

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ENDOKRİNOLOJİ VE METABOLİZMA HASTALIKLARI BİLİM DALI

ATORVASTATİNİN MEDÜLLER TİROİD KANSERİ HÜCRE
HATTINDA (TT CELL LINE) APOPTOZİS VE KALSİTONİN
GEN EKSPRESYONU ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

ENDOKRİNOLOJİ VE METABOLİZMA HASTALIKLARI
YAN DAL UZMANLIK TEZİ

Dr. Emine KARTAL BAYKAN

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. L. Füsün SAYGILI

İZMİR
-2014-

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım değerli hocam, Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı Başkanı ve tez danışmanım Prof. Dr. L. Füsün Saygılı'ya desteği ve bu çalışmanın her aşamasındaki eşsiz katkılarından dolayı en içten teşekkürlerimi sunarım.

İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Fehmi Akçiçek'e vermiş olduğu destek ve duyduğu güven için en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yan dal eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı öğretim üyelerinden; Prof. Dr. Taylan Kabalak'a, Prof. Dr. Candeğer Yılmaz'a, Prof. Dr. A. Gökhan Özgen'e, beni endokrinoloji üzerinde çalışmaya yönlendiren, güven duyan ve her zaman destekleyen Doç. Dr. Şevki Çetinkalp'e ve Doç. Dr. Mehmet Erdoğan'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmanın gerçekleşmesi için Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan Yrd. Doç. Dr. Çığır Biray Avcı'ya, Prof. Dr. Cumhuriyet Gündüz'e ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı çalışanlarına gösterdikleri bilimsel destek ve ilgileri için en içten teşekkürlerimi sunarım.

Proje desteği nedeniyle Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırma Proje birimine çok teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalıştığım tüm arkadaşlarıma, servis ve poliklinik çalışanlarımıza teşekkür ederim.

Hayattaki en büyük şansım ve desteğim olan sevgili aileme sonsuz teşekkürler...

ÖZET

ATORVASTATİNİN MEDÜLLER TİROİD KANSERİ HÜCRE HATTINDA (TT CELL LINE) APOPTOZİS VE KALSİTONİN GEN EKSPRESYONU ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Medüller tiroid kanseri(MTK) tiroid kanserlerinin yaklaşık %5' ini oluşturur, % 25 vakada familyal olarak gelişir. Genetik geçişten sorumlu olan, RET protoonkogeninde “germ-line” aktive edici mutasyonlardır. RET mutasyonu sonrası tirozin kinaz aktivasyonu ile onkojenik hücrenin proliferasyonu artar. Medüller tiroid kanserinde persistent ve rekürrens hastalığın tedavisi zordur çünkü kemoterapi, radyoterapi ve radyoaktif iyot tedavisine karşı yanıtıdır. Bu vakalarda RET ve tirozin kinaz reseptör aktivitesini hedef alan ajanların denebilir. Tirozin kinaz inhibitörleri metastazik hastalığı stabilize edebilir ancak sağ kalım süresinde bir değişiklik oluşturmazlar ve birçok yan etkileri olduğu için klinik kullanımları zordur. Statinler HMG Co A redüktaz inhibisyonu ile mevolanat yolağını inhibe ederek, proapoptotik, antiangiogenetik ve immunomodülatuar etki ile kanser hücresinde büyümeyi önledikleri daha önce birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmada MTK hücre hattında (TT cell line) atorvastatinin, kanser hücrelerindeki apoptotik ve kalsitonin gen ekspresyonundaki etkisini incelenmiştir.

TT hücreleri ile atorvastatin değişen dozlarda (12,5-25-50-60-70-80-90-100-125-150-200 µM) uygulandı, IC 50 değeri 24. saatte 90 µM, 48. saatte 80 µM ve 72. saatte 80 µM olarak hesaplandı. Atorvastatinin, apoptotik etkisi; Kaspaz 9 aktivitesi ile değerlendirildi. Atorvastatin, kaspaz 9 aktivitesini kontrol grubuna göre 24. saatte 1.273 kat, 48. saatte 1.660 kat ve 72. saatte 1.716 kat arttırdığı görüldü. Kalsitonin gen ekspresyonunu, atorvastatin sonrası, kontrol grubuna göre 24. saatte 1.377 kat, 48. saatte 7.290 kat ve 72. saate ise 8.494 kat azalttığı görüldü.

Sonuç olarak; atorvastatinin TT hücre hattında doza ve zaman bağlı olarak apoptozisi artırır ve kalsitonin gen ekspresyonunu ise azaltır. Kullanımı kolay, yan etkisi az olan atorvastatin, ilerlemiş MTK vakaların tedavisinde umut vadeden yeni bir olabilir.

ABSTRACT

ATORVASTATIN MEDULLAR THYROID CANCER OVER TT CELL LINE

IMPACT OF APOPTOSIS AND CALCITONIN OVER GENE EXPRESSION

Medullar thyroid cancer (MTC) constitutes 5% of thyroid cancers. 25% of MTC are familial. Mutations activating “germ-line” in RET protooncogene are responsible from genetic inheritance. RET mutation causing tyrosine kinase activation result in oncogenic cell proliferation. Persistent and recurrence disease management is complicated in medullary thyroid cancer because it is unresponsive to chemo, radio and radioactive iodine therapy. Agents targeting thyrosine kinase and RET receptor activity can be used in this case. Tyrosine kinas inhibitors have potential to stabilize metastatic disease, but has no effect on survival, they have many serios side effects. Many studies show that statins, inhibit canser growth by inhibiting HMG Co A reductase through supressing mevolonate pathway. In the present study, through TT cell line we investigated atorvastatin’s apoptotic impact in MTC cells and also it is effect on calcitonin gene expression.

TT cell were treated with varying doses of atorvastatine (12,5-25-50-60-70-80-90-100-125-150-200 μ M). IC 50 values at 24 hrs was 90 μ M, at 48 hrs was 80 μ M, at 72 hrs was 80 μ M. The apoptotic effect of atorvastatine was evaluated according to caspace 9 activity. Compared to controls atorvastatine increase caspace 9 activity 1.27 times at 24 hrs, 1.660 times at 48 hrs and 1.716 times at 72 hrs. Calcitonin gene expression decreased 1.377 times at 24 hrs, 7.290 times at 48 hrs and 8.494 times at 72 hrs after treating with atrvastatine when compared with controls.

The result of this study show that atorvastatine increases apoptosis in TT cell line depending on dose and duration, decreases calcitonin gene expression. In conclusion atorvastatine which has low side effects may be a remedy for advnced MTC patients.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.	ii
ÖZET	iii
ACTRACT	iv
KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER VE GRAFİKLER	ix
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Medüller Tiroid Kanseri.....	3
2.1.1 Genetik.	3
2.1.2 Klinik.....	6
2.1.2.1 Sporadik MTK.....	6
2.1.2.2 MEN 2A (Multipl Endokrin Neoplazi 2A) – Sipple Sendromu.	7
2.1.2.3 MEN 2B (Multipl Endokrin Neoplazi 2B).....	7
2.1.2.4 FMTK(Familyal medüller tiroid karsinomu.....	7
2.1.3 Tanı.....	7
2.1.4 Tarama.....	8
2.1.5 Tedavi	8
2.1.5.1 Koruyucu Tedavi Amaçlı Profilaktik Tiroidektomi	8
2.1.5.2 Cerrahi Yöntem	9
2.1.5.3 Uzun Dönem Hasta İzlemi	10
2.1.5.4 Persistan ve Rekürrent Hastalık	10
2.1.5.4.1 <i>Persistan Hiperkalsitonemi</i>	10
2.1.5.4.2 <i>Cerrahi</i>	10
2.1.5.5 Radyoterapi	11
2.1.5.6 Hedefe Yönelik Tedavi.	11
2.1.6 Prognoz	12
2.2 Statinler.....	13
2.2.1 Kimyasal ve Fonksiyonel Özellikleri	15
2.2.2 Etki Mekanizmaları:	15
2.2.3 Farmakokinetik Özellikleri	16

2.2.4 Yan Etkiler ve İlaç Etkileşimleri	18
2.2.4.1 Hepatotoksisite	18
2.2.4.2 Miyopati	18
2.3 Statin Ve Kanser	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1 TT Hücre Hattı ve Özellikleri	25
3.2 Hücre Hattının Temini ve Kültüre Edilmesi	25
3.3 Dondurulmuş Hücre Dizisinin Çözülmesi	25
3.4 Hücre Dizisinin Kültüre Edilmesi ve Pasajlanması	25
3.5 Hücrelerinin Sayımı ve Canlılığının Değerlendirilmesi	26
3.6 Atorvastatin Stok Solüsyonunun Hazırlanması	26
3.7 Sitotoksisite Değerlendirilmesi	27
3.8 Apoptozisin Değerlendirilmesi, Caspase 9	27
3.9 Kalsitonin ekspresyonu düzeyi değerlendirilmesi	28
4. SONUÇLAR.....	30
4.1 TT Hücre Hattında Atorvastatinin IC50 Değeri	30
4.2 Atorvastatinin, TT hücre hattında apoptotik etkisi; Kaspaz 9 aktivitesi	31
4.3 Kalsitonin gen ekspresyonunun değerlendirilmesi	32
5. TARTIŞMA.....	34
KAYNAKLAR.....	38

ŞEKİLLER VE GRAFİKLER

Şekil 1: RET Sinyal Yolağı.	5
Şekil 2: Statinlerin kolesterol sentezine etkisi.	14
Şekil 3: Mevolonate yolağı, HMG-COA inhibisyonu	21
Şekil 4: Ras, Raf, Rac1, Rho yolağı.	22
Grafik 1: Atorvastatinin TT hücrelerinde 24. saatte doz cevap eğrisi	30
Grafik 2: Atorvastatinin TT hücrelerinde 48. saatte doz cevap eğrisi	30
Grafik 3: Atorvastatinin TT hücrelerinde 72. saatte doz cevap eğrisi	31
Grafik 4: Kaspaz 9 aktivitesi	31
Grafik 5: Kaspaz 9 aktivitesindeki kat değişimi.....	32
Grafik 6: Kalsitonin gen ekspresyonu	32
Grafik 7: Kalsitonin gen ekspresyonu azalma katları	33

KISALTMALAR

AKT	: Protein Kinaz B
ALT	: Alanin Amino Transferaz
ATA	: American Thyroid Association
ATCC	: American Type of Culture Collection
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
CASPASE	: Cysteine Aspartate Specific ProteASEs
CEA	: Karsinoembiryogenik Antijen
CK	: Kreatinin Kinaz
CYP	: Sitokorom
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksi Ribonükleik Asit
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ERK 5	: Enigma Ekstrasellüler Regulated Kinase 5
ERK1/2	:Extrasellüler Regulated Kinase ½
FDA	: Food and Drug Administration
FFP	: Farsenil Pirofosfat
FMTK	: Familyal Medüller Tiroid Kanseri
GAPDH	: Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
GDNF	: Glial-Derive Neurotropic Faktör
GFRI	: Familyal GPI-Linked RET Koreseptörleri
GGPP	: Garenil Garenil Pirofosfat
HDL	: Yüksek Dansiteli Lipoprotein
HMGCoA	: Hidroksi Metil Glutaril Koenzim A
IDL	: Orta Dansiteli Lipoprotein
İİAB	: İnce İğne Aspirasyon Biyopsi
JNK	: C-Jun N-Terminal Kinase Yolağı
LDL	: Düşük Dansiteli Lipoprotein
MAPK	: Mitojen Aktive Protein Kinaz
MEN	: Multipl Endokrin Neoplazisi
MR	: Manyetik Rezonans
MTK	:Medüller Tiroid Kanseri

PCR	: Polymerase Chain Reaction
PET	: Positron Emission Tomography
PI3K	: Phosphatidylinositol 3-Kinase
RAF	: Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RAS	: Rat Sarcoma Oncogene
RET	: Re Arranged During Transfection
RNA	: Ribonükleik Asit
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute
RTK	: Reseptör Tirozin Kinazi
STAT 3	: Sinyal Transducer And Activator Of Transcription 3
VIP	: Vasoaktif İntestinal Peptid
VLDL	: Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein
WST-1	:Water Soluble Tetrazolium

1. GİRİŞ

Medüller tiroid kanseri (MTK), nadir görülen bir tiroid kanseri olup, tüm tiroid kanserlerinin yaklaşık %5' ini oluşturur. Tiroidin parafoliküler C hücrelerinden gelişir. Tümör hücreleri tarafından kalsitonin üretiminin olması karakteristik bulgudur. MTK, %75 sporadik , %25 familyal olarak gelişir. Familyal formalar; multipl endokrin neoplazisi (MEN) 2A, MEN 2B ve pür familyal MTC sendromu (FMTK).

Genetik geçişli tablodan sorumlu olan, kromozom 10' da lokalize olan RET(re arranged during transfection) protoonkogeninde “germ-line” aktive edici mutasyonlardır. Mutasyondan en sık etkilenen bölge ekstrasellüler sisteinden zengin bölge ve intrasellüler tirozin kinaz bölgesidir. RET mutasyonu sonucu tirozin kinaz aktivitesi artar. Tirozin kinaz aktivasyonu sonrası Ras/Raf/MEK/ERK yolağı aktive olur, bu yolağın aktivasyonu sonrası onkojenik hücrenin proliferasyonu artar.

MTK temel tedavisi cerrahidir, çoğunlukla bilateral seyrettiği için MTK olan veya yakalanma riski olan tüm hastalara total tiroidektomi ve santral boyun diseksiyonu yapılmalıdır. Cerrahi sonrası persistant ve rekürrens hastalığı değerlendirmek için kalsitonin ve CEA takibi yapılmalıdır. Postoperatif lokal hastalık varlığında cerrahi düşünülmelidir.

MTK' de uzak metastaz varlığında kemoterapi, radyasyon, hepatik kemoembolizasyon gibi palyatif tedavi yöntemleri uygulanabilirse de yanıt yoktur. İlerlemiş hastalığı olanlarda RET ve tirozin kinaz reseptör aktivitesini hedef alan ajanların tedavide etkili olabilir. Tirozin kinaz aktivitesini inhibe eden hedefe yönelik tedavi ajanları; vandetanib, sorafenib, sunitinib, pazopanib, cabozantinib ve motesanibdir. Tirozin kinaz inhibitörleri metastazik hastalığı stabilize edebilir ancak sağ kalım süresinde bir değişiklik oluşturmazlar. Ayrıca tirozin kinaz inhibitörlerinin ciddi yan etkileri olduğu için kullanımları zordur.

Statinler karaciğer ve diğer dokularda kolesterol sentezinin hız kısıtlayıcı basamağı olan HMG Co A redüktazı inhibe ederek hepatositler de kolesterol içeriğini azaltır, LDL reseptör ekspresyonunu uyarır ve sonunda dolaşımdan LDL uzaklaştırılmasını artırır. LDL' yi azaltmaya ek olarak antioksidan ve anti-inflamatuar gibi pleiotropik etkileri bulunmaktadır. HMG CoA redüktaz enzimi aracılığı ile HMG-CoA, mevalonate dönüşür, mevalonat yolağı aktivasyonu sonrası hücre içi sinyal iletiminde, hücrenin farklılaşması, proliferasyonu ve apoptozis de rol

oyunayan Ras, Rho, ve Rac gibi bir çok protein aktive olur. Statinler HMG Co A redüktaz inhibisyonu ile mevolanat yolağını inhibe eder, proapoptotik, antianjiogenetik ve immunomodülatuar etki oluşturarak kanser hücresinde büyümeyi önlerler. Daha önce yapılan birçok çalışmada ve metaanalizde statin kullanımı ile prostat kanseri, hepatosellüler kanser, mide kanseri, özafagus kanseri gibi çeşitli kanserlerin gelişme riskinin azaldığı gösterilmiştir.

Bu invitro çalışmada, atorvastatinin MTK hücrelerindeki etkisini araştırmak üzere planlandı. Bu amaçla TT hücre hattı kullanıldı.

GENEL BİLGİLER

2.1. Medüller Tiroid Kanseri

Medüller tiroid kanseri(MTK), nadir görülen bir tiroid kanseri olup, tiroidin parafoliküler C hücrelerinden gelişir. MTK tüm tiroid kanserlerinin yaklaşık %5' ini oluşturur (1-3). Tümör hücreleri tarafından kalsitonin üretiminin olması önemli bir karakteristik bulgudur.

MTK çoğunlukla sporadik olarak gelişir. Familial formlar tüm vakaların yaklaşık olarak % 25' ini oluşturur, multipl endokrin neoplazisi (MEN) 2A, MEN 2B ve pür familial MTC sendromu (FMTK)(4). Genetik geçişli tablodan sorumlu olan, kromozom 10' da lokalize olan RET (re arranged during transfection) protoonkogeninde “germ-line” aktive edici mutasyonlardır (5-7). Genetik formda, genellikle bilateral prekanseröz C hücre hiperplazisi eşlik eder. Sporadik vakalarda somatik RET mutasyonu % 30-50 oranda saptanır. Sporadik MTK de C hücre hiperplazisi tümöregenezin ilk aşamasında, lokal ve uzak metastaz gelişim evrelerinde görülür (8).

MTK tanısındaki zorluklar, genetik ve sporadik formları ayırt etmek ve tedavi seçeneğini belirleyecek olan hastalığın derecesini belirlemektir. Erken tanı ve tedavi oldukça önemli olup, sonuçları daha iyi iken, geç tanı alan olgularda sağ kalım oldukça azalmıştır (9, 10). MTK de hastalığın agresivitesinin değerlendirilmesinde; spesifik RET mutasyonlarının varlığı, kalsitonin seviyesi ve karsinoembriyogenik antijen(CEA) düzeyi önemlidir (11, 12). Genetik testler, asemptomatik taşıyıcıyı ve yüksek riskli hastayı belirlemede önemlidir (13). Rutin ultrasonografi ve kalsitonin taramasının yapılması, erken tanı olasılığını artırmış ve mortaliteyi azaltmıştır. MTC de primer tedavi yöntemi cerrahidir (14,15).

2.1.1. Genetik

RET protoonkogen germline mutasyonları 1993 yılında tanımlanmış. MEN 2A, MEN 2B ve FMTK de tespit edilmiştir. Ailesel MTK sendromlarından sorumlu germline mutasyon 10. kromozomun uzun kolundaki bant q11.2 proksimal bölgesinde

yer alır, öncelikle tiroid C hücreleri ve adrenal medülla hücreleri de dahil olmak üzere nöroendokrin hücrelerde reseptör benzeri tirozin kinaz üretimini kodlar (5, 6, 17, 18).

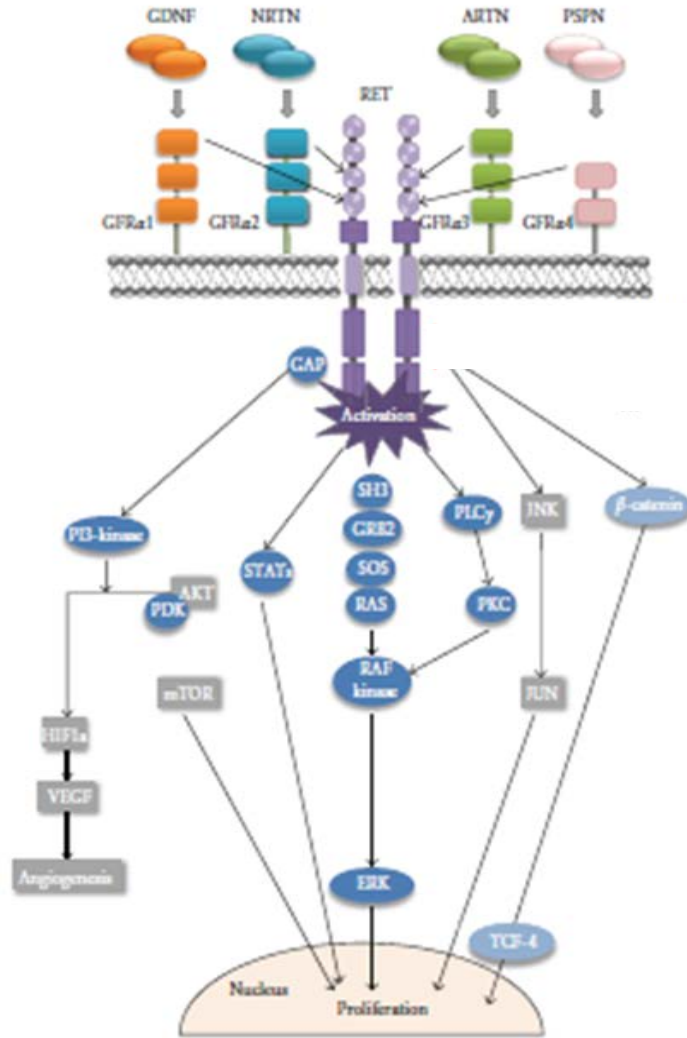
RET geninden kodlanan membran reseptör tirozin kinazı, dört ekstrasellüler cadherin-like motifler, sisteinden zengin bölge, bir transmembran kısmı ve tirozin kinaz aktivitesi olan intrasellüler alandan oluşur (Şekil 1 RET Sinyal Yolağı)(19). RET sinyali yolağı sayesinde bir ligand/koreseptör/RET multikompleksi yerine reseptör/ligand bağlanması oluşur. Glial-derive neurotrophic faktör(GDNF) ailesinde, GDNF, artemin, neurturin ve persephin ligandları ve familial GPI-linked RET koreseptörleri(GFRI-4) tanımlanmıştır (20). Ligand/koreseptör birleşmesi sonucu oluşan RET kompleksi, intrasellüler tirozini otofosforile eder. Fosforilasyon sonrası intrasellüler hedef proteinlerin aktivasyonu ile mitojen aktiviteli protein kinaz kaskadı başlar. Kaskat; Rat sarcoma oncogene/rapidly accelerated fibrosarcoma/ekstrasellüler regulated kinase 1/2(RAS/RAF/ERK1/2), phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase yolağı(PI3K/AKT), c-Jun N-terminal kinase yolağı(JNK), P38, enigma ekstrasellüler regulated kinase 5(ERK5), c AMP cevaplı element bağlayıcı protein ve sinyal transducer ve activator of transcription 3(STAT3)(21).

RET geninde oluşan germ-line aktive edici mutasyon sonrası oluşan onkogenlere bağlı kanser yolağı aktive olur (22, 23). Artan büyüme faktörleri ve proliferasyon sonucu RAS/RAF/ERK1/2 kaskadı aktive olur. Bu kaskad karsinogenetik aktiviteden sorumludur ve STAT3 fosforile olur (24, 25). RET aktivasyonuna bağlı oluşan RAC1 ve JNK hücre göçünden, FAK ise hücre göçü, invazivasyon ve metastazdan sorumludur (22, 26). RET germ-line mutasyonları sonucu klinikte en sık görülen kanser tipi herediter MTK' dir. Herediter MTK' de RET mutasyonu sonucu tirozin kinaz aktivitesi artar. Mutasyondan en sık etkilenen bölge ekstrasellüler sisteinden zengin bölge ve intrasellüler tirozin kinaz bölgesidir Ekstrasellüler sistein bölgesinde oluşan sistein kodon 634 mutasyonu vakaların %80' nında görülürken, sistein kodon 609, 611, 618, 620 ve 630 mutasyonu daha az sıklıkta görülür. Tirozin kinaz bölgesinde en sık görülen mutasyonlar ise Met918, Val804, Leu790, Tyr791 ve Ala883, daha az görülen mutasyonlar 768, 876, 891, 886, ve 912 dir (27 -33).

MEN 2A sendromunda % 80 oranda, ekson 10(kodon 609, 611, 618 ve 620) ve ekson 11(kodon 634) mutasyonları görülür. Diğer mutasyonlar; ekson 5(kodon 321), ekson 8 (kodon 515 ve 533), ekson 11(kodon 630, 634, 649, 666), ekson 13(kodon 768, 776, 777, 790 ve 791), ekson 14(kodon 804), ekson 15(kodon 866 ve 891) ve ekson

16(kodon 912) dir. Bu mutasyonlar, somatik mutasyonlardan daha çok yeni germline mutasyonları yansıtabilir. Bu mutasyonlar MEN 2A' daki tüm mutasyonların yaklaşık% 98' inden sorumludur.

FMTK mutasyonları yaygın olarak ekson 10 (kodon 609, 611, 618, 620), ekson 11 (kodon 630, 631, 634, 649, 666), ekson 13 (kodon 768), ekson 14 (kodon 804, 819, 833, 844) ve ekson 15 (kodon 866, 891) bulunur (5, 7, 34-36).



Şekil 1: RET Sinyal Yolağı

Yeni mutasyonlar MEN 2A ve FMTK olan hastalarda yaygın değildir ve genellikle vakalarının % 10' dan az oranında bulunurlar (37, 38).

MEN 2B sendromun da olguların yaklaşık % 95'de tek mutasyon ekson 16 (kodon 918) da bulunur. Nadiren ekson 15'de(kodon 883) başka bir mutasyon da bulunabilir(38 - 40).

Sporadik MTK' deki mutasyonlar ekson 13 ve 16 da kodon 918 ancak bu hastaların sadece % 30 tespit edilmiştir. RET mutasyonu olmayanlara kıyasla bu mutasyon olan tümörlerde prognoz daha kötüdür (6, 41, 42). Bu mutasyonlar, somatik mutasyonlardan daha çok yeni germline mutasyonları yansıtabilir (43).

RET protoonkogenindeki germline mutasyonlar, herediter MTK vakalarının hemen hemen hepsinde görülürken sporadik vakalarda % 30-50 oranda saptanmıştır (16). Genetik test MTK olan hastalarda rutin değerlendirmenin bir parçasıdır çünkü RET mutasyonu pozitif olan olgularda aile üyelerinde yüksek oranda MTK gelişir. Tüm hastalara olası ailesel hastalık hakkında danışmanlık ve genetik testler önerilmelidir.

2.1.2 Klinik

MTK' leri çoğunlukla sporadik olmakla birlikte vakaların % 25 familyaldır. Aşağıda MTK' nin dört tipi tanımlanacak; sporadik MTK, MEN 2A, MEN 2B ve FMTK.

2.1.2.1 Sporadik MTK

MTK vakalarının büyük çoğunluğu sporadiktir (%75 - 80). Dördüncü ve altıncı dekadarda pik yapar, kadınlarda erkeklere oranla biraz daha sıktır. Genellikle tek taraflıdır (44). Çoğunlukla ele gelen tiroid nodülü veya boyunda kitle ile presente olur. Patognomik bir ultrason bulgusu yoktur, nodül genelde solid olup, hipoekoik görünümde ve kalsifikasyon içerir. İleri yaşta olan hastalarda % 50 den fazla oranda servikal lenfadenopati görülür. Kalsitonin, prostaglandin, serotonin ve vasoaktif intestinal peptid(VIP) salgılamasına sekonder gelişen diare ve flushing gibi sistemik semptomlar daha az oranda görülür. Çok nadiren tümör hücresi tarafından sekrete edilen ACTH ya bağlı Cushing sendromu gelişir.

MTK olan tüm vakalarda bazal kalsitonin seviyesi her zaman yüksek saptanır. Önemli olan diğer bir tümör markırı CEA dır. Tiroid fonksiyon testleri genellikle normal saptanır. Patologa değerlendirme öncesi MTK şüphesi olduğu hakkında bilgi verildiğinde ince iğne aspirasyon biyopsi (İİAB) ve kalsitonin boyaması ile tanı konulabilir (45).

2.1.2.2 MEN 2A (Multipl Endokrin Neoplazi 2A) – Sipple Sendromu

MEN 2A sendromu bileşenleri MTK, feokromositoma ve primer hiperparatiroidizmdir (46). Bu sendrom otozomal dominant geçişli olup, her iki cins eşit oranda etkilenir. MTK gelişme oranı % 100 olup, multifokal ve bilateral gelişir. Feokromasitoma gelişme riski % 50 iken, hiperparatiroidizm riski % 30 dur. Bütün feokromasitomalar adrenal bezden köken alırlar ve % 50 vakada bilateral gelişir. Hiperparatiroidizm genellikle üçüncü dekattan sonra gelişir. MEN 2A’ da sıklıkla görülen diğer hastalıklar, hirschsprung hastalığı ve kutanöz liken amiloidozdur. MTK da pik insidans otuzlu yaşlarda olur, 13 yaş civarında prevalans % 25 iken 70 yaşında %70 dir (47).

2.1.2.3 MEN 2B (Multipl Endokrin Neoplazi 2B)

MEN 2B de klinik özellikler MEN 2A’ ya benzemekle birlikte MTK genellikle daha erken yaşta gelişir ve daha agresiftir. Beraber bulunabilen diğer klinik özellikler, mukozan nörinom, gastrointestinal sistemde ganglionöromatozis ve marfonoid vücut yapısıdır. Hiperparatiroidizm bu sendromda görülmez. Mukozal nörinomlar, dudakta, dilde ve intestinal kanalda olabilir (48).

2.1.2.4FMTK(Familyal nedüller tiroid karsinomu)

Bu hastalarda sadece MTK gelişir. FMTK tanısı koyabilmek için aile taramasında iki veya daha fazla jenerasyonda feokromasitoma ve hiperparatiroidizm olmadığını göstermek gereklidir. FMTK de MTK gelişimi daha ileri yaşta olur ve diğerlerine oranla prognoz daha iyidir. Bazı görüşlere göre FMTK bir MEN 2A varyantıdır (49).

2.1.3 Tanı

Tiroid nodülü olan hastalarda değerlendirme ilk olarak ince iğne aspirasyon biyopsisi (İİAB) ve sitoloji ile başlar. Klinik öykü ya da İİAB’ de MTK şüphesi varsa kalsitonin washout da yapılabilir (45). Tiroid nodülü olan hastalarda rutin kalsitonin tarama yapılması hala tartışmalıdır Avrupa (ETA) tarama yapılmasını önerirken ABD (ATA) de rutin olarak tarama yapılması önerilmemekte; sadece yüksek riskli vakalarda

bakılmasını önermektedir (50, 51). Pentagastrin uyarı testi yapılabilir tanı değeri yüksektir ve cost-effective'dir (51 – 53). MTK tanısı konduktan sonra yapılacak testler: serum kalsitonini düzeyi ölçümü, CEA, boyun ultrasonografisi, RET protoonkogeni testi için genetik konsültasyonu, 24 saat idrar metanefrin ve normetanefrin ölçümü, parathormon ölçümüdür (54, 55). Preoperatif dönemde mutlaka kalsitonin ve CEA düzeyi ölçülmelidir. Postoperatif dönemdeki kürü ve prognozu değerlendirirken karşılaştırma yapılabilir (56). Bazal kalsitonin seviyesinin 400 pg/ml üzerinde bulunması metastaz düşündürür. Metastaz taramalarında boyun ve göğüs bilgisayarlı tomografisi(BT) ile görüntülenir, karaciğer için üst batın manyetik rezonans(MR) yapılmalıdır (54).

2.1.4 Tarama

Genetik testler ile RET protoonkogenini tarama, sadece MTK tanısı için değil, aynı zamanda prognozu belirlemek ve tanısız diğer vakaları bulmak içinde önemlidir. Saptanan mutasyona göre risk sınıflandırılması yapılabilir ve farklı tedavi seçeneklerine karar verilebilir (57). MTK veya C hücre hiperplazisi olan tüm hastalarda genetik test mutlaka yapılmalıdır, sporadik MTK olan olgularda RET protoonkogeni mutasyonu saptanma olasılığı % 4 – 10 arasındadır. MTK için tarama, ailede MEN 2B tanısı olanlarda doğumdan hemen sonra yapılmalıdır, MEN 2A ve FMTK tanısı olan olgularda 5. yaşta yapılmalıdır, aynı zamanda feokromositoma ve paratiroid adenomu içinde de taramalar yapılmalıdır. Normal bulunduğu 1 - 3 yılda bir tekrarlanmalıdır (54).

2.1.5 Tedavi

2.1.5.1 Koruyucu Tedavi Amaçlı Profilaktik Tiroidektomi

Ailesel MTK de penetrasyon oranı % 100 olduğu için tüm aile bireyleri RET mutasyonu için değerlendirilmeli ve MTK için cerrahi tedavi yapılmalıdır. Buradaki amaç semptomatik olmayan vakaların erken tanısı ve tedavisi ile hastalığın ilerlemesini engellemektir.

MEN 2B de saptanan 883, 918 ve 922 mutasyonlarında prognoz oldukça kötü olup yaşamın ilk yılında yaygın metastaz yaptığı için, yaşamın ilk yılında profilaktik

cerrahi yapılmalıdır. Kodon 611, 618, 620, 634 ve 891 mutasyonlarında 5. yaşta cerrahi yapılmalıdır. En son ATA(American Thyroid Association) klavuzuna göre risk sınıflaması; yüksek risk(D), orta risk(C – B), düşük risk(A) (54). MEN 2B mutasyonlarında risk yüksek(ATA-D) olduğu için profilaktik total tiroidektomi yaşamın ilk yılında yapılmalıdır, kodon 634 mutasyonu olan olgular ATA-C kategorisinde olduğu için yaşamın ilk 5 yılında profilaktik total tiroidektomi yapılmalıdır. Diğer iki kategoride olan(ATA-A ve ATA-B) ise prognoz daha iyi olduğu için profilaktik total tiroidektomi 5 yaş sonrasına ertelenebilir ancak düzenli olarak boyun ultasonografi, bazal ve uyarılmış kalsitonin ölçümü ile takip edilmelidir. Eğer testlerde bir anormallik saptanırsa cerrahi yapılmalıdır (54).

2.1.5.2 Cerrahi Yöntem

Ailevi sendromlar ve sporadik vakaların %30' u bilateral seyrettiği için MTK olan veya yakalanma riski olan tüm hastalara total tiroidektomi ve santral boyun diseksiyonu tavsiye edilmektedir (54). MTK sıklıkla servikal lenf nodu metastazı (% 80 ipsilateral, % 40 kontrolateral), daha az sıklıkla karaciğer, akciğer ve kemik metastazı yapar (58). Cerrahi açıdan bakıldığında hastalar üç kategoriye ayrılır; lokalize hastalık, boyunda sınırlı metastazik hastalık ve uzak metastazik hastalık. Son gruptaki hastalarda cerrahi kür olasılığı yoktur (59).

Klinik ve radyolojik görüntüleme yöntemleri ile lenf nodu metastazı saptanamayan MTK hastalarda profilaktik olarak santral boyun lenf nodu (Level VI) diseksiyonu yapılmalıdır. MTK olan vakaların % 40 bu kategoride yer alır. Santral bölgede lenf bezi metastazı şüphesi olan olgularda ultrasonografide lateral bölge normal dahi olsa level VI bölge diseksiyonu yapılmalıdır. Aynı tarafa profilaktik lateral lenf nodu diseksiyonunuda önerenler de var. Belgelenmiş santral ve lateral boyun lenf nodu metastazı olan vakalara santral ve lateral bölge (level IIA, III, IV, ve V) boyun diseksiyonu yapılmalıdır (54, 60). Uzak metastazı olan olgularda daha az agresif boyun diseksiyonu yapılmalıdır; böylece lokal hastalık kontrol altına alınabilir, yutma, konuşma ve paratiroid fonksiyonları korunabilir. Palyatif cerrahi öncelikle uzak metastaz olan hastalarda ağrıyı gidermek için gerekli olabilir (54).

En sık görülen cerrahi komplikasyonlar; rekürrent laringeal sinir hasarı ve hipoparatiroidizmdir. Primer hiperparatiroidizmi olan vakalarda tiroid cerrahisine ek

olarak paratiroid cerrahi de yapılmalıdır. Ailevi sendrom olan tüm vakalarda cerrahi öncesi katekolamin sekresyonu mutlaka değerlendirilmelidir (54).

2.1.5.3 Uzun Dönem Hasta İzlemi

TSH normal tutacak şekilde tiroksin tedavi (T4) verilmeli. T4 tedavi için başlangıç dozu; 1.6 mcg/kg. Diferansiye tiroid kanserlerinde uygulanan TSH supresyonu, MTK olan vakalarda gerekli değildir. Persistent ve rekürrens hastalığı değerlendirmek için kalsitonin ve CEA takibi yapılmalıdır. Cerrahi sonrası ilk kontrol 2-3 ay sonra yapılır, ölçülemeyecek düzeyde kalsitonin ve CEA olan olgular biyokimyasal kür olarak değerlendirilir, uzun dönem takipte bu vakalarda rekürrens olasılığı % 3' den düşüktür. Daha sonraki değerlendirmeler 2- 3 yıl boyunca 6 ayda bir yapılmalıdır (54). Boyun ultrasonografisi MTK olan olguların takibinde tercih edilen görüntüleme yöntemidir.

2.1.5.4 Persistan ve Rekürrent Hastalık

2.1.5.4.1 Persistan Hiperkalsitonemi

Kür olan olgular da postop dönemde kalsitonin seviyesi ölçülemeyecek düzeydedir. Kalsitonin seviyesi 150 pg/ml altında olan vakalarda boyun ultrasonografi yapılmalıdır, bu olgularda uzak metastaz olasılığı düşüktür. Servikal lenf nodu saptanan olgulara İİAB ve kalsitonin washout yapılmalıdır. Ek görüntüleme yöntemleri yapılabilir ancak çoğunlukla sonuç negatiftir (54).

Kalsitonin seviyesi 150 pg/ml üzerinde olan vakalarda ek görüntüleme yöntemleri (akciğer BT, boyun BT, karaciğer MR, PET (Positron Emission Tomografi) ve kemik sintigrafisi yapılmalıdır (54).

2.1.5.4.2 Cerrahi

Küçük servikal lenf nodu (< 1 cm) olan ve uzak metastaz olmayan vakalara izlem veya tekrar cerrahi yapılabilir. Küçük servikal lenf nodu (< 1 cm) olan ve asemptomatik uzak metastaz varlığında ise izlem yerine cerrahi müdahale daha iyidir (54).

Lezyonlar > 1 cm, semptomatik ve / veya ilerleyici lokal hastalık varlığında cerrahi düşünülmelidir. Uzak metastaz varlığında kemoterapi, radyasyon, hepatik kemoembolizasyon gibi palyatif tedavi yöntemleri uygulanabilir (54).

2.1.5.5 Radyoterapi

MTK tedavisinde radyoterapi (RT) kullanımı tartışmalıdır. RT servial relaps riski yüksek olan hastalarda lokal hastalığı kontrol etmekte ve ağrı palyasyonunda etkili olabilir ancak uzun dönem prognozda etkili olduğu gösterilmemiştir (61 – 64). SEER(Surveillance Epidemiology and Results Program of the National Cancer Institute) çalışması, RT' nin prognoz üzerinde etkisiz olduğunu göstermiş (65).

İnkomplet rezeksiyon veya mikroskobik yayılım olan rezidü hastalığın tedavisinde RT kullanımı ATA tarafından önerilmektedir. İzole beyin metastazı varlığında cerrahi rezeksiyon ve cerrahi yapılamayan olgularda RT önerilmektedir (54). RT kalsitonin seviyesini düşürmez, çevre doku üzerinde fibrozis ve skar gibi yan etkiler oluşturur ayrıca ek cerrahi için zorluk yaratır (66). Radyoaktif iyot tedavi, MTK ve lenf nodu metastazı tedavisinde etkisi yoktur. RT sadece cerrahi sonrası lokal nüks riski yüksek olan hastalara kullanılmalıdır ancak prognoz üzerinde etkisi yoktur (67, 68).

2.1.5.6 Hedefe Yönelik Tedavi

İlerlemiş MTK vakaları için etkin bir tedavi yöntemi yok. Konvansiyonel tedaviye (cerrahi ve RT) rağmen ilerleyici hastalığı olan olgular sistemik tedavi için adaydırlar. İdeal olan yöntem ilerlemiş hastalığı olan vakalar hedefe yönelik tedavi uygulanan çalışmalara katılmalıdır (54). Yapılan çalışmalarda RET ve tirozin kinaz reseptör aktivitesini hedef alan ajanların tedavide etkili olabileceği gösterilmiştir (11, 69). Tirozin kinazın, tümör yayılması ve anjiyogeneze neden olduğu bilinmektedir. Tirozin kinaz aktivitesini inhibe eden hedefe yönelik tedavi ajanları; vandetanib, sorafenib, sunitinib, pazopanib, cabozantinib ve motesanibdir.

Vandetanib (RET, VEGF ve EGFR TKI), 2011 yılında FDA tarafından semptomatik ve ilerleyici MTK olan vakaların tedavisinde onaylanan ilk maddedir. Faz II çalışmasında kısmi yanıt gösterilmiştir. Bazı hastalarda 24 hafta kadar hastalık stabil kalmıştır (70, 71). Yeni yapılan faz III çalışmasında, progresyon olmayan sörveyin uzadığı gösterildi. Yan etkiler; diyare, rash, bulantı, hipertansiyon, QT uzaması ve baş

ağrısı (72). Vandetanib yanıtı özellikle RET M918T mutasyonu pozitif olanlarda negatif olanlara göre belirgin olarak daha iyidir.

Sorefenib (multipotent TKI, VEGFR-2,3, PDGFR, FLT-3 ve c-kit) diğer bir oral kullanılan tirozin kinaz inhibitörüdür, faz II çalışmasında parsiyel yanıt olduğu gösterilmiştir (73, 74).

Cabozantinib (MET, VEGF2 ve RET TKI) faz III (75) ve **motesanib** VEGFR 1,2,3 ve PDGFR ve stem cell factor (c-kit) TKI) faz II (76) çalışmaları olan yeni ilaçlardır. Cabozantinib oldukça toksik bir ajandır. Yan etkiler; diare, el-ayak sendromu, halsizlik, VEGF inhibisyonuna bağlı olarak hipertansiyon ve yara yeri iyileşmesinde gecikmedir. Cabozantinib FDA tarafından progresif metastazik MTK tedavisinde kullanılabilir olarak yakın zamanda onaylanmıştır.

MTK tedavisi için hedefe yönelik kullanılan ajanlar umut vericidir ancak tedavideki etkinliği değerlendirmek için daha fazla araştırma ve çalışmaya ihtiyaç vardır. Komplet remisyonun olması oldukça nadirdir. Tirozin kinaz inhibitörleri metastazik hastalığı stabilize edebilir ancak sağ kalım süresinde bir değişiklik oluşturmazlar.

CEA hedefleyen antikorlarla yapılan immunoterapi diğer bir tedavi seçeneğidir ancak sonuçları oldukça sınırlıdır (77). Dakarbazin, streptozosin, siklofosamid, 5-fluorourasil, vinkristin ve doksorubisin gibi geleneksel sitotoksik ilaçların tedavideki etkinliği azdır. Karaciğer metastazları için doksorubisin ile kemoembolizasyon denenebilir.

ATA asemptomatik ve 2 cm' den küçük, büyüyen (yılda çapı en az % 20) metastatik tümörlerde gözlem yapılmasını tavsiye etmektedir. Görüntüleme 6 – 12 ayda bir yapılmalıdır. İlerleyici hastalığı olan hastalarda (tümör 2 cm den fazla ve yılda çapı % 20' den fazla büyüme) ve cerrahi veya radyasyon için uygun olmayan semptomatik hastalar için sistemik tedavi yapılması için bir klinik çalışmaya yönlendirilmelidir. Hasta bir klinik çalışmaya dahil edilemiyorsa oral tirozin kinaz inhibitörleri verilmelidir (54).

2.1.6 Prognoz

MTK de 10 yıllık sörvey süresi tümörün özelliklerine bağlı olarak % 43-88 arasında değişmektedir (10, 44, 79-83). Prognozda önemli olan bağımsız risk faktörleri;

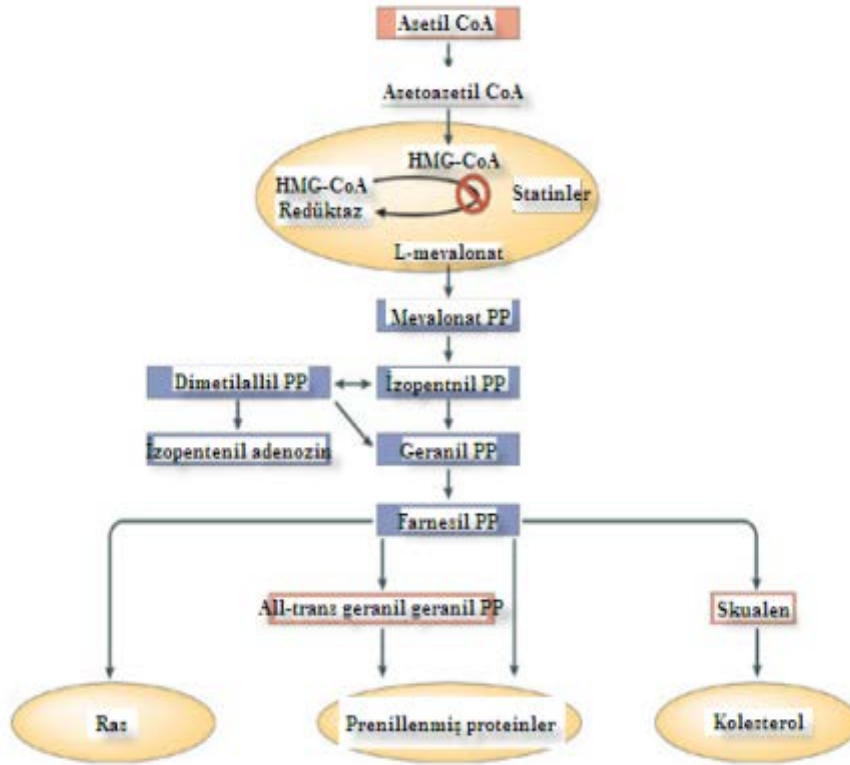
yaş, tanı esnasındaki evre ve ilk cerrahi rezeksiyonun bütünlüğüdür. Mortalite şu sırayla artar: familyal MTK < MEN 2A < sporadik MTK < MEN 2B. Kodon 918 de olan RET germline mutasyonunda hastalık oldukça invaziv seyrederek ve prognoz çok kötüdür. Erken dönemde total tiroidektomi + servikal lenf nodu diseysiyonu ile tedavi edilen olgularda kür oranı yaklaşık olarak % 100 dür. Uygun küratif cerrahi sonrası, radyolojik ve klinik olarak rezidüe tümör gösterelemeyen ancak postoperatif dönemde kalsitonini yüksek olan olgularda da yaşam beklentisi uzundur (44). Kalsitonin ve CEA katlanma zamanının 2 yıldan kısa olması kötü bir prognoztik faktördür (84).

2.2 Statinler

Kardiovasküler hastalıklar bugün dünyada en önemli bir ölüm nedenidir. Bunlar arasında da sıklık açısından ilk sırada koroner arter hastalıkları, ikinci sırada ise inme yer almaktadır. Kardiovasküler hastalıklarda esas patofizyolojik mekanizma aterosklerozdur. Ateroskleroz gelişiminde ise ana etken hiperlipidemidir. Hiperlipidemi durumunda okside düşük yoğunluklu lipoprotein-C (Düşük Dansiteli Lipoprotein-C/LDL-C) monositler tarafından fagosite edilir ve köpük hücreleri oluşur. Bu köpük hücreleri damar duvarında birikir ve bir inflamasyon meydana gelir. Sürekli kendini tekrarlayan bu kaskad neticesinde damar duvarında hasar oluşur. Bu patofizyolojik mekanizmanın anlaşılmasından sonra lipid düşürücü ajanlarla ateroskleroz gelişiminin önüne geçilmeye çalışılmış ve bu amaçla ilk olarak 1940'da klofibrat üretilmiştir. Onu sırasıyla niasin, kolestiramin, gemfibrozil ve 1987'de ise ilk statin olan lovastatin izlemiştir (88).

Statinler ilk olarak bir küf olan *Penicillium citrinium*' dan izole edilmişler ve 1976'da Endo ve meslektaşları tarafından kolesterol sentezi inhibitörü olarak tanımlanmışlardır (85). Ardından Brown ve arkadaşları tarafından (1978) statinlerin hidroksimetilglutaril koenzim A (HMGCoA) redüktaz enzimini inhibe ederek etki ettiği ortaya çıkarılmıştır (86). İnsanda çalışılan ilk statin mevastatin olarak adlandırılmıştır (87). Fakat Alberts ve arkadaşları insanda kullanımı uygun görülen ilk statin olan ve *Aspergillus terreus*'dan izole edilen lovastatin geliştirmişlerdir (88). Lovastatinin FDA (Food and Drug Administration) tarafından kabul edilmesinin ardından bu güne kadar yedi statin daha geliştirilmiştir. Bunlardan lovastatin, simvastatin ve pravastatin fungal kaynaklı HMGCoA redüktaz inhibitörleri iken, atorvastatin, fluvastatin, cerivastatin, pitvastatin ve rosuvastatin tamamen sentetik bileşiklerdir (89).

HMGCoA redüktaz enzimi, HMGCoA' nın mevalonata çevrildiği ve de novo kolesterol sentezinin hız kısıtlayıcı basamağını olan reaksiyonu katalizler (Şekil 2: Statinlerin kolesterol sentezine etkisi). Bu enzimin statinler tarafından yarışmalı inhibisyonu hepatositlerde kolesterol sentezini baskılar. Hücre içindeki kolesterol miktarının azalması hepatosit yüzeyinde LDL reseptörü ekspresyonunu artırır. Sonuçta dolaşımdan daha fazla LDL kolesterol çekilir ve dolaşımdaki LDL konsantrasyonu azalır (90). Statinler ayrıca yüksek dansiteli lipoprotein kolesterolü (HDL kolesterol) artırırken, trigliserit konsantrasyonunu düşürürler (91). Statinlerin aterosjenik lipoproteinleri azaltmalarıyla ilişkili ikincil mekanizmalar; karaciğerde apolipoprotein B100 sentezini baskılamaları ve trigliseritten zengin lipoproteinlerin sentez ve salınımlarını azaltmalarıdır (92).



Şekil 2: Statinlerin kolesterol sentezine etkisi

Hali hazır da klinik kullanımda yedi ayrı statin bulunmaktadır. Genellikle statinler oldukça güvenli ve iyi tolere edilen ilaçlardır ancak cerivastatin 2001 yılında yan etkilerinden dolayı ABD’de kullanımdan kaldırılmıştır (93).

2.2.1 Kimyasal ve Fonksiyonel Özellikleri

Statinlerin kimyasal şekilleri kabaca üç parçaya ayrılabilir;

1. Hedef enzimin substratı olan HMGC_oA analogu kısım,
2. Substrat analogu olan kısma kovalent bağlı olan ve statini enzime bağlama işlevini gören kompleks bir hidrofobik halka yapısı
3. İlaçların çözünme özelliklerini, dolayısıyla pek çok farmakokinetik özelliklerini belirleyen halka yapılarına bağlı yan gruplar

Simvastatin, atorvastatin, fluvastatin ve lovastatin nispeten lipofilik bileşikler iken, pravastatin ve rosuvastatin sırasıyla hidroksil ve metan sülfonamid grupları sebebiyle daha hidrofilik yapıdadırlar (94).

2.2.2 Etki Mekanizmaları:

Statinlerin ortaya çıkardığı ana etki LDL düşüştür. Bunu HMGC_oA analogu olan parçalarının HMGC_oA redüktaz enzimini inhibe etmesi ve ürün oluşumunu engellemesiyle sağlarlar (88). Statiner karaciğerde kolesterol sentezini inhibe ederek kan kolesterol düzeyini değiştirirler sonuç olarak LDL reseptör geninin ekspresyonunda artışa sebep olurlar. Hepatositler içindeki serbest kolesterol miktarının azalmasına cevap olarak membrana bağlı SREBP ler (sterol düzenleyici element bağlayıcı protein) proteazlar tarafından membrandan ayrılır ve çekirdeğe transloke olurlar. Ardından transkripsiyon faktörleri LDL reseptör geninin sterole cevap veren bölümüne bağlanarak taranskripsiyonun ve LDL reseptör sentezinin artmasına sebep olur (95). Ayrıca LDL reseptörlerinin yıkımı da azaltılır (86). Hepatosit yüzeyindeki LDL reseptör sayısının artması kandan daha fazla LDL alınması ve kan LDL düzeyinin düşmesine sebep olur. Bazı çalışmalarda statinlerin ayrıca, LDL prekürsörleri olan VLDL(Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein) ve IDL(Orta Dansiteli Lipoprotein)'nin kandan uzaklaşmasını artırarak ve karaciğer VLDL üretimini azaltarak da LDL kolesterol seviyelerini düşürebileceği belirtilmektedir (96, 97). VLDL kalıntılarının ve IDL' nin Apo E yönünden zengin olduğu bilinmektedir, LDL reseptörleri de ApoB100 ve Apo E' ye cevap veren reseptörlerdir. Bu sebeple statinlerle LDL reseptör sayı artışının uyarılması bu LDL prekürsörlerinin serumdan temizlenmesini artırmaktadır (98).

Statinler kullanılan doza bağlı olarak LDL kolesterolü %20 den %50' ye kadar düşürürler. Farklı statinlerin etkilerinin karşılaştırıldığı geniş çalışmalara göre statinlerin yaklaşık eş dozları 5 mg rosuvastatin, 10 mg atorvastatin, 20 mg simvastatin, 60 mg , lovastatin, 60 mg pravastatin, 80 mg fluvastatin şeklindedir (99, 100). Ancak statinlerin doz cevap ilişkileri incelemeleri LDL kolesterolün düşürülme etkinliğinin lineer olmadığını göstermiştir. Statin dozunun iki katına her bir çıkarılışında LDL kolesterolü bazal değeri sadece yaklaşık %6 daha azalır (100). Plazma kolesterol düzeylerinde maksimum etki 7-10 gün içinde ortaya çıkar. Statinler gerçekte yüksek LDL kolesterollü tüm hastalara etkilidir. Ancak homozigot ailesel hiperkolesterolemi hastaları genelde kullanılan statin dozlarına çok az cevap verirler, çünkü LDL reseptörünü kodlayan genin her iki alleli de disfonksiyonel reseptörleri oluşturur. Statinlerin bu hastalardaki kısmi etkileri ise hepatik VLDL sentezinin azalmasıyla gerçekleşir (101). Statin tedavisi Lp(a) seviyesini düşürmez (102).

2.2.3 Farmakokinetik Özellikleri

Tüm statinler uygulamanın ardından hızla absorbe edilerek dört saat içinde en yüksek plazma konsantrasyonlarına ulaşırlar(103, 104). Atorvastatinin absorpsiyon hızı ve oranı gün içinde alınma zamanına göre değişirken(103) rosuvastatinin farmakokinetik özellikleri zamandan etkilenmez(105). Ancak her iki ilaç içinde sabah veya akşam uygulanmaları ilacın lipit düşürücü etkisini değiştirmez. Bunun sebebi yarılanma ömürlerinin uzun olmasıdır. Yarı ömürleri 3 saat veya daha az olan diğer statinler için en iyi uygulama endojen kolesterol sentezinin en hızlı olduğu akşam saatlerinde verilmeleridir(104, 106). Atorvastatinin yarı ömrünün yaklaşık 14 saat olması (103) diğer statinlere kıyasla LDL kolesterolün düşürme etkinliğinin daha yüksek olmasına katkıda bulunur (107). Atorvastatinin aktif metabolitleri de HMGC_oA redüktaz üzerindeki inhibisyonu devam ettirerek eliminasyon yarı ömrünü 20-30 saate kadar genişletir (108). Rosuvastatinin yarı ömrü tipik olarak 19 saat iken(109), pitvastatinin 11 saattir (110). İleri derecede ilk geçiş eliminasyonundan dolayı, genellikle statinlerin sistemik biyoyararlanımları düşüktür (104,111). Belirtildiği gibi statinler için hedef organ karaciğerdir ve ilk geçişte alınmaları etkileri açısından biyoyararlanımlarından daha önemlidir.

Pravastatin dışındaki tüm statinler büyük oranda plazma proteinlerine bağlanırlar. Bu sebeple bağlı olmayan yani sistemik olarak aktif ilaca maruziyet

nispeten azdır (112). Bağlı olmayan pravastatin düzeyleri diğer statinlere kıyasla yüksek olmakla birlikte, ilacın hidrofilitik yapısı sayesinde geniş doku dağılımları engellenmiştir (113). Rosuvastatin, pravastatinden daha da hidrofilitiktir ancak diğer statinler lipofilitik yapıdadırlar (112). Endojen kolesterol sentezinin büyük çoğunluğu karaciğerde yapılır ve statinler etki ettikleri yer olduğu için kısmen hepatoselektiftirler. Bu hepatoselektif etkiye katkıda bulunan mekanizma statinlerin çözünürlük profili tarafından yönetilir. Lipofilitik statinler için hepatosit membranından etkin ilk geçiş eliminasyonu öncelikle pasif difüzyonla gerçekleşirken, hidrofilitik statinler için ana mekanizma taşıyıcı yoluyla alınmadır (113). Lipofilitik etkin hepatik geçişle birlikte karaciğer dışı doku membranlarından geçişi de kolaylaştırır. Bu zellik hidrofilitik statinlerin daha hepatoselektif olduğunu ortaya koyar. Gerçekte pravastatinin düz kas hücre proliferasyonunu az etkilemesinin sebebi, muhtemelen ilacın hücelere girişinin az olmasındandır (114).

Statinler ağırlıklı olarak otuzun üzerinde yesi bulunan sitokrom P450 (CYP450) enzim ailesi tarafından metabolize edilirler (115) . CYP3A4 izoenzimi insanda en fazla sayıda ilacı metabolize eden izoenzimdir ve lovastatin, simvastatin ve atorvastatini de yıkar (115). Her üç ilacında inhibitör etkilerinin bir kısmı aktif metabolitleri tarafından oluşturulur; atorvastatinin aktif metaboliti 2-hidroksi ve 4-hidroksi atorvastatindir ve simvastatinin β -hidroksi asiti esas aktif metabolitidir (116). Fluvastatin büyük oranda CYP2C9 izoenzimi tarafından metabolize edilirken, pravastatin, pitavastatin ve rosuvastatin CYP450 sisteminde metabolize olmazlar (115). Pek çok ilaç CYP450 sistemini ve özellikle CYP3A4 izoformunu inhibe edebildiği için günümüzde CYP450 sistemiyle metabolize edilen statinlerin ilaç etkileşimi sebebiyle kas toksisitesi oluşturma riskinin daha fazla olduğu bilinmektedir. İlaç etkileşimi plazma statin düzeyini artıracak ve sonuçta toksik etkilerin oluşma riski artacaktır. Statinlerin çoğunluğunun ağırlıklı atılım yolu karaciğer tarafından metabolize edildikten sonra safra yoluyla atılmalarıdır (117). Bu sebeple karaciğer disfonksiyonu statinle uyarılan miyopati için risk faktörüdür ve tüm üreticiler statin reçete edilirken hasta hikayesinin de karaciğer hastalığı olup olmadığına dikkat edilmesini önerirler. Pravastatin hem karaciğer hem de böbrekten çoğunluğu değişmemiş ilaç şeklinde atılır (118). Ancak diğer statinlerde olduğu gibi hepatik disfonksiyonu olan hastalarda farmakokinetiği değişir (119). Rosuvastatin de büyük oranda değişmeden böbrek ve

karaciğer yoluyla atılır ancak farmakokinetik özellikleri hafif veya orta dereceli karaciğer bozukluklarıyla değişmez (120).

2.2.4 Yan Etkiler ve İlaç Etkileşimleri

2.2.4.1 Hepatotoksisite

Statinlerin satışa sunulmadan önceki gözetim çalışmalarında, karaciğer transaminazlarının normal üst limitlerinin üç katından daha fazla yükselme insidansı, %1'e varan oranda gözlenmiştir. Bu yükselmenin sıklığının dozla ilişkili olduğu saptanmıştır. Fakat 20-40 mg dozlarda simvastatin, pravastatin, ve lovastatin kullanılan plasebo kontrollü çalışmalarda, aktif ilaç uygulanan gruplarda, hepatik transaminazların üç kat yükselme insidansında anlamlı artış gözlenmemiştir (121). Ciddi karaciğer patolojisi görülebilmese rağmen oldukça nadirdir (122). Klinik çalışmalarda belirtilen güvenilirlik verileri sebebiyle başlangıçta bazal ALT (Alanin Amino Transferaz) düzeyi ölçüldükten sonra tedavinin başlaması veya doz artırımının ardından 3-6 ay sonra tekrar ölçüm yapılması yeterlidir. Eğer ALT seviyeleri normal ise her 6 veya 12 aydan önce ALT çalışmak gereksizdir.

2.2.4.2 Miyopati

Statin kullanımıyla ilişkili, klinik anlamı olan tek büyük yan etki miyopatidir. Bütün statinler miyopatiye ve rabdomiyolize yol açabilir (123). Cerivastatinin 2001 de klinik kullanımdan kaldırılmasıyla bu etkiler daha titizlikle incelenmeye başlanmıştır ancak rabdomiyoliz insidansındaki artış sadece bu ilaca spesifik görünmektedir (93, 124). Miyopati riskini artıran ek bir ilaç uygulanmayan hastalarda, miyopati riski düşüktür (< % 0.1). Fibrat grubu ilaçlar ve niasin tek başlarına kullanıldıklarında da miyopatiye sebep olabilmektedirler. Statinler, fibratlar veya niasin ile birlikte uygulandığında, muhtemelen iskelet kaslarında sterol sentezinin aşırı baskılanması sebebiyle miyopati gelişir (farmakodinamik etkileşim) (125).

Makrolid antibiyotikler (ör. eritromisin), azol grubu içeren antifungaller (ör. itrakonazol), siklosporin ve proteaz inhibitörleri gibi ilaçlar, statinlerin çoğu gibi 21 CYP3A4 tarafından metabolize edilirler(125). Statinlerle bu ilaçlar arasındaki farmakokinetik etkileşim plazmada statinlerin ve aktif metabolitlerinin miktarlarının

artmasına sebep olur (125). Atorvastatin, cerivastatin, lovastatin ve simvastatin öncelikle CYP3A4 tarafından metabolize edilir ancak cerivastatin ayrıca CYP2C8 ile de yıkılabilir. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, rapor edilen miyopati vakalarının çokluğu sebebiyle cerivastatinle birlikte gemfibrozil tedavisinin kontraendike olduğu belirtilmektedir (123). Pravastatin ve lovastatin CYP3A4 sistemiyle geniş şekilde metabolize edilmedikleri için, predispozan ilaçlardan biriyle kullanıldıklarında miyopati oluşma riski muhtemelen daha azdır. Ancak bu ilaçlar için de miyopati vakaları rapor edildiği için herhangi bir statinle kombine tedavi yapılırken kar zarar ilişkisi iyi değerlendirilmelidir.

Miyopati sendromu önce kollar ve baldırlarda başlayıp tüm vücutta hissedilen grip benzeri kas ağrısı ve yorgunlukla karakterizedir. Hastalar miyopatiyi uyaran ilaçları almaya devam ettikçe semptomlar ilerler. Miyoglobüri ve böbrek yetmezliği vakaları da rapor edilmiştir (126). Serum kreatin kinaz (CK) düzeyleri tipik olarak normalin üst sınırın on kat üzerindedir. Miyopatiden şüphelenildiği zaman vakit geçirmeden plazma CK düzeyinin on katına çıkıp çıkmadığına bakılmalıdır, çünkü kas ağrısından şikayet eden hastaların çoğunda ağrı statin kaynaklı miyopatiden kaynaklanmamaktadır. Miyopatiden şüphelenildiğinde CK düzeyi bakılamıyorsa bile statin ve miyopatiye katkı yapabilecek diğer ilaçlar kesilmelidir. Rabdomiyoliz ekarte edilmeli ve böbrek fonksiyonları izlenmelidir.

Kombine tedavi dışında miyopati nadiren oluşur ve statin başka bir predispozan ilaçla kullanılmıyorsa rutin CK testi önerilmez. Miyopati kombine tedavi başladıktan aylar veya yıllar sonra da ortaya çıkabileceği için böyle bir izlem yetersizdir. Bir kural olarak, statinler bu predispozan ilaçlardan herhangi biriyle kombine kullanılacaklarsa maksimum dozlarının %25'inden daha az dozda verilerek miyopati riski azaltılır (125).

2.3 Statin ve Kanser

Statinler karaciğer ve diğer dokularda kolesterol sentezinin hız kısıtlayıcı basamağı olan HMG Co A redüktazın inhibisyonuyla hepatosit kolesterol içeriğini azaltır, LDL reseptör ekspresyonunu uyarır ve sonunda dolaşımdan LDL uzaklaştırılmasını artırır (126). Farklı popülasyonlardaki geniş çaplı klinik çalışmalarda statinlerin kardiyovasküler hastalık riskini anlamlı olarak azalttıkları kanıtlanmıştır. LDL'yi azaltmaya ek olarak trombüs oluşumunun azaltılma, antioksidan

etki, vasküler endotelial hücre hasarının iyileştirilmesi, anti-inflamatuar etki ve plak stabilizasyonu gibi pleiotropik etkileriyle ateroskleroz progresyonunu yavaşlattıkları bilinmektedir (127). Statinlerin yapısal ve fiziksel özelliklerinde farklılıklar farmakokinetikleri, pleiotropik etkileri ve ilaç etkileşimlerinde farklılıklarla sonuçlanır. Pravastatin ve rosuvastatin hidrofilik iken atorvastatin, fluvastatin, lovastatin, ve simvastatin lipofilik statinlerdir (126). Lipofilik statinlerin kanser hücreleri üzerindeki etkisi hidrofilik statinlere göre daha fazladır, bu fark lipofilik statinlerin biyolojik membranları daha kolay aşarak, intrasellüler alana geçişinin daha fazla olmasından kaynaklanabilir (128).

HMG CoA redüktaz enzimi aracılığı ile HMG-CoA, mevalonate dönüşür, mevalonatta diğer ara mediyatörlere (isoprenoidler, farnesil pirofosfat(FFP) ve geranylgeranyl pirofosfat(GGPP) dönüşür (Şekil 3: Mevalonate yolağı, HMG-COA inhibisyonu). Bu ara mediyatörler hücre içerisinde Ras(farnesil proteini), Rho(geranylgeranile protein), Rac-1(geranylgeranile protein) gibi proteinlerin posttranslasyonunda, hücre içi sinyal iletiminde, hücrenin farklılaşması, proliferasyonunda ve apoptozisinde rol oynar (129).

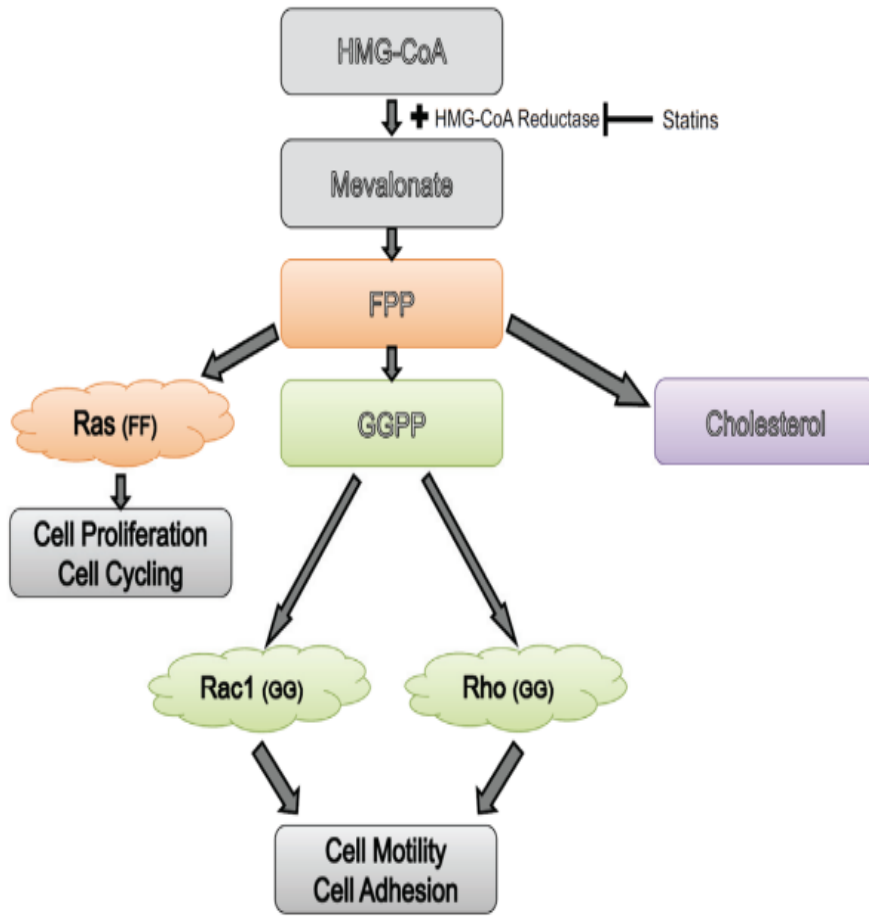
Kanser hücrelerinde Ras hücre apoptozisinden, Rho ise aktin sitoskeleton reorganizasyonu, hücre adezyonu, invazyon ve metastazdan sorumludur (Şekil-4 Ras, Raf, Rac1, Rho yolağı). Daha önce yapılan birçok çalışmada, aberran Ras aktivasyonu ve bu yolağın devamında oluşan Raf aktivasyonunun kanser gelişmesine neden olduğu gösterilmiştir. MTK, feokromositoma ve küçük hücreli akciğer karsinomu Ras/Raf yolağının anormal aktivasyonu sonrası gelişir.

Artahan ve ark. 2010 da; MTK hücre kültürü çalışmasında Ras/Raf/MEK/ERK yolağının inhibisyonuna sebep olan ajan (leukemia inhibitör faktör) ile kanser hücrelerinin proliferasyonunu azalttığını ve apoptozisi arttırdığını gösterdiler (130).

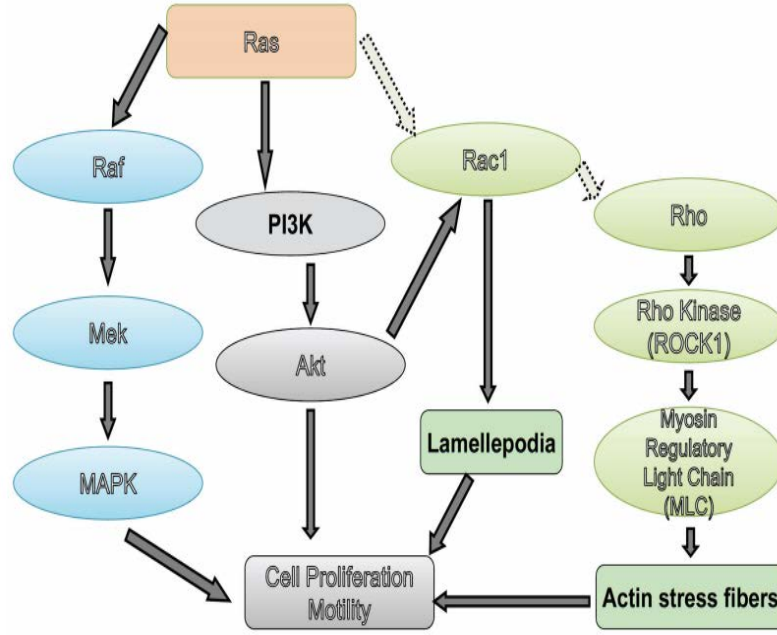
Hong ve ark 2011 de; MTK ve diferansiye tiroid kanseri olan 35 hastaya RET tirozin kinaz inhibitörü olan sorafenib ile farnesil transferaz ve ras inaktivatörü olan tipifarnib kombine kullanıldığında MTK de tedaviye yanıt oranı %38 olduğunu saptamışlar (131).

Yapılan hücre kültürü çalışmalarında, kanser hücrelerinde HMG-CoA enzim inhibisyonu ile Ras, Rho, ve Rac gibi isoprenoid proteinler bloke olduğunda, hücre büyümesinin ve diferansiyasyonunun azaldığı gösterilmiştir (132).

Statinler, Mitojen Aktive Protein Kinaz (MAPK), fosfotidilinozitol 3 kinaz (PI3K), protein kinaz B (AKT), epidermal büyüme faktörü reseptörü(EGFR) gibi birçok önemli hücrel sinyal yolağını etkiler. Sonuç olarak statinler; proapoptotik, antiangiogenetik ve immunomodülatuar etkileri nedeniyle kanser hücrelerinde büyümeyi önlerler (133).



Şekil 3: Mevalonate yolağı, HMG-COA inhibisyonu



Şekil 4 Ras, Raf, Rac1, Rho yolu

Daha önce yapılan birçok çalışmada ve metaanalizde statin kullanımı ile prostat kanseri, hepatosellüler kanser, mide kanseri, özafagus kanseri gibi çeşitli kanserlerin gelişme riskinin azaldığı gösterilmiştir (134 – 137).

Statinlerin kardiyovasküler sonuçlarını araştıran randomize kontrollü çalışmaların erken post-hoc analizinde, statin kullanımının kansere bağlı mortaliteyi azaltmadığı gösterilmiştir ancak bu çalışmalardaki en önemli kısıtlama takip süresinin kısa olmasıdır (138).

NEJM’ da Kasım 2012’ de yayınlanan Nielsen ve ark. yaptığı çalışmada (139); Danimarka nüfusunda 1995-2009 yılları arasında 40 yaş üstü, kanser tanısı almadan önce statin kullanan hastalarda kansere bağlı mortalite oranının araştırılmıştır. 1.072.503 kişi takip edilmiş, bu olguların 295.925 kanser tanısı almış, toplam 195.594 ölüm olmuş ve bu ölümlerden 162.067 si kansere bağlı olmuş. Kanser tanısı almadan önce statin kullanmayanlara kıyasla statin kullananlarda herhangi bir nedene bağlı mortalite (düzeltilmiş HR:0.85; %95 CI:0.83-0.87) veya kansere bağlı mortalite (düzeltilmiş HR:0.85; %95:0.82-0.87) oranı %15 az saptanmış. 18721 statin kullanan ile 277204 statin kullanmayan kanserli olgular 27 kanser tipi için mortalite oranları açısından değerlendirildiğinde 13 kanser tipinde statin kullanımı ile sağkalım artmış. Akciğer kanseri (düzeltilmiş HR:0.87; %95 CI:0.83-0.92), kolorektal kanser(düzeltilmiş HR:0.79; %95 CI:0.75-0.85), prostat kanseri(düzeltilmiş HR:0.81; %95 CI:0.75-0.88),

meme kanseri(düzeltilmiş HR:0.88; %95 CI:0.80-0.99), serviks kanseri(düzeltilmiş HR:0.87; %95 CI:0.83-0.92), pankreas kanseri(düzeltilmiş HR:0.89; %95 CI:0.81-0.98).

Ahern ve ark. yaptığı çalışmada; evre I-III meme kanserli olgularda 10 yıllık simvastatin (lipofilik statin) kullanımı sonrası meme kanseri rekürrensinde % 30 (HR:0.70; %95, CL:0.57-08) oranında azalma saptanmıştır (140).

Cauley ve ark. yapmış olduğu büyük bir prospektif çalışmada; 156351 sağlıklı kadınlarda lipofilik statin (simvastatin, lovastatin ve fluvastatin) kullanımı ile invaziv meme kanseri gelişme insidansının %18 (HR:0.82; 95% CI:0.70 to 0.97) düştüğü saptanmıştır (141).

Robinson E. ve ark. yapmış oldukları hücre kültürü çalışmasında; over kanseri hücre hattında statinlerin apoptozis üzerindeki etkinliğini araştırmış. Statinlerin over kanseri hücrelerinde büyümeyi inhibe ettiklerini ve simvastatin, fluvastatin gibi lipofilik statinlerin, hidrofilik statinlere göre daha potent olduklarını göstermişlerdir (142).

Lung Chang ve ark. yapmış oldukları hücre kültürü çalışmasında; kolorektal kanser hücre hattında statinlerin apoptozis ve p38MAPK-p53 sinyal yolağındaki etkisini araştırmışlar. Lovastatin ve simvastatinin hücre canlılığını azaltarak apoptozisi artırdığı, pravastatinin (hidrofilik statin) etkisiz olduğunu göstermişler. Ayrıca simvastatinin p38MAPK-p53 kaskadını aktive ederek apoptosize sebep olduğunu göstermişlerdir (143).

Campbell ve ark. 2006 da; in-vivo oral statin kullanımının farelerde meme kanseri gelişimini azalttığını ve in-vitro statinlerin meme kanser hücrelerinin proliferasyonunu azalttığını ve apoptozisi indüklediğini göstermişlerdir (144).

Sivaprasad ve ark.2006 da; prostat kanser hücre hattında, statinlerin kanser hücrelerini G1 fazında öldürdüklerini gösterdiler (145).

Kawata ve ark. 1994 de hepatosellüler kanser hücre hattında, Hawk ve ark. 1996 da akciğer kanseri hücre hattında ve Gbelcova ve ark. 2008 de pankreas kanseri hücre hattında yaptıkları çalışmalarda; statinlerin invitro kullanımı ile antiproliferatif etkilerinin olduğunu gösterdiler (146, 147, 148). Statinlerin kanser hücreleri üzerindeki etkileri; hücre büyümesini inhibe etme ya da apoptozisi artırma biçimindedir (149).

Statinlerin tiroid hücrelerindeki antiproliferatif etkilerini araştıran sınırlı sayıda çalışma vardır. Bifulco ve ark 1999 da; lovastatinin rat tiroid hücrelerinde

antiproliferatif ve proapoptotik aktivitesi olduğunu gösterdiler. Bifulco ve ark 2008 de anaplastik tiroid kanseri hücre hattında lovastatinin Rho inhibisyonu ile geranilgeranil pirofosfat oluşumunu azalttığı ve proapoptotik olduğunu gösterdiler (150). Zhong ve ark 2003 de; anaplastik tiroid kanseri hücre hattında lovastatinin, farnesil pirofosfat ve geranilgeranil pirofosfat oluşumu azaltarak antiproliferatif etkili olduğunu gösterdiler (151). Zeybek ve ark 2011 de rosuvastatinin papiller tiroid kanser hücre kültüründe apoptozisi indüklediğini gösterdiler (152). Campbelli ve ark. ise 2008’de statin tedavisi alan hastalarda tiroid nodul insidansının azaldığını gösterdiler (153).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 TT Hücre Hattı ve Özellikleri

TT hücre dizisi; 77 yaşında, medüller tiroid karsinomlu Kafkas ırklı bir bayanın tümör dokusundan 1981 yılında üretilmiştir. İnsan kökenli bir tiroid karsinoma hücre hattıdır. İğsi veya yuvarlak şekillidir ve tek katmanlı olarak tutunarak çoğalırlar. Kalsitonin ve CEA üretimi yüksek düzeydedir.

3.2 Hücre Hattının Temini ve Kültüre Edilmesi

TT hücre hatları ATCC (American Type of Culture Collection) den satın alındı. Bu çalışma için Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi desteği alındı (proje takip no 2.100.2012.0155)

3.3 Dondurulmuş Hücre Dizisinin Çözülmesi

%10 DMSO(Dimetil Sülfoksit) ile dondurulmuş olan TT hücre dizisi -86°C'den çıkarıldıktan sonra -20°C' de bekletildi ve kademeli olarak 37°C'de çözüldü. DMSO' dan arındırılmak amacıyla hücrelerin üzerine 10-15 ml besi yeri eklenerek 800 devir/dakikada 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında oluşan süpernatant atılıp daha sonra kalan hücre çökeltisi üzerine taze besiyeri eklenerek homojenize edildi. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Homojenizasyon sonrası hücreler 75 cm²'lik steril flasklara aktarıldı.

3.4 Hücre Dizisinin Kültüre Edilmesi ve Pasajlanması

Hücre kültür işlemleri, steril laminar hava akımlı çalışma kabini içinde gerçekleştirildi. Çalışma boyunca hücre dizisinin devamının sağlanması ve canlılığının korunması amacıyla pasajlar yapıldı. Kültür flasklarının tabanına tutunarak çoğalan hücreler mikroskop yardımıyla günlük olarak canlılık, çoğalma ve enfeksiyon yönünden izlendi. Flasklardaki besiyeri 3 günde bir değiştirildi ve ikilenme sürelerine uygun olacak şekilde pasajlama yapıldı.

TT için gerekli olan bazal besiyeri %90 RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640'tır. Bu besiyerine ısı ile inaktive edilmiş fetal sığır serumu %10 konsantrasyonda, 10000 U/mL penisilin ve 10 mg/ml streptomisin eklendi.

TT hücre hattı, 37°C'de %5 CO₂'li, nemli inkubatörde belirtilen besiyeri konularak çoğaltıldı.

Hücrelere filtreli kapağı olan kültür flasklarında 10 ml besiyeri eklendi ve filtreli kapak sayesinde CO₂ girişi sağlandı.

3.5 Hücrelerinin Sayımı ve Canlılığının Değerlendirilmesi

TT hücrelerinin kültür flasklarının zemininde tutunarak oluşturdukları tek katlı hücre tabakası, mekanik olarak kazılarak flask zemininden ayrıldı. Hücreler zeminden kalkınca, besiyeri ile nötralize edilip 15 ml'lik steril santrifüj tüplerine aktarıldı. Santrifüjlenen hücrelerin, işlem sonrası süpernatantı atılarak dibe çöken hücre pelleti 10 ml besiyeri ile seyreltildi. Pipetajla homojenize edilen hücrelerin süspansiyonundan 50 µl alınıp 50 µl tripan mavisini ile 1:1 oranında karıştırıldı. Bu karışımdan alınan örnekler, otomatik sayım cihazı ile sayıldı. Tripan mavisini canlılık testinin kontrolü olarak floresan mikroskopta da incelendi. Canlı hücreler, tripan mavisini boyasını membranlarından içeri almadıkları için parlak, ölü hücreler ise bu boyayı hücre içine aldıkları için koyu mavi renkte görüldü, fotoğraflandı.

Canlı hücre sayısı belirlenen hücre süspansiyonundan 100 µl' de 100000 canlı hücre olacak şekilde seyreltme yapıldı. 96 kuyucuk içeren hücre kültürü plakları kullanıldı. Her kuyucuğa 100 µl hücre süspansiyonu eklendi. 24 saat inkubatörde bekletildi.

3.6 Atorvastatin Stok Solüsyonunun Hazırlanması

Bu çalışmada statin olarak 1155.36 gr/mol moleküler ağırlıktaki atorvastatin Calcium Salt ((C₃₃H₃₄FN₂O₅)₂•Ca) kullanıldı. Atorvastatin kalsiyum tuzu 50 mg flakon şeklinde Santa Cruz Biotechnology den satın alındı

10 mg toz atorvastatin kalsiyum tuzu 1 ml DMSO çözülerek, 10 mM'lık stok solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan stok solüsyonlar 0.22 µm'lik filtrelerden geçirilip

sterilize edilerek 100 µl'lik küçük hacimler halinde -20°C'de saklandı. Her deney için yeni stok solüsyon kullanıldı.

3.7 Sitotoksisite Değerlendirilmesi

WST-1 solüsyonu (Water Soluble Tetrazolium tuzu), canlı veya apoptozun erken evresindeki hücrelerin mitokondrilerinde bir reaksiyon oluşturur. Solüsyonda bulunan tetrazolium halkası hücre mitokondrilerinde bulunan dehidrogenaz enzimlerince parçalanarak renkli formazan kristalleri oluşturur. WST-1'in kimyasal formülü [2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolium sodyum tuzu]'dur.

Atorvastatin kalsiyum tuzu 24.-48.-72. saatlerdeki sitotoksik etkilerini değerlendirmek için WST-1 hücre canlılık kiti kullanıldı.

Her kuyucukta 100 µl hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklara pipetlendi. Atorvastatin kalsiyum tuzu 12,5-25-50-60-70-80-90-100-125-150-200 µM şeklinde artan dozları kullanıldı. Her konsantrasyon için üç kuyucuk kullanıldı. İlaç konulmayan sadece hücre ve besiyeri içeren kuyucuklar pozitif kontrol olarak kabul edildi. Hücre ve ilaç içermeyen kuyucuklara ise sadece besiyeri eklenerek negatif kontrol olarak kullanıldı. 24.-48.-72. saatlerde her kuyucuğa 10µl WST-1 hücre canlılık kiti eklendi. Hücreler 3-4 saat inkübatörde bekletildi. WST-1 konulduktan sonra her kuyucuğun absorbans değeri spektrofotometrik olarak mikropłaka okuyucuda 480 nm'de ölçüldü. Her deney 3 kez tekrarlandı.

IC₅₀ değeri hesaplanması için sitotoksisite değerleri CalcuSyn 2.0 programına girildi. (IC₅₀, bir ilacın hücrelerin %50'sini öldürdüğü inhibitör konsantrasyonudur.) Yüzde canlılık ve dolaylı olarak sitotoksisite değerleri hesaplandı.

% sitotoksiste formülü:

$$1 - [(ilaçlı kuyucukların absorbans ort./kontrol kuyucukların absorbans ort.)x100]$$

3.8 Apoptozisin Değerlendirilmesi, Caspase 9

Bu deneylerde apoptozis kaspase 9 ile değerlendirildi. Caspase – 9, 25 assay kit olarak Biovision firmasından satın alındı.

Test protokolü;

- Atorvastatin ile apoptoz için indüke edilmiş hücreler kullanıldı. Apoptoz için indüke edilmemiş hücreler kontrol grubu olarak alındı.
- Hücreler sayıldı ve 2-5 x 1.000.000 hücre kullanıldı.
- Süspanse hücreler 50 ul Cell Lysis Buffer eklendi ve 10 dakika kadar buz üzerinde inkübe edildi.
- Mikrosantrifüj ile 1 dakika (10.000 x g) santrifüj yapıldı
- Elde edilen süpernatant buz üzerinde yeni bir tüpe alındı.
- Test için protein konsantrasyonu alındı
- Her bir test için 100-200 ug protein 50 ul Cell Lysis Buffer ile dilüe edildi
- Her bir örnek için 50 ul reaksiyon tamponu (10 mM DTT) ve 5 ul LEHD-pNA substratı eklenerek 37 C de 1-2 saat inkübe edildi.
- Örnekler 400/405 nm microtiter plate reader ile okutuldu.

3.9 Kalsitonin ekspresyonu düzeyi değerlendirilmesi;

Kalsitonin ekspresyonunun değerlendirilmesi için; Colorimetrik Assay kit LightCycler Calsitonin UPL Assay set (Calcitonin primers: forward, 59-AGCGACTTGGAGAGAGAC; reverse, 59-AGCCCAAAGAGCCACCA, High Pure RNA(Ribonükleik Asit) Isolation Kit 50 rxn, Transcriptor High fidelity CDNA(Deoksi Ribonükleik Asit)Synthesis Kit 50 rxn, LC Taqman Master Kit 50 rxn) kullanıldı.

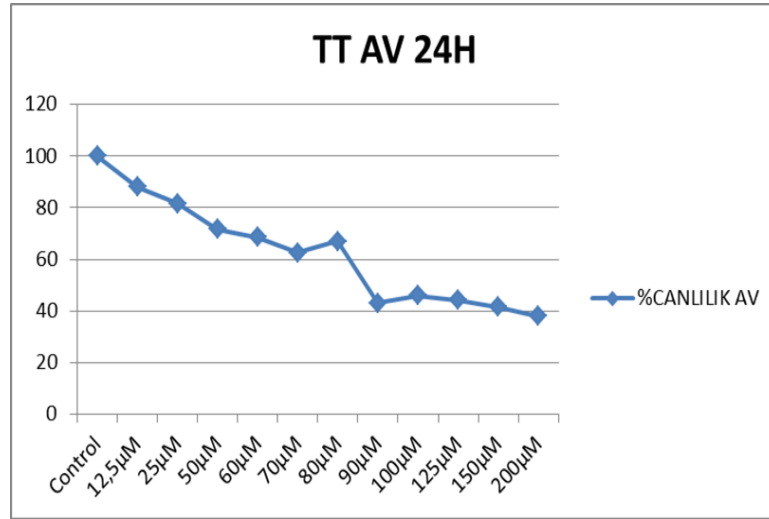
- mRNA ekspresyonları RT PCR metoduyla çalışıldı.
- Önce RNA eldesi ve kantitasyonu gerçekleştirildi.
- RNA elde edildikten sonra Roche Applied Biosystems Taqman Reverse Transcription Reagents kiti kullanılarak cDNA elde edildi.
- PCR reaksiyonu sırasında amplifikasyon işlemi gerçekleştikçe TaqMan probdan salınarak serbest kalan FAM boyasının verdiği floresans Real-Time PCR cihazı tarafından kaydedilerek her örneğin başlangıç konsantrasyonuna göre vermiş olduğu Ct değerleri yine cihaz tarafından otomatik olarak hesaplandı.
- Sonuçlar Comperative Ct yöntemi ile hesaplandı. Bu yöntemde önce atorvastatin ve kontrol grubu örneklerinin ortalama Ct değerleri GAPDH(Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase), kalsitonin ayrı ayrı hesaplandı Daha sonra kalsitonin ortalama değerlerinden tek tek GAPDH ortalama değerleri

çıkartıldı ve bu işlem hem atorvastatin grubuna hemde kontrol grubuna yapılarak ΔCt (delta Ct) değerleri hesaplandı. Daha sonra hesaplanan kontrol grubu ΔCt değerleri hasta grubu ΔCt değerlerinden çıkartılarak $\Delta\Delta Ct$ değeri hesaplandı. Bu değer $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne uygulanarak atorvastatin grubunun kalsitonin ekspresyonunun kontrol grubuna göre kaç kez artmış ya da azalmış olduğu GAPDH gen ekspresyonu internal kontrol olarak kullanılarak rölatif olarak belirlendi.

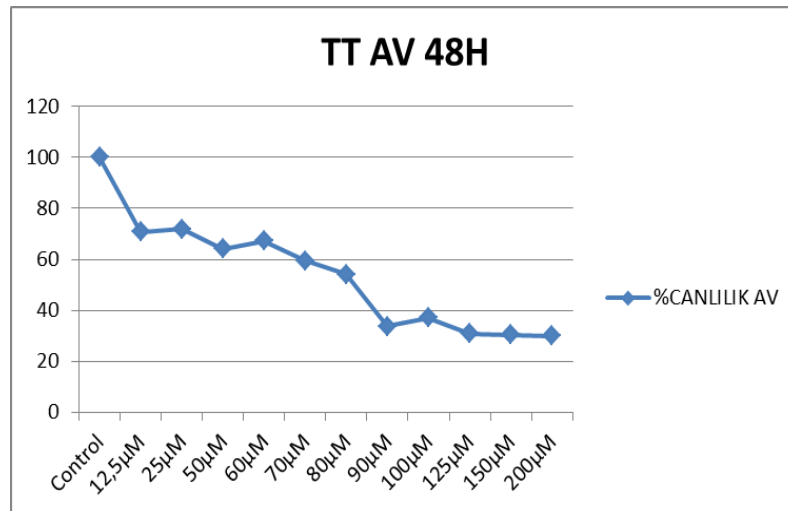
4. SONUÇLAR

4.1 TT Hücre Hattında Atorvastatinin IC50 Değeri

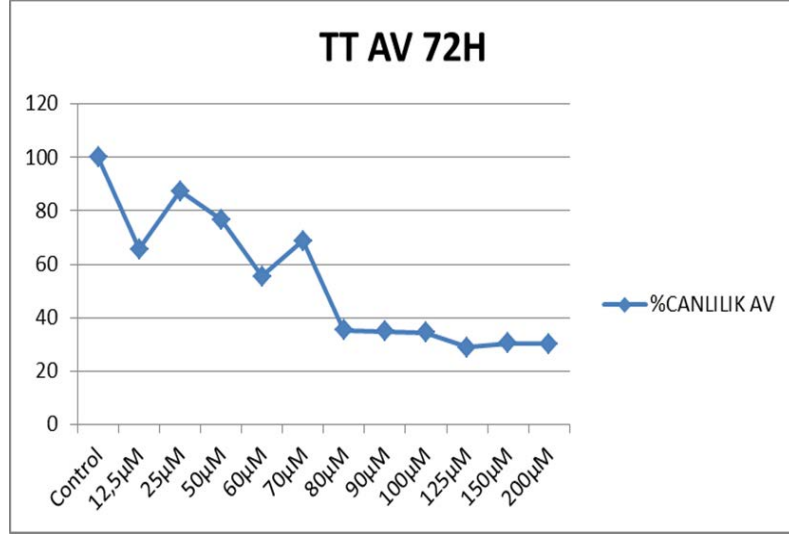
TT hücrelerine atorvastatinin değişen dozlarla (12,5-25-50-60-70-80-90-100-125-150-200 μM) muamelesi sonrası elde olunan absorbans değerlerinden sitotoksosite yüzdeleri hesaplandı. Sitotoksosite değerleri CalcuSyn 2.0 (Biosoft, İngiltere) programı ile hesaplandı. Böylece ilacın doz etki eğrisi oluşturularak ilacın IC 50 değeri hesaplandı. Atorvastatin IC 50 değeri 24. saat, 48. saat ve 72. saat için sırasıyla; 90 μM , 80 μM ve 80 μM olarak hesaplandı.



Grafik 1: Atorvastatinin TT hücrelerinde 24. saatte doz cevap eğrisi



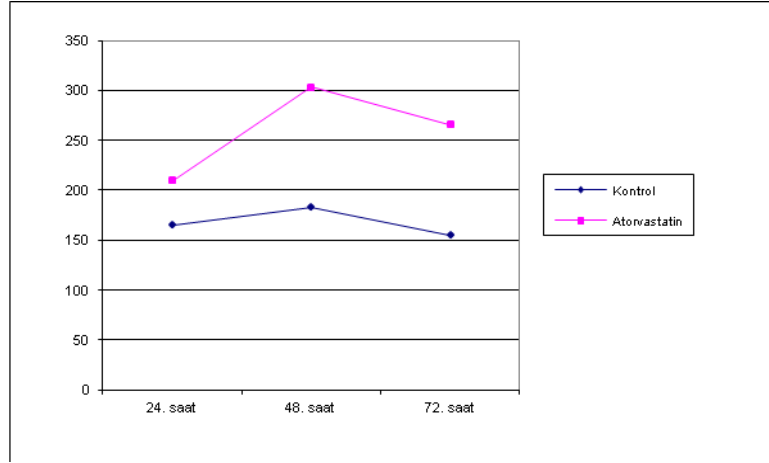
Grafik 2: Atorvastatinin TT hücrelerinde 48. saatte doz cevap eğrisi



Grafik 3: Atorvastatinin TT hücrelerinde 72. saatte doz cevap eğrisi

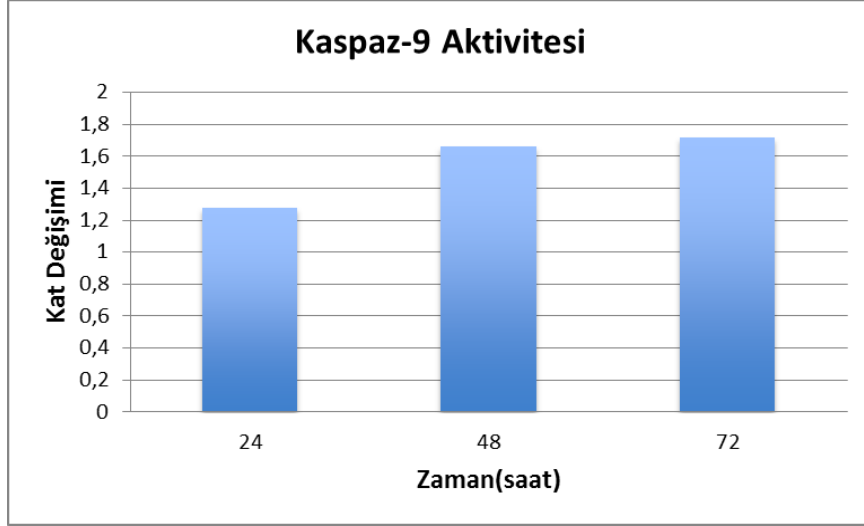
4.2 Atorvastatinin, TT hücre hattında apoptotik etkisi; Kaspaz 9 aktivitesi

Kontrol grubunda kaspaz 9 aktivitesi, 24. saat, 48. saat, 72. saat için sırasıyla; 0.165, 0.183, 0.155 olarak saptandı. Atorvastatin grubunda kaspaz 9 aktivitesi ise, 24. saat, 48. saat, 72. saat için sırasıyla; 0.210, 0.310, 0.266 olarak saptandı (Grafik- 4).



Grafik 4: Kaspaz 9 aktivitesi

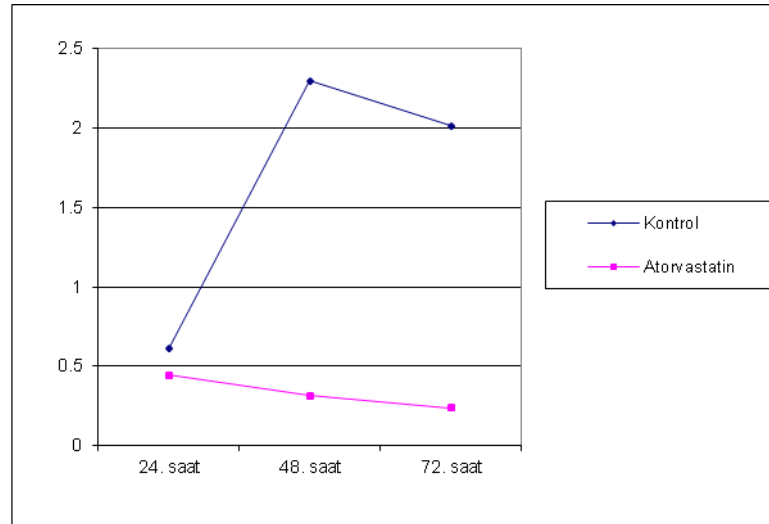
Atorvastatinin, kaspaz 9 aktivitesini kontrol grubuna göre 24. saatte 1.273 kat, 48. saatte 1.660 kat ve 72. saatte 1.716 kat artırdığı görüldü (Grafik 5).



Grafik 5: Kaspaz 9 aktivitesindeki kat değişimi

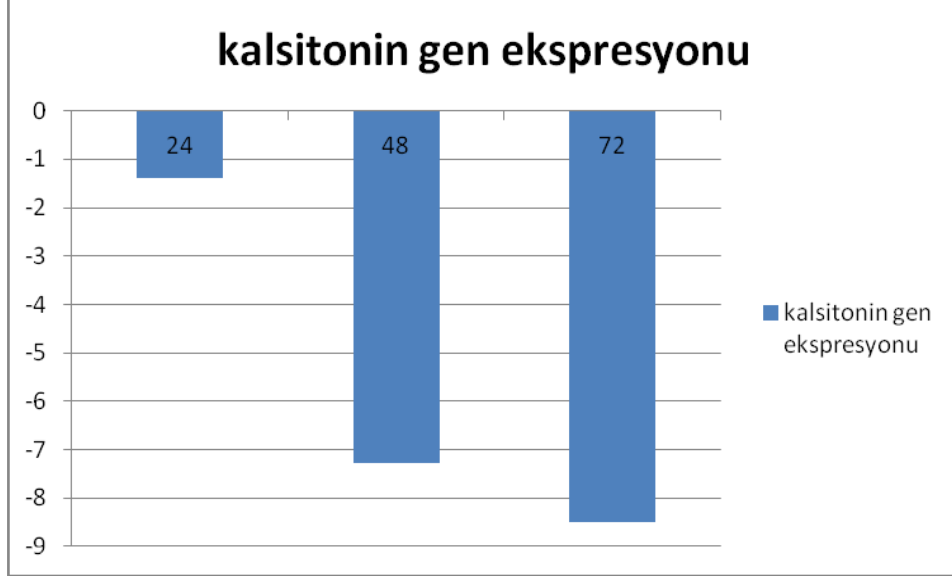
4.3 Kalsitonin gen ekspresyonunun değerlendirilmesi

Kontrol grubunda kalsitonin gen ekspresyonu düzeyi, 24. saat, 48. saat, 72. saatde sırasıyla; 0.611, 2.298, 2.013 olarak bulundu. Atorvastatin grubunda kalsitonin gen ekspresyonu düzeyi, 24. saat, 48. saat, 72. saat sırası ile; 0.443, 0.315, 0.237 saptandı (Grafik 6).



Grafik 6: Kalsitonin gen ekspresyonu

Kalsitonin gen ekspresyonunun, atorvastatin sonrası azalma oranlarına bakıldığında, 24. saatte 1.377 kat, 48. saatte 7.290 kat ve 72. saate ise 8.494 kat azaldığı görüldü(Grafik 7).



Grafik 7: Kalsitonin gen ekspresyonu azalma katları

5. TARTIŞMA

MTK nadir görülen bir tiroid kanseri olup, tüm tiroid kanserlerinin yaklaşık %5' ini oluşturur (1-3). Bilinen en iyi tedavi yöntemi cerrahi rezeksiyondur. Ancak cerrahi ile tam küratif yanıt her zaman sağlanamaz. Konvansiyonel sitotoksik kemoterapinin ve radyoterapinin tedavide etkinliği sınırlıdır. Sağ kalım oranı 5 yılda %25, 10 yılda %10 dur. İlerlemiş MTK vakaları için etkin bir tedavi yöntemi yoktur. Konvansiyonel tedaviye (cerrahi ve RT) rağmen ilerleyici hastalığı olan olgular sistemik tedavi için adaydırlar (54).

RET proto-onkogenindeki germline mutasyonlar, herediter MTK vakalarının hemen hemen hepsinde görülürken sporadik vakalarda % 30-50 oranda saptanmıştır (16). RET geninde oluşan germ-line aktive edici mutasyon sonrası oluşan onkogenlere bağlı kanser yolağı aktive olur (22, 23). Artan büyüme faktörleri ve proliferasyon sonucu RAS/RAF/ERK1/2 kaskadı aktive olur. Bu kaskad karsinogenetik aktiviteden sorumludur ve STAT3 fosforile olur (24, 25). RET aktivasyonuna bağlı oluşan RAC1 ve JNK hücre göçünden, FAK ise hücre göçü, invazivasyon ve metastazdan sorumludur. RET proto-onkogenindeki germline mutasyondan en sık etkilenen bölge ekstrasellüler sisteinden zengin bölge ve intrasellüler tirozin kinaz bölgesidir. RET mutasyonu sonucu tirozin kinaz aktivitesi artar ve reseptör aktive olur. Tirozin kinazın, tümör yayılması ve anjiyogeneze neden olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda RET ve tirozin kinaz reseptör aktivitesini hedef alan ajanların tedavide etkili olabileceği gösterilmiştir (11, 69).

HMG CoA redüktaz enzimi aracılığı ile HMG-CoA, mevalonate dönüşür, mevalonatta diğer ara mediyatörlere (isoprenoidler, FFP ve GGPP) dönüşür. Bu ara mediyatörler hücre içerisinde Ras, Rho, Rac-1 gibi proteinlerin posttranslasyonunda, hücre içi sinyal iletiminde, hücrenin farklılaşması, proliferasyonunda ve apoptozisinde rol oynar (129). Kanser hücrelerinde Ras hücre apoptozisinden, Rho ise aktin sitoskelet reorganizasyonu, hücre adezyonu, invazyon ve metastazdan sorumludur.

MTK, Ras/Raf yolağının anormal aktivasyonu sonrası gelişir. Yapılan bir hücre kültürü çalışmasında, MTK hücrelerinde Ras/Raf/MEK/ERK yolağının inhibisyonu ile kanser hücrelerinin proliferasyonun azaldığı ve apoptozisin arttığını gösterdiler (130). Hücre kültürü çalışmalarında, kanser hücrelerinde HMG-CoA enzim inhibisyonu ile

Ras, Rho ve Rac gibi proteinlerin bloke olduğu, hücre büyümesinin ve diferansiyasyonunun azaldığı gösterilmiştir (132).

Statinler, Mitojen Aktive Protein Kinaz (MAPK), fosfotidilinozitol 3 kinaz (PI3K), protein kinaz B (AKT), epidermal büyüme faktörü reseptörü(EGFR) gibi birçok önemli hücresel sinyal yolağını etkiler. Sonuç olarak statinler; proapoptotik, antianjiyogenetik ve immunomodülatuar etkileri nedeniyle kanser hücresinde büyümeyi önlerler (133).

Yapılan birçok çalışmada ve metaanalizde statin kullanımı ile prostat kanseri, hepatosellüler kanser, mide kanseri, özafagus kanseri gibi çeşitli kanserlerin gelişme riskinin azaldığı gösterilmiştir (134–137).

- Over kanseri hücre hattında, statinlerin kanser hücrelerinde büyümeyi inhibe ettikleri ve simvastatin ve fluvastatin gibi lipofilik statinlerin, hidrofilik statinlere göre daha potent olduklarını gösterilmiştir (142).

- Kolorektal kanser hücre hattında, lovastatin ve simvastatinin hücre canlılığını azaltarak apoptozisi artırdığı, pravastatinin(hidrofilik statin) etkisiz olduğunu göstermişler. Ayrıca simvastatinin p38MAPK-p53 kaskadını aktive ederek apoptozise sebep olduğunu göstermiştir (143).

- Yavaşoğlu ve ark. kronik lösemi hücre kültüründe, atorvastatin (IC 50 dozu 5 μ M) ile apoptozisin arttığını göstermişlerdir (155).

- Xi Zheng ve ark. prostat kanseri hücre kültüründe, atorvastatin (IC 50 dozu 10 μ M) ile apoptozisin arttığını göstermişlerdir (156).

- J Chen ve ark. Gefitinib dirençli küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre kültüründe, atorvastatin (IC 50 dozu 5 μ M) ile gefitinib kombine edildiğinde apoptozisin arttığını göstermişler (157). Islam M ve ark, skuamoz hücreli karsinom hücre kültüründe, atorvastatin (IC 50 dozu 10 μ M) ile apoptozisin arttığını, RhoC, p-ERK1/2 ve p-STAT3 aktivitesinde azalma olduğunu göstermişlerdir (158).

- Riganti C ve ark. Her2/neu pozitif meme kanseri hücre hattında, atorvastatin 2.5 – 20 – 50 – 100 – 200 μ M dozlarında FFP ve GGPP sentezinde azalma ve IC 50 dozu 200 μ M dozda ise apoptoziste artma saptamışlardır (159).

- Hongli Liu ve ark. Over kanseri hücre kültüründe atorvastatin (IC 50 dozu 10 μ M) ile apoptozisin arttığını göstermişlerdir (160).

Statinlerin tiroid kanser hücrelerindeki antiproliferatif etkilerini araştıran sınırlı sayıda çalışma vardır.

- Bifulco ve ark 2008 de anaplastik tiroid kanseri hücre hattında lovastatin ile Rho inhibisyonu sonrası geranilgeranil pirofosfat oluşumunun azaldığını ve hücrelerde proapoptotik etkili olduğunu gösterdiler (150).

- Zhong ve ark 2003 de; anaplastik tiroid kanseri hücre hattında lovastatinin, farnesil pirofosfat ve geranilgeranil pirofosfat oluşumu azaltarak antiproliferatif etkili olduğunu gösterdiler (151).

- Zeybek ve ark 2011 de rosuvastatinin papiller tiroid kanser hücre kültüründe apoptozisi indüklediğini gösterdiler (152).

Bizim alışmamızda, atorvastatin MTK hücre kültüründe(TT cell) sitotoksik etkili olduğu saptandı. IC 50 değeri 80 μ M olarak saptandı. Kronik lösemi hücresi, prostat kanseri hücresi, akciğer kanseri hücresi ve over kanseri hücresine kıyasla IC 50 değeri daha yüksek saptandı.

MTK hücre hattında hedefe yönelik ajanlar ile apoptozisin ve kalsitonin gen ekspresyon düzeyindeki değişikliği araştıran alışmalar;

- Starenki D ve ark, 2 farklı MTK hücre hattında(TT cell line ve MZ-CRC-1), Mito-CP (mitochondria-targeted carboxy-proxyl)'nin kaspaz 3 aktivitesini artırarak apoptozisi indüklediği ve kalsitonin gen ekspresyonunu azalttığını göstermişlerdir (161).

- Sophie Broutin ve ark, MTK hücre hattında(TT cell line), sunitib ile doza ve zaman bağlı olarak apoptozisin arttığı gözlenmiştir (162).

- Tomoda C ve ark, MTK hücre hattında(TT cell line), indometasin ile apoptotik aktivite ve kalsitonin gen ekspresyonu değerlendirmişler. İndometazin için IC 50 200 μ M, saptamışlar. İndometazinin kaspaz 3/7, kaspaz 8 ve kaspaz 9 aktivitesini arttırarak apoptozisi arttırdığını gözlemişler. Kalsitonin gen ekspresyon düzeyinde ise indometazin sonrası bir değişiklik saptamamışlardır (163).

- Hans H. G. Verbeek ve ark, 2 farklı MTK hücre hattında(TT cell line ve MZ-CRC-1), 4 farklı tirozin kinaz inhibitörünün (axitinib, sunitinib, vandetanib ve cabozantinib) sitotoksitesini ve RET ve kalsitonin gen ekspresyonuna etkisini araştırmışlar. Dört tirozin kinaz inhibitöründe MTK hücrelerinde benzer sitotoksik etki

göstermiş ancak RET ve kalsitonin gen ekspresyonu değerlendirildiğinde vandetanib ve cabozantinibin daha güçlü olduğu göstermişlerdir (164).

- Mazumdar M ve ark, MTK (TT cell line) hücre hattında teaflevin(siyah çayın biyoaktif komponenti) ile apoptozisin arttığını ve apoptotik yolda PI3K/Akt ve p38MAPK/caspase-8'in rol aldığını gösterilmiş(165).

Bizim çalışmamızda MTK (TT cell line) hücre hattında atorvastatinin kaspaz 9 aktivitesini artırarak apoptozisi doza ve zaman bağlı olarak indüklediği gösterildi. Kalsitonin gen ekspresyon düzeyinde ise atorvastatin sonrası zamana bağlı olarak azalma gösterildi.

İleri evre MTK tedavisinde kullanılan kısıtlı sayıda hedefe yönelik tedavi ajanı var. Tirozin kinaz aktivitesini inhibe eden hedefe yönelik tedavi ajanları; vandetanib, sorafenib, sunitinib, pazopanib, cabozantinib ve motesanibdir. Tirozin kinaz inhibitörleri metastazik hastalığı stabilize edebilir ancak sağ kalım süresinde bir değişiklik oluşturmazlar. Komplet remisyonun olması oldukça nadirdir, ayrıca tirozin kinaz inhibitörlerinin kullanımı sonrası diyare, bulantı, rash, el ayak sendromu, hipertansiyon, QT uzaması, baş ağrısı, yara iyileşmesinde gecikme gibi birçok yan etki gelişir (72, 75, 76). İlerlemiş MTK vakalarının tedavisi için, metastatik hastalığı stabilize eden, sağ kalımı arttıran, klinik kullanımı kolay ve daha az yan etkisi olan yeni ajanlara ihtiyaç var.

Literatürde statinlerin MTK kanser hücrelerindeki antiproliferatif etkilerini araştıran bir çalışma yoktur. Bizim çalışmamız atorvastatinin, MTK (TT cell line) hücre hattında, apoptozis ve kalsitonin ekspresyonu üzerindeki etkisini araştıran ilk çalışmadır. Bu çalışmada atorvastatin, TT hücre hattında doza ve zaman bağlı olarak kaspaz 9 aktivitesini artırarak apoptozisi arttırdığı ve kalsitonin gen ekspresyonunu azalttığı gösterildi. Kullanımı kolay ve yan etkisi az olan atorvastatin, ilerlemiş MTK vakalarının tedavisinde umut vadeden bir ajan olabilir. Bu hipotezi destekleyen ileri invitro ve invivo çalışmalara ihtiyaç var.

KAYNAKLAR

- 1- Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995 (see commetns). *Cancer* 1998, 83(12):2638-2648.
- 2- Marsh DJ, Learoyd DL, Robinson BG. Medullary thyroid carcinoma: recent advances and management update. *Thyroid*. 1995;5:407-424.
- 3- Almeida MQ, Stratakis CA. Solid tumors associated with multiple endocrine neoplasias. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010;203:30-36.
- 4- Pelizzo MR, Boschin IM, Bernante P, et al. Natural history, diagnosis, treatment and outcome of medullary thyroid cancer: 37 years experience on 157 patients. *Eur J Surg Oncol*. 2007, 33(4):493-497.
- 5- Mulligan LM, Eng C, Healey CS, et al. Specific mutations of the RET proto-oncogene are related to disease phenotype in MEN 2A and FMTC. *Nat Genet* 1994;6:70-74.
- 6- Hofstra RM, Landsvater RM, Ceccherini I, et al. A mutation in the RET protooncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma. *Nature*. 1994, 367:375-376.
- 7- Tsai MS, Ledger GA, Khosla S. Identification of multiple endocrine neoplasia, type 2 gene carriers using linkage analysis and analysis of the RET proto-oncogene. *JCEM*. 1994;78:1261-1264.
- 8- Waguespack SG, Rich TA, Perrier ND. Management of medullary thyroid carcinoma and MEN2 syndromes in childhood. *Nat Rev Endocrinol* 2011;7:596-607.
- 9- Lairmore TC, Wells SA, Jr. Medullary carcinoma of the thyroid: current diagnosis and management. *Semin Surg Oncol*. 1991;7:92-99.
- 10- Rendl G, Manzl M, Hitzl W. Long-term prognosis of medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008, 69:497-505.
- 11- Almeida MQ, Hoff AO. Recent advances in the molecular pathogenesis and targeted therapies of medullary thyroid carcinoma. *Curr Opin Oncol*. 2012;24:229-234.
- 12- Giuffrida D, Gharib H. Current diagnosis and management of medullary thyroid carcinoma. *Ann Oncol*. 1998;9:695-701.
- 13- Frohnauer MK, Decker RA. Update on the MEN 2A c804 RET mutation: is prophylactic thyroidectomy indicated? *Surgery*. 2000;128:1052-1057;discussion 1057-1058.
- 14- Marx SJ. Molecular genetics of multiple endocrine neoplasia types 1 and 2. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:367-375.
- 15- Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, et al. Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *JCEM*. 2001;86:5658-5671.
- 16- Donis-Keller H, Dou S, Chi D, et al. Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. *Hum Mol Genet* 1993;2:851-856.

- 17- Santoro M, Carlomagno F, Romano A, et al. Activation of RET as a dominant transforming gene by germline mutations of MEN2A and MEN2B. *Science*. 1995;267:381-383.
- 18- Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, et al. Germ-line mutations of the RET protooncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature*. 1993, 363:458-460.
- 19- M. Takahashi and G. M. Cooper, "ret Transforming gene encodes a fusion protein homologous to tyrosine kinases," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 7, no. 4, pp. 1378–1385, 1987.
- 20- M. S. Airaksinen, A. Titievsky, and M. Saarma, "GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant," *Molecular and Cellular Neurosciences*, vol. 13, no. 5, pp. 313–325, 1999.
- 21- E. Arighi, M. G. Borrello, and H. Sariola, "RET tyrosine kinase signaling in development and cancer," *Cytokine and Growth Factor Reviews*, vol. 16, no. 4-5, pp. 441–467, 2005
- 22- M. Takahashi, J. Ritz, and G. M. Cooper, "Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement," *Cell*, vol. 42, no. 2, pp. 581–588, 1985.
- 23- D. Hanahan and R. A. Weinberg, "The hallmarks of cancer," *Cell*, vol. 100, no. 1, pp. 57–70, 2000.
- 24- T. Watanabe, M. Ichihara, M. Hashimoto et al. "Characterization of gene expression induced by RET with MEN2A or MEN2B mutation," *American Journal of Pathology*, vol. 161, no. 1, pp. 249–256, 2002.
- 25- J. J. Schuringa, K. Wojtachnio, W. Hagens et al. "MEN2A/RET- induced cellular transformation by activation of STAT3," *Oncogene*, vol. 20, no. 38, pp. 5350–5358, 2001.
- 26- N. Asai, T. Fukuda, Z. Wu et al., "Targeted mutation of serine 697 in the Ret tyrosine kinase causes migration defect of enteric neural crest cells," *Development*, vol. 133, no. 22, pp. 4507–4516, 2006.
- 27- G. W. McLean, N. O. Carragher, E. Avizienyte, J. Evans, V. G. Brunton, and M. C. Frame, "The role of focal-adhesion kinase in cancer—a new therapeutic opportunity," *Nature Reviews Cancer*, vol. 5, no. 7, pp. 505–515, 2005.
- 28- C. Eng, D. Clayton, I. Schuffenecker et al., "The relationship between specific ret proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2: international RET mutation consortium analysis," *Journal of the American Medical Association*, vol. 276, no. 19, pp. 1575–1579, 1996.
- 29- M. Santoro, F. Carlomagno, A. Romano et al., "Activation of RET as a dominant transforming gene by germline mutations of MEN2A and MEN2B," *Science*, vol. 267, no. 5196, pp. 381–383, 1995. M. Santoro, F. Carlomagno, A. Romano et al., "Activation of RET as a dominant transforming gene by germline mutations of MEN2A and MEN2B," *Science*, vol. 267, no. 5196, pp. 381–383, 1995.
- 30- M. D. Castellone, A. Verrienti, D. Magendra Rao et al., "A novel de novo germline V292M mutation in the extracellular region of RET in a patient with pheochromocytoma and medullary thyroid carcinoma: functional characterization," *Clinical Endocrinology*, vol. 73, no. 4, pp. 529–534, 2010.

- 31- F. Lesueur, A. Cebrian, A. Cranston et al., "Germline homozygous mutations at codon 804 in the RET protooncogene in medullary thyroid carcinoma/multiple endocrine neoplasia type 2A patients," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 90, no. 6, pp. 3454–3457, 2005.
- 32- P. Pigny, C. Bauters, J. L. Wemeau et al., "A novel 9-base pair duplication in RET exon 8 in familial medullary thyroid carcinoma," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 84, no. 5, pp. 1700–1704, 1999.
- 33- A. N. Cranston, C. Carniti, K. Oakhill et al., "RET is constitutively activated by novel tandem mutations that alter the active site resulting in multiple endocrine neoplasia type 2B," *Cancer Research*, vol. 66, no. 20, pp. 10179–10187, 2006.
- 34- Schuffenecker I, Billaud M, Calender A, et al. RET proto-oncogene mutations in French MEN 2A and FMTC families. *Hum Mol Genet.* 1994;3:1939-1943.
- 35- Bolino A, Schuffenecker I, Luo Y, et al. RET mutations in exons 13 and 14 of FMTC patients. *Oncogene.* 1995;10:2415-2419.
- 36- Eng C, Smith DP, Mulligan LM, et al. A novel point mutation in the tyrosine kinase domain of the RET proto-oncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma and in a family with FMTC. *Oncogene.* 1995;10:509-513.
- 37- Zedenius J, Wallin G, Hamberger B, Nordenskjold M, Weber G, Larsson C. Somatic and MEN 2A de novo mutations identified in the RET proto-oncogene by screening of sporadic MTC:s. *Hum Mol Genet.* 1994;3:1259-1262.
- 38- Schuffenecker I, Ginet N, Goldgar D, et al. Prevalence and parental origin of de novo RET mutations in multiple endocrine neoplasia type 2A and familial medullary thyroid carcinoma. Le Groupe d'Etude des Tumeurs a Calcitonine. *Am J Hum Genet.* 1997;60:233-237.
- 39- Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, et al. The relationship between specific RET protooncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. International RET mutation consortium analysis. *JAMA.* 1996;276:1575-1579.
- 40- Carlson KM, Bracamontes J, Jackson CE, Clark R, Lacroix A, Wells SA, Jr. Goodfellow PJ: Parent-of-origin effects in multiple endocrine neoplasia type 2B. *Am J Hum Genet.* 1994;55:1076-1082.
- 41- Eng C, Mulligan LM, Smith DP, et al. Mutation of the RET protooncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 1995;12:209-212.
- 42- Prognostic significance of somatic RET oncogene mutations in sporadic medullary thyroid cancer: a 10-year follow-up study. *JCEM.* 2008;93:682-687.
- 43- Eng C, Mulligan LM, Smith DP, et al. Low frequency of germline mutations in the RET proto-oncogene in patients with apparently sporadic medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1995;43:123-127.
- 44- Kebebew E, Ituarte PH, Siperstein AE, Duh QY, Clark OH. Medullary thyroid carcinoma: clinical characteristics, treatment, prognostic factors, and a comparison of staging systems. *Cancer.* 2000;88:1139-1148

- 45- Boi F, Maurelli I, Pinna G, Atzeni F, Piga M, Lai ML, Mariotti S. Calcitonin measurement in wash-out fluid from fine needle aspiration of neck masses in patients with primary and metastatic medullary thyroid carcinoma. *JCEM*. 2007;92:2115-2118.
- 46- Sipple J. The association of pheochromocytoma with carcinoma of the thyroid gland. *AmJ Med*. 1961;31:4.
- 47- Gagel RF, Jackson CE, Block MA, et al. Age-related probability of development of hereditary medullary thyroid carcinoma. *J Pediatr*. 1982;101:941-946.
- 48- Williams ED, Pollock DJ. Multiple mucosal neuromata with endocrine tumours: a syndrome allied to von Recklinghausen's disease. *J Pathol Bacteriol*. 1966;91:71-80.
- 49- Farndon JR, Leight GS, Dilley WG, et al. Familial medullary thyroid carcinoma without associated endocrinopathies: a distinct clinical entity. *Br J Surg*. 1986;73:278-281
- 50- Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, et al. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*. 2009;19:1167-1214.
- 51- Ahmed SR, Ball DW. Clinical review: Incidentally discovered medullary thyroid cancer: diagnostic strategies and treatment. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96:1237-1245
- 52- Daniels GH. Screening for medullary thyroid carcinoma with serum calcitonin measurements in patients with thyroid nodules in the United States and Canada. *Thyroid*. 2011;21:1199-1207.
- 53- Valle LA, Kloos RT. The prevalence of occult medullary thyroid carcinoma at autopsy. *J Clin Endocrinol Metab* 2011, 96(1):E109-113.
- 54- Kloos RT, Eng C, Evans DB, et al. Medullary thyroid cancer: management guidelines of the American Thyroid Association. *Thyroid*. 2009;19:565-612.
- 55- Algeciras-Schimmich A, Preissner CM, Young WF, Jr., Singh RJ, Grebe SK. Plasma chromogranin A or urine fractionated metanephrines follow-up testing improves the diagnostic accuracy of plasma fractionated metanephrines for pheochromocytoma. *JCEM*. 2008;93:91-95.
- 56- Tisell LE, Dilley WG, Wells SA, Jr. Progression of postoperative residual medullary thyroid carcinoma as monitored by plasma calcitonin levels. *Surgery*. 1996;119:34-39.
- 57- AT, FS, GP, MB. Genetic alterations in medullary thyroid cancer: diagnostic and prognostic markers. *Curr Genomics*. 2011;12:618-625.
- 58- Moley JF, DeBenedetti MK. Patterns of nodal metastases in palpable medullary thyroid carcinoma: recommendations for extent of node dissection. *Ann Surg*. 1999;229:880-887; discussion 887-888.
- 59- Jimenez C, Hu MI, Gagel RF. Management of medullary thyroid carcinoma. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2008;37:481-496.
- 60- Scollo C, Baudin E, Travagli JP, et al. Rationale for central and bilateral lymph node dissection in sporadic and hereditary medullary thyroid cancer. *JCEM*. 2003;88:2070- 2075.

- 61- Brierley J, Tsang R, Simpson WJ, Gospodarowicz M, Sutcliffe S, Panzarella T. Medullary thyroid cancer: analyses of survival and prognostic factors and the role of radiation therapy in local control. *Thyroid*. 1996;6:305-310.
- 62- Fife KM, Bower M, Harmer CL. Medullary thyroid cancer: the role of radiotherapy in local control. *Eur J Surg Oncol*. 1996;22:588-591.
- 63- Terezakis SA, Lee KS, Ghossein RA, et al. Role of external beam radiotherapy in patients with advanced or recurrent nonanaplastic thyroid cancer: Memorial Sloan-Kettering Cancer Center experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009;73:795-801.
- 64- Schwartz DL, Rana V, Shaw S, et al. Postoperative radiotherapy for advanced medullary thyroid cancer--local disease control in the modern era. *Head Neck*. 2008, 30:883-888.
- 65- Martinez SR, Beal SH, Chen A, Chen SL, Schneider PD. Adjuvant external beam radiation for medullary thyroid carcinoma. *J Surg Oncol*. 2010;102:175-178.
- 66- Moley JF. Medullary thyroid carcinoma: management of lymph node metastases. *J Natl Compr Canc Netw*. 2010;8:549-556.
- 67- Brierley JD. Update on external beam radiation therapy in thyroid cancer. *JCEM*. 2011; 96:2289-2295.
- 68- Brierley J, Sherman E. The role of external beam radiation and targeted therapy in thyroid cancer. *Semin Radiat Oncol* 2012, 22(3):254-262.
- 69- Kapiteijn E, Schneider TC, Morreau H, Gelderblom H, Nortier JW, Smit JW. New treatment modalities in advanced thyroid cancer. *Ann Oncol*. 2012;23:10-18.
- 70- Wells SA, Jr., Gosnell JE, Gagel RF, et al. Vandetanib for the treatment of patients with locally advanced or metastatic hereditary medullary thyroid cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28:767-772.
- 71- Robinson BG, Paz-Ares L, Krebs A, Vasselli J, Haddad R. Vandetanib (100 mg) in patients with locally advanced or metastatic hereditary medullary thyroid cancer. *JCEM* 2010;95:2664-2671.
- 72- Wells SA, Jr., Robinson BG, Gagel RF, et al. Vandetanib in patients with locally advanced or metastatic medullary thyroid cancer: a randomized, double-blind phase III trial. *J Clin Oncol*. 2012;30:134-141.
- 73- Lam ET, Ringel MD, Kloos RT, et al. Phase II clinical trial of sorafenib in metastatic medullary thyroid cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28:2323-2330.
- 74- Ahmed M, Barbachano Y, Riddell A, et al. Analysis of the efficacy and toxicity of sorafenib in thyroid cancer: a phase II study in a UK based population. *Eur J Endocrinol*. 2011;165:315-322.
- 75- David Viola, Virginia Cappagli & Rossella Elisei Cabozantinib (XL184) for the treatment of locally advanced or metastatic progressive medullary thyroid cancer. *Future Oncology* August 2013, Vol. 9, No. 8, Pages 1083-1092
- 76- Schlumberger MJ, Elisei R, Bastholt L, et al. Phase II study of safety and efficacy of motesanib in patients with progressive or symptomatic, advanced or metastatic medullary thyroid cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27:3794-3801.

- 77- Stein R, Goldenberg DM. A humanized monoclonal antibody to carcinoembryonic antigen, labetuzumab, inhibits tumor growth and sensitizes human medullary thyroid cancer xenografts to dacarbazine chemotherapy. *Mol Cancer Ther.* 2004, 3:1559-1564.
- 78- Elisei R, Bottici V, Luchetti F, et al. Impact of routine measurement of serum calcitonin on the diagnosis and outcome of medullary thyroid cancer: experience in 10,864 patients with nodular thyroid disorders. *JCEM.* 2004;89:163-168.
- 79- Modigliani E, Cohen R, Campos JM, et al. Prognostic factors for survival and for biochemical cure in medullary thyroid carcinoma: results in 899 patients. The GETC Study Group. Groupe d'etude des tumeurs a calcitonine. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1998;48:265-273.
- 80- van Heerden JA, Grant CS, Gharib H, Hay ID, Ilstrup DM. Long-term course of patients with persistent hypercalcitoninemia after apparent curative primary surgery for medullary thyroid carcinoma. *Ann Surg.* 1990;212:395-400;discussion 400-391.
- 81- Girelli ME, Nacamulli D, Pelizzo MR, et al. Medullary thyroid carcinoma: clinical features and long-term follow-up of seventy-eight patients treated between 1969 and 1986. *Thyroid.* 1998;8:517-523.
- 82- Clark JR, Fridman TR, Odell MJ, Brierley J, Walfish PG, Freeman JL. Prognostic variables and calcitonin in medullary thyroid cancer. *The Laryngoscope.* 2005;115:1445-1450.
- 83- Bergholm U, Bergstrom R, Ekblom A. Long-term follow-up of patients with medullar carcinoma of the thyroid. *Cancer.* 1997;79:132-138.
- 84- Gawlik T, d'Amico A, Szpak-Ulczoek S, Skoczylas A, Gubala E, Chorazy A, Gorczewski K, Wloch J, Jarzab B: The prognostic value of tumor markers doubling times in medullary thyroid carcinoma - preliminary report. *Thyroid Res* 2010, 3(1):10.
- 85- Endo A, Kuroda M, Tsujita Y. ML-236A, ML-236B, ML-236C new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. *J Antibiot (Tokyo)* 29: 1346-1348, 197
- 86- Brown MS, Faust JR, Goldstein JL. Induction of 3-hydroxy 3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in human fibroblasts incubated with compactin (ML-236B), a competitive inhibitor of the reductase. *J Biol Chem.* 253: 1121-1128, 1978
- 87- Yamamoto A, Yamamura T, Yokohama S, Sudo H, Matsuzawa Y. Combined drug therapy-cholestiramin and compactin- for familial hypercholesterolemia. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol.* 22: 493-497, 1984
- 88- Alberts AW, Chenj, Kuron G, Hunt V, Huff J, Hoffman C, Rothrock J, Lopez M, Joshua H, Harris E, Patchett A, Monaghan R, Currie S, Stapley E, Alberts SG, Hensens O, Hirsfield J, Hoogsteen K, Liesch J, Springer J. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxy methylglutaryl coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc Natl Acad Sci USA.* 77: 3957-3961, 1980
- 89- Davidson MH. Rosuvastatin: a highly efficacious statin for the treatment of dyslipidaemia. *Expert Opin Invest Drugs.* 11:125-141, 2002

- 90- Hobbs HH, Brown M., Goldstein JL. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolaemia. *Hum Mutat.* 1 445–466, 1992
- 91- Maron DJ, Fazio S, Linton MF. Current perspectives on statins. *Circulation.* 101 207–213, 2000
- 92- Ginsberg HN, Le NA, Short MP, Ramakrishnan R, Desnick RJ. Suppression of apolipoprotein B production during treatment of cholesteryl ester storage disease with lovastatin: implications for the regulation of apolipoprotein B synthesis. *J Clin Invest.* 80 1692–1697, 1987
- 93- Furberg CD, Pitt B. Withdrawal of cerivastatin from the world market. *Curr Control Trials Cardiovasc Med.* 2 205– 207, 2001
- 94- McTavish D, Sorkin EM. Pravastatin. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in hypercholesterolaemia. *Drugs* 42 65–89, 1991
- 95- Brown MS, Goldstein JL. A receptor – mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.* 232: 34-47, 1986
- 96- Grundy SM, Wega GL. Influence of mevinolin on metabolism of low density lipoproteins in primary moderate hypercholesterolemia. *J Lipid Res.* 26: 1464-1475, 1985
- 97- Arad Y, Ramakrishnan R, Ginsberg HN. Lovastatin therapy reduces low density lipoprotein apoB levels in subjects with combined hyperlipidemia by reducing the production of apoB-containing lipoproteins: implications for the pathophysiology of apoB production. *J Lipid Res.* 31: 567-582, 1990
- 98- Gaw A, Packard CJ, Murray EF, Lindsay GM, Griffin BA, Caslake MJ, Vallance BD, Lorimar AR, Shepherd J. Effects of simvastatin on apoB metabolism and LDL subfraction distribution. *Arterioscler Thromb.* 13: 170-189, 1993
- 99- Crouse JR, Frolich J, Ose L, Mercuri M, Tobert JA. Effects of high doses of simvastatin and atorvastatin on high-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein A-1. *Am J Cardiol.* 83: 1476-1477, 1999
- 100- Jones P, Kafonek S, Laurora I, Hunninghake D. Comparative dose efficacy study of atorvastatin versus simvastatin, pravastatin, lovastatin and fluvastatin in patients with hypercholesterolemia (the CURVES study). *Am J Cardiol.* 81:582-587, 1998
- 101- Raal FJ, Pappu AS, Illingworth DR, Pilcher GJ, Marais AD, Firth JC, Kotze MK, Heinonen TM, Black DM. Inhibition of cholesterol synthesis by atorvastatin in homozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 150: 421-428, 2000
- 102- Kostner GM, Gavish D, Leopold B, Bolzano K, Weintraub MS, Breslow JL. HMGCoA reductase inhibitors lower LDL cholesterol without reducing Lp(a) levels. *Circulation.* 80: 1313-1319, 1989
- 103- Cilla DD Jr, Gibson DM, Whitfield LR, Sedman AJ. Pharmacodynamic effects and pharmacokinetics of atorvastatin after administration to normocholesterolemic subjects in the morning and evening. *J Clin Pharmacol.* 36:604–609, 1996
- 104- Tse FL, Jaffe JM, Troendle A. Pharmacokinetics of fluvastatin after single and multiple doses in normal volunteers. *J Clin Pharmacol.* 32 630–638, 1992

- 105- Martin PD, Mitchell PD, Schneck DW. Pharmacodynamic effects and pharmacokinetics of a new HMG-CoA reductase inhibitor, rosuvastatin, after morning or evening administration in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol.* 54: 472–477, 2002
- 106- Singhvi SM, Pan HY, Morrison RA, Willard DA. Disposition of pravastatin sodium, a tissue-selective HMG-CoA reductase inhibitor, in healthy subjects. . *Br J Clin Pharmacol.* 29: 239–243, 1990
- 107- Naoumova RP, Dunn S., Rallidis L. Prolonged inhibition of cholesterol synthesis explains the efficacy of atorvastatin. *J Lipid Res.* 38 1496–1500, 1997
- 108- Yang B-B, Smithers JA, Stern RH. Pharmacokinetics and dose proportionality of atorvastatin and its active metabolites. *Pharm. Res.* 13 (Suppl. 1) S437, 1996
- 109- Warwick MJ, Dane AL, Raza A, Schneck DW. Single and multiple-dose pharmacokinetics and safety of the new HMGCoA reductase inhibitor ZD4522. *Atherosclerosis.* 151 39, 2000
- 110- Kajinami K, Mabuchi H, Saito Y. NK-104: a novel synthetic HMG-CoA reductase inhibitor. *Expert Opin Investig Drugs.* 9 2653–2661, 2000
- 111- Lennernas H. Clinical pharmacokinetics of atorvastatin. *Clin Pharmacokinet.* 42 1141–1160, 2003
- 112- Corsini A, Bellosta S, Baetta R, New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacol Ther.* 84, 413–428, 1999
- 113- Hamelin BA, Turgeon J. Hydrophilicity/lipophilicity: relevance for the pharmacology and clinical effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *TiPS.* 19 36–37, 1998
- 114- Rosenson RS, Tangney CC. Antiatherosclerotic properties of statins: implications for cardiovascular event reduction. *JAMA.* 279 1643–1650, 1998
- 115- Bottorff M, Hansten P. Long-term safety of hepatic hydroxymethyl glutaryl coenzyme A reductase inhibitors: the role of metabolism – monograph for physicians. *Arch Intern Med.* 160 2273–2280, 2000
- 116- Lennernas H, Fager G. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Clin Pharmacokinet.* 32 403–425, 1997
- 117- Knopp RH. Drug treatment of lipid disorders. *N Engl J Med.* 341 498–511, 1999
- 118- Corsini A, Maggi FM, Catapano AL. Pharmacology of competitive inhibitors of HMGCoA reductase. *Pharmacol Res.* 31 9–27, 1995
- 119- Garnett WR. Interactions with hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors. *Am J Health Syst Pharm.* 52 1639–1645, 1995
- 120- Simonson SG, Martin PD, Mitchell P, Schneck DW, Lasseter KC, Warwick MJ. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of rosuvastatin in subjects with hepatic impairment. *Eur J Clin Pharmacol.* 58 669–675, 2003
- 121- Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet.* 344: 1383-1389, 1994

- 122- Nakad A, Bataille L, Hamoir V, Sempoux C, Horsmans Y. Atorvastatin-induced acute hepatitis with absence of cross toxicity with simvastatin *Lancet*. 353: 1763-1764, 1999
- 123- Physicians' Desk Reference 55th ed. Medical Economics Company, Montvale, NJ 2001; 843-846
- 124- Staffa JA, Chang J, Green J. Cerivastatin and reports of fatal rhabdomyolysis. *N Engl J Med*. 346 539–540, 2002
- 125- Christians U, Jacobsen W, Floren LC. Metabolism and drug interactions of 3-hydroxy- 3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in transplant patients: are the statins mechanistically similar? *Pharmacol Ther*. 80: 1-34, 1998
- 126- Vaughan CJ, Gotto AM :Update on statins 2003. *Circulation*, 2004;110:886-892
- 127- Sasaki J., Iwashita M., Kono S. Statins:Beneficial or adverse for glucose metabolism *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 2006;13:123-129.
- 128- Gonyeau MJ and Yuen DW. A clinical review of statins and cancer: helpful or harmful? *Pharmacotherapy* 2010; 30: 177-194.
- 129- Alegret M & Silvestre JS 2006 Pleiotropic effects of statins and related pharmacological experimental approaches. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology* 28 627–656.
- 130- Arthan D, Hong SK, Park JI. Leukemia inhibitory factor can mediate Ras/Raf/MEK/ERK-induced growth inhibitory signaling in medullary thyroid cancer cells. *Cancer Lett*. 2010 Nov 1;297(1):31-41. Epub 2010 May 31.
- 131- Hong DS, Cabanillas ME, Wheeler J, Naing A. Inhibition of the Ras/Raf/MEK/ERK and RET kinase pathways with the combination of the multikinase inhibitor sorafenib and the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in medullary and differentiated thyroid malignancies. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Apr;96(4):997-1005. Epub 2011 Feb 2.
- 132- Demierre MF, Higgins PD, Gruber SB, Hawk E, Lippman SM. Statins and cancer prevention. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 930-942
- 133- Chan KK, Oza AM, Siu LL. The statins as anticancer agents.*Clin Cancer Res* 2003; 9: 10-19
- 134- Bansal D, Undela K, D'Cruz S, Schifano F. Statin use and risk of prostate cancer: a meta-analysis of observational studies. *PLoS One* 2012
- 135- Singh S, Singh PP, Singh AG, Murad MH, Sanchez W. Statins Are Associated With a Reduced Risk of Hepatocellular Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology* 2012
- 136- Singh PP, Singh S. Statins are associated with reduced risk of gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol* 2013 Apr 18
- 137- Singh S, Singh AG, Singh PP, Murad MH, Iyer PG. Statins Are Associated With Reduced Risk of Esophageal Cancer, Particularly in Patients With Barrett's Esophagus: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013

- 138- Emberson JR, Kearney PM, Blackwell L, Newman C, Reith C, Bhala N, Holland L, Peto R, Keech A, Collins R, Simes J, Baigent C. Lack of effect of lowering LDL cholesterol on cancer: meta-analysis of individual data from 175,000 people in 27 randomised trials of statin therapy. *PLoS One* 2012;
- 139- Nielsen SF, Nordestgaard BG, Bojesen SE. Statin use and reduced cancer-related mortality. *N Engl J Med* 2012; 367: 1792-1802
- 140- Ahern TP, Pedersen L, Tarp M, Cronin-Fenton DP, Garne JP, Silliman RA, Sørensen HT, Lash TL (2011) Statin prescriptions and breast cancer recurrence risk: a Danish nationwide prospective cohort study. *J Natl Cancer Inst* 103(19): 1461–1468.
- 141- Cauley JA, McTiernan A, Rodabough RJ (2006) Statin use and breast cancer: prospective results from the Women’s Health Initiative. *J Natl Cancer Inst* 17 98(10): 700–707.
- 142- Elizabeth Robinson , Mandrita Nandi , Laurelle L. Wilkinson. Preclinical evaluation of statins as a treatment for ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 129 (2013) 417–424
- 143- Hang-Lung Chang , Chih-Yu Chen , Ya-Fen Hsu. Simvastatin induced HCT116 colorectal cancer cell apoptosis through p38MAPK-p53-survivin signaling cascade. *Biochimica et Biophysica Acta* 1830 (2013) 4053–4064
- 144- Campbell MJ, Esserman LJ, Zhou Y, Shoemaker M, Lobo M, Borman E, Baehner F, Kumar AS, Adduci K, Marx C et al. 2006 Breast cancer growth prevention by statins. *Cancer Research* 66 8707–8714.
- 145- Sivaprasad U, Abbas T & Dutta A 2006 Differential efficacy of 3-hydroxy-3-methyl glutaryl CoA reductase inhibitors on the cell cycle of prostate cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 5 2310–2316.
- 146- Kawata S, Nagase T, Yamasaki E, Ishiguro H & Matsuzawa Y 1994 Modulation of the mevalonate pathway and cell growth by pravastatin and d-limonene in a human hepatoma cell line (Hep G2). *British Journal of Cancer* 69 1015–1020.
- 147- HawkMA, Cesen KT, Siglin JC, StonerGD & Ruch RJ 1996 Inhibition of lung tumor cell growth in vitro and mouse lung tumor formation by lovastatin. *Cancer Letters* 109 217–222.
- 148- Gbelcova’ H, Lení’cek M, Zelenka J, 2008 Differences in antitumor effects of various statins on human pancreatic cancer. *International Journal of Cancer* 122 1214–1221.
- 149- Sassano A & Plataniias LC. Statins in tumor suppression. *Cancer Letters* 260 11 19.
- 150- Bifulco M 2008 Therapeutic potential of statins in thyroid proliferative disease. *Nature Clinical Practice. Endocrinology and Metabolism* 4 242–243.
- 151- Zhong W, Wang C, Chang T & Lee W 2003 Lovastatin induces apoptosis of anaplastic thyroid cancer cells via inhibitor of protein geranylgeranylation and de novo protein synthesis. *Endocrinology* 144 3852–3859. N Dilara Zeybek, Rosuvastatin induces apoptosis in cultured human papillary thyroid cancer cells *Journal of Endocrinology* (2011) 210, 105–115, 0022–0795/11/0210–105 2011 Society for Endocrinology Printed in Great Britain

- 152- Cappelli C, Castellano M, Salvi A & Rosei EA 2008 Reduced thyroid volume and nodularity in dyslipidemic patients on statin treatment. *Clinical Endocrinology* 68 16–21.
- 153- Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 1999; 6:1028-1042.
- 154- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW and et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996; 87 (2): 171
- 155- Yavasoglu I, Sargin G, Kadikoylu G, The activity of atorvastatin and rosiglitazone on CD38, ZAP70 and apoptosis in lymphocytes of B-cell chronic lymphocytic leukemia in vitro. *Med Oncol.* 2013;30(3):603
- 156- Xi Zheng, Xiao-Xing Cui, Zhi Gao, Atorvastatin and celecoxib in combination inhibits the progression of androgen-dependent LNCaP xenograft prostate tumors to androgen independence. *Cancer Prev Res (Phila).* 2010 January ; 3(1): 114–124.
- 157- J Chen, H Bi, J Hou, Atorvastatin overcomes gefitinib resistance in KRAS mutant human non-small cell lung carcinoma cells. *Cell Death Dis.* 2013 Sep 26;4:e814
- 158- Islam M, Sharma S, Kumar B, Atorvastatin inhibits RhoC function and limits head and neck cancer metastasis. *Oral Oncol.* 2013 Aug;49(8):778-86.
- 159- Riganti C, Pinto H, Bolli E. Atorvastatin modulates anti-proliferative and pro-proliferative signals in Her2/neu-positive mammary cancer. *Biochem Pharmacol.* 2011 Nov 1;82(9):1079-89
- 160- Hongli L., Shu-Ling L., Sheetal K. Statins induce apoptosis in ovarian cancer cells through activation of JNK and enhancement of Bim expression. *Cancer Chemother Pharmacol* (2009) 63:997–1005
- 161- Starenki D, Park JI. Mitochondria-targeted nitroxide, Mito-CP, suppresses medullary thyroid carcinoma cell survival in vitro and in vivo. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Apr;98(4):1529-40.
- 162- Broutin S, Ameur N, Lacroix L Identification of soluble candidate biomarkers of therapeutic response to sunitinib in medullary thyroid carcinoma in preclinical models. *Clin Cancer Res.* 2011 Apr 1;17(7):2044-54
- 163- Tomoda C, Moatamed F, Naeim F Indomethacin inhibits cell growth of medullary thyroid carcinoma by reducing cell cycle progression into S phase. *Exp Biol Med* (Maywood). 2008 Nov;233(11):1433-40.
- 164- Verbeek HH, Alves MM, de Groot JW, The effects of four different tyrosine kinase inhibitors on medullary and papillary thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Jun;96(6):E991-5.
- 165- Mazumdar M, Adhikary A, Chakraborty S, Targeting RET to induce medullary thyroid cancer cell apoptosis: an antagonistic interplay between PI3K/Akt and p38MAPK/caspase-8 pathways. *Apoptosis.* 2013 May;18(5):589-604.