır ($p=0.008$) (Tablo 4.8). Tüm olgularda sitoplazmik ER- β ekspresyonu ile tümör grade'i ve tümör lokalizasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır (sırasıyla p değerleri 0.553 ve 0.225) (Tablo 4.9, tablo 4.10).

Tablo 4.8. Tüm olgularda ER- β 'nin sitoplazmik ekspresyonunun boyanma şiddetine göre dağılımı

Ekspresyon	LN(-) Grup 1	LN(+) Grup 2	TOPLAM
Negatif	32	20	52
Zayıf (+)	16	30	46
Orta-kuvvetli (+)	0	0	0
TOPLAM	48	50	98

Tablo 4.9. Tüm olgularda tümör grade'ine göre ER- β 'nin sitoplazmik ekspresyonunun dağılımı

Ekspresyon	Tümör Derecelendirmesi			TOPLAM
	Grade 1	Grade 2	Grade 3	
Negatif	14	27	10	51
Zayıf (+)	10	24	13	47
Orta-kuvvetli (+)	0	0	0	0
TOPLAM	24	51	23	98

Tablo 4.10. Tüm olgularda tümör lokalizasyonuna göre ER- β 'nın sitoplazmik ekspresyonu

Ekspresyon	Lokalizasyon		
	Sağ meme	Sol meme	TOPLAM
Negatif	29	23	52
Zayıf (+)	20	26	46
Orta-kuvvetli (+)	0	0	0
TOPLAM	49	49	98

Grup 1 ve grup 2'deki olgular ayrı ayrı ele alındığında sitoplazmik ER- β ekspresyonu ile tümör grade'i ve lokalizasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (sırasıyla p değerleri grup 1 için 0.843, 0.838, grup 2 için 0.912, 0.064) (Tablo 4.11-14).

Tablo 4.11. Grup 1 olgularda tümör grade'ine göre ER- β 'nın sitoplazmik ekspresyonu

Ekspresyon	Tümör Derecelendirmesi			
	Grade 1	Grade 2	Grade 3	TOPLAM
Negatif	9	19	4	32
Zayıf (+)	4	9	3	16
Orta-kuvvetli (+)	0	0	0	0
TOPLAM	13	28	7	48

Tablo 4.12. Grup 1 olgularda tümör lokalizasyonuna göre ER- β 'nın sitoplazmik ekspresyonu

Ekspresyon	Lokalizasyon		
	Sağ meme	Sol meme	TOPLAM
Negatif	15	17	32
Zayıf (+)	7	9	16
Orta-kuvvetli (+)	0	0	0
TOPLAM	22	26	48

Tablo 4.13. Grup 2 olgularda tümör grade'ine göre ER- β 'nin sitoplazmik ekspresyonu

Ekspresyon	Tümör Derecelendirmesi			
	Grade 1	Grade 2	Grade 3	TOPLAM
Negatif	5	8	6	19
Zayıf (+)	6	15	10	31
Orta-kuvvetli (+)	0	0	0	0
TOPLAM	11	23	16	50

Tablo 4.14. Grup 2 olgularda tümör lokalizasyonuna göre ER- β 'nin sitoplazmik ekspresyonu

Ekspresyon	Lokalizasyon		
	Sağ meme	Sol meme	TOPLAM
Negatif	14	6	20
Zayıf (+)	13	17	30
Orta-kuvvetli (+)	0	0	0
TOPLAM	27	23	50

Primer Odakta ER- β ve ER- α Ekspresyonları

Tüm olguların % 76.2'si ER- α (74/97) pozitif, % 23.7'si (23/97) negatiftir. Östrojen reseptör- α pozitif olguların % 71.6'sında (53/74), nükleer ER- β ekspresyonu izlenmiş olup, % 28.4'ünde ER- β negatiftir. Östrojen reseptör- α negatif olguların % 56.5'inde (13/23) ER- β nükleer ekspresyonu izlenmiştir. Olguların % 43.5'inde (10/23) her iki reseptör ekspresyonu negatiftir. Primer tümörde ER- β 'nın nükleer ekspresyonu ile ER- α arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p=0.175) (Tablo 4.15).

Tablo 4.15. ER- α ve nükleer ER- β ekspresyonlarının tüm olgulardaki dağılımı

Boyama durumu	ER- β (-), nükleer	ER- β (+), nükleer	TOPLAM
ER- α (-)	10	13	23
ER- α (+)	21	53	74
TOPLAM	31	66	97

Primer Odakta ER- β ve PR ekspresyonları

Tüm olguların % 57.8'inde (55/95) PR pozitif, % 42.1'inde (40/95) negatiftir. Progesteron pozitif olguların % 69.1'inde (38/55) nükleer ER- β ekspresyonu izlenmiş olup, % 30.9'unda (17/55) ER- β negatiftir. Progesteron negatif olguların % 67.5'inde (27/40) nükleer ER- β ekspresyonu izlenmiştir. Olguların % 32.5'inde (13/40) her ikisi de negatiftir. Primer tümörde ER- β nükleer ekspresyonu ile PR arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p=0.869) (Tablo 4.16).

Tablo 4.16. Tüm olgularda PR ve nükleer ER- β ekspresyonları

Boyama durumu	ER- β (-), nükleer	ER- β (+), nükleer	TOPLAM
PR (-)	13	27	40
PR (+)	17	38	55
TOPLAM	30	65	95

ER- β 'nin Primer Odakta ve Metastatik Lenf Nodunda Sitoplazmik Ekspresyonlarının Karşılaştırılması

Grup 2'deki 50 olgunun metastatik lenf nodlarına uygulanan ER- β ile olguların % 6.1'inde (3/49) orta-kuvvetli nükleer pozitiflik, % 32.7'sinde (16/49) zayıf nükleer pozitiflik izlenmiş olup, % 61.2'si (30/49) negatiftir. Östrojen reseptör- β 'nin sitoplazmik ekspresyonu; olguların % 30'unda (15/50) zayıf pozitif, %70'inde (35/50) negatiftir. Olguların çoğunda ER- β sitoplazmik ekspresyonu negatifti (Tablo 4.17).

Tablo 4.17. Metastatik lenf nodunda ER- β 'nin nükleer ve sitoplazmik ekspresyonları

Ekspresyon	ER- β 'nin nükleer eks. (metastatik lenf nodu)	ER- β 'nin sitoplazmik eks. (metastatik lenf nodu)
Negatif	30	35
Zayıf (+)	16	15
Orta-kuvvetli (+)	3	0
TOPLAM	49	50

Grup 2'deki olgularda, ER- β 'nın metastatik lenf nodundaki ve primer tümördeki nükleer ekspresyonları karşılaştırıldığında, ER- β 13 (% 26) olguda hem primer tümörde hem de metastatik lenf nodunda negatif, 17 (%34) olguda her iki odakta pozitifdir. Olgulardan iki tanesinde (% 4) ER- β primer tümörde negatif, metastatik lenf nodunda pozitif iken, 18'inde (% 36) primer tümörde pozitif, metastatik lenf nodunda negatifdir (Tablo 4.18). Yapılan istatistiksel incelemede bir uyum izlenmiştir ancak bu uyum zayıf derecededir ($p=0.019$).

Tablo 4.18. Grup 2 olgularda ER- β 'nın tümör ve metastatik lenf nodunda nükleer ekspresyonu

Boyanma durumu	LN-ER- β (-) (nükleer)	LN- ER- β (+) (nükleer)	TOPLAM
Tm-ER- β (nükleer) (-)	13	2	15
Tm- ER- β (nükleer) (+)	18	17	35
TOPLAM	31	19	50

Grup 2'deki olgularda, ER- β 'nın metastatik lenf nodundaki ve primer tümördeki sitoplazmik ekspresyonları karşılaştırıldığında, 15 olguda (% 30) hem primer tümörde hem de metastatik lenf nodunda negatif, 10 olguda (% 20) ER- β pozitifdir. Olgulardan 5'inde (% 10) ER- β primer tümörde negatif, metastatik lenf nodunda pozitif iken 20'sinde (% 40) primer tümörde pozitif, metastatik lenf nodunda negatifdir. Yapılan istatistiksel incelemede anlamlı bir uyum bulunmamıştır ($p=0.529$) (Tablo 4.19).

Tablo 4.19. Grup 2 olgularda ER- β 'nin tümör ve metastatik lenf nodunda sitoplazmik ekspresyonu

Boyanma Durumu	LN-ER- β (-) (sitoplazmik)	LN- ER- β (+) (sitoplazmik)	TOPLAM
Tm-ER- β (sitoplazmik) (-)	15	5	20
Tm-ER- β (sitoplazmik) (+)	20	10	30
TOPLAM	35	15	50

ER- α (+), PR (+) Olgularda ER- β 'nin Nükleer ve Sitoplazmik Ekspresyonu

Tüm olgular arasında ER- α pozitif, PR pozitif 55 olgu vardı. Bu olguların % 69.1'nde (38/55) ER- β nükleer pozitiflik göstermekte olup, % 30.9'u (17/55) negatiftir. Bu grubun % 45.5'inde (25/55) ER- β sitoplazmik ekspresyonu izlenirken, % 54.5'inde (30/55) sitoplazmik negatiftir (Tablo 4.20-21).

Grup 1'de ER- α pozitif, PR negatif 28 olgu mevcut olup; olguların % 67.9'unda (19/28) ER- β 'nin nükleer ekspresyonu izlenmiştir. Grup 1'deki olguların % 32.1'inde (9/28) ER- β 'nin sitoplazmik ekspresyonu izlenmiştir. Olguların % 67.9'u (19/28) negatiftir (Tablo 4.22-23).

Grup 2'de ER- α pozitif, PR negatif 27 olgu mevcut olup; olguların % 70.4'ü (19/27) ER- β ile nükleer pozitif olup, % 29.6'sı (8/27) negatiftir. Yine bu grubun % 59.3'ünde (16/27) ER- β sitoplazmik pozitif olup, % 40.7'si (11/27) negatiftir (Tablo 4.24-25).

ER- α (+), PR (-) Olgularda ER- β 'nin Nükleer ve Sitoplazmik Ekspresyonu

Tüm olgular arasında ER- α pozitif, PR negatif 19 olgu vardı. Bu olguların % 78.9'unda (15/19) ER- β nükleer pozitiflik göstermekte olup, % 21.1'inde (4/19)

negatiftir. Bu grubun % 47.4'ünde (9/19) ER- β sitoplazmik ekspresyonu izlenirken, % 52.6'sında (10/19) sitoplazmik negatiftir (Tablo 4.20-21).

Grup 1'de ER- α pozitif, PR negatif 10 olgu mevcut olup; olguların % 80'inde (8/10) ER- β 'nın nükleer ekspresyonu izlenmiştir. Olguların % 20'si (2/10) negatiftir. Yine bu olguların % 30'unda (3/10) ER- β sitoplazmik ekspresyonu izlenirken, % 70'i (7/10) negatiftir (Tablo 4.22-23).

Grup 2'de ER- α pozitif, PR negatif 9 olgu mevcut olup; bunların % 77.8'i (7/9) nükleer pozitif, % 22.2'si (2/9) negatiftir. Bu olguların % 66.7'si (6/9) sitoplazmik pozitif olup, % 33.3'ü (3/9) negatiftir (Tablo 4.24-25).

ER- α (-), PR (-) Olgularda ER- β 'nın Nükleer ve Sitoplazmik Ekspresyonu

Tüm olgular arasında ER- α negatif, PR negatif 21 olgu vardı. Bu olguların % 57.1'inde (12/21) ER- β nükleer pozitiflik göstermekte olup, % 42.9'unda (9/21) negatiftir. Bu grubun % 47.6'sında (10/21) ER- β sitoplazmik ekspresyonu izlenirken, % 52.4'ünde (11/21) sitoplazmik negatiftir. (Tablo 4.20-21).

Grup 1'de ER- α negatif, PR negatif 10 olgu mevcut olup; olguların % 50'sinde (5/10) ER- β 'nın nükleer ekspresyonu izlenmiştir. Olguların % 50'si (5/10) negatiftir. Yine bu grupta olguların % 40'ında (4/10) ER- β 'nın sitoplazmik ekspresyonu izlenirken, % 60'ı (6/10) negatiftir. (Tablo 4.22-23)

Grup 2'de ER- α negatif, PR negatif 11 olgu olup, bunların % 63.6'sı (7/11) nükleer pozitifdir. Olguların % 36.4 (4/11)'ü ise negatiftir. Bu olguların % 54.5'i (6/11) sitoplazmik pozitif olup, % 45.5'i (5/11) negatiftir (Tablo 4.24-25).

ER- α (-), PR (+) Olgularda ER- β 'nın Nükleer ve Sitoplazmik Ekspresyonu

Bu hormon profili ile uyumlu hasta yoktu.

Yukarda bildirilen hormonal durumların tüm olgularda ER- β 'nın nükleer ve sitoplazmik ekspresyonu ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir uyum görülmemiştir (sırasıyla p=0.329 ve 0.981).

Grup 1'deki olguların hormonal durumu ile ER- β 'nin nükleer ve sitoplazmik ekspresyonu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir uyum izlenmedi (sırasıyla $p=0.356$ ve 0.875).

Grup 2'deki olguların hormonal durumu ile ER- β 'nin nükleer ve sitoplazmik ekspresyonu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir uyum izlenmedi (sırasıyla $p=0.789$ ve 0.859).

Tablo 4.20. Tüm olgularda hormonal duruma göre ER- β nükleer ekspresyonu

Boyanma durumu	ER- β (-), nükleer	ER- β (+), nükleer	TOPLAM
ER- α (+), PR (+)	17	38	55
ER- α (+), PR (-)	4	15	19
ER- α (-), PR (-)	9	12	21
TOPLAM	30	65	95

Tablo 4.21. Tüm olgulardaki hormonal duruma göre ER- β sitoplazmik ekspresyonu

Boyanma durumu	ER- β (-), sitoplazmik	ER- β (+), sitoplazmik	TOPLAM
ER- α (+), PR (+)	30	25	55
ER- α (+), PR (-)	10	9	19
ER- α (-), PR (-)	11	10	21
TOPLAM	51	44	95

Grup 1 ve grup 2'deki olguların nükleer ER- β ekspresyonlarının hormonal durumlarına göre vaka dağılımlarına bakıldığında iki grup arasında belirgin farklılık görülmemiştir (Tablo 4.24 ve 4.26).

Tablo 4.22. Grup 1 olgularda ER- β nükleer ekspresyonunun hormonal duruma göre dağılımı

Boyanma durumu	ER- β (-), nükleer	ER- β (+), nükleer	TOPLAM
ER- α (+), PR (+)	9	19	28
ER- α (+), PR (-)	2	8	10
ER- α (-), PR (-)	5	5	10
TOPLAM	16	32	48

Grup 1 ve grup 2'deki olguların sitoplazmik ER- β ekspresyonlarının hormonal durumlarına göre vaka dağılımlarına bakıldığında iki grup arasında belirgin farklılık görülmemiştir (Tablo 4.25 ve tablo 4.27).

Tablo 4.23. Grup 1 olgularda ER- β sitoplazmik ekspresyonunun hormonal duruma göre dağılımı

Boyanma durumu	ER- β (-), sitoplazmik	ER- β (+), sitoplazmik	TOPLAM
ER- α (+), PR (+)	19	9	28
ER- α (+), PR (-)	7	3	10
ER- α (-), PR (-)	6	4	10
TOPLAM	32	16	48

Tablo 4.24. Grup 2 olgularda ER- β nükleer ekspresyonunun hormonal duruma göre vaka dağılımı

Boyanma durumu	ER- β (-), nükleer	ER- β (+), nükleer	TOPLAM
ER- α (+), PR (+)	8	19	27
ER- α (+), PR (-)	2	7	9
ER- α (-), PR (-)	4	7	11
TOPLAM	14	33	47

Tablo 4.25. Grup 2 olgulardaki ER- β sitoplazmik ekspresyonunun hormonal duruma göre vaka dağılımı

Boyama Durumu	ER- β (-), sitoplazmik	ER- β (+), sitoplazmik	TOPLAM
ER- α (+), PR (+)	11	16	27
ER- α (+), PR (-)	3	6	9
ER- α (-), PR (-)	5	6	11
TOPLAM	19	28	47

ER- β 'nin Nükleer Ekspresyonu ve Tümör Boyutu

Tüm olgularda tümör boyutu ≤ 2 cm olan 49 olgu, > 2 cm olan 48 olgu mevcuttur. Tümör boyutu ≤ 2 cm olan 49 olgunun 35'inde, tümör boyut > 2 cm olan 48 olgunun da 31'inde ER- β nükleer pozitifdir (Tablo 4.26). Tümör boyutu ile ER- β ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p=0.657$).

Tablo 4.26. Tüm olgularda ER- β nükleer ekspresyonunun tümör boyutuna göre dağılımı

	ER- β (nükleer)(-)	ER- β (nükleer)(+)	TOPLAM
Tümör boyutu ≤ 2 cm	14	35	49
Tümör boyutu > 2 cm	17	31	48
TOPLAM	31	66	97

4.2.2. Twist-1-Ekspresyonu

Normal Meme Dokusunda Twist-1'in Nükleer Ekspresyonu

Tüm olgularda tümör komşuluğundaki normal meme duktus epitel hücrelerinde Twist-1 ekspresyonu değerlendirilmiş olup 88 olgunun % 93.1'inde (82/88) normal meme dokusunda nükleer Twist-1 ekspresyonu izlenmiştir.

Grup 1 olguların ise % 95'inde (42/44) nükleer Twist-1 ekspresyonu izlenmiştir.

Grup 2 olguların ise % 80'inde (40/42) nükleer Twist-1 ekspresyonu izlenmiştir.

Twist-1'in Primer Odakta Nükleer Ekspresyonu

Twist-1 tüm olguların % 15.4'ünde (15/97) orta-kuvvetli, % 64.9'unda (63/97) zayıf pozitif olup, % 19.5'inde (19/97) negatiftir (Tablo 4.27).

Tablo 4.27. Tüm olgularda Twist-1'in nükleer ekspresyonunun boyanma şiddetine göre dağılımı

Ekspresyon	LN(-)	LN(+)	TOPLAM
	Grup 1	Grup 2	
Negatif	9	10	19
Zayıf (+)	27	36	63
Orta-kuvvetli (+)	11	4	15
TOPLAM	47	50	97

Twist-1 ile değişik derecelerde izlenen nükleer pozitiflik, tümöral dokunun % 10'undan daha azında izlendiğinden bu olgular negatif olarak değerlendirilmiştir.

Tüm olgularda izlenen Twist-1 nükleer ekspresyonu ile tümör grade'i, tümör lokalizasyonu ve lenf nodu durumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p değerleri sırasıyla 0.229, 0.015 ve 0.105) (Tablo 4.28-29).

Tablo 4.28. Tüm olgularda tümör grade'ine göre Twist-1'in nükleer ekspresyonunun dağılımı

Ekspresyon	Tümör Derecelendirmesi			
	Grade 1	Grade 2	Grade 3	TOPLAM
Negatif	2	11	6	19
Zayıf (+)	15	32	16	63
Orta-kuvvetli (+)	6	8	1	15
TOPLAM	23	51	23	97

Tablo 4.29. Tüm olgularda tümör lokalizasyonuna göre Twist-1'in nükleer ekspresyon dağılımı

Ekspresyon	Lokalizasyon		
	Sağ meme	Sol meme	TOPLAM
Negatif	4	15	19
Zayıf (+)	37	26	63
Orta-kuvvetli (+)	7	8	15
TOPLAM	48	49	97

Grup 1'de Twist-1 nükleer ekspresyon düzeyi ile tümör grade'i ve lokalizasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p değerleri sırasıyla 0.747, 0.301) (Tablo 4.30-31).

Tablo 4.30. Grup 1 olgularda tümör grade'ine göre Twist-1'in nükleer ekspresyonu

Ekspresyon	Tümör Derecelendirmesi			
	Grade 1	Grade 2	Grade 3	TOPLAM
Negatif	1	6	2	9
Zayıf (+)	7	17	4	28
Orta-kuvvetli(+)	4	6	1	11
TOPLAM	12	29	7	48

Tablo 4.31. Grup 1 olgularda tümör lokalizasyonuna göre Twist-1'in nükleer ekspresyonu

Ekspresyon	Lokalizasyon		
	Sağ meme	Sol meme	TOPLAM
Negatif	2	7	9
Zayıf (+)	13	14	27
Orta-kuvvetli (+)	6	5	11
TOPLAM	21	26	47

Grup 2’de Twist-1 nükleer ekspresyon düzeyi ile tümör grade’ i arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmazken, tümör lokalizasyonu ile anlamlı bir ilişki bulunmuştur (p değerleri sırasıyla 0.456, 0.016) (Tablo 4.32-33). Grup 2’deki olguların 36’sı zayıf pozitif, 4’ü orta-kuvvetli derece pozitif iken, 10’u negatiftir.

Tablo 4.32. Grup 2 olgularda tümör grade’ine göre Twist-1’in nükleer ekspresyonu

Ekspresyon	Tümör Derecelendirmesi			
	Grade 1	Grade 2	Grade 3	TOPLAM
Negatif	1	5	4	10
Zayıf (+)	8	16	12	36
Orta-kuvvetli (+)	2	2	0	4
TOPLAM	11	23	16	50

Tablo 4.33. Grup 2 olgularda tümör lokalizasyonuna göre Twist-1’in nükleer ekspresyonu

Ekspresyon	Lokalizasyon		
	Sağ meme	Sol meme	TOPLAM
Negatif	2	8	10
Zayıf (+)	24	12	36
Orta-kuvvetli (+)	1	3	4
TOPLAM	27	23	50

Şiddetine bakmaksızın Twist-1 ile pozitif boyanan 40 olgunun, 25'i sağ meme, 15'i ise sol meme yerleşimlidir. Grup 2'deki olgularda, sağ memedeki tümör odaklarında Twist-1 ekspresyonu (% 62.5) daha sık görülmüştür.

Twist-1'in Primer Odakta Sitoplazmik Ekspresyonu

Twist-1 olguların % 5.2'sinde (5/96) orta-kuvvetli derecede pozitif, % 81.3'ünde (78/96) zayıf pozitif iken, % 13.5'inde (13/96) negatiftir (Tablo 4.34).

Tablo 4.34. Tüm olgularda Twist-1'in sitoplazmik ekspresyonunun boyanma şiddetine göre dağılımı

Ekspresyon	LN(-) Grup 1	LN(+) Grup 2	TOPLAM
Negatif	8	5	13
Zayıf (+)	35	43	78
Orta-kuvvetli (+)	3	2	5
TOPLAM	46	50	96

Tüm olgularda Twist-1'in ekspresyonu ile tümör lokalizasyonu, tümör grade'i ve lenf nodu durumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p değerleri sırasıyla 0.127, 0.461, 0.461) (Tablo 4.34-6).

Tablo 4.35. Tüm olgularda tümör grade'ine göre Twist-1'in sitoplazmik ekspresyonu

Ekspresyon	Tümör Derecelendirmesi			
	Grade 1	Grade 2	Grade 3	TOPLAM
Negatif	2	11	6	19
Zayıf (+)	15	32	16	63
Orta-kuvvetli (+)	6	8	1	15
TOPLAM	23	51	23	97

Tablo 4.36. Tüm olgularda tümör lokalizasyonuna göre Twist-1'in sitoplazmik ekspresyonu

Ekspresyon	Lokalizasyon		
	Sağ meme	Sol meme	TOPLAM
Negatif	3	10	13
Zayıf (+)	41	37	78
Orta-kuvvetli (+)	3	2	5
TOPLAM	47	49	96

Grup 1 ve 2'deki olgular arasında Twist-1 sitoplazmik ekspresyonları açısından istatistiksel anlamlı fark olmayıp, tümör grade'i ve tümör lokalizasyonu ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p

değerleri sırasıyla grup 1 için, 0.087, 0.399, grup 2 için 0.049, 0.268) (Tablo 4.37-40).

Tablo 4.37. Grup 1 olgularda tümör grade'ine göre Twist-1'in sitoplazmik ekspresyonu

Ekspresyon	Tümör Derecelendirmesi			
	Grade 1	Grade 2	Grade 3	TOPLAM
Negatif	2	4	2	8
Zayıf (+)	10	23	3	36
Orta-kuvvetli (+)	0	1	2	3
TOPLAM	12	28	7	47

Tablo 4.38. Grup 1 olgularda tümör lokalizasyonuna göre Twist-1'in sitoplazmik ekspresyonu

Ekspresyon	Lokalizasyon		
	Sağ meme	Sol meme	TOPLAM
Negatif	2	6	8
Zayıf (+)	16	19	35
Orta-kuvvetli(+)	2	1	3
TOPLAM	20	26	46

Tablo 4.39. Grup 2 olgularda tümör grade'ine göre Twist-1'in sitoplazmik ekspresyonu

Ekspresyon	Tümör Derecelendirmesi			
	Grade 1	Grade 2	Grade 3	TOPLAM
Negatif	2	1	2	5
Zayıf (+)	7	22	14	43
Orta-kuvvetli(+)	2	0	0	2
TOPLAM	11	23	16	50

Tablo 4.40. Grup 2 olgularda tümör lokalizasyonuna göre Twist-1'in sitoplazmik ekspresyonu

Ekspresyon	Lokalizasyon		
	Sağ meme	Sol meme	TOPLAM
Negatif	1	4	5
Zayıf (+)	25	18	43
Orta-kuvvetli(+)	1	1	2
TOPLAM	27	23	50

Twist-1'in Metastatik Lenf Nodunda Nükleer ve Sitoplazmik Ekspresyonu

Grup 2'deki 50 olgunun metastatik lenf nodlarına uygulanan Twist-1 ile olguların % 46.9'unda (23/49) zayıf nükleer pozitiflik izlenmiş olup, % 53.1'i (26/49) negatiftir. Twist-1 ile orta-kuvvetli pozitif nükleer boyanma izlenmemiştir. Twist-1'in sitoplazmik ekspresyonu olguların % 6.1'inde (3/49) orta-kuvvetli pozitif, % 89.8'inde (44/49) zayıf pozitif olup, % 4.1'inde (2/49) negatiftir (Tablo 4.41).

Tablo 4.41. Metastatik lenf nodunda Twist-1'in nükleer ve sitoplazmik ekspresyonlarının boyanma şiddetine göre dağılımı

Ekspresyon	Twist-1 nükleer eks.	Twist-1 sitoplazmik eks.
Negatif	26	2
Zayıf (+)	23	44
Orta-kuvvetli (+)	0	3

Grup 2'deki olgularda, Twist-1'in metastatik lenf nodundaki ve primer tümördeki nükleer ekspresyonları karşılaştırıldığında Twist-1, 7 olguda (% 14.3) hem primer tümörde hem de metastatik lenf nodunda negatif, 20 olguda (% 40.8) hem primer tümör hem de metastatik lenf nodunda pozitifdir. Olgulardan 3'ünde (% 6.1) ER- β primer tümörde negatif, metastatik lenf nodunda pozitif iken 19'unda (% 38.8) primer tümörde pozitif, metastatik lenf nodunda negatiftir (Tablo 4.42). Yapılan istatistiksel incelemede uyum saptanmamıştır (p=0.229).

Tablo 4.42. Grup 2 olgularda Twist-1'in tümör ve metastatik lenf nodunda nükleer ekspresyonu

Boyanma durumu	LN-Twist-1 (-) (nükleer)	LN- Twist-1 (+) (nükleer)	TOPLAM
Tm-Twist-1 (nükleer) (-)	7	3	10
Tm-Twist-1 (nükleer)(+)	19	20	39
TOPLAM	26	23	49

Grup 2'deki olgularda, Twist-1'in metastatik lenf nodundaki ve primer tümördeki sitoplazmik ekspresyonları karşılaştırıldığında, Twist-1 bir olguda (% 2) hem primer tümörde hem de metastatik lenf nodunda negatif, 44 olguda (% 88) hem primer tümör hem de metastatik lenf nodunda pozitifdir. Olgulardan 4'ünde (% 8) Twist-1 primer tümörde negatif, metastatik lenf nodunda pozitif iken 1 olguda (% 2) primer tümörde pozitif, metastatik lenf nodunda negatiftir (Tablo 4.43). Yapılan istatistiksel incelemede uyum saptanmamıştır ($p=0.054$).

Tablo 4.43. Grup 2 olgularda Twist-1'in tümör ve metastatik lenf nodunda sitoplazmik ekspresyonu

Boyanma durumu	LN-Twist-1 (-) (sitoplazmik)	LN-Twist-1 (+) (sitoplazmik)	TOPLAM
Tm-Twist-1 (sitoplazmik) (-)	1	4	5
Tm-Twist-1 (sitoplazmik) (+)	1	44	45
TOPLAM	2	48	50

Primer Odakta Twist-1 ve ER- α Ekspresyonları

Tüm olguların ER- α ile % 76'sı (73/96) pozitif, % 23.9'u (23/96) negatiftir. Pozitif olguların % 83.6'sında (61/73) Twist-1 ile nükleer ekspresyon izlenmiş olup, % 16.4'ünde (12/73) Twist-1 negatiftir. Östrojen reseptör- α negatif olguların % 69.6'sında (16/23) Twist-1 ile nükleer ekspresyon izlenmiştir. Olguların % 3.4'ünde (7/23) her iki belirleyici de negatiftir (Tablo 4.46). Tüm olgularda primer tümörde Twist-1'in nükleer ekspresyonu ile ER- α arasında istatistiksel olarak anlamlı bir uyum bulunmamıştır (p=0.142) (Tablo 4.44).

Tablo 4.44. Tüm olgularda ER- α ile nükleer Twist-1 ekspresyonları

Boyama Durumu	Twist-1 (-), nükleer	Twist-1 (+), nükleer	TOPLAM
ER- α (-)	7	16	23
ER- α (+)	12	61	73
TOPLAM	19	77	96

Tüm olgularda sitoplazmik Twist-1 ekspresyonu ile ER- α ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir uyum bulunmamıştır (p=0.918) (Tablo 4.45).

Tablo 4.45. Tüm olgularda ER- α ile Twist-1'in sitoplazmik ekspresyonu

Boyama durumu	Twist-1 (-), sitoplazmik	Twist-1 (+), sitoplazmik	TOPLAM
ER- α (-)	3	20	23
ER- α (+)	10	62	72
TOPLAM	13	82	95

Primer Odakta Twist-1 ve PR Ekspresyonları

Tüm olguların PR ile % 57.4'ü (54/94) pozitif, % 42.5'i (40/94) negatiftir. Pozitif olguların % 87'sinde (47/54) Twist-1 ile nükleer ekspresyon izlenmiş olup, % 13'ünde (7/54) Twist-1 negatiftir. Progesteron negatif olguların % 70'inde (28/40) Twist-1 ile nükleer ekspresyon izlenmiştir. Olguların % 30'unda (12/40) her iki belirleyici de negatiftir (Tablo 4.46). Primer tümörde Twist-1'in nükleer ekspresyonu ile PR arasında istatistiksel olarak anlamlı bir uyum bulunmamıştır (p=0.067).

Tablo 4.46. Tüm olgularda PR ile nükleer Twist-1 ekspresyonu

	Twist-1 (-), nükleer	Twist-1 (+), nükleer	TOPLAM
PR (-)	12	28	40
PR (+)	7	47	54
TOPLAM	19	75	94

Tüm olgularda sitoplazmik Twist-1 ekspresyonu ile PR istatistiksel olarak anlamlı bir uyum bulunmamıştır (p=0.6) (Tablo 4.47).

Tablo 4.47. Tüm olgularda PR ile sitoplazmik Twist-1 ekspresyonu

Boyanma durumu	Twist-1 (-), sitoplazmik	Twist-1 (+), sitoplazmik	TOPLAM
PR (-)	6	34	40
PR (+)	6	47	53
TOPLAM	12	81	93

ER- α (+), PR (+) Olgularda Twist-1'in Nükleer ve Sitoplazmik Ekspresyonu

Grup 1 ve 2' de ER- α pozitif, PR pozitif 54 olgu vardı. Bu olguların % 82.4'ü (47/54) Twist-1 ile nükleer pozitiflik göstermektedir. Bu grubun % 88.6'sında (47/53) Twist-1 sitoplazmik ekspresyonu izlenmiştir (Tablo 4.50-51).

Grup 1'de ER- α pozitif, PR pozitif 27 olgu mevcut olup; olguların % 88.8'inde (24/27) Twist-1'in nükleer ekspresyonu izlenmiştir. Grup 1'deki olguların % 92.3'ünde (24/26) Twist-1'in sitoplazmik ekspresyonu izlenmiştir.

Grup 2'de ER- α pozitif, PR pozitif 27 olgu mevcut olup; olguların % 85.2'si (23/27) Twist-1 ile nükleer pozitifdir. Yine bu grubun % 85.2'sinde (23/27) ER- β sitoplazmik pozitifdir.

ER- α (+), PR (-) Olgularda Twist-1'in Nükleer ve Sitoplazmik Ekspresyonu

Grup 1 ve 2'de ER- α pozitif, PR negatif 19 olgu vardı. Bu olguların % 73.7'si (14/19) Twist-1 ile nükleer pozitiflik göstermekteydi. Bu grubun % 78.9'unda (15/19) Twist-1 ile sitoplazmik ekspresyon mevcuttu (Tablo 4.50 - 4.51).

Grup 1'de ER- α pozitif, PR negatif 10 olgu mevcut olup; olguların % 80'inde (8/10) Twist-1 ile nükleer ekspresyon izlenmiştir. Yine bu olguların % 60'ında (6/10) Twist-1'in sitoplazmik ekspresyon mevcuttu (Tablo 4.52 - 4.53).

Grup 2'de ER- α pozitif, PR negatif 9 olgu mevcut olup; bunların % 66.7'si (6/9) nükleer pozitifdir. Bu olguların % 100'ü (9/9) sitoplazmik pozitifdir (Tablo 4.54 - 4.55).

ER- α (-), PR (-) Olgularda Twist-1'in Nükleer ve Sitoplazmik Ekspresyonu

Grup 1 ve 2'de ER- α negatif, PR negatif 21 olgu vardı. Bu olguların % 66.7'sinde (12/21) Twist-1 nükleer pozitiflik göstermektedir. Bu grubun % 90.5'i (19/21) Twist-1 ile sitoplazmik ekspresyon göstermektedir (Tablo 4.48-49).

Tablo 4.48. Tüm olgulardaki Twist-1'in nükleer ekspresyonunun hormonal duruma göre dağılımı

Boyanma durumu	Twist-1 (-), nükleer	Twist-1 (+), nükleer	TOPLAM
ER- α (+), PR (+)	7	47	54
ER- α (+), PR (-)	5	14	19
ER- α (-), PR (-)	7	14	21
TOPLAM	19	75	94

Tablo 4.49. Tüm olgulardaki Twist-1'in sitoplazmik ekspresyonunun hormonal duruma göre dağılımı

Boyanma durumu	Twist-1 (-), sitoplazmik	Twist-1 (+), sitoplazmik	TOPLAM
ER- α (+), PR (+)	6	47	53
ER- α (+), PR (-)	4	15	19
ER- α (-), PR (-)	2	19	21
TOPLAM	12	81	93

Grup 1'de ER- α negatif, PR negatif 10 olgu mevcut olup; olguların % 60'ında (6/10) Twist-1'in nükleer ekspresyonu izlenmiştir. Yine bu grupta olguların % 80'inde (8/10) Twist-1 sitoplazmik ekspresyonu izlendi (Tablo 4.50-51).

Tablo 4.50. Grup 1 olgulardaki Twist-1'in nükleer ekspresyonunun hormonal duruma göre dağılımı

Boyanma durumu	Twist-1 (-),nükleer	Twist-1 (+), nükleer	TOPLAM
ER- α (+), PR (+)	3	24	27
ER- α (+), PR (-)	2	8	10
ER- α (-), PR (-)	4	6	10
TOPLAM	9	38	47

Tablo 4.51. Grup 1 olguların Twist-1'in sitoplazmik ekspresyonunun hormonal duruma göre dağılımı

Boyanma durumu	Twist-1 (-), sitoplazmik	Twist-1 (+), sitoplazmik	TOPLAM
ER- α (+), PR (+)	2	24	26
ER- α (+), PR (-)	4	6	10
ER- α (-), PR (-)	2	8	10
TOPLAM	8	38	46

Grup 2’de ER- α negatif, PR negatif 11 olgu olup, bunların % 72.7’si (8/11) nükleer pozitifdir. Bu olguların % 100’ü (11/11) sitoplazmik pozitifdir (Tablo 4.52-53).

Tablo 4.52. Grup 2 olgulardaki Twist-1 nükleer ekspresyonunun hormonal duruma göre dağılımı

Boyanma durumu	Twist-1 (-), nükleer	Twist-1 (+), nükleer	TOPLAM
ER- α (+), PR (+)	4	23	27
ER- α (+), PR (-)	3	6	9
ER- α (-), PR (-)	3	8	11
TOPLAM	10	37	47

Tablo 4.53. Grup 2 olgulardaki Twist-1 sitoplazmik ekspresyonunun hormonal duruma göre dağılımı

Boyanma durumu	Twist-1 (-), sitoplazmik	Twist-1 (+), sitoplazmik	TOPLAM
ER- α (+), PR (+)	4	23	27
ER- α (+), PR (-)	0	9	9
ER- α (-), PR (-)	0	11	11
TOPLAM	4	43	47

ER- α (-), PR (+) Olgularda Twist-1'in Nükleer ve Sitoplazmik Ekspresyonu

Grup 1 ve grup 2'deki olgularda bu hormon profili ile uyumlu hasta yok idi.

Grup 1 ve 2'deki olgulardaki hormonal durum ile Twist-1'in nükleer ve sitoplazmik ekspresyonu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir uyum bulunmamıştır (sırasıyla $p=0.109$ ve 0.483).

Grup 1'deki olguların hormonal durumu ile Twist-1'in nükleer ve sitoplazmik ekspresyonu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir uyum saptanmamıştır (sırasıyla $p=0.139$ ve 0.070).

Grup 2'deki olguların hormonal durumu ile Twist-1'in nükleer ve sitoplazmik ekspresyonu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir uyum bulunmamıştır (sırasıyla $p=0.429$ ve 0.198).

Tümör Boyutu ile Twist-1'in Nükleer Ekspresyonunun İlişkisi

Tüm olguların 46'sında tümör boyutu tümör boyutu ≤ 2 cm olup, 50'sinde > 2 cm'dir (Tablo 4.56). Tümör boyutu ≤ 2 cm olan olguların 37'sinde, > 2 cm olan olguların ise 40'ında Twist-1 pozitifdir. İstatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p=0.957$) (Tablo 4.54).

Tablo 4.54. Tüm olgularda Twist-1'in nükleer ekspresyonunun boyuta göre dağılımı

Boyanma durumu	Twist-1(-) nükleer	Twist-1 (+) nükleer	TOPLAM
Tümör boyutu ≤ 2 cm	9	37	46
Tümör boyutu > 2 cm	10	40	50
TOPLAM	19	77	96

4.2.3. Primer Odakta ER- β ve Twist-1'in Nükleer Ekspresyonları

Primer odakta tüm olguların % 55.2'sinde (53/96) her iki belirleyici nükleer pozitif iken, % 7.2'sinde (7/96) her iki belirleyici negatifti. Östrojen reseptör- β pozitif, Twist-1 negatif olgular ise % 12.5 (12/96) oranındaydı. Yapılan istatistiksel incelemede tüm olgularda ER- β ve Twist-1 nükleer ekspresyonları arasında uyum izlenmedi ($p=0.636$) (Tablo 4.55).

Tablo 4.55. Tüm olgularda ER- β ile Twist-1'in nükleer ekspresyonu

Boyanma durumu	Tümör, nükleer Twist-1 (-)	Tümör, nükleer Twist-1 (+)	TOPLAM
Tümör, nükleer ER- β (-)	7	24	31
Tümör, nükleer ER- β (+)	12	53	65
TOPLAM	19	77	96

Primer odakta grup 1 olguların % 54.3'ünde (25/46) her iki belirleyici nükleer pozitif iken, % 8.6'sında (4/46) her iki belirleyici negatifti. Östrojen reseptör- β pozitif, Twist-1 negatif olgular ise % 12.5 (5/46) oranındaydı. Yapılan istatistiksel incelemede grup 1 olgularda ER- β ve Twist-1 nükleer ekspresyonları arasında uyum izlenmedi ($p=0.497$) (Tablo 4.56).

Tablo 4.56. Grup 1 olgularda ER- β ile Twist-1'in nükleer ekspresyonları

Boyama durumu	Tümör, nükleer Twist-1 (-)	Tümör, nükleer Twist-1 (+)	TOPLAM
Tümör, nükleer ER- β (-)	4	12	16
Tümör, nükleer ER- β (+)	5	25	30
TOPLAM	9	37	46

Primer odakta grup 2 olguların % 56'sında (28/50) her iki belirleyici nükleer pozitif iken, % 6'sında (3/50) her iki belirleyici negatifti. Östrojen reseptör- β pozitif, Twist-1 negatif olgular ise % 14 (7/50) oranındaydı. Yapılan istatistiksel incelemede grup 2 olgularda ER- β ve Twist-1 nükleer ekspresyonları arasında uyum izlenmedi ($p=0.136$) (Tablo 4.57).

Tablo 4.57. Grup 2 olgularda ER- β ile Twist-1'in nükleer ekspresyonları

Boyama durumu	Tümör, nükleer Twist-1 (-)	Tümör, nükleer Twist-1 (+)	TOPLAM
Tümör, nükleer ER- β (-)	3	12	15
Tümör, nükleer ER- β (+)	7	28	35
TOPLAM	10	40	50

4.2.4. Primer Odakta ER- β ve Twist-1'in Sitoplazmik Ekspresyonları

Primer odakta tüm olguların % 45.2'sinde (43/95) her iki belirleyici sitoplazmik pozitif iken, % 10.5'i (10/96) her iki belirleyici negatifti. Östrojen

reseptör- β pozitif, Twist-1 negatif olgular ise % 13.6 (3/95) oranındaydı. Yapılan istatistiksel incelemede tüm olgularda ER- β ve Twist-1 sitoplazmik ekspresyonları arasında uyum izlenmedi ($p=0.066$) (Tablo 4.58).

Tablo 4.58. Tüm olgularda ER- β ile Twist-1'in sitoplazmik ekspresyonu

Boyanma durumu	Tümör, sitoplazmik Twist-1 (-)	Tümör, sitoplazmik Twist-1 (+)	TOPLAM
Tümör, sitoplazmik ER- β (-)	10	3	13
Tümör, sitoplazmik ER- β (+)	39	43	82
TOPLAM	49	46	95

Primer odakta grup 1 olgularda % 31.1'i (14/45) her iki belirleyici ile de sitoplazmik pozitif iken, % 15.5'i (7/45) her iki belirleyici ile de negatifti. Yapılan istatistiksel incelemede grup 1 olgularda ER- β ve Twist-1 sitoplazmik ekspresyonları arasında uyum izlenmedi ($p=0.078$) (Tablo 4.59).

Tablo 4.59. Grup 1 olgularda ER- β ile Twist-1'in sitoplazmik ekspresyonları

Boyanma durumu	Tümör, sitoplazmik Twist-1 (-)	Tümör, sitoplazmik Twist-1 (+)	TOPLAM
Tümör, sitoplazmik ER- β (-)	7	1	8
Tümör, sitoplazmik ER- β (+)	23	14	37
TOPLAM	30	15	45

Primer odakta grup 2 olguların % 56'sında (28/50) her iki belirleyici sitoplazmik pozitif iken, % 6'sında (3/50) her iki belirleyici negatifti. Yapılan istatistiksel incelemede tüm olgularda ER- β ve Twist-1 sitoplazmik ekspresyonları arasında uyum izlenmedi ($p=0.336$) (Tablo 4.60).

Tablo 4.60. Grup 2 olgularda ER- β ile Twist-1'in sitoplazmik ekspresyonları

Boyanma durumu	Tümör, sitoplazmik Twist-1 (-)	Tümör, sitoplazmik Twist-1 (+)	TOPLAM
Tümör, sitoplazmik ER- β (-)	3	2	5
Tümör, sitoplazmik ER- β (+)	17	28	45
TOPLAM	20	30	50

4.2.5. Metastatik Lenf Nodunda ER- β ve Twist-1'in Nükleer

Ekspresyonları

Metastatik lenf nodunda olguların % 26.5'inde (13/49) her iki belirleyici nükleer pozitifdir. Olguların % 36.7'sinde (18/49) her iki belirleyici negatiftir. Yapılan istatistiksel incelemede metastatik lenf nodunda ER- β ve Twist-1 nükleer ekspresyonları arasında uyum izlenmedi ($p=0.357$) (Tablo 4.61).

Tablo 4.61. Metastatik lenf nodunda ER- β ile Twist-1'in nükleer ekspresyonları

Boyanma durumu	LN, nükleer Twist-1 (-)	LN, nükleer Twist-1 (+)	TOPLAM
LN, nükleer ER- β (-)	18	13	31
LN, nükleer ER- β (+)	8	10	18
TOPLAM	26	23	49

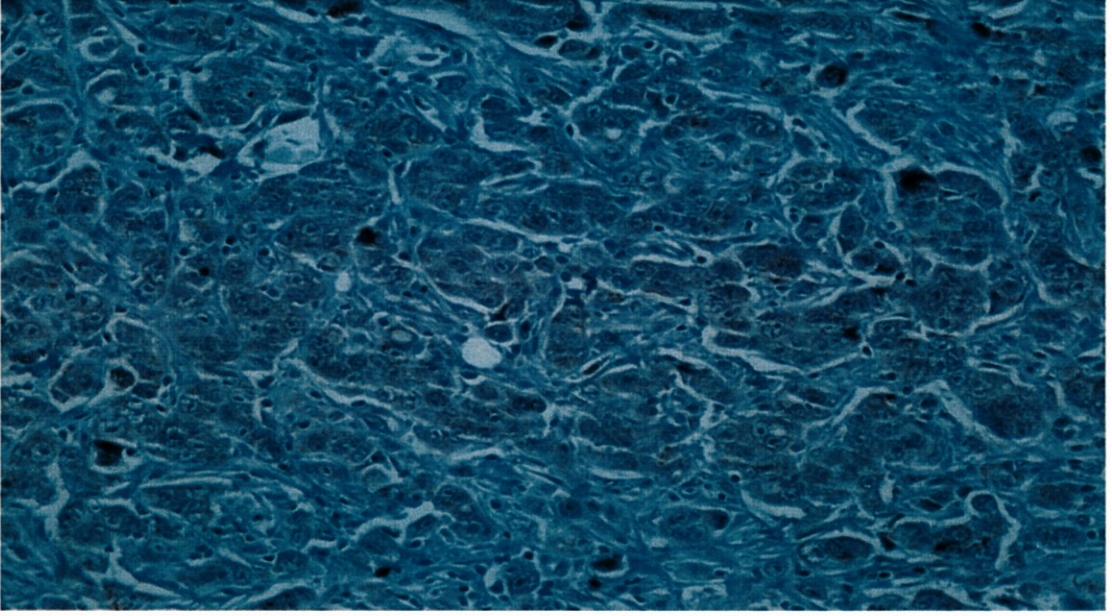
4.2.6. Metastatik Lenf Nodunda ER- β ve Twist-1'in Sitoplazmik

Ekspresyonlarının İlişkisi

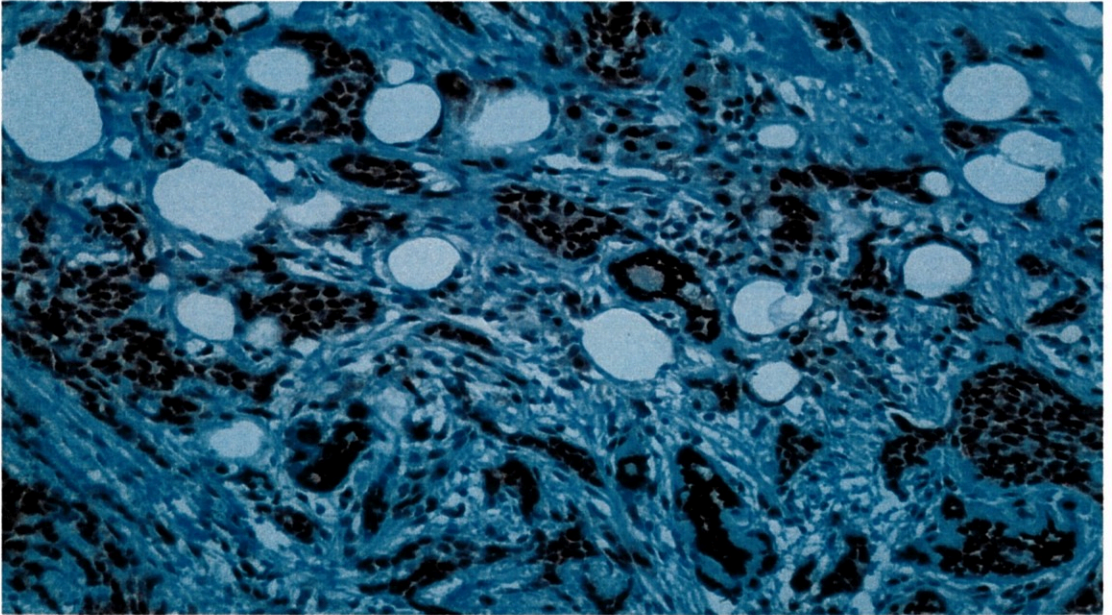
Metastatik lenf nodunda olguların % 26'sında (13/50) her iki belirleyici sitoplazmik pozitif iken, her iki belirleyicinin de negatif olduğu olgu yoktur. Yapılan istatistiksel incelemede metastatik lenf nodunda ER- β ve Twist-1 sitoplazmik ekspresyonları arasında uyum izlenmedi ($p=0.027$) (Tablo 4.62).

Tablo 4.62. Metastatik lenf nodunda ER- β ile Twist-1'in sitoplazmik ekspresyonları

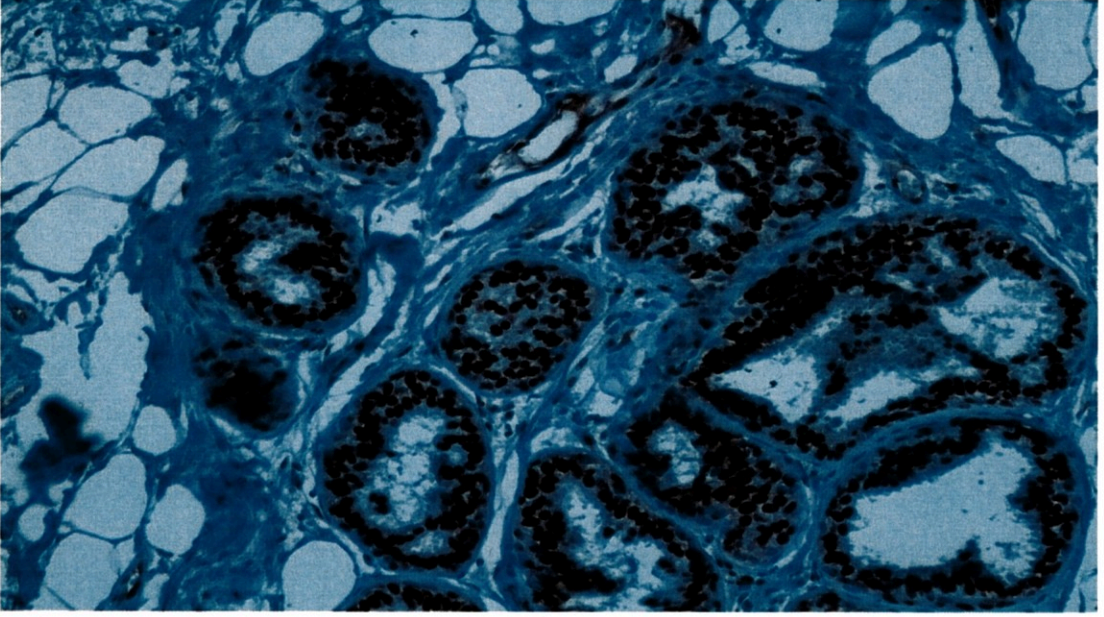
Boyanma durumu	LN, sitoplazmik Twist-1 (-)	LN, sitoplazmik Twist-1 (+)	TOPLAM
LN, sitoplazmik ER- β (-)	0	35	35
LN, sitoplazmik ER- β (+)	2	13	15
TOPLAM	2	48	50



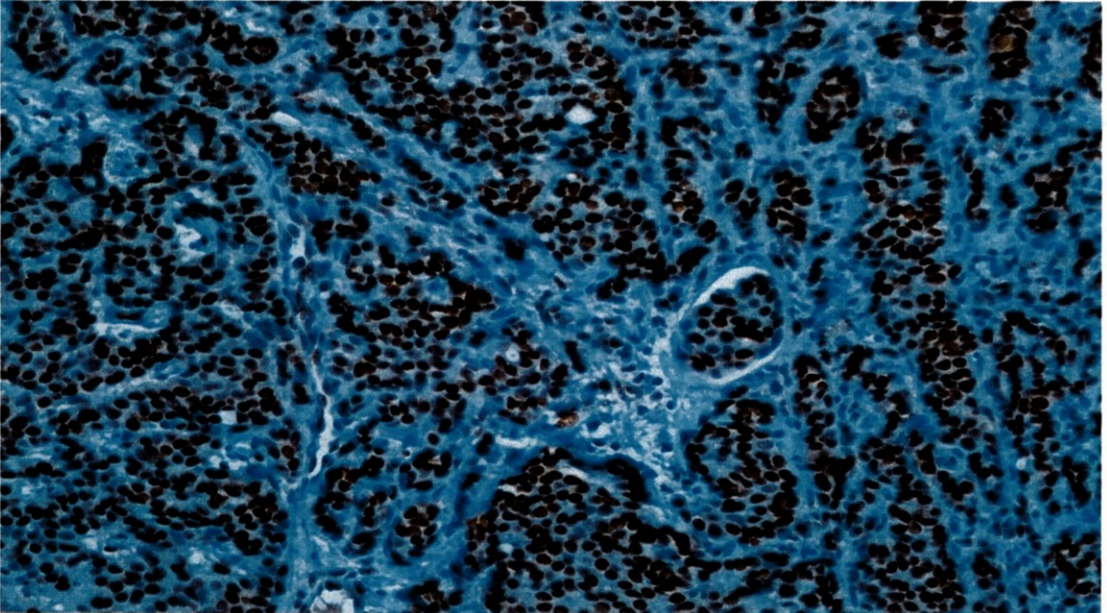
Şekil 4.4. Grup 1’de primer odakta, tümörde negatif nükleer ve zayıf şiddette sitoplazmik ER- β ekspresyonu (olgu 27, X200)



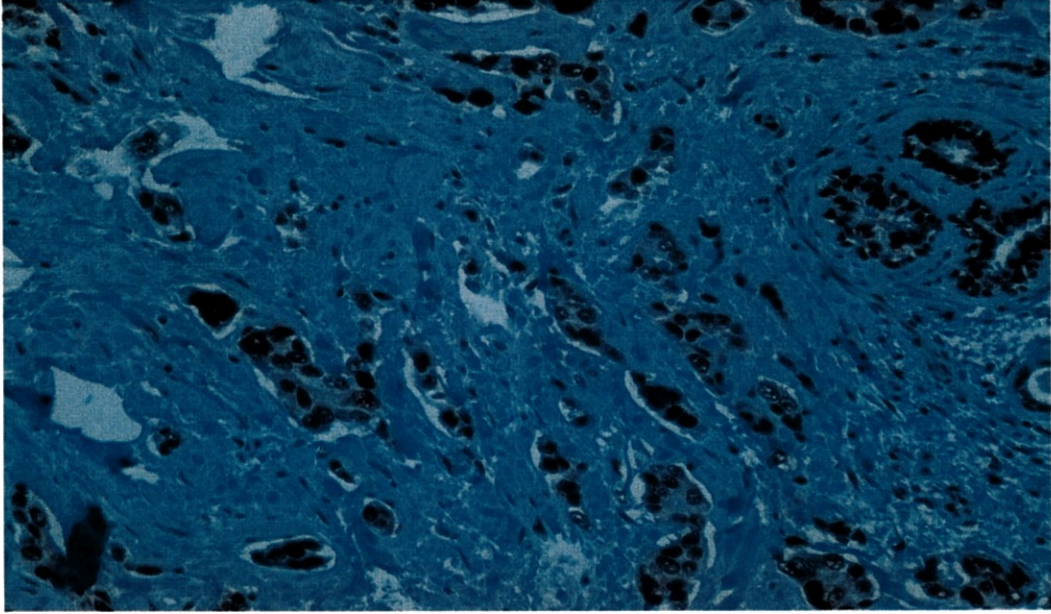
Şekil 4.5. Grup 1’de primer odakta tümörde ve endojen kontrolde orta şiddette nükleer ER- β ekspresyonu, tümörde ve endojen kontrolde negatif sitoplazmik ER- β ekspresyonu (olgu 16, X200)



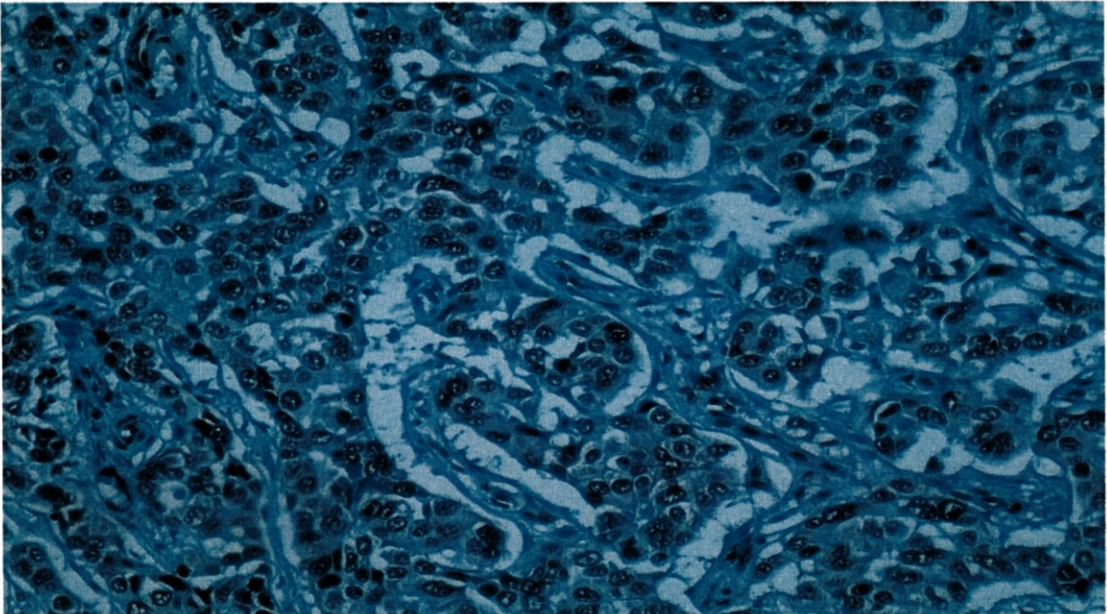
Şekil 4.6. Grup 1’de primer odaktaki hiperplastik meme glandlarını içeren endojen kontrolde kuvvetli şiddette nükleer ve negatif sitoplazmik ER-β ekspresyonu (olgu 35, X200)



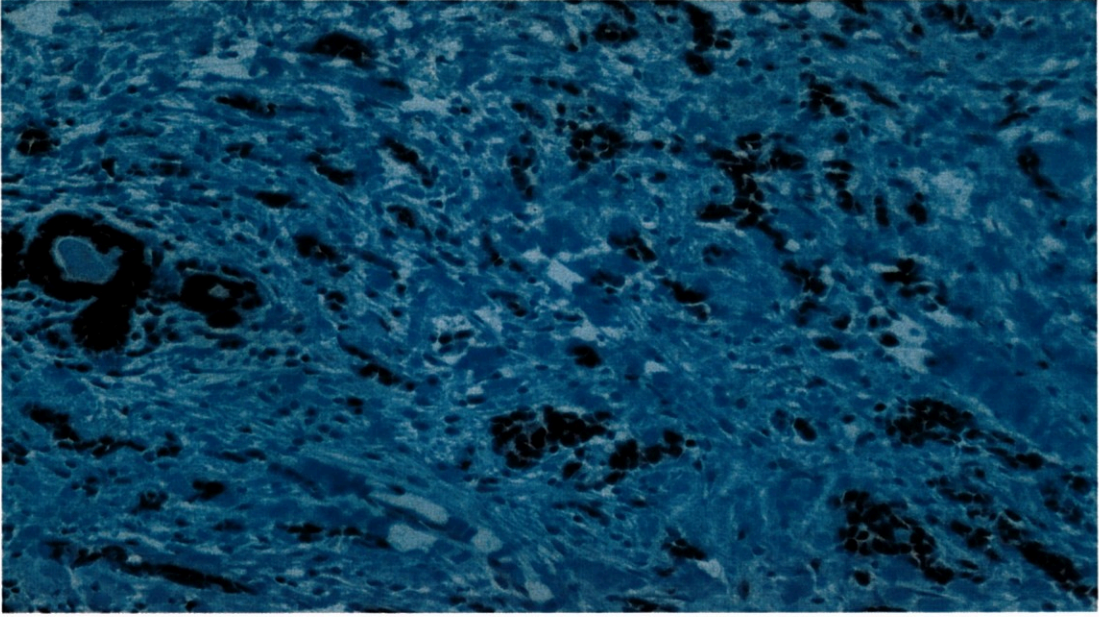
Şekil 4.7. Grup 1’de primer odaktaki tümörde kuvvetli şiddette nükleer ve negatif sitoplazmik ER-β ekspresyonu (olgu 35, X200)



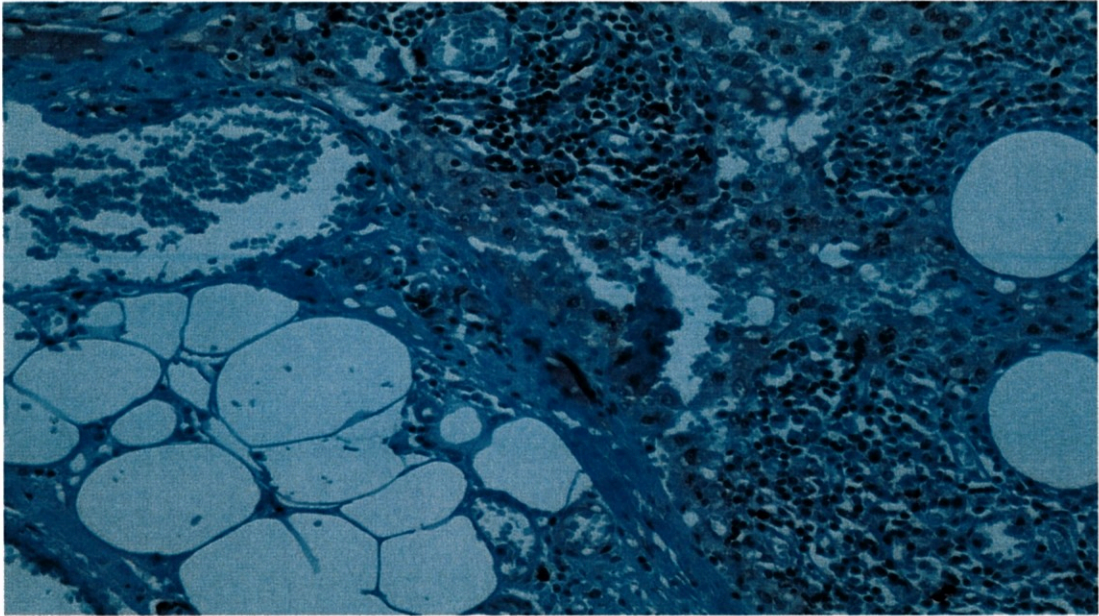
Şekil 4.8. Grup 2’de primer odakta tümörde zayıf, endojen kontrolde kuvvetli şiddette nükleer ER- β ekspresyonu, tümörde ve endojen kontrolde negatif sitoplazmik ER- β ekspresyonu (olgu 7, X200)



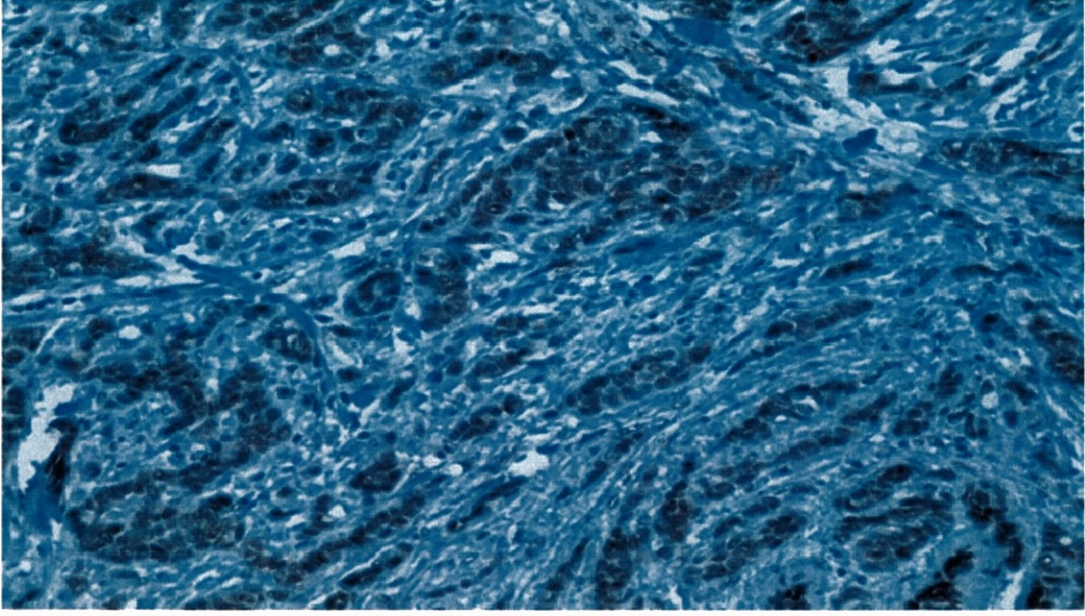
Şekil 4.9. Grup 2’de metastatik lenf nodundaki tümöral dokuda orta şiddette nükleer ve negatif sitoplazmik ER- β ekspresyonu (olgu 7, X200)



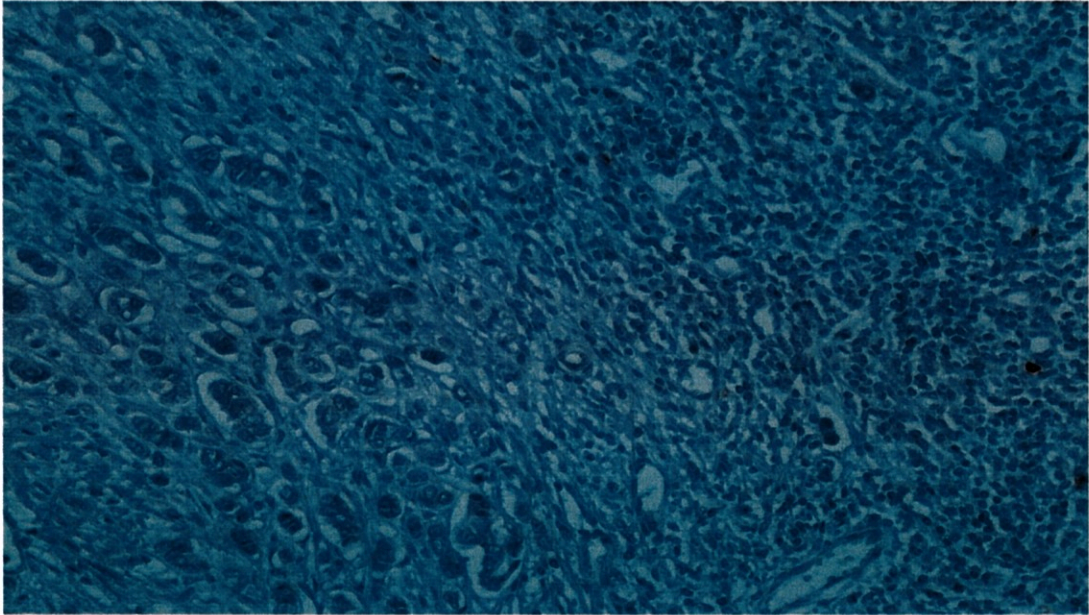
Şekil 4.10. Grup 2’de metastatik lenf nodundaki tümöral dokuda orta şiddette nükleer ve negatif sitoplazmik ER- β ekspresyonu (olgu 16, X200)



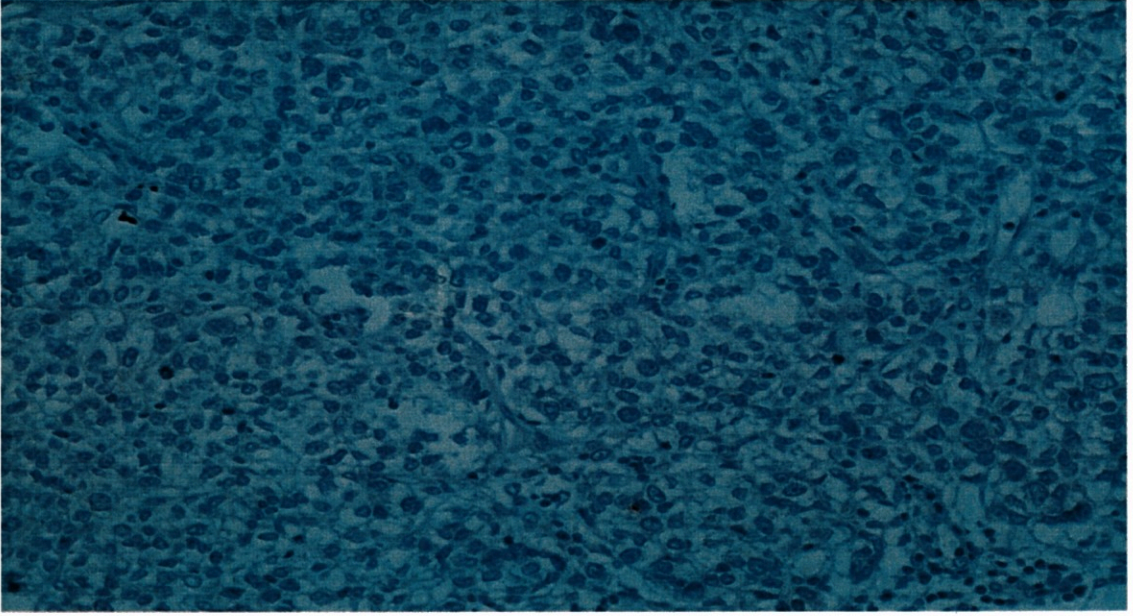
Şekil 4.11 Grup 2’de metastatik lenf nodundaki tümöral dokuda zayıf şiddette nükleer ve negatif sitoplazmik ER- β ekspresyonu (olgu 16, X200)



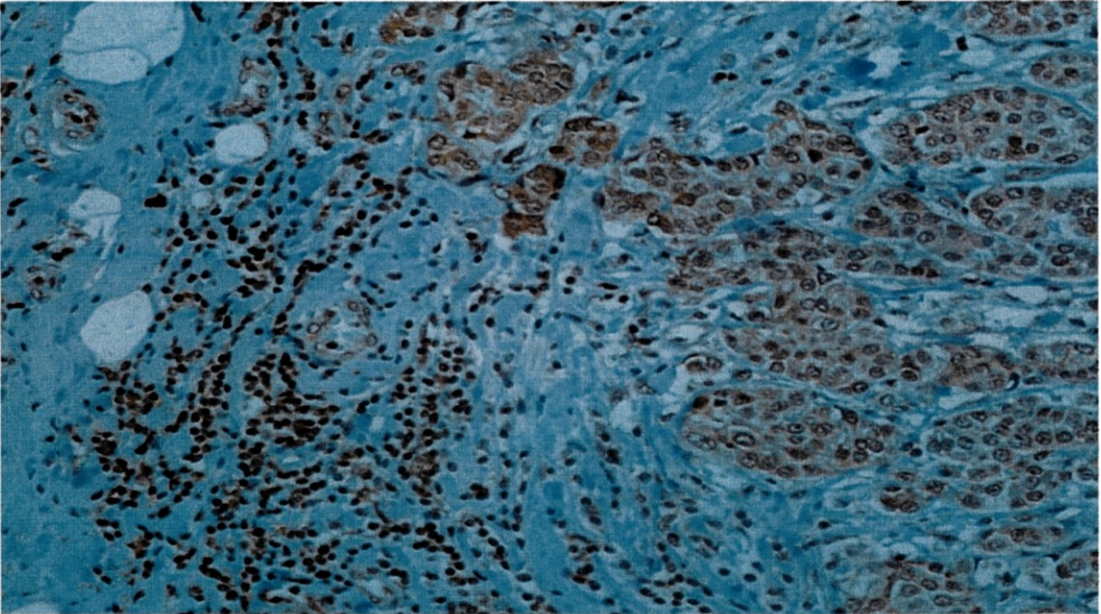
Şekil 4.12. Grup 2’de, primer odakta tümörde zayıf şiddette nükleer ve sitoplazmik ER-β ekspresyonu (olgu 44, X200)



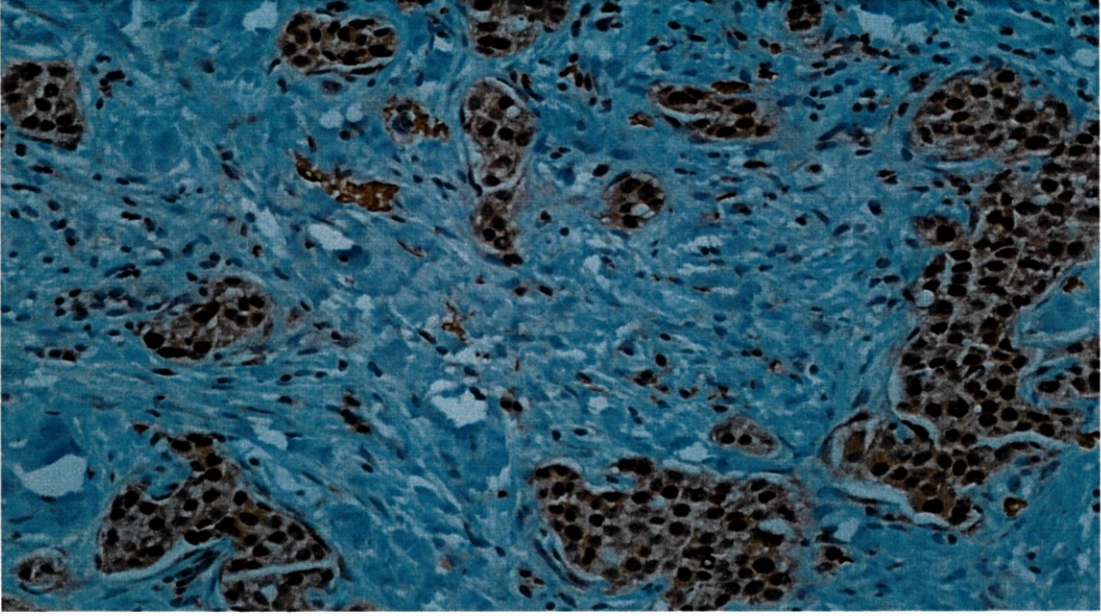
Şekil 4.13. Grup 2’de, metastatik lenf nodundaki tümörde negatif nükleer ve sitoplazmik ER-β ekspresyonu (olgu 44, X200)



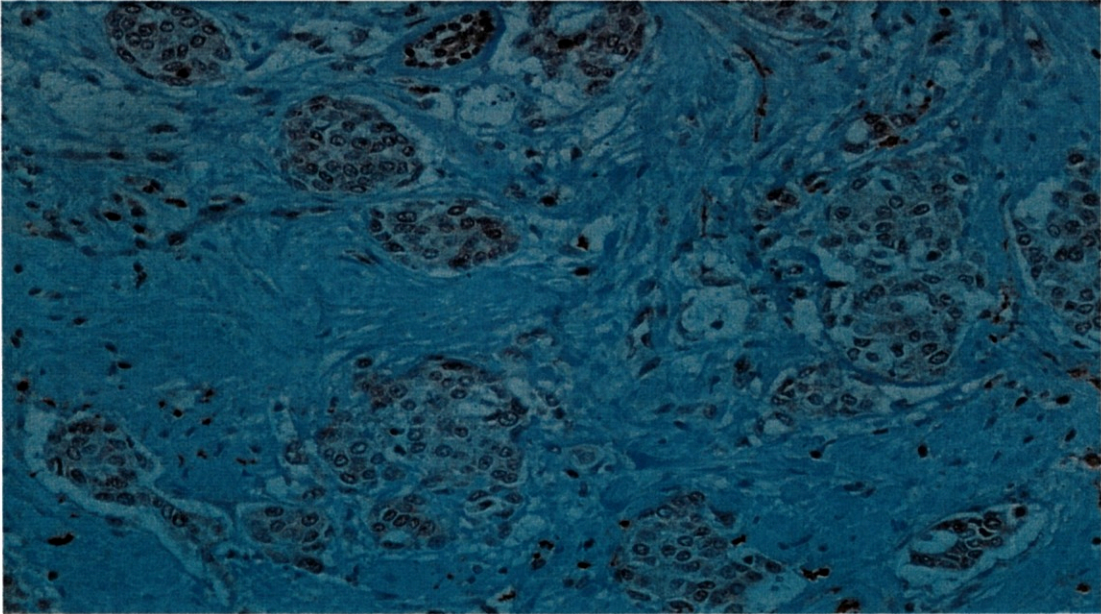
Şekil 4.14. Grup 1’de, primer odakta, tümörde negatif nükleer ve sitoplazmik Twist-1 ekspresyonu (olgu 40, X200)



Şekil 4.15. Grup 1’de, primer odakta, tümörde zayıf şiddette nükleer ve sitoplazmik Twist-1 ekspresyonu. Tümör komşuluğundaki lenfositlerde de nükleer ekspresyon izlenmiştir. (olgu 33, X200)



Şekil 4.16. Grup 1’de, primer odakta tümörde orta şiddette nükleer ve zayıf-orta şiddette sitoplazmik Twist-1 ekspresyonu (olgu 6, X200)



Şekil 4.17. Grup 2’de, primer odakta, tümörde çok zayıf şiddette nükleer ve sitoplazmik Twist-1 ekspresyonu (olgu 49, X200)



Şekil 4.18. Grup 2’de, metastatik lenf nodundaki tümörde çok zayıf şiddette nükleer ve sitoplazmik Twist-1 ekspresyonu (olgu 49, X200)

5. TARTIŞMA

Kadınlarda en sık görülen malign tümör meme kanseri olup, yılda 1,000,000'dan fazla kadın meme kanseri tanısı almaktadır (1, 3). Meme kanseri, kansere bağlı ölümlerde ikinci sırada yer almakta olup, meme kanseri olan kadınların yaklaşık üçte biri bu nedenle ölmektedir (2). Meme kanser gelişiminde kadın cinsiyet, artmış östrojen maruziyeti ve genetik yatkınlık önemli risk faktörleri olup, yaş, diet, obezite, çevresel toksinler, radyasyon maruziyeti, alkol kullanımı, karşı memede ya da endometriumda karsinom varlığı, sigara diğer risk faktörleridir. Meme kanser prognozunu belirleyen faktörler: invaziv karsinoma eşlik eden in situ karsinom, uzak metastaz, lenf nodu metastazı, tümör boyutu, lokal ileri hastalık, inflamatuvar karsinom varlığı, histolojik sub-tip, histolojik grade, ER ve PR durumu, HER2 onkoprotein ekspresyonu, lenfovasküler invazyon, proliferasyon oranı, neoadjuvan tedaviye yanıt, DNA içeriği ve gen ekspresyon profilidir (3).

Meme kanserinin hem etyolojisinde yer alan hem de önemli bir prognostik belirleyici olan ER, etkilerini hormon bağımlı transkripsiyon regülatörü olan ER- α ve ER- β olarak adlandırılan, iki spesifik intrasellüler reseptör aracılığı ile oluşturmaktadır (5-7, 35). Bu iki reseptör yapısal olarak büyük oranda benzerlik içermelerine rağmen her ikisi de farklı sinyal yolları üzerinden etkilerini gösterir (26). Östrojen reseptör- α ve PR, meme kanser prognozunu belirlemede yararlı biomarkerlar olup, günümüzde optimal tedavi seçiminde rutin olarak kullanılmaktadır (36). Östrojen reseptör- α ve PR'nun klinik önemi açıkça ortaya konmuştur ancak ER- β 'nın klinikopatolojik faktörlerle ve diğer hormon reseptörleriyle ilişkisi netlik kazanmamıştır.

Östrojen reseptör- β normal meme duktus ve lobüllerinde izlenmekte, bunun dışında normal prostat, tükrük bezi, testis, over, periferik sinir sistemi ile vasküler endotel, düz kas, santral sinir sistemi nöronlarında da eksprese edilmektedir (13-21). Yapılan çalışmalarda normal meme duktus epitel hücrelerinde ER- β ekspresyonunun olması nedeniyle, ER- β 'nın normal meme glandında fonksiyonu olduğunu öne sürülmüştür (29, 31, 37).

Östrojen reseptör- β ekspresyonu normal meme glandında hem luminal hem de myoepitelyal hücrelerde görülmektedir. Östrojen reseptör- β ekspresyonu normal

meme dokusu ve invaziv kanser hücreleri yanı sıra çevredeki fibroblastlar, lenfoid infiltrat, makrofaj ve damarların endotelial hücrelerinde de izlemiştir. Östrojen reseptör- α normal meme dokusunda bazı luminal epitelyal hücrelerde izlenmekte olup tümöral dokunun çevresindeki hücresele elemanlarda eksprese edilmemektedir (31).

Östrojen reseptör- β ekspresyonu meme kanserinden başka adrenokortikal, kolorektal, endometrium, karaciğer, akciğer, over, pankreas, prostat, tiroid ve özofagus tümörlerinde de gösterilmiştir (67).

Biz bu araştırmamızda, memede invaziv duktal karsinomda tümör dokusunda ve metastazı olan olguların lenf nodunda ER- β ekspresyonunu ve primer odaktaki tümörde ER- β ekspresyonu ile tümör grade'i, tümör lokalizasyonu ve lenf nodu durumu arasındaki ilişkiyi değerlendirdik.

Literatürde bazı çalışmalarda ER- β 'nın meme karsinogenezinde rolü olduğu öne sürülmüştür (29, 31). Aşağıda meme kanser gelişiminde risk oluşturabilecek proliferatif lezyonlar ve meme kanserinde yapılmış çalışmalar bildirilmektedir;

Roger ve ark. (31) normal meme dokusu, proliferatif olmayan meme lezyonları, atipili/ atipisiz proliferatif meme lezyonları ve DKIS içeren 118 olguda ER- β ekspresyonunu immunohistokimyasal yöntemle değerlendirerek meme karsinogenezindeki rolünü araştırmıştır. Bu çalışmada normal meme dokusunda ve meme lezyonlarında ER- β ve ER- α ekspresyonu gösteren hücrelerin yüzdeleri değerlendirilmiştir. Boyamalarda görülen sitoplazmik ER- β ekspresyonunun cross-reaktivite olduğunun gösterilmesi sonucu sadece nükleer boyanma değerlendirmeye alınmıştır. Normal meme glandından proliferatif olmayan benign meme lezyonları, atipisiz ve atipili proliferatif benign meme lezyonları ve DKIS'ya gidildikçe ER- β ekspresyonu gösteren hücrelerin sayısının azaldığı saptanmıştır. Meme kanser gelişiminde artmış risk oluşturan proliferatif lezyonlarda ve DKIS'da ER- β ekspresyonunun daha az görülmesi, karsinom oluşumunda down-regüle olduğunu düşündürmüştür. Bunun tersine, ER- α ekspresyonu gösteren hücrelerin sayısının normal meme dokusundan pre-invaziv lezyonlara gidildikçe arttığı gösterilmiştir. Buna göre ER- α 'nın artmasıyla meme dokusunun östrojen bağlama kapasitesinin arttığı ve bunun malign transformasyon riskini de artan yönde etkilediği ve ER- β 'nin

azalmasının malign transformasyon açısından düşük bir risk oluşturduğu öne sürülmüştür. Östrojen reseptör- β 'nin normal gland yapıları ve benign meme lezyonlarındaki ekspresyonunun, ER- α 'ya göre daha sık olması normal meme dokusunda fonksiyonu olduğunu düşündürmüştür. Bizim çalışmamızda, tümör komşuluğundaki normal meme dokusunda tüm olguların % 89.8'inde nükleer ER- β ekspresyonu izlenmiştir.

Shaaban ve ark. (29) ER- β ekspresyonunun meme karsinogenezindeki rolünü araştırmak üzere 53 normal meme dokusu, 54 duktal hiperplazi, 35 DKIS ve 141 invaziv duktal karsinom olgusunda immunohistokimyasal yöntem ile ER- α ve ER- β ekspresyonunu değerlendirmiştir. Östrojen reseptör- β normal meme dokusunda olguların % 94.3'ünde, duktal hiperplazili olguların % 76.6'sında, DKIS'li olguların % 70'inde ve invaziv karsinomlu olguların % 60'ında pozitif bulunmuştur. Östrojen reseptör- α normal meme dokusunda olguların % 44.8'inde, duktal hiperplazili olguların % 41.4'ünde, DKIS'li olguların ise % 27.6'sında, invaziv karsinomlu olguların % 80'inde pozitif bulunmuştur. İnvaziv meme karsinomlu olguların çoğunda her iki reseptörün de ekspresyon gösterdiği saptanmış. Olguların % 33.8'inde ER- α pozitif, ER- β negatif bulunmuştur. Bu çalışmada da normal meme dokusunda ER- β ekspresyonunun sık görülmüş olması normal meme dokusunda fonksiyonel olduğunu düşündürmüştür. Östrojen reseptör- β ekspresyonu benign lezyonlarda daha sık iken, malign lezyonlarda daha az sıklıkta görülmüştür. Meme karsinogenezinde ER- β ekspresyonunun azalmasının önemli role sahip olduğu ve bunun invaziv meme kanserine progresyonu arttırıcı yönde önemli bir risk oluşturduğu öne sürülmüştür. Diğer bir deyişle ER- β ekspresyonunun artması memenin epitelyal lezyonlarının neoplastik progresyonunu azaltıcı yönde etki eder ve böylece malign transformasyon olasılığını azaltır. Sonuç olarak bu çalışmada ER- β 'nin tanısal ve prognostik açıdan önemli olup, gelecekteki yeni terapötik hormonal manipülasyonlara cevap oluşumunda düzenleyici bir rolü olabileceği öne sürülmüştür.

Skiliris ve ark. (33) çoğunun histolojik tipi invaziv duktal karsinom olan 65 (35/65) meme karsinomlu olguda ve 8 normal meme dokusunda immunohistokimyasal olarak ER- β ekspresyonunu araştırmıştır. Bu çalışmada değişik histolojik tipteki karsinomlu olguların % 74'ünde (48/65) nükleer boyanma

saptanmıştır. İnvaziv duktal karsinomlu olguların ise % 62.8'inde ER- β ekspresyonu izlenmiştir. Bazı tümörlerde hafif sitoplazmik boyanma da izlenmiş olup, tek başına sitoplazmik boyanma non-spesifik olarak değerlendirilmiştir. İnvaziv lobüler, tubüler, kribriform ve müsinöz tümörlerde, invaziv duktal karsinoma göre daha sık ER- β ekspresyonu görülmüştür. Östrojen reseptör- β ekspresyonunun ER- α ve PR durumları ile ilişkisi de değerlendirilmiştir. Östrojen reseptör- α pozitif 50 olgunun % 80'inde (40/50), PR pozitif 37 olgunun % 83'ünde ER- β ekspresyonu izlenmiştir. Hormon reseptör ekspresyonları ile ER- β ekspresyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Östrojen reseptör- α + / PR+ olguların % 86'sı (32/37), ER- α + / PR- olguların % 42.8'inde (3/7), ER- α - / PR- olguların % 41.6'sında ER- β ekspresyonu izlenmiştir. Östrojen reseptör- α - / PR+ olguların hiçbirinde pozitif ER- β ekspresyonu izlenmemiştir. Östrojen reseptör- β ekspresyonu ile tümör grade'i, tümör boyutu, lenf nodu durumu gibi klinikopatolojik özellikler karşılaştırıldığında; düşük grade'li tümörlerde artmış ER- β ekspresyonu saptanmıştır. Bu çalışmada hem meme redüksiyon spesmenlerine ait 8 normal meme dokusunda, hem de tümöre komşu normal meme dokusunun duktus ve lobüllerindeki epitelyal ve myoepitelyal hücrelerin nukleuslarında ER- β ile ekspresyon izlenmiştir.

Speirs ve ark. (32) RT-PCR ile 23 normal meme dokusu ve 60 meme kanserli olguda ER- α ve ER- β ekspresyonunu ve bunların prognostik önemini değerlendirmiştir. Normal meme dokusunda olguların % 22'sinde ER- β , % 13'ünde ER- α pozitifliği saptanmıştır. İnvaziv kanserli olguların % 27'sinde sadece ER- α ekspresyonu, % 50'sinde ise ER- α ve ER- β ekspresyonu birlikte izlenmiş olup, olguların hiçbirinde tek başına ER- β ekspresyonu görülmemiştir. Diğer bir deyişle invaziv meme kanserli ER- α pozitif olgularda ER- β izlenmiştir. Östrojen reseptör- α ve ER- β 'nin birlikte eksprese olması ile tümör grade'i ve lenf nodu durumu arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, her iki östrojen reseptörünü eksprese eden olguların % 63'ünde lenf nodu metastazı olup, bu olguların çoğunun yüksek grade'li olgular olduğu ortaya konmuştur. Normal dokuda ER- α ve ER- β ekspresyonları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Meme kanserinde ER- α ve ER- β ekspresyonunun bir arada olmasının, hormonoterapi alan olgularda tedaviye cevabın değerlendirilmesinde önemli olabileceği ve daha geniş vaka serilerinde immunohistokimyasal yöntemle yapılacak çalışmaların gerekli olduğu belirtilmiştir.

Shaw ve ark. (26) 62 meme karsinomu ve 32 normal meme dokusunda RT-PCR ile ER- α ve ER- β 'nin mRNA ekspresyonlarını araştırmıştır. Normal meme dokusunda olguların % 66'sında ER- α , % 73'ünde ER- β mRNA pozitif bulunmuştur. Yapılan immunohistokimyasal çalışmada ise olguların % 60'ında ER- α , % 90'ında ER- β pozitif saptanmıştır. Meme karsinomlarının % 92'sinde ER- α mRNA, % 85'inde ER- β mRNA pozitifliği. İmmunohistokimyasal çalışmada ise olguların % 72'sinde ER- α , % 32'sinde ER- β , % 62'sinde PR pozitifliği. Klinikopatolojik parametrelerle ilişkilerine bakıldığında; ER- α tümör grade'i ile güçlü ilişki gösterirken, ER- β ile anlamlı ilişki saptanmamıştır. Östrojen reseptör- α 'nın düşük grade'li olgularda daha sık eksprese edildiği gösterilmiştir. Grade 3 olguların tümünde ER- α ve ER- β negatif bulunmuştur. Tümör boyutu ve lenf nodu durumuyla ER- α ve ER- β arasında anlamlı ilişki saptanmamış, ER- α ve ER- β 'nin ko-eksprese olmalarının klinikopatolojik özelliklerle arasında istatistiksel açıdan önemli bir ilişki bulunmamıştır. RT-PCR ile normal meme dokusunda ER- α ve ER- β benzer ekspresyon göstermekte olup ER- β 'nin stromal hücrelerde ve myoepitelyumda da ekspresyonu gösterilmiştir. Östrojen reseptör- α ve ER- β 'nin meme tümöründeki ekspresyon sıklıklarının farklı olması, normal meme dokusunda ER- β 'nin eksprese edilip, meme tümörlerinde ekspresyonunun azalması meme karsinogenezinde ER- β 'nin önemli rolü olabileceğini akla getirmiştir.

Nakopoulou ve ark. (37) 181 meme tümöründe ER- β 'nin prognostik rolünü saptamak üzere yaptıkları immunohistokimyasal çalışmada; olguların % 71.2'sinde ER- β ekspresyonu saptamış olup; yapılan tek ve çok değişkenli survey analizlerinde ER- β ekspresyonun, hastalıksız ve tüm yaşam süresini olumlu yönde etkilediği sonucuna varılmıştır. Bu olgularda lenf nodu metastazı yoktu. Olguların; 149'u invaziv duktal, 32'si invaziv lobüler karsinomdu. Östrojen reseptör- β 'nin nükleer ekspresyonu hem kanser hücrelerinde hem de tümör komşuluğundaki normal duktus epitelinde izlenmiştir. Östrojen reseptör- β 'nin tümör boyutu, nükleer ve histolojik grade, histolojik tip, lenf nodu durumu ve hormonal durum gibi klinikopatolojik parametreler ile de ilişkisi değerlendirilmiştir. Olguların % 64.6'sı ER- α pozitifliği. Bu olguların da % 80.3'ü ER- β ekspresyonu göstermekteydi. Olguların çoğunda ER- β ekspresyonu izlenmiş olup, bu durumun ER- α ekspresyonuyla pozitif yönde korelasyon gösterdiği saptanmıştır. Östrojen reseptör- α negatif olguların %

55.7'sinde ER- β ekspresyonu izlenmiştir. Olguların % 48.06'sında PR ekspresyonu izlenmiş ve bu olguların da % 74.7'sinde ER- β ekspresyonu saptanmış olup, ER- β ile PR ekspresyonu ve diğer klinikopatolojik parametreler arasında istatistiksel anlamlı bir ilişki gösterilmemiştir.

Fuqua ve ark. (36) ER- β ve ER- α 'nın meme karsinogenezindeki fonksiyonunu ve ER- β ekspresyonunun klinik tümör parametreleri ile arasındaki ilişkiyi değerlendirmiştir. Bu çalışmadaki 242 meme kanserli olgunun % 76'sında ER- β ekspresyonu izlenmiştir. Çoğu olguda ER- α ve ER- β ko-ekspresyonu saptanmıştır. Ancak sadece ER- α 'nın PR reseptör ekspresyonuyla direkt ve güçlü ilişkisinin olduğu gösterilmiş ve ER- α 'nın, ER- β 'ya göre meme kanser gelişim sürecinde daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Östrojen reseptör- α ekspresyonu, prognozu iyi yönde etkileyen düşük tümör grade'i ve diploidi gibi parametreler ile pozitif yönde korelasyon göstermekteydi. Östrojen reseptör- β ekspresyonu ise klinik tümör parametrelerinden sadece aneuploidi ile ilişkili bulunmuştur. Araştırmacılar ER- β 'nın meme kanserlerine klinik yaklaşımda ER- α 'nın yerini almasının mümkün olmadığını ancak prognoz ve hormonal tedaviye yanıtı değerlendirmede ER- β 'nın rolünün araştırılması için yeni çalışmalara ihtiyaç olduğunu belirtmektedir.

Mann ve ark.(103) mastektomi ve aksiller disseksiyonla tedavi edilmiş 47 invaziv duktal karsinom olgusu ile mastektomi ve aksiller disseksiyon ile birlikte adjuvan hormonoterapi (tamoksifen) alan 118 invaziv meme kanserli iki grupta ER- β ekspresyonunu değerlendirmiş ve ilk grubun % 70'inde (33/47), ikinci grubun % 66'sında (78/118) ER- β ekspresyonu saptamıştır. Östrojen reseptör- β pozitifliği kanser hücrelerinin nüvelerinde izlenmiş olup; genellikle zayıf bazen orta şiddette sitoplazmik boyanma görülmüştür. Östrojen reseptör- α ilk gruptaki olguların % 64'ünde pozitif, % 36'sında negatif olarak bulunmuştur. Östrojen reseptör- α negatif 17 olgunun % 47'si ER- β pozitifdir. Bu veriler ilk grup için survey açısından analiz edildiğinde ER- β 'nın tüm yaşam süresiyle ilişkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır. İkinci grupta ER- β negatif olguların daha uzun bir yaşam süresine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu grupta 36 vakada lenf nodu metastazı yoktu. Bu 36 vakada, ER- β ekspresyonunun tüm yaşam süresinin önemli belirleyicilerinden olduğu sonucuna varılmıştır.

Borgquist ve ark. (35) 512 meme kanserli olguda ER- α ve ER- β reseptörlerinin klinikopatolojik parametrelerle ilişkileri ve ko-ekspresyonlarının endokrin tedaviye iyi yanıtı predikte edip etmediğini yaptıkları immunohistokimyasal çalışmada araştırmıştır. Olguların % 78'i ER- α , % 50'si ER- β , % 33'ü PR pozitif olarak saptanmıştır. Östrojen reseptör- β pozitif olguların % 83'ü ER- α , % 53'ü PR pozitifdir. Olgularda klinikopatolojik parametreler, hasta yaşı, tümör tipi, tümör boyutu, tümör grade'i, lenf nodu tutulumu ve ER- α /PR ekspresyonunu içermekteydi. Olgularda sadece ER- β ekspresyonu ile hormon reseptör durumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmıştır. Östrojen reseptör- α ise sadece tümör grade'i ve boyutu ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkiye sahipti. Olgularda tümör grade'i arttıkça, ER- α ekspresyonu gösteren olguların sıklığı azalmaktadır. Östrojen reseptör- α ve ER- β 'nın farklı kombinasyonlarının (ER α +/ER β +, ER α +/ER β -, ER α -/ER β +, ER α -/ER β -) klinikopatolojik özelliklerle ve surveyle ilişkisi değerlendirildiğinde istatistiksel anlamlı bir sonuç elde edilmemiştir. Hormon tedavisi almış meme kanserli ER- α +/ER- β + grubun tüm yaşam süresi, hormon tedavisi almış ER- α +/ER- β - gruba göre anlamlı oranda yüksek olarak saptanmıştır. Çalışmanın sonunda ER- β ekspresyonunun, meme kanserli hastalarda hormonal tedaviye yanıtın değerlendirilmesinde prediktif bir role sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Jarvinen ve ark. (27) immunohistokimyasal olarak ER- β 'nın, ER- α ve PR ile ko-ekspresyonunun lenf nodu tutulumu, tümör boyutu, histolojik tip ve grade gibi klinikopatolojik parametrelerle ilişkisini araştırmıştır. Bu çalışmada 79 invaziv duktal karsinom, 6 invaziv lobüler karsinom ve 7 intraduktal karsinom olmak üzere 92 olgu değerlendirilmiştir. Olguların % 59.8'inde (55/92) ER- β pozitif saptanmıştır. Östrojen reseptör- α pozitif 63 olgunun % 75'i, ER- α negatif 29 olgunun %24'ü ER- β pozitifdir. Östrojen reseptör- β ve ER- α arasındaki doğru orantılı ve güçlü ilişki, ER- β ile PR arasında da izlenmiştir. Progesteron pozitif 49 olgunun % 76'sında, PR negatif 43 olgunun da % 42'sinde ER- β pozitifdir. Östrojen reseptör- α ve PR durumları kombine edildiğinde ER- α (+) / PR (+) tümörlerin % 77'sinde ER- β pozitifdir. Östrojen reseptör- α (+) /PR (-) tümörlerin ise % 75'inde ER- β pozitifdir. Östrojen reseptör- α (-) /PR (-) tümörlerin % 22'sinde ER- β pozitifdir. Östrojen reseptör- β ekspresyonu ile birçok klinikopatolojik özellik arasında anlamlı ilişkili bulunmuş

olup, aksiller lenf nodu metastazı olmayan olgularda (% 48), aksiller lenf nodu olan olgulara (% 7) göre ER- β pozitifliği daha sık izlenmiştir.

Östrojen reseptör- β ekspresyonu ile histolojik grade arasında ise anlamlı ilişki saptanmış olup, grade 1 tümörlerin % 76'sında, grade 2 tümörlerin % 64'ünde pozitif olmakla birlikte grade 3 tümörlerin % 23'ünde ER- β pozitifdir. Tümör grade'i arttıkça ER- β ekspresyon sıklığı azalmaktadır. Tümör boyutu ve histolojik tip ile ER- β arasında ilişki saptanmamıştır. Bu çalışmada ER- β 'nin, ER- α ve PR ile ko-ekspresye olabildiğini gösterilmiştir. Ayrıca azalmış ER- β ekspresyonunun yüksek tümör grade'i ve artmış metastatik davranış gibi agresif biyolojik tümör parametreleri ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür.

Marotti ve ark. (34) invaziv meme kanserinde ER- β ekspresyonu ve bu ekspresyonun moleküler fenotiple ilişkisini araştırmıştır. Bu çalışmaya 1585 meme kanserli olgu dahil edilmiştir. Bu olgulara immunohistokimyasal olarak ER- α , PR reseptör, HER2, sitokeratin 5/6, EGFR ve ER- β uygulanmıştır. Olgular immunfenotiplerine göre luminal A (ER- α + ve/veya PR+ ve HER2-); luminal B (ER- α + ve/veya progesteron+ ve HER2+); HER2 (ER- α - ve PR- ve HER2+), ve bazal-like (ER- α -, PR-, HER2- ve EGFR veya sitokeratin 5/6+) olmak üzere 4 şekilde kategorize edilmiştir. Olguların bu kategorizasyona göre dağılımları sırasıyla; % 73, % 5, % 6 ve % 11 şeklindedir. Olguların % 5'i immunfenotipik özelliklerinden dolayı (ER- α -, PR-, HER2-, EGFR-, sitokeratin 5/6-) klasifiye edilememiştir. Olguların % 68'i ER- β pozitifdir. Östrojen reseptör- β ekspresyonu önemli oranda ER- α ile ilişkili bulunmuştur.

Östrojen reseptör- β ekspresyonu moleküler kategori ile de önemli oranda ilişkili bulunmuştur. Luminal A grubu (% 72) ve luminal B grubunda (% 68), HER2 (% 55) ve bazal-like (% 48) gruplarına göre daha fazla ER- β ekspresyonu izlenmiştir. Klasifiye edilemeyen grupta ise ER- β % 48 oranında pozitifdir. Östrojen reseptör- β , invaziv duktal karsinomların % 63'ü, invaziv lobüler karsinomların % 87'si, müsinöz karsinomların % 83'ü, tubüler karsinomların % 100'ü olmak üzere tüm histolojik alt tiplerde izlenmiştir.

Büyük boyutlu ve yüksek grade'li tümörlerde ve lenf nodu tutulumları olan olgularda ER- β pozitifdir. Grade 1 tümörlerin % 85'i, grade 2 tümörlerin % 71'i ve

grade 3 tümörlerin % 49'u ER- β pozitifdir. Östrojen reseptör- β ekspresyonunun survey ile ilişkisi gösterilememiştir.

Miyoshi ve ark. (38) 79 invaziv meme kanseri olgusunda, ER- α , ER- β ve PR ekspresyonlarını değerlendirmiştir. Olguların % 62'si ER- α pozitif, % 30'u ER- β pozitif saptanmış ve ER- α ile ER- β ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Olguların % 54'ü PR pozitif olup, bu olguların % 30'u ER- β , % 93'ü ER- α pozitifdir. Östrojen reseptör- α pozitif tümörlerde, ER- β pozitif tümörlere göre PR pozitifliği daha sık görüldü. Östrojen reseptör- β ile PR ekspresyonu arasında da anlamlı ilişki gösterilememiştir. Östrojen reseptör- α (+) /ER- β (-) tümörlerde PR ekspresyon sıklığı düşüktü. Küçük tümör boyutu (≤ 2 cm) ve yüksek tümör grade'i ER- β pozitif tümörlerde daha sıklıkla izlenmiştir. Tümör boyutunun küçük, tümör grade'nin yüksek olduğu olgularda ER- β pozitifliği daha sıkı.

Bizim çalışmamızda değerlendirdiğimiz invaziv duktal karsinom olgularının % 68.4'ünde ER- β ekspresyonu saptadık. Bu görülme sıklığı literatürdeki çalışmalarla uyumlu olup, diğer çalışmalarda meme kanserlerinde ER- β ekspresyonunun görülme sıklığı % 30-71.2 oranında idi (26, 27, 29, 33-38, 103).

Literatürde normal meme dokusunda ER- β 'nin yüksek oranlarda bulunduğu bildirilmektedir. Bizim çalışmamızda da çoğu olgunun normal meme dokusunda ER- β pozitifliği (% 89.9). Diğer çalışmalarda öne sürüldüğü gibi bizim bulgumuz da ER- β ekspresyonunun normal meme dokusunda fonksiyonel bir rolü olduğunu desteklemektedir.

Çalışmamızda lenf nodu durumu ile ER- β ekspresyonu arasında istatistiksel anlamlı bir ilişki saptanmadı. Literatürde ER- β ekspresyonu ile lenf nodu durumu arasındaki ilişkiyi araştıran bazı çalışmalarda lenf nodu metastazı içermeyen olgularda daha sık ER- β ekspresyonu izlendiği bildirilmiştir (27, 34). Bir çalışmada da nükleer ER- β 2 pozitifliği ile lenf nodu tutulumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (109). Diğer çalışmalarda ise bizim çalışmamızda olduğu gibi lenf nodu durumuyla ER- β ekspresyonu arasında anlamlı ilişki saptanmamıştır (33, 35, 37). Östrojen reseptör- β ekspresyonunun lenf nodu metastazındaki rolü tartışmalı olup, bu konuda ilave çalışmalar gereklidir.

Literatürde ER- β 'nın nükleer ekspresyonunun tümör grade'i ile ilişkisini araştıran çalışmalarda farklı sonuçlar bildirilmiştir. Çalışmaların bir kısmında düşük grade'li tümörlerde artmış ER- β ekspresyonu saptanırken (27, 33, 34), bir çalışmada ise azalmış ER- β ekspresyonu (38) bildirilmektedir. Bu çalışmaların yanısıra tümör grade'i ile nükleer ER- β ekspresyonu arasında bir ilişkinin bulunmadığı çalışmalar da mevcuttur (26, 35-37). Bizim çalışmamızda lenf nodu durumuna bakılmaksızın tüm olgular ele alındığında: ER- β 'nın nükleer ekspresyonunun tümör grade'i ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki görülmemiştir.

Lenf nodu durumuna göre oluşturduğumuz gruplardaki olgularda ER- β ekspresyonunun tümör grade ile ilişkisi değerlendirildiğinde; grup 2'deki grade 2 ve 3 olan olgularda ER- β pozitif olgu sayısı daha fazladır (% 56). Grade 1 tümör içeren olgular sayıca az olmakla birlikte, bu olgularda ER- β ekspresyon sıklığı daha düşüktü. Lenf nodu metastazı olan olgularda yüksek grade'li tümörlerde ER- β ekspresyonu daha sık görülmesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.03$). Bu bulgu ER- β ekspresyonunun prognostik bir faktör olabileceğini düşündürülebilir. Ancak grade 1 olgu sayımız az olduğundan ER- β , grade ve lenf nodu durumu arasındaki ilişkinin daha geniş serilerde değerlendirilmesinin uygun olacağı düşünüldü.

Literatürde sitoplazmik ER- β 1 ve ER- β 2 ekspresyonu ile klinikopatolojik parametreler arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışmada istatistiksel anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (109). Diğer yayınlarda ise sitoplazmik ER- β ekspresyonu non-spesifik kabul edilerek değerlendirilmemiştir (27, 29, 31, 34-37, 103). Ancak biz çalışmamızda sitoplazmik boyanmanın spesifik olmadığını gösteremediğimizden ER- β 'nın sitoplazmik ekspresyonunu değerlendirmeye aldık. Östrojen reseptör- β 'nın sitoplazmik ekspresyonuyla lenf nodu metastazı arasında anlamlı ilişki bulduk ($p=0.008$). Aksiller metastatik lenf nodu olan olguların % 60'ında, aksiller lenf nodu olmayan olguların % 33'ünde ER- β sitoplazmik ekspresyonu izlenmiştir. Aksiller lenf nodu metastazı varlığı meme kanserinde kötü prognostik bir faktör olup, ER- β 'nın sitoplazmik ekspresyonuyla ilişkisinin metastatik davranışa etkisi daha geniş kapsamlı çalışmalarla araştırılmalıdır.

Literatürde çeşitli çalışmalarda ER- β 'nin diğer hormon reseptör ekspresyonlarıyla birlikteliği ve birbirleriyle ilişkisi değerlendirilmiştir.

Skiliris ve ark.'nın (33) yaptığı çalışmada ER- α ve PR pozitif olgularda, ER- β ekspresyonu daha sık izlenmiş olup, her iki hormon reseptörünün negatif olduğu grupta en fazla ER- β negatifliği izlenmiştir. Nakapoulou ve ark.'nın (37) yaptığı çalışmada ise ER- α pozitif olgularda daha sık ER- β ekspresyonu olduğu bildirilmiştir. Fuqua ve ark.'nın (36) yaptığı çalışmada ise ER- α ve ER- β 'nin meme kanserli olgularda ko-ekspresyon gösterdiği saptanmış, sadece ER- α 'nın, PR ekspresyonuyla direkt ve güçlü ilişkisinin gösterilmesi sonucunda ER- α nın meme kanser regülasyonunda daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Borgquist ve ark.'nın (35) yaptığı çalışmada ise hormonoterapi almış bir grup meme kanserli hastada ER- α ve ER- β ekspresyonları değerlendirilmiş olup, sonuçlar survey ile ilişkilendirilmiştir. Hormonoterapi almış ER- α ve ER- β pozitif olguların yaşam süreleri, ER- α pozitif, ER- β negatif hormonoterapi almış olgulara göre daha uzundur. Bu yazarlara göre meme kanserli olgularda hormonoterapiye yanıtın değerlendirilmesinde ER- β önemli prediktif bir faktördür. Speirs ve ark.'nın (32) yaptığı çalışmada ise yüksek grade'li ve metastatik lenf nodu olan olgularda, ER- α ve ER- β 'nin simultane ekspresyonu daha sık izlenmiştir. Miyoshi ve ark.'nın (38) yaptığı çalışmada ER- β ekspresyonu ile hormonal durum arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

Bizim çalışmamızda tüm olguların % 76.2'si ER- α pozitifdir. Östrojen reseptör- α pozitif olguların % 71.6'sında ER- β ile nükleer pozitifliği. Primer tümörde ER- β 'nin nükleer ekspresyonu ile ER- α arasında istatistiksel olarak uyum izlenmedi ($p>0.05$).

Tümöral dokuda her ikisinin de eksprese olması, fonksiyonel olarak birbirleriyle ilişkili olabileceklerini düşündürebilir. Östrojen reseptör- β ekspresyonunun, ER- α gibi sıklıkla meme kanserinde görülmüş olması meme karsinogenezinde rolü olabileceğini ve hormonoterapi modalitelerinde bir yeri olabileceğini akla getirmektedir.

Çalışmamızdaki tüm olguların % 57.8'i PR ile pozitif, % 42.1'si negatiftir. Progesteron pozitif olguların % 69.1'inde ER- β ile nükleer ekspresyonu izlenmiştir.

Primer tümörde ER- β 'nin nükleer ekspresyonu ile PR ekspresyonu arasında istatistiksel olarak uyum bulunmamıştır ($p=0.869$).

Jarvinen ve ark.'nın (27) yaptığı çalışmada ER- β , ER- α ve PR'nun eşzamanlı ekspresyonunun düşük agresif davranışla ilişkili olduğu ve ER- β eksprese eden tümörlerin hormonoterapiye cevaplarının iyi olduğuna yönelik bulgular öne sürülmüştür. Bizim çalışmamızdaki olguların yaklaşık yarısında (% 55) ER- α ve PR pozitif. Bunların yarısından fazlasında (% 69.1) ER- β pozitif. Östrojen reseptör- β ekspresyonu ile ER- α ve PR arasında anlamlı bir uyum saptanmamıştır ($p=0.329$). Olguların sayıca dağılımları yeterli olmadığından bu hormonların çeşitli kombinasyonlarının klinikopatolojik parametrelerle ilişkisi istatistiksel olarak değerlendirilemedi.

Literatürde ER- β ekspresyonu ile tümör boyutu arasındaki ilişkiyi araştırmış çalışmalarda tümör boyutu büyük olan olgularda ER- β ekspresyonunun daha az sıklıkla görüldüğü bildirilmektedir (34, 38). Mandusic ve ark. (110) 39 erken evre, 35 ileri evre meme karsinomlu olguda RT-PCR yöntemi ile ER- β 1 ve ER- β 2 ekspresyon seviyelerinin tümör boyutu ile ilişkisini araştırmıştır. Erken evre meme kanserli olgularda tümör boyutu ile ER- β 1 mRNA ekspresyonu arasında ve ileri evre meme kanserli olgularda ise tümör boyutu ile ER- β 2 mRNA ekspresyonu arasında ters orantılı bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda tümör boyutu ile ER- β ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p=0.657$). Çalışma grubumuzda tümör boyutu ≤ 2 cm olan 49 olgu olup, bunların % 71'i ER- β pozitif. Tümör boyutu > 2 cm olan 48 olgu olup, bunların da % 64'ün ER- β pozitif. Tümör boyutu > 2 cm olan olgularda ER- β 'nin nükleer ekspresyon sıklığı daha azdı. Literatürdeki diğer çalışmalarda da anlamlı sonuçlar elde edilmemiştir (27, 33, 35, 37).

Çalışmamızda ayrıca, grup 2'deki olguların metastatik lenf nodlarına ve tümörlerine eşzamanlı ER- β uyguladık ve ekspresyonlarını karşılaştırdık. Grup 2'deki olguların % 38.8'inde metastatik lenf nodunda nükleer ER- β pozitif olup, % 61.2'sinde negatif. Östrojen reseptör- β 'nin sitoplazmik ekspresyonu olguların % 30'unda pozitif, % 70'inde negatif.

Grup 2'deki olgularda, ER- β 'nin metastatik lenf nodundaki ve primer tümördeki nükleer ekspresyonları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak aralarında anlamlı ancak düşük bir uyum bulunmuştur ($p=0.019$). Grup 2'deki olgularda, ER- β 'nin metastatik lenf nodundaki ve primer tümördeki sitoplazmik ekspresyonları karşılaştırıldığında, ER- β olguların % 34'ünde hem primer tümörde hem de metastatik lenf nodunda negatif, % 26'sında hem primer tümör hem de metastatik lenf nodunda pozitifdir. Olguların % 4'ünde ER- β primer tümörde negatif, metastatik lenf nodunda pozitif iken, % 36'sında primer tümörde pozitif metastatik lenf nodunda negatifdir.

Grup 2'deki olguların yarısından fazlasında (%60) her iki odakta nükleer ER- β ekspresyonunun benzer, geri kalanında değişken olup, değişken olguların çoğunda (%36) primer tümörde pozitifken metastatik lenf nodunda negatifdir. Bu durum ER- β ekspresyonu açısından olgular arasında farklılıklar olduğunu göstermektedir. Değişken olan olguların çoğunda primer tümör odağında pozitif olduğu halde metastatik lenf nodunda negatif olması, azalan nükleer ER- β ekspresyonunun metastaz gelişiminde katkısı olabileceğini düşündürülebilir. Bizim çalışmamız literatürde primer odak ve lenf nodu metastazında birlikte ER- β ekspresyonunun değerlendirildiği ilk çalışmadır.

Twist-1, EMT denen ve metastaz gelişiminde önemli rol oynayan, epitelyal hücrelerin mezenkimal hücrelere dönüşümüyle karakterize mekanizmayı kontrol eden önemli bir transkripsiyon faktörüdür (111, 112). Twist-1'in meme kanseri, mide kanseri ve prostat kanseri, sarkom, gliom, nöroblastom ve melanom gibi birçok çeşitli tümörde ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (42, 45, 47-52, 54). Twist-1'in tümöral hücrelerden başka normal meme duktus epitelinde de ekspresyonu olduğu bilinmektedir (54, 111).

Epitelyal mezenkimal dönüşüm (EMT), tümöral hücrelerin çevre dokuya invazyonları ve uzak metastaz yapabilmeleri için gerekli olan fibroblast benzeri özellikler kazandıkları, e-kaderin gibi adezyon moleküllerinin down-regulasyonu, α -düz kas aktin/vimentin gibi myofibroblastik veya fibroblastik hücrelerde bulunan genlerin upregulasyonu ile sağlanır. Epitelyal mezenkimal dönüşüm snail, slug, zeb

1, Twist-1 ve CarB-box-binding faktör, Mesenchyme Forkhead 1 ve Kruppel-like factor gibi transkripsiyon faktörleri ile kontrol edilir (113).

Soini ve ark. (113) Twist-1, Zeb-1 ve Snail 1 gibi transkripsiyon faktörlerinin meme karsinomundaki ekspresyonu ve ER/PR durumu, grade, histolojik tip, tümör boyutu, lenf nodu durumu ve survey gibi klinikopatolojik parametrelerle ilişkilerini araştırmak üzere yaptıkları çalışmada, invaziv ve in situ karsinomları içeren 388 olguyu değerlendirmiştir. Bu olgular 252 invaziv duktal karsinom, 70 invaziv lobüler karsinom, 16 in situ karsinom, 19 müsinöz karsinom, 8 meduller karsinom ve sınıflamadaki diğerleri kategorisinde olan 23 vakayı içermekteydi. İmmunohistokimyasal olarak 252 olguya uygulanan zeb 1, snail ve Twist-1 immun belirteçleri tümörün epitelyal komponentinde ve stromal fibroblastik hücrelerde değerlendirilmiş olup, sadece nükleer pozitiflik spesifik olarak kabul edilmiştir. Olguların % 3.6'sı (7 invaziv duktal, 4 invaziv lobüler, 1 tubüler, 1 diğer kategoride ve 1 DKIS) Twist-1 ekspresyonu gösteriyordu. Pozitif tümörlerin çoğu grade 3'tü. Yapılan survey araştırmasında nükleer Twist-1 ekspresyonu, oldukça az olguda görülmüş olmakla birlikte, kötü klinik gidiş ve yüksek tümör grade'i ile ilişkili bulunmuştur. Twist-1 pozitifliği ile diğer klinikopatolojik özellikler arasında ilişki yoktu.

Van Nes ve ark. (112) ER pozitif erken meme kanserli 575 olguda Twist-1 ile birlikte çeşitli transkripsiyon faktörlerinin prognostik etkisi olduğunu ortaya koymuştur. Bu olguların % 50'sinde yüksek Twist-1 nükleer ekspresyonu saptanmıştır. Yüksek Twist-1 ekspresyonu, daha ileri evre ve yüksek tümör grade ile ilişkili bulunmuştur. İlk kez bu çalışmada ER pozitif meme kanserli olgularda Snail ve Twist-1 ko-ekspresyonunun daha doğru prognostik bilgi verdiği gösterilmiştir. Twist-1 ve snail immun belirteçlerinin özellikle de ER pozitif olgulardaki ko-ekspresyonları, düşük E-kaderin ve yüksek N-kaderin ekspresyonuyla birliktelik göstermekte olup, bu durumun epitelyal mezenkimal dönüşümün indüklenmesinde önemli olduğu öne sürülmüştür.

Wnt/ β -kathenin sinyalizasyonunda görevli Wnt-1 ve Wnt-2'nin, Twist-1 ekspresyonunda regülatör görevi olup meme karsinogenezinde etkili rol oynadığı düşünülmektedir (54). Bu nedenle Watanabe ve ark. (54) meme tümörogenezindeki

regülatör rollerini araştırmak üzere Twist-1, Wnt-1 ve Wnt-2 ekspresyonunu RT-PCR ve immunohistokimyasal yöntemle 23 meme kanserli olguda değerlendirmiştir. İmmunohistokimyasal yöntemle Twist-1 olguların % 52.2'sinde tümör dokusunda pozitif bulunmuş olup, az sayıda olguda (% 34.8) tümöral doku komşuluğundaki normal meme dokusunda zayıf pozitif olarak saptanmıştır. Duktus epitel hücreleri ve tümör hücrelerinin sitoplazmalarında da Twist-1 pozitifliği izlenmiştir. RT-PCR yöntemi ile değerlendirilen normal meme dokusu ve tümöral dokuda Twist-1 sırasıyla olguların % 69.6'sı ve % 21.7'sinde saptanmıştır. RT-PCR ile vakaların çoğunda tümör dokusunda ve normal dokuda Wnt-1 ve Wnt-2 ekspresyonu da görölmüştür. Bu çalışmada Twist-1 ve Wnt-2'nin meme kanserinde yüksek oranda eksprese edildiği ve her iki molekülün de meme karsinogenezinde önemli rolleri olabileceği öne sürölmüştür.

Gort ve ark. (111) meme karsinomunda Twist-1 ekspresyonunun meme karsinogenezindeki rolünü araştırmak üzere yaptıkları çalışmaya 34 invaziv duktal, 42 invaziv loböler olmak üzere toplam 76 meme kanserli olguyu dahil etmiştir. Twist-1'in tümöral hücrelerdeki nükleer ekspresyonu spesifik kabul edilmiş olup, normal meme epitelinde de nükleer boyanma izlenmiştir. Olguların % 51'inde nükleer boyanma görölmüştür. Loböler kanserlerde e-kaderin kaybına bağlı yüksek seviyelerde EMT ve Twist-1 ekspresyonu beklenirken, invaziv duktal ve invaziv loböler kanserli olgularda Twist-1 ekspresyonu açasından fark izlenmemiştir. Lenf nodu tutulumu, tümör grade'i, ER/PR durumu, yaş, mitotik oran ve tümör boyutu gibi klinikopatolojik özelliklerle Twist-1 ekspresyonu arasında istatistiksel anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Normal meme dokusunda Twist-1 ekspresyonun izlenmesi, Twist-1'in normal meme epitelinde fizyolojik rolü olabileceğini akla getirmiştir. Twist-1'in malign epitel hücrelerinin nukleuslarında daha fazla ekspresyon göstermesi, meme kanseri gelişiminde önemli role sahip olabileceğini düşündürmüştür.

Riaz ve ark. (59) 778 lenf nodu negatif, 649 lenf nodu pozitif meme kanserli olguda RT-PCR yöntemiyle Twist-1 mRNA ekspresyonunu araştırmış ve lenf nodu ve ER- α durumu ile prognostik ilişkisini değerlendirmiştir. Lenf nodu negatif olguların 552'sinde ER pozitif, 226'sında ER negatifti. Sonuçlar istatistiksel olarak tek ve çok değişkenli analizlerle değerlendirildiğinde, artmış Twist-1 mRNA

ekspresyonu tüm olgularda ve lenf nodu negatif olgularda daha kısa metastazsız yaşam süresiyle ilişkili bulunmuştur. Benzer şekilde yüksek Twist-1 ekspresyonu tüm hasta grubu ve lenf nodu negatif-ER pozitif grupta daha kısa hastaliksız ve tüm yaşam süresiyle ilişkili bulunmuştur. Twist-1 mRNA'nın lenf nodu negatif-ER pozitif meme kanserli olgularda kötü prognozu belirlemede bağımsız bir prognostik faktör olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Biz de bu çalışmada invaziv duktal kanserli olgularda Twist-1'in ekspresyonunu, bunun lenf nodu durumu ve prognostik diğer parametreler arasında bulunan tümör grade'i, tümör boyutu ile ilişkisini değerlendirdik.

Çalışmamızda tüm olguların % 80.4'ünde nükleer ve % 86.4'ünde sitoplazmik Twist-1 ekspresyonu saptadık. Literatürdeki benzer çalışmalarda nükleer Twist-1 ekspresyon görülme sıklığı bizim olgularımıza göre daha azdır. Grup 1'deki olguların % 80.5'inde, grup 2'deki olguların ise % 80'inde Twist-1 pozitifdir. Bizim çalışmamızda normal meme dokusunda olguların % 93.1'inde Twist-1 pozitifliği izlendi. Gort ve ark.'nın (111) çalışmasında olduğu gibi bizim çalışmamızdaki iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmemiş olup Twist-1 ekspresyonunun lenf nodu metataziyle ilişkisi olmadığı sonucuna varıldı. Ancak literatürdeki çalışmaların çoğu Twist-1 ekspresyonunun kötü prognostik bir belirteç olduğunu bildirmektedir (59, 112, 113). Twist-1'in prognostik önemi konusundaki çalışmalar az sayıda olduğundan prognostik öneminin ortaya konulması için ilave çalışmalar gereklidir.

Bizim çalışmamızda Twist-1 ekspresyonunun tümör grade'i ile ilişkisi değerlendirildiğinde: Grade 1 olan 23 olgunun 21'i, Grade 2 olan 51 olgunun 40'ı, Grade 3 olan 23 olgunun 17'si nükleer Twist-1 pozitifliği göstermekteydi. İstatistiksel olarak Twist-1 ekspresyonu ve tümör grade'i arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır.

Twist-1 nükleer pozitif olan olguların % 52'sinde (40/77) tümör boyutu > 2 cm, % 48'inde (37/77) tümör boyutu ≤ 2 cm'dir. Twist-1 nükleer negatif olan grupta da olguların dağılımı benzerdi. Bizim çalışmamızda da tümör boyutu ve Twist-1 ekspresyonu arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır (p=0.957). Literatürde bu konuda yapılmış tek bir çalışma olup, benzer bulgu bildirilmektedir (111).

Çalışmamızda tüm olgularda primer odakta Twist-1 ve ER-β'nın nükleer ekspresyonlarının birlikteliği değerlendirildiğinde olguların % 55.2'sinde her iki belirleyici pozitif iken, % 7.2'sinde her iki belirleyici negatifti. Her iki belirleyicinin pozitif görülme oranı yüksek olmakla birlikte istatistiksel analizde anlamlı bir uyum saptanmadı (p=0.636). Grup 1 olgularda primer odakta olguların % 54.3'ünde her iki belirleyici de nükleer pozitif iken, % 8.6'sında her iki belirleyici negatifti. Östrojen reseptör-β pozitif, Twist-1 negatif olgular ise % 12.5 oranındaydı. Yapılan istatistiksel incelemede grup 1 olgularda ER-β ve Twist-1 nükleer ekspresyonları arasında uyum izlenmedi (p=0.497). Grup 2 olgularda primer odakta olguların % 56'sı her iki belirleyici ile de nükleer pozitif iken, % 6'sı her iki belirleyici ile negatifti. Östrojen reseptör-β pozitif, Twist-1 negatif olgular ise % 14 oranındaydı. Yapılan istatistiksel incelemede grup 2 olgularda da ER-β ve Twist-1 nükleer ekspresyonları arasında anlamlı uyum izlenmedi (p=0.136).

Bizim çalışmamızda ER-α pozitif olguların % 83.6'sı Twist-1 pozitif. Östrojen reseptör-α negatif olguların % 69.6'sı Twist-1 pozitif, aralarında istatistiksel bir ilişki izlenmedi (p=0.142). Van Nes ve ark. (112) yaptığı çalışmada ER-α pozitif olgularda artmış nükleer Twist-1 ekspresyonu kötü prognozla ilişkili bulunmuştur. Bizim çalışmamızda ve literatürdeki diğer çalışmalarda Twist-1'in nükleer ekspresyonu ile ER/PR ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki gösterilmemiştir (p=0.109) (111, 113).

Çalışmamızda tüm olgularda Twist-1 sitoplazmik ekspresyonları da değerlendirilmiş olup, olguların % 86.5'inde pozitif bulunmuştur. Gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark izlenmemiştir (p=0.461). Sitoplazmik Twist-1 ekspresyonunun tümör grade'i ile istatistiksel olarak anlamlı ilişkisi bulunmamıştır (p=0.127).

Bizim çalışmamızda Twist-1 olguların % 5.2'sinde (5/96) orta-kuvvetli derecede pozitif, % 81.3'ünde (78/96) zayıf pozitif iken, % 13.5'inde (13/96) negatif idi.

Biz çalışmamızda tüm olgularda ve gruplar ayrı ayrı Twist-1'in nükleer ve sitoplazmik ekspresyonuyla tümör lokalizasyonunun ilişkisini değerlendirdik. Grup 2'deki tümörü sağ memeye lokalize olgularda Twist-1 nükleer ekspresyon sıklığı

yüksek olup, istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki izlenmiştir ($p=0.016$). Literatürde bununla ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bizim çalışmamızda da tümöral hücreler dışında normal meme duktus epitelinde Twist-1 ile pozitif boyanma izlenmiştir. Twist-1'in tümöral doku dışında normal meme dokusunda da eksprese ediliyor olması, meme dokusunda fizyolojik bir rolünün olabileceğini akla getirmiştir (54, 111).

Sonuç olarak ER- β ve Twist-1'in primer odak ve metastatik lenf nodundaki ekspresyonlarının daha geniş serilerde karşılaştırılması, biyolojik davranıştaki rolleri hakkında ek bilgiler sağlayabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalında 2002-2012 yılları arasında invaziv duktal karsinom tanısı almış 100 olgunun tümör boyutu, tümör lokalizasyonu, tümör grade'i, lenf nodu durumu ve hormonal durumu gözden geçirilerek, tümörün primer ve metastaz odağındaki ER- β ve Twist-1 ekspresyonları ile ilişkileri değerlendirildi. Bunların yanısıra olguların yaş dağılımı da değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar şöyledir:

1. Çalışmaya alınan hastaların yaşları 24 ile 82 arasında değişmekte idi ve yaş ortalaması 54.64'tü.
2. Tümör, olguların % 49'unda sağ meme; % 51'inde sol memeye lokalize idi.
3. Tümör boyutu 0.6 cm ile 7 cm arasında değişmekte olup, tümör boyut ortalaması aksiller lenf nodu metastazı içermeyen grupta 2.27 cm, aksiller lenf nodu metastazı içeren grupta 2.74 cm idi.
4. Olguların % 24'ü grade 1, % 53'ü grade 2, % 23'ü grade 3 idi.
5. Olguların % 68.4'ünde nükleer ER- β , % 46.9'unda sitoplazmik ER- β ekspresyonu görüldü.
6. Lenf nodu negatif grupta (grup 1) ER- β ile olguların % 66.6'sı nükleer, % 33.3'ü sitoplazmik pozitif.
7. Lenf nodu pozitif grupta (grup 2) ER- β ile olguların % 70'i nükleer, % 60'ı sitoplazmik pozitif.
8. Tüm olgularda ER- β 'nın nükleer ekspresyonu ile aksiller lenf nodu durumu, tümör grade'i ve tümör lokalizasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (sırasıyla p değerleri= 0.390. 0.225, 0.872).
9. Grup 1 olgularda tümör grade'i ve lokalizasyonu ile ER- β 'nın nükleer ekspresyon düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (sırasıyla p değerleri 0.803 ve 0.150).
10. Grup 2'deki olgularda ER- β 'nın nükleer ekspresyon düzeyi ile tümör lokalizasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p =0.984).
11. Grup 2'deki olgularda ER- β 'nın nükleer ekspresyon düzeyi ile tümör grade'i arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır (p=0.03).

12. Tüm olgular ele alındığında ER- β 'nin sitoplazmik ekspresyonu ile aksiller lenf nodu durumu arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır (p=0.008).
13. Tüm olgularda sitoplazmik ER- β ekspresyonu ile tümör grade'i ve tümör lokalizasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmamıştır (sırasıyla p değerleri 0.553 ve 0.225).
14. Grup 1 olgularda sitoplazmik ER- β ekspresyon düzeyleri ile tümör grade'i ve lokalizasyonu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bir bulunmamıştır (sırasıyla p değerleri 0.843 ve 0.838).
15. Grup 2'deki olguların sitoplazmik ER- β ekspresyon düzeyleri ile tümör grade'i ve lokalizasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bir bulunmamıştır (sırasıyla p değerleri 0.912, 0.064).
16. Tüm olgularda primer tümörde ER- β 'nin nükleer ekspresyonu ile ER- α arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p=0.175).
17. Tüm olgularda sitoplazmik ER- β ekspresyonu ile ER- α arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki izlenmemiştir (p=0.601).
18. Tüm olgularda primer tümörde ER- β nükleer ekspresyonu ile PR arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p=0.869).
19. Tüm olgularda primer odakta sitoplazmik ER- β ekspresyonu ile PR karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p=0.844).
20. Grup 2'deki olgularda, ER- β 'nin metastatik lenf nodundaki ve primer tümördeki nükleer ekspresyonları arasında istatistiksel anlamlı zayıf bir uyum saptanmıştır (p=0.019).
21. Grup 2'de, ER- β 'nin metastatik lenf nodundaki ve primer tümördeki sitoplazmik ekspresyonları arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmamıştır (p=0.529).
22. Tüm olgulardaki ER- α ve PR ekspresyonları (hormonal durum) ile ER- β 'nin nükleer ve sitoplazmik ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (sırasıyla p=0.329 ve 0.981).
23. Grup 1'deki olguların hormonal durumu ile ER- β 'nin nükleer ve sitoplazmik ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (sırasıyla p=0.356 ve 0.875).

24. Grup 2'deki olguların hormonal durumu ile ER- β 'nin nükleer ve sitoplazmik ekspresyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (sırasıyla $p=0.789$ ve 0.859).
25. Grup 1 ve grup 2'deki olguların nükleer ER- β ekspresyonlarının hormonal durumlarına göre dağılımları istatistiksel değerlendirme için yetersiz olduğundan aralarında karşılaştırma yapılamadı.
26. Grup 1 ve grup 2'deki olguların sitoplazmik ER- β ekspresyonlarının hormonal durumlarına göre olgu dağılımlarına bakıldığında iki grup arasında belirgin farklılık görülmemiştir ($p>0.05$).
27. Tümör boyutu ile ER- β nükleer ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p=0.657$).
28. Tüm olgularda tümör komşuluğundaki normal meme dokusunda olguların % 89.8'inde (80/89) nükleer ER- β ekspresyonu izlenmiştir.
29. Grup 1'de olguların 46'sında tümör komşuluğunda normal meme dokusu değerlendirilebilmiş olup % 89.1'inde (41/46) nükleer ER- β pozitifliği izlenmiştir.
30. Grup 2'de ise olguların 43'ünde tümör komşuluğunda normal meme dokusu değerlendirilebilmiş olup % 90.6'sı (39/43) nükleer ER- β pozitifliği izlenmiştir.

Twist-1 ekspresyonu ile ilgili bulgular

1. Nükleer Twist-1 ekspresyonu tüm olguların % 80.3'ünde (78/97) pozitif olup, % 19.5'inde (19/97) negatifti. Grup 1 olguların % 95'inde (42/44), grup 2 olguların % 80'inde (40/42) nükleer Twist-1 ekspresyonu izlenmiştir.
2. Tüm olgular ele alındığında nükleer Twist-1 ekspresyonunun tümör grade'i, tümör lokalizasyonu ve lenf nodu durumuyla arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p değerleri sırasıyla 0.229, 0.015 ve 0.105).
3. Grup 1'de Twist-1 nükleer ekspresyon düzeyi ile tümör grade'i ve lokalizasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p değerleri sırasıyla 0.747, 0.301).

4. Grup 2'de ise Twist-1 nükleer ekspresyon düzeyi ile tümör grade' i arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır (p= 0.456).
5. Grup 2'de ise Twist-1 nükleer ekspresyon düzeyi ile tümör lokalizasyonu arasında anlamlı ilişki bulunmuştur (p= 0.016). Grup 2'de Twist-1 ile pozitif olan 40 olgunun 25'i sağ meme (% 62.5), 15'i ise sol meme yerleşimlidir.
6. Twist-1 olguların % 86.5'inde (83/96) sitoplazmik pozitif , % 13.5'inde (13/96) negatif bulunmuştur.
7. Tüm olgularda sitoplazmik Twist-1 ekspresyonu ile tümör lokalizasyonu, tümör grade'i ve lenf nodu durumu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p değerleri sırasıyla 0.127, 0.461, 0.461).
8. Grup 1'deki olgularda Twist-1'in sitoplazmik ekspresyonu ile tümör grade'i ve tümör lokalizasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p değerleri 0.087, 0.399).
9. Grup 2'deki olgularda Twist-1'in sitoplazmik ekspresyonu ile tümör grade'i ve tümör lokalizasyonu arasında istatistiksel anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p=0.049, 0.268).
10. Grup 2'deki 50 olgunun % 46.9'unda (23/49) metastatik lenf nodlarında nükleer Twist-1 pozitifliği olup, % 53.1'inde (26/49) negatiftir.
11. Grup 2'deki olgularda, Twist-1'in metastatik lenf nodundaki ve primer tümördeki nükleer ekspresyonu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p=0.229).
12. Grup 2'deki olgularda, Twist-1'in metastatik lenf nodundaki ve primer tümördeki sitoplazmik ekspresyonları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p=0.054).
13. Primer tümörde Twist-1'in nükleer ekspresyonu ile ER- α arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p=0.142).
14. Tüm olgularda sitoplazmik Twist-1 ekspresyonu ile ER- α arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p=0.918).
15. Primer tümörde Twist-1'in nükleer ekspresyonu ile PR arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (p=0.067).

16. Grup 1 ve 2'deki olgulardaki hormonal durum ile Twist-1'in nükleer ve sitoplazmik ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır (sırasıyla $p=0.109$ ve 0.483).
17. Grup 1'deki olguların hormonal durumu ile ER- β 'nin nükleer ve sitoplazmik ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (sırasıyla $p=0.139$ ve 0.070).
18. Grup 2'deki olguların hormonal durumu ile ER- β 'nin nükleer ve sitoplazmik ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (sırasıyla $p=0.429$ ve 0.198).
19. Tüm olguların 46'sında tümör boyutu ≤ 2 cm olup, 50'sinde > 2 cm'dir. Tümör boyutu ≤ 2 cm olan olguların 37'sinde, > 2 cm olan olguların ise 40'ında Twist-1 pozitifdir. İstatistiksel olarak Twist-1 ekspresyonu ile tümör boyutu arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p=0.957$).
20. Tümör komşuluğundaki normal meme dokusunda 88 olgunun % 93.1'inde (82/88) nükleer Twist-1 ekspresyonu izlenmiştir.

Östrojen reseptör- β ve Twist-1 ekspresyonlarının birlikte değerlendirilmesi

1. Tüm olguların % 55.2'sinde (53/96) primer odakta her iki belirleyici ile nükleer pozitiflik mevcuttu. İstatistiksel olarak ER- β ve Twist-1 nükleer ekspresyonları arasında uyum izlenmedi ($p=0.636$).
2. Grup 1 olguların % 54.3'ünde (25/46) Twist-1 ve ER- β ekspresyonu pozitif iken, % 8.6'sı (4/46) her iki belirleyici negatifti. Yapılan istatistiksel incelemede bu grupta ER- β ve Twist-1 nükleer ekspresyonları arasında uyum izlenmedi ($p=0.497$).
3. Grup 2 olguların % 56'sında (28/50) primer odakta her iki belirleyici ile nükleer pozitiflik mevcut olup, % 6'sında (3/50) her iki belirleyici negatifti. Olguların % 24'ünde (12/50) ER- β nükleer negatif olup, Twist-1 pozitif. İstatistiksel olarak bu olgularda ER- β ve Twist-1 nükleer ekspresyonları arasında uyum izlenmedi ($p=0.136$).

4. Grup 1 olguların % 31.1'inde (14/45) primer odakta her iki belirleyici ile sitoplazmik pozitiflik olup, % 15.5'inde (7/45) her iki belirleyici negatifti. İstatistiksel olarak bu olgularda ER- β ve Twist-1 sitoplazmik ekspresyonları arasında uyum izlenmedi ($p=0.078$).
5. Grup 2 olguların % 56'sında (28/50) primer odakta her iki belirleyici ile sitoplazmik pozitiflik olup, % 6'sında (3/50) her iki belirleyici negatifti. Olguların % 34'ünde (17/50) ER- β sitoplazmik pozitif olup, Twist-1 negatifti. İstatistiksel olarak bu olgularda ER- β ve Twist-1 sitoplazmik ekspresyonları arasında uyum izlenmedi ($p=0.336$).
6. Olguların % 26.5'inde (13/49) metastatik lenf nodunda her iki belirleyici ile nükleer pozitiflik izlendi. Olguların % 36.7'sinde (18/49) her iki belirleyici negatiftir. Yapılan istatistiksel incelemede metastatik lenf nodunda ER- β ve Twist-1 nükleer ekspresyonları arasında uyum izlenmedi ($p=0.357$).
7. Metastatik lenf nodlarının % 26'sında (13/50) her iki belirleyici ile sitoplazmik ER- β ve Twist-1 pozitif iken, her iki belirleyicinin negatif olduğu olgu yoktur. Yapılan istatistiksel incelemede metastatik lenf nodunda ER- β ve Twist-1 sitoplazmik ekspresyonları arasında uyum izlenmedi ($p=0.027$).

KAYNAKLAR

1. Rosai J. Breast. In: Rosai J, editor. Rosai and Ackerman's Surgical Pathology. Ninth ed. New York: Mosby; 2004.p.1787.
2. Erhan Y. Meme Kanseri. In: Mocan G.Özdamar Ş, Zergeroğlu S. Temel Patoloji. Ankara: Güneş Kitabevi: 2007.s.723-42.
3. Lester SC. The Breast. In: Kumar V, Abbas A, Fausto N, Aster J, editor. Pathologic Basis of Disease. Eighth ed. Philadelphia: Saunders; 2010.p.1068-95.
4. Cheng G, Li Y, Omoto Y, et al. Differential regulation of estrogen receptor (ER) α and ER β in primate mammary gland. J Clin Endocrinol & Metab 2005; 90(1): 435-44.
5. Fox EM, Davis RJ, Shupnik MA, et al. ER- β in breast cancer-onlooker, passive player or active protector? Steroids 2008; 73: 1039-51.
6. Kuiper G, Carlsson B, Grandien K, et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors- α and - β . Endocrinology 1997; 138(3): 863-70.
7. Yager JD, Davidson NE. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. N Engl J Med 2006; 354: 270-82.
8. Toft D, Shyamala G, Gorski J. A receptor molecule for estrogens: studies using a cell-free system. Dept Physiol & Biophys, University of Illinois, USA 1967; 57: 1740-43.
9. Kuiper G, Enmark E, Peltö-Huikko M, et al. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. Proc Natl Acad Sci 1996; 93: 5925-30.
10. Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER- β ; identification and characterization of a novel human estrogen receptor. FEBS Lett 1996; 392: 49-53.
11. Taylor AH, Al-Azzawi F. Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. J Mol Endocrinol 2000; 24: 145-55.
12. Omoto Y, Inoue S, Ogawa S, et al. Clinical value of the wild-type estrogen receptor β expression in breast cancer. Cancer Lett 2001; 163: 207-12.

13. Weihua Z, Makela S, Andersson LC, et al. A role for estrogen receptor β in the regulation of growth of the ventral prostate. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98(11): 6330-35.
14. Valimaa H, Savolainen S, Soukka T, et al. Estrogen receptor- β is the predominant estrogen receptor subtype in human oral epithelium and salivary glands. *J Endocrinol* 2004; 180: 55-62.
15. Makinen S, Makela S, Weihua Z, et al. Localization of oestrogen receptors α and β in human testis. *J Mol Hum Reprod* 2001; 7(6): 497-503.
16. Cheng G, Weihua Z, Makinen S, et al. A role of the androgen receptor in follicular atresia of estrogen receptor β knockout mouse ovary. *Biol Reprod* 2002; 66: 77-84.
17. Lindner V, Kim SK, Karas RH, et al. Increased expression of estrogen receptor-mRNA in male blood vessels after vascular injury. *Circ Res* 1998; 83: 224-29.
18. Barchiesi F, Jackson EK, Imthurn B, et al. Differential regulation of estrogen receptor subtypes α and β in human aortic smooth muscle cells by oligonucleotides and estradiol. *J Clin Endocrinol & Metab* 2004; 89(5): 2373-81.
19. Shughrue PJ, Scrimo P, Merchenthaler. Estrogen binding and estrogen receptor characterization (ER α and ER β) in the cholinergic neurons of the rat basal fore brain. *Neuroscience* 2000; 96: 41 – 49.
20. Mitra SW, Hoskin E, Yudkovitz J, et al. Immunolocalization of estrogen receptor β in the mouse brain: comparison with estrogen receptor- α . *Endocrinology* 2003; 144(5): 2055-67.
21. Bennett HL, Gustafsson JA, Keast JR. Estrogen receptor expression in lumbosacral dorsal root ganglion cells innervating the female rat urinary bladder. *Auto Neurosci* 2003; 105: 90-100.
22. Leygue E, Dotzlaw H, Watson PH, et al. Altered estrogen receptor α and β messenger RNA expression during human breast tumorigenesis. *Cancer Res* 1998; 58: 3197-3201.
23. Ricketts D, Turnbull, Ryall G, et al. Estrogen and progesterone receptors in the normal female breast. *Cancer Res* 1991; 51: 1817-22.

24. Markopoulos C, Berger U, Wilson P, et al. Oestrogen receptor content of normal breast cells and breast carcinomas throughout the menstrual cycle. *Br Med J* 1988; 296: 1349-51.
25. Battersby S, Robertson BJ, Anderson TJ, et al. Influence of menstrual cycle, parity and oral contraceptive use on steroid hormone receptors in normal breast. *Br J Cancer* 1992; 65: 601-607.
26. Shaw JA, Udokang K, Mosquera UJ, et al. Oestrogen receptors alpha and beta differ in normal human breast and breast carcinomas. *J Pathol* 2002; 198: 450-457.
27. Jarvinen TAH, Pelto-Huikko M, Holli K, et al. Estrogen receptor- β is coexpressed with ER- α , PR and associated with nodal status, grade and proliferation rate in breast cancer. *Am J Pathol* 2000; 156: 29-35.
28. Palmieri C, Cheng GJ, Saji S, et al. Estrogen receptor beta in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2002; 9: 1-13.
29. Shaaban AM, O'Neill PA, Davies MPA, et al. Declining estrogen receptor- β expression defines malignant progression of human breast neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 1502-12.
30. Fixemer T, Remberger K, Bonkkoff H. Differential expression of the estrogen receptor beta (Er- β) in human prostate tissue, premalignant changes and in primary, metastatic, and recurrent prostatic adenocarcinoma. *The Prostate* 2003; 54: 79-87.
31. Roger P, Sahla ME, Makela S, et al. Decreased expression of estrogen receptor- β protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer Res* 2001; 61: 2537-41.
32. Speirs V, Parkers M, Kerin MJ, et al. Coexpression of estrogen receptor α and β : poor prognostic factors in human breast cancer? *Cancer Res* 1999; 59: 525-28.
33. Skiliris GP, Carder P, Lansdown M, et al. Immunohistochemical detection of ER- β in breast cancer: towards more detailed receptor profiling? *Br J Cancer* 2001; 84 (8): 1095-98.

34. Marotti JD, Collins L, Hu R, et al. Estrogen receptor- β expression in invasive breast cancer in relation to molecular phenotype: results from the Nurses Health Study. *Mod Pathol* 2010; 23: 197-204.
35. Borgquist S, Holm C, Stendahl M, et al. Oestrogen receptors α and β show different associations to clinicopathological parameters and their co-expression might predict a better response to endocrine treatment in breast cancer. *J Clin Pathol* 2008; 61: 197-202.
36. Fuqua SA, Schiff R, Parra I, et al. Estrogen receptor β protein in human breast cancer: correlation with clinical tumor parameters. *Cancer Res* 2003; 63: 2434-39.
37. Nakopoulou L, Lazaris A, Panayatopoulou EG, et al. The favourable prognostic value of oestrogen receptor β immunohistochemical expression in breast cancer. *J Clin Pathol* 2004; 57: 523-28.
38. Myoshi Y, Taguchi T, Gustafsson J, et al. Clinicopathological characteristics of estrogen- β -positive human breast cancers. *Jpn J Cancer Res* 2001; 92: 1057-61.
39. Simpson P. Maternal-zygotic gene interactions during formation of the dorsoventral pattern in *Drosophila* embryos. *Genetics* 1983; 105: 615-632.
40. Chen ZF, Behringer RR. Twist is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis. *Genes Dev* 1995; 9: 686-99.
41. Thompson E, Newgreen DF. Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer Res* 2005; 65: 5991-95.
42. Puisieux A, Valsesia-Wittmann S, Ansieau S. A twist for survival and cancer progression. *Br J Cancer* 2006; 94: 13-17.
43. Thisse B, Stoetzel C, Gorostiza-Thisse C, et al. Sequence of the twist gene and nuclear localization of its protein in endomesodermal cells of early *Drosophila* embryos. *EMBO J* 1988; 7 (7): 2175-83.
44. Li L, Cserjesi P, Olson EN. Dermo-1: A novel Twist-related bHLH protein expressed in the developing dermis. *Dev Biol* 1995; 172: 280-92.
45. Fu J, Zhang L, He T, et al. Twist represses estrogen receptor- α expression by recruiting the NURD protein complex in breast cancer cells. *Int J Biol Sci* 2012; 8(4): 522-32.

46. Sasic D, Richardson JA, Yu K, et al. Twist regulates cytokine gene expression through a negative feedback loop that represses NF- kappa B activity. *Cell* 2003; 114: 169-80.
47. Mironchik Y, Winnard PT, Vesuna F, et al. Twist overexpression induces in vivo angiogenesis and correlates with chromosomal instability in breast cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 10801–809.
48. Zhang Z, Don Xie D, Li X, et al. Significance of TWIST expression and its association with E-cadherin in bladder cancer. *Hum Pathol* 2007; 38: 598-606.
49. Ohuchida K, Mizumoto K, Ohhashi S, et al. Twist, a novel oncogene, is upregulated in pancreatic cancer: clinical implication of Twist expression in pancreatic juice. *Int J Cancer* 2007; 120: 1634-40.
50. Entz-Werle N, Stoetzel C, Berard-Marec P, et al. Frequent genomic abnormalities at twist in human pediatric osteosarcomas. *Int J Cancer* 2005; 117:349-355.
51. Valsesia-Wittmann S, Magdeleine M, Dupasquier S, et al. Oncogenic cooperation between H-Twist and N-myc overrides failsafe programs in cancer cells. *Cancer Cell* 2004; 6: 625-30.
52. Hoek K, Rimm DL, Williams KR, et al. Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas. *Cancer Res* 2004; 64: 5270-82.
53. Rosivatz E, Becker I, Specht K, et al. Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators Snail, SIP 1 and Twist in gastric cancer. *Am J Pathol* 2002; 161(5): 1881-91.
54. Watanabe O, Imamura H, Shimizu T, et al. Expression of Twist and Wnt in human breast cancer. *Anticancer Res* 2004; 24: 3851 – 56.
55. Kwok WK, Ling MT, Lee TK, et al. Up-regulation of Twist in prostate cancer and its implication as a therapeutic target. *Cancer Res* 2005; 65: 5153-62.
56. Yang J, Mani SA, Donaher JL, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 2004; 117: 927-939.
57. Evron E, Dooley WC, Umbricht CB, et al. Detection of breast cancer in ductal lavage fluid by methylation-specific PCR. *Lancet* 2001; 357: 1335-36.

58. Fackler MJ, McVeigh M, Evron E, et al. DNA methylation of RASSF1A, HIN-1, RAR-beta, Cyclin D2 and Twist in situ and invasive lobular breast carcinoma. *Int J Cancer* 2003; 107: 970-75.
59. Riaz M, Sieuwerts A, Look MP, et al. High Twist-1 mRNA expression is associated with poor prognosis in lymph node-negative and estrogen receptor-positive human breast cancer and is co-expressed with stromal as well as ECM related genes. *Breast Cancer Res* 2012; 14: 2-15.
60. Wang X, Ling MT, Guan XY, et al. Identification of a novel function of Twist, a bHLH protein in the development of acquired taxol resistance in human cancer cells. *Oncogene* 2004; 15: 474-82.
61. Lakhani S, Ellis I, Schnitt S. WHO Classification of Tumours of Breast, Fourth Ed. World Health Organization; 2012; Classification Of Breast Tumors.
62. Stuart J, Collins L. Invasive Breast Carcinoma. In: Epstein J, editor. *Biopsy Interpretation of the Breast*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2009. p. 249-52.
63. Carter D, Schnitt SJ, Mills R. The Breast. In: Mills S, Carter D, Greenson J, Reuter V, Stoler M, editor. *Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology*. Fifth Ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2010. p. 321.
64. Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Invasive Carcinoma of the Breast [online] College of American Pathologists. http://www.cap.org/apps/docs/committees/cancer/cancer_protocols/2013/BreastInvasive_13protocol_3200.pdf.
65. Taylor S, Martin-Hirsch P, Marin FL, et al. Oestrogen receptor splice variants in the pathogenesis of disease. *Cancer Lett* 2010; 288: 133 – 148.
66. Nilsson S, Makela S, Treuter E, et al. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 2001; 81(4): 1535-65.
67. Chen GC, Zeng Q, Tse MK. Estrogen and its receptors in cancer. *Med Res Rev* 2008; 28 (6): 954-74.
68. Shanle EK, Xu W. Selectively targeting estrogen receptors for cancer treatment. *Adv Drug Deliv Rev* 2010; 62 (13): 1265-76.
69. Colditz GA. Relationship between estrogen levels, use of hormone replacement therapy and breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90(11): 814-23.

70. Ström A, Hartman J, Foster JS, et al. Estrogen receptor β inhibits 17 β -estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101(6): 1566-71.
71. Hawkins MB, Thornton JW, Crews D, et al. Identification of third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97(20): 10751-56.
72. Balfe P, McCam AH, Welch HM, et al. Estrogen receptor- β and breast cancer. *J Cancer Surg* 2004; 30: 1043-50.
73. Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, et al. Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor β cx: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Res* 1998; 26 (15): 3505-12.
74. Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, et al. Human estrogen receptor β -gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol & Metab* 1997; 82(12): 4258-65.
75. Morani A, Warner M, Gustafsson JA. Biological functions and clinical implications of oestrogen receptors alpha and beta in epithelial tissues. *J Int Med* 2008; 264: 128-42.
76. Klinge CM. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res* 2001; 29(14): 2905-89.
77. Koide A, Zhao C, Naganuma M, et al. Identification of regions within the F domain of the human estrogen receptor- α that are important for modulating transactivation and protein-protein interaction. *Mol Endocrinol* 2006; 21(4): 829-42.
78. Pratt WB, Jolly DJ, Pratt DV, et al. A region in the steroid binding domain determines formation of the non-DNA-binding, 9s glucocorticoid receptor complex. *J Biol Chem* 1988; 263(1): 267-73.
79. Picard D, Yamamoto KR. Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *J EMBO* 1987; 6(11): 3333-40.
80. Moore JT, McKee DD, Slentz-Kesler K, et al. Cloning and characterization of human estrogen receptor β isoforms. *Biochem and Biophys Res Commun* 1998; 247: 75-78.

81. Green C, Peter M, Speirs V, et al. The potential role of ER- β isoforms in the clinical management of breast cancer. *Histopathol* 2008; 53: 374-80.
82. O'neill PA, Davies A, Shaaban AM. Wild-type oestrogen receptor beta (ER β 1) mRNA and protein expression in Tamoxifen-treated post-menopausal breast cancers. *Br J Cancer* 2004;91(9): 1694-1702.
83. Cvorovic A, Tzagarakis-Foster C, Tatomer D, et al. Distinct roles of unliganded and liganded estrogen receptors in transcriptional regression. *Mol Cell* 2006; 21: 555-64.
84. Carroll JS, Brown M. Estrogen receptor target gene: an evolving concept. *J Mol Endocrinol* 2006; 20 (8): 1707-14.
85. Eeckhoutte J, Keeton EK, Lupien M, et al. Positive cross-regulatory loop ties GATA-3 to estrogen receptor- α expression in breast cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 6477-83.
86. Björnström L, Sjöberg M. Estrogen receptor-dependent activation of AP-1 via non-genomic signalling. *Nucl Rec* 2004; 2: 3.
87. Cascio S, Bartella V, Garofalo C, et al. Insulin-like growth factor-1 differentially regulates estrogen receptor-dependent transcription at estrogen response element and AP-1 sites in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2007; 282: 3498-3506.
88. Mourits MJE, De Bock GH. Exogenous steroids for menopausal symptoms and breast / endometrial cancer risk. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 16: 494-96.
89. Russo J, Russo IH. The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006; 102(1-5): 89-96.
90. Han WD, Si YL, Zhao YL, et al. GC-rich promoter elements maximally confers estrogen-induced transactivation of LRP16 gene through Er- α / SP 1 interaction in MCF-7 cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008; 109: 47-56.
91. Vendrell JA, Ghayad S, Ben-Larbi S, et al. A20/ TNFAIP3, a new estrogen – regulated gene that confers tamoxifen resistance in breast cancer cells. *Oncogene* 2007; 26: 4656-67.
92. Lin C, Ström A, Kong SL, et al. Inhibitory effects of estrogen receptor beta on specific hormone-responsive gene expression and association with disease outcome in primary breast cancer. *Breast Cancer Res* 2007; 9: R25.

93. Mueck Ao, Seeger H. Breast Cancer: Are oestrogen metabolites carcinogenic? *Maturitas* 2007; 57: 42 - 46.
94. Au WW, Abdou-Salama S, Al-Hendy A. Inhibition of growth of cervical cancer cells using a dominant negative estrogen receptor gene. *Gynecol Oncol* 2007; 104(2): 276-80.
95. Zhao C, Matthews J, Tujague M, et al. Estrogen receptor β 2 negatively regulates the transactivation of estrogen receptor α in human breast cancer cells. *Cancer Res* 2007; 67: 3955-62.
96. Macaluso M, Montanari M, Noto PB, et al. Nuclear and cytoplasmic interaction of PRb2/p130 and ER- β in MCF-7 breast cancer cells. *Ann Oncol* 2006; 17: 27-29.
97. Shoker BS, Jarvis C, Sibson R et al. Oestrogen receptor expression in the normal and precancerous breast. *J Pathol* 1999; 188: 237-44.
98. Herynk MH, Fuqua S. Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocr Rev* 2003; 25(6): 869-98.
99. Foley EF, Jazaeri AA, Shupnik MA, et al. Selective loss of estrogen receptor β in malignant human colon. *Cancer Res* 2000; 60: 245-48.
100. Bardin A, Boulle N, Lazennec G, et al. Loss of ER- β expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocr Relat Cancer* 2004; 11: 537-51.
101. Rody A, Holtrich U, Solbach C, et al. Methylation of estrogen receptor- β promoter correlates with loss of ER- β expression in mammary carcinoma and is an early indication marker in premalignant lesions. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12: 903-16.
102. Sugiura H, Toyama T, Hara Y, et al. Expression of estrogen receptor β wild-type and its variant, ER β cx/ β 2 is correlated with better prognosis in breast cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2007; 37(11): 820-28.
103. Mann S, Laucirica R, Carlson N, et al. Estrogen receptor beta expression in invasive breast cancer. *Hum Pathol* 2000; 32: 113-18.
104. Trimboli AJ, Fukino K, Bruin A, et al. Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer. *Cancer Res* 2008; 68 (3): 937-45.

105. Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Cell Biol* 2005; 17: 548-58.
106. Foubert E, Craene BD, Berx G. Key signalling nodes in mammary gland development and cancer the snail1 Twist 1 conspiracy in malignant breast cancer progression. *Breast Cancer Res* 2010; 12 (206): 2-11.
107. Derycke L, Bracke M et al. N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. *Int J Dev Biol* 2004; 48: 463- 76.
108. Sarrio D, Rodriguez-Pinilla SM, Hardisson D, et al. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res* 2008; 68 (4): 989-99.
109. Niki C, Tiniakos D, Palaiologou, et al. Estrogen receptor beta 2 associated with poor prognosis in estrogen receptor alpha-negative breast carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2013; 139: 1489-98.
110. Mandusic V, Dimitrijevic B, Nikolic-Vukosavljevic D, et al. Different associations of estrogen receptor β isoforms, ER β 1 and ER β 2, expression levels with tumor size and survival in early- and late-onset breast cancer. *Cancer Lett* 2012; 321: 73-79.
111. Gort EH, Suijkerbuijk PMK, Roothaan SM, et al. Methylation of the Twist-1 promoter, Twist-1 mRNA levels, and immunohistochemical expression of Twist-1 in breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 3325-30.
112. Van Nes JGH, Kruijf EM, Putter H, et al. Co-expression of Snail and Twist determines prognosis in estrogen receptor-positive early breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 133: 49-59.
113. Soini Y, Tuhkanen H, Seronen R, et al. Transcription factors Zeb1, Twist and Snail in breast carcinoma. *BMC Cancer* 2011; 11: 1-8.

