



T.C
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

Sorafenib, Lapatinib ve Bevacizumab'ın Tiroid Medüller Kanseri Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin Tek Başına ve Kombine Olarak Araştırılması

Dr. Gülşah Altun
UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

SİVAS
2016



T.C
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**Sorafenib, Lapatinib ve Bevacizumab'ın Tiroid Medüller Kanseri Hücreleri
Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin Tek Başına ve Kombine Olarak
Araştırılması**

Dr. Gülşah Altun
UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Prof. Dr. Naciye Özlem Saygılı Yöner
DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ

SİVAS
2016



Tıpta Uzmanlık Tez Yazım Yönergesi, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 10/02/2010 tarih ve 2010 / 1-2 sayılı kararı ile kabul edilerek yürürlüğe girmiştir.

ONAY SAYFASI

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nda uzmanlık tez olarak kabul edilmiştir.

İmza

Üye: Prof. Dr. Ferhan Candan



Üye: Prof. Dr. Naciye Özlem Saygılı Yöner



Üye: Doç. Dr. Serdal Korkmaz



Bu tez, 10.02.2016 tarih ve 2016/11 sayılı Yönetim Kurulu Kararı ile belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Okay Bulut
Tıp Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi, deneyim ve güler yüzlerini benden esirgemeyen değerli hocalarım; Prof. Dr. Füsün Gültekin, Prof. Dr. Mehmet Şencan, Prof. Dr. Sebila Dökmetaş, Prof. Dr. Ferhan Candan, Prof. Dr. Mansur Kayataş, Prof. Dr. Hakan Alagözlü, Prof. Dr. Kerim Yılmaz, Prof. Dr. Özlem Yöner Saygılı, Yrd. Doç Dr. Serhat İçağasıoğlu, Doç. Dr. Hilmi Ataseven, Doç. Dr. Fatih Kılıçlı, Doç. Dr. Saadettin Kılıçkap, Doç. Dr. Ali Şahin ve Yrd. Doç. Dr. Emrah Yerlikaya'ya,

Tez çalışma döneminde birlikte çalıştığım ve uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübesinden istifade ettiğim, her dönem naifliğini ve yardımlarını bizlerden esirgemeyen çok değerli tez danışmanım Prof. Dr. Naciye Özlem Saygılı Yöner'e,

Tezimin oluşmasının her aşamasında hiçbir desteğini ve emeğini esirgemeyen çok değerli eşim Yrd. Doç. Dr. Ahmet Altun'a,

Hem tez süreci hem de tüm hayatım boyunca desteğini, sevgisini ve duasını arkamda hissettiğim başta annem olmak üzere tüm aileme,

Birlikte çalıştığım ve çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm asistan ve intern doktor arkadaşlarıma yürekten teşekkür ederim.

ÖZET

Tiroid kanserleri tüm tiroid neoplazileri içerisinde en sıklardan birisi olmamasına rağmen, en ölümcül onlardan birisidir. Özellikle medüller tiroid kanserleri bunların içinde tedavisi en zor olanlardan birisidir. Bizim bu çalışmamızdaki amacımız sorafenib ve lapatinib'in tek başlarına ve kombine uygulamalarının antikanser etkilerini medüller tiroid kanseri hücreleri üzerinde araştırmaktır. TT medüller tiroid kanser hücreleri ATCC'den (Amerikan Tıp Hücre Koleksiyonu, Manassas, Virginia) temin edilmiştir. Ana besi yerleri olan DMEM, F12 medium ve Fetal bovin serum (FBS) da yine aynı şekilde ATCC'den sipariş edilmiştir. Kanseri hücreleri 37 °C'de, nemli bir ortamda, %5 karbondiyoksitli bir ortam sağlayabilen bir inkübatör içerisinde, %10 FBS ve antibiyotik takviyeleriyle çoğaltılmışlardır. Sorafenib ve lapatinib'in tek başlarına ve bevacizumab ile kombine şekilde hücre proliferasyonu üzerinde gösterdikleri etkiyi değerlendirmek amacıyla Gerçek zamanlı hücre analiz yöntemi (xCELLigence system) kullanılmıştır. Çalışmamızda hem sorafenib hem de lapatinib'in tiroid medüller kanser hücreleri üzerinde zamana ve konsantrasyona bağımlı güçlü bir sitotoksik etki gösterdiğini tespit ettik. Yarı minimum inhibitör konsantrasyon (IC₅₀) değerleri sırasıyla 10.2×10^{-9} M ve 1.2×10^{-9} M'idi. Bunun yanında çalışmamızda bevacizumab'ın sorafenib ve lapatinib ile kombine edilmesinin ajanların tek başlarına uygulanmasına göre sitotoksik etkilerini artırdığı gözlemlendi. Ayrıca sorafenib ve lapatinib'in submaksimal konsantrasyonları bevacizumab'ın etkisiz konsantrasyonları ile kombine edilince ortaya çıkan sitotoksik etkinin sorafenib ve lapatinib'in tek başına uygulamalarındakinden anlamlı şekilde daha yüksek olduğu görüldü. Bu çalışmanın sonuçları, oldukça düşük konsantrasyonda etkinlik gösterebilen ajanlar oldukları için, sorafenib ve lapatinib'in tiroid medüller kanserinde konvansiyonel tedaviye birer alternatif olabileceğini göstermektedir. Ayrıca çalışma sorafenib ve lapatinib'in bevacizumab ile kombinasyonunun, bu ajanları daha düşük konsantrasyonlarda kullanmaya imkan vermesi ve böylece kemoterapi nedeniyle yan etki riskini azaltması bakımından tiroid medüller kanseri tedavisinde çok daha iyi bir yaklaşım olabileceğini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Sorafenib, Lapatinib, Bevacizumab, Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi, Tiroid medüller kanseri, Sitotoksikite.

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu (CÜBAP) tarafından T-610 proje numarası ile desteklenmiştir.

ABSTRACT

Although thyroid carcinomas are not the common ones in endocrine tumor, they are one of the most deadly ones. In particular medullar thyroid carcinomas are the ones which is harder to be treated. In the present study we aimed to investigate the antitumor effects of sorafenib and lapatinib on medullar thyroid cancer cells alone and in combination with bevacizumab. TT medullar thyroid cancer cell line was purchased from ATCC (American Type Cell Collection, Manassas, Virginia). Main mediums, DMEM, F12 medium and Fetal bovine serum (FBS) were purchased from ATCC. Cancer cells were grown at 37 °C in a humid atmosphere of 5% CO₂ in incubator supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics. Real-time cell analysis (xCELLigence system) method was used to determine the effects of sorafenib and lapatinib on colorectal cell proliferation alone and in combination of bevacizumab. We found that sorafenib and lapatinib both showed time and concentration dependent strong cytotoxic effect with an half maximum inhibition of concentration (IC₅₀) value of 10.2×10^{-9} M and 1.2×10^{-9} M, respectively. Also it has been observed that combination sorafenib and lapatinib with bevacizumab increased cytotoxic effect of the agents when compared to the single administrations. Furthermore when submaximal concentrations of sorafenib and lapatinib combined with ineffective concentrations of the bevacizumab, the antitumor effect of the combination was significantly high when compared to the single administrations of sorafenib and lapatinib.

Results of this study indicate that sorafenib and lapatinib may be alternative treatment options in medullar thyroid cancer since they have been found effective in very low IC₅₀ values. Also the present study revealed that combination of sorafenib and lapatinib may be much better approach in terms of using sorafenib and lapatinib in lower concentrations to reduce risk of chemotherapy related side effects.

Keywords: Sorafenib, Lapatinib, Bevacizumab, Real Time Cell Analyzing System, Thyroid Medullar Cancer, Cytotoxicity.

This work is supported by the Scientific Research Project Fund of Cumhuriyet University under the project number T-610

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Medüller Tiroid Kanseri	2
2.1.1. Genetik	2
2.1.2 Klinik	4
2.1.3 Tanı	5
2.1.4 Tarama	6
2.1.5 Tedavi	6
2.1.6 Prognoz	10
2.2. Tiroid Kanserinde PTEN PI3K-p85 mTOR ve RAS'ın Tümörögeneziste Yeri	10
2.3. PI3K/p85 Yolağı	13
2.4. mTOR Yolağı	15
2.5. Sorafenib	16
2.6. Lapatinib	17
2.7. VEGF (Vascular Endotelial Growth Factor) ve Bevacizumab	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Çalışma İlaçları ve Hazırlanması	25
3.2. Çalışma Kullanılan Hücre Tipi ve Özellikleri	26
3.3. Hücre Kültürü Teknikleri	30
3.3.1. Hücre Hattının Açılması	30
3.3.2. Hücrelerin Çoğaltılması	30
3.3.3. Hücrelerin Pasajlanması	30
3.3.4. Hücre Sayımı	30
3.3.5. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması	31
3.4. xCELLigence sistemi	32
3.5. Hücre Proliferasyon Çalışması (Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi, Xcelligence Deneyi).	36

3.6. İstatistiksel Değerlendirme	38
4. BULGULAR	
4.1. Antitümör Aktivite Değerlendirmesi	39
4.2. Tek Başına Sorafenib Uygulaması	39
4.3. Tek Başına Lapatinib Uygulaması	41
4.4. Tek Başına Bevacizumab Uygulaması	42
4.5. Ajanların Sitotoksik Etkilerinin Karşılaştırılması	43
4.6. Kombinasyon alışmaları	44
5. TARTIşMA	48
6. KAYNAKLAR	58



SİMGE VE KISALTMALAR

4E-BP	4E Bağlayıcı Proteini
AKT	Protein Kinase B
ATA	Amerikan Tiroid Cemiyeti
ATCC	American Type Cell Collection
CEA	Karsinoembriyogenik Antijen
CÜTFAM	C.Ü. Tıp Fakültesi Araştırma Merkezi
DMEM	Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu
EGFR/HER1	Epidermal Growth Faktör Reseptör
ERK1/2	Extrasellüler Regulated Kinase ½
ETA	Avrupa Tiroid Cemiyeti
FBS	Fötal Sığır Serumumu
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda Ve İlaç Dairesi
FLT-3	FMS-Like Tirozin Kinaz
FMTK	Pür Familial MTC Sendromu
FRAP	Rapamisin İlişkili Protein
GDNF	Glial-Derive Neuroropic Faktör
GFRI-4	GPI-Linked RET Koreseptörleri
HER2/ErbB2	Epidermal Growth Faktör Reseptör
HIF-1	Hypoxia-İnducible Factors
İİAB	İnce İğne Aspirasyon Biyopsi
JNK	C-Jun N-Terminal Kinase Yolağı
KML	Kronik Myelositer Löseminin
MEK	Mitogen-Activated Kinases
MEN	Multipl Endokrin Neoplazisi
MKRK	Metastatik Kolorektal Kanseri
MTK	Medüller Tiroid Kanseri
Mtor	Mammalian Target Of Rapamycin
NCCN	The National Comprehensive Cancer Network
PDGF	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PDK-1	Pyruvate Dehydrogenase Lipoamide Kinase İsozyme 1
PET	Positron Emission Tomografi
PFS	Progresyonsuz Sağ Kalım Süresi
PI3K/AKT	Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase Yolağı
PTEN	Phosphatase And Tensin Homolog
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RAS	Rat Sarcoma Oncogene
RET	Re Arranged During Transfection
RT	Radyoterapi
RTK	Receptor Tyrosine Kinase
SEER	Surveillance Epidemiology And Results Program Of The National Cancer Institute
STAT3	Sinyal Transducer Ve Activator Of Transcription 3
TKI	Tirozin Kinaz İnhibitörü

TSC1- Hamartin,	
TSC2-Tuberin	Akt Tubein Skleroz Protein Kompleksleri
VEFG	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGFR	Receptors For Vascular Endothelial Growth Factor
VIP	Vasoaktif İntestinal Peptid



ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Tiroid bezi anatomisi (13).

Şekil 2.2. Tiroid Bezinin Anatomisi ve Tiroid Folikülü (2).

Şekil 2.3. Tiroid kanserinde PI3K/Akt ve MAP kinaz yolları (95).

Şekil 2.4. PI3K/Akt Yolağı (96).

Şekil 2.5. PI3K/Akt yolağı ve p85 (104)

Şekil 2.6. Akt-mTOR yolağı (111).

Şekil 2.7. Tümör hücresi ve endotel hücresi arasındaki VEGF bağımlı etkileşimler (120)

Şekil 2.8. ErbB1, IGFR, ErbB2, Lapatinib ve Trastuzumab'ın etkileşimi (125)

Şekil 2.9. Anjiogenezisin tümör büyümesinde rol oynadığı evreler (134).

Şekil 2.10. VEGF reseptörleri (135).

Şekil 3.1. TT medüller tiroid kanseri hücrelerinin mikroskop altındaki görüntüsü.

Şekil 3.2. Hücrelerin incelenmesinde kullanılan mikroskop ve TT medüller tiroid kanseri hücreleri için kullanılan flask.

Şekil 3.3. DMEM, Fötal sığır serumu (FBS), Penisilin-streptomisin, Tripsin, EDTA

Şekil 3.4. Hücre kültürü aşamalarının gerçekleştirildiği steril laminar akımlı kabin

Şekil 3.5. Hücre kültürü aşamalarının gerçekleştirildiği steril laminar akımlı kabinin iç görünümü.

Şekil 3.6. %5 CO₂ içeren inkübatör

Şekil 3.7. İlaçların seri dilüsyonların laminar flow kabini altında yapılması.

Şekil 3.8. İlaçların değişik konsantrasyonlarının hazırlanması ve epandorflar içerisinde sıralanması.

Şekil 3.9. RTCA DP istasyonu ve dizüstü bilgisayar

Şekil 3.10. RTCA Analiz cihazı

Şekil 3.11. RTCA DP istasyonu

Şekil 3.12. Kuyucuk tabanındaki altın plağın hücrelerin elektrik yük empedanslarını ölçmesi

Şekil 3.13. E-plate 16

Şekil 3.14. Steril kabin içerisinde ekstraksiyon solüsyonunun E-platelere uygulanması

Şekil 3.15 İlaçların E-platelere uygulanması

Şekil 3.16. xCELLigence sistemi bilgisayarı ve inkübatörü.

Şekil 4.1. TT hücrelerinin zamana bağlı büyüme paternleri.

Şekil 4.2. Sorafenibin tek başına uygulanmasının 80, 40, 20, 10, 5, 2.5 ve 1.25 nM konsantrasyonlarının TT tiroid medüller kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine olan etkilerinin zamana bağlı değişimi.

Şekil 4.3. Lapatinibin 80, 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 ve 0.312 nM konsantrasyonlarının TT tiroid kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine olan etkilerinin zamana bağlı değişimi.

Şekil 4.4. Bevacizumab'ın 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 ve 0.0612 mM konsantrasyonlarının TT tiroid kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine olan etkilerinin zamana bağlı değişimi.

Şekil 4.5. Sorafenib, lapatinib ve bevacizumab'ın IC₅₀ değerlerinin hesaplanması.

Şekil 4.6. Sorafenib, lapatinib ve bevacizumab'ın IC₅₀ değerlerinin karşılaştırılması.

Şekil 4.7. Sorafenibin 80 ve 5 nM, bevacizumab'ın 16 ve 0.06 mM konsantrasyonlarının tek başlarına ve kombine uygulamalarının TT tiroid medüller kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine olan etkilerinin zamana bağlı değişimi.

Şekil 4.8. Lapatinibin 80 ve 1.25 nM, bevacizumab'ın 16 ve 0.06 mM konsantrasyonlarının tek başlarına ve kombine uygulamalarının TT tiroid medüller kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine olan etkilerinin zamana bağlı değişimi.

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 bulgusudur. MTK, %75 sporadik , %25 familial olarak gelişir. Familial formalar; multipl endokrin neoplazisi (MEN) 2A, MEN 2B ve pür familial MTC sendromu (FMTK) olarak gruplandırılabilir. 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 sistenden 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 onkogenik hücrenin proliferasyonu artar. Tirozin kinaz reseptörünün aktivasyonu sadece hücre proliferasyonu ile ilgili olmayıp bu reseptör aynı zamanda apoptozis, anjiogenez ve hatta hücrenin glikoz metabolizması gibi birçok hayati hücrenel faaliyeti kontrol etmektedir. Bu faaliyetlerin tirozin kinaz reseptörü tarafından aktive edilmesi onkogenezi tetiklemekte ve devamında hem hücrelerin proliferasyon hızlarını artırmakta hem de apoptoza gidişlerini engellemektedir. Bu reseptörü inhibe edecek ajanların sentezlenmesiyle ilk olarak Kronik Myelositer Lösemnin (KML), bu kanser tipindeki başarının ardından da birçok kanser türünün tedavisinde önemli mesafeler katedilmiştir. Anjiogenez var olan damar yapılarından yenilerinin oluşturulma süreci olacak tanımlanmakta, birçok fizyolojik sürece aracılık etmesine rağmen kanser hücrelerinin büyümesi ve özellikle de metastazı gibi patolojik durumlarda da önemli rol oynamaktadır. Anjiogenez sürecinin en önemli aktörü Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) olup, bu moleküle karşı üretilmiş monoklonal bir antikor olan bevacizumab neoadjuvan bir tedavi ajanı olarak kolon kanseri tedavisinde onay almış bir ilaçtır.

Bu bilgiler ışığında biz de çalışmamızda tirozin kinaz inhibitörleri olan sorafenib ve lapatinib'in medüller tiroid kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik etkinliği olup olmadığını, eğer varsa bu etkinin monoklonal bir VEGF antikorunu olan bevacizumab ile artırılıp artırılamayacağını araştırmayı amaçladık.

2. 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, 10. kromozomda 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. MTK'da 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 medulla hücreleri de dahil olmak üzere nöroendokrin hücrelerde reseptör benzeri tirozin kinaz üretimini kodlar (5, 6, 16, 17).

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 (18). RET sinyal yolağı sayesinde bir ligand/koreseptör/RET multikopleksi yerine reseptör/ligand bağlanması oluşur. Glial-derive neuroropic faktör (GDNF) ailesinde, GDNF, artemin, neurturin ve persephin ligandları ve familyal GPI-linked RET koreseptörleri (GFRI-4) tanımlanmıştır (19). 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 (RAS), rapidly accelerated fibrosarcoma (RAF), extrasellüler regulated kinase ½ (ERK1/2), phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase yolağı(PI3K/AKT), c-Jun N-terminal kinase yolağı (JNK), P38, enigma ekstrasellüler regülated kinase 5 (ERK5), c AMP cevaplı element bağlayıcı protein ve sinyal transducer ve activator of transcription 3 (STAT3) gibi yolaklar ile aşağıya doğru devam eder (20). RET geninde oluşan germ-line aktive edici mutasyon sonrası oluşan onkogenlere bağlı kanser yolağı aktive olur (21, 22). Artan büyüme faktörleri ve proliferasyon sonucu RAS/RAF/ERK1/2 kaskadı aktive olur. Bu kaskad karsinogenetik aktiviteden sorumludur ve STAT3 fosforile olur (23, 24). RET aktivasyonuna bağlı oluşan RAC1 ve JNK hücre göçünden, FAK ise hücre göçü, invazyon ve metastazdan sorumludur (21, 25). RET germ-line mutasyonları sonucu klinikte en sık görülen kanser tipi herediter MTK'dır. Herediter MTK'da 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 (26, 27).

MEN 2A sendromunda % 80 oranında, 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, 28-30).

Yeni mutasyonlar MEN 2A ve FMTK olan hastalarda yaygın değildir ve genellikle vakalarının % 10'dan az oranında bulunurlar (31).

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 (32, 34). 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, 35, 36). Bu mutasyonlar, somatik mutasyonlardan daha çok yeni germline mutasyonları yansıtabilir (36).

RET protoonkogenindeki germline mutasyonlar, herediter MTK vakalarının hemen hemen hepsinde görülürken sporadik vakalarda % 30-50 oranda saptanmıştır (37). 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 tanımlanmaktadır; sporadik MTK, MEN 2A, MEN 2B ve FMTK.

2.1.2.1 Sporadik MTK

MTK vakalarının büyük çoğunluğu sporadiktir (%75 - 80). Dördüncü ve altıncı dekatlar arasında pik yapar, kadınlarda erkeklere oranla biraz daha sıktır. Genellikle tek taraflıdır (38). Çoğunlukla ele gelen tiroid nodülü veya boyunda kitle ile presente olur. Patagonomik bir ultrason bulgusu yoktur, nodül genelde solid olup, hipoeoik görünümde ve kalsifikasyon içerir. İleri yaşta olan hastalarda % 50 den fazla oranda servikal lenfadenopati görülür. Kalsitonin, prostaglandin, serotonin ve vasoaktif intestinal peptid (VIP) salınımına 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 belirteci karsinoembriyonik antijen (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 (39).

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

MEN 2A sendromu bileşenleri MTK, feokromositoma ve primer hiperparatiroidizmdir (40). 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 (41).

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 agresifdir. Beraber bulunabilen diğer klinik özellikler, mukozal nörinom, gastrointestinal sistemde ganglionöromatozis ve marfanoid vücut yapısıdır. Hiperparatiroidizm bu sendromda görülmez. Mukozal nörinomlar, dudakta, dilde ve intestinal kanalda olabilir (42).

2.1.2.4 FMTK(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 (43).

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 İİAB yıkama sıvısında kalsitonin seviyesine de bakılabilir (39). Tiroid nodülü olan hastalarda rutin kalsitonin tarama yapılması hala tartışmalıdır Avrupa Tiroid Cemiyeti (ETA) tarama yapılmasını önerirken Amerikan Tiroid Cemiyeti (ATA) de rutin olarak tarama yapılması önerilmemekte; sadece yüksek riskli vakalarda bakılmasını önermektedir (44, 45). Pentagastrin uyarı testi yapılabilir tanı değeri yüksektir ve aynı zamanda maliyet etkindir (45-47). 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 (48, 49). Preoperatif dönemde mutlaka kalsitonin ve CEA düzeyi ölçülmelidir. Postoperatif dönemdeki kürü ve prognozu değerlendirirken karşılaştırma yapılabilir (50). 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 (48).

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 (51). 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 için de taramalar yapılmalıdır. Normal bulunduğu 1 - 3 yılda bir tekrarlanmalıdır (48).

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) şeklinde belirlenmiştir (48). 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 ultrasonografi, bazal ve uyarılmış

kalsitonin ölçümü ile takip edilmelidir. Eğer testlerde bir anormallik saptanırsa cerrahi yapılmalıdır (48).

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. MTK sıklıkla servikal lenf nodu metastazı (% 80 ipsilateral, % 40 kontrolateral), daha az sıklıkla karaciğer, akciğer ve kemik metastazı yapar (52). Cerrahi açıdan bakıldığında hastalar üç kategoriye ayrılır; lokalize hastalık, boyunda sınırlı metastatik hastalık ve uzak metastatik hastalık. Son gruptaki hastalarda cerrahi kür olasılığı yoktur (53).

Klinik ve radyolojik görüntüleme yöntemleri ile lenf nodu metastazı saptanamayan MTK hastaların da profilaktik olarak santral boyun lenf nodu (Level VI) diseksiyonu yapılmalıdır. MTK olan vakaların % 40' ı 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 diseksiyonunda 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 (48, 54). 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 metastazı olan hastalarda ağrıyı gidermek için gerekli olabilir (48).

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 (48).

2.1.5.3 Uzun Dönem Hasta İzlemi

TSH normal tutacak şekilde tiroksin tedavi (T4) verilmelidir. T4 tedavisi için başlangıç dozu; 1.6 mcg/kg'dır. Diferansiye tiroid kanserlerinde uygulanan TSH supresyonu, MTK olan vakalarda gerekli değildir. Persistant ve rekürren 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 (48). Boyun ultrasonografisi MTK olan olguların takibinde tercih edilen görüntüleme yöntemidir.

2.1.5.4 Persistan ve Rekürrent Hastalık

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 tiroid İİAB yıkama sıvısında kalsitonin bakılmalıdır. Ek görüntüleme yöntemleri yapılabilir ancak çoğunlukla sonuç negatiftir (48).

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 (48).

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 (48).

Lezyonlar > 1 cm, semptomatik ve / veya ilerleyici lokal hastalık varlığında cerrahi düşünülmelidir. Uzak metastaz varlığında kemoterapi, radyoterapi, hepatik kemoembolizasyon gibi palyatif tedavi yöntemleri uygulanabilir (48).

Radyoterapi

MTK tedavisinde radyoterapi (RT) kullanımı tartışmalıdır. RT servikal relaps riski yüksek olan hastalarda lokal hastalığı kontrol etmekte ve ağrı palyasyonunda etkili olabilir ancak uzun dönem prognozda etkili olduğu gösterilmemiştir (55-58). SEER (Surveillance Epidemiology and Results Program of the National Cancer Institute) çalışması, RT' nin prognoz üzerinde etkisiz olduğunu göstermiştir (59).

İnkomplet rezeksiyon veya mikroskobik yayılım olan rezidü hastalığın tedavisinde RT kullanımı ATA tarafından önerilmektedir. İzole beyin metastaz varlığında cerrahi rezeksiyon ve cerrahi yapılamayan olgularda RT önerilmektedir (48). RT kalsitonin seviyesini düşürmez, çevre doku üzerinde fibrozis ve skar gibi yan etkiler oluşturur, ayrıca ek cerrahi için zorluk yaratır (60). Radyoaktif iyot tedavisi, MTK ve lenf nodu metastazı tedavisinde etkisi yoktur. RT sadece cerrahi sonrası lokal nüks riski yüksek olan hastalara kullanılmalıdır ancak prognoz üzerinde etkisi yoktur (61, 62).

Hedefe Yönelik Tedavi

İlerlemiş MTK vakaları için etkin bir tedavi yöntemi yoktur. 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 katılmasıdır (48). Yapılan çalışmalarda RET ve tirozin kinaz reseptör aktivitesini hedef alan ajanların tedavide etkili olabileceği gösterilmiştir (11, 63). 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 (64, 65). Yeni yapılan faz III çalışmasında sağ kalımın uzadığı gösterilmiştir. Yan etkiler; diyare, rash, bulantı, hipertansiyon, QT uzaması ve baş ağrısıdır (66). 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 (67, 68).

Cabozantinib (MET, VEGF2 ve RET TKI) faz III (69) ve motesanib VEGFR 1,2,3 ve PDGFR ve stem cell factor (c-kit TKI) faz II (70) çalışmaları olan yeni ilaçlardır. Cabozantinib oldukça toksik bir ajandır. Yan etkileri; diare, el-ayak sendromu, halsizlik, VEGF inhibisyonuna bağlı olarak hipertansiyon ve yara yeri iyileşmesinde gecikmedir. Cabozantinib FDA tarafından progresif metastatik 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 metastatik hastalığı stabilize edebilir ancak sağ kalım süresinde bir değişiklik oluşturmazlar.

CEA hedefleyen antikolarlarla yapılan immunoterapi diğer bir tedavi seçeneğidir ancak sonuçları oldukça sınırlıdır (71). Dakarbazin, streptozosin, siklofosamid, 5-fluorourasil, vinkristin ve doksorubisin gibi geleneksel sitotoksik ilaçların tedavideki

etkinliği azdır. Karaciğer metastazları için doksorubisin ile kemoembolizasyon denenebilir.

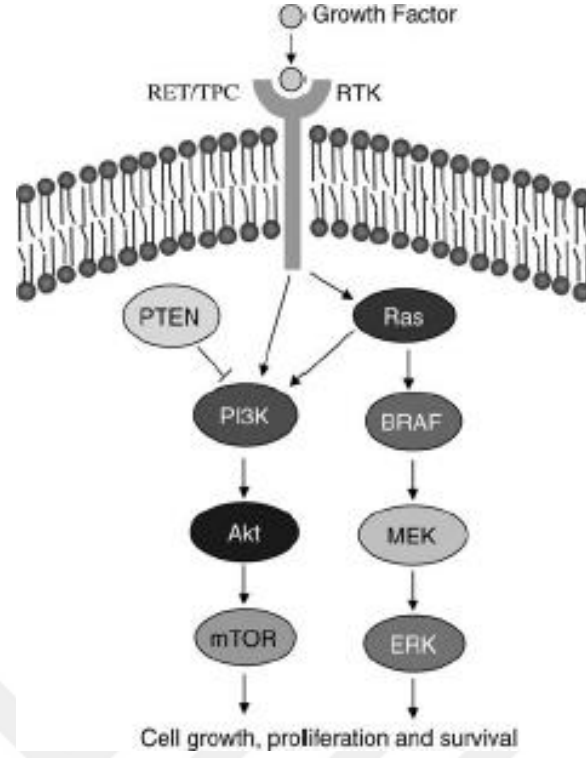
ATA asemptomatik ve 2 cm' den küçük, büyüyen (yılda çapı en az % 20) metastatik tümörlerde gözlem yapılmasını tavsiye etmektedir. Görüntüleme 6 – 12 ayda bir yapılmalıdır. İlerleyici hastalığı olan hastalarda (tümör 2 cm den fazla ve yılda çapı % 20' den fazla büyüme) ve cerrahi veya radyasyon için uygun olmayan semptomatik hastalar için sistemik tedavi yapılması için bir klinik çalışmaya yönlendirilmelidir. Hasta bir klinik çalışmaya dahil edilemiyorsa oral tirozin kinaz inhibitörleri verilmelidir (48).

2.1.6 Prognoz

MTK de 10 yıllık sağ kalım süresi tümörün özelliklerine bağlı olarak % 43-88 arasında değişmektedir (10, 38, 72-76). Prognozda önemli olan bağımsız risk faktörleri; yaşı, 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 seyreder ve prognoz çok kötüdür. Erken dönemde total tiroidektomi + servikal lenf nodu diseksiyonu ile tedavi edilen olgularda kür oranı yaklaşık olarak % 100 dür. Uygun küratif cerrahi sonrası, radyolojik ve klinik olarak rezidü tümör gösterilemeyen ancak postoperatif dönemde kalsitonini yüksek olan olgularda da yaşam beklentisi uzundur (38). Kalsitonin ve CEA katlanma zamanınının 2 yıldan kısa olması kötü bir prognostik faktördür (77).

2.2. Tiroid Kanserinde PTEN PI3K-p85 mTOR ve RAS'ın Tümörögeneziste Yeri

Tiroid kanserinde; PI3K/Akt ve MAP kinaz yolları tümörögeneziste önemli yollarlardır. Şekil 2.3'de bu iki yolağın temel elementleri gösterilmiştir. RTK'lar büyüme faktörleri ile aktive olduktan sonra RET/PTC ve Ras her iki yolda da rol alır. PI3K, mTOR, RAS hücre büyümesi, proliferasyonu ve hücre sağkalımından sorumludur. PTEN ise negatif düzenleyici olarak rol almaktadır. PTEN tümör süpresördür. PTEN kaybı hücre büyümesi, proliferasyonu ve sağkalımına neden olur (78).



Şekil 2.3. Tiroid kanserinde PI3K/Akt ve MAP kinaz yolları (78).

PI3K/Akt yolağı p85 PI3K'ın aktive büyüme faktörü reseptörü üzerindeki aktive tirozin rezidülerinin subunitlerine bağlanarak ya da Ras interaksyonu yoluyla aktive olur. PI3K yolağının çeşitli mekanizmaları Şekil 2.4'de gösterilmiştir. PIP2, PI3K aracılığıyla fosforolize olarak PIP3'a çevirir. PIP3, PDK1'i PH domaini aracılığıyla membran lokalizasyonunu değiştirir. PDK1 Akt'ı fosforilize ve aktive eder. Bütün bu yolların sonucunda apoptozis inhibe olarak, hücre proliferasyonuna ve sağkalımına neden olmaktadır (79).

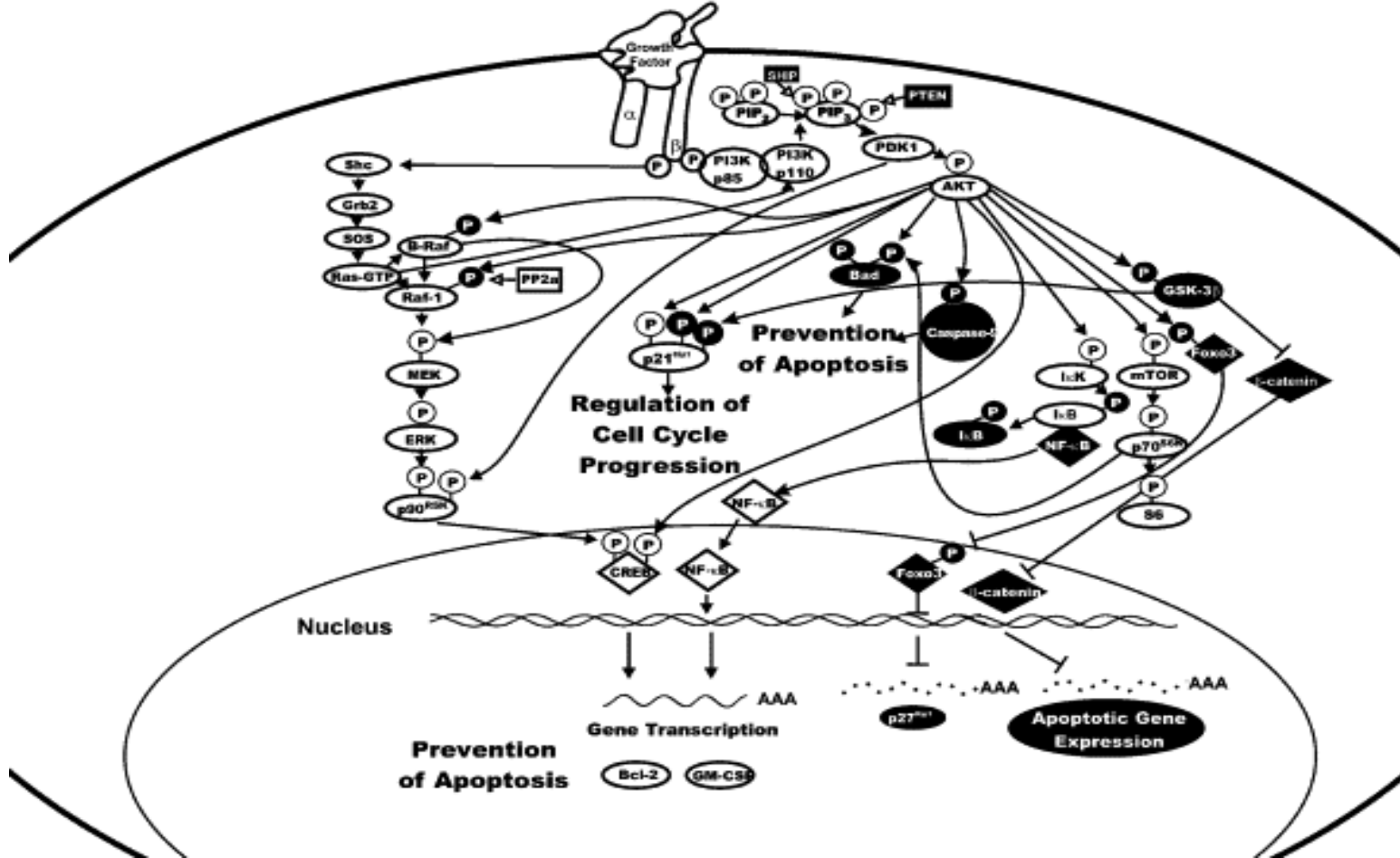
2.3. PI3K/p85 Yolağı

PI3K/Akt yolağı hücree büyümesinin regülasyonu, proliferasyon, sağkalım ve insan tümörogenezisinde temel rol alır (80, 81). PI3Ks çeşitli subunitleri mevcuttur. Klas I çok iyi tanımlanmıştır p85 ve p110 katalitik subunitlerine sahiptir (Şekil 2.5). Alfa-tip (PIK3CA) ve beta (PIK3CB) p110 subunitleri değişik dokularda geniş olarak eksprese edilirken; diğer p110 subtipleri sadece sınırlı dokuda eksprese edilir (82, 83).

Akt'ların 3 subtipi mevcuttur; Akt-1, Akt-2, Akt-3. Aktive Akt, protein efektörlerini fosforilize ve sinyal kaskatlarını amplifiye ederek hücre proliferasyonunu uyarır, apoptozisi inhibe eder. PI3K/Akt yolağı tümör süpresör gen PTEN ürünü ile antogonize edilir. PTEN fosfataz aktivitesi ile PIP3'ü defosforilize ederek PI3K/Akt yolağında sinyal iletimini sonlandırır (84).

Tiroid kanserlerinde PI3K sinyal aktivasyonu tiroid kanserlerinde gösterilmiştir (85). Akt1, Akt2 tiroid kaserinde önemlidir, PIK3CA amplifikasyonu özellikle FTK ve ATK'de olmaktadır (86, 87). PIK3CA mutasyon ve amplifikasyonu, Ras mutasyonu ve PTEN mutasyonu gibi PI3K yolağındaki çeşitli genetik değişimler FTK ve ATK'de yüksek oranda gözlenir (87, 88).

Overview of the PI3K/Akt Pathway



Şekil

2.5. PI3K/Akt yolağı ve p85 (79)

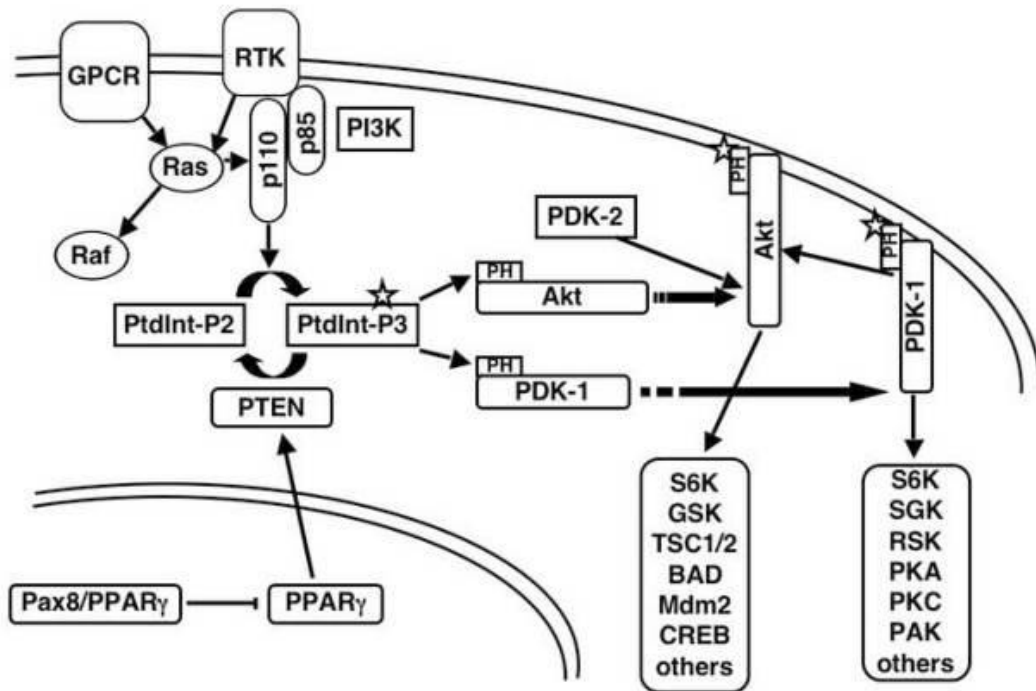
2.4. mTOR Yolağı

mTOR, FK506 bağlayan protein 12, rapamisin ilişkili protein (FRAP) 1, PI3K kaskadında serin/threonin protein kinazdır (89-91). mTOR, S6K'yı fosforile ve aktive eder; ökaryotik translasyon başlangıç faktör 4E bağlayıcı proteini (4E-BP) inhibe eder; buda protein sentezi ve hücre proliferasyonunda artışla sonlanır.

Akt aktivitesi mTOR aktivitesini güçlendirir. Akt ve mTOR arasındaki karmaşık ilişkiyi şekil 2.6'da görmekteyiz. Akt tubein skleroz protein komplekslerini (TSC1-hamartin, TSC2-tuberin) fosforile ve inhibe ederek ras homologundan zengin brain (rheb) aktivitesini artırır, mTOR aktivasyonu ile mTOR protein kompleksleri olan MTORC1 ve MTORC2 ile etkileşime girer (92).

mTOR, Raptor, mLST8, PRAS40 içeren MTORC1 bir mTOR inhibitörüdür. Rheb'in artmış aktivitesi, fosforilasyonla PRAS40 inhibisyonu, Akt'ın TSC1'i inhibe etmesiyle mTOR ve devamında sinyal yolağının aktivasyonuna sağlar. Aktive mTORC1 kompleks IRS1 gibi proksimal sinyal düzenleyicilerinin downregülasyonu ile PI3K sinyal yolağında negatif feedbackle inhibisyona sebep olur (93).

mTOR, Rictor, mLST8 ve mSIN1 içeren mTORC2 aktive olduğunda PDK-2'yi aktive eder, serin 473 fosforilasyonu ve Akt aktivasyonu ile pozitif feedback yapar. mTORC2 ilişkili yollar çok iyi bilinmemektedir. (Şekil 2.6) (94).

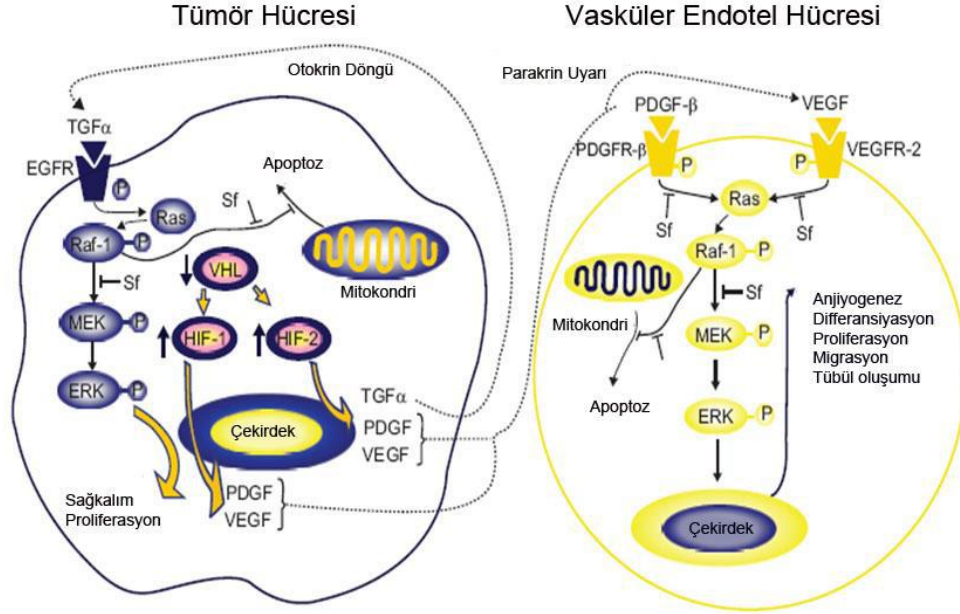


Şekil 2.6. Akt-mTOR yolağı (94).

2.5. Sorafenib

Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar) bir oral multikinase inhibitörüdür. Raf-1 ve B-Raf Serin-Treonin kinazları, Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) reseptörleri 1, 2 ve 3'ün ve Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF) reseptörünü, KIT, RET ve FLT-3 (FMS-like tirozin kinaz) aktivitesini inhibe eder (95). Sorafenib, Raf/MEK/ERK yolu ve VEGF sinyal yolunu hedefleyerek, tümör hücre proliferasyonunu ve tümör anjiyogenezini engeller. Ayrıca çok sayıda tümör

modelinde apoptoz hızını artırdığı (96) bunun yanında ileri evre hepatosellüler kanser ile metastatik renal hücreli kanserde sağ kalım süresini artırdığı gösterilmiştir (97, 98). Tümör gelişmesinde; hücre çoğalmasını, apoptozun baskılanması ile tümör yayılımı, metastazı gibi süreçler aktive olmuş tirozin kinaz reseptörünün tetiklediği sinyal yolları tarafından yönetilir. Bir proto-onkogen olan Ras, tirozin kinaz reseptörlerinin uyarılmasına yardımcı olur. Bu nedenle önceden de belirtildiği gibi Ras sinyal yolunun aktivasyonu, insanda kanser gelişmesinde önemli bir mekanizmadır. Ras'ın Raf/MEK/ERK gibi sinerjistik etki gösteren çeşitli yolları idare ederek hücre dönüşümünde etkili olduğu bilinmektedir (95, 99, 100) (Sekil 2.11-Sekil 2.13). Raf kinazlar, GSK-3 gibi serin/treonin kinaz ailesindedir ve Ras moleküllerinin aktive olmasını sağlarlar (101). Raf kinaz ailesinin 3 üyesi bulunmaktadır; A-Raf, B-Raf, Raf1. Tümör hücreleri aşırı miktarda VEGF ve PDGF- gibi bazı büyüme faktörleri ve sitokinler salgılar. Bunların endotel hücreleri üzerindeki reseptörlere bağlanması, Raf/MEK/ERK yollarını aktive eder, bunun sonucunda da anjiyogenez ve lenfanjiyogenez görülür (102). Raf kinazlar, VEGF ve PDGF- tümör gelişmesinin ve anjiyogenezin engellenmesinde potansiyel moleküler tedavi hedefleridir (103).



Şekil 2.7. Tümör hücresi ve endotel hücresi arasındaki VEGF bağımlı etkileşimler (103)

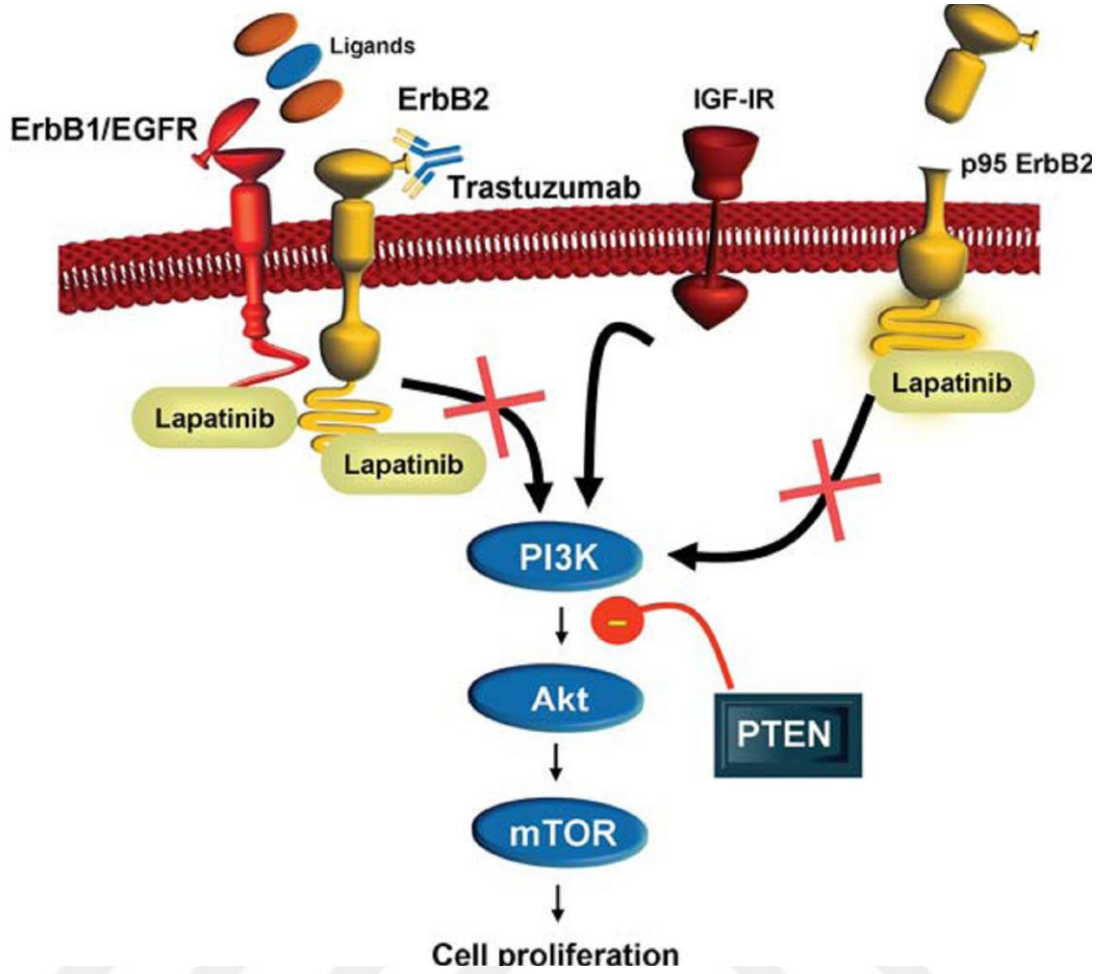
Sorafenib'in etki mekanizması: Sorafenib ikili etki yaratarak tümörde ve tümör damarlarında Raf-1 dahil Raf kinazları ve vasküler endotelial büyüme faktör reseptörü 2 ve 3 (VEGFR 2,3) Trombosit kaynaklı büyüme faktör reseptörü (PDGFR) gibi tirozin kinaz reseptörlerini inhibe eder (103).

Sorafenib'in özellikle ileri evre karaciğer kanseri ve böbrek kanseri basta olmak üzere farklı kanserlerdeki etkisini araştırmak amacıyla çeşitli çalışmalar yayınlanmıştır. FDA (United States Food and Drug Administration, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve ilaç dairesi) Aralık 2005'de Sorafenib'in böbrek ve karaciğer kanserinde kullanılması için kısa sürede onay vermiştir. Ayrıca tiroid kanserinde etkili olduğunu gösteren yayınlar bulunmaktadır (104). Günümüzde de diğer bazı kanserler üzerine etkisini araştıran çalışmalar yapılmaktadır (104, 105).

2.6. Lapatinib

Lapatinib insan epidermal growth faktör reseptör 1 (EGFR/HER1) ve insan epidermal growth faktör reseptör 2 (HER2/ErbB2) tirozin kinazını (TK) inhibe ederek sinyal iletimini önleyen çift etkili selektif inhibitördür (106). Lapatinib etkisini intraselüler olarak TK'ın ATP bağlayan kısmına bağlanarak etki göstermektedir. TK'ın fosforilasyon ve aktivasyonuna engel olmaktadır. Bu sayede

sinyal iletimi en baştan bloke edilerek, ekstraselüler sinyal bağımlı kinaz 1 (ERK1) ve fosfatidilinozitol-3'kinaz (PI3K) gibi birçok yolağın aktivasyonuna engel olunmaktadır (Şekil 2.8) (107, 108). İnsan epidermal growth faktör reseptör-1, VEGF reseptörüne benzer şekilde tirozin kinaz reseptör ailesi karakteristiğini taşır. HER1, EGFR'nün 19 alt grubundan birisidir (104). HER1'in uyarılması TK aktivasyonu sonucunda protein kinaz ve fosfatidil inozitol-3-OH kinaz yolunu aktive etmektedir (109). Preklinik çalışmalar sonucunda HER1 aktivasyonuna ve neovaskülarizasyona neden olduğu gösterilmiştir (110). EGFR aktivasyonu ile VEGF gibi anjiyogenik moleküllerin salınımını artarak anjiyogenezin hızlandığı bilinmektedir (111). EGFR inhibitörleri sayesinde anjiyogenezin engellenebileceği gösterilmiştir (112). İnsan epidermal growth faktör reseptör-2, Lapatinib'in etkili olduğu ikinci reseptördür ve anjiyogenezde önemli rolü vardır. HER2'nin aktivasyonu EGF'ün reseptöre bağlanmasını indükler. Fosfatidilinositol 3 kinaz ve mitojen aktive protein kinaz kaskadını içeren multipl hücresel sinyal yolu aktive olur. HER2 reseptörü normal hücrelerin proliferasyon ve diferansiasyonunda kritik rol oynar (113). Bu reseptörlerin aktivasyonu artmış hücre proliferasyonu, invazyon, artmış tümör hücre motilitesi, anjiyogenez ve apoptozisin inhibisyonu ile ilişkilidir (114). İnvitro çalışmalarda da Lapatinib'in HER1 ve HER2 reseptörlerinin ikisini birden inhibe ettiği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda Lapatinib'in HER1 ve HER2 reseptör blokörü olarak, tek başına HER1 reseptör blokörlerinden daha etkin olduğu gösterilmiştir (108). Trastuzumab'a ilave olarak Lapatinib'in bazı kanser türlerinde daha etkin olduğu gösterilmiştir. HER1 ve HER2 ayrı ayrı inhibisyonunun kornea neovaskülarizasyonunu engellediği daha önceki yayınlarda gösterilmiştir (108). Lapatinib sayesinde kornea neovaskülarizasyonunu önlediği bilinen 2 reseptörün birden inhibisyonu ile daha etkili tedavi yöntemleri hedeflenmektedir. Lapatinib kornea neovaskülarizasyonunu önlenmesinde çok hedefli terapötik yaklaşımın diğer bir parçası olabilir. Lapatinib'in göz hastalıklarında için kullanım ruhsatı yoktur.



Şekil 2.8. ErbB1, IGFR, ErbB2, Lapatinib ve Trastuzumab'ın etkileşimi (108)

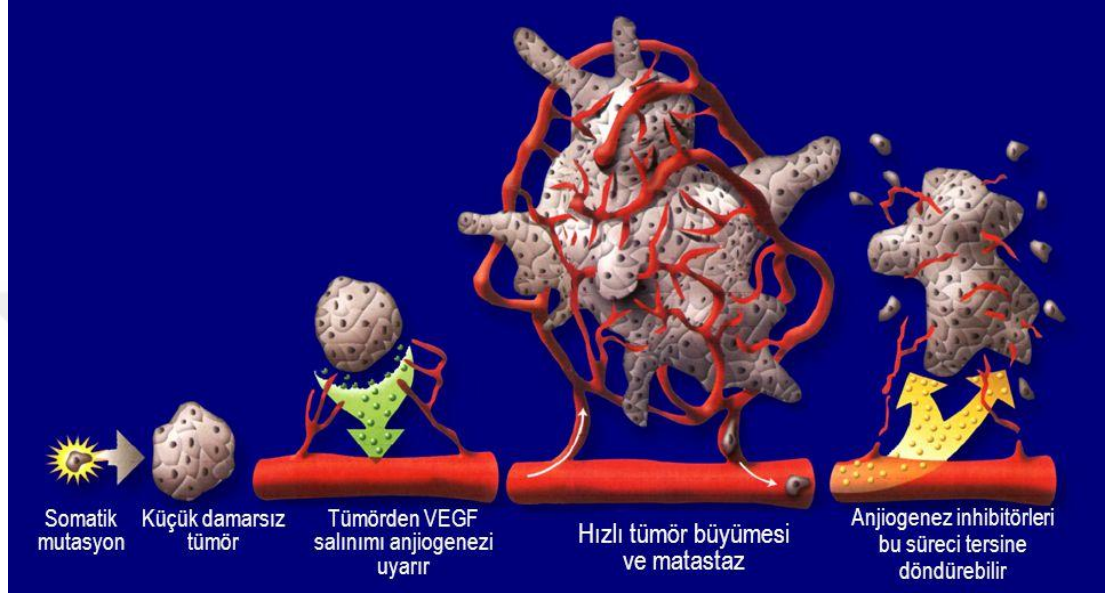
2.7. VEGF (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü) ve Bevacizumab

Tümörler, küçük hücre popülasyonlarına komşu olan kan damarlarından ekstravasküler mesafeden basit difüzyonla aldıkları besinlerle yaşamlarını sürdürebilir. Bu hücre kolonisinin çapı 1-2 mm'ye ulaştığında basit difüzyon, büyümeyi desteklemekte yetersiz kalır. Tümör hücreleri bundan sonra endotel hücreleri için mitojenik olan ve mevcut kan damarlarından yeni kapillerlerin oluşumunu stimüle eden VEGF gibi faktörler salgılar. Tümör damarlarının oluşması, tümöre besin temin ederek ve atık ürünlerin perfüzyonla uzaklaştırılmasıyla tümörlerin çapının 1-2 mm'den fazla büyümesini sağlar.

1971'de Folkman, tümörün en hassas olduğu dönemde (anjyogenezden önce) TAF (tümör anjiyojenik faktör)'lerin bloke edilmesi sayesinde büyüme için gerekli besin ve oksijene ulaşımın önlenerek tümör büyümesinin sınırlanabileceği varsayımını ortaya atmıştır. Anti-anjiyojenik tedavi böylece solid tümörlerin büyümesinin kontrol altına

alınmasında güçlü bir araç olabilecekti. 1989’da en güçlü TAF moleküllerinden biri olan VEGF, Ferrara ve Henzel tarafından keşfedilmiştir (115, 116).

Tümör anjiyogenezi kapsamlı araştırmaların konusu olmuştur ve şimdi anjiyogenezin kanser oluşumunun ilk evrelerinden uzak metastazların büyümesine kadar tümör gelişimiyle ilgili olduğu bilinmektedir (117) (Şekil 2.9).



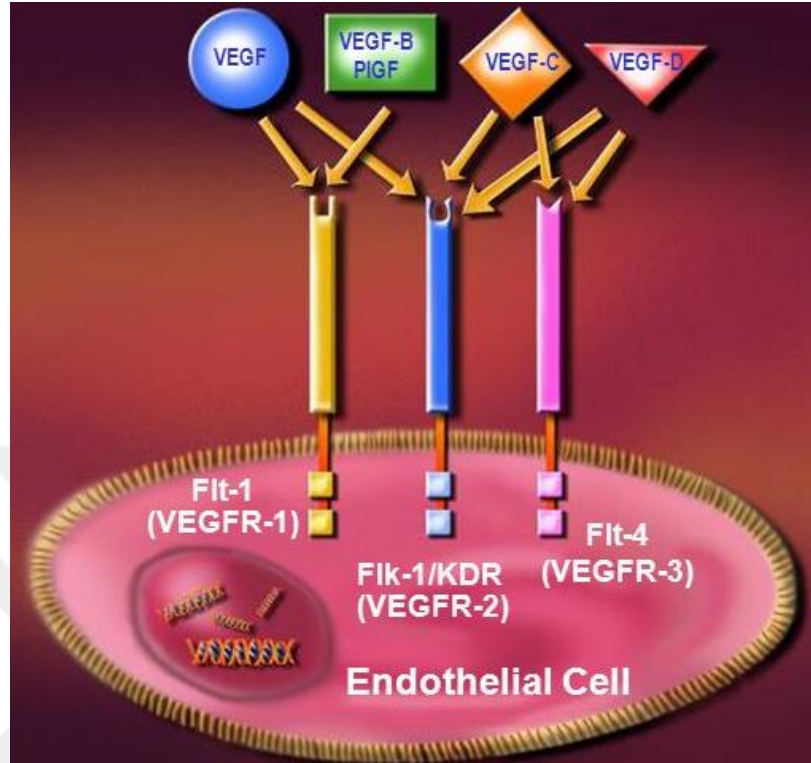
Şekil 2.9. Anjiyogenezin tümör büyümesinde rol oynadığı evreler (117).

Tümör dokusunun kendine yeni damar yeni damar oluşturma süreci, salgıladığı anjiyogenik büyüme faktörleri (VEGF) sayesinde başlar. VEGF arterler, venler ve lenfatiklerden köken alan vasküler endotel hücreler için güçlü bir mitojendir ancak başka hücre tipleri için mitojenik aktivitesi yoktur (118).

Doğal VEGF (veya VEGF-A) bazik, heparine-bağlanan, 45,000 Dalton ağırlığında, homodimerik bir glikoproteindir. Bu, onun iki özdeş birimden oluştuğu anlamına gelir. İnsan VEGF geninin farklı ekspresyonu 121, 165, 189 ve 206 amino asidi olan dört farklı molekül türünün oluşmasıyla sonuçlanır (118).

Tümör hücrelerinde ve mikro çevresinde yer alan bazı immün hücrelerden salgılanan VEGF (A, B, C, D) endotel hücreleri yüzeyinde bulunan özgün reseptörleri VEGF-R1 (Flt-1), VEGF-R2 (KDR) ve VEGF-R3 (Flt-4) ile etkileşirler. Bunlardan VEGF B sadece VEGF-R1’i uyarırken, VEGF A hem VEGF-R1 hem de VEGF-R2’yi uyarabilir. VEGF C, VEGF R2 ve R3’ü uyarabilir. VEGF D ise sadece VEGF-R3’ü uyarabilme yeteneğine sahiptir. VEGF-R’ler uyarıldığında hücre içinde Ras/Raf/Erk, PI3K ve P38 MAPK yolları aktiflenmektedir. VEGF-R1 anjiyogenezden, VEGF-R2

anjiogenez ve lenfanjiogenezden, VEGF-R3 ise lenfanjiogenezden sorumludur (118).
(Şekil 2.10)



Şekil 2.10. VEGF reseptörleri (118).

VEGF molekülü tarafından aktiflenen endotel hücreleri de bazı parakrin faktörler salgılayarak perisitleri uyarırlar. Bunlar içerisinde en iyi bilineni PDGF'dir. PDGF perisitlerin yüzeyinde bulunan PDGF-Rb'ye bağlanarak hücre içinde Ras/Erk ve PI3K yollarını uyarır. Böylece hücre aktivasyonu ve damarın maturasyonu tamamlanmış olur (118).

Lenfanjiyogenez VEGF tarafından regüle edilir ve sıklıkla anjiyogeneze eşlik eder. Lenfatik damarlar sıvı, protein ve hücreleri taşır ve bunları venöz dolaşıma geri götürürler. Tümörlerin çevresindeki lenfatik çoğalma malign hücrelerin metastatik yayılımına yardımcı olabilir (119).

Anjiyogenez, birçok düzenleyici molekülün ekspresyonuyla yönetilen karmaşık bir süreçtir. Anjiyogenik süreçte rol alan en önemli molekül kuşkusuz VEGF'dir. Çeşitli faktörlerin VEGF sentezini artırdığı gösterilmiştir. Bu faktörler arasında çevresel faktörler (hipoksi, HIF1 α , Ph), büyüme faktörleri ve hormonlar (EGF, bFGF, PDGF,

IGF-1, IL-1a, IL-6, östrojen), tümördeki bazı genetik mutasyonlar (p53, p73, svc, K-RAS, HRAS, rHc, bcr-abl) sayılmaktadır (120).

Negatif düzenleyiciler trombospondin, plazminojen fragmanı, anjiyostatin ve kolajen XVIII fragmanı endostatini içerir. Pro-anjiyojenik ve anti-anjiyojenik büyüme faktörlerinin sıkıca dengelenmiş ekspresyonu normalde düzensiz anjiyogeneze engel olur. VEGF hem fizyolojik (embriyogenez ve erken postnatal) hem de patolojik (tümör) anjiyogeneze rol oynar. VEGF'nin aktivitesi, hücre yüzeyi reseptörlerine, esasen, hücrel etkilere çevrilen moleküler olayları uyaran intraselüler sinyal kaskadlarını stimüle eden VEGF R-2'ye bağlanarak indüklenir. VEGF'nin etkisi altındaki kan damarları anormaldir. VEGF damar geçirgenliğini ve dolayısıyla interstisyel basıncı etkileyerek damarların hücrelere oksijen ve besinleri ulaştırmasını etkiler. Bu da VEGF sekresyonunu ve yeni, olgunlaşmamış kan damarlarının oluşmasını daha çok uyarır. Günümüzde VEGF ve VEGF reseptör aktivasyonunu baskılamak amacı ile pek çok yeni ajan geliştirilmiştir. Bu ajanların farklı etki mekanizmaları vardır. Bevacizumab, aflibercept ve cediranip (multitargeted bir ajandır) gibi ilaçlar VEGF'i veya reseptörlerini bloke ederek etkili olurken; sunitinib, sorafenib, vandetanib, pazopanib, vatalanib, motesanib gibi diğer moleküller ise çoğunlukla VEGF reseptörünün hücre içi tirozin kinaz aktivitesini baskılayarak (multi-kinaz inhibitörleridir) etkili olurlar (120). VEGF inhibisyonu için en iyi araştırılmış ajan Bevacizumab'dır. Bevacizumab IgG1 yapısında rekombinant humanize bir monokonal antikordur. VEGF'nin tüm izoformlarını tanıma yeteneğine sahiptir. Uygulandıktan sonraki yarı ömrü ortalama 20 gün (11-50 gün) civarındadır. Dolaşımdaki VEGF'i bağlayarak (ligand miktarını önemli oranda azaltarak reseptör aktivasyonunu engeller) endotel proliferasyonunu ve yeni damar oluşumunu engeller. Aynı zamanda endotel hücrelerinde apoptozisi uyatarak var olan damarlarda da regresyon sağlar (121).

Bevacizumabın tümör damarları üzerine diğer bir önemli etkisi de tümör dokusundaki bozulmuş kan akımının normalizasyonudur. Tümör dokusunda artmış interstisyel basınç yapısal bozukluğu olan tortiyöz tümör damarlarının kollapsına ve tümör içi kan akımının bozuk olmasına yol açar. Bevacizumab doku içindeki basıncı düşürerek tümör dokusundaki kan akımının normalizasyonunu ve böylece kemoterapi ilaçlarının tümörlü dokuya daha iyi penetre olmasını sağlar (122).

Bevacizumabın kolon kanserinde kullanıldığı ilk randomize çalışma Kabbinavar ve ark. (2003) tarafından yayınlanan bir faz 2 çalışmadır (123). Bu çalışmada tek başına bolus 5-FU/FA iki farklı dozda bevacizumab kombinasyonu ile (5 mg/kg ve 10 mg/kg) karşılaştırılmış ve 5FU/FA+5 mg/kg bevacizumab kolunda RR ve PFS diğer kollardan anlamlı şekilde daha iyi bulunmuştu. Bu çalışmadan sonra bevacizumabın optimum dozu 5 mg/kg olarak kabul edildi ve ilacın onay almasını sağlayan asıl faz-3 çalışma, Hurwitz ve ark. (2004) tarafından çok merkezli olarak yapıldı (124). Bu çalışmada, bevacizumab lökoverin (IFL) ile kombine edildiğinde yanıt oranları %34.8'den %44.8'e, PFS 6.2 aydan 10.6 aya ve OS 15.6 aydan 20.3 aya kadar anlamlı olarak yükseldi. Bu çalışmanın sonuçlarının açıklanması ile bevacizumab kombinasyonları Amerika ve Avrupa'da mKRR'in birinci basamak tedavisinde standart haline geldi.

Asıl ilk sıra çalışma ile aynı zamanda yapılmaya başlanan ECOG-3200 çalışmasında bevacizumabın ikinci sıra tedavide etkinliği FOLFOX kombinasyonu ile araştırılıyordu (125). Bu çalışmada irinotekan+fluorouracil sonrası başarısız olunmuş, bevacizumab naive hastalar FOLFOX+bevacizumab, yalnız FOLFOX ve yalnızca bevacizumab kollarına ayrılmışlardı. Bevacizumab 10 mg/kg dozunda kullanılmıştı. FOLFOX-4+bevacizumab kolu sadece FOLFOX kolu ile kıyaslandığında ortalama tüm sağ kalımda (12,5 vs 10,7 ay, p:0.0024) ılımlı bir artış sağlanmıştı. Tek ajan bevacizumab kolunda önemli oranda düşük hastaliksız sağ kalım görülmüştü ve cevap oranı %3 oranındaydı ve kolorektal kanserde tek ajan olarak aktivitesi olmadığı için kullanılmaması gerektiği ileri sürülmüştü. Bu çalışmaya sadece birinci basamakta bevacizumab kullanmamış hastalar katılmıştı. İkinci sıra tedavide etkinli analizi yapmasına rağmen ECOG-3200 çalışması FOLFOX+bevacizumab kombinasyonunun güvenlik datalarını sağlayan ilk çalışmadır. Bunun sonucunda ilk sıra kullanım verileri olmasa bile Amerika'da mKRR'de ilk sıra tedavide FOLFOX+bevacizumab kombinasyonu yaygın kabul görmüştü. İlk sıra tedavide bevacizumab+oxaliplatin kombinasyonunun etkin olup olmadığını araştıran NO16966 çalışmasında (126), mKRR'li 1400 hasta, FOLFOX-4 veya CapeOx kollarına randomize edildikten sonra, her iki kol bevacizumablı veya bevacizumabsız kollara (ikiye iki randomizasyon) ayrıldı. FOLFOX ve CapeOX rejimlerine bevacizumab eklenmesi ile Progresyonsuz sağ kalım süresinde (PFS) bir miktar uzama (9.4 vs 8 ay, p=0.0023) sağlanmış ancak anlamlı bir genel sağkalım

avantajı bulunmamıştı (21.3 vs 19.9 ay, $p=0.077$). Bu durum, oxaliplatin-bevacizumab kombinasyonu alan hastaların önemli kısmının daha önce okzaliplatin içeren adjuvan tedavi almış olmaları ve özellikle oxaliplatine bağlı yan etkiler nedeni ile tedaviyi erken bırakmalarına (hastaların %71'i), ayrıca tedavinin 6 kür ile kısıtlanması ile izah edilmektedir. Gerçekten de bevacizumabın en çarpıcı sağkalım avantajı sağladığı IFL çalışmasında hastalar ortalama 40.4 hafta bevacizumab almışken, bu süre NO16966 çalışmasında 27.1 haftadır. Metastatik kolorektal kanser (MKRK) tedavisinin birinci basamağında bevacizumabın oxaliplatin ile kombine kullanıldığı 5 randomize çalışmanın ve ikinci sıra tedavide kullanıldığı bir randomize çalışmanın metanalizinde, bu kombinasyonun hem progresyonsuz sağkalımı hem de genel sağkalımı anlamlı olarak artırdığı gösterilmiştir (127).

En son NCCN (The National Comprehensive Cancer Network) klavuzlarında da bu veriler ışığında, mKRK'in tedavisinde bevacizumabın 5-FU, kapesitabin, irinotekan veya okzaliplatin içeren kombine kemoterapi protokolleri ile birlikte uygulanması standart olarak önerilmektedir.

Metastatik hastalıkta palyatif kemoterapinin optimal süresi hakkındaki tartışma (tedaviye ara verme yada dur ve devam et stratejisi mi?) devam etmektedir. Kemoterapi rejimlerinin toksisitesi nedeni ile tedaviye ara verilmesini önerenler olduğu gibi daha az toksik ajanlar ile tedavinin devam etmesi gerektiğini savunanlar da vardır. Tedavinin devam etmesi gerektiğini önerenlerin temel yaklaşımı, VEGF inhibitörleri kesildiğinde tümör dam arlanmasıyla reaktif bir artış olduğunun gösterilmesine dayanmaktadır (128). Bu nedenle kemoterapi bir nedenle kesilse bile bevacizumaba devam edilmesini öneren araştırmalar vardır.

Diaz-Rubi ve ark. (2012)'nin yaptığı faz 3 MACRO çalışmasında bevacizumabın maximum yararının hastalık progresyonuna kadar devam edildiğinde gözlendiğini gösterdiler (129). Bunun üzerine Türk Onkoloji Grubunun (130) yaptığı çok merkezli, faz 3 çalışmada 6 kür XELOX+Bevacizumab aldıktan sonra XELOX+bevacizumab ve capesitabin+bevacizumab kollarına randomize edilen hastalarda, capesitabin ile devam edilen kolda ortalama PFS (11.0 vs 8.3 ay, $p=0.002$) istatistiksel olarak daha iyi saptandı. RR ve OS'de iki kol arasında anlamlı farklılık yoktu.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Sorafenib, Lapatinib ve Bevacizumab'ın medüller tiroid kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini tek başına ve kombine olarak araştırılması amaçlanmıştır. Araştırmamız, C.Ü. Tıp Fakültesi Araştırma Merkezi laboratuvarlarında ve Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalında hücre kültürü alt yapısı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışma, Cumhuriyet Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 24.07.2014 tarihli toplantı kararı ile izin alınmıştır. Ayrıca çalışmanın finansal olarak desteklenmesi amacı ile Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) Müdürlüğüne baş vurulmuş ve çalışma T-610 proje numarası ve 20000 TL'lik bütçe ile CÜBAP tarafından desteklenmiştir.

3.1. Çalışma İlaçları ve Hazırlanması

Çalışmamızda sorafenib (Santa Cruz Biotechnology®) ve lapatinib (Santa Cruz Biotechnology®) ilaçlarının etken maddeleri Santa Cruz Biotechnology® şirketinden temin edilerek kullanılmıştır. Bevacizumab (Avastin®, Genentech İlaç Şirketi) çözücüsü içinde hazır çözünmüş şekilde pazarlandığı için bu ilacın Genentech İlaç Şirketi tarafından temin edilen ticari preparatı kullanılmıştır. Sorafenib ve lapatinib, her ikisi birden hem suda hem de Dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözünebilen moleküllerdir. DMSO içerisinde çözünürlük daha yüksek olmasına rağmen DMSO'nun potansiyel sitotoksik etkilerinden ötürü ilaçlar suda çözünmüş halleri ile kullanılmıştır. Bevacizumab ise kendi çözücüsü ile birlikte kullanılmıştır.

3.2. Çalışmada Kullanılan Hücre Tipi ve Özellikleri

Çalışmamızda insan kaynaklı bir hücre serisi olan TT (ATCC® CRL-1803™) tiroid meduller kanseri hücreleri kullanılmıştır. Bu hücreler C634R RET mutation–pozitif epitelyal kaynaklı yapışma özelliği olan (adherent) hücrelerdir.

Sitotoksisite testleri C.Ü. Tıp Fakültesi Araştırma Merkezi (CÜTFAM)'nde gerçekleştirildi. Çalışmamızda, American Type Cell Collection (ATCC)'den temin edilen TT isimli medüller tiroid kanseri hücre hattı kullanıldı (Şekil 3.11). ATCC'den temin edilen hücreler Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırma Merkezindeki hücre kültürü modülünde 25 cm² ve 75 cm²'lik flasklarda, % 5 CO₂, % 95 nem içeren karbondioksitli inkübatör ortamında tutularak çoğaltıldı. Hücreler için besiyeri olarak “Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu” (DMEM) kullanıldı (Çizelge 3.1) (Şekil 3.3). DMEM'e ek olarak Tiroid kanseri hücreleri için seçici bir besiyeri olan F12 medium, bunun yanında % 10 oranında fetal sığır serumu (FBS) ve %1 oranında penisilin-streptomisin kullanıldı (Şekil 3.5). Hücreler %70 yoğunluğa ulaşmış flasksın yüzeyini kaplayınca, haftada en az iki kere pasajlanarak çoğaltıldı (Şekil 3.5). Tüm işlemler UV ışıkla sterilize edilen laminar akımlı kabin içerisinde gerçekleştirildi (Şekil 3.5 ve Şekil 3.7). % 0.05 tripsin, 0.53 mM EDTA solüsyonu ile hücrelerin flasktan ayrılması sağlandı. Hücre süspansiyonunun üzerine DMEM eklenerek tripsinin etkisi nötralize edildi ve hücre süspansiyonu flaskslar arasında paylaştırıldı.



Şekil 3.1. TT medüller tiroid kanseri hücrelerinin mikroskop altındaki görüntüsü.



Şekil 3.2. Hücrelerin incelenmesinde kullanılan mikroskop ve TT medüller tiroid kanseri hücreleri için kullanılan flask.



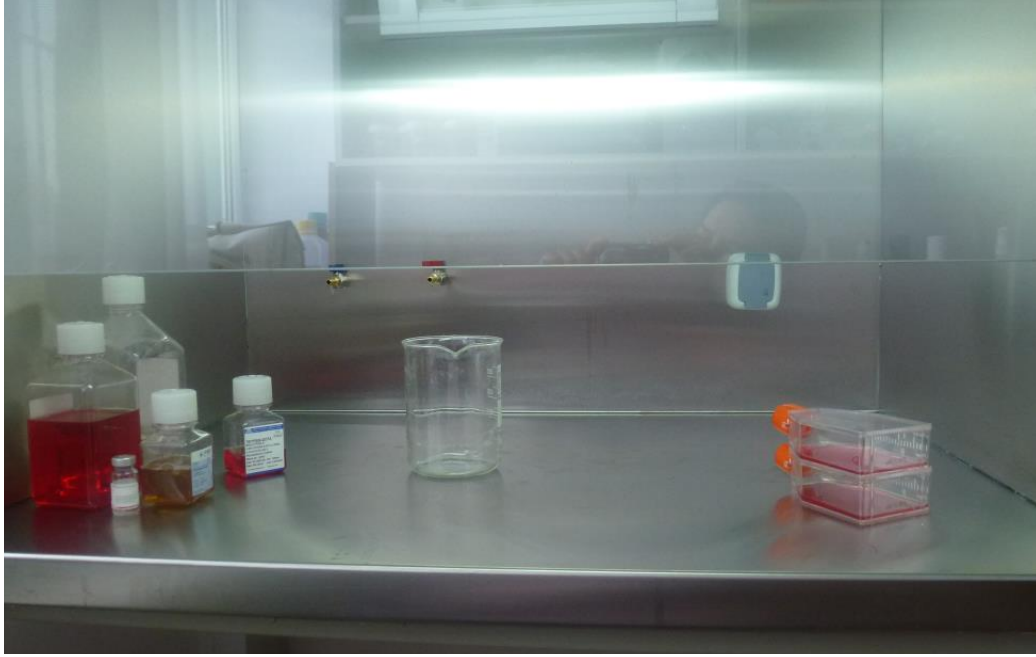
Şekil 3.3 DMEM, Fötal sığır serumu (FBS), Penisilin-streptomisin, Tripsin, EDTA

Çizelge 3.1 Hücre kültüründe kullanılan besiyeri ve içeriği.

Hücre Kültür Besi Yeri	Kullanılan Miktar	Üretici Firma
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	100ml	Sigma Aldrich Cheme, Germany
Penicilin/Streptomycin (1000 U/10000Mg/ml)	1ml	Biochrom KG, Berlin, Germany
L-glutamin	1ml	Biochrom KG, Berlin, Germany
Fetal Bovine Serum (FBS)	4 ml	Biochrom KG, Berlin, Germany



Şekil 3.4 Hücre kültürü aşamalarının gerçekleştirildiği steril laminer akımlı kabin



Şekil 3.5. Hücre kültürü aşamalarının gerçekleştirildiği steril laminer akımlı kabinin iç görünümü.



Şekil 3.6. %5 CO₂ içeren inkübatör

3.3. Hücre Kültürü Teknikleri

3.3.1. Hücre Hattının Açılması

Uzun süre sıvı azot buharında saklanmış olan hücreler çözünmesi sağlanana kadar 37 °C'lik su banyosunda tutuldu. Çözünen hücre süspansiyonu % 20 FBS içeren medyum ile muamele edilerek flasklara kondu, sonrasında 3-4 saat 37 °C'de, % 5 CO₂ ve 1 atm basınç altında inkübasyona bırakıldı (Şekil 3.6). Bu sürenin sonunda hücre medyumunu %10 FBS içeren medyumla değiştirildi.

3.3.2. Hücrelerin Çoğaltılması

Hücreler 25 cm²'lik flasklarda 8-10 ml, 75 cm²'lik flasklarda ise 25 ml %10 FBS ve %1 (100 IU) penisilin-streptomisin içeren DMEM medyumunu içerisinde % 70 yoğunluğa geldiklerinde pasajlanmak suretiyle üretildi.

3.3.3. Hücrelerin Pasajlanması

Flasklar içerisinde yeterli yoğunluğa gelen hücrelerden medyum uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine % 0.05'lik tripsinden, küçük flasklara 1-2 ml, büyük flasklara 3-4 ml eklenerek 2-3 dakika bekletildi. Flasklar 37 °C'lik %5'lik CO₂ etüvde 2-3 dakika bekletilerek hücrelerin kontrollü şekilde kalkmaları sağlandı. Yüzeiden ayrılan hücrelerin üzerine tripsinin etkisini bloke etmek için tripsinle aynı miktarda medyum eklendi ve iyice pipetaj yapıldıktan sonra, santrifüj tüpüne süspansiyon halinde toplanan hücreler 800 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant (üst faz) kısım uzaklaştırıldı. Bir miktar medyumla süspansiyon edilen ve iyice pipetaj yapılan hücreler yeterli miktarda medyum konulmuş flasklara eklendi. Flasklar 37 °C'lik %5'lik CO₂ etüve kaldırıldı.

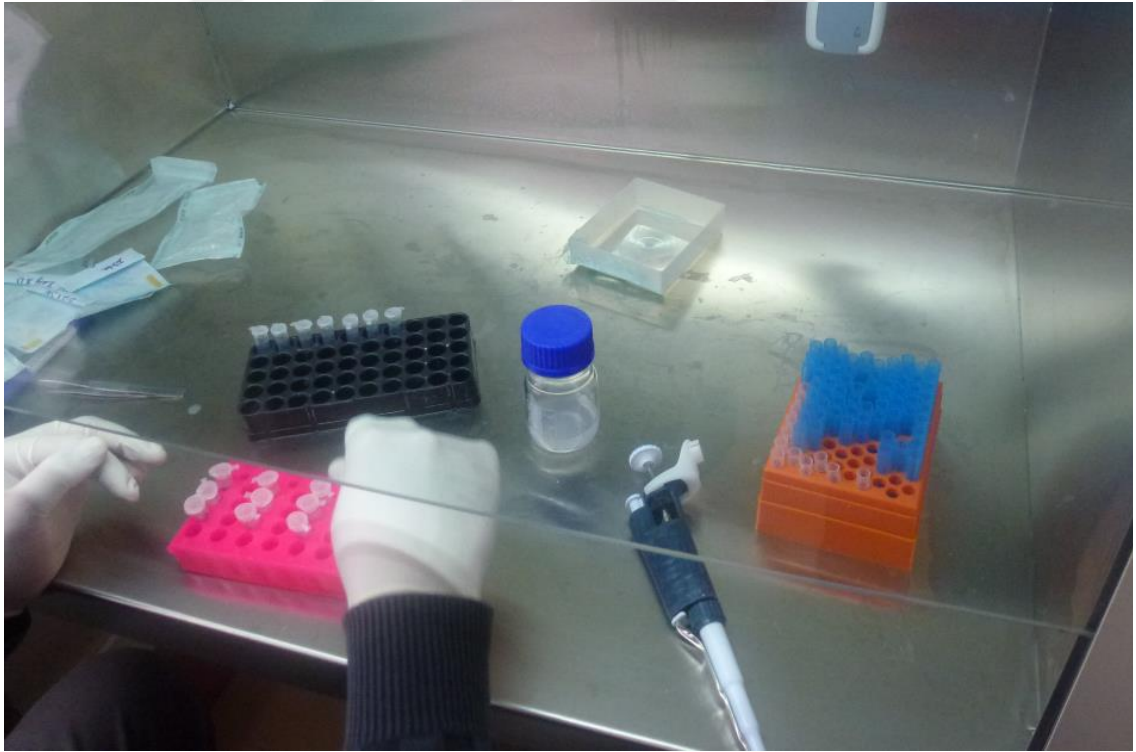
3.3.4. Hücre Sayımı

Toplam hücre süspansiyonunun mililitresindeki hücre sayısını hesaplamak için, üzeri 4 adet 16 küçük kare içeren bölgeden oluşan 1 mm²'lik alan ve 0.1 mm derinliğe sahip hemasitometre kullanıldı. Süspansiyonun mililitresindeki toplam hücre sayısı aşağıdaki formülle hesaplandı.

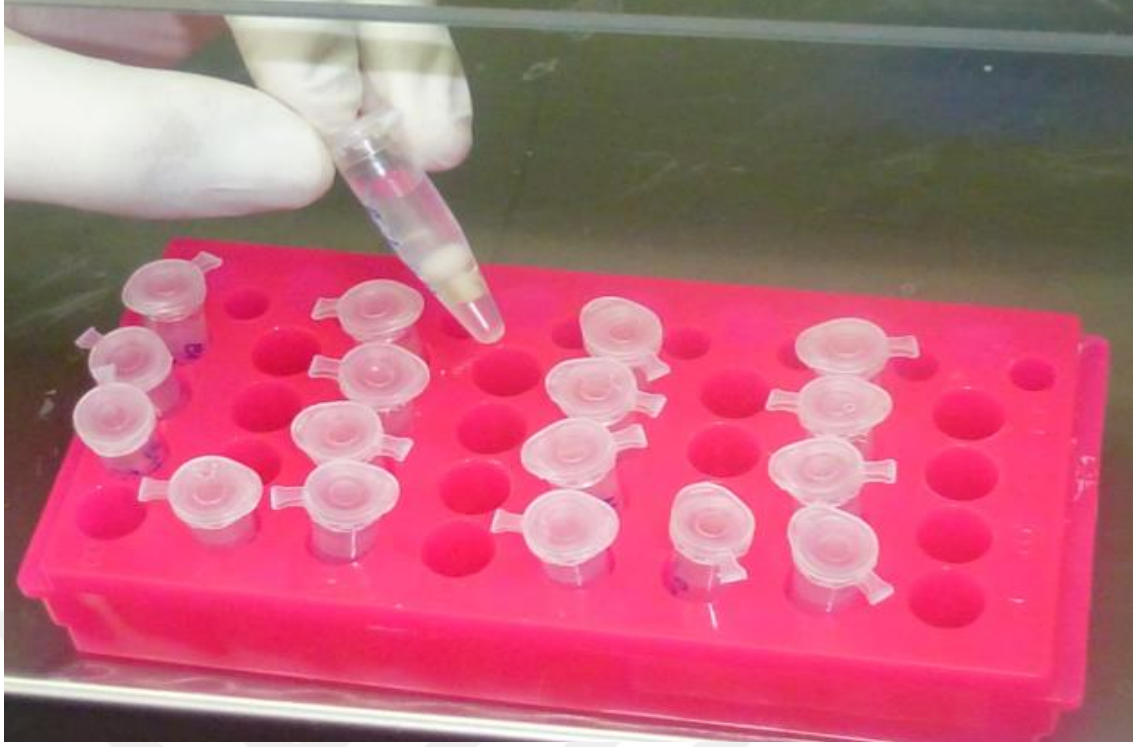
Toplam hücre sayısı/ml = Hemasitometre sayım sonucu x 10⁴ x Medyum miktarı(ml)

3.3.5. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

Hücreler %0.05'lik tripsin uygulaması ile tutundukları yüzeyden kaldırıldı. Kalktıkları gözlenen hücelere tripsinin etkisini bloke etmek için medyum eklendi ve süspansiyon santrifüj tüpünde toplanarak 800 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısım uzaklaştırıldı. Pellete tekrar medyum eklendi ve tripsinin etkisinden kurtarmak için tekrar santrifüj edildi. Bu işlem sonrasında pellete tekrar medyum ilave edildi ve pipetajla hüceler tek hücre süspansiyonu haline getirildi. Hemasitometrede hücre sayımı yapıldı. Hücreleri içeren falkon tüpü, %90 FBS ve %10 DMSO (dimetil sülfoksil) içeren medyumlu falkon tüpü buz içerisine oturtuldu. Kullanılacak soğuga dayanıklı saklama tüpleri (cryo tüp) de buza oturtularak soğumaları sağlandı. Tüp içerisindeki tek hücre süspansiyonundan DMSO'lu serumlu medyum içerisine alınan hüceler cryo tüpüne damla damla ilave edildi. Saklama tüpü 1 gece -20 °C'de, 1 gece de -70 °C'de bekletildikten sonra sıvı nitrojen buharına alındı. Tüm bu uygulamalar tüpteki son konsantrasyon 2.5×10^6 hücre/ml olacak şekilde yapıldı.



Şekil 3.7. İlaçların seri dilüsyonlarının laminer flow kabini altında yapılması.



Şekil 3.8. İlaçların değişik konsantrasyonlarının hazırlanması ve epandorflar içerisinde sıralanması.

3.4. xCELLigence sistemi

Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (XCELLigence sistemi) dört ana bileşenden oluşur: RTCA analizörü, RTCA DP istasyonu, entegre yazılım ile RTCA bilgisayar ve atılabilir E-plate 16' dır. (Şekil 3.9-12).

Analiz cihazı ve dizüstü bilgisayar dışarıda yer alırken, RTCA DP istasyonu, standart bir doku kültürü inkübatörü içerisinde yer almaktadır. XCELLigence sisteminin temeli E-plate16'dır. Yaygın olarak kullanılan 96 kuyucuklu platalere benzer bir uygulaması olan, RTCA DP cihazı üzerinde hücre bazlı deneyleri gerçekleştirmek için kullanılan, tek kullanımlık atılabilir bir alettir. Fakat E-plate 16, 96 kuyucuklu platalerden zemininde altın plakalar içermesi, her bir kuyucukta ayrı ayrı deney yapılabilmesi ve bunların sonuçlarının ayrı ayrı değerlendirilebilmesi özelliği ile çok farklıdır. E-plate 16 düşük buharlaşma sağlayan bir kapak tasarımına sahiptir. Her kuyucuğun taban çapı $5.0\text{mm} \pm 0.05\text{mm}$; toplam hacmi $210 \pm 5 \mu\text{L}$ 'dir. Her kuyucuğun zemin alanının yaklaşık %80'i dairesel elektrodlarla kaplıdır. Sensör elektrodların elektronik empedansları, elektrodlar üzerindeki hücrelerin fizyolojik değişikliklerini tespit etme ve izlemeye izin verecek şekilde ölçülür (Şekil 3.12). RTCA ölçümleri

boyunca elektrodla uygulanan voltaj 20mV (RMS) civarındadır. Herbir kuyucuk içinde elektrodla arasında ölçülen empedans, elektron geometrisine, kuyucuk içindeki iyon konsantrasyonuna ve hücrelerin elektrodla bağılı olup olmasına bağılıdır.

RTCA yazılımını kullanıcıların ortalama değer, maksimum ve minimum değerler, standart sapma (SD), maksimum etkinin yarısını yapan konsantrasyon (EC50), maksimum inhibisyonun yarı konsantrasyonu (IC50), hücre indeksi (CI) ve grafik gibi parametreler elde etmesini sağlar (131).



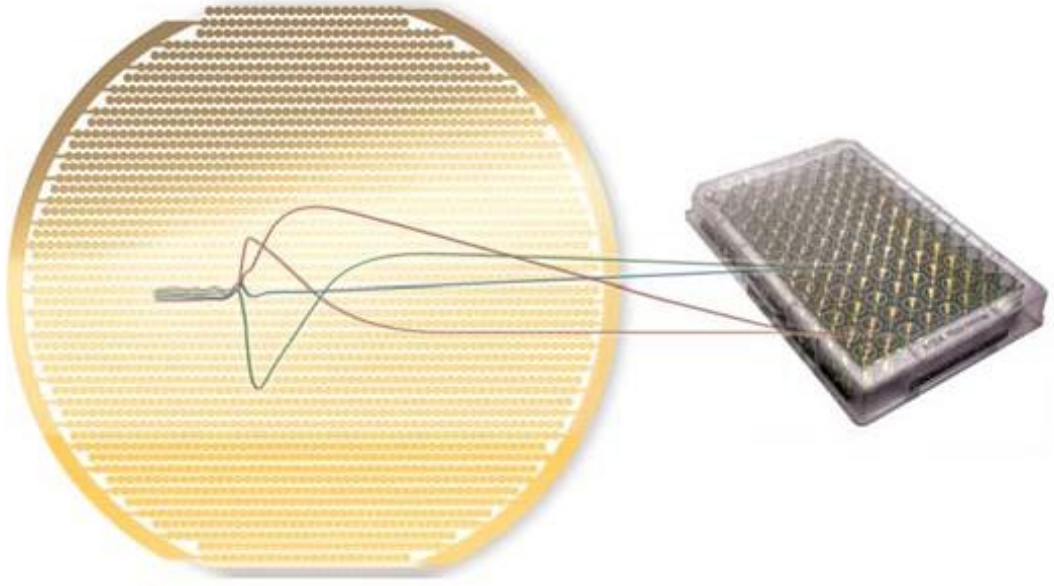
Şekil 3.9. RTCA DP istasyonu ve dizüstü bilgisayar



Şekil 3.10. RTCA Analiz cihazı



Şekil 3.11. RTCA DP istasyonu



Şekil 3.12. Kuyucuk tabanındaki altın plağın hücrelerin elektrik yük empedanslarını ölçmesi



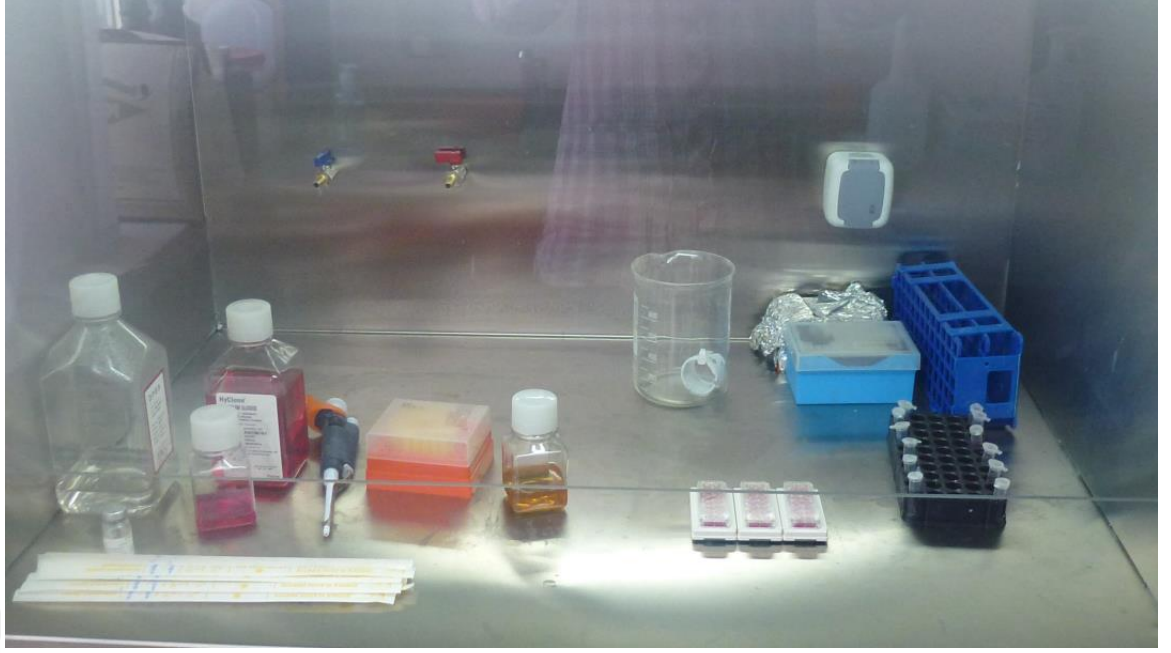
Şekil 3.13. E-plate 16

3.5. Hücre Proliferasyon Çalışması (Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi, Xcelligence Deneyi)

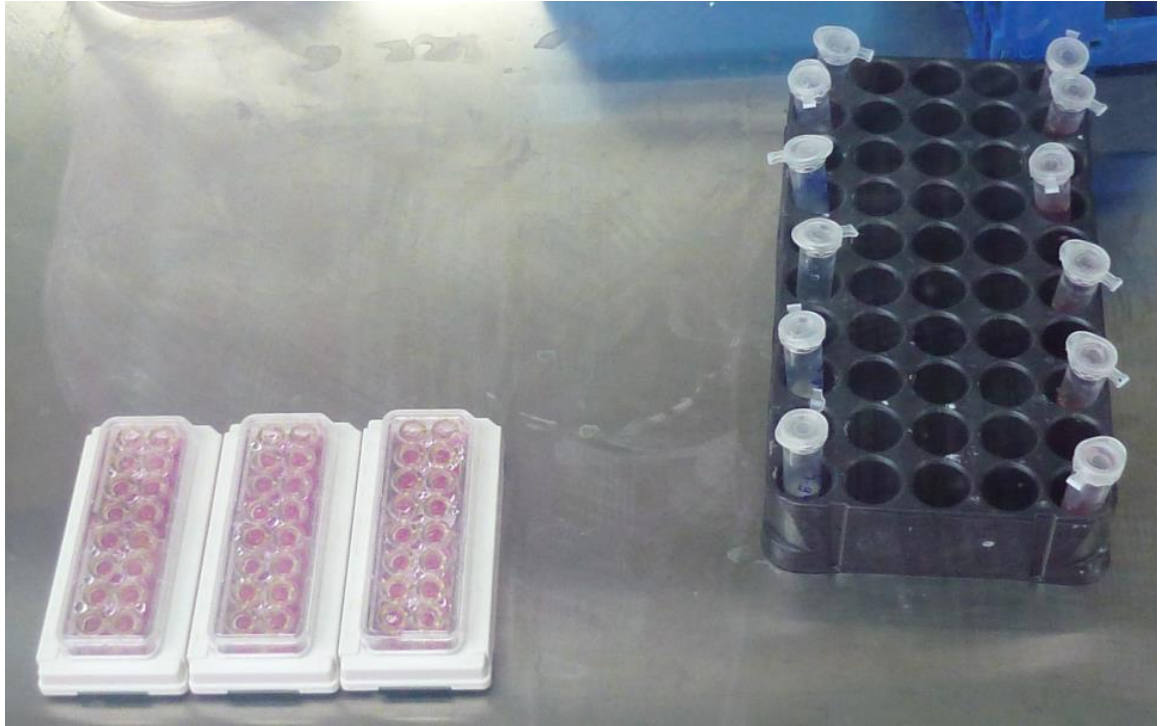
Çalışmamızda kullanılan sorafenib, lapatinib ve bevacizumabın in-vitro sitotoksik etkinlikleri, gerçek zamanlı hücre analiz sistemi ile değerlendirilmiştir. xCELLigence sistemi üretici firma talimatlarına göre kullanılmıştır (131).

Çalışmada E-plate 16 isimli, her bir kuyucuğu 250 µL hacminde, zemin çapı 5 mm olan ve 16 kuyucuktan oluşan plateler kullanıldı (Şekil 3.23). İlk olarak her bir kuyucuğa hücre içermeyen, 100 µL besiyeri karışımı konularak cihazda bir bazal okuma yaptırıldı. Ardından flasklardan tripsinizasyon ve santrifüj (800 RPM, 10 dakika) yoluyla toplanan hücreler kuyucuklara 100 µL hacim içerisinde ekilmiştir.

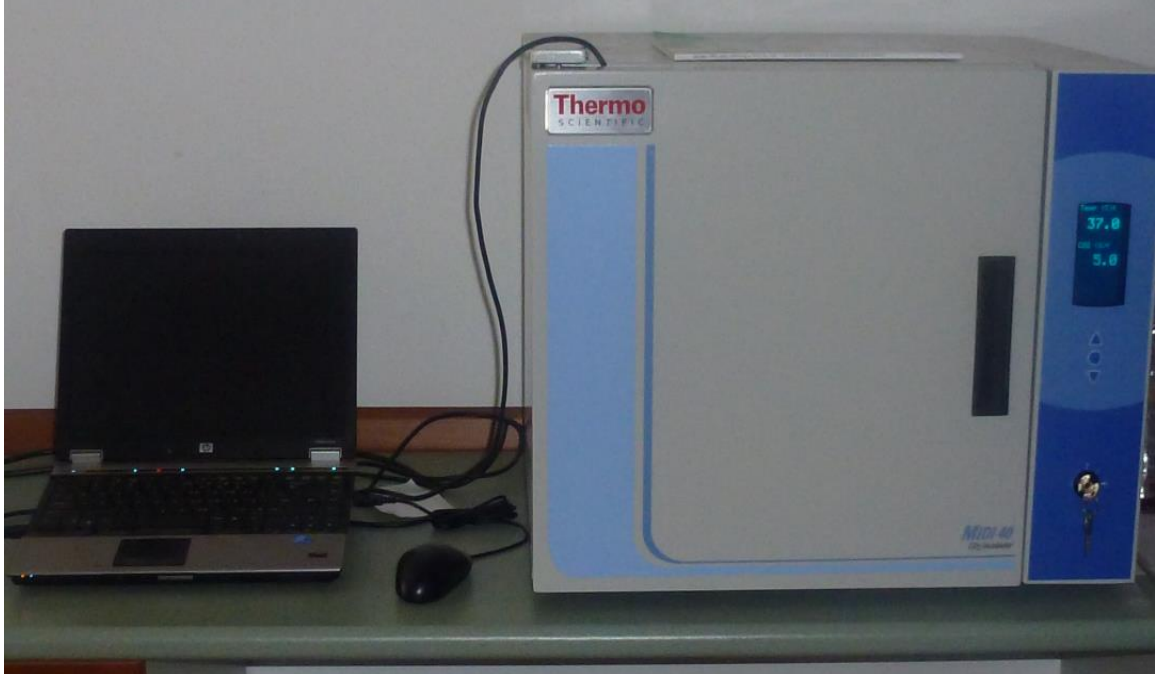
TT hücreleri laminer flow kabin içerisinde kuyucuklara ekildikten sonra plate inkübatörün içerisinde yerleştirilmiş ve 1'er saatlik zaman aralıkları ile hücre büyümeleri takip edilmiştir. Kuyucuklara ekilen tiroid kanseri hücreleri kuyucuk tabanına yapışmış ve burada uygun besin ve O₂/CO₂ ortamında büyümelerini sürdürmüşlerdir. Kuyucuk tabanına yerleştirilmiş olan altın plak elektrik akımını kullanarak bölünen hücrelerin elektrik yük empedanslarını ölçtü ve hücrelerin büyüme indekslerini tespit etmemizi sağlamıştır. Hücrelerin hızlı büyüme fazına girmelerinin ardından (Log fazı), deney grubu olarak belirlenen kuyucuklara sitotoksik etkinliği değerlendirilecek ajanlar 10 µL hacim içerisinde, değişen konsantrasyonlarda (1/1 ve 1/2 dilüsyonlarda) uygulanmıştır (Şekil 3.24-25). Aynı deney seti içerisinde ilaç içermeyen, sadece medium ve hücre içeren kontrol grubu ve ilaçları çözmek için kullanılan besi yeri mediumları da Sham grubu olarak ilave edilmiştir. Ayrıca hücre içermeyen negatif kontrol grubu da çalışmaya dahil edilmiştir. Bu uygulamayı takiben plate yeniden inkübatörün içerisinde yerleştirilmiştir. İlaç uygulamalarının ardından 1'er saatlik ölçümlere devam edilmiştir. Takip 72-96 saat boyunca devam ettirilmiştir. Xcelligence testi ile ilaçların hem tek başlarına hem de kombine olarak TT medüller tiroid kanseri üzerindeki sitotoksik etkileri zamana bağlı olarak araştırılmış bulgular ile her ilaca yada ilaç kombinasyonuna ait ortalama hücre proliferasyon yüzdeleri hesaplanarak elde edilen değerler istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.



Şekil 3.14. Steril kabin içerisinde ekstraksiyon solüsyonunun E-platelere uygulanması



Şekil 3.15 İlaçların E-platelere uygulanması



Şekil 3.16. xCELLigence sistemi bilgisayar ve inkübatörü

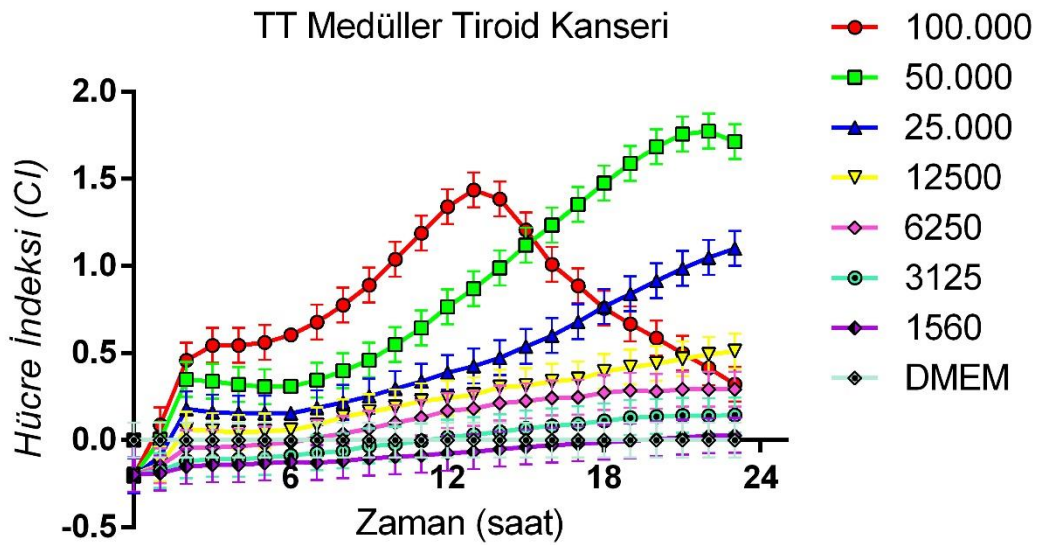
3.6. İstatistiksel Değerlendirme

Bu çalışmadan elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmesi SPSS 16.0 bilgisayar programı kullanılarak yapıldı. Tüm verilerin ortalaması ve standart hatası hesaplanarak veriler ortalama \pm ortalamanın standart hatası olarak sunuldu (mean \pm SEM). Gruplar arasındaki fark varyans analizini takiben (ANOVA testi), post hoc TUKEY testi ile araştırıldı. p değerinin 0,05'den küçük olması durumunda fark anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Antitümör Aktivite Değerlendirmesi

Ajanların sitotoksik etkilerini değerlendirmede kullanılacak başlangıç hücre sayısını belirlemek için hücreler çeşitli dilüsyonlarda hazırlanarak pilot çalışmalar yapıldı. Kuyucuklara, kuyucuk başına 100.000, 50.000, 25.000, 12.500, 6250, 3.125 ve 1560 hücre olacak şekilde hücreler ekilerek büyüme paternleri değerlendirildi (Şekil 4.1). Hücrelerin konsantrasyona bağımlı şekilde bir proliferasyon gösterdikleri tespit edildi. Hücrelerin büyüme profilleri değerlendirildiği zaman kuyucuk başına 50.000 hücrenin çalışmanın devamından kullanılmak için en uygun sayı olduğuna karar verildi.

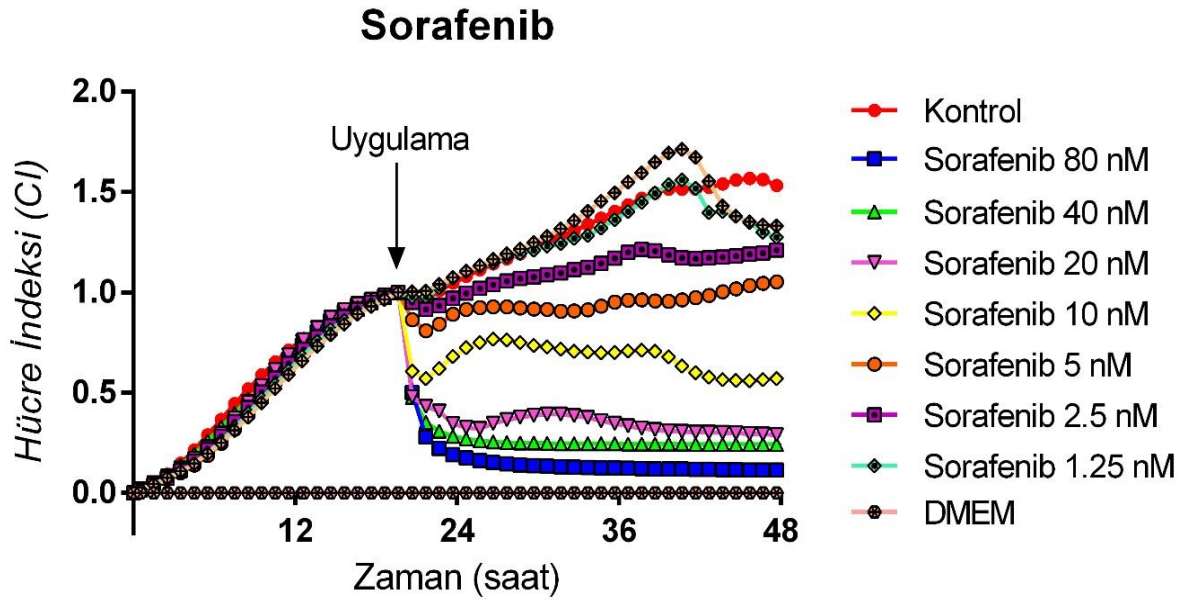


Şekil 4.1. TT hücrelerinin zamana bağlı büyüme paternleri.

4.2. Tek Başına Sorafenib Uygulaması

Tirozin kinaz inhibitörü olan sorafenibin TT medüller tiroid kanseri hücreleri üzerine olan antitümöral etkinliğini değerlendirmek için sorafenibin Sorafenibin tek başına uygulanmasının 80, 40, 20, 10, 5, 2.5 ve 1.25 nM konsantrasyonlarının hücre proliferasyonu üzerine olan etkileri gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (Xcelligence Sistem) ile değerlendirildi. Hücreler 24. saate kadar proliferasyonlarına devam ettiler ve hücre indeksi 1'e kadar yükseldi. Yirmidördüncü saatteki ilaç uygulamalarından sonra sorafenibin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi 48. saate kadar saatlik ölçümler ile takip edildi. NVP-BEZ 235'in 80, 40 ve 20 nM konsantrasyonları TT

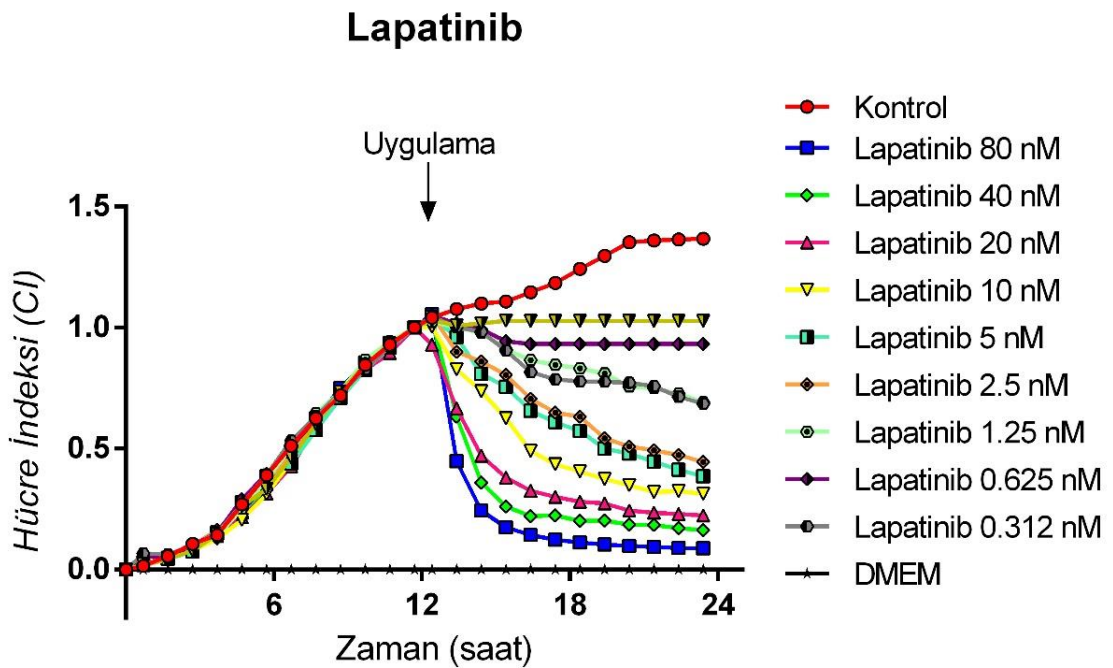
hücrelerini tamamen öldürerek hücre indeksini 0.1'e kadar düşürürken, 10 nM konsantrasyonu ancak %50'lik kısmi bir hücre ölümü meydana getirdi. Diğer konsantrasyonların ise TT hücreleri üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı ve eğrilerinin kontrol grubu eğrisi ile paralel seyrettiği gözlemlendi (Şekil 4.2). Sorafenib için inhibitör konsantrasyon 50 değeri (IC_{50}) 10.2×10^{-9} M olarak hesaplanırken, eğri fit değeri ise Square R=0.999 olarak hesaplandı (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Sorafenibin tek başına uygulanmasının 80, 40, 20, 10, 5, 2.5 ve 1.25 nM konsantrasyonlarının TT medüller tiroid kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine olan etkilerinin zamana bağlı değişimi.

4.3. Tek Başına Lapatinib Uygulaması

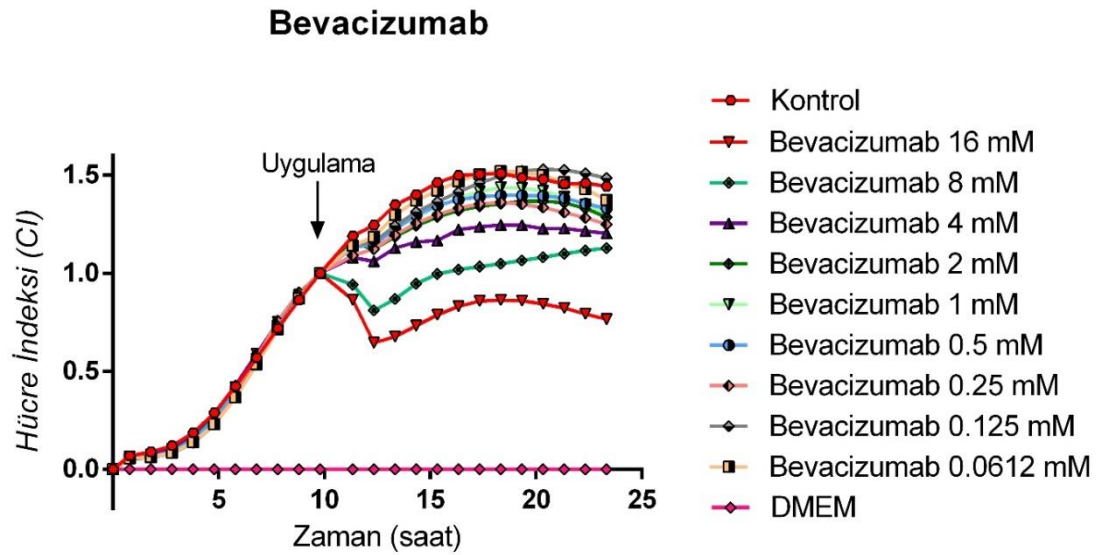
Tirozin kinaz inhibitörü olan Lapatinibin TT tiroid kanseri hücreleri üzerine olan antitümöral etkinliğini değerlendirmek için lapatinibin 80, 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 ve 0.312 nM konsantrasyonlarının hücre proliferasyonu üzerine olan etkileri gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (Xcelligence Sistem) ile değerlendirildi. Hücreler 12. saate kadar proliferasyonlarına devam ettiler ve hücre indeksi 1'e kadar yükseldi. Onikinci saatteki ilaç uygulamalarından sonra hücreler 24. saate kadar, saatlik ölçümler ile takip edildi. Lapatinibin konsantrasyona ve zamana bağımlı güçlü bir sitotoksik etki gösterdiği tespit edildi. API-1'in 80, 40, 20 nM konsantrasyonları TT hücrelerini tamamen öldürür ve hücre indeksini 0.1'e kadar düşürürken, en düşük konsantrasyon olan 0.312 nM'ın dahi kontrol ile kıyaslandığı zaman istatistiksel olarak anlamlı şekilde güçlü bir sitotoksik etki meydana getirdiği görüldü. Arada kalan diğer konsantrasyonların ise homojen olarak dağıldığı gözlemlendi. (Şekil 4.3). Lapatinib için inhibitör konsantrasyon 50 değeri (IC_{50}) 1.2×10^{-9} M olarak hesaplanırken, eğri fit değeri ise Square R=0.927 olarak hesaplandı (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Lapatinibin 80, 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 ve 0.312 nM konsantrasyonlarının TT tiroid kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine olan etkilerinin zamana bağlı değişimi.

4.4. Tek Başına Bevacizumab Uygulaması

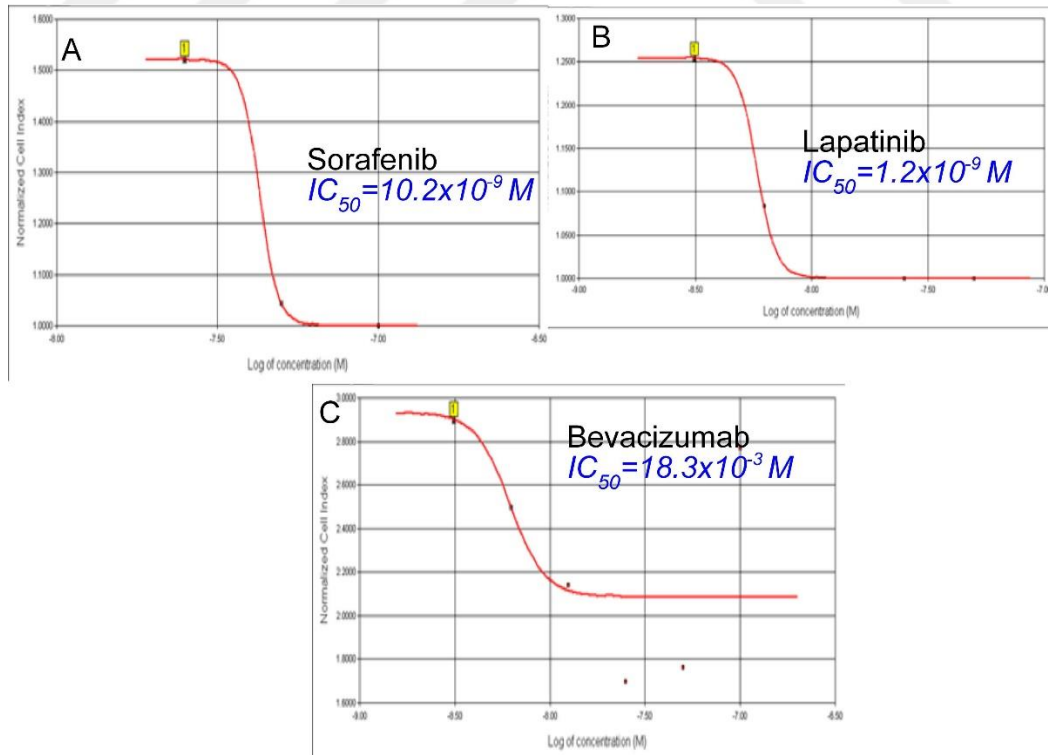
Spesifik bir VEGF antikoru olan bevacizumab'ın TT tiroid kanseri hücreleri üzerine olan antitümöral etkinliğini değerlendirmek için bevacizumab'ın 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 ve 0.0612 mM konsantrasyonlarının hücre proliferasyonu üzerine olan etkileri gerçek zamanlı hücre analiz sistemi (Xcelligence Sistem) ile değerlendirildi. Bevacizumab'ın medüller tiroid kanseri hücreleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir sitotoksik etki meydana getirmediği gözlemlendi ($p>0.05$). Sadece oldukça yüksek bir konsantrasyon olan 16 mM konsantrasyonun hücrelerin % 47.5'lik bir kısmını öldürebildiği, bu etkinin de hemen katışıt bir etki ile (rebound proliferatif etki) dengelenmeye çalışıldığı gözlemlendi. Bununla paralel olarak 8 mM bevacizumab konsantrasyonunun da kısmi bir sitotoksik etki meydana getirdiği fakat bu etkinin çok zayıf olmasından dolayı, refleks transkripsiyon faktörü aktivasyonuna bağlı olarak hücrelerin proliferasyon hızlarında meydana gelen artışla bu sitotoksik etkinin dengelendiği gözlemlendi. Diğer konsantrasyonların ise hiç bir sitotoksik etkinliklerinin olmadığı ve proliferasyon eğrilerinin kontrol grubu hücreleri ile paralellik seyrettiği gözlemlendi. PP242 için inhibitör konsantrasyon 50 değeri (IC_{50}) 18.3×10^{-3} olarak hesaplanırken, eğri fit değeri ise Square $R=0.914$ olarak hesaplandı (Şekil 4.4).



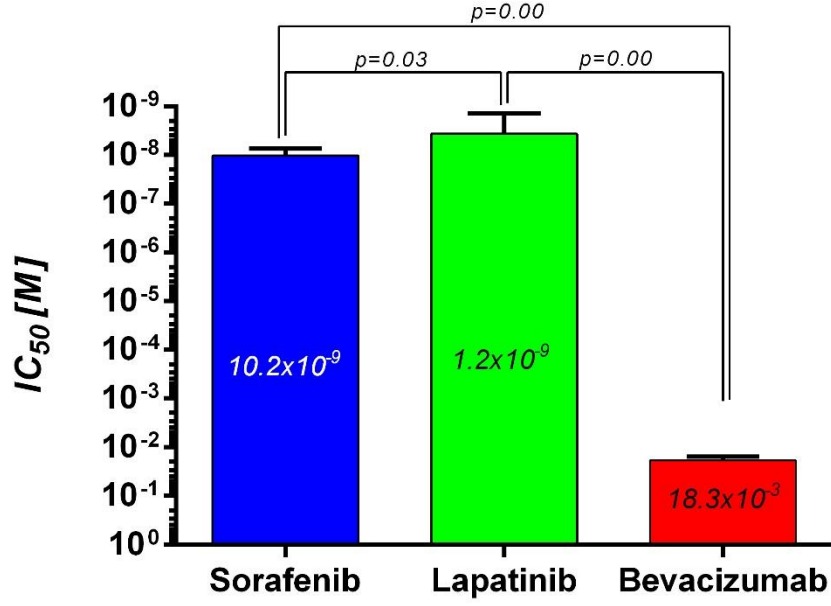
Şekil 4.4. Bevacizumab'ın 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 ve 0.0612 mM konsantrasyonlarının TT tiroid kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine olan etkilerinin zamana bağlı değişimi.

4.5. Ajanların Sitotoksik Etkilerinin Karşılaştırılması

Çalışmamızda kullanılan ajanların tek başına uygulamalarının TT medüller tiroid kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri inhibitör konsantrasyon 50 (IC_{50}) değerleri kullanılarak karşılaştırıldı. En güçlü sitotoksik etkiye tirozin kinaz inhibitörü lapatinibin sahip olduğu (**Şekil 4.5 B**), en düşük sitotoksik etkiye ise monoklonal VEGF antikorunu olan bevacizumab'ın sahip olduğu görülmüştür (**Şekil 4.5 C**). Sorafenib'in IC_{50} değerleri lapatinibten daha yüksek olduğu ve aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p=0.000$) (Şekil 4.6 ve 4.7). Ajanların IC_{50} değerlerine göre sıralınışı Lapatinib<Sorafenib<Bevacizumab şeklindedir (**Şekil 4.6**). IC_{50} değeri daha düşük olan ajanın gravimetrik etki gücünün daha yüksek olduğu düşünülecek olursa medüller tiroid kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etki güçleri bakımından ajanların sıralaması Lapatinib>Sorafenib>Bevacizumab şeklindedir. Kombine uygulamaların sitotoksik etkilerine ait IC_{50} değeri hesaplamak ve dolayısıyla kombinasyon uygulamalarının etki güçlerini birbirleri ile kıyaslamak mümkün olmamasına rağmen, Lapatinib+Bevacizumab kombinasyonunun, Sorafenib+Bevacizumab kombinasyonundan daha güçlü bir sitotoksik etkiye sahip olduğu görülmektedir.



Şekil 4.5. Sorafenib, lapatinib ve bevacizumab'ın IC_{50} değerlerinin hesaplanması.



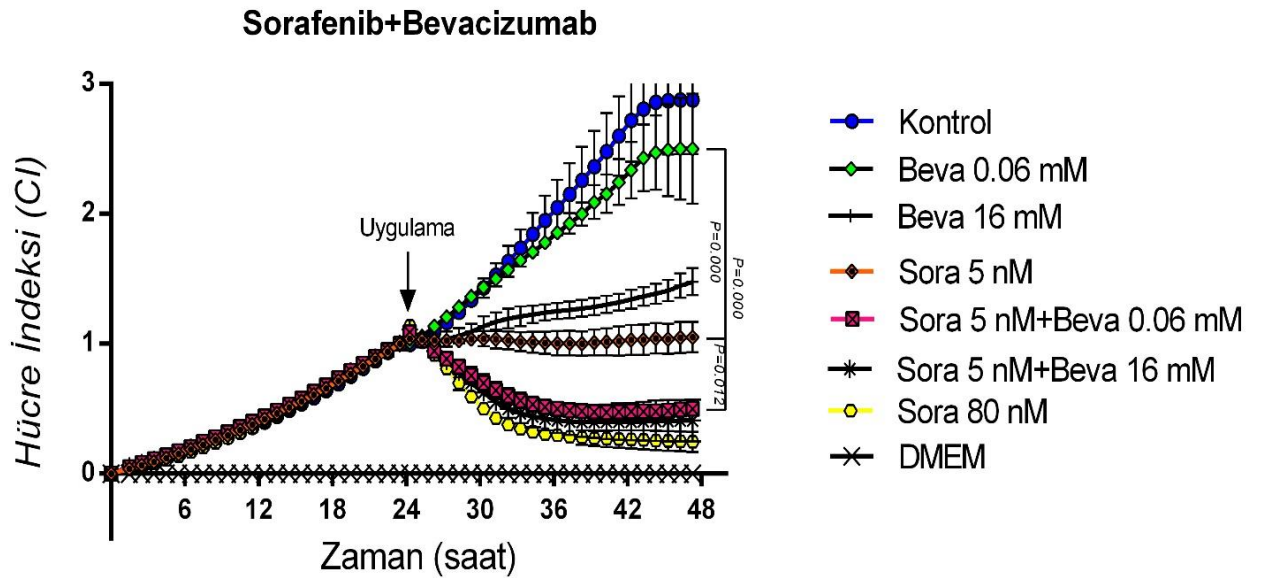
Şekil 4.6. Sorafenib, lapatinib ve bevacizumab'ın IC₅₀ değerlerinin karşılaştırılması.

4.6. Kombinasyon Çalışmaları

Sorafenib+Bevacizumab Kombinasyonu:

Tek başlarına TT medüller tiroid kanseri hücre proliferasyonu üzerinde antitümöral etkinlikleri olduğu tespit edilen sorafenib ve bevacizumab ajanlarının kombine uygulamalarının sitotoksik etki gücünü tespit etmek amacıyla, sorafenibin kısmi etkinlik gösterdiği konsantrasyon ile (5 nM), bevacizumab'ın kısmi etkinlik gösterdiği konsantrasyon (16 mM) kombine olarak uygulandı. Ayrıca sorafenib ile bevacizumab arasında aditif bir ilaç etkileşmesi olup olmadığının tespit edilebilmesi için sorafenibin kısmi etkinlik gösterdiği konsantrasyon ile (5 nM), bevacizumab'ın etkinlik göstermediği konsantrasyon (0.06 mM) da kombine olarak uygulanarak TT medüller tiroid kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinlik değerlendirildi. Sorafenib ve bevacizumab'ın kısmi sitotoksik etkinlik gösteren konsantrasyonları (5 nM ve 16 mM) kombine olarak uygulandıkları zaman kombinasyonun göstermiş olduğu sitotoksik etki ajanların tek başına göstermiş oldukları sitotoksik etkinlik ile kıyaslandığı zaman istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha güçlü olduğu gözlemlendi.

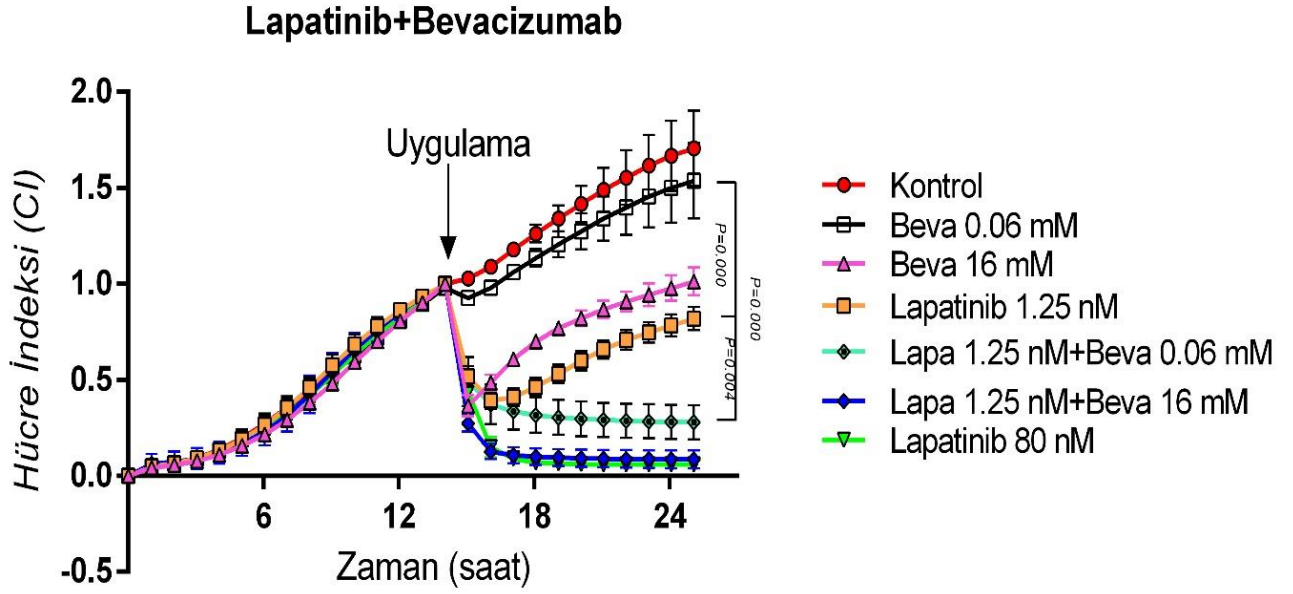
(sırası ile $p=0.012$ ve $p=0.09$). Bu sonuç ajanların birlikte uygulamalarının birbirinin sitotoksik etkinliğini anlamlı şekilde artırdığını göstermektedir. Bu kombinasyonun sitotoksik etki gücü ile tek başına 80 nM sorafenib uygulamasının meydana getirdiği sitotoksik etki arasında istatistiksel olarak bir fark bulunamadı ($p=0.874$). Daha da ilginç olarak sorafenibin kısmi sitotoksik etkinlik gösteren konsantrasyon ile (5 nM), bevacizumab hiç bir sitotoksik etkinlik göstermediği konsantrasyon (0.06 mM) kombine edildiği zaman kombinasyonun sitotoksik etkisinin ajanların her birinin tek başına uygulandığı konsantrasyonlara göre (5 nM ve 0.06 mM) istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha güçlü bir sitotoksik etkinlik gösterdiği görüldü (sırasıyla $p=0.000$ ve $p=0.012$). Bu kombinasyonun sitotoksik etki gücü ile sorafenib 80 nM tek başına uygulaması ve Sorafenib 5 nM+bevacizumab 16 mM kombine uygulamasının sitotoksik etki gücü arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi (sırasıyla $p=0.932$ ve $p=0.896$). Bu durum bevacizumab'ın kendisinin etkisiz olduğu bir konsantrasyonda sorafenibin kısmi sitotoksik etkinlik gösteren konsantrasyonunun etkisini aditif olarak artırarak 16 kat daha güçlü bir etki göstermesine katkıda bulunduğunu ortaya koymaktadır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Sorafenibin 80 ve 5 nM, bevacizumab'ın 16 ve 0.06 mM konsantrasyonlarının tek başlarına ve kombine uygulamalarının TT medüller tiroid kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine olan etkilerinin zamana bağlı değişimi.

Lapatinib+Bevacizumab Kombinasyonu:

Tek başlarına TT medüller tiroid kanseri hücre proliferasyonu üzerinde antitümöral etkinlikleri olduğu tespit edilen lapatinib ve bevacizumab ajanlarının kombine uygulamalarının sitotoksik etki gücünü tespit etmek amacıyla, lapatinibin kısmi etkinlik gösterdiği konsantrasyon ile (1.25 nM), bevacizumab'ın kısmi etkinlik gösterdiği konsantrasyon (16 mM) kombine olarak uygulandı. Ayrıca lapatinib ile bevacizumab arasında aditif bir ilaç etkileşmesi olup olmadığının tespit edilebilmesi için lapatinibin kısmi etkinlik gösterdiği konsantrasyon ile (1.25 nM), bevacizumab'ın etkinlik göstermediği konsantrasyon (0.06 mM) da kombine olarak uygulanarak TT medüller tiroid kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinlik değerlendirildi. Lapatinib ve bevacizumab'ın kısmi sitotoksik etkinlik gösteren konsantrasyonları (1.25 nM ve 16 mM) kombine olarak uygulandıkları zaman kombinasyonun göstermiş olduğu sitotoksik etki ajanların tek başına göstermiş oldukları sitotoksik etkinlik ile kıyaslandığı zaman istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha güçlü olduğu gözlemlendi (sırası ile $p=0.008$ ve $p=0.05$). Bu sonuç ajanların birlikte uygulamalarının birbirinin sitotoksik etkinliğini anlamlı şekilde artırdığını göstermektedir. Bu kombinasyonun sitotoksik etki gücü ile tek başına 80 nM lapatinib uygulamasının meydana getirdiği sitotoksik etki arasında istatistiksel olarak bir fark bulunamadı ($p=0.914$). Daha da ilginç olarak lapatinibin kısmi sitotoksik etkinlik gösteren konsantrasyon ile (1.25 nM), bevacizumab hiç bir sitotoksik etkinlik göstermediği konsantrasyon (0.06 mM) kombine edildiği zaman kombinasyonun sitotoksik etkisinin ajanların her birinin tek başına uygulandığı konsantrasyonlara göre (1.25 nM ve 0.06 mM) istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha güçlü bir sitotoksik etkinlik gösterdiği görüldü (sırasıyla $p=0.000$ ve $p=0.004$). Bu kombinasyonun sitotoksik etki gücü ile lapatinibin 80 nM tek başına uygulaması ve Lapa 1.25 nM+beva 16 mM kombine uygulamasının sitotoksik etki gücü arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi (sırasıyla $p=0.946$ ve $p=0.996$). Bu durum bevacizumab'ın kendisinin etkisiz olduğu bir konsantrasyonda lapatinibin kısmi sitotoksik etkinlik gösteren konsantrasyonunun etkisini aditif olarak artırarak 64 kat daha güçlü bir etki göstermesine katkıda bulunduğunu ortaya koymaktadır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Lapatinibin 80 ve 1.25 nM, bevacizumab'ın 16 ve 0.06 mM konsantrasyonlarının tek başlarına ve kombine uygulamalarının TT medüller tiroid kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerine olan etkilerinin zamana bağlı değişimi

5. TARTIŞMA

Medüller tiroid kanserleri (MTK) tüm tiroid kanserlerinin sadece % 5-10'unu oluşturan nadir bir endokrin tümör ailesidir (132). MTK nöral krestten köken alan parafolüküler C hücrelerinden kaynaklanmaktadır. Hastalık, sıklıkla yükselmiş kalsitonin seviyelerinin eşlik ettiği C hücre hiperplazisi ile başlar, önce mikroskopik invaziv karsinoma daha sonra da belirgin karsinoma olarak süreç devam eder (133). Diğer endokrin tümörlerde olduğu gibi MTK birçok madde salgılayabilir. Bunlar arasında kalsitonin, karsinoembriyonik antijen, serotonin ve kromogranin A vardır. Hastalığın diyare gibi birçok semptomundan bu maddeler sorumludur. Bu bağlamda kalsitonin seviyeleri tanının doğrulanması, tedavi etkinliğinin saptanması ve hastalığın gelişiminin gözlenmesi ve rekürrenslerin tespiti için kullanılabilir (134-136).

MTK hastaların %60 ila 75'inde sporadik olarak gelişir (134, 137) yada multipl endokrin neoplazilerin (MEN) tip 2A ve 2B'si ve ailesel MTK'larda da görülen RET protoonkogen germline mutasyonu sonucu meydana gelebilir. MTK sıklıkla yavaş seyirli olarak gelişir ve 15 yıllık sağkalımı yaklaşık %85 civarındadır. Fakat lokal lenf nodlarına yayılmaya meyilli olması cerrahi ile tam kürü zorlaştırmaktadır (138). Total tiroidektomi ve lenfadenektomi hastaların sadece %40'ında biyokimyasal kür (kalsitonin ve CEA seviyelerinin normale dönmesi) sağlayabilmektedir (138, 139). Biyokimyasal kür sağlansa bile hastaların yaklaşık olarak %9'unda hastalarda nüks görülmektedir (139). Sporadik MTK olan hastalarda hastalığın histolojik olarak onaylanmasından sonra total tiroidektomi ve santral boyun diseksiyonu yapılmaktadır. RET mutasyonu olduğu bilinen hastalara çocukluk döneminde profilaktik olarak total tiroidektomi ve lenfadenektomi önerilmektedir (140). Cerrahi kür sağlamadaki başarısızlıktan dolayı uzun dönem yüksek sağ kalım sağlayabilmek için operasyon sonrası medikal tedavi uygulamalarının başarısı kritiktir. Hastalığın rölatif olarak nadir görülen bir hastalık olmasından dolayı klinik araştırma dizayn etmek oldukça zordur. Bu yüzden elimizdeki bilgiler küçük prospektif çalışmalar ve retrospektif raporlara dayanmaktadır.

İlerlemiş MTK hastalarında cerrahi dışı tedavi alternatifleri oldukça sınırlıdır. Bunlar kısaca özetlenecek olursa bunlardan ilki somatostatin analoglarıdır. Oktreotit ve lanreotit gibi SSTR2 ve SSTR5 reseptörleri için oldukça seçici somatostatin analogları MTK tedavisinde denenmiş ve malesef sağkalım üzerinde herhangi bir

etkilerinin olmadığı görülmüştür. Sağ kalım oranlarında iyileşme meydana getirememelerine rağmen hastalığın flushing ve diare gibi komplikasyonlarını anlamlı şekilde azalttıkları görülmüştür (141). Somatostatin reseptörlerinin MTK hastalarının sadece %40'ında pozitif bulunduğu düşünülecek olursa bu ilaçların reseptör pozitifliği olduğu bilinen ya da diyare tedavisinin diğer ilaçlar ile sağlanamadığı durumlarda kullanılması önerilmektedir (142).

Radyofrekans ablasyon (RFA) MTK tedavisinde kullanılabilir alternatif tedavi seçeneklerinden birisidir. RFA lokal tümör varlığında ya da ciddi diyarenin eşlik ettiği tümör vakalarında tümörü küçültmek amacı ile kullanılabilir. RFA karaciğer metastazı varlığında diferansiye tiroid tümörlerinin tedavisinde ve bunun yanında metastatik MTK vakalarında kullanılabilir (143).

Radyoterapi yine MTK tedavisinde bazı özel durumlarda kullanılabilen bir tedavi alternatifidir. Radyoterapinin lokal tümör kontrolündeki etkinliği oldukça zayıftır. Fakat tam başarılı olmamış, boyun bölgesinde rezidü tümör bulunan vakalarda ve ekstamural lokal yayımlı tümör varlığında başarılı bulunmuştur (144). Cerrahi olarak ulaşılamayan uzak organ metastazlarında, örneğin ağırlı kemik metastazlarında yada paraplejiye neden olabilen medulla spinalis metastazları varlığında radyoterapiye başvurulabilir. Ayrıca cerrahi takiben adjuvan bir tedavi olarak da kullanılabilir (145).

Günümüzde MTK için hala standart olarak kabul edilebilecek bir kemoterapi rejimi bulunmamaktadır. Fakat MTK tedavisinde kemoterapötik olarak en sık kullanılan ajan ya tek başına doksorubisin yada doksorubisin-sisplatin kombinasyonudur. Bu ilaçlara yanıt ancak parsiyeldir ve hastaların yaklaşık olarak %22'sinde yanıt alınabilmektedir. Doksorubisinin 5-florourasil, dakarbazin, streptozosin, siklofosamid ve vinkristin gibi birçok değişik ilaç ile kombinasyonları da denenmiştir (146). Fakat bu kombinasyonlarından hiç biri yaygın olarak kullanılacak kadar etkili bulunmamıştır.

Cerrahi, somatostatin analogları, radyofrekans ile ablasyon, radyoterapi ve konvansiyonel kemoterapötikler gibi birçok değişik yaklaşım denenmiş olmasına rağmen başarı oranlarının çok düşük olması MTK'yı nadir görülmesine rağmen oldukça önemli bir sağlık sorunu haline getirmiştir. Fakat tirozin kinaz inhibitörlerinin keşfi ve klinik kullanıma girmesi MTK medikal tedavisinde bir

devrim yaratmıştır. (142, 145). Tirozin kinaz inhibitörlerinin MTK tedavisindeki yerini anlamak için tirozin kinaz aktivitesi olan reseptörlerin post reseptör yollarını ve PI3K/Akt/mTOR yolağının hem karsinogenez hem de MTK patogenizindeki rolünü iyi anlamak gerekmektedir.

mTOR hücre proliferasyonu, apoptozis, hücre döngüsü, anjiogenez, metabolizma ve protein sentezi gibi hem fizyolojik süreçlerde hem de onkogeneze çok önemli biyolojik fonksiyonların düzenlenmesinden sorumlu bir proteindir (147). mTOR sinyali vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), insülin benzeri büyüme faktörü (ILGF), fibroblast büyüme faktörü-3 (FGF-3), platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) gibi büyüme faktörleri, aminoasitler ve hipoksi gibi değişik faktörlerle aktive edilir (148, 149). mTOR fonksiyonlarını kontrol eden ana sinyal yolağı PI3K/Akt sinyalidir. PI3K/Akt sinyal yolağı birçok değişik tirozin kinaz reseptörü (RTK) tarafından tetiklenebilir. Spesifik büyüme faktörleri tarafından bu tirozin kinaz reseptörlerinin aktive olması fosfoinozitol 4,5-bifosfatları (PIP₂) fosforile ederek, fosfoinozitol 3,4,5-trifosfatlara (PIP₃) çevirmektedir. PIP₃ AKT'yi ve nihayetinde o da mTOR protein kompleksini aktive etmektedir. Aktive olan mTOR protein kompleksi de yukarıda belirtilen hücre proliferasyonu, apoptozis, hücre döngüsü, anjiogenez, metabolizma ve protein sentezi gibi fonksiyonları yerine getirmektedir (150). mTOR-1 kompleksi 4E-binding proteinini (4EBP1) ve S6 kinaz proteinini (S6K1), fosforile etmektedir. Bu her iki protein de hücre döngüsünün ilerlemesi, hücre farklılaşması, hücre ölümü, anjiogenez ve hücre migrasyonu gibi birçok kritik biyolojik faaliyetin kontrolünden sorumludur (151, 152). Yukarıda ayrıntılı şekilde belirtildiği üzere PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağı hücre proliferasyonu, hücre ölümü ve anjiogenez gibi fonksiyonları kontrol etmektedir. Bu biyolojik fonksiyonların ortak özelliği aynı zamanda onkogenin de önemli birer parçaları olmalıdır. Bu yüzden PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağının uygunsuz şekilde aktive olması kanser ile sonuçlanmaktadır (153, 154). Bu noktada en önemli soru PI3K/Akt/mTOR yolağının medüller tiroid kanserinde aktif olup olmadığıdır.

MTK'nın birçok formunda RET protoonkongeninde mutasyon varlığı gösterilmiştir (155). Bu genin germline mutasyonları familial MTK'ların yaklaşık %88-99'in pozitif bulunurken (155), somatik mutasyonları sporadik MTK'ların % 23-70'inde pozitif bulunmuştur (156). RET protoonkongeni C hücrelerini de içeren tüm nöral krest hücrelerinde eksprese olan özel bir tirozin kinaz reseptörü kodlamaktadır (157).

Bu reseptörün aktive olması, RAS/RAF/MEK/ERK ve PI3K/Akt/mTOR sinyal yolları üzerinden, C hücrelerinin büyümesi, hayatta kalması, farklılaşması ve migrasyonu gibi birçok hayati fonksiyonu kontrol etmektedir (155, 156). Segouffin-Cariou (158) RET geninin MEN2A mutant formunu eksprese eden fibroblast hücrelerinde PI3K ve Akt yollarının sürekli olarak aktive kaldıklarını göstermişlerdir. Drosten ve ark. yaptıkları çalışmada (159) bizim çalışmamızda kullandığımız TT MTK hücrelerinin içerisine özel olarak tasarlanmış bir adenovirüs vektörü sokmuşlardır. Bu vektör ile RET geninin onkogenik olmayan bir varyantı ile hücreleri transfekte etmişlerdir. Bunun anlamı artık RET geninin onkogenik fonksiyon gösterememesidir. Bu hücrelerdeki sinyal yollarını inceledikleri zaman Akt aktivitesinin güçlü bir şekilde baskılandığını ve hem hücre proliferasyonunda hem de hücre sağkalımında anlamlı bir azalma meydana geldiğini tespit etmişlerdir. Tamburrino ve ark. (160) mTOR yolağının MTK tümörögenезinin primer fazlarında rol oynadığını rapor etmişlerdir. Bu yolağın erken fazdaki C hücre transformasyonundaki önemini göstermekle kalmayıp aynı zamanda mTOR aktivasyonu olan vakalarda daha yüksek lenf nodu metastazı olduğunu da göstermişlerdir. Bu da mTOR yolağının primer MTK'da sadece progresyonu artıran bir durum değil aynı zamanda başlatıcı faktörlerden biri olduğunu da göstermektedir. Aberant RET aktivasyonu PI3K/Akt/mTOR yolağının aşırı aktivasyonundan sorumlu olan tek faktör değilmiş gibi görünmektedir. Çünkü MTK vakalarının yaklaşık %96-100'ünde PI3K/Akt/mTOR yolağının aktive olduğu rapor edilirken (154, 160), özellikle sporadik MTK'larda RET mutasyonlarının aktivasyon oranı bundan oldukça düşüktür. Bu durum MTK'larda PI3K/Akt/mTOR yolağını aktive eden başka faktörlerin de olduğunu göstermektedir (161). Aktive eden faktör ne olursa olsun PI3K/Akt/mTOR yolağının MTK'daki rolü açıktır ve elimizdeki bilgiler bu yolağın hedeflenmesinin MTK tedavisinde en uygun yaklaşım olduğunu göstermektedir.

Biz de çalışmamızda tirozin kinaz inhibitörlerinden sorafenib and lapatinibin MTK tedavisindeki etkinliklerini değerlendirdik. Sorafenib Raf, VEGFR-2, VEGFR-3, platelet kaynaklı büyüme faktörü reseptörü ve Ret kinazlara karşı oldukça güçlü bir aktiviteye sahip potent bir multi kinaz inhibitörüdür (162). Sorafenib halihazırda Amedikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından renal hücreli karsinom ve hepatoselüler karsinom için onay almış bir ilaçtır. Metastatik, radyoaktif iyot tedavisine yanıt

vermeyen diferansiye tiroid kanseri tedavisinde etkin olduğunu gösteren çalışmalar olmasına rağmen henüz bu endikasyon için onay almamıştır. Faz II çalışmaları devam etmektedir (163, 164). Castroneves LA. ve ark. 2016 yılının Şubat ayında sorafenibin metastatik MTK hastalarındaki etkinliği ve güvenilirliği ile ilgili yayınladıkları ve bir çalışmada (165); ilacın hastalar tarafından oldukça iyi tolere edildiği, hastalığın uzun dönem kontrolü ve klinik fayda sağlama konusunda hastaların %75'inde olumlu sonuç alındığını ifade etmişler, vandetanib ve cabozantinib verilmesinin mümkün olmadığı yada bu ilaçlar ile başarılı tedavi sağlanamadığı durumlarda sorafenibin uygun bir alternatif seçenek olduğunu belirtmişlerdir. Türk popülasyonu üzerinde 2014 yılında yapılan bir çalışmada (166), çalışmaya 14 papiller, 10 foliküler ve 16 medüller tiroid kanseri hastası dahil edilmiş ve sorafenibin klinik etkinliği değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda araştırmacıları tiroid kanserlerinde iyi tolere edilen ve yüksek etkinlik gösteren bir ajan olduğunu ifade etmişlerdir. Klinik çalışmaların yanında sorafenibin MTK üzerindeki etkisinin bizim çalışmamızda olduğu gibi *in-vitro* olarak değerlendirildiği çalışmalar da mevcuttur. Lin CI. ve ark. (167) otofajik aktivasyonun sorafenibin medüller tiroid kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik etkisini artırıp artırmadığını göstermek amacı ile yaptıkları çalışmada, bizim çalışmamıza benzer şekilde TT medüller tiroid kanseri hücre hattını kullanmışlardır. Bizim çalışmamıza paralel şekilde onlar da sorafenibin TT hücreleri üzerinde konsantrasyona bağımlı şekilde güçlü bir sitotoksik etkinlik gösterdiğini bulmuşlardır. Sitotoksikiteyi değerlendirmek için kullanmış oldukları yöntem farklı olmasına rağmen elde etmiş oldukları IC₅₀ değerinin (10 nM) bizim çalışmamızda elde edilen IC₅₀ değeri (10.2 nM) ile oldukça benzer olması çalışmamızın literatür ile birebir örtüşüğünü ve kullanmış olduğumuz yöntemin uygunluğunu bir kez daha göstermektedir. Yine sorafenibin TT MTK hücrelerindeki sitotoksik etkisinin Mitojen ile aktive olan protein kinaz (MEK) inhibisyonu ile artırılmaya çalışıldığı bir başka çalışmada Koh YW. ve ark. (168) bizim çalışmamızın sonuçları ile uygun şekilde sorafenibin TT MTK hücreleri üzerinde zamana ve konsantrasyona bağımlı güçlü bir sitotoksik etkinliği olduğunu ve IC₅₀ değerinin de 1.7 nM olduğunu tespit etmişlerdir. Bu değer bizim çalışmamızda elde ettiğimiz değerden daha düşük olmasına rağmen bu kadar düşük konsantrasyonlarda gerçekleştirilen çalışmalarda böyle ufak farkların olabileceği gözden kaçırılmamalıdır. Sonuçta elde hem bizim çalışmamızda elde edilen, hem de literatür ile teyit edilen bu IC₅₀ değerinin oldukça düşük olması sorafenibin MTK tedavisinde

neden bu denli önemsenen bir ajan olduğunu ortaya koymaktadır. Bizim çalışmamız ve literatürdeki birçok çalışma sorafenibin MTK'daki güçlü ve başarılı etkinliğini ortaya koysa da literatürde sorafenibe karşı direnç gelişebileceği yada bazı vakalarda ilaca ancak kısmi yanıt alınabildiğine dair çalışmalar da mevcuttur (169). Bu durum sorafenibe alternatif ve en az onun kadar etkin başka tedavi seçeneklerinin bulunmasını zorunlu kılmaktadır. Bu bağlamda bizim çalışmamızda MTK tedavisinde sorafenibe alternatif olarak kullanılabilen ilaç lapatinib olmuştur. Lapatinib hem EGRF hem de HER2'nin tirozin kinaz aktivitesi gösteren bölgeleri için potent bir inhibitördür (170). Literatürde lapatinibin tiroid kanserleri üzerindeki etkisine dair herhangi bir çalışma bulunmamasına rağmen, gastrik kanser (171, 172), özefagial squamöz hücreli karsinom (173), duktal karsinoma in-situ (174), meme kanseri (175, 176) ve hatta glioma (177) kanser tiplerinde denenmiş ve bu kanserlerde bizim MTK hücreleri üzerinde bulduğumuza benzer şekilde konsantrasyona ve zamana bağlı olarak güçlü bir sitotoksik etki elde edilmiştir. Bu çalışmaların bazıları *in-vivo* olarak gerçekleştirilmesine rağmen büyük çoğunluğu bizim çalışmamız gibi *in-vitro* olarak yapılmıştır. Literatürdeki bu *in-vitro* çalışmalar incelendiğinde kanser tipi ne olursa olsun elde edilen IC₅₀ değerlerinin mikromolar düzeyinde olduğu dikkat çekmektedir. Bizim çalışmamızda ise lapatinibin IC₅₀ değeri nanomolar düzeyinde bulunmuş olup bu değer sorafenibin IC₅₀ değerlerinin neredeyse 1/10'udur. Elde edilen bu sonuç literatür ile birlikte değerlendirildiğinde lapatinibin MTK tedavisinde sorafenibten neredeyse 10 kat daha güçlü olduğu ve MTK'nın şu ana kadar lapatinib tedavisi denenilen kanser türleri içerisinde lapatinibe en duyarlı olan kanser türü olduğu sonucu çıkmaktadır.

MTK'nın tümör büyümesi ve metastazı için gerekli olan anormal bir anjiogenez paterni sergilediği bilinmektedir. MTK anjiogenezinde major mediatörün VEGFR-2 olduğuna inanılmaktadır (178). VEGFR-2'nin MTK hücrelerinde normal hücrelerden çok daha fazla eksprese olduğu ve bu durumun da direk olarak artmış metastaz oranları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (178, 179). Endotelde ve MTK hücrelerinde bulunan VEGFR-2'nin etkileşimi tümöral VEGF A, B, C, ve/veya D'nin üretimine, bu da neoanjiogenezis ile sonuçlanacak şekilde MAPK ve PI3K/AKT yollarının aktivasyonuna neden olmaktadır. Böylece VEGFR'nin bloke edilmesi tümör aracılı angiogenezi inhibe etmektedir (179). Bu güçlü VEGF ve MTK bağlantısından dolayı

sorafenib ve lapatinibin etkinliğini artırmak amacı ile çalışmamızda bir VEGF antikoru olan bevacizumab kullanılmıştır.

Bevacizumab rekombinant monoklonal VEGF antikoru ve güçlü antianjiyogenik etkinliği nedeniyle birçok kanser tipinin tedavisinde kullanılmaktadır. Bevacizumab ilk kez 2004 yılında metastatik kolon kanserinin tedavisinde kullanılmak üzere FDA onayı almış, bunu 2006 yılında akciğer kanseri, 2008 yılında paklitaksel ile kombine olarak kullanılmak üzere HER-2 negatif meme kanseri, 2009 yılında glioblastoma ve böbrek kanseri, 2014 yılında ise metastatik servikal kanser ve platinum rezistansı gelişmiş over kanserinin tedavisi izlemiştir (180) . Bevacizumab tek başına tedavi ajanı olmaktan ziyade tedavide kullanılan ana ajana ek olarak kullanılan adjuvan ajan olarak tercih edilmektedir. Bevacizumab'ın tiroid kanserlerindeki rolü ile ilgili olarak literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Fakat benzer etki mekanizması ile etki eden ve bevacizumabtan çok daha yüksek bir etki gücüne sahip bir VEGF inhibitörü olan "VEGF trapon"un antikanser etkinliği Peng XG. ve ark. (181) tarafından 2015 yılında yapılan bir çalışma ile foliküler tiroid kanseri üzerinde *in-vitro* ve *in-vivo* olarak araştırılmış ve güçlü bir antianjiyogenik ve antiproliferatif etkinliği olduğu bulunmuştur. Tümör büyümesini %73 oranında azalttığı görülmüştür. Literatürdeki bu bulgudan farklı olarak bizim çalışmamızda bevacizumab MTK hücreleri üzerinde oldukça düşük bir antikanser etkinlik gösterdi. Bu durum traponun aksine bevacizumabın anti-VEGF dışında herhangi bir ekstra etki mekanizması olmaması ve bizim çalışmamızın yapıldığı *in-vitro* koşullarda VEGF seviyelerinin yüksek olmasının beklenemeyeceği gerçeği ile açıklanabilir. Ayrıca literatürde bizim bulgularımızı destekleyen bevacizumabın tek başına uygulanmasının *in-vitro* koşullarda düşük bir sitotoksik etkinlik gösterdiğini ortaya koyan birçok çalışma vardır. Tonissi F ve ark. 2015 yılında yapmış oldukları çalışmada (182) bevacizumabın sitotoksik etkinliğini MCF-7 ve MDA-MM-231 meme kanseri hücreleri ve HUVEC insan umbilikal ven endotel hücrelerinde denemişler ve her üç hücre hattı için de IC₅₀ değerini 16x10⁻³ M olarak bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda ise bevacizumabın MTK hücreleri üzerine uygulamasının IC₅₀ değeri ise 18.3x10⁻³ M olarak tespit edilmiştir. Bu sonuç literatürdeki benzer uygulamalar ile birebir örtüşmektedir.

Bevacizumabın kanser tedavisinde ana tedavi ajanı ile kombine olarak kullanılması, yani adjuvan tedavi ajanı olarak kullanılması uzun zamandır denenen birçok kanser

türünde etkili bulunmuş bir yaklaşımdır. Bevacizumabın; küçük hücreli akciğer kanserinde irinotekanla (183), glioblastomada tandutinib (184) veya temozolomidle (185), küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde erlotinible (186), hedeflenmiş tedaviye dirençli kolanjiokarsinomda setüksimabla (187), ileri kolorektal kanser vakalarında kapesitabin-irinotekanla (188) kombine olarak uygulandığını ve olumlu sonuçlar verdiğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Kombinasyon yaklaşımı sadece bevacizumab ile ilgili değil aynı zamanda tirozin kinaz inhibitörlerinin antikanser etkinliklerini artırmak için denenen bir yaklaşımdır. Çünkü tirozin kinaz inhibitörleri her kadar kullanıma girdikleri her alan ve her kanser tipinin tedavisinden önemli gelişmeler kaydedilmesine katkıda bulunmuş olsalar da kullanımlarını kısıtlayan en önemli iki parametre yüksek toksisite oranları ve bazı durumlarda gelişebilen toleranstır. Bu iki durumu da aşmanın en etkin yolu tirozin kinaz inhibitörlerini farklı etki mekanizması ile benzer etkinlik gösteren ajanlar ile kombine etmek gibi görülmektedir. Hong DS. ve ark. (189) sorafenibin hem medüller hem de diferansiye tiroid kanserlerindeki antikanser etkinliğini tek başına hem de farnesil transferaz inhibitörü tipifarnib ile kombine olarak değerlendirmişler, tipifarnibin sorafenibin antikanser etkinliğini anlamlı şekilde artırdığını göstermişlerdir. Benzer şekilde bizim çalışmamızda sorafenib ve lapatinibin bevacizumab ile kombinasyonu ile elde edilen antikanser etkinliğin ajanların tek başlarına uygulandıklarında elde edilen antikanser etkinliğe göre anlamlı şekilde güçlü olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızın sonuçları bevacizumabın lapatinibte daha belirgin olmak üzere her iki tirozin kinaz inhibitörünün antikanser etkinliğini artırdığını göstermiş, ayrıca bu etkileşimin tabiatı hakkında da bilgi vermektedir. Çalışmamızın sonuçları hem sorafenib ve lapatinib hem de bevacizumabın antikanser etkinlik gösterdiği konsantrasyonlarda kombine edilmelerinin antikanser etkinliği artırdığını göstermekle kalmayıp, bevacizumabın antikanser etkinlik göstermediği çok düşük konsantrasyonlarda bile hem sorafenibin hem de lapatinibin MTK üzerindeki antikanser etkisini anlamlı şekilde artırdığını, yani bu ajanlar arasında aditif bir etkileşim olduğunu göstermektedir. Bu önemli sonuç bevacizumabın sorafenib ve lapatinib tedavisine düşük dozlarda eklenebileceğini ve bu ajanların normalde kullanılan dozlarından çok daha düşük dozlarda yeterli bir antikanser etkinlik gösterebileceğine işaret etmektedir. Bu durum sadece sorafenib ve lapatinibin neden olmuş olduğu yan etkilerde azalma ile sonuçlanmayacak aynı zamanda uzun dönemde bu ajanlara tolerans gelişme ihtimalini de azaltacaktır. Bu sonuçların *in-vitro* sonuçlar olduğu unutulmamalı, önce

in-vivo hayvan deneyleri daha sonra da klinik faz çalışmaları ile çalışmamızda görülen etkilerin teyit edilmesi gerekmektedir.

SONUÇLAR;

1. Sarafenib düşük konsantrasyonlarda TT MTK hücrelerinde zamana ve konsantrasyona bağımlı güçlü bir antikanser etkinlik meydana getirmiştir (IC₅₀=10.2 nM)
2. Lapatinib sorafenibten bile daha düşük konsantrasyonlarda TT MTK hücrelerinde zamana ve konsantrasyona bağımlı güçlü bir antikanser etkinlik meydana getirmiştir (IC₅₀=1.2 nM)
3. Bevacizumab tek başına uygulamada yüksek konsantrasyonlarda bile TT MTK hücrelerinde ancak zayıf bir antikanser etkinlik meydana getirebilmiştir.
4. Tek başına uygulamaların TT MTK hücreleri üzerindeki antikanser etki güçlerine göre sıralamaları lapatinib>sorafenib>bevacizumab şeklindedir. Lapatinib ile ilgili herhangi bir literatür bilgisi bulunmamasına rağmen bu konuda standart tedavi ilacı olarak adlandırılabilen sorafenibten yaklaşık 10 kat daha güçlü bir etkinlik göstermiştir.
5. Sorafenib ve lapatinibin kısmi antikanser etkinlik gösteren konsantrasyonu bevacizumabın yine kısmi antikanser etkinlik gösteren kombinasyonu ile kombine edildiğinde bevacizumab sorafenibin antikanser etkinliğini 16 kat, lapatinibin antikanser etkinliğini 64 kat artırmıştır.
6. Bevacizumab sorafenib ve lapatinibin antikanser etkinliğini sadece kendisinin de antikanser etkinlik gösterdiği yüksek konsantrasyonlarda değil, hiç antikanser etkinlik göstermediği en düşük konsantrasyonlarda bile artırarak çalışmada kullanılan tirozin kinaz inhibitörleri ile aditif etkileşim göstermiştir.

Sonuç olarak çalışmamız; sorafenib ve lapatinibin hem tek başlarına hem de bevacizumab ile kombine şekilde medüller tiroid kanser tedavisinde kullanılabilen etkili ajanlar olduğunu göstermiştir. Ayrıca kombinasyonların oldukça düşük konsantrasyonlarda bile etkinlik göstermesi, tirozin kinaz inhibitörlerinin yan

etkilerinden sakınma ve meydana gelebilecek direnç durumlarının önüne geçme anlamında oldukça umut vericidir.



6. 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. *Cancer*, 83(12):2638-48, 1998.
2. Marsh DJ, Learoyd DL, Robinson BG. Medullary thyroid carcinoma: recent advances and management update. *Thyroid*, 5:407-24, 1995.
3. Almeida MQ ve Stratakis CA. Solid tumors associated with multiple endocrine neoplasias. *Cancer Genet Cytogenet*, 203:30-36, 2010.
4. Pelizzo MR, Boschin IM, Bernante P, Toniato A, Piotto A, Pagetta C, et al. Natural history, diagnosis, treatment and outcome of medullary thyroid cancer: 37 years experience on 157 patients. *Eur J Surg Oncol*, 33(4):493-97, 2007.
5. Mulligan LM, Eng C, Healey CS, Clayton D, Kwok JB, Gardner E, et al. Specific mutations of the RET proto-oncogene are related to disease phenotype in MEN 2A and FMTC. *Nat Genet*, 6:70-74, 1994.
6. Hofstra RM, Landsvater RM, Ceccherini I, Stulp RP, Stelwagen T, Luo Y, et al. A mutation in the RET protooncogene associated with multiple endocrine neoplasia type 2B and sporadic medullary thyroid carcinoma. *Nature*, 367:375-76, 1994.
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*, 78:1261-64, 1994.
8. Waguespack SG, Rich TA, Perrier ND. Management of medullary thyroid carcinoma and MEN2 syndromes in childhood. *Nat Rev Endocrinol*, 7:596-607, 2011.
9. Lairmore TC ve Wells SA Jr. Medullary carcinoma of the thyroid: current diagnosis and management. *Semin Surg Oncol*, 7:92-99, 1991.
10. Rendl G, Manzl M, Hitzl W. Long-term prognosis of medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 69:497-505, 2008.
11. Almeida MQ ve Hoff AO. Recent advances in the molecular pathogenesis and targeted therapies of medullary thyroid carcinoma. *Curr Opin Oncol*, 24:229-34, 2012.
12. Giuffrida D ve Gharib H. Current diagnosis and management of medullary thyroid carcinoma. *Ann Oncol*, 9:695-701, 1998.

13. Frohnauer MK ve Decker RA. Update on the MEN 2A c804 RET mutation: is prophylactic thyroidectomy indicated? *Surgery*, 128:1052-58, 2000.
14. Marx SJ. Molecular genetics of multiple endocrine neoplasia types 1 and 2. *Nat Rev Cancer*, 5:367-375, 2005.
15. Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, Bilezikian JP, Beck-Peccoz P, Bordi C, et al. Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *JCEM*, 86:5658-71, 2001.
16. Santoro M, Carlomagno F, Romano A, Bottaro DP, Dathan NA, Grieco M, et al. Activation of RET as a dominant transforming gene by germline mutations of MEN2A and MEN2B. *Science*, 267:381-83, 1995.
17. Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, Elsdon MJ, Eng C, Gardner E, et al. Germ-line mutations of the RET protooncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature*, 363:458-60, 1993.
18. Takahashi M ve Cooper GM. ret Transforming gene encodes a fusion protein homologous to tyrosine kinases. *Molecular and Cellular Biology*, 7;4:1378-85, 1987.
19. Airaksinen MS, Titievsky A, Saarma M. GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 13;5:313-25, 1999.
20. Arighi E, Borrello MG, Sariola H. RET tyrosine kinase signaling in development and cancer. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 16;4-5:441-67, 2005.
21. Takahashi M, Ritz J, Cooper GM. Activation of a novel human transforming gene, ret, by DNA rearrangement. *Cell*, 42;2:581-88, 1985.
22. Hanahan D ve Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100;1:57-70, 2000.
23. Watanabe T, Ichihara M, Hashimoto M. Characterization of gene expression induced by RET with MEN2A or MEN2B mutation. *American Journal of Pathology*, 161;1:249-56, 2002.
24. Schuringa JJ, Wojtachnio K, Hagens W, Vellenga E, Buys CH, Hofstra R, et al. MEN2A/RET- induced cellular transformation by activation of STAT3. *Oncogene*, 20;38:5350-58, 2001.
25. Asai N, Fukuda T, Wu Z, Enomoto A, Pachnis V, Takahashi M, et al. Targeted mutation of serine 697 in the Ret tyrosine kinase causes migration defect of enteric neural crest cells. *Development*, 133;22:4507-16, 2006.

26. McLean GW, Carragher NO, Avizienyte E, Evans J, Brunton VG, Frame MC. The role of focal-adhesion kinase in cancer—a new therapeutic opportunity. *Nature Reviews Cancer*, 5,7; 505–15, 2005.
27. Cranston AN, Carniti C, Oakhill K, Radzio-Andzelm E, Stone EA, McCallion AS, et al. RET is constitutively activated by novel tandem mutations that alter the active site resulting in multiple endocrine neoplasia type 2B. *Cancer Research*, 66;20: 10179–187, 2006.
28. Schuffenecker I, Billaud M, Calender A, Chambe B, Ginet N, Calmettes C, et al. 1994 RET proto-oncogene mutations in French MEN 2A and FMTC families. *Hum Mol Genet*3:1939-43, 1994.
29. Bolino A, Schuffenecker I, Luo Y, Seri M, Silengo M, Tocco T, et al. RET mutations in exons 13 and 14 of FMTC patients. *Oncogene*, 10:2415-19, 1995.
30. Eng C, Smith DP, Mulligan LM, Healey CS, Zvelebil MJ, Stonehouse TJ, 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*, 10:509-13, 1995.
31. 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*, 3:1259-62, 1994.
32. chuffenecker I, Ginet N, Goldgar D, Eng C, Chambe B, Boneu A, 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*, 60:233-37, 1997.
33. Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, Lenoir G, Cote G, Gagel RF, et al. The relationship between specific RET protooncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. *International RET mutation consortium analysis. JAMA*, 276:1575-79, 1996.
34. 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*, 55:1076-82, 1994.

35. Eng C, Mulligan LM, Smith DP, Healey CS, Frilling A, Raue F, et al. Mutation of the RET protooncogene in sporadic medullary thyroid carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 12:209-12, 1995.
36. Elisei R, Cosci B, Romei C, Bottici V, Renzini G, Molinaro E, et al. Prognostic significance of somatic RET oncogene mutations in sporadic medullary thyroid cancer: a 10-year follow-up study. *JCEM*, 93:682-87, 2008.
37. Donis-Keller H, Dou S, Chi D, Carlson KM, Toshima K, Lairmore TC, et al. Mutations in the RET proto-oncogene are associated with MEN 2A and FMTC. *Hum Mol Genet*, 2:851-56, 1993.
38. 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*, 88:1139-48, 2000.
39. Boi F, Maurelli I, Pinna G, Atzeni F, Piga M, Lai ML, et al. Calcitonin measurement in wash-out fluid from fine needle aspiration of neck masses in patients with primary and metastatic medullary thyroid carcinoma. *JCEM*, 92:2115-18, 2007.
40. Sipple J. The association of pheochromocytoma with carcinoma of the thyroid gland. *AmJ Med*, 31:4, 1961.
41. Gagel RF, Jackson CE, Block MA, Feldman ZT, Reichlin S, Hamilton BP, et al. Age-related probability of development of hereditary medullary thyroid carcinoma. *J Pediatr*, 101:941-46, 1982.
42. Williams ED ve Pollock DJ. Multiple mucosal neuromata with endocrine tumours: a syndrome allied to von Recklinghausen's disease. *J Pathol Bacteriol*, 91:71-80, 1966.
43. Farndon JR, Leight GS, Dilley WG, Baylin SB, Smallridge RC, Harrison TS, et al. Familial medullary thyroid carcinoma without associated endocrinopathies: a distinct clinical entity. *Br J Surg*, 73:278-81, 1986.
44. Cooper DS, Doherty GM, Haugen BR, Kloos RT, Lee SL, Mandel SJ, et al. Revised American Thyroid Association management guidelines for patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer. *Thyroid*, 19:1167-1214, 2009.
45. Ahmed SR ve Ball DW. Clinical review: Incidentally discovered medullary thyroid cancer: diagnostic strategies and treatment. *J Clin Endocrinol Metab*, 96:1237-45, 2011.

46. Daniels GH. Screening for medullary thyroid carcinoma with serum calcitonin measurements in patients with thyroid nodules in the United States and Canada. *Thyroid*, 21:1199-1207, 2011.
47. Valle LA ve Kloos RT. The prevalence of occult medullary thyroid carcinoma at autopsy. *J Clin Endocrinol Metab*, 96(1):109-13, 2011.
48. Kloos RT, Eng C, Evans DB, Francis GL, Gagel RF, Gharib H, et al. Medullary thyroid cancer: management guidelines of the American Thyroid Association. *Thyroid*, 19:565-612, 2009.
49. 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*, 93:91-95, 2008.
50. Tisell LE, Dille WG, Wells SA, Jr. Progression of postoperative residual medullary thyroid carcinoma as monitored by plasma calcitonin levels. *Surgery*, 119:34-39, 1996.
51. AT, FS, GP, MB. Genetic alterations in medullary thyroid cancer: diagnostic and prognostic markers. *Curr Genomics*, 12:618-25, 2011.
52. Moley JF ve DeBenedetti MK. Patterns of nodal metastases in palpable medullary thyroid carcinoma: recommendations for extent of node dissection. *Ann Surg*, 229:880-88, 1999.
53. Jimenez C, Hu MI, Gagel RF. Management of medullary thyroid carcinoma. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 37:481-96, 2008.
54. Scollo C, Baudin E, Travagli JP, Caillou B, Bellon N, Leboulleux S, et al. Rationale for central and bilateral lymph node dissection in sporadic and hereditary medullary thyroid cancer. *JCEM*, 88:2070- 75, 2003.
55. 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*, 6:305-10, 1996.
56. Fife KM, Bower M, Harmer CL. Medullary thyroid cancer: the role of radiotherapy in local control. *Eur J Surg Oncol*, 22:588-91, 1996.
57. Terezakis SA, Lee KS, Ghossein RA, Rivera M, Tuttle RM, Wolden SL, 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*, 73:795-801, 2009.

58. Schwartz DL, Rana V, Shaw S, Yazbeck C, Ang KK, Morrison WH, et al. Postoperative radiotherapy for advanced medullary thyroid cancer--local disease control in the modern era. *Head Neck*, 30:883-88, 2008.
59. Martinez SR, Beal SH, Chen A, Chen SL, Schneider PD. Adjuvant external beam radiation for medullary thyroid carcinoma. *J Surg Oncol*, 102:175-78, 2010.
60. Moley JF. Medullary thyroid carcinoma: management of lymph node metastases. *J Natl Compr Canc Netw*, 28:549-56, 2010.
61. Brierley JD. Update on external beam radiation therapy in thyroid cancer. *JCEM*, 96:2289-95, 2011.
62. Brierley J ve Sherman E. The role of external beam radiation and targeted therapy in thyroid cancer. *Semin Radiat Oncol*, 22(3):254-62, 2012.
63. Kapiteijn E, Schneider TC, Morreau H, Gelderblom H, Nortier JW, Smit JW. New treatment modalities in advanced thyroid cancer. *Ann Oncol*, 23:10-18, 2012.
64. Wells SA Jr, Gosnell JE, Gagel RF, Moley J, Pfister D, Sosa JA, et al. Vandetanib for the treatment of patients with locally advanced or metastatic hereditary medullary thyroid cancer. *J Clin Oncol*, 28:767-72, 2010.
65. 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*, 95:2664-71, 2010.
66. Wells SA Jr, Robinson BG, Gagel RF, Dralle H, Fagin JA, Santoro M, et al. Vandetanib in patients with locally advanced or metastatic medullary thyroid cancer: a randomized, double-blind phase III trial. *J Clin Oncol*, 30:134-41, 2012.
67. Lam ET, Ringel MD, Kloos RT, Prior TW, Knopp MV, Liang J, et al. Phase II clinical trial of sorafenib in metastatic medullary thyroid cancer. *J Clin Oncol*, 28:2323-30, 2010.
68. Ahmed M, Barbachano Y, Riddell A, Hickey J, Newbold KL, Viros 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*, 165:315-22, 2011.
69. Viola D, Cappagli V, Elisei R. Cabozantinib (XL184) for the treatment of locally advanced or metastatic progressive medullary thyroid cancer. *Future Oncol*, 9(8):1083-92, 2013.

70. Schlumberger MJ, Elisei R, Bastholt L, Wirth LJ, Martins RG, Locati LD, 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*, 27:3794-3801, 2009.
71. Stein R ve 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*, 3:1559-64, 2004.
72. Modigliani E, Cohen R, Campos JM, Conte-Devolx B, Maes B, Boneu A, 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)*, 48:265-73, 1998.
73. 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*, 212:395-400, 1990.
74. Girelli ME, Nacamulli D, Pelizzo MR, De Vido D, Mian C, Piccolo M, et al. Medullary thyroid carcinoma: clinical features and long-term follow-up of seventy-eight patients treated between 1969 and 1986. *Thyroid*, 8:517-23, 1998.
75. Clark JR, Fridman TR, Odell MJ, Brierley J, Walfish PG, Freeman JL. Prognostic variables and calcitonin in medullary thyroid cancer. *The Laryngoscope*, 115:1445-50, 2005.
76. Bergholm U, Bergstrom R, Ekblom A. Long-term follow-up of patients with medullary carcinoma of the thyroid. *Cancer*, 79:132-38, 1997.
77. Gorczewski K, Wloch J, Jarzab B. The prognostic value of tumor markers doubling times in medullary thyroid carcinoma - preliminary report. *Thyroid Res*, 3(1):10, 2010.
78. Xing M. Genetic alterations in the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Thyroid*, 20(7):697-706, 2010.
79. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, et al. Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Adv Enzyme Regul*, 46:249-79, 2006.

80. Mian C, Barollo S, Pennelli G, Pavan N, Ruge M, Pelizzo MR, et al. Molecular characteristics in papillary thyroid cancers (PTCs) with no ¹³¹I uptake. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 68(1):108-16, 2008.
81. Vivanco I ve Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*, 2(7):489-501, 2002.
82. Saji M ve Ringel MD. The PI3K-Akt-mTOR pathway in initiation and progression of thyroid tumors. *Mol Cell Endocrinol*, 28;321(1):20-8, 2010.
83. Legakis I ve Syrigos K. Recent advances in molecular diagnosis of thyroid cancer. *J Thyroid Res*, 384213, 2011.
84. Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, González-Barón M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev*, 30(2):193-204, 2004.
85. Sansal I ve Sellers WR. The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway. *J Clin Oncol*, 15;22(14):2954-63, 2004.
86. García-Rostán G, Costa AM, Pereira-Castro I, Salvatore G, Hernandez R, Hermsem MJ, et al. Mutation of the PIK3CA gene in anaplastic thyroid cancer. *Cancer Res*, 15;65(22):10199-207, 2005.
87. Hou P, Liu D, Shan Y, Hu S, Studeman K, Condouris S, et al. Genetic alterations and their relationship in the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in thyroid cancer. *Clin Cancer Res*, 15;13(4):1161-70, 2007.
88. Wu G, Mambo E, Guo Z, Hu S, Huang X, Gollin SM, et al. Uncommon mutation, but common amplifications, of the PIK3CA gene in thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(8):4688-93, 2005.
89. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 10;124(3):471-84, 2006.
90. Abraham RT ve Gibbons JJ. The mammalian target of rapamycin signaling pathway: twists and turns in the road to cancer therapy. *Clin Cancer Res*, 1;13(11):3109-14, 2007.
91. Guertin DA ve Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell*, 12(1):9-22, 2007.
92. Astrinidis A ve Henske EP. Tuberous sclerosis complex: linking growth and energy signaling pathways with human disease. *Oncogene*, 14;24(50):7475-81, 2005.

93. Takano A, Usui I, Haruta T, Kawahara J, Uno T, Iwata M, et al. Mammalian target of rapamycin pathway regulates insulin signaling via subcellular redistribution of insulin receptor substrate 1 and integrates nutritional signals and metabolic signals of insulin. *Mol Cell Biol*, 21(15):5050-62, 2001.
94. Saji M ve Ringel MD. The PI3K-Akt-mTOR pathway in initiation and progression of thyroid tumors *Mol Cell Endocrinol*, 28;321(1):20-8, 2010.
95. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res*, 64: 7099-7109, 2004.
96. Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, Wilkie D, et al. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *CancerRes*, 66: 11851-858, 2006.
97. Ratain MJ, Eisen T, Stadler WM, Flaherty KT, Kaye SB, Rosner GL, et al. Phase II placebo-controlled randomized discontinuation trial of sorafenib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*, 24 (16): 2505-12, 2006.
98. Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, et al. TARGET Study Group. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*, 356(2): 125-134, 2007.
99. Hackel P0, Zwick E, Prenzel N, Ullrich A. Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr Opm Cell Biol*, (2): 184-89, 1999.
100. Woodburn JR. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol Ther*, 82: 241-50, 1999.
101. Liovet M, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, et al. SHARP Investigators Study Group. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*, 359(4): 378-90, 2008.
102. Hood JD, Bednarski M, Frausto R, Guccione S, Reisfeld RA, Xiang R, et al. Tumor regression by targeted gene delivery to the neovasculature. *Science*, 296(5577): 2404-07, 2002.
103. Furuse J. Sorafenib for the treatment of unresectable hepatocellular carcinoma. *Biologics*, 2(4): 779-88, 2008.

- 104.** Hong DS, Sebti SM, Newman RA, Blaskovich MA, Ye L, Gagel RF, et al. Phase I trial of a combination of the multikinase inhibitor sorafenib and the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in advanced malignancies. *Clin Cancer Res*, 15(22): 7061-68, 2009.
- 105.** Hasskarl J. Sorafenib. *Recent Results Cancer Res*, 184: 61-70, 2010.
- 106.** Spector NL, Xia W, Burris H. Study of the biologic effects of lapatinib a reversible inhibitor of ErbB1 and ErbB2 tyrosine kinases, on tumor growth and survival pathways in patients with advanced malignancies. *J Clin Oncol*, 23: 2502–12, 2005.
- 107.** Wood ER, Truesdale AT, Nonaka S, McDonald OB. A unique structure for epidermal growth factor receptor bound to GW572016 (lapatinib) relationships among protein conformation, inhibitor off-rate, and receptor activity in tumor cells. *Cancer Res*, 64: 6652–59, 2004.
- 108.** Rusnak DW, Lackey K, Affleck K, Wood ER, Alligood KJ, Rhodes N, et al. The effects of the novel, reversible epidermal growth factor receptor/ErbB-2 tyrosine kinase inhibitor, GW572016, on the growth of human normal and tumor-derived cell lines in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther*, 1: 85–94, 2001.
- 109.** Arteaga CL. The epidermal growth factor receptor: From mutant oncogene in nonhuman cancers to therapeutic target in human neoplasia. *J Clin Oncol*, 19: 32– 40, 2001.
- 110.** Woodburn JR. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol Ther*, 82: 241–50, 1999.
- 111.** Van C, Giaccone G, Hoekman K. Epidermal growth factor receptor and angiogenesis: Opportunities for combined anticancer strategies. *Int J Cancer*, 117:883– 88, 2005.
- 112.** Camp ER, Summy J, Bauer TW, Liu W, Gallick G, Ellis L. Molecular mechanisms of resistance to therapies targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res*, 11: 397– 405, 2005.
- 113.** Schlessinger J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell*, 103: 211–25, 2000.
- 114.** Rowinsky EK. Signal Events: Cell Signal Transduction and Its Inhibition in Cancer. *The Oncologist*, 8: 5-17, 2003.

115. Folkman J. Tumour angiogenesis: therapeutic implications. *N Eng J Med*, 285: 1182-6, 1971.
116. Ferrara N ve Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 161: 851-8, 1989.
117. Poon RT-P, Fan S-T, Wong J. Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol*, 19: 1207-25, 2001.
118. Ferrara N ve Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, 18: 4-25, 1997.
119. Nathanson SD. Insights into the mechanisms of lymph node metastasis. *Cancer*, 98: 413-23, 2003.
120. Kerbel R ve Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer*, 2: 727-39, 2002.
121. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 3: 391, 2004.
122. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*, 25: 581, 2004.
123. Kabbinnavar F, Hurwitz HI, Fehrenbacher L, Meropol NJ, Novotny WF, Lieberman G, et al. Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 21: 60, 2003.
124. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, 350: 2335, 2004.
125. Iantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol*, 25: 1539, 2007.
126. Saltz LB, Clarke S, Díaz-Rubio E, Scheithauer W, Figuer A, Wong R, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol*, 26: 2013, 2008.

- 127.** Wagner AD, Arnold D, Grothey AA, Haerting J, Unverzagt S. Anti-angiogenic therapies for metastatic colorectal cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, CD005392, 2009.
- 128.** Mancuso MR, Davis R, Norberg SM, O'Brien S, Sennino B, Nakahara T, et al. Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VRGF inhibition. *J Clin Invest*, 116: 2610-21, 2006.
- 129.** Diaz-Rubio E, Espana AG, Massuti B. Role of K-RAS Status in Patients with Metastatic Colorectal Cancer Receiving First-Line Chemotherapy plus Bevacizumab: A TTD Group Cooperative Study. *Oncologist*, 17(11): 1426-8, 2012.
- 130.** Yalcin S, Uslu R, Dane F, Yilmaz U, Zengin N, Buyukunal E, et al. Bevacizumab+Capecitabine as maintenance therapy after initial bevacizumab+XELOX treatment in previously untreated patients with metastatic colorectal cancer: Phase 3 'Stop and Go' study results-A Turkish Oncology Trial. *Oncologist*, 85(6): 328-35, 2013.
- 131.** RocheDiagnosticsGmbH. Introduction of the RTCA SP Instrument. RTCA SP Instrument Operator's Manual, A. Acea Biosciences, Inc. 14-16, 2008.
- 132.** Baloch ZW, LiVolsi VA. Prognostic Factors in Well-Differentiated Follicular-Derived Carcinoma and Medullary Thyroid Carcinoma. *Thyroid*, 11(7):637-45, 2001.
- 133.** Wolfe HJ, Melvin KE, Cervi-Skinner SJ, Saadi AA, Juliar JF, Jackson CE, et al. C-Cell Hyperplasia Preceding Medullary Thyroid Carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 289(9):437-41, 1973.
- 134.** Pelizzo MR, Boschin IM, Bernante P, Toniato A, Piotto A, Pagetta C, et al. Natural History, Diagnosis, Treatment and Outcome of Medullary Thyroid Cancer: 37 Years Experience on 157 Patients. *Eur J Surg Oncol*, 33(4):493-97, 2007.
- 135.** Fugazzola L, Pinchera A, Luchetti F, Iacconi P, Miccoli P, Romei C, et al. Disappearance Rate of Serum Calcitonin after Total Thyroidectomy for Medullary Thyroid Carcinoma. *Int J Biol Markers*, 9(1):21-24, 1994.
- 136.** Meijer JA, le Cessie S, van den Hout WB, Kievit J, Schoones JW, Romijn JA, et al. Calcitonin and Carcinoembryonic Antigen Doubling Times as Prognostic Factors in Medullary Thyroid Carcinoma: A Structured Meta-Analysis. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 72(4):534-42, 2010.

137. Kebebew E, Ituarte PH, Siperstein AE, Duh QY, Clark OH, et al. Medullary Thyroid Carcinoma: Clinical Characteristics, Treatment, Prognostic Factors, and a Comparison of Staging Systems. *Cancer*, 88:1139–48, 2000.
138. Rendl G, Manzl M, Hitzl W, Sungler P, Pirich C. et al. Long-Term Prognosis of Medullary Thyroid Carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 69(3):497–505, 2008.
139. Modigliani E, Cohen R, Campos JM, Conte-Devolx B, Maes B, Boneu A, et al. Prognostic Factors for Survival and for Biochemical Cure in Medullary Thyroid Carcinoma: Results in 899 Patients. *Clinical Endocrinology*, 48:265–73, 1998.
140. Kloos RT, Eng C, Evans DB, Francis GL, Gagel RF, Gharib H, et al. Medullary Thyroid Cancer: Management Guidelines of the American Thyroid Association. *Thyroid*, 19(6):565–612, 2009.
141. Vitale G, Tagliaferri P, Caraglia M, Rampone E, Ciccarelli A, Bianco AR, et al. Slow release lanreotide in combination with interferon- α 2b in the treatment of symptomatic advanced medullary thyroid carcinoma. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85:983–88, 2000.
142. Kloos RT, Eng C, Evans DB, Francis GL, Gagel RF, Gharib H, et al. Medullary thyroid cancer: management guidelines of the American Thyroid Association. *Thyroid*, 19;565–612, 2009.
143. Wertenbroek MW, Links TP, Prins TR, Plukker JT, van der Jagt EJ, de Jong KP. Radiofrequency ablation of hepatic metastases from thyroid carcinoma. *Thyroid*, 18;1105–10, 2008.
144. Schlumberger M, Gardet P, de Vathaire F, Sarrazin D, Travagli JP, Parmentier C. In *Medullary Thyroid Carcinoma*, vol 211. Chapter: External radiotherapy and chemotherapy in MTC patients. pp 213–220. Ed. C Calmette. Paris: INSERMZJohn Libbey Eurotext Ltd, 1991.
145. Schlumberger M, Bastholt L, Dralle H, Jarzab B, Pacini F, Smit JW, et al. European thyroid association guidelines for metastatic medullary thyroid cancer. *European Thyroid Journal*, 1;5–14, 2012.
146. Nocera M, Baudin E, Pellegriti G, Cailleux AF, Mechelany-Corone C, Schlumberger M, et al. Treatment of advanced medullary thyroid cancer with an alternating combination of doxorubicin-streptozocin and 5 FU-dacarbazine. *British Journal of Cancer*, 83;715–18, 2000.

147. Meric-Bernstam F ve Gonzalez-Angulo AM. Targeting the mTOR signaling network for cancer therapy. *J Clin Oncol*, 27;2278–87, 2009.
148. Capdevila J ve Tabernero J. A shining light in the darkness for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer Discov*, 1;213–21, 2011.
149. Skinner HD, Zheng JZ, Fang J, Agani F, Jiang BH. Vascular endothelial growth factor transcriptional activation is mediated by hypoxia inducible factor 1alpha, HDM2, and p70S6K1 in response to phosphatidylinositol 3kinase/AKT signaling. *J Biol Chem*, 279;45643–51, 2004.
150. Sekulic A, Hudson CC, Homme JL, Yin P, Otterness DM, Karnitz LM, et al. A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells. *Cancer Res*, 60;3504–13, 2000.
151. Schmeizle T ve Hall MN. TOR, a central controller of cell growth. *Cell*, 103;253–62, 2000.
152. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(1);21–35, 2011.
153. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, et al. Velculescu, High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*, 304;554, 2004.
154. Samuels Y ve Velculescu VE, Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Cell Cycle*, 3;1221–24, 2004.
155. Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, Lenoir G, Cote G, Gagel RF, et al. The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. International RET mutation consortium analysis. *JAMA*, 276(19);1575–79, 1996.
156. Tamburrino A, Molinolo AA, Salerno P, Chernock RD, Raffeld M, Xi L, et al. Activation of the mTOR pathway in primary medullary thyroid carcinoma and lymph node metastases. *Clin. Cancer Res*, 18;3532–40, 2012.
157. Eng C ve Mulligan LM. Mutations of the RET protooncogene in multiple endocrine neoplasia type 2, related sporadic tumours and Hirschsprung diseases. *Hum Mutat*, 9;97–109, 1997.
158. Segouffin-Cariou C ve Billaud M. Transforming ability of MEN2ARET requires activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. *J Biol Chem*, 275;3568–76, 2000.

- 159.** Drosten M, Hilken G, Böckmann M, Rödicker F, Mise N, Cranston AN, et al. Role of MEN2A-derived RET in maintenance and proliferation of medullary thyroid cancer. *J Natl Cancer Inst*, 96;1231–39, 2004.
- 160.** Kouvaraki MA, Liakou C, Paraschi A, Dimas K, Patsouris E, Tseleni-Balafouta S, et al. Activation of mTOR signaling in medullary and aggressive papillary thyroid carcinomas. *Surgery*, 150;1258–65, 2011.
- 161.** Burke JF, Schlosser L, Harrison AD, Kunnimalaiyaan M, Chen H, MK-2206 causes growth suppression and reduces neuroendocrine tumor marker production in medullary thyroid cancer through Akt inhibition. *Ann Surg Oncol*, 20(12);3862–68, 2013.
- 162.** Nikiforov YE. Thyroid carcinoma: Molecular pathways and therapeutic targets. *Mod Pathol*, 21;37-43, 2008.
- 163.** Gupta-Abramson V, Troxel AB, Nellore A, Puttaswamy K, Redlinger M, Ransone K, et al: Phase II trial of sorafenib in advanced thyroid cancer. *J Clin Oncol*, 26:4714-19, 2008.
- 164.** Kloos RT, Ringel MD, Knopp MV, Hall NC, King M, Stevens R, et al: Phase II trial of sorafenib in metastatic thyroid cancer. *J Clin Oncol*, 27:1675-84, 2009.
- 165.** Castroneves LA, Negrão MV, Freitas RM, Papadia C, Lima JV Jr, Fukushima JT, et al. Sorafenib for the Treatment of Progressive Metastatic Medullary Thyroid Cancer: Efficacy and Safety Analysis. *Thyroid*, 9, 2016.
- 166.** Benekli M, Yalcin S, Ozkan M, Elkiran ET, Sevinc A, Cabuk D, et al. Efficacy of sorafenib in advanced differentiated and medullary thyroid cancer: experience in a Turkish population. *Onco Targets Ther*, 15;8:1-5, 2014.
- 167.** Lin CI, Whang EE, Lorch JH, Ruan DT. Autophagic activation potentiates the antiproliferative effects of tyrosine kinase inhibitors in medullary thyroid cancer. *Surgery*,;152(6):1142-9, 2012.
- 168.** Koh YW, Shah MH, Agarwal K, McCarty SK, Koo BS, Brendel VJ, et al. Sorafenib and Mek inhibition is synergistic in medullary thyroid carcinoma in vitro. *Endocr Relat Cancer*, 9;19(1):29-38, 2012.
- 169.** Aller S, Popescu A, Rao S, Morgan E, Gosiengfiao Y. Transient partial response to sorafenib treatment in an adolescent patient with MEN2B

- syndrome and end-stage medullary thyroid carcinoma. *Pediatr Blood Cancer*,;58(1):98-100, 2012.
- 170.** Xia W, Mullin RJ, Keith BR, Liu LH, Ma H, Rusnak DW, et al. Anti-tumor activity of GW572016: a dual tyrosine kinase inhibitor blocks EGF activation of EGFR/erbB2 and downstream Erk1/2 and AKT pathways. *Oncogene*, 21:6255-63, 2002.
- 171.** De Silva N, Schulz L, Paterson A, Qain W, Secrier M, Godfrey E, et al. Molecular effects of Lapatinib in the treatment of HER2 overexpressing oesophago-gastric adenocarcinoma. *Br J Cancer*, 3;113(9):1305-12, 2015.
- 172.** Shima Y, Tanaka H, Murakami H, Ito Y, Furuya T, Kondo E, et al. Lapatinib sensitivities of two novel trastuzumab-resistant HER2 gene-amplified gastric cancer cell lines. *Gastric Cancer*, 17(3):450-62, 2014.
- 173.** Saito S, Morishima K, Ui T, Hoshino H, Matsubara D, Ishikawa S, et al. The role of HGF/MET and FGF/FGFR in fibroblast-derived growth stimulation and lapatinib-resistance of esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*, 25;15:82, 2015.
- 174.** Farnie G, Johnson RL, Williams KE, Clarke RB, Bundred NJ. Lapatinib inhibits stem/progenitor proliferation in preclinical in vitro models of ductal carcinoma in situ (DCIS). *Cell Cycle*, 13(3):418-25, 2014.
- 175.** Kwon YS, Chun SY, Nam KS, Kim S. Lapatinib sensitizes quiescent MDA-MB-231 breast cancer cells to doxorubicin by inhibiting the expression of multidrug resistance-associated protein-1. *Oncol Rep*, 34(2):884-90, 2015.
- 176.** Jegg AM, Ward TM, Iorns E, Hoe N, Zhou J, Liu X, et al. PI3K independent activation of mTORC1 as a target in lapatinib-resistant ERBB2+ breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 136(3):683-92, 2012.
- 177.** Giannopoulou E, Dimitropoulos K, Argyriou AA, Koutras AK, Dimitrakopoulos F, Kalofonos HP. An in vitro study, evaluating the effect of sunitinib and/or lapatinib on two glioma cell lines. *Invest New Drugs*, 28(5):554-60, 2010.
- 178.** Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med*, 358(19):2039–49, 2008.
- 179.** Capp C, Wajner SM, Siqueira DR, Brasil BA, Meurer L, Maia AL. et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor and its receptors, VEGFR-1 and VEGFR-2, in medullary thyroid carcinoma. *Thyroid*, 20(8):863–71, 2010.

- 180.** Rodríguez-Antona C, Pallares J, Montero-Conde C, Inglada-Pérez L, Castelblanco E, Landa I, et al. Overexpression and activation of EGFR and VEGFR2 in medullary thyroid carcinomas is related to metastasis. *Endocr Relat Cancer*, 17(1):7–16, 2010.
- 181.** Peng XG, Chen ZF, Zhang KJ, Wang PG, Liu ZM, Chen ZJ, et al. VEGF Trapon inhibits tumor growth in papillary thyroid carcinoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 19(2):235-40, 2015.
- 182.** Tonissi F, Lattanzio L, Merlano MC, Infante L, Lo Nigro C, Garrone O. The effect of paclitaxel and nab-paclitaxel in combination with anti-angiogenic therapy in breast cancer cell lines. *Invest New Drugs*,;33(4):801-9, 2015.
- 183.** Trafalis DT, Alifieris C, Stathopoulos GP, Sitaras N. Phase II study of bevacizumab plus irinotecan on the treatment of relapsed resistant small cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2016.
- 184.** Oda Y, Sul J, Shih JH, Kreisl TN, Butman JA, Iwamoto FM, et al. A Phase II trial of tandutinib (MLN 518) in combination with bevacizumab for patients with recurrent glioblastoma. *CNS Oncol*, 2016.
- 185.** Balana C, De Las Penas R, Sepúlveda JM, Gil-Gil MJ, Luque R, Gallego O, et al. Bevacizumab and temozolomide versus temozolomide alone as neoadjuvant treatment in unresected glioblastoma: the GENOM 009 randomized phase II trial. *J Neurooncol*, 2016.
- 186.** Rolff J, Becker M, Merk J, Hoffmann J, Fichtner I. Preclinical Study of a Combination of Erlotinib and Bevacizumab in Early Stages of Unselected Non-Small Cell Lung Cancer Patient-Derived Xenografts. *Target Oncol*, 2016.
- 187.** Bruckner HW, Hirschfeld A, Schwartz M. Targeted Therapy for Resistant Cholangiocarcinoma with Bevacizumab or Cetuximab Added to Failed Cytotoxic Drug Cores. *Anticancer Res*, 36(1):399-402, 2016.
- 188.** Rudek MA, Dasari A, Laheru D, He P, Jin R, Walker R, et al. Phase I Study of ABT-751 in Combination with CAPIRI (Capecitabine and Irinotecan) and Bevacizumab in Patients with Advanced Colorectal Cancer. *J Clin Pharmacol*, 2015.
- 189.** Hong DS, Cabanillas ME, Wheler J, Naing A, Tsimberidou AM, Ye L, et al. 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, 96(4):997-1005, 2011.

