

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM
ANABİLİM DALI

**İnsan Granuloza Hücreli Tümörlerde mTOR
Protein Ekspresyonunun Histolojik ve Klinik
Tümör Agresivitesi Belirteçleri ile Olan İlişkisi**

(UZMANLIK TEZİ)

DR. ŞAHİN ONUR GÜRALP

İSTANBUL-2012

ÖNSÖZ

Asistanlığım süresince engin bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, uzmanlık yolunda bana emek veren başta Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Veli Yedigöz olmak üzere tüm saygıdeğer hocalarıma;

Tez çalışmam boyunca zamanını ve emeğini esirgemeyen, bilgileriyle bana yol gösteren, ayrıca benim ve tüm asistan arkadaşlarımın eğitimine gönülden emek veren tez danışman hocam Prof. Dr. Macit Arvas'a ve jinekolojik onkolojideki hocalarım Prof. Dr. Tugan Beşe, Prof. Dr. Fuat Demirkıran ve Prof. Dr. Cevdet Şanioğlu'na;

Tez çalışmam boyunca destek olan ve her sıkıştığım da yardımına koşan Doç. Dr. Özgür Öktem'e,

Asistanlık dönemim boyunca omuz omuza çalışıp, Cerrahpaşa'nın iyi kötü tüm zamanlarını paylaştığımız sevgili doktor, ebe ve hemşire arkadaşlarıma, tüm klinik çalışanlarına;

Çok sevdiğim Tarık Hocama ve yaşamımın her aşamasında yanımda olup bana hep yardım eden, beni ben yapan, sevgi ve sıcaklığını her zaman hissettiğim çok sevdiğim babama;

Teşekkür ederim.

Dr. Şahin Onur Güralp

08.09.2012

BEYAN

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

Dr. Şahin Onur GÜRALP

İÇİNDEKİLER

	SAYFA NO.
ÖNSÖZ	II
BEYAN	III
İÇİNDEKİLER	IV-V
TABLolar, ŞEKİLLER VE RESİMLER LİSTESİ	VI-VII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.A GRANÜLOZA HÜCRELİ OVER TÜMÖRLERİ	3
2.B ETYOLOJİ VE RİSK FAKTÖRLERİ	4
2.B.1 SİTOGENETİK BOZUKLUKLAR	4
2.B.2 GENETİK SENDROMLAR	4
2.B.3 HİPERSTİMÜLASYON	5
2.C. KLİNİK TABLO VE TANI	5
2.D. PATOLOJİ	6
2.D.1 FSH ARACILI SİNYAL YOLAKLARI	8
2.D.2 TGF-B SÜPER AİLE ÜYELERİ	9
2.D.3 NÜKLEER RESEPTÖRLER	10
2.D.4 NÜKLEER FAKTÖR KAPPA B	10
2.D.5 ONKOGENLER VE TÜMÖR SÜPRESÖRLERİ	11
2.D.6 DİĞER SİNYAL FAKTÖRLERİ	12
2.D.7 APOPTOZ	12
2.D.8 FOXL2	12
2.E TEDAVİ	13
2.F SAĞKALIM	14
2.G MTOR	14
3. YÖNTEM VE GEREÇ	18
3.A PATOLOJİK İNCELEME	18
3.B İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME	25
4. BULGULAR	26

	SAYFA NO.
5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇ	36
7. ÖZET	37
8. İNGİLİZCE ÖZET	38
9. KISALTMALAR	39
10.KAYNAKLAR	40

TABLolar, ŞEKİLLER VE RESİMLER LİSTESİ

TABLOLAR

		SAYFA NO.
Tablo 2.A.1	Over tümörlerinin histolojik sınıflandırması	3
Tablo 4.1	MTOR boyanma yüzdesi ve niteliğinin çeşitli parametrelerle ilişkisinin değerlendirilmesi	30

ŞEKİLLER

Şekil 2.D.1	FSH reseptörü üzerinden PKA aktivasyonu	8
Şekil 2.D.2	FSH ve Tirozin kinaz yolları arasındaki çapraz etkileşimler	9
Şekil 2.D.3	SMAD transkripsiyon yolunun aktive edilmesi	10
Şekil 2.D.4	Çeşitli reseptörler üzerinden NF-κ-B aktivasyonu	11
Şekil 2.G.1	Besin ve büyüme faktörlerinin varlığında mTOR üzerinden hücre proliferasyonunun düzenlenmesi	15

RESİMLER

SAYFA NO.

Resim 3.A.1	F-mTOR için pozitif kontrol grubu, normal meme dokusu (x200)	19
Resim 3.A.2	mTOR için pozitif kontrol grubu, meme duktal karsinomu (x400)	19
Resim 3.A.3	Boyanma yok (x200)	20
Resim 3.A.4	Yüzde 5 boyanma (x200)	20
Resim 3.A.5	Yüzde 30 boyanma (x200)	21
Resim 3.A.6	Yüzde 50 boyanma (x200)	21
Resim 3.A.7	Yüzde 90 boyanma (x200)	22
Resim 3.A.8	Yüzde 100 boyanma (x200)	22
Resim 3.A.9	Bir pozitif boyanma (x200)	23
Resim 3.A.10	İki pozitif boyanma (x200)	23
Resim 3.A.11	Üç pozitif boyanma (x200)	24
Resim 3.A.12	Dört pozitif boyanma (x200)	24
Resim 4.1	mTOR için %30, bir pozitif boyanma görülen granüloza hücreli tümör (x200)	27
Resim 4.2	mTOR için %100, iki pozitif boyanma görülen granüloza hücreli tümör (x200)	27
Resim 4.3	mTOR için %90, üç pozitif boyanma görülen granüloza hücreli tümör (x200)	28
Resim 4.4	mTOR için %30, bir pozitif boyanma görülen granüloza hücreli tümör (x400)	28
Resim 4.5	mTOR için %90, üç pozitif boyanma görülen granüloza hücreli tümör (x400)	29
Resim 4.6	mTOR için %100, üç pozitif boyanma görülen granüloza hücreli tümör (x400)	29
Resim 4.7	F-mTOR için %5, dört pozitif boyanma görülen granüloza hücreli tümör (x200)	31
Resim 4.8	F-mTOR için %5, dört pozitif boyanma görülen granüloza hücreli tümör (x400)	31
Resim 4.9	mTOR için %100, dört pozitif boyanma görülen granüloza hücreli tümör (x200)	32
Resim 4.10	mTOR için %100, dört pozitif boyanma görülen granüloza hücreli tümör (x400)	32

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Granüloza hücreli over tümörleri tüm over kanserlerinin yaklaşık %5'ini oluşturmaktadır. Geç preovulatuvar foliküle ait normal proliferasyon gösteren granüloza hücrelerinden kaynaklandıkları düşünülmektedir. Morfolojik ve biyokimyasal özellikleri tamamen bu hücrelere benzemektedir. Granüloza hücreli over tümörleri diğer over kanserlerinden hormonal aktiviteleri östrojen, inhibin ve antimüllerian hormon salgılayabilmeleri açısından farklıdır. Düşük malignite potansiyeline sahip oldukları düşünülmektedir. Genellikle yavaş ve sessiz bir seyir izlerler. Ancak bu yavaş ve sessiz seyir nedeniyle tümör tekrarlamaı uzun sürelerde gerçekleşmekte, bu da tanıyı zorlaştırmaktadır (1).

Günümüze dek birçok araştırma yapılmış olan epitelyal over tümörlerinin aksine granüloza hücreli over tümörlerine neden olan moleküler ve genetik değişiklikler ile ilgili çok az şey bilinmektedir. Yapılan araştırmalar daha çok normal granüloza hücresi proliferasyonunda rol oynayan yollara odaklanmıştır. Bu yolların en önemlisi "FSH reseptör uyarı yolağı"dır. Yakın zamanda erişkin tip granüloza hücreli over tümörlerinin yaklaşık %97'sinde Forkhead box L2 (FOXL2) geninde somatik missense mutasyonu olduğu saptanmıştır. Granüloza hücreli over tümörlerinin tedavisinde cerrahi, adjuvan tedaviler (radyasyon ve konvensiyonel kemoterapi) ve hormon tedavisi (gonadotropin salıverici hormon (GnRH) antagonistleri, tamoksifen ve aromataz inhibitörleri) bulunmaktadır. Metastatik hastalığı olan veya primer cerrahi rezeksiyon sonrası rekürrens görülen hastalarda adjuvan tedavi bir seçenek olmasına rağmen sistemik kemoterapinin etkinliğı net olarak bilinmemektedir. Epitelyal over tümörlerinden edinilen tecrübelerle dayanılarak öncelikli kemoterapi seçeneğı platin bazlı kemoterapidir. Sisplatin ile birlikte doksorubisin, siklofosamid, vinblastin, bleomisin ve etoposid gibi ajanlar denenmiş, yanıt oranlarının %60-83 arasında değıştiğı gözlenmiştir (1). Granüloza hücreli over tümörlerinin moleküler, genetik özelliklerinin daha derinlemesine araştırılmasıyla şüphesiz tedavi seçenekleri artacaktır.

Mammalian Target of Rapamisin (mTOR) bir serin/treonin protein kinaz olup fosfatidil inositol-3-kinaz (PI3K) /AKT sinyal yolağında yer alır. Kanserin hücrel gelişimi, metabolizması ve hücre siklusu ilerlemesinde kritik rol oynamaktadır (2).

PI3K bağımlı iletinin bozulması over, endometrium ve serviks kanserinin de aralarında bulunduğu geniş bir tümör yelpazesine neden olmaktadır. Yapılan klinik çalışmalarda birinci kuşak mTOR inhibitörlerinin over ve endometrium kanserinde umut verici klinik etkinlik gösterdiği saptanmıştır (3). Ancak moleküler bazda bu ilaçlara ait duyarlılık ve direnç oranları bilinmemektedir. Bu noktada granüloza hücreli over tümörlerinde mTOR yolağının aşırı aktivasyonu ile ilgili çalışmaların yetersiz olduğunu görmekteyiz. Çalışmamızda granüloza hücreli over tümörleri kesitlerinde mTOR ve fosfo-mTOR ekspresyonunu inceleyerek, granüloza hücreli over tümörlerinin moleküler genetik özelliklerini daha iyi anlamayı ve bu sayede mTOR inhibitörlerinin tedavide kullanılıp kullanılamayacağını saptamayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.A GRANÜLOZA HÜCRELİ OVER TÜMÖRLERİ

Granüloza hücreli over tümörleri seks kord stromal tümörler grubunda yer almaktadırlar. Tüm over kanserlerinin yaklaşık %5'ini, malign seks kord stromal tümörlerin ise %70'inden fazlasını oluşturmaktadır (Tablo 2.A.1) (3). Bu tümörlerin ortalama tanı yaşı 52'dir. Ancak doğumdan 100 yaşına kadar herhangi bir zamanda ortaya çıkabilir. Yüzde yetmişinden fazlası östrojen salgılamaktadır (3).

Tablo 2.A.1. Over tümörlerinin histolojik sınıflandırması

1. Epitelyal tümörler
 - a. Seröz tümörler
 - b. Müsinöz tümörler
 - c. Endometrioid tümörler
 - d. Berrak hücreli tümör
 - e. Tranzisyonel hücreli tümör
 - f. Skuamöz hücreli tümör
 - g. Karışık tip epitelyal tümör
 - h. Farklılaşmamış karsinom
 2. Seks kord stromal tümörler
 - a. Granüloza hücreli tümör
 - b. Tekoma-fibroma grubu
 - c. Sertoli stromal hücreli tümör
 - d. Sınıflandırılmayan veya karışık tip seks kord stromal tümörler
 - e. Sertoli hücreli tümör
 3. Germ hücreli tümörler
 - a. Disgerminom
 - b. Endodermal sinüs tümör
 - c. Embriyonel karsinom
 - d. Poliembriyoma
 - e. Koryokarsinoma
 - f. Teratom
 - g. Karışık formlar
 4. Metastatik tümörler
-

Granüloza hücreli over tümörlerinin juvenil ve erişkin olmak üzere 2 tipi bulunmaktadır. Olguların %95'i erişkin tiptir (1). Granüloza hücreli over tümörleri geç preovulatuvar folikülün folikül uyarıcı hormona (FSH) yanıt veren granüloza hücrelerinin moleküler profiline benzer bir profil sergilemektedir (4, 5). Tümörün kendisine özgü hormon aktivitesi sayesinde çok erken evrede saptanabilmekte ve bu nedenle epitelyal over tümörlerine kıyasla daha iyi prognozlu oldukları kabul edilmektedir. Ancak yavaş ve sessiz seyirleri ve rekürrens oranlarının yüksek olması nedeniyle hastaların %80'inde ileri evre veya rekürrens görülmektedir (6).

2.B ETYOLOJİ VE RİSK FAKTÖRLERİ

2.B.1 Sitogenetik Bozukluklar

Diğer over tümör tipleriyle karşılaştırıldığında granüloza hücreli over tümörleri göreceli olarak daha kararlı bir karyotipe sahiptir. Yapılan az sayıdaki sitogenetik çalışmada hastaların %14-33'ünde trizomi 12, %25-33'ünde trizomi 14 ve %35-40'ında monozomi 22 saptanmıştır (7,8). Granüloza hücreli over tümörlerinde anoploidi görülme sıklığı %5-20 arasındadır; ancak ne karyotip ne de ploidinin prognostik önemi yoktur (7, 9-11).

2.B.2 Genetik Sendromlar

Peutz-Jeghers sendromu (PJS) otozomal dominant geçişli bir hastalık olup gastrointestinal hamartamatöz polipozis, çeşitli organlarda benign ve malign tümör riskinde artış ve dudaklar, bukkal mukoza ve parmaklarda mukokutanöz pigmentasyon ile karakterizedir (12). PJS görülen kadınlarda morfolojik olarak granüloza hücreli over tümörü ve sertoli hücreli tümör arasında bir morfolojik görünüme sahip olan özgül bir over seks kord stromal tümör görülebilmektedir (13).

Juvenil tip granüloza hücreli tümörler Ollier hastalığı ve Mafucci sendromu ile ilişkilendirilmiştir (14-18).

2.B.3 Hiperstimülasyon

Overlerin selektif östrojen reseptör modülatörü (SERM), klomifen sitrat gibi ovülasyon uyarılmasında kullanılan ilaçlara veya infertilite tedavisinde kullanılan gonadotropinlere sürekli olarak maruz kalmasının granüloza hücreli over tümörü gelişimi riskinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (19, 20). Ancak toplum geneline kıyasla infertilite tedavisi alan hastalarda muayene ve tarama sıklığının daha fazla olmasının sonuçları etkileyebileceği de düşünülmektedir (21, 22). Ayrıca ilaçlardan bağımsız olarak infertilitenin kendisinin de over kanseri gelişimi açısından başlı başına bir risk faktörü olabileceği öne sürülmüştür (23-26).

2.C. KLİNİK TABLO VE TANI

Hastaların çoğu karın ağrısı, distansiyon veya şişkinlik gibi özgül olmayan semptomlarla başvurmaktadır (27). Tümörden salınan östrojene bağlı olarak endokrin bulgular sık görülmektedir. Puberte öncesi kızlarda izoseksüel pseudo puberte prekoks görülebilir. Üreme çağındaki kadınlarda menoraji, ara kanama veya sekonder amenore gibi adet düzensizlikleri ve menopoza sonrası kadınlarda vajinal kanama en sık semptomdur (28). Granüloza hücreli tümörlerde damarlanmanın fazla olması nedeniyle hastaların %10'unda tümörün yırtılmasına bağlı olarak karın ağrısı ve akut hemoperitoneum ortaya çıkmaktadır (29). Östrojene uzun süreli maruziyet sonucu hem endometrial hiperplazi hem de eş zamanlı endometrial adenokarsinom gözlenebilir (30-32).

2.D. PATOLOJİ

Granüloza hücreli over tümörleri genellikle hem solid hem kistik bileşenlere sahip olup hemoraji alanları sık görülmektedir (3). Ortalama tümör boyutu yaklaşık 12 cm'dir (3). Sıklıkla unilateraldir. Mikrofoliküler, makrofoliküler, insular veya trabeküler olmak üzere birçok karakteristik görünümünden biri bulunabilir. Tipik call-exner cisimsikleri genellikle mikrofoliküler paternde izlenmektedir. Daha nadir olarak bu tümörler daha az diferansiye olabilir ve girus şeklinde veya diffüz sarkomatoid biçimde gözlenebilir. Histolojik alt tipin prognoza etkisi yoktur ancak yüksek nükleer grade, atipi ve yüksek mitotik indeks kötü klinik seyir ile ilişkilendirilmiştir (3).

İmmünohistokimyasal yöntemlerle inhibin varlığının gösterilmesi granüloza hücreli tümörlerin patolojik tanısında yardımcıdır çünkü inhibin üretimi diğer over lezyonlarında neredeyse hiç gözlenmemektedir. Son derece nadir olarak seks kord elementleri, sinsityotrofoblastların görüldüğü uterin tümörler de inhibin pozitif olarak saptanabilir. Fossi ve arkadaşları (33) evre 1 veya 2 tümörlerde daha yüksek evrelere kıyasla inhibin saptanma oranının daha yüksek olduğunu gözlemlemiştir. Bu bulgudan yola çıkılarak inhibin pozitifliğinin daha iyi prognoz ile ilişkili olduğu söylenebilir.

Normal granüloza hücrelerinin proliferasyonu FSH tarafından uyarılmaktadır. Bu nedenle infertilite tedavisinde olduğu gibi overin FSH tarafından aşırı uyarılmasının granüloza hücreli tümör gelişimine yol açıp açmayacağı araştırılmıştır. Fuller ve ark. (5) granüloza hücreli over tümörlerinde FSH sinyal yolağının aktivitesini araştırmış ve FSH reseptörü veya $G\alpha$ genlerinde aktive edici mutasyon saptayamamışlardır. İnhibinin FSH üretimi üzerine negatif geri besleme özelliği bulunmaktadır. Ayrıca inhibin progesteron üretimini uyarmakta ve östradiol üretimi üzerinde negatif geri besleme sağlamaktadır (34). Granüloza hücreli over tümörü görülen postmenopozal kadınlarda inhibin salgısı FSH düzeylerini baskılamakta, bu da inhibinin biyolojik olarak aktif olduğunu göstermektedir. İnhibinin granüloza hücreli over tümörü patogenezendeki rolü henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Granüloza hücreli over tümörlerinin inhibin reseptörü veya sinyal yolağı düzeyinde meydana gelen bir mutasyon sonucu inhibine karşı dirençli olduğu öne sürülmüştür. İnhibin sinyalinin kaybı inhibisyonun yapılamaması ve granüloza hücrelerinde kanser gelişimi anlamına geliyor olabilir. Granüloza hücreli over tümörlerinde yüksek düzeyde östrojen reseptörü beta olduğu saptanmıştır. Ancak bu reseptörlerin patogenezendeki

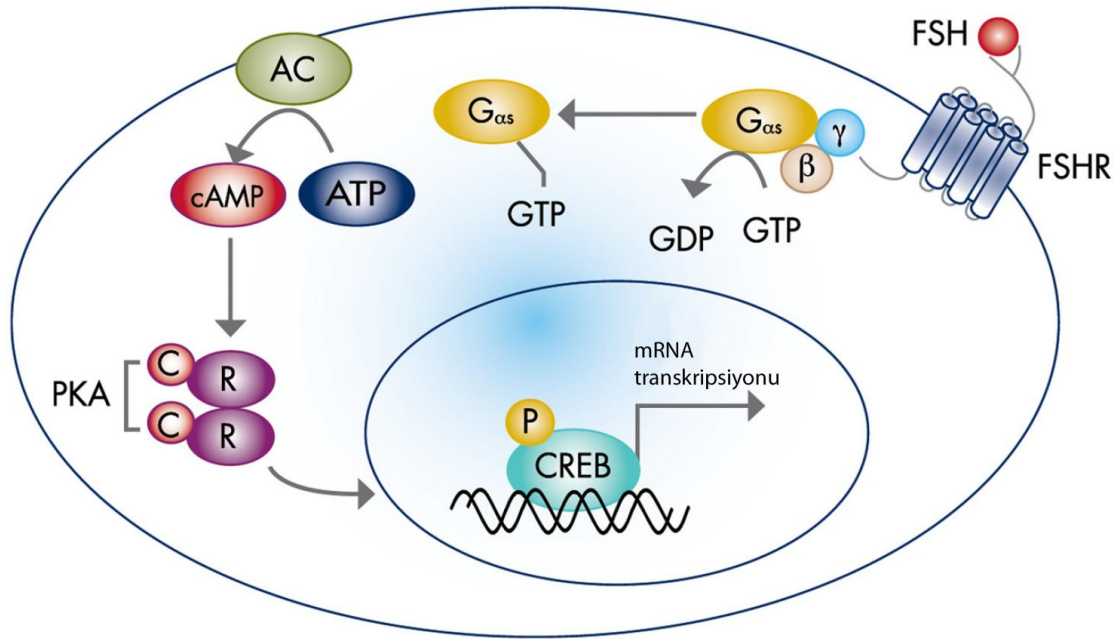
rolü henüz bilinmemektedir (3). Granüloza hücreli over tümörü gelişimine neden olan moleküler değişiklikler granüloza hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde rol oynayan sinyal yollarının bozulmasıdır. Aslında granüloza hücreli over tümörleri preovulatuvar folikülün çoğalan granüloza hücrelerinin birçok özelliğine sahiptir. Bu özellikler arasında FSH reseptör ekspresyonu (35), FSH bağlanması (36, 37), östrojen sentezi (6), GATA-4 ekspresyonu (38, 39) ve biyolojik olarak aktif inhibinin sentezini sağlayan inhibin alt ünite genlerinin ekspresyonu (40) bulunmaktadır (1, 40). Bu moleküler fenotip FSH reseptör sinyal yolağının uyarılması ile uyumludur. Aynı şekilde granüloza hücreli over tümörünün gen ekspresyon profili FSH ile uyarılmış granüloza hücrelerinin profiline benzer olup protein kinaz A'nın düzenleyici subunitesi, siklin D2 ve geç yanıt belirteci siklooksigenaz-2 (COX-2) ekspresyonu artmaktadır (1).

Granüloza hücreli over tümörlerinde patogeneizde rol oynaması olası yollar şunlardır:

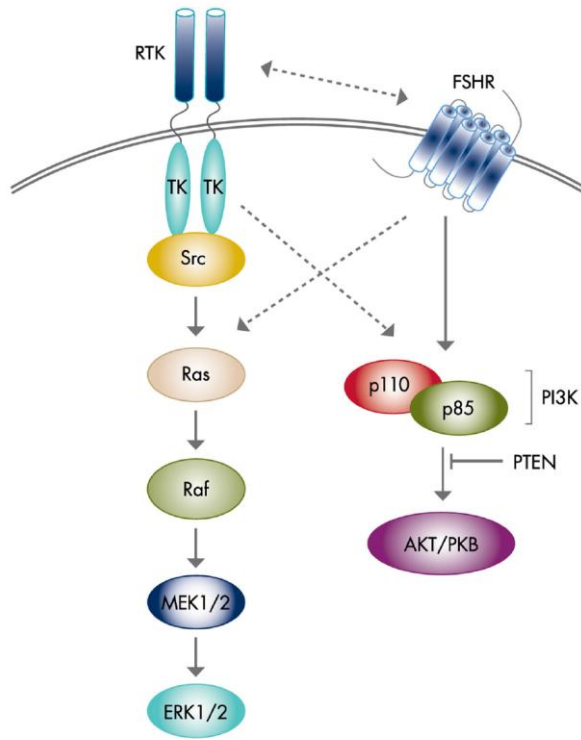
- a) FSH'a bağlı sinyal yolları**
 - a.** Siklik adenosin monofosfat/protein kinaz A (cAMP/PKA)
 - b.** PI3K/AKT
 - c.** Epidermal büyüme faktörü (EGF)
 - d.** Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)
 - e.** Diğer tirozin kinazlar
- b) Dönüştürücü büyüme faktörü (TGF) β süper aile üyeleri**
 - a.** İnhibin subuniteleri
 - b.** İnhibin/aktivin reseptörleri
 - c.** SMAD proteinleri
- c) Nükleer reseptörler**
- d) Nükleer faktör- κ -B**
- e) Onkogenler ve tümör supresörler**
- f) Diğer sinyal faktörleri**
 - a.** Wnt/ β katenin
 - b.** IGF sistemi
 - c.** GATA-4
- g) Apoptoz**
- h) FOXL2**

2.D.1 FSH Aracılı Sinyal Yolakları

Normal overde granüloza hücre proliferasyonundaki en hızlı dönem folikül gelişiminin preantral evresi ile preovülatuar evresi arasındadır (41). FSH reseptörü preantral granüloza hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilmektedir. Buna karşılık preantral folikülogenez intraovaryan faktörlerin otokrin ve parakrin etkilerine bağımlı olup gonadotropin uyarısından bağımsız olarak ilerleyebilmektedir. Puberte sonrası ovülasyona uğrama olasılığı olan folikül evresine kadar olan büyüme kesinlikle hipofizer gonadotropinlere bağımlıdır. Bu faz FSH reseptörünün bulunmasına bağlı olan hücrenin FSH reseptivitesi ile aynı zamanda denk gelmektedir (1). (Şekil 2.D.1,2)



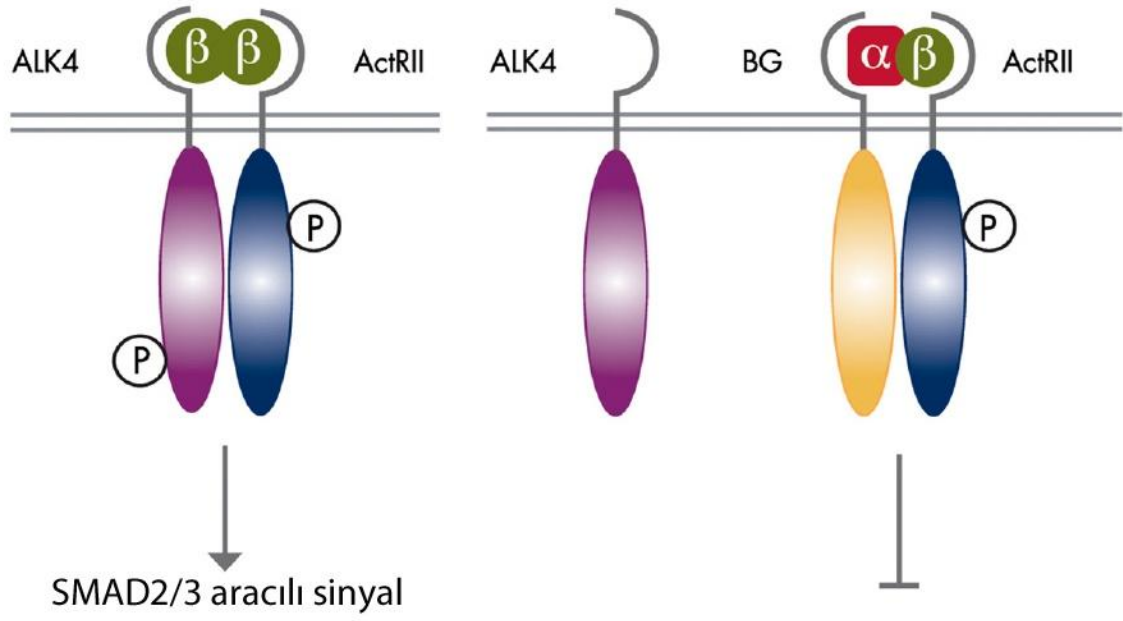
Şekil 2.D.1 FSH reseptörü üzerinden PKA aktivasyonu



Şekil 2.D.2 FSH ve Tirozin kinaz yollarındaki çapraz etkileşimler

2.D.2 TGF- β Süper Aile Üyeleri

Bu grupta ele alınan inhibin, inhibin aktivin reseptörleri ve SMAD proteinlerinin over folikül gelişimindeki rolü iyi bilinmektedir. Aktivin ActR II'ye bağlanarak tip 1 reseptörünün (Alk4) fosforilasyonunu artırarak reseptörler tarafından düzenlenen SMAD transkripsiyon faktör proteinlerini aktive eder. İnhibin de ActR2'ye bağlanma yeteneğine sahiptir. Bu sayede aktivinin etkilerini antagonize edebilir (1). (Şekil 2.D.3)



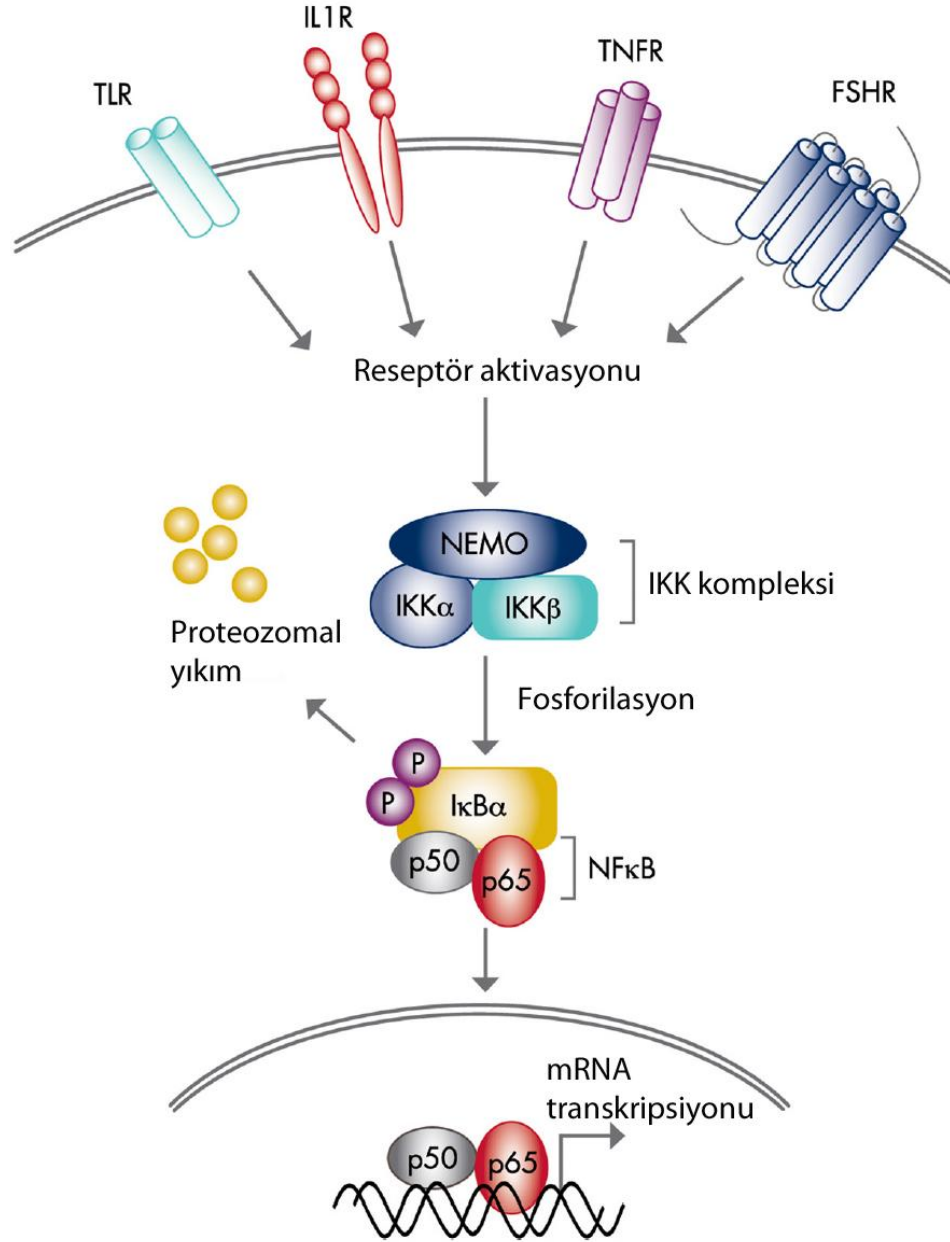
Şekil 2.D.3 SMAD transkripsiyon yolunun aktive edilmesi

2.D.3 Nükleer Reseptörler

Granüloza hücreli tümörlerde östrojen reseptörü (ER) β (42), ER α , progesteron reseptörü (43) ve steroidogenik faktör 1 (SF1) (38) bilinen nükleer reseptörler arasındadır. Hücre kültürlerinde diğer nükleer reseptörler araştırılmaktadır.

2.D.4 Nükleer Faktör Kappa B (NF- κ -B)

NF- κ -B yolağı I- κ -B kinaz (IKK) kompleksi tarafından düzenlenir. IKK kompleksinin uyarılması I- κ -B α 'nın fosforilasyonuna rol açan bir dizi uyarı tarafından başlatılabilir. Serbest NF- κ -B dimerleri hedef genlerin transkripsiyonunu uyarmak için böylece nükleusa girer (1). (Şekil 2.D.4)



Şekil 2.D.4 Çeşitli reseptörler üzerinden NF-κ-B aktivasyonu

2.D.5 Onkogenler ve Tümör Süpresörleri

Granüloza hücreli tümör patogeneğinde rol oynaması olası onkogenler arasında c-myc, p21-RAS, c-erb B2 (9), K-RAS, N-RAS, H-RAS, B-raf (44) ve WT1 (45) bulunmaktadır.

2.D.6 Diğer Sinyal Faktörleri

Bu grupta Wnt/ β katenin, IGF sistemi, GATA-4 bulunmaktadır.

2.D.7 Apoptoz

Yolakların anormal uyarılması ve onkogenlerin uyarısının dışında patogenetik nedenler de olabilir. Folikül büyümesi ve farklılaşması primordiyal evreden başlayarak korpus luteumun tam olarak oluşmasına kadar oldukça karmaşık bir süreç olup foliküllerin %0.1'inden daha azı başarıya ulaşmaktadır. Kadınlarda fertilite, her bir ovulatuvar siklus sırasında olgunlaşacak folikülün hücrelerinin hayatta kalabilmesini sağlayan sinyaller ile atreziye gitmesi gereken hücreleri bu yöne yönlendiren hücre ölümü sinyallerinin hassas bir dengesine bağlıdır. Bu nedenle apoptoz sürecindeki herhangi bir bozukluk granüloza hücre tümörü oluşumuna neden oluyor olabilir (1).

2.D.8 FOXL2

Memeli embriyogenezinde FOXL2 over farklılaşmasının tespit edilebilen en erken seksüel dimorfik belirteçidir. FOXL2 göz kapakları ve fetal ve erişkin over folikül hücrelerinde bulunmaktadır (46). FOXL2 primer foliküllerin optimal formasyonu için gereklidir. Erişkin granüloza hücreli tümörlerin yaklaşık %97'sinde FOXL2 geninde somatik missense mutasyon bulunmaktadır. Ancak bu mutasyon juvenil granüloza hücreli tümörlerde ve diğer malignitelerde görülmemekte bu yüzden erişkin tip granüloza hücreli tümörler için patognomik kabul edilmektedir (1).

2.E TEDAVİ

Geleneksel olarak granüloza hücreli tümörlerin tedavisi cerrahi ve sonrasında rekürrens veya ilerleyen hastalık saptanırsa kemoterapi verilmesidir (1).

2.E.1 Cerrahi

Granüloza hücreli tümörlerin %78-91'i evre 1 olarak tanı almaktadır. Bu hastalarda fertilité isteği varsa unilateral salpingoofektomi yapılmaktadır (47). Eşlik eden bir endometriyal patolojinin dışlanması için endometriyal biyopsi yapılması önerilmektedir. Evre 1 tümör görülen kadınlarda adjuvan tedavi önerilmemektedir (3). Postmenopozal kadınlarda ve daha ileri evre hastalığı olan veya bilateral over tutulumu olan kadınlarda total abdominal histerektomi ve bilateral salpingoofektomi yapılarak görülebilen tüm tümör odaklarının çıkarılması önerilmektedir (28, 47, 48).

2.E.2 Adjuvan Tedaviler

Epitelyal over tümörlerinden edinilen tecrübelerle dayanılarak öncelikli kemoterapi seçeneği platin bazlı kemoterapidir. Sisplatin ile birlikte doksorubisin, siklofosfamid, vinblastin, bleomisin ve etoposid gibi ajanlar denenmiş, yanıt oranlarının %60-83 arasında değiştii gözlenmiştir (49-56).

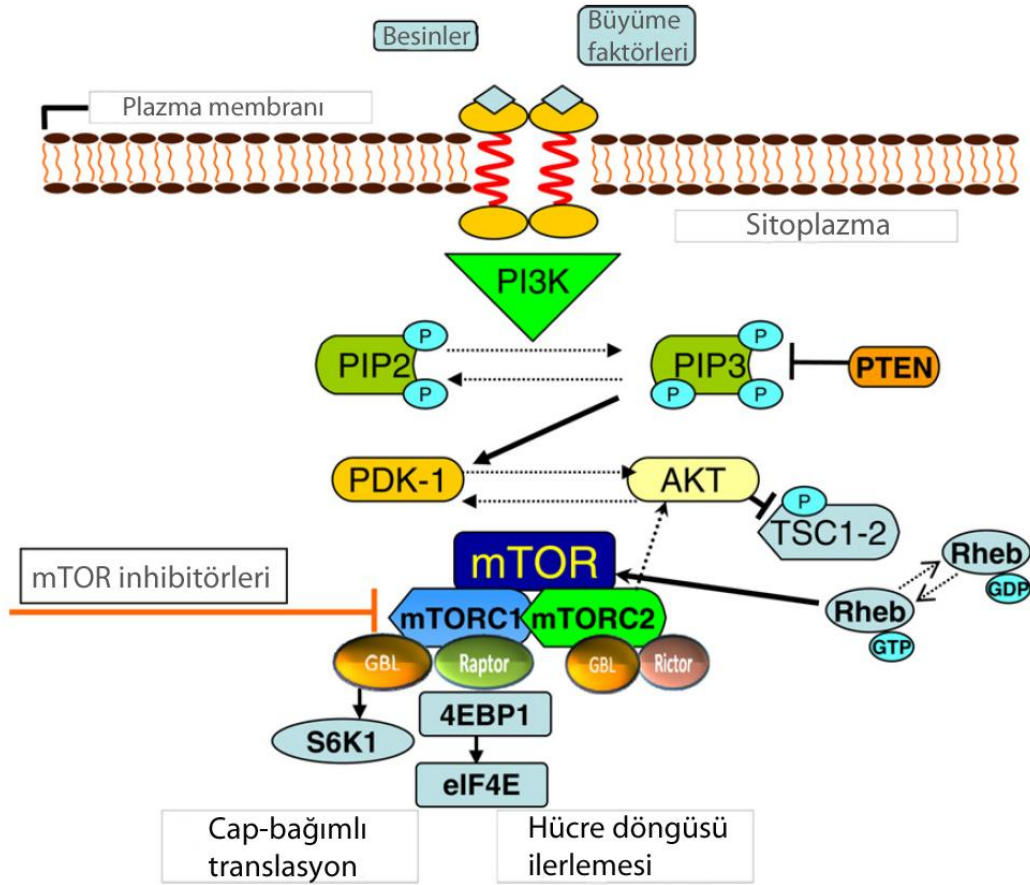
Radyoterapi hem adjuvan olarak hem de rekürren hastalık için kullanılabilir (57, 58). Ancak granüloza hücreli tümörlerde radyoterapinin rolünü gösteren randomize kontrollü çalışma bulunmamaktadır. Postoperatif radyoterapinin sağkalımda artış sağladığını gösteren (59,60) ve sağkalım artışı sağlamadığını gösteren (30,61-63) çalışmalar bulunmaktadır. Sonuç olarak radyoterapinin adjuvan şekilde verilmesini destekleyen yeterli kanıt bulunmamaktadır. Ayrıca tüm batin ışınlamasının gerekli olup olmadığı ve kullanılması gereken doz tartışmalıdır (64).

2.F SAĞKALIM

5 yıllık sağkalım evre 1’de %90-100, evre 2’de %55-75, evre 3 ve 4’te %22-50’dir. Granüloza hücreli tümörlerde 25 yıl gibi çok uzun bir süre sonra bile rekürrens görülebilir (65,66); bu nedenle takibe devam edilmelidir.

2.G mTOR

mTOR PI3K ilişkili protein kinaz ailesinin bir üyesidir ve en az 2 multiprotein kompleksin (mTORC1 ve mTORC2) yapısına katılmaktadır (2). Büyüme faktörü reseptörü uyarısı PI3K’nın aktivasyonuna neden olur. PI3K, fosfatidil inositol-4, 5-bifosfat (PIP2)’ı fosforilleyerek fosfatidil inositol-3, 4, 5-trifosfat (PIP3)’a dönüştürür. PIP3’ün birikmesi PDK1 tarafından protein serin-treonin kinaz AKT’nin fosforilasyonu (aktivasyonu) ile başlayan bir sinyal kaskadını aktive eder (2). Fosfataz ve tensin homolog PTEN protein PIP3’ü defosforile edebilir ve PI3K’nin etkisini tersine çevirebilir. Bu şekilde fosforile AKT modüle edilir. AKT, tüberoz skleroz kompleksini (TSC) fosforile ederek inhibe eder ve TSC’nin Ras ilişkili küçük guanin-tri-fosfataz (GTPaz) Rheb üzerindeki inhibitör etkisini ortadan kaldırır. RAS ilişkili küçük GTPaz Rheb, mTOR’u aktive etmektedir. mTOR’un aktive edilmesi ile mTOR diğer proteinlerle kompleks oluşturarak ökaryotik translasyon inisiyasyon faktörü 4E bağlayıcı protein (4E-BP1) ve ribozomal protein S6 kinaz 1 (S6K1) ’in fosforilasyonunu sağlar (Şekil 2.G.1), (2).



Şekil 2.G.1 Besin ve büyüme faktörlerinin varlığında mTOR üzerinden hücre proliferasyonunun düzenlenmesi

Kanser hücrelerinde 4E-BP1 fosforilasyonu translasyonun başlamasına yol açmaktadır. mTOR kompleks 1 (mTORC1) aktivasyonu hücre siklusu düzenleyici proteinler, VEGF veya c-myc gibi proteinlerin senteziyle sonuçlanır (2).

mTOR mitojenler, stres ve besinlerin varlığıyla oluşan sinyallerin entegrasyonunu sağlar (67,68). Besin miktarı ve büyüme faktörleri azaldığında veya stres varlığında mTOR aktivitesi azalır. Bu durumda hücre proliferasyonu ve doku büyümesi azalır ve otofaji başlar. mTORC1 mTOR ve raptor kofaktör proteinlerini içerir (69,70), mTORC2 ise “raptor” yerine “rictor” kofaktörünü içerir (71,72). Rapamisin her iki mTOR kompleksini de inhibe etmektedir (71,73-75).

Yakın zamanda yapılan prospektif büyük ölçekli bir genom analizinde yüksek dereceli seröz over tümörlerinde PI3K/AKT yolağında bozukluk olduğu gösterilmiştir (76). Bu çalışmada olguların %18’inde PI3KCA’nın mutasyona uğradığı ve PTEN delesyonlarının

olguların %7'sinde görüldüğü saptanmıştır. PIK3CA mutasyonları tipik olarak 9 ve 20. eksonlarda yer alır ve endometrioid ve müsinöz karsinomların yaklaşık %20'sinde, berrak hücreli tümörlerin %46'sında bulunmaktadır (59). PIK3CA mutasyonları AKT fosforilasyonuna yol açar (77). AKT2 kinazın aktivasyonu over kanserlerinin yaklaşık %40'ında bulunmaktadır. Ayrıca eş zamanlı AKT ve mTOR aktivasyonu over tümörlerinin %87'sinde saptanmaktadır (78). Over kanseri hücre kültürlerinde yapısal AKT1 aktivitesi veya AKT2 gen amplifikasyonu olduğunda düşük AKT düzeylerine sahip hücrelere kıyasla paklitaksele yüksek oranda direnç gösterdikleri buna karşılık mTOR inhibisyonuna duyarlı oldukları saptanmıştır (2,79-81).

Araştırılmakta olan mTOR inhibitörleri rapamisin, everolimus (RAD001), temsirolimus (CCI-779), deforolimus (AP23573) tur (82). mTOR'u regüle ettiği bilinen ilk bileşik bir makrolid olan rapamisindir. Öncelikle immün baskılayıcı aktivitesi için kullanılan rapamisinin daha sonra bir antitümör ilaç olduğu anlaşılmıştır (83). Rapamisin doğrudan hedefe yönelmemekte hücre içi reseptör FK506 bağlayıcı protein (FKBP12) ile etkileşerek mTORC1'e bağlanır ve mTORC1 aracılı fosforilasyonu baskılar. Hücreleri hücre döngüsünün G1 fazında durdurarak sitostatik aktivitesini gösterir. Bu hücre dizilerinin apoptozu tetiklediği veya otofajiyi uyardığı bildirilmiştir.

Yu ve arkadaşları (84) tarafından yapılan bir çalışmada over granüloza proliferasyonunun düzenlenmesinde mTOR kinaz ile östradiol arasındaki etkileşim araştırılmıştır.

Kinaz aktif serin 24-48 fosforile mTOR formu (p-mTOR) M fazında çok yüksek düzeylerde bulunmaktadır. mTOR'un ser-24-28 fosforilasyonu sonucunda rapamisin tedavisine karşı bir anda duyarlı hale gelmektedir (85,86). Yaba ve ark. (68) 2008 yılında yaptıkları bir çalışmada p-mTOR'un sağlıklı foliküllerde bol miktarda bulunduğu M fazında ayrıışan kromozomların yakınında ve arasında bulunduğu saptanmıştır. P-mTOR ekspresyonunun ayrıca bölünen granüloza hücrelerinin aktin kontraktıl halkasının olduğu bölgede arttığı saptanmıştır. Komşu tuba ve uterusu ait dokular da incelenmiş, hiçbir hücre tipinde mitoz sırasında p-mTOR saptanmamıştır.

Rapamisin in vitro ortamda mTOR yolağını farklı düzeylerde kesmektedir. Ancak bu değerli etkisine karşılık suda çözünürlüğünün ve kimyasal kararlılığının zayıf olması nedeniyle in vivo ortamda kullanımı sınırlıdır. Bu nedenle bu kimyasal yapıya benzer yeni kuşak ilaçlar üretilmiştir. Everolimus (RAD001), temsirolimus (CCI-779), deforolimus (AP23573) bu

amaçla üretilen analoglardır (82). İn vitro ortamda tek ajan olarak everolimus insan over karsinomu veya berrak hücreli over karsinomu gibi yüksek AKT aktivitesine sahip hücrelerin proliferasyonunu durdurmuş ve hücre kültürlerinde sisplatine karşı duyarlılığı arttırmıştır. Buna karşılık AKT aktivitesi düşük olan over hücrelerinde etkinliği çok daha düşüktür. Everolimus halen faz 1 ve 2 düzeyinde olup bevasizumab ile birlikte rekürren veya persistan over kanseri olan hastalarda denenmektedir (87,88).

Temsirolimus bir faz 2 çalışmada ilk kuşak platin bazlı kemoterapi sonrası sadece CA125 yüksekliği görülen over kanserli hastalarda denenmektedir (89).Deforolimus ise metastatik/ileri evre endometrium karsinomunda faz 1 ve 2 klinik çalışmalarda umut verici sonuçlar vermektedir (90).

Şu ana kadar literatürde granüloza hücreli over tümörlerde mTOR ekspresyonunun artıp artmadığını bildiren bir yayın bulunmamaktadır. Tüm bu verilerin ışığında çalışmamızda granüloza hücreli over tümörleri kesitlerinde mTOR ve fosfo-mTOR boyanma özelliklerini inceleyerek, granüloza hücreli over tümörlerinin moleküler genetik özelliklerini daha iyi anlamayı ve bu sayede mTOR inhibitörlerinin tedavide kullanılıp kullanılamayacağını saptamayı amaçladık.

3. YÖNTEM VE GEREÇ

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Jinekolojik Onkoloji Bilim Dalı'nda 1999-2011 yılları arasında adneksiyal kitle nedeniyle ameliyat edilen ve patoloji sonucu “granüloza hücreli over tümörü” olan hastalara ait kayıtlar ve patoloji kesitleri geriye dönük olarak değerlendirildi.

Çalışmamız İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Değerlendirme Kurulu tarafından 06.09.2011 tarih ve 32476 no'lu kararında onaylanmıştır. Çalışmamız İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projelerini Birimi tarafından desteklendi (Proje no 17384).

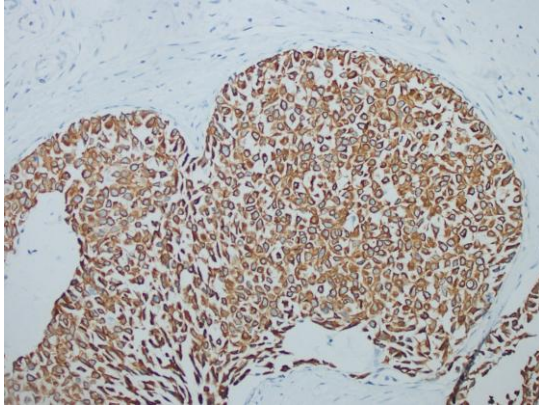
Jinekolojik Onkoloji arşivinde “granüloza hücreli over tümörü” tanısı alan toplam 38 hasta olduğu saptandı. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı arşivinde bu hastalardan toplam 20 hastaya ait parafin bloğa ulaşıldı.

3.A Patolojik İnceleme

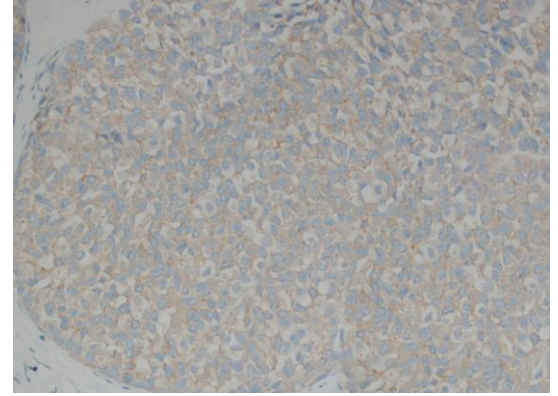
Thermo scientific marka mikrotom ile parafin bloklardan 3 mikron kalınlığından seri kesitler alındı. Kesitler 20 dakika 80°C'de etüvde (Nüve EN55) kurutuldu. İmmunohistokimyasal boyama streptavidin biotin yöntemi ile tam otomatik immunohistokimya cihazı Ventana Benchmark Ultra'da (Arizona, ABD) yapıldı. Boyama için cihaza yerleştirilen kesitlere önce 72°C'de 8 dakika ısı ve ardından Ez Prep (Ventana, ABD) uygulaması ile deparafinizasyon işlemi tamamlandı. Sonraki adımda kesitlere antijen retrieveal işlemi için 95°C'de 8 dakika CC1 (Ventana, ABD) uygulandı. Primer antikor mTOR (7C10) Rabbit mAb (1:50, Cell Signaling Technology) 24°C'de 48 dakika süreyle uygulandı. Phospho-mTOR (Ser2448) (49F9) Rabbit mAb (IHC Specific) (Cell Signaling Technology,

ABD) 24°C’de 40 dakika süreyle uygulandı. Antikor dilüsyonu için Normal Antibody Diluent (Scytek, ABD) kullanıldı. Primer antikor uygulamasından sonra kesitlere Blocker A ve B (Ventana, ABD) 4’er dakika uygulandı. Kesitler biyotinlenmiş sekonder antikor (İView DAB Delection Kit, Ventana, ABD) 4 dakika ve streptoavidin konjuge Horseradishperoxidase (İView DAB Delection Kit, Ventana, ABD) ile 8 dakika inkübe edildi. Diaminobenzidine (DAB, İView DAB Delection Kit, Ventana, ABD) ile 8 dakika inkübe edilen kesitler Copper (İView DAB Delection Kit, Ventana, ABD) ile mordantlaması yapıldı. Tüm yıkama basamaklarında Reaction Buffer (Ventana, ABD) kullanıldı. Zıt boyama hematoksilin II (Ventana, ABD) ile 12 dakika yapıldı. Çeşme suyunda yıkanan kesitler alkol serilerinden geçirilip, ksilende şeffaflandırıldıktan sonra kapatma mediumu Consul-Mount (Thermo Scientific, UK) ile kapatıldı.

mTOR için pozitif kontrol grubu olarak memenin in situ duktal karsinom örnekleri kullanıldı (Resim 3.A.1). F-mTOR için pozitif kontrol grubu olarak normal meme dokusu örnekleri kullanıldı. (Resim 3.A.2)

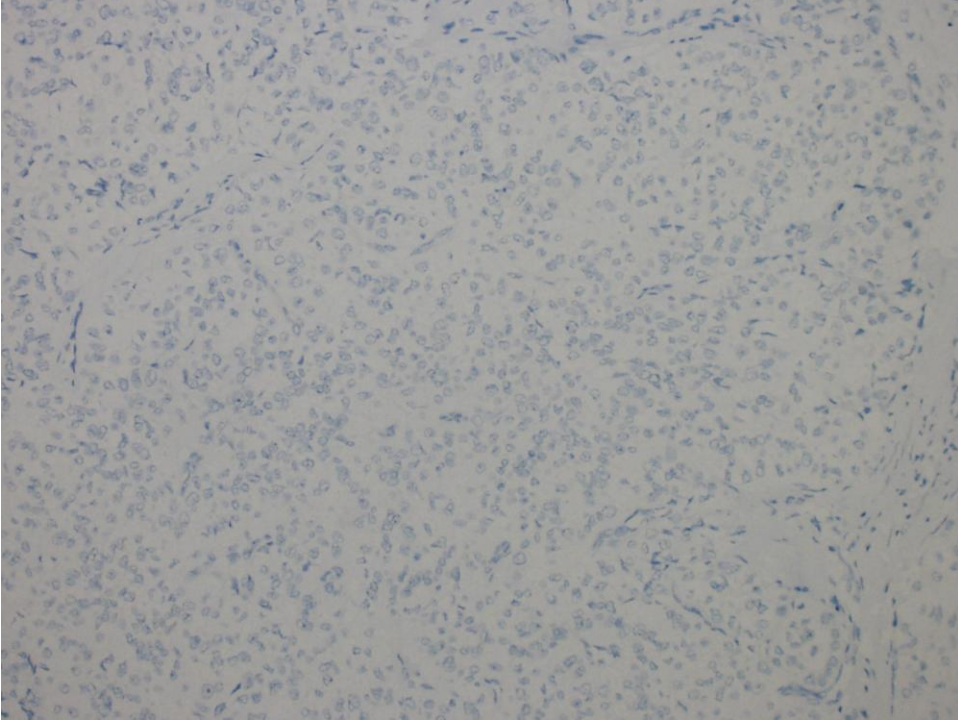


Resim 3.A.1 F-mTOR için pozitif kontrol grubu, normal meme dokusu (x200)

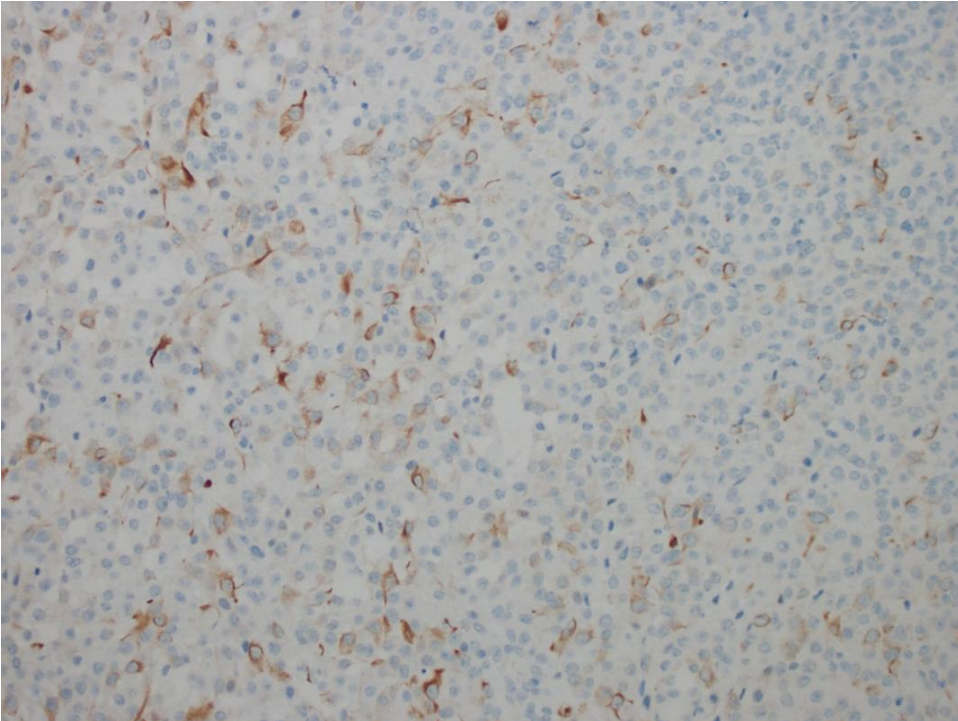


Resim 3.A.2 mTOR için pozitif kontrol grubu, meme duktal karsinomu (x400)

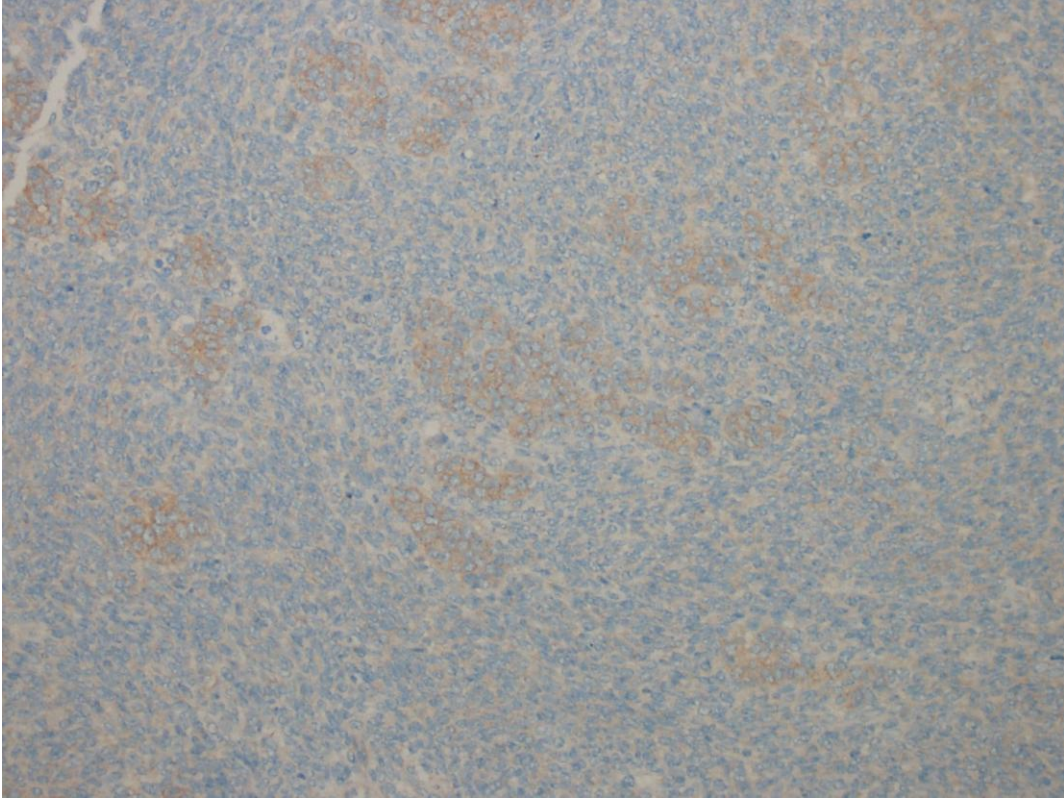
Hazırlanan kesitler ışık mikroskobunda (Olympus BX 50, OLYMPUS CORPORATION, Japonya) incelendi. M-TOR ve P-mTOR ekspresyonu açısından ayrı ayrı olacak şekilde boyanma niteliği dağılım bakımından yüzde, şiddet bakımından ise “boyanma yok, zayıf, orta, kuvvetli, çok kuvvetli” olarak semikantitatif şekilde değerlendirildi. Boyanma yüzdelere göre örnekler Resim 3.A.3-8’de gösterilmiştir. Boyanma niteliklerine ilişkin özellikler Resim 3.A.9-12’de gösterilmiştir.



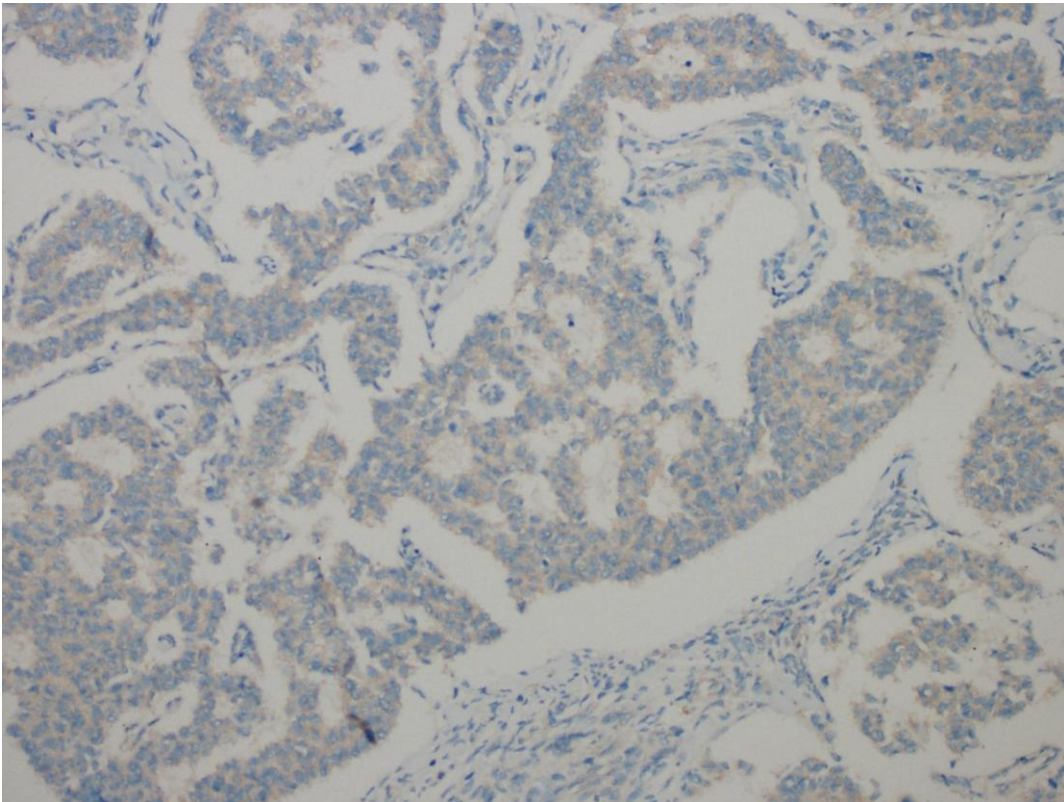
Resim 3.A.3 Boyanma yok (x200)



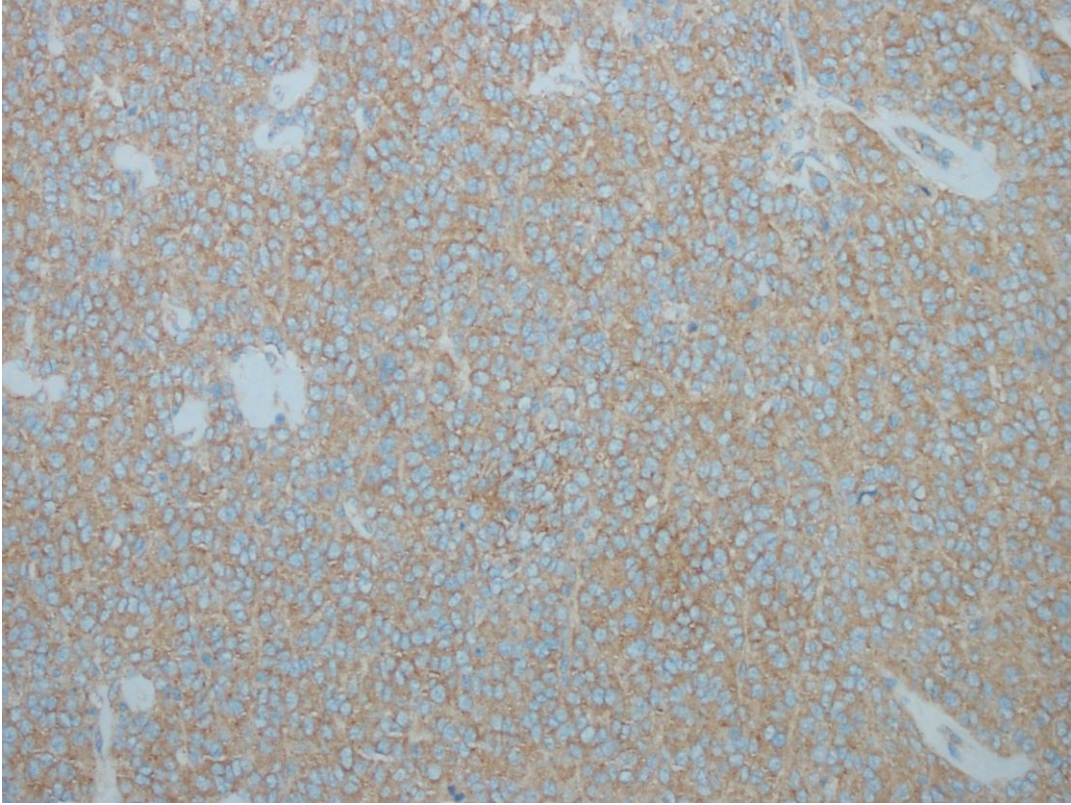
Resim 3.A.4 Yüzde 5 boyanma (x200)



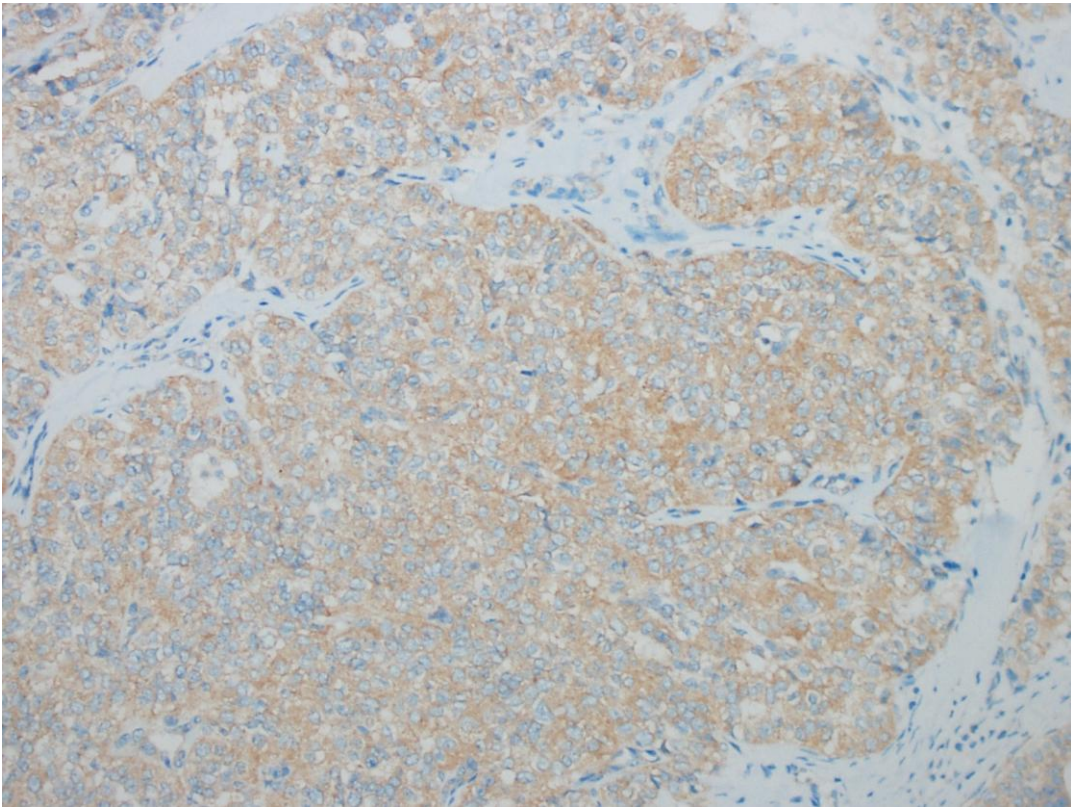
Resim 3.A.5 Yüzde 30 boyanma (x200)



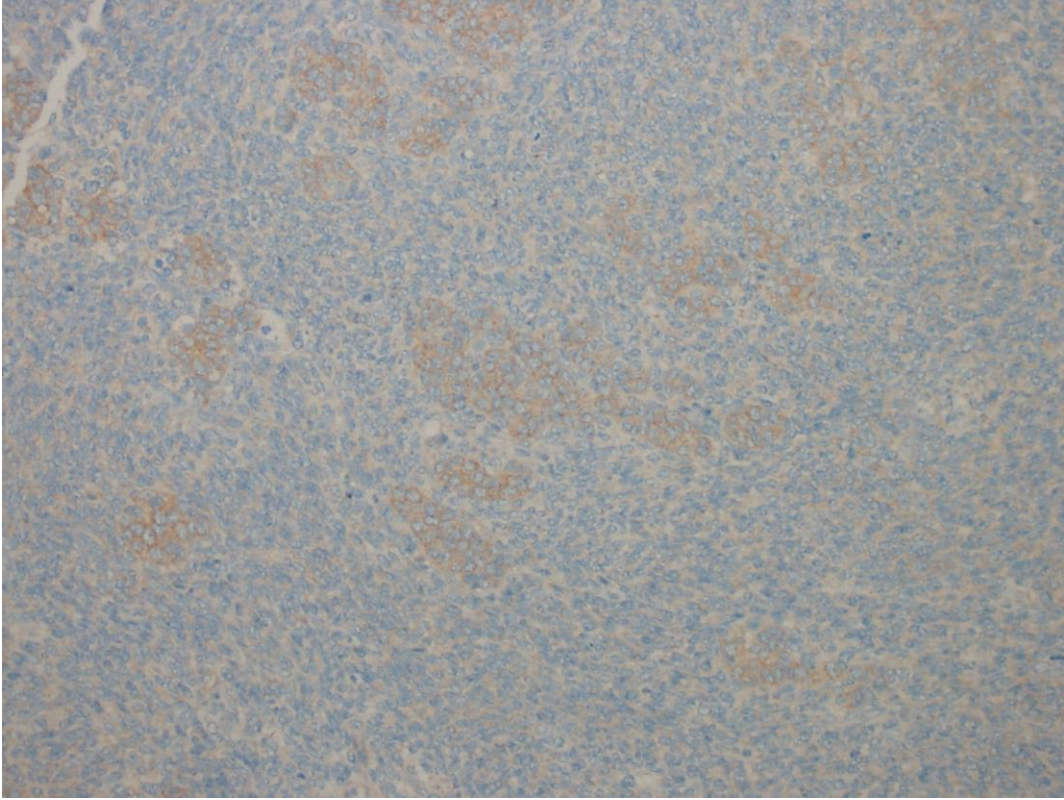
Resim 3.A.6 Yüzde 50 boyanma (x200)



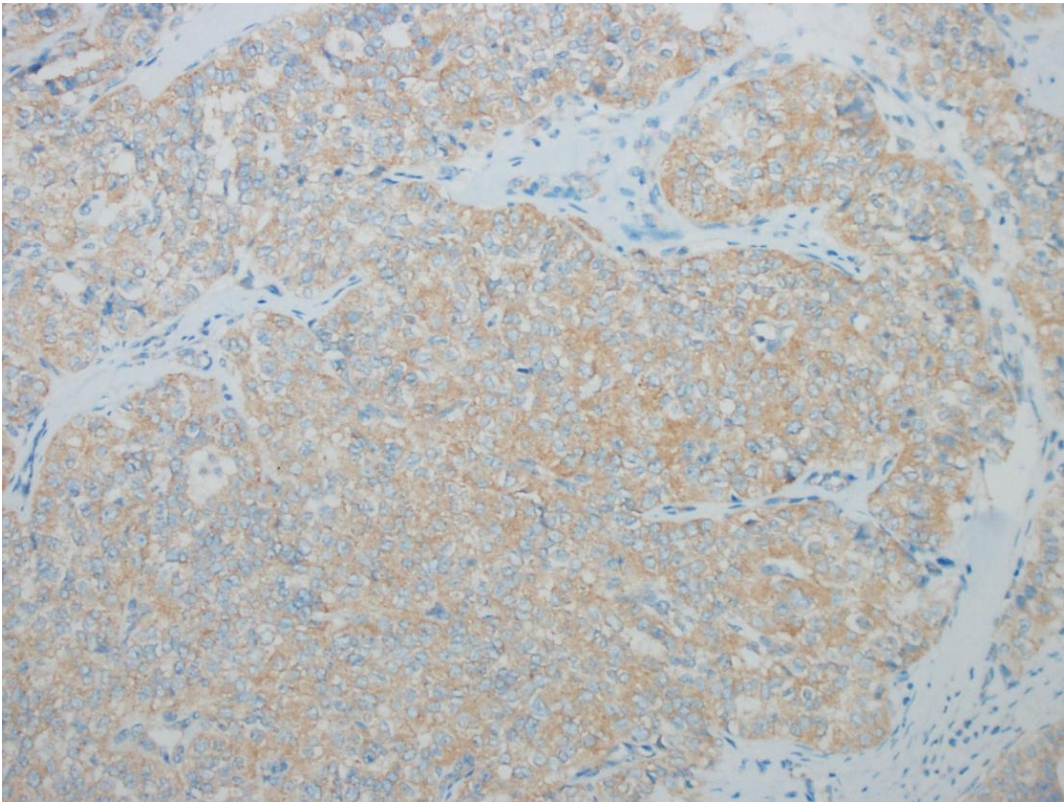
Resim 3.A.7 Yüzde 90 boyanma (x200)



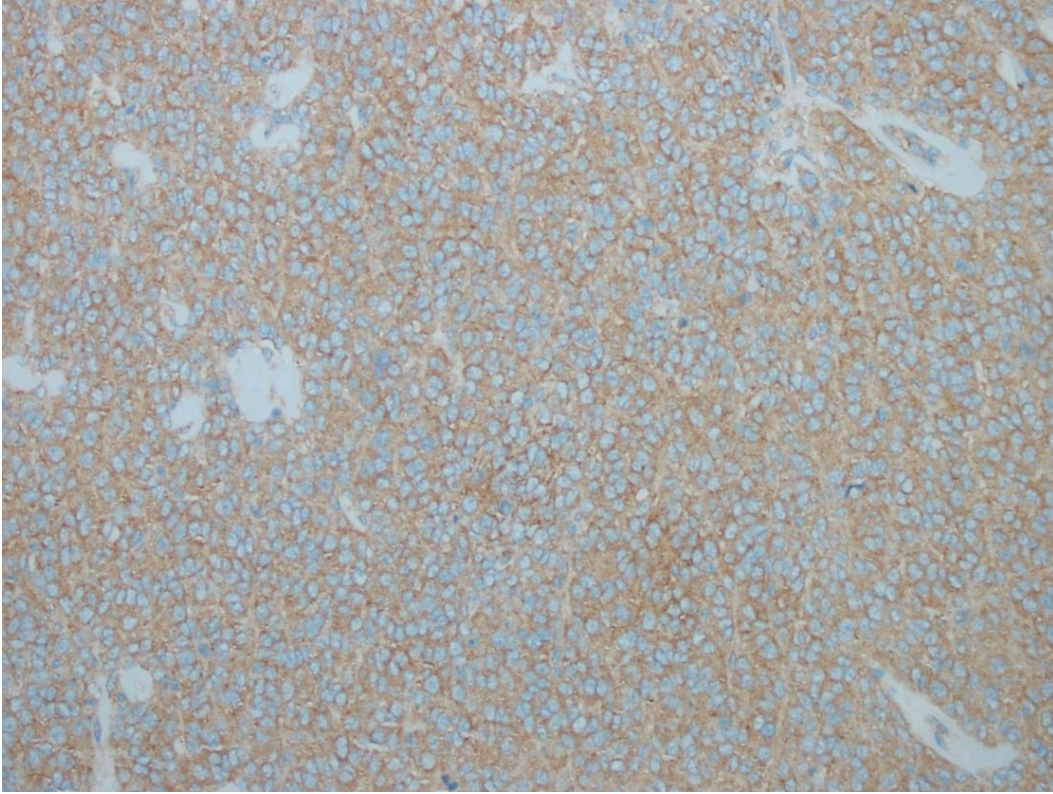
Resim 3.A.8 Yüzde 100 boyanma (x200)



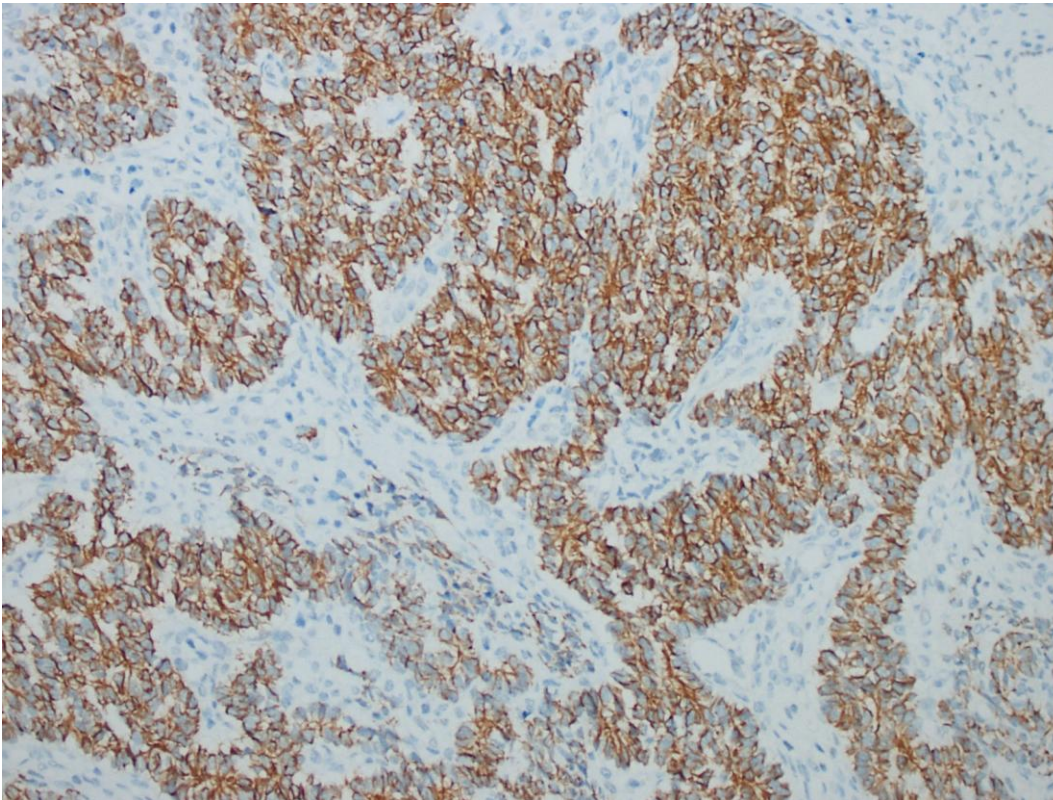
Resim 3.A.9 Bir pozitif boyanma (x200)



Resim 3.A.10 İki pozitif boyanma (x200)



Resim 3.A.11 Üç pozitif boyanma (x200)



Resim 3.A.12 Dört pozitif boyanma (x200)

3.B İstatistiksel Değerlendirme

Parametrik veriler ortalama $\pm$ standart deviyasyon olarak, non-parametrik veriler ortanca, minimum ve maksimum olarak ifade edildi. Parametrik verilerin karşılaştırılmasında T testi ve ANOVA, non-parametrik verilerin karşılaştırılmasında ki-kare testi kullanıldı. Parametrik değişkenlerin arasında korelasyon analizi Pearson korelasyon testi, nonparametrik değişkenler arasında korelasyon analizi Spearman korelasyon testi ile yapıldı. İstatistiksel değerlendirmede Statistical Package for Social Sciences (SPSS 11.0, Chicago, IL, ABD) programı kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık değeri $p<0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmamızda toplam 20 hastaya ait kayıtlar ve patolojik örnekler incelendi. Hastaların yaş ortalaması 46.05 ± 11.5 (min: 26, maks: 71) olarak saptandı. Tanı anında hastaların 11 tanesi (%55) menopoz öncesi dönemde, 9 tanesi (%45) menopoz dönemindeydi.

Hastaların 11'i (%55) evre 1a, 5'i (%25) evre 1c, 1'i (%5) evre 3b, 3'ü (%15) evre 3c olarak saptandı.

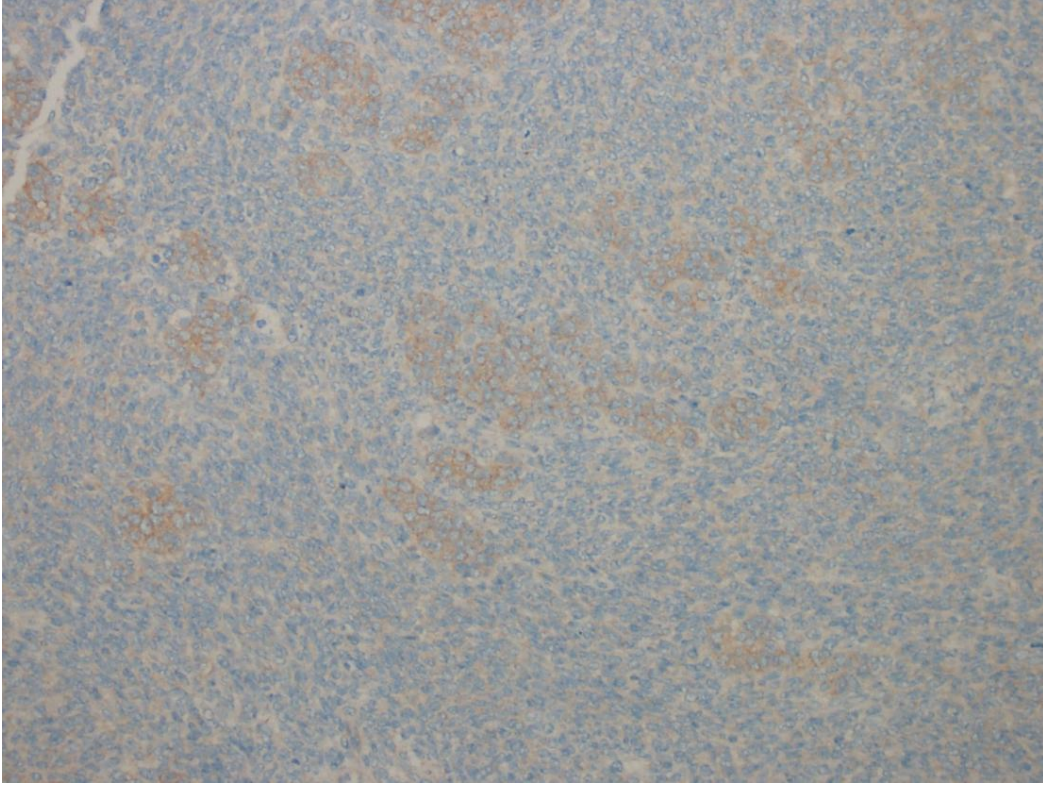
Hastaların tümünde granüloza hücreli tümörün “erişkin tip” olduğu gözlemlendi. Ortalama tümör boyutu $92 \text{ mm} \pm 50 \text{ mm}$ (min: 15 mm, maks: 190 mm) olarak saptandı.

Hastaların 7'sinde (%35) nekroz bulunduğu, 13'ünde (%65) nekroz bulunmadığı saptandı. Mitoz sayısı hastaların 7'sinde 1-4 arasında, 8'inde 4-8 arasında, 3'ünde ise 8'den fazla olarak saptandı. Nükleer atipi 1 (%5) hastada gözlenmezken, 8 (%40) hastada hafif atipi, 5 (%25) hastada orta derecede atipi, 2 (%10) hastada ağır atipi olduğu belirlendi.

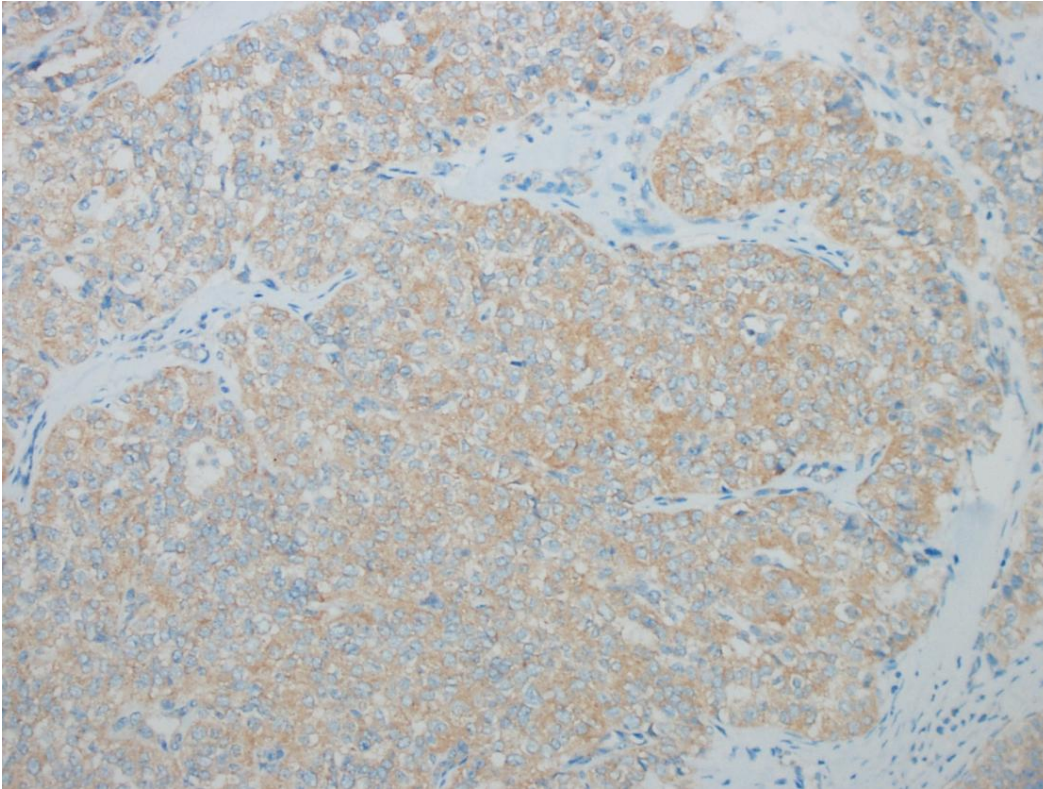
Ortalama tümör boyutu evre 1a'da $77 \pm 37 \text{ mm}$, evre 1c'de $156 \pm 35 \text{ mm}$, evre 3b'de 50 mm, evre 3c'de $60 \pm 10 \text{ mm}$ olarak saptandı. Tek yönlü ANOVA analizinde evre 1c'de tümör boyutunun diğer evrelere göre anlamlı şekilde büyük olduğu ($p=0.002$) ancak Pearson korelasyon testinde bu iki parametre arasında anlamlı ilişki olmadığı saptandı ($p=0.539$, $r=-0.150$).

Kruskal-Wallis testinde evre ilerledikçe nekroz varlığının daha sık gözlemlendiği ($p=0.017$), atipi varlığının ise anlamlı şekilde değişmediği ($p=0.153$) saptandı.

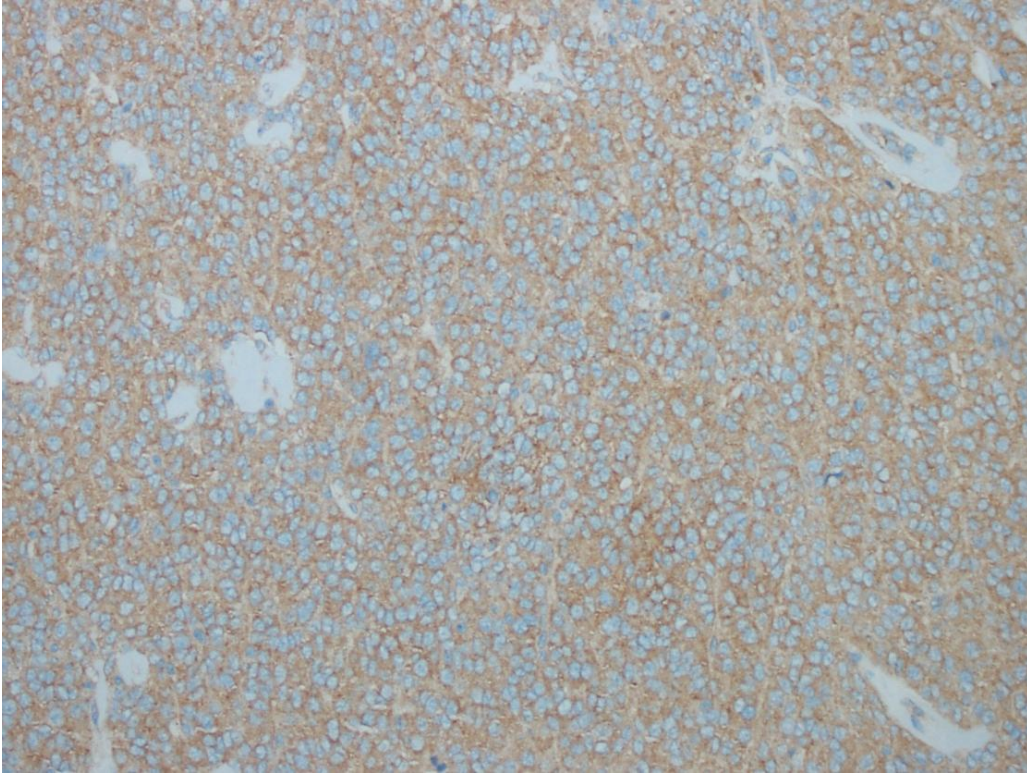
mTOR boyanma özelliklerine bakıldığında hastaların 2'sinde (%10) boyanma izlenmezken, 3'ünde (%15) hafif derecede boyanma, 8'inde (%40) orta derecede boyanma, 6'sında (%30) kuvvetli derecede boyanma, 1'inde (%5) çok kuvvetli derecede boyanma olduğu belirlendi. Ortalama mTOR boyanma yüzdesi 59 ± 41 olarak saptandı (min: 0, maks: 100). mTOR boyanma özelliklerine ilişkin resimler Resim 4.1-6'da verilmiştir.



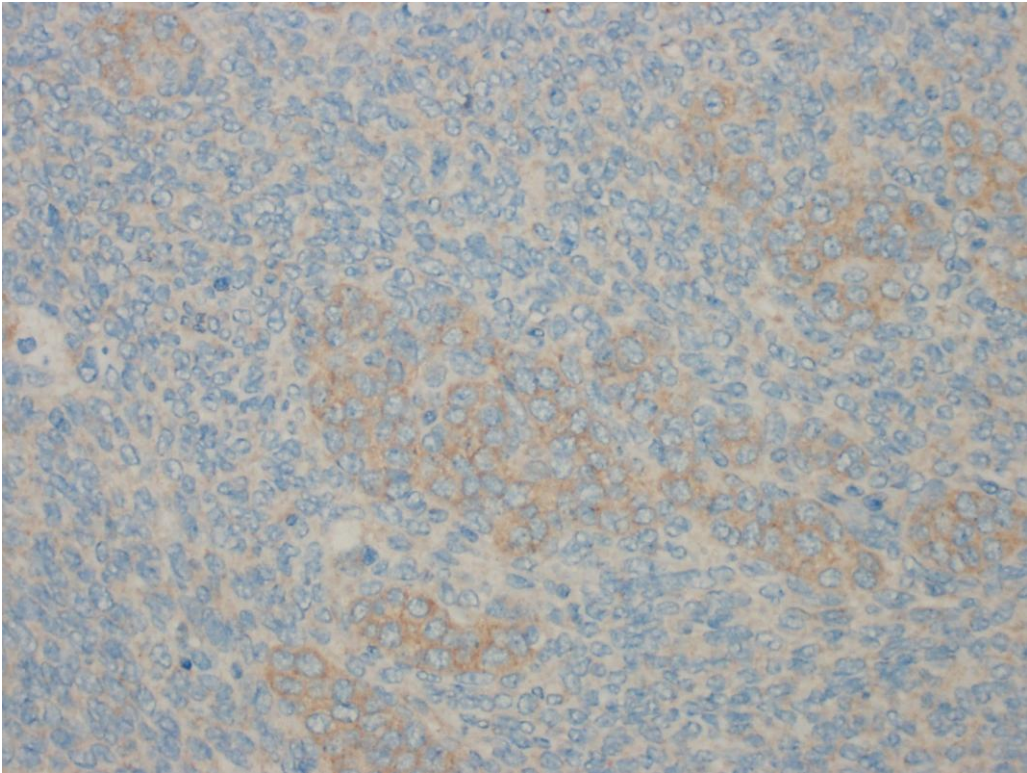
Resim 4.1 mTOR için %30, bir pozitif boyanma görülen granüloza hücreli tümör (x200)



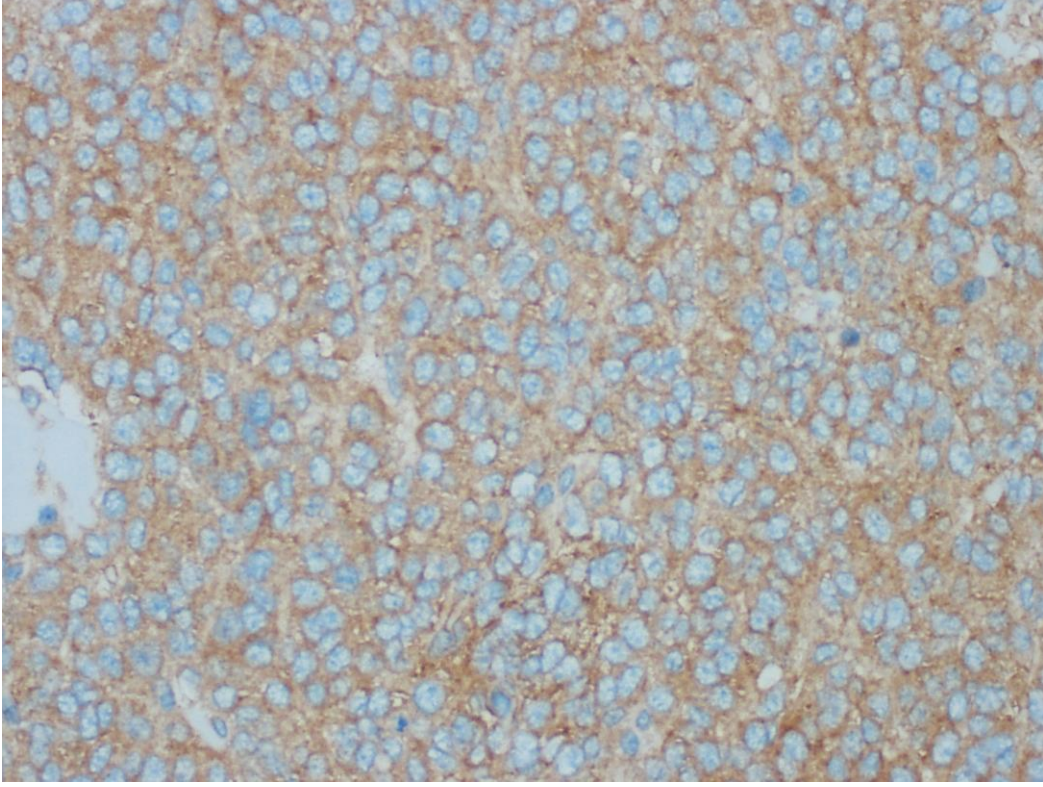
Resim 4.2 mTOR için %100, iki pozitif boyanma görülen granüloza hücreli tümör (x200)



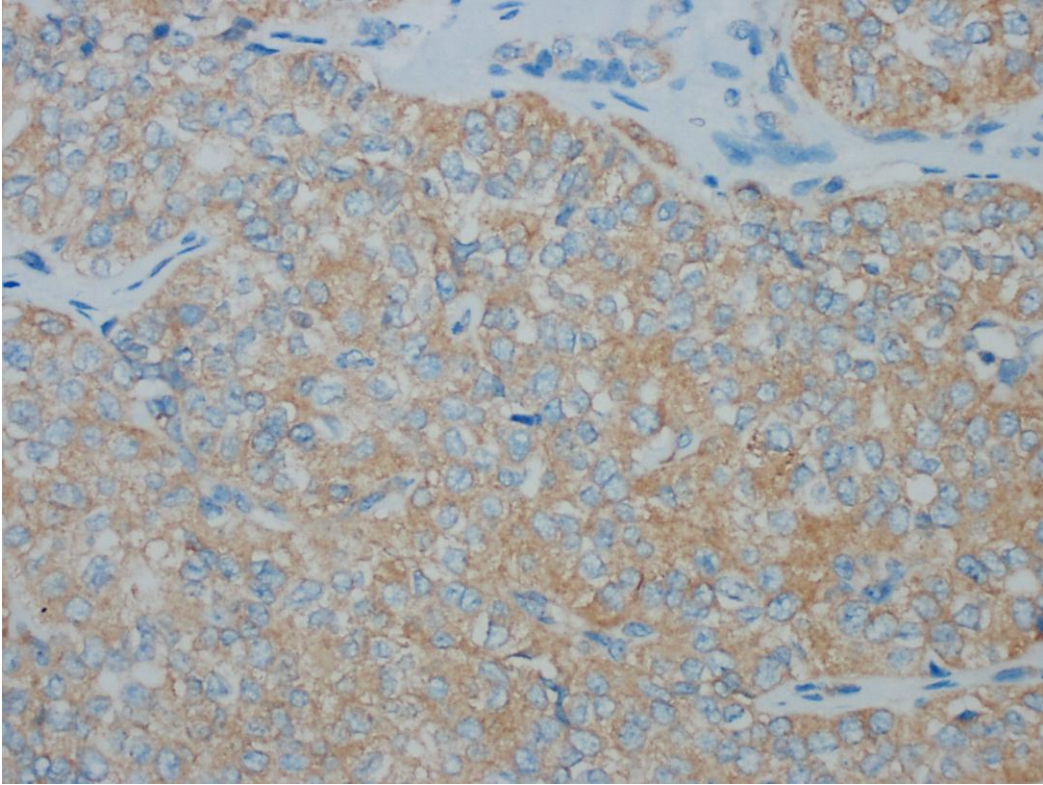
Resim 4.3 mTOR için %90, üç pozitif boyanma görülen granüloza hücreli tümör (x200)



Resim 4.4 mTOR için %30, bir pozitif boyanma görülen granüloza hücreli tümör (x400)



Resim 4.5 mTOR için %90, üç pozitif boyanma görülen granüloza hücreli tümör (x400)



Resim 4.6 mTOR için %100, üç pozitif boyanma görülen granüloza hücreli tümör (x400)

Yaş ile tümör boyutu, mTOR boyanma yüzdesi, mTOR boyanma niteliği, p-mTOR boyanma yüzdesi, p-mTOR boyanma niteliği arasında korelasyon saptanmadı. mTOR boyanma yüzdesi ile boyanma niteliği arasında pozitif korelasyon olduğu saptandı. ($p<0.001$, $r=0.819$) (Tablo 4.1)

Tablo 4.1 MTOR boyanma yüzdesi ve niteliğinin çeşitli parametrelerle ilişkisinin değerlendirilmesi

	MTOR boyanma yüzdesi		mTOR boyanma yoğunluğu	
	p	r	p	r
Yaş	0.750 ^a	-0.076 ^a	0.584 ^a	-.0130 ^a
Evre	0.128 ^a	0.352 ^a	0.109 ^b	0.370 ^b
Tümör boyutu	0.296 ^a	-0.253 ^a	0.094 ^a	-0.395 ^a
Atipi varlığı	0.868 ^a	0.043 ^a	0.443 ^b	0.199 ^b
Nekroz varlığı	0.550 ^a	0.146 ^a	0.367 ^b	0.219 ^b

^a Pearson korelasyon testi, $p<0.05$ anlamlı

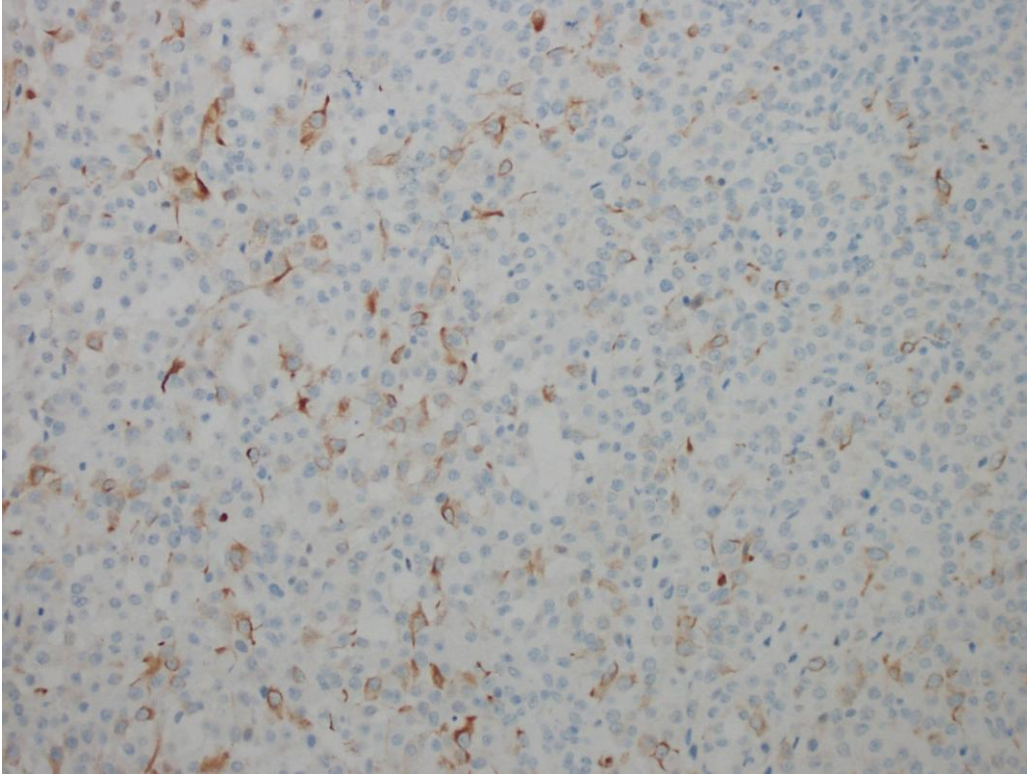
^b Spearman Korelasyon testi, $p<0.05$ anlamlı

r: korelasyon katsayısı

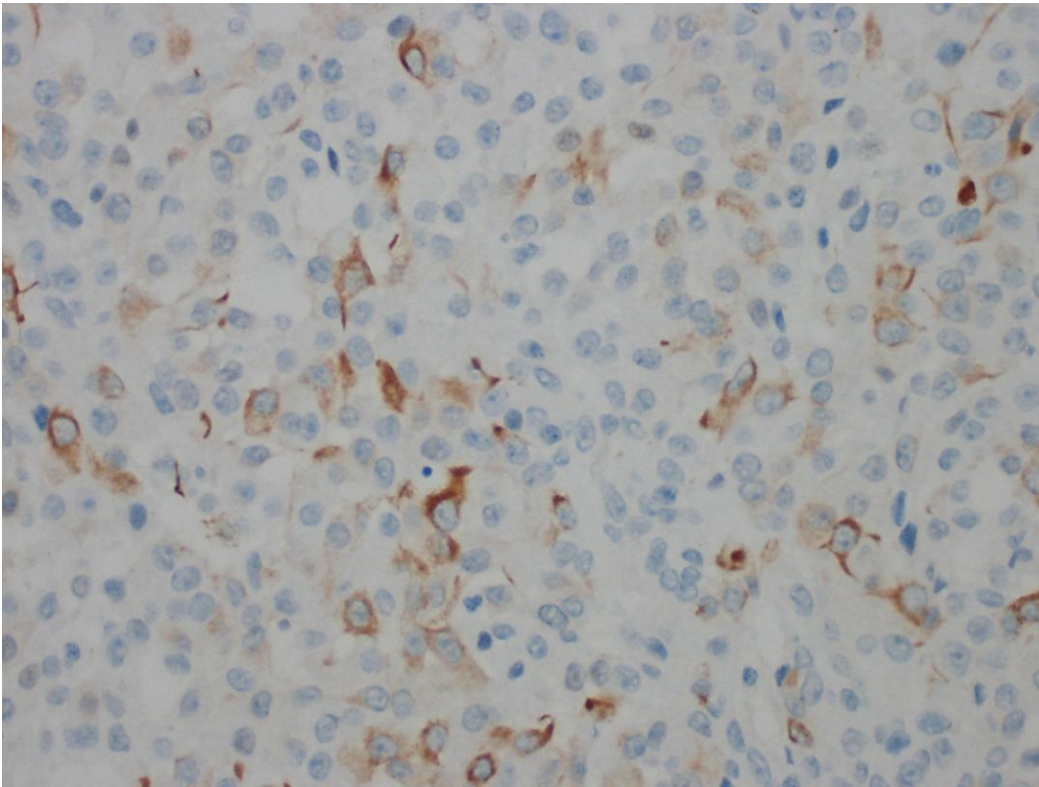
p-mTOR boyanma özelliklerine bakıldığında hastaların 18'inde (%90) boyanma olmadığı, 1'inde (%5) %5 boyanma olduğu, 1'inde (%5) ise %100 boyanma olduğu gözlemlendi. Boyanma görülen her iki hastada da boyanmanın niteliği çok kuvvetli olarak gözlemlendi. F-mTOR boyanma özelliklerine ilişkin resimler Resim 4.7-10'da verilmiştir.

p-mTOR pozitif olgulardan %5 oranda boyanan olgu 26 yaşında evre 3c, 5 cm tümör boyutuna sahip, tuba, uterus serozası ve omentumda yaygın tümör implantları olan; mitoz sayısı 19/10 BBA, histolojik olarak yüksek derece atipi izlenen bir olguydu.

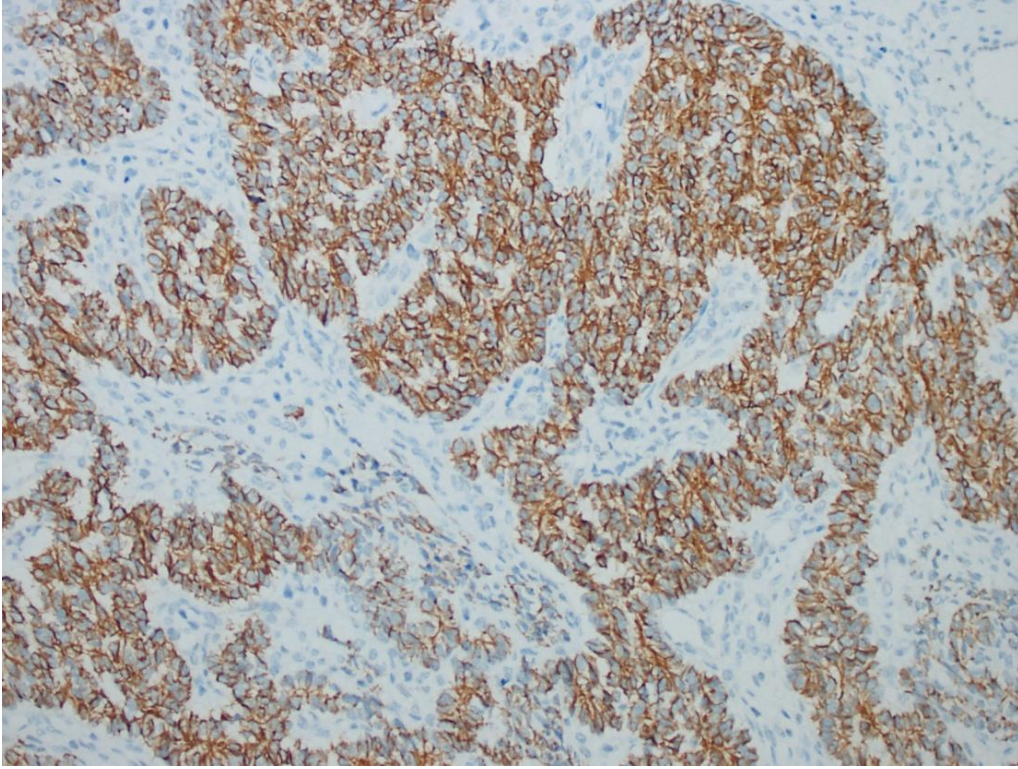
p-mTOR pozitif olgulardan %100 oranda boyanan olgu 42 yaşında evre 1a, 12 cm tümör boyutuna sahip; mitoz sayısı 2/10 BBA, histolojik olarak hafif derece atipi izlenen bir olguydu. P-mTOR pozitif olguların azlığı nedeniyle istatistiksel inceleme yapılamadı.



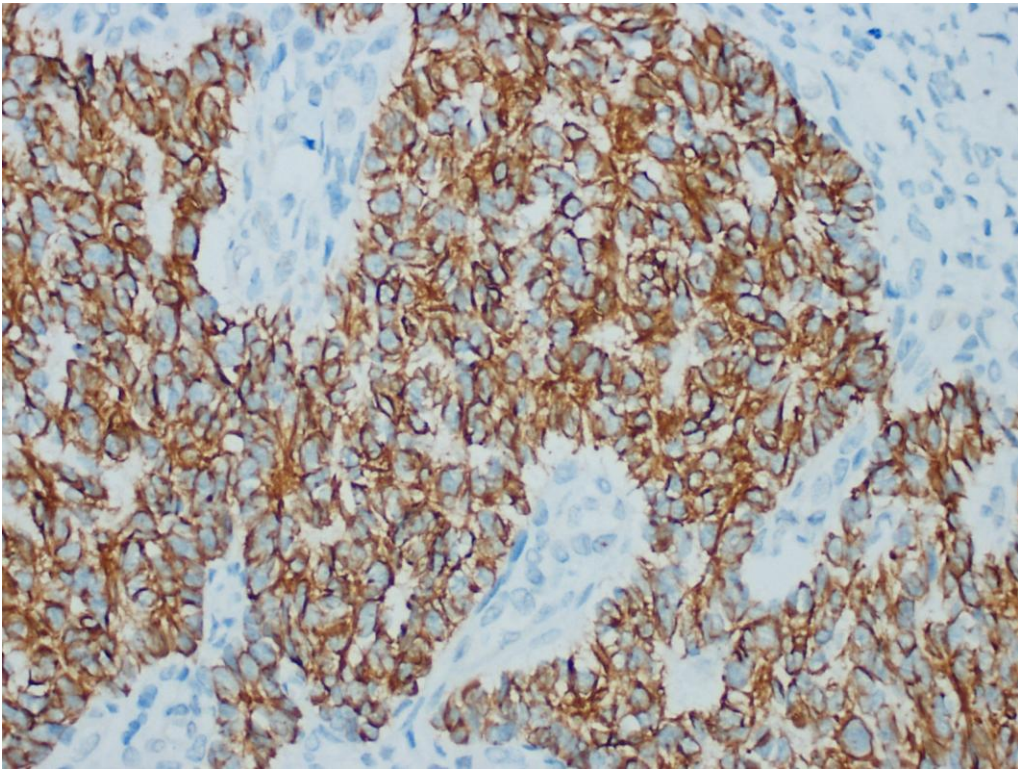
Resim 4.7 F-mTOR için %5, dört pozitif boyanma görülen granüloza hücreli tümör (x200)



Resim 4.8 F-mTOR için %5, dört pozitif boyanma görülen granüloza hücreli tümör (x400)



Resim 4.9 mTOR için %100, dört pozitif boyanma görülen granüloza hücreli tümör (x200)



Resim 4.10 mTOR için %100, dört pozitif boyanma görülen granüloza hücreli tümör (x400)

5. TARTIŞMA

Granüloza hücreli over tümörü tanısı alan toplam 20 hastanın yaş ortalaması 46.05 ± 11.5 idi. MTOR boyanma özelliklerine bakıldığında hastaların 2'sinde (%10) boyanma izlenmezken, 3'ünde (%15) hafif derecede boyanma, 8'inde (%40) orta derecede boyanma, 6'sında (%30) kuvvetli derecede boyanma, 1'inde (%5) çok kuvvetli derecede boyanma olduğu belirlendi. Ortalama mTOR boyanma yüzdesi 59 ± 41 olarak saptandı (min: 0, maks: 100). Yaş ile tümör boyutu, mTOR boyanma yüzdesi, mTOR boyanma niteliği, p-mTOR boyanma yüzdesi, p-mTOR boyanma niteliği arasında korelasyon saptanmadı. p-mTOR boyanma özelliklerine bakıldığında hastaların 18'inde (%90) boyanma olmadığı, 1'inde (%5) %5 boyanma olduğu, 1'inde (%5) ise %100 boyanma olduğu gözlemlendi. Boyanma görülen her iki hastada da boyanmanın niteliği çok kuvvetli olarak gözlemlendi.

Literatüre baktığımızda granüloza hücreli tümörler için ortalama tanı yaşının 50-52 olduğunu görmekteyiz (10, 91, 92). Çalışmamızda ortalama yaş 46 ± 11 olarak saptandı ve literatür ile uyumlu olduğu görüldü. Granüloza hücreli over tümörlerinin erişkin tipinin sıklıkla 40-70 yaş arasında gözlenmesine rağmen çalışmamızda en genci 26 yaşında olmak üzere 4 hastanın 40 yaşının altında olduğunu görmekteyiz. Bu nedenle 40 yaş öncesi over kitlelerinin değerlendirilmesinde granüloza hücreli over tümörleri de ayırıcı tanıda düşünülmelidir.

Granüloza hücreli tümörlerin karakteristik özelliği hem solid hem de kistik bileşenleri olup sıklıkla kanama alanları içermeleridir. Ortalama tümör boyutu 120 mm olarak bildirilmiştir (93). Biz de çalışmamızda ortalama tümör boyutunun 92 ± 50 mm olduğunu saptadık. Tümör boyutunun prognostik öneminin olduğu öne sürülmüştür. Yapılan çalışmalarda 5 cm veya daha küçük olan granüloza hücreli over tümörlerinde ilerlemesiz sağkalım ve 10 yıllık sağkalım oranlarının 5 cm'den büyük tümörlere kıyasla evreden bağımsız olarak daha iyi olduğu saptanmıştır (61, 94, 95). Buna karşılık tümör boyutunun prognostik öneminin olmadığını öne süren çalışmalar da bulunmaktadır (62, 30, 96).

Çalışmamızdaki hastaların çok büyük bir kısmının 2007-2011 yılları arasında opere edilmiş olmaları nedeniyle sağkalım ile ilgili verilerimiz sınırlıdır.

Granüloza hücreli over tümörlerinde yüksek östrojen üretimine bağlı olarak endometrial hiperplazi ve iyi diferansiye endometrial adenokarsinom saptanabilmektedir. Bu oran çeşitli çalışmalarda %13'e kadar çıkmaktadır (61, 94, 97). Bizim çalışmamızda 1 hastada eş zamanlı olarak endometrioid tip endometrial adenokarsinom saptandı.

Granüloza hücreli over tümörlerinde hastalar genellikle (%50-90) evre 1 hastalıkta tanı alırlar (32, 98-100). Bizim çalışmamızda hastaların %80'inin evre 1 olduğunu görmekteyiz. Hastalığın erken evrede tanı alması hastalığın yavaş seyrine ve diğer over kanserlerine kıyasla düşük dereceli malignite potansiyeline bağlanmaktadır. Çalışmamızda hastaların %65'inde nekroz bulunmadığı, %45'inde mitoz sayısının düşük, %40'ında orta derecede olduğu saptandı. Ayrıca hastaların sadece %10'unda yüksek derecede atipi olduğu gözlemlendi.

Granüloza hücrelerinde mTOR sitoplazma ve nükleus etrafında bol miktarda bulunmaktadır (68). mTOR'un kinaz aktif serin 24-48 fosforile formu diğer bir deyişle aktif formu olan p-mTOR ise genellikle M fazında yüksek düzeylerde bulunmaktadır. Fosfo-mTOR mitotik içciklerin yakınında ve sitokinezis sırasında kontraktıl halkanın yakınında gözlenmektedir. mTOR'un rapamisin ile inhibisyonu in vitro ortamda doza bağımlı olarak hem granüloza hücre proliferasyonunu hem de folikül gelişimini azaltmıştır. Ancak rapamisin içeren kültürlerde foliküller atreziye gitmemektedir. Yaba ve arkadaşları (68) fare overi üzerinde yaptıkları çalışmalarında nükleusa kıyasla sitoplazmada mTOR ekspresyonunun daha yoğun olduğunu saptamışlar, primer granüloza hücre kültürlerinde mTOR inhibisyonunun hücre siklusunun G2/M evrelerinde hücre ölümü ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Rapamisin varlığında oluşturulan over folikül kültürlerinde ise doku boyutunda küçülme saptanmış ancak hücrelerin hala yaşadığı gözlenmiştir. Diğer bir deyişle rapamisin direkt olarak folikül atrezisini uyarmamakta, mTOR daha çok bir kontrol noktası görevi görerek folikül büyümesini düzenlemektedir. Yu ve arkadaşlarının 2011'de yaptıkları çalışmada fare overinde, primer fare granüloza hücrelerinde ve spontan olarak ölümsüzleştirilmiş sıçan granüloza hücre dizisi (SIGC) serilerinde mTOR ekspresyonu araştırılmıştır. Fare granüloza hücrelerinde ve SIGC grubunda M fazında mTOR ekspresyonu gözlenmiştir. Fare granüloza hücrelerinde p-mTOR düzeyleri G2/M fazında yüksek oranda eksprese edilmiştir. Çalışmamızda MTOR boyanma özelliklerine bakıldığında hastaların 2'sinde (%10) boyanma izlenmezken, 3'ünde (%15) hafif derecede boyanma, 8'inde (%40)

orta derecede boyanma, 6'sında (%30) kuvvetli derecede boyanma, 1'inde (%5) çok kuvvetli derecede boyanma olduğu belirlendi ancak p-mTOR boyanma özelliklerine bakıldığında hastaların 18'inde (%90) boyanma olmadığı, 1'inde (%5) %5 boyanma olduğu, 1'inde (%5) ise %100 boyanma olduğu gözlemlendi.

Hücre kültüründe hücre siklusu fazlarını saptamak mümkün iken patoloji kesitlerinde bu durum mümkün değildir. Bununla birlikte mTOR ve p-mTOR'un granüloza hücreleri, over folikülleri ve in vitro ortamda spontan ölümsüzleştirilmiş granüloza hücre dizilerinde oynadıkları rol ortaya konulmuş olmasına rağmen literatürde insan granüloza hücreli over tümörlerinde mTOR ve p-mTOR ekspresyonunun immunohistokimyasal olarak araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. K-RAS borderline müsinöz ve seröz over tümörlerinin yaklaşık %48'inde bulunmaktadır (101,102). H-RAS onkogeni ve diğer onkogenlerle yapılan kararlı transfeksiyon yöntemi granüloza hücrelerini ölümsüzleştirmek için kullanılabilir (103). Ancak RAS mutasyonları granüloza hücreli over tümörlerinde bildirilmemiştir. Bu nedenle ölümsüzleştirilmiş granüloza hücre dizileri, granüloza hücreli over karsinom hücrelerini birebir temsil etmiyor olabilir. mTOR ve p-mTOR'un granüloza hücrelerinin büyümesi ve proliferasyonunda rol oynadıkları bilinmekle beraber protein ekspresyonunu sağlayan tek yolak bu değildir. Bu nedenle kanser gelişimi sırasında mTOR dışındaki diğer yolaklar aktive edilmiş olabilir.

HücreSEL ve moleküler düzeyde over kanserlerinin genel anlamda heterojen oldukları bilinen bir gerçektir. Altomare ve arkadaşlarının (78) 2004 yılında yaptıkları bir çalışmada mTOR proteinin de içinde yer aldığı PI3K yolağının over kanserlerinin %70'inde aktive olduğu ve aktive olmasının ilaç direncine neden olan ana faktör olduğu belirtilmiştir. Ancak bu yolda negatif ve pozitif geri besleme halkaları ve alternatif yollara geçişler bulunmaktadır (104). Örneğin mTORC1'in rapamisin tarafından inhibe edilmesi kısa vadede mTORC2 düzeylerini artırarak AKT'nin aşırı aktivasyonuna neden olmaktadır. AKT'den çıkan sinyal artışı mTOR inhibisyonunun baskılayıcı etkisine karşı gelmektedir. Ayrıca mTORC1'in inhibisyonu p70 ve IRS-1'in bir üzerindeki düzenleyici geri besleme etkisinin kaybına neden olur. Tüm bunlara ek olarak FSH reseptör uyarısıyla PI3K ve AKT aktivasyon yolağının yanısıra paralel bir yol olan reseptör tirozin kinazlar tarafından aktive edilen MEK/ERK yolağı bulunmaktadır. Bu iki yolak arasında çapraz iletişim mevcuttur. Normal granüloza hücrelerinde hücre büyümesi FSH etkisine bir miktar bağımlı olsa da granüloza hücreli karsinom hücrelerinde FSH'ya ihtiyaç olmadan proliferasyon görülebilir.

6. SONUÇ

1. Granüloza hücreli over tümörü tanısı alan toplam 20 hastanın yaş ortalaması 46.05 ± 11.5 (min: 26, maks: 71) idi.
2. Çalışma grubunda ortalama tümör boyutu $92 \text{ mm} \pm 50 \text{ mm}$ (min: 15 mm, maks: 190 mm) idi.
3. Hastaların 7'sinde (%35) nekroz bulunduğu, 13'ünde (%65) nekroz bulunmadığı saptandı.
4. Mitoz sayısı hastaların 7'sinde (%35) 1-4 arasında, 8'inde (%40) 4-8 arasında, 3'ünde (%15) ise 8'den fazla olarak saptandı.
5. Nükleer atipi 1 (%5) hastada gözlenmezken, 8 (%40) hastada hafif atipi, 5 (%25) hastada orta derecede atipi, 2 (%10) hastada ağır atipi olduğu belirlendi.
6. Evre ilerledikçe nekroz varlığının daha sık gözlemlendiği, atipi varlığının ise anlamlı şekilde değişmediği saptandı.
7. MTOR boyanma özelliklerine bakıldığında hastaların 2'sinde (%10) boyanma izlenmezken, 3'ünde (%15) hafif derecede boyanma, 8'inde (%40) orta derecede boyanma, 6'sında (%30) kuvvetli derecede boyanma, 1'inde (%5) çok kuvvetli derecede boyanma olduğu belirlendi.
8. Ortalama mTOR boyanma yüzdesi 59 ± 41 olarak saptandı (min: 0, maks: 100).
9. Yaş ile tümör boyutu, mTOR boyanma yüzdesi, mTOR boyanma niteliği, p-mTOR boyanma yüzdesi, p-mTOR boyanma niteliği arasında korelasyon saptanmadı.
10. mTOR boyanma yüzdesi ile boyanma niteliği arasında pozitif korelasyon olduğu saptandı.
11. p-mTOR boyanma özelliklerine bakıldığında hastaların 18'inde (%90) boyanma olmadığı, 1'inde (%5) %5 boyanma olduğu, 1'inde (%5) ise %100 boyanma olduğu gözlemlendi. Boyanma görülen her iki hastada da boyanmanın niteliği çok kuvvetli olarak gözlemlendi.

7. ÖZET

AMAÇ: Granüloza hücreli over tümörlerinde mTOR proteininin oynadığı rolü belirlemek.

YÖNTEM VE GEREÇ: İ.Ü. C.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum AD, Jinekolojik Onkoloji BD’da 1999-2011 yılları arasında “granüloza hücreli over tümörü” tanısı alan hastalara ait kayıtlar ve patoloji kesitleri geriye dönük olarak değerlendirildi. İmmunohistokimyasal olarak mTOR ve fosfo-mTOR ekspresyonu araştırılarak, boyanma yüzde ve şiddet bakımından değerlendirildi.

BULGULAR: Toplam 20 hastaya ait kayıtlar ve patolojik örnekler incelendi. Yaş ortalaması 46.05 ± 11.5 idi. Hastaların 11’i (%55) evre 1a, 5’i (%25) evre 1c, 1’i (%5) evre 3b, 3’ü (%15) evre 3c idi. Hastaların tümünde granüloza hücreli tümörün “erişkin tip” olduğu gözlemlendi. Ortalama tümör boyutu 92 ± 50 mm idi. Hastaların 7’sinde (%35) nekroz bulunduğu saptandı. Mitoz sayısı hastaların 7’sinde 1-4 arasında, 8’inde 4-8 arasında, 3’ünde ise 8’den fazla olarak saptandı. Nükleer atipi 1 (%5) hastada gözlenmezken, 8 (%40) hastada hafif atipi, 5 (%25) hastada orta derecede atipi, 2 (%10) hastada ağır atipi olduğu belirlendi.

Hastaların 2’sinde (%10) mTOR için boyanma izlenmezken, 3’ünde (%15) hafif derecede boyanma, 8’inde (%40) orta derecede boyanma, 6’sında (%30) kuvvetli derecede boyanma, 1’inde (%5) çok kuvvetli derecede boyanma olduğu belirlendi. Ortalama mTOR boyanma yüzdesi 59 ± 41 olarak saptandı.

Hastaların 18’inde (%90) p-mTOR için boyanma olmadığı, 1’inde (%5) %5 boyanma olduğu, 1’inde (%5) ise %100 boyanma olduğu gözlemlendi. Boyanma görülen her iki hastada da boyanmanın niteliği çok kuvvetli olarak gözlemlendi.

SONUÇ: Granüloza hücreli over tümöründe hastaların %90’ında çeşitli düzeylerde mTOR ekspresyonu izlenirken, p-mTOR ekspresyonu hastaların yalnızca %10’unda izlenmektedir.

8. İNGİLİZCE ÖZET

The relationship between mTOR protein expression and histological and clinical parameters of tumor aggression in human granulosa cell tumors

Aim: To investigate the role of mTOR protein in granulosa cell ovarian tumors.

Materials and methods: A retrospective evaluation of the medical records and pathological sections of patients with granulosa cell ovarian carcinoma who were operated in I.U. Cerrahpasa School Of Medicine Obstetrics and Gynecology, Division of Gynecologic Oncology between 1999 and 2011. mTOR and p-mTOR expression was immunohistochemically investigated and slides were interpreted for staining ratio and density.

Results: A total of twenty patients' medical records and pathological sections were evaluated. Mean age was 46.05 ± 11.5 . Eleven (55%) women had stage 1a, 5 (25%) women had stage 1c, 1 (5%) woman had stage 3b, 3 (15%) women had stage 3c disease. All women had "adult type" granulosa cell tumor. Mean tumor size was 92 ± 50 mm. Seven (35%) samples had necrosis. Number of mitosis was 1-4 in seven, 4-8 in eight, >8 in three samples. Nuclear atypia was not detected in 1(5%) sample, and mild, moderate and severe atypia was seen in 8 (40%), 5 (25%), and 2 (10%) samples, respectively. mTOR staining was not detected in two patients. Mild, moderate, dense and very dense staining was observed in three (15%), eight (40%), six (30%) and one (5%) samples, respectively. Mean mTOR staining ratio was 59 ± 41 . pmTOR staining was not observed in 18 patients. One (5%) patient had 5% staining, one (5%) patient had 100% staining for p-mTOR. Both of the latter patients had "very dense" staining.

Conclusion: mTOR expression is observed in various degrees in 90%, and p-mTOR expression is observed in only 10% of the patients with granulosa cell ovarian carcinoma.

Key Words: Granulosa cell ovarian tumor, mTOR, p-mTOR

9. KISALTMALAR

cAMP	Siklik adenzin monofosfat
COX-2	siklooksigenaz-2
EGF	Epidermal büyüme faktörü
ER	Östrojen reseptörü
FOXL2	Forkhead box L2
FSH	folikül stimulan hormon
GnRH	Gonadotropin saliverici hormon
GTP-az	guanin-tri-fosfataz
IKK	I κ B kinaz
MTOR	Rapamisinin memelilerdeki hedefi (Mammalian Target of Rapamisin)
NF κ B	Nükleer Faktör Kappa B
PI3K	fosfatidil inositol-3-kinaz
PIP3	fosfatidil inositol-3, 4, 5-trifosfat
PJS	Peutz-Jeghers sendromu
PKA	protein kinaz A
PTEN	Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10
SERM	selektif östrojen reseptör modülatörü
SF1	Steroidogenik faktör 1
TGF	Dönüştürücü büyüme faktörü
TSC	tübero skleroz kompleksi
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü

10. KAYNAKLAR

1. Jamieson S, Fuller PJ. Molecular pathogenesis of granulosa cell tumors of the ovary. *Endocr Rev.* 2012 Feb;33(1):109-44.
2. Diaz-Padilla I, Duran I, Clarke BA, Oza AM. Biologic rationale and clinical activity of mTOR inhibitors in gynecological cancer. *Cancer Treat Rev.* 2012 Oct;38(6):767-75.
3. Stuart GC, Dawson LM. Update on granulosa cell tumours of ovary. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2003,15:33–37.
4. Chu S, Rushdi S, Zumpe ET, Mamers P, Healy DL, Jobling T, Burger HG, Fuller PJ. FSH-regulated gene expression profiles in ovarian tumours and normal ovaries. *Mol Hum Reprod*, 2002, 8:426–433.
5. Fuller PJ, Chu S, Fikret S, Burger HG. Molecular pathogenesis of granulosa cell tumours. *Mol Cell Endocrinol*, 2002, 191:89–96.
6. Amsterdam A, Selvaraj N. Control of differentiation, transformation, and apoptosis in granulosa cells by oncogenes, oncoviruses, and tumor suppressor genes. *Endocr Rev*, 1997, 18:435–461
7. MayrD, Kaltz-Wittmer C, Arbogast S, AmannG, Aust DE, Diebold J. Characteristic pattern of genetic aberrations in ovarian granulosa cell tumors. *Mod Pathol*, 2002, 15: 951–957.
8. Lin YS, Eng HL, Jan YJ, Lee HS, HoWL, Liou CP, LeeWY, Tzeng CC. Molecular cytogenetics of ovarian granulosa cell tumors by comparative genomic hybridization. *Gynecol Oncol*, 2005, 97:68–73.
9. King LA, Okagaki T, Gallup DG, Twiggs LB, Messing MJ, Carson LF. Mitotic count, nuclear atypia, and immunohistochemical determination of Ki-67, c-myc, p21-ras, c-erbB2, and p53 expression in granulosa cell tumors of the ovary: mitotic count and Ki-67 are indicators of poor prognosis. *Gynecol Oncol*, 1996, 61:227–232.

10. Miller BE, Barron BA, Dockter ME, Delmore JE, Silva EG, Gershenson DM. Parameters of differentiation and proliferation in adult granulosa cell tumors of the ovary. *Cancer Detect Prev*, 2001, 25:48–54.
11. Vilella J, Herrmann FR, Kaul S, Lele S, Marchetti D, Natiella J, Odunsi K, Mhawech-Fauceglia P. Clinical and pathological predictive factors in women with adult-type granulosa cell tumor of the ovary. *Int J Gynecol Pathol*, 2007, 26:154–159
12. Yoo LI, Chung DC, Yuan J. LKB1: a master tumour suppressor of the small intestine and beyond. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2:529–535.
13. Benagiano G, Bigotti G, Buzzi M, D'Alessandro P, Napolitano C. Endocrine and morphological study of a case of ovarian sex-cord tumor with annular tubules in a woman with Peutz-Jeghers syndrome. *Int J Gynaecol Obstet*, 1988, 26:441–452.
14. Clement PB, Young RH, Scully RE. Clinical syndromes associated with tumors of the female genital tract. *Semin Diagn Pathol*, 1991, 8:204–233
15. Tanaka Y, Sasaki Y, Nishihira H, Izawa T, Nishi T. Ovarian juvenile granulosa cell tumor associated with Maffucci's syndrome. *Am J Clin Pathol*, 1992, 97:523–527.
16. Gell JS, Stannard MW, Ramnani DM, Bradshaw KD. Juvenile granulosa cell tumor in a 13-year-old girl with enchondromatosis (Ollier's disease): a case report. *J Pediatr Adolesc Gynecol*, 1998, 11:147–150.
17. Leyva-Carmona M, Vazquez-Lopez MA, Lendinez-Molinos F. Ovarian juvenile granulosa cell tumors in infants. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2009, 31:304–306
18. Rietveld L, Nieboer TE, Kluivers KB, Schreuder HW, Bulten J, Massuger LF. First case of juvenile granulosa cell tumor in an adult with Ollier disease. *Int J Gynecol Pathol*, 2009, 28:464–467.
19. Willemsen W, Kruitwagen R, Bastiaans B, Hanselaar T, Rolland R. Ovarian stimulation and granulosa-cell tumour. *Lancet*, 1993, 341:986–988.
20. Rossing MA, Daling JR, Weiss NS, Moore DE, Self SG. Ovarian tumors in a cohort of infertile women. *N Engl J Med*, 1994, 331:771–776.

21. Del Priore G, Robischon K, Phipps WR. Risk of ovarian cancer after treatment for infertility. *N Engl J Med*, 1995, 332:1300; author reply 1302.
22. Shapiro S. Risk of ovarian cancer after treatment for infertility. *N Engl J Med*, 1995, 332:1301; author reply 1302.
23. Bristow RE, Karlan BY. The risk of ovarian cancer after treatment for infertility. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 1996, 8:32–37.
24. Glud E, Kjaer SK, Troisi R, Brinton LA. Fertility drugs and ovarian cancer. *Epidemiol Rev*, 1998, 20:237–257.
25. Venn A, Watson L, Bruinsma F, Giles G, Healy D. Risk of cancer after use of fertility drugs with in-vitro fertilisation. *Lancet*, 1999, 354:1586–1590.
26. Venn A, Healy D, McLachlan R. Cancer risks associated with the diagnosis of infertility. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2003, 17:343–367.
27. Young RH, Scully RE. Endocrine tumours of the ovary. *Curr Top Pathol*, 1992, 85:114–164.
28. Segal R, DePetrillo AD, Thomas G. Clinical review of adult granulosa cell tumors of the ovary. *Gynecol Oncol*, 1995, 56:338–344.
29. Crew KD, Cohen MH, Smith DH, Tiersten AD, Feirt NM, Hershman DL. Long natural history of recurrent granulosa cell tumor of the ovary 23 years after initial diagnosis: a case report and review of the literature. *Gynecol Oncol*, 2005, 96:235–240.
30. Malmstrom H, Hogberg T, Risberg B, Simonsen E. Granulosa cell tumors of the ovary: prognostic factors and outcome. *Gynecol Oncol* 1994;52(1):50–5.
31. Unkila-Kallio L, Tiitinen A, Wahlström T, Lehtovirta P, Leminen A. Reproductive features in women developing ovarian granulosa cell tumour at a fertile age. *Hum Reprod*, 2000, 15:589–593.
32. Auranen A, Sundstrom J, Ijas J, Grenman S. Prognostic factors of ovarian granulosa cell tumor: a study of 35 patients and review of the literature. *Int J Gynecol Cancer*, 2007, 17:1011–1018.

33. Ala-Fossi SL, Aine R, Punnonen R, Maenpaa J. Is potential to produce inhibins related to prognosis in ovarian granulosa cell tumors? *Eur J Gynaecol Oncol* 2000; 21:187–189.
34. Woodruff TK. Role of inhibins and activins in ovarian cancer. *Cancer Treat Res* 2002; 107:293–302.
35. Fuller PJ, Verity K, Shen Y, Mamers P, Jobling T, Burger HG. No evidence of a role for mutations or polymorphisms of the follicle-stimulating hormone receptor in ovarian granulosa cell tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998, 83:274–279.
36. Stouffer RL, Grodin MS, Davis JR, Surwit EA. Investigation of binding sites for follicle-stimulating hormone and chorionic gonadotropin in human ovarian cancers. *J Clin Endocrinol Metab*, 1984, 59:441–446.
37. Graves PE, Surwit EA, Davis JR, Stouffer RL. Adenylate cyclase in human ovarian cancers: sensitivity to gonadotropins and nonhormonal activators. *Am J Obstet Gynecol*, 1985, 153:877–882.
38. Anttonen M, Unkila-Kallio L, Leminen A, Butzow R, Heikinheimo M. High GATA-4 expression associates with aggressive behavior, whereas low anti-Mullerian hormone expression associates with growth potential of ovarian granulosa cell tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90: 6529–6535.
39. Laitinen MP, Anttonen M, Ketola I, Wilson DB, Ritvos O, Butzow R, Heikinheimo M. Transcription factors GATA-4 and GATA-6 and a GATA family cofactor, FOG-2, are expressed in human ovary and sex cord-derived ovarian tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85: 3476–3483.
40. Lague MN, Paquet M, Fan HY, Kaartinen MJ, Chu S, Jamin SP, Behringer RR, Fuller PJ, Mitchell A, Dore M, Huneault LM, Richards JS, Boerboom D. Synergistic effects of Pten loss and WNT/CTNNB1 signaling pathway activation in ovarian granulosa cell tumor development and progression. *Carcinogenesis*, 2008, 29:2062–2072.
41. Robker RL, Richards JS. Hormone-induced proliferation and differentiation of granulosa cells: a coordinated balance of the cell cycle regulators cyclin D2 and p27Kip1. *Mol Endocrinol*, 1998, 12:924–940.

42. Chu S, Mamers P, Burger HG, Fuller PJ. Estrogen receptor isoform gene expression in ovarian stromal and epithelial tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, 85:1200–1205.
43. Farinola MA, Gown AM, Judson K, Ronnett BM, Barry TS, Movahedi-Lankarani S, Vang R. Estrogen receptor α and progesterone receptor expression in ovarian adult granulosa cell tumors and Sertoli-Leydig cell tumors. *Int J Gynecol Pathol*, 2007, 26:375–382.
44. Jamieson S, Alexiadis M, Fuller PJ. Expression status and mutational analysis of the ras and B-raf genes in ovarian granulosa cell and epithelial tumors. *Gynecol Oncol*, 2004, 95:603–609.
45. Coppes MJ, Ye Y, Rackley R, Zhao XL, Liefers GJ, Casey G, Williams BR. Analysis of WT1 in granulosa cell and other sex cord-stromal tumors. *Cancer Res*, 1993, 53:2712–2714.
46. Cocquet J, Pailhoux E, Jaubert F, Servel N, Xia X, Pannetier M, De Baere E, Messiaen L, Cotinot C, Fellous M, Veitia RA Evolution and expression of FOXL2. *J Med Genet*, 2002, 39:916–921.
47. Schumer ST, Cannistra SA. Granulosa cell tumor of the ovary. *J Clin Oncol*, 2003, 21:1180–1189.
48. Colombo N, Parma G, Zanagnolo V, Insinga A. Management of ovarian stromal cell tumors. *J Clin Oncol*, 2007, 25: 2944–2951
49. Kaye SB, Davies E. Cyclophosphamide, adriamycin, and cis-platinum for the treatment of advanced granulosa cell tumor, using serum estradiol as a tumor marker. *Gynecol Oncol*, 1986, 24:261–264.
50. Hines JF, Khalifa MA, Moore JL, Fine KP, Lage JM, Barnes WA. Recurrent granulosa cell tumor of the ovary 37 years after initial diagnosis: a case report and review of the literature. *Gynecol Oncol*, 1996, 60:484–488.
51. Homesley HD, Bundy BN, Hurteau JA, Roth LM. Bleomycin, etoposide, and cisplatin combination therapy of ovarian granulosa cell tumors and other stromal malignancies: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol*, 1999, 72:131–137.
52. Pecorelli S, WagenaarHC, Vergote IB, Curran D, Beex LV, Wiltshaw E, Vermorken JB. Cisplatin (P), vinblastine (V) and bleomycin (B) combination chemotherapy in recurrent or

- advanced granulosa(-theca) cell tumours of the ovary. An EORTC Gynaecological Cancer Cooperative Group study. *Eur J Cancer*, 1999, 35:1331–1337.
53. Erdreich-Epstein A, Monforte HL, Lavey RS, Joshi S, Phillips JD, Villablanca JG. Successful multimodality therapy of recurrent multifocal juvenile granulosa cell tumor of the ovary. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2002, 24:229–233.
 54. Ohara N, Teramoto K, Murao S. Chemotherapy for ovarian adult granulosa cell tumour with synchronous endometrial adenocarcinoma. *J Obstet Gynaecol*, 2002, 22:573– 574.
 55. Uygun K, Aydiner A, Saip P, Kocak Z, Basaran M, Dincer M, Topuz E. Clinical parameters and treatment results in recurrent granulosa cell tumor of the ovary. *Gynecol Oncol*, 2003, 88:400–403.
 56. Pautier P, Gutierrez-Bonnaire M, Rey A, Sillet-Bach I, Chevreau C, Kerbrat P, Morice P, Duvillard P, Lhomme C. Combination of bleomycin, etoposide, and cisplatin for the treatment of advanced ovarian granulosa cell tumors. *Int J Gynecol Cancer*, 2008, 18:446–452
 57. Savage P, Constenla D, Fisher C, Shepherd JH, Barton DP, Blake P, et al. Granulosa cell tumours of the ovary: demographics, survival and the management of advanced disease. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 1998;10(4):242–5.
 58. Pankratz E, Boyes DA, White GW, Galliford BW, Fairey RN, Benedet JL. Granulosa cell tumors. A clinical review of 61 cases. *Obstet Gynecol* 1978;52(6):718–23.
 59. Margolin KA, Pak HY, Esensten ML, Doroshow JH. Hepatic metastasis in granulosa cell tumor of the ovary. *Cancer* 1985; 56(3):691–5.
 60. Neville AJ, Gilchrist KW, Davis TE. The chemotherapy of granulosa cell tumors of the ovary: experience of the Wisconsin Clinical Cancer Center. *Med Pediatr Oncol* 1984;12(6): 397–400.
 61. Evans 3rd AT, Gaffey TA, Malkasian Jr GD, Annegers JF. Clinicopathologic review of 118 granulosa and 82 theca cell tumors. *Obstet Gynecol* 1980;55(2):231–8.
 62. Bjorkholm E, Silfversward C. Prognostic factors in granulosacell tumors. *Gynecol Oncol* 1981;11(3):261–74.

63. Ohel G, Kaneti H, Schenker JG. Granulosa cell tumors in Israel: a study of 172 cases. *Gynecol Oncol* 1983;15(2):278–86.
64. Pectasides D, Pectasides E, Psyrri A. Granulosa cell tumor of the ovary. *Cancer Treat Rev.* 2008 Feb;34(1):1-12.
65. Fujimoto T, Sakuragi N, Okuyama K, Fujino T, Yamashita K, Yamashiro S, et al. Histopathological prognostic factors of adult granulosa cell tumors of the ovary. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2001;80(11):1069–74.
66. Sommers SC, Gates O, Goodof II. Late recurrence of granulosa cell tumors; report of two cases. *Obstet Gynecol* 1955;6(4): 395–8.
67. Alam H, Maizels E, Park Y, Ghaey S, Feiger Z, et al. Follicle-stimulating hormone activation of hypoxia-inducible factor-1 by the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/Ras homolog enriched in brain (Rheb)/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway is necessary for induction of select protein markers of follicular differentiation. *J Biol Chem* 2004, 279: 19431–19440.
68. Yaba A, Bianchi V, Borini A, Johnson J. A putative mitotic checkpoint dependent on mTOR function controls cell proliferation and survival in ovarian granulosa cells. *Reprod Sci*, 2008, 15: 128–138.
69. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, et al. mtor interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*, 2002, 110: 163–175.
70. Kim DH, Sabatini DM. Raptor and mtor: subunits of a nutrient-sensitive complex. *Current Topics in Microbiological Immunology*, 2004, 279: 259–270.
71. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Regg MA, et al. Mammalian tor complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol* 2004, 6: 1122–1128.
72. Yu J, Yaba A, Kasiman C, Thomson T, Johnson J. mTOR controls ovarian follicle growth by regulating granulosa cell proliferation. *PLoS One.* 2011;6(7):e21415.

73. Barilli A, Visigalli R, Sala R, Gazzola G, Parolari A, et al. In human endothelial cells rapamycin causes mTORC2 inhibition and impairs cell viability and function. *Cardiovasc Res*, 2008, 78: 563–571.
74. Akcakanat A, Singh G, Hung M, Meric-Bernstam F. Rapamycin regulates the phosphorylation of rictor. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 362: 330–333.
75. Sarbassov D, Ali S, Sengupta S, Sheen J, Hsu P, et al. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* 2006, 22: 159–168.
76. The Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 2011;474:609–15.
77. Campbell IG, Russell SE, Choong DY, et al. Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer Res* 2004;64:7678–81.
78. Altomare DA, Wang HQ, Skele KL, et al. AKT and mTOR phosphorylation is frequently detected in ovarian cancer and can be targeted to disrupt ovarian tumor cell growth. *Oncogene* 2004;23:5853–7.
79. Yuan ZQ, Sun M, Feldman RI, et al. Frequent activation of AKT2 and induction of apoptosis by inhibition of phosphoinositide-3-OH kinase/Akt pathway in human ovarian cancer. *Oncogene* 2000;19:2324–30.
80. Page C, Lin HJ, Jin Y, et al. Overexpression of Akt/AKT can modulate chemotherapy-induced apoptosis. *Anticancer Res* 2000;20:407–16.
81. Hu L, Hofmann J, Lu Y, et al. Inhibition of phosphatidylinositol 30-kinase increases efficacy of paclitaxel in in vitro and in vivo ovarian cancer models. *Cancer Res* 2002;62:1087–92.
82. Mazzeletti M, Broggini M. PI3K/AKT/mTOR inhibitors in ovarian cancer. *Curr Med Chem*. 2010;17(36):4433-47. Review.
83. Baldo P, Cecco S, Giacomini E, Lazzarini R, Ros B, Marastoni S. mTOR pathway and mTOR inhibitors as agents for cancer therapy. *Curr. Cancer Drug Targets*, 2008, 8(8), 647-665.

84. Yu J, Thomson TC, Johnson J. Cross talk between estradiol and mTOR kinase in the regulation of ovarian granulosa proliferation. *Reprod Sci.* 2012;19(2):143-51.
85. Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science.* 1991;253:905-909.
86. Chiang GG, Abraham RT. Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at ser-2448 is mediated by p70s6 kinase. *J Biol Chem.* 2005;280:25485-25490.
87. Mabuchi S, Altomare, DA, Cheung M, Zhang L, Poulikakos PI, Hensley HH, Schilder RJ, Ozols RF, Testa JR. RAD001 inhibits human ovarian cancer cell proliferation, enhances cisplatin-induced apoptosis, and prolongs survival in an ovarian cancer model. *Clin. Cancer Res.*, 2007, 13(14), 4261-4270.
88. Mabuchi S, Kawase C, Altomare DA, Morishige K, Sawada K, Hayashi M, Tsujimoto M, Yamoto M, Klein-Szanto AJ, Schilder RJ, Ohmichi M, Testa JR, Kimura T. mTOR is a promising therapeutic target both in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant clear cell carcinoma of the ovary. *Clin. Cancer Res.*, 2009, 15(17), 5404-5413.
89. Rini BI. Temsirolimus, an inhibitor of mammalian target of rapamycin. *Clin. Cancer Res.*, 2008, 14(5), 1286-1290.
90. Mita M, Sankhala K, Abdel-Karim I, Mita A, Giles F. Deforolimus (AP23573) a novel mTOR inhibitor in clinical development. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 2008, 17(12), 1947-1954.
91. Robertson DM, Stephenson T, Pruyers E, et al. Characterization of inhibin forms and their measurement by an inhibin alpha-subunit ELISA in serum from postmenopausal women with ovarian cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:816–824.
92. Burger HG, Fuller PJ, Chu S, et al. The inhibins and ovarian cancer. *Mol Cell, Endocrinol* 2001; 180: 145–148.
93. Hartmann LC, Young RH, Podratz KC. Ovarian sex cord-stromal tumors. In: Hoskins WJ, Perez CA, Young RC, editors. *Principles and practice of gynecologic oncology*, 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins. Chapter 36:1075–1093.

- 94.** Fox H, Agrawal K, Langley FA. A clinicopathologic study of 92 cases of granulosa cell tumor of the ovary with special reference to the factors influencing prognosis. *Cancer* 1975; 35(1):231–41.
- 95.** Stenwig JT, Hazekamp JT, Beecham JB. Granulosa cell tumors of the ovary. A clinicopathological study of 118 cases with longterm follow-up. *Gynecol Oncol* 1979;7(2):136–52.
- 96.** Miller BE, Barron BA, Wan JY, Delmore JE, Silva EG, Gershenson DM. Prognostic factors in adult granulosa cell tumor of the ovary. *Cancer* 1997;79(10):1951–5.
- 97.** Bennington JL, Ferguson BR, Haber SL. Incidence and relative frequency of benign and malignant ovarian neoplasms. *Obstet Gynecol* 1968;32(5):627–32.
- 98.** Zhang M, Cheung MK, Shin JY, Kapp DS, Husain A, Teng NN, Berek JS, Osann K, Chan JK. Prognostic factors responsible for survival in sex cord stromal tumors of the ovary: an analysis of 376 women. *Gynecol Oncol*, 2007, 104: 396–400
- 99.** Lee YK, Park NH, Kim JW, Song YS, Kang SB, Lee HP. Characteristics of recurrence in adult-type granulosa cell tumor. *Int J Gynecol Cancer*, 2008, 18:642–647
- 100.** Ayhan A, Salman MC, Velipasaoglu M, Sakinci M, Yuce K. Prognostic factors in adult granulosa cell tumors of the ovary: a retrospective analysis of 80 cases. *J Gynecol Oncol*, 2009, 20:158–163
- 101.** Garrett, A.P. et al. K-ras mutation may be an early event in mucinous ovarian tumorigenesis. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 2001, 20, 244–251
- 102.** Mok, S.C. et al. Mutation of K-ras protooncogene in human ovarian epithelial tumors of borderline malignancy. *Cancer Res.* 1993, 53,1489–1492
- 103.** Tajima, K. et al. Establishment of FSH-responsive cell lines by transfection of pre-ovulatory human granulosa cells with mutated p53 (p53val135) and Ha-ras genes. *Mol. Hum. Reprod.* 2002, 8, 48–57
- 104.** Mazzeletti M, Broggin M. PI3K/AKT/mTOR inhibitors in ovarian cancer. *Curr Med Chem.* 2010;17(36):4433-47. Review.