



T.C
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

MYELOM TEDAVİSİNDE STATİNLER BORTEZOMİB'İN ETKİSİNİ ARTIRIYOR MU?

UZMANLIK TEZİ
DR. EFSER ERBİL

DANIŞMAN
PROF. DR. ALİ ZAHİT BOLAMAN

AYDIN-2021

T.C
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

MYELOM TEDAVİSİNDE STATİNLER
BORTEZOMİB'İN ETKİSİNİ
ARTIRIYOR MU?

UZMANLIK TEZİ
DR. EFSER ERBİL

DANIŞMAN
PROF. DR. ALİ ZAHİT BOLAMAN

Bu araştırma ADÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından TPF-19024 numaralı proje ile desteklenmiştir.

AYDIN-2021

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	II
ŞEKİL DİZİNİ.....	III
RESİM DİZİNİ.....	IV
KISALTMALAR DİZİNİ	V
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Multipl myelom.....	1
1.2. Multipl myelomda standart tedavi yaklaşımları.....	1
1.3. Statinler ve malign hastalık ilişkisi	2
2. AMAÇ	5
3. MATERYAL METOD.....	6
3.1. Çalışma gruplarının oluşturulması	6
3.2. Hücre kültürü	6
3.3. MTS/PMS deneyi.....	6
3.4. Akım sitometri	7
3.5. İstatistik	7
4. SONUÇLAR.....	8
5. TARTIŞMA.....	14
6. ÖZET	17
7. SUMMARY.....	18
8. KAYNAKLAR	19

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca kıymetli bilgi birikimi, tecrübesi ve sabrı ile bana yol gösteren, destek olan değerli danışman hocam Prof Dr A Zahit Bolaman'a, eğitimim süresince üzerimde büyük emekleri bulunan değerli hocalarım başta tezimin akım sitometri değerlendirmesinde yardımcı olan Prof Dr İrfan Yavaşoğlu olmak üzere Prof Dr Engin Güney, Prof Dr Yavuz Yeniçerioğlu, Prof Dr Sabri Barutça, Prof Dr Nezih Meydan, Prof Dr Taşkın Şentürk, Prof Dr M Hadi Yaşa, Prof Dr Hulki Meltem Sönmez, Doç Dr Hakan Akdam, Doç Dr Adil Coşkun, Doç Dr Mustafa Ünübol, Doç Dr Altay Kandemir, Doç Dr Hilal Bektaş Uysal, Doç Dr Songül Çildağ, Doç Dr Özlem Oltulu, Doç Dr Esin Oktay, ayrıca tezimin istatistik değerlendirmesi için emek harcayan Doç Dr Gökhan Sargın'a bilhassa teşekkür ederim. Tezimin materyal-metod bölümünün oluşumu için laboratuvar çalışmalarından hücre kültürü aşamasında yol gösteren değerli hocam Prof Dr Kemal Ergin'e, hücre kültürünün gerçekleşmesinde büyük emeği olan doktora öğrencisi Rahmi Çetinkaya'ya ve ayrıca akım sitometri çalışmalarını gerçekleştiren Biyolog Ercüment Erdem ve Esra Barışık'a teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Efser Erbil

Aydın, 2021

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Mevalonat yolağı ve son ürünleri	3
Şekil 2. Atorvastatin'in U266 hücrelerindeki sitotoksik etkisi. B.Bortezomib'in U266 hücrelerindeki sitotoksik etkisi. C.U266 hücrelerinde Atorvastatin ve Bortezomib'in kombinasyonunun sitotoksik etkisi.....	11
Şekil 3. Akım sitometrisi ile U266 hücrelerindeki atorvastatin, bortezomib ve kombinasyon tedavisinin apoptoz üzerindeki etkisi.....	12
Şekil 4. Akım sitometride gruplar arası Annexin – FITC ile boyanma. İlaç gruplarında kontrol gruplarına göre belirgin boyanma izlenmekte.....	13



RESİM DİZİNİ

Resim 1.İşlem öncesi U266 hücre hattında plazma hücrelerinin May Grünwald-Giemsa boyama ile ışık mikroskoptaki görünümü	8
Resim 2. Konflüente ulaşmış U266 hücreleri (1x10), B: Bakteriyel kontaminasyona sahip U266 hücreleri (1x10), C:Fungal kontaminasyona sahip U266 hücreleri.....	8
Resim 3. Thoma lamında U266 hücrelerinin görünümü	9
Resim 4. MTS/PMS deneyinde bortezomib ve atorvastatinin artan konsantrasyonlarında renk değişiminin gözlenmesi	10



KISALTMALAR DİZİNİ

MM	: Multipl Myelom
IMiD	: İmmunmodölatör ilaç
PI	: Proteozom inhibitörleri
CAM-DR	: Cell adhesion mediated drug resistance
FTI	: Farnesil transferaz inhibitörleri
GGTI	: Geranilgeranil transferaz inhibitörlerinin
AML	: Akut miyeloid lösemi
IC50	: Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Multipl myelom

Multipl myelom (MM) kemik iliğinde veya kemik iliği dışında klonal plazma hücrelerinin artışıyla karakterize, non-Hodgkin lenfomadan sonra en sık görülen hematolojik malign hastalıktır (1). MM'de genellikle anormal plazma hücreleri tarafından üretilen monoklonal immünoglobulin (M veya monoklonal protein) yapımı söz konusudur (2). Olguların %15-20'si ağır zincir yapımı olmaksızın sadece hafif zincir hastalığı; %1-5'i ise ne ağır ne de hafif zincir yapımının olmadığı non-sekretuar myelom tipindedir (3). MM klinik ve biyolojik olarak heterojen bir hastalıktır. Hastalıkta klinik belirtiler oluşmadan evvel, genetik değişiklikler ortaya çıkar. Hastalığın patogenezi ve seyrinde kromozomal translokasyonlar (t4;14, 11;14, 14;16, 14;20) ve 17 p delesyonu, DNA metilasyonu, microRNA (miRNA) ekspresyonu gibi genetik ve epigenetik değişiklikler önemli rol oynamaktadır (1). MM nonkürabl bir hastalık olarak kabul edilir. Son zamanlarda hastalığın biyoloji ve heterojenitesinin daha iyi anlaşılması ile tedavide iyileşmeler elde edilmiştir. MM hastalarında yeni ilaçların tedaviye eklenmesi ile yaşam süresi 2-4 yıldan 8-10 yıla yükselmiştir (4).

1.2. Multipl myelomda standart tedavi yaklaşımları

Önceki yıllarda standart tedavi olarak kullanılan melfalan-prednizolon tedavisi ile yeterli yanıt elde edilememiştir. Bu tedavi yerine veya bu tedaviye ek olarak verilen immünomodülatör ilaçlar (IMiD) ve proteozom inhibitörlerinin (PI) kullanılması, otolog kök hücre nakli yapan merkez sayısının artması ve daratumumab gibi monoklonal antikorların tedaviye eklenmesi ile sağ kalımda belirgin bir iyileşme gözlenmiştir (5,6). MM tedavisinde kortikosteroidler, alkilleyici ajanlar, antrasiklinler, proteozom inhibitörleri (bortezomib, karfilzomib, iksazomib), immünomodülatör ilaçlar (talidomid, lenalidomid, pomalidomid), histondeasetilaz inhibitörleri (panobinostat) ve monoklonal antikorların (daratumumab, elotuzumab) farklı kombinasyonları ile otolog kök hücre nakli kullanılır (4).

MM tedavisine yaklaşımda hastanın yaşı (65 yaş), fit olup olmaması, komorbiditelerinin varlığı, olumsuz prognostik faktörlerinin varlığı, yaşam beklentisi, sosyal olanakları, isteği ve tedaviye erişebilme olanakları belirleyicidir. Genel yaklaşım; fit ve komorbiditerleri olmayan hastalara 4-6 siklus IMiD ve PI kombinasyonu ilaçlar verildikten sonra en azından çok iyi kısmi remisyon elde edilen hastalarda otolog kök hücre nakli

uygulanması şeklindedir. Kök hücre nakli sonrası hastalar 100. günde yeniden değerlendirilir. Eğer minimal reziduel hastalık var ise veya hasta tedavi öncesi yüksek risk grubunda ise indüksiyon tedavisinde kullanılan ilaçlar 2-4 kez daha verilerek konsolidasyon tedavisi yapılabilir (merkezler arası görüş ayrılığı olabilir). Daha sonra da hastalara en az 2 yıl süre ile idame tedavisi uygulanır. İdame tedavisi için genellikle lenalidomid tercih edilir ise de iksazomib de etkili olabilir. Fit olmayan ve/veya yaşlı transplantasyona uygun olmayan hastalarda melfalan-prednizolon-bortezomib veya melfalan-prednizolon-talidomid kombinasyonları etkin tedavi rejimleridir. Bazı merkezler COVID-19 döneminde hastaneye gelme sıklığını azaltmak için bortezomib yerine iksazomib kullanımını tercih etmiştir. Transplantasyona uygun olmayan hastalarda proteozom inhibitörü-lenalidomid-deksametazon tedavisinin diğer kombinasyonlara üstün olduğu bilinmektedir. Bu grupta tedavi süresi tartışmalıdır. Genel olarak kabul edilen görüş en az 12 ay süre ile tedavidir. İdame veya devamlı tedavi yeni yaklaşım şekli olarak rağbet görmektedir. Son zamanlarda monoklonal antikorların ilk seçenek tedaviye eklenmesinin yararlı olduğu gösterilmiştir (7).

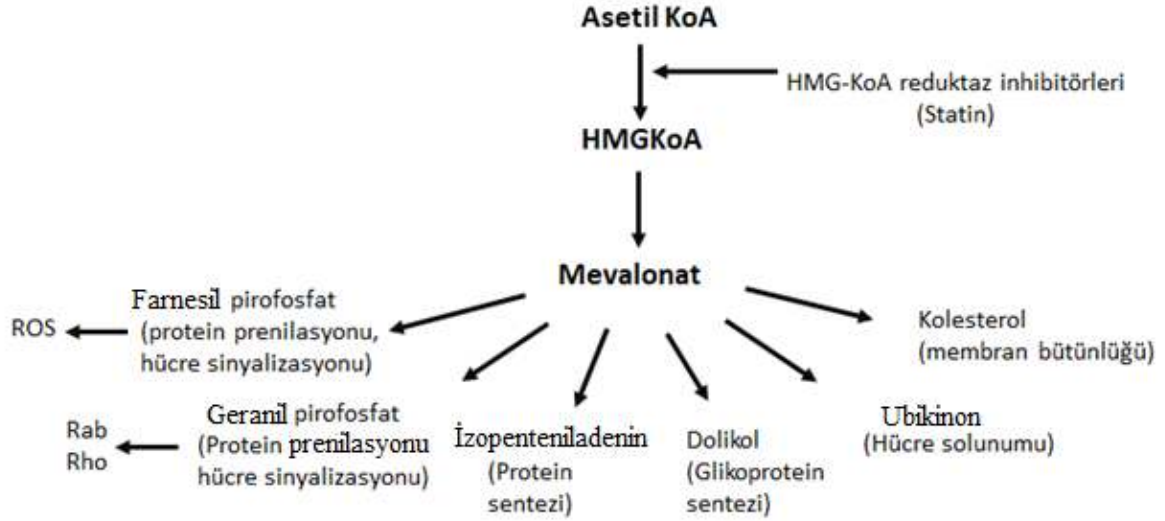
MM'de gerek indüksiyon tedavisinde ve gerek ise relaps olan hastalarda PI olmaz ise olmaz ilaç grubundadır. Bu grupta başlıca bortezomib, iksazomib ve karfilzomib bulunur. Bortezomib'in MM hücrelerinde apoptozu ve osteoklastları uyardığı ve osteoblast farklılaşmasına neden olduğu gösterilmiştir (8).Yeni ilaçların tedaviye katkısına rağmen gerek yeni tanı ve gerekse relaps refrakter MM hastalarında yeni tedavilere bilhassa da ekonomik yük getirmeyen kolay kullanılabilir ilaçlara gereksinim vardır.

1.3. Statinler ve malign hastalık ilişkisi

HMG-CoA redüktaz (3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A) inhibitörleri olarak da adlandırılan statinler içinde en iyi bilinenleri atorvastatin, lovastatin, pravastatin ve simvastatindir. Statinler plazma kolesterol seviyesini düşürmesi ve kardiovasküler hastalık risklerini azaltması nedeni ile dünyada çok yaygın reçete edilen bir ilaç grubudur (9).

Statinler mevalonat yolağının ilk basamağında HMG-CoA redüktaz enzimini inhibe ederler. Mevalonat yolağı hücre homeostazında etkilidir. Bu yolağın son ürünleri, bir dizi temel hücresel fonksiyon için gereklidir. Bunlar arasında membran bütünlüğü ve steroid üretiminde rol alan kolesterol, elektron taşınması ve hücre solunumu ile ilgili ubiquinon (koenzim Q) protein prenilasyonu ve hücre haberleşmesinde görevli farnesil ve

geranilgeranil izoprenoidler; glikoprotein sentezi için gerekli olan dolikol ve protein sentezi için gerekli olan izopenteniladenin bulunmaktadır (10).



Şekil 1. Mevalonat yolağı ve son ürünleri(11)

Statinler, HMG-CoA redüktaz enzimini inhibe ederek kolesterol dışındaki mevalonat yolağının ürünleri olan, farnesil pirofosfat ve geranilgeranil pirofosfat sentezini baskılar. Statinler, geranilgeranilasyonun inhibisyonu yoluyla myelom hücrelerinde apoptozu indükler ve hücre proliferasyonunu inhibe eder (12,13). Statinlerin etkileri apoptotik, immünosupresif, anti-trombotik, anti-anjiyojenik ve onkoprotektif olarak bilinmektedir (14).Yüksek doz statinin tümör hücrelerinin apoptozunu tetiklediği de gösterilmiştir (15).

Birçok kanser hücrelerinin gelişimi ve hayatta kalımı izoprenoidlerin biyosentezine bağlıdır (16). Bu özelliklerinden başka statinler değişik kemoterapötik ajanlara karşı malign hücreleri sensitize edebilir (17). Statin kullanan hastalarda malignite insidansında azalma olduğunun gözlenmesi bu ilaçların antineoplastik özelliklerinin olabileceği fikrini ortaya çıkarmıştır (18).

HMG-CoA redüktaz inhibitörü olan lovastatin proliferasyon inhibisyonu ve apoptoz indüksiyonu ile hücre ölümüne sebep olurken deksametazon ile birlikte kullanıldığında hücre ölümünün indüksiyonunda sinerjik etkiye sahiptir (19). Schmidmaier ve ark (20) 2004 yılında HMG-Co Aredüktaz inhibitörü simvastatinin MM'de Rhokinaz aktivasyonu ve Rho protein geranilgeranilasyonu ile hücre adezyon aracılıklı ilaç direncini (cell adhesion

mediated drug resistance:CAM-DR) engellediğini, daha sonra da simvastatin ve zolendronat ile mevalonat yolağının bloke etmesinin sinerjik olarak apoptozu indüklediğini ve CAM-DR'ı tersine çevirdiğini göstermiştir (21).

Farnesil transferaz inhibitörleri (FTI) ve geranilgeranil transferaz inhibitörlerinin (GGTI) tek başına ve lovastatin ile birlikte kombinasyonlarıyla yapılan ve anti-myelom etkilerinin araştırıldığı çalışmada FTI-lovastatin ve FTI-GGTI kombine tedavilerinin myelom hücre proliferasyonunu inhibe ettiği saptanmıştır (22). RPMI-8226 ve U266 hücre dizilerinde lenalidomid ve simvastatin kombinasyonunun RPMI-8226 ve U266 hücre dizilerinde sinerjistik etkiyle hücre canlılığında azalma ve apoptoz indüksiyonuna yol açtığı gösterilmiştir (23).

Li (24) ve Sato (25) fare hücre serilerinde myelom hücrelerinin büyümesi için kolesterole gereksinim olduğunu ortaya koymuştur. Faz 1-2 çalışmalarda statin kullanan kişilerde kanser insidansının daha düşük olduğu rapor edilmiştir (26). İnsanlarda statinlerin anti-myelom aktivitesini inceleyen ilk faz II çalışmada, 6 myelom hastasında 3. ve 4. Siklülarda simvastatin kemoterapi ile eş zamanlı uygulanmış ve HMG-CoA redüktaz inhibisyonunun hem ilaç direncini azalttığı hem de relaps refrakter myelom hastalarında ilaç direncinin yenilebileceği rapor edilmiştir (27). Kliniğimizce daha evvel yapılan çalışmada myelomda hastalık evresi ile kolesterol düzeyleri arasında bir ilişki olduğu gösterilmiş; bu duruma kolesterolün tümör hücreleri tarafından kullanılmasının neden olabileceği ve bu nedenle de statin tedavisinin myelom tedavisinde yarar sağlayabileceği ifade edilmiştir (28).

MM tanısı almış 5922 ABD emekli asker hastalarla yapılan statin ile ölüm ilişkisinin araştırıldığı çalışmada, statin kullanımının ölüm riskinde %21 azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir (29). Brånvall ve ark.nın (30) İsveç toplumunda 1 Ocak 2007- 31 Aralık 2013 tarihleri arasında tanı almış 4315 MM vakası ile yapmış oldukları, statin kullanımı ve doz yoğunluğu ile MM sağ kalımı arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmalarında statin kullanımının MM'ye bağlı ölümleri azalttığı gösterilmiştir. Bu çalışmada doz artışının ölümleri azaltmada etkili olduğu vurgulanmıştır (30).

Zhang ve Liu (31) yapmış oldukları meta-analizde statin kullanımının MM patogenezi için koruyucu bir faktör olabileceğini vurgulamaktadır. Bu çalışmada statin kullanımının Kafkas ırkında MM riskini azalttığı ancak Asyalılarda ilacın myelom üzerine bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Ancak bu yayın ile ilgili tartışma mevcuttur ve Asyalılar üzerinde çalışmaların yetersizliği olduğu belirtilmektedir (31).

2. AMAÇ

MM tedavisinde yeni ajanlar tedavi başarısını artırsa da hastalığın inkürabl olması nedeni ile hala yeni ve farklı yolları etkileyen ajanlara gereksinim olduğu aşikardır. Statin kullanan hastalarda malign hastalıkların daha az görüldüğü göz önüne alınarak bu çalışmada kolesterol sentezinden sorumlu ve hücre proliferasyonunda önemli rol oynayan mevalonat yolağı üzerine etki gösteren statinlerin, bortezomib ile beraber etkisinin hastalığın tedavisine katkısının olup olmayacağı araştırıldı. MM hücre kültüründe statinlerin bortezomib ile beraber kullanıldığında plazma hücreleri üzerine etkisinin incelenmesi amaçlandı.



3. MATERYAL METOD

İlk olarak bortezomib ve atorvastatinin doz titrasyonu elde edildi. Daha sonra çalışma gurupları oluşturularak hücre kültürlerindeki etkileri incelendi. Elde edilen sonuçlar hücre canlılığı ve apoptoz yönünden değerlendirildi.

3.1. Çalışma guruplarının oluşturulması

Çalışma 4 gurup üzerine kuruldu.

1. Grup: Kontrol gurubu
2. Grup: Saf atorvastatin gurubu
3. Grup: Saf bortezomib gurubu
4. Grup: Bortezomib ve atorvastatin kombinasyonu şeklinde idi.

3.2. Hücre kültürü

Amerikan Tipi Hücre Koleksiyonu olan (ATCC) Myelom U266 hücre hattı İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsünden temin edildi. Hücreler RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640, Sigma) besi yerinde %10 ısı ile inaktive edilmiş Fetal Sığır Serum, 100 U / ml penisilin (Gibco), 100 mg / ml streptomisin (Gibco), 200 mM L-glutamin ortamında ve %5 CO₂, 37 °C atmosferde ve 75 cm² polistiren flasklarda büyütüldü. Hücreler %90 konfluente ulaştığında pasajlanarak çoğaltıldı. Hücre kültürü malzemeleri İnterlab ve İdea'dan temin edildi.

3.3. MTS/PMS deneyi

Thoma lamı kullanılarak Tripan mavisi ile hücre canlılığı doğrulandıktan sonra, hücreler 100 µl nihai hacimde yaklaşık 1×10^4 hücre/kuyucuk şekilde ekildi. Bortezomib (100, 200, 300, 400, 600, 800 ve 1000 nM) ve atorvastatin (5, 10, 20, 40, 80, 100 ve 200 µM) konsantrasyonlarda işleme alındı. Deney ilaçlarının uygulamasından sonra, bortezomib ve atorvastatinin yarı maksimum inhibitör konsantrasyona (IC₅₀) sahip değerleri belirlendi. IC₅₀ değerleri GraphPad Prism programı kullanılarak belirlendi. Plakalar, 24 ve 48 saat boyunca %5 CO₂ inkübatöründe 37 ° C'de inkübe edildi. Bu süre zarfında ortam yenilenmedi. İnkübasyonun sonunda, 20 µl MTS/PMS (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-

karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfenil)- 2H tetrazolyum/fenazinmetosülfat (Promega) her kuyuya eklendi ve plakalar 4 saat daha 37 ° C'de inkübe edildi. Absorbans, bir mikroparka okuyucu (DTX 880 Multimode Reader, Beckman Coulter, ABD) kullanılarak 490 nm'de ölçüldü. Her bir doz için üçlü deneylerin ortalaması, IC50 değerlerini hesaplamak için kullanıldı.

3.4. Akım sitometri

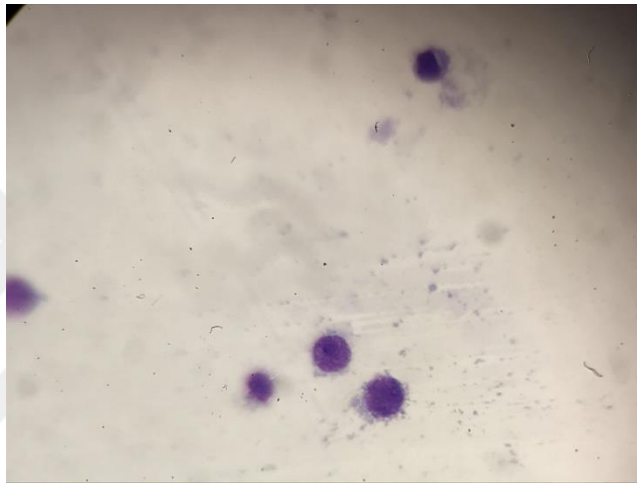
Akım sitometri deneyine hazırlık için hücreler 75 cm²'lik flasklara ekildi. Konflüente ulaştığında hücreler santrifüj edilerek toplandı. Thoma lamı kullanılarak 6-kuyucuklu plakanın her kuyucuğuna 50.000 hücre ekildi. Ardından hücreler atorvastatin 100 mM, bortezomib 800 µM ve atorvastatin + bortezomib kombinasyonu ile 48 saat inkübe edildi. Örneklendirme kabına 100 µl örnek ve 2 cc PBS (fosfat buffer salin) koyuldu, 500 RPM de 5 dakika +4 ° C sıcaklıkta santrifüj edildi, süpernatant atıldı. Binding bufferden 100 µl alındı, 1/10 oranında sulandırıldıktan sonra örneklendirme kabına eklenip karıştırıldı. Anneksin 10 µl ilave edildi. Üzerine 20 µl 7-AAD (7-amino aktinomisin) eklendi. Karanlık alanda 15 dakika bekletildi. Sonrasında örneklendirme kabına 400 µl binding bufferden ilave edilerek karıştırıldı. Beckman Coulter Navios 3L10C cihazında okutuldu. Deneyler kontrol grupları için de yapıldı.

3.5. İstatistik

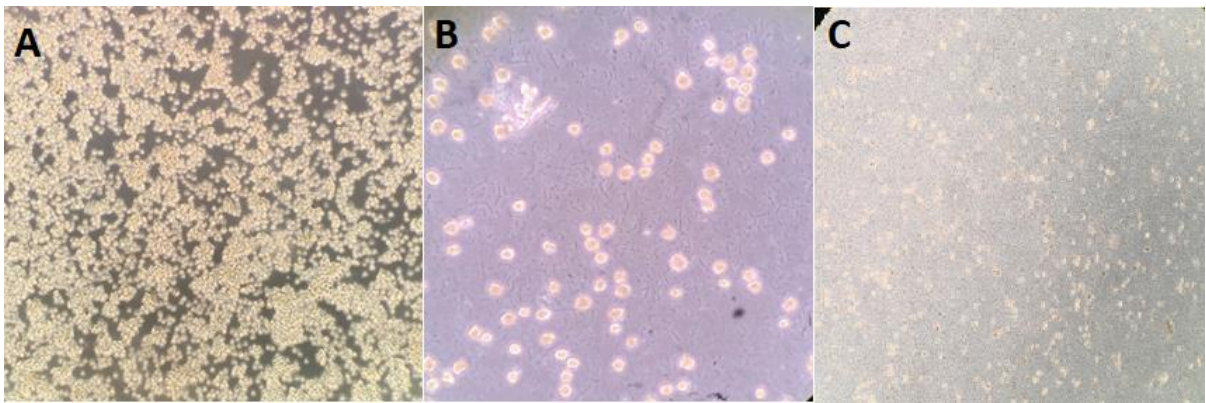
Veriler SPSS 21 programı kullanılarak analiz edildi. Normallik dağılımının analizi için Kolmogorov-Smirnov testi kullanıldı ve dağılım analizine göre sayısal veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi. İki grup arasındaki istatistiksel farkı belirlemek için Independent Samples-T test; 3 veya daha fazla gruplar arasındaki farkı belirlemek için de One-way ANOVA testi kullanıldı. P<0,05 değeri istatistiksel anlamlı kabul edildi.

4. SONUÇLAR

Hücre kültürü teknikleri ile in vitro olarak çoğaltılan U266 MM hücreleri Giemsa boyama tekniği ile boyandı. Hücreler ışık mikroskobu altında incelendi (Resim 1). Ayrıca in vitro olarak çoğaltılan U266 hücre dizisi, deneylerin yapılma süreci içerisinde ışık mikroskobu altında morfolojik olarak sürekli incelendi. Bu sayede hücrelerin canlılık ve kontaminasyon açısından değerlendirilmesi sağlandı (Resim 2). Hücreler deneyler öncesi hücre sayısının belirlenmesi için Thoma lamı ile sayıldı (Resim 3).



Resim 1. İşlem öncesi U266 hücre hattında plazma hücrelerinin May Grünwald-Giemsa boyama ile ışık mikroskoptaki görünümü (1x100)

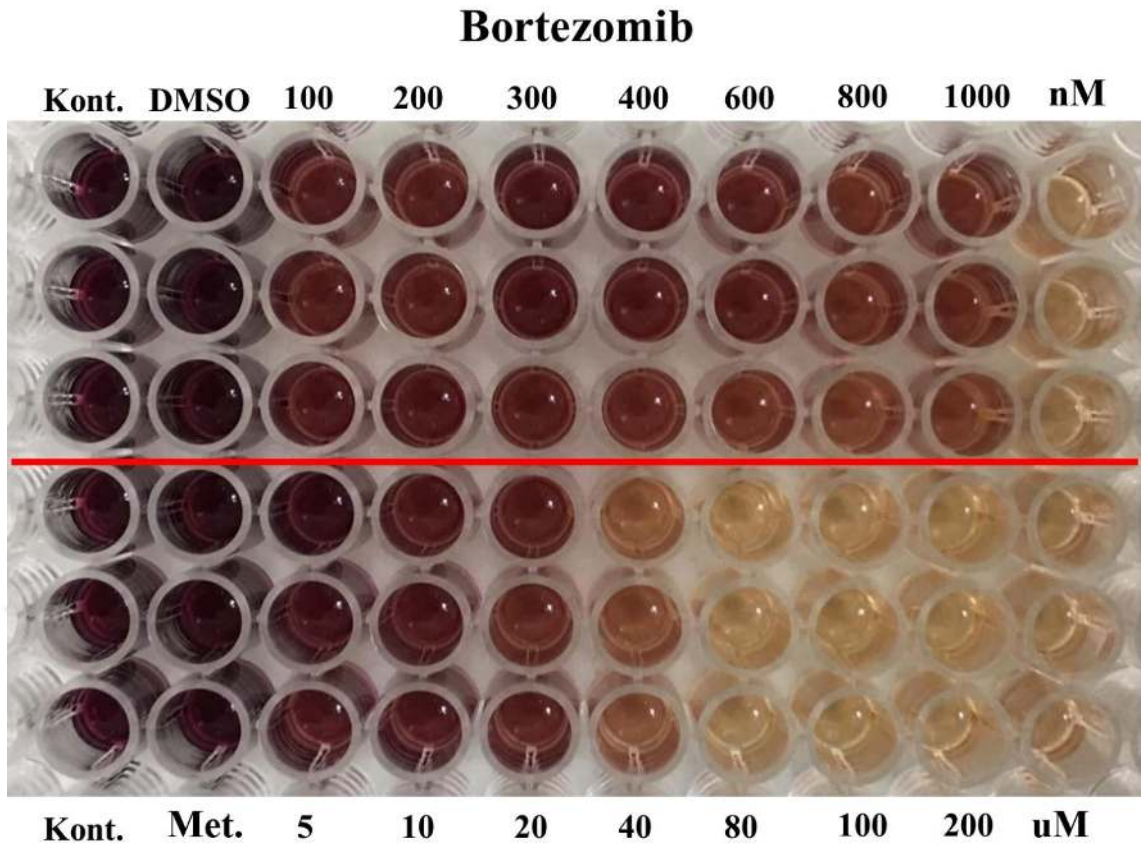


Resim 2. Konfluent ulaşmış U266 hücreleri (1x10), B: Bakteriyel kontaminasyona sahip U266 hücreleri (1x10), C: Fungal kontaminasyona sahip U266 hücreleri (1x10)



Resim 3. Thoma lamında U266 hücrelerinin görünümü

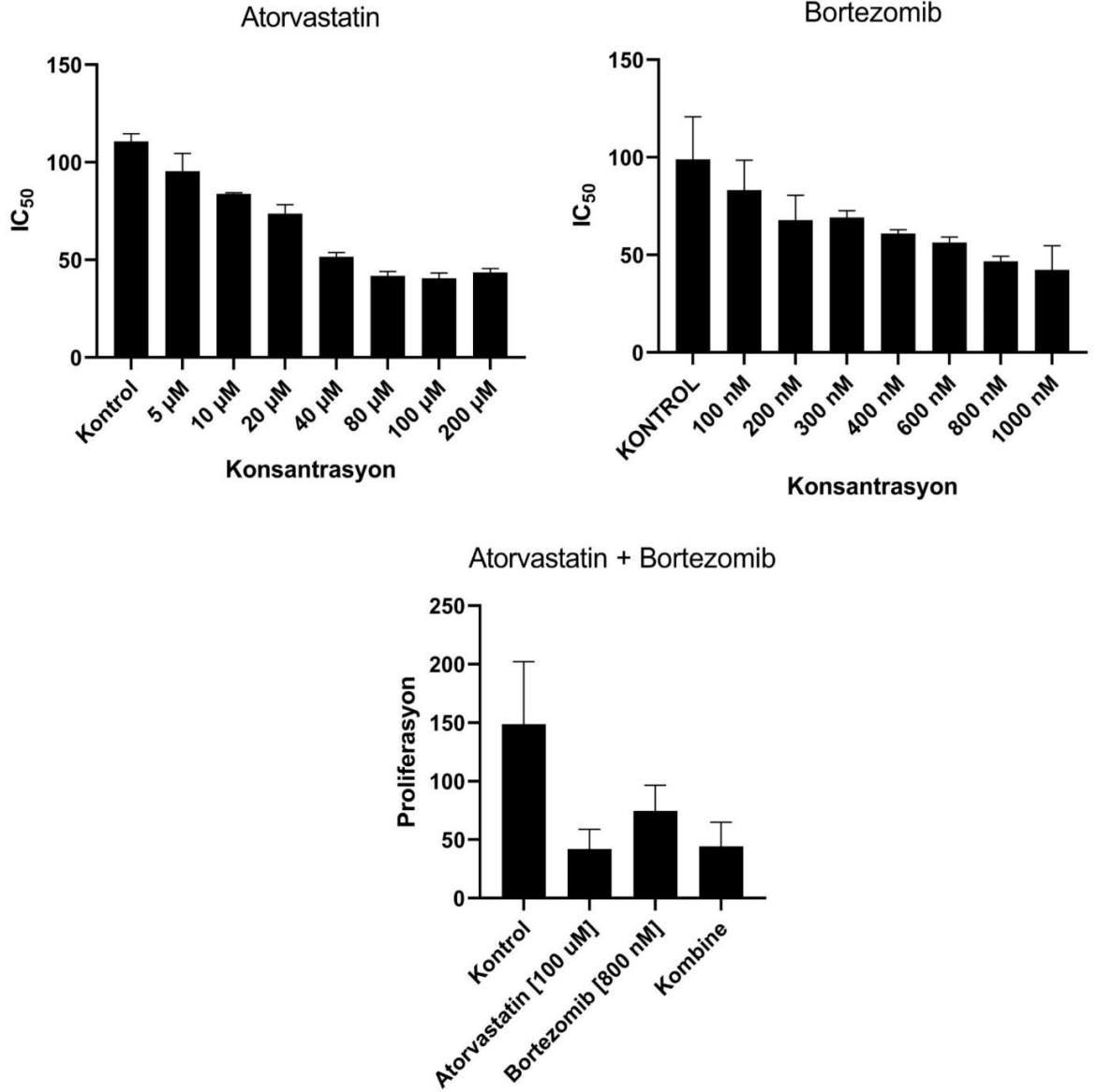
MTS/PMS deneyinde atorvastatinin U266 hücrelerinde proliferasyonu engellediği ve hücre canlılığında azalmayı indüklediği gözlemlendi. Atorvastatinin neden olduğu sitotoksikite doza (5-200 μM) bağımlıydı. Atorvastatin U266 hücrelerinde 40 μM ve üzerindeki konsantrasyonlarda sitotoksik etki gösterdi (Şekil 2A). Diğer taraftan bortezomib de U266 hücrelerinde sitotoksik etki gösterdi ise de bu etki atorvastatinden farklı olarak doza bağımlı değildi (Şekil 2B). Bortezomib ile yarı maksimum inhibisyon konsantrasyonu 800 nM dozunda elde edildi. Atorvastatinin ise yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu 100 μM olarak belirlendi. Ayrıca U266 hücrelerinde atorvastatin + bortezomib kombinasyonunun tek başına bortezomib muamelesine göre önemli sitotoksikite sergilediği bulundu. Her iki ilaç için yarı maksimum inhibisyon konsantrasyonunun kombinasyonu tek kullanımlara kıyasla sitotoksikiteyi arttırdı (Şekil 2C).



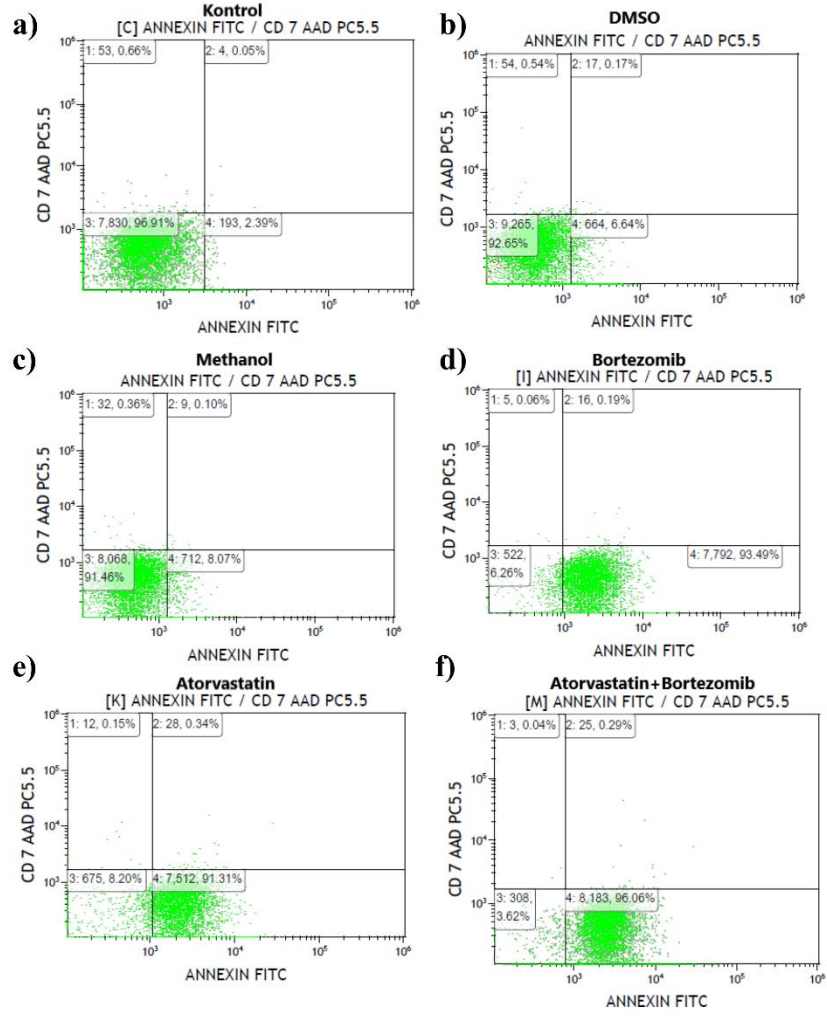
Canlılık

Resim 4. MTS/PMS deneyinde bortezomib ve atorvastatinin artan konsantrasyonlarında renk değişiminin gözlenmesi

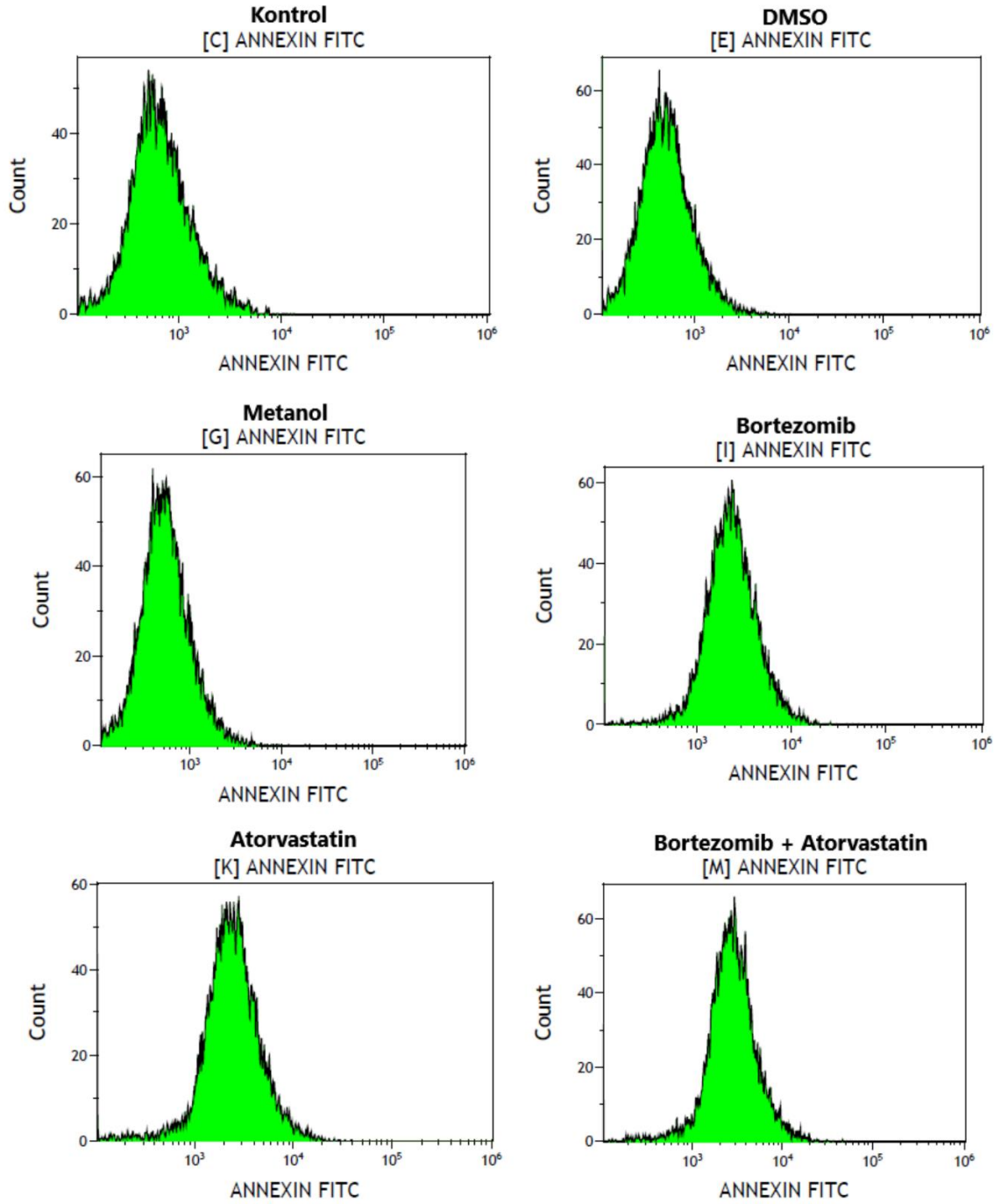
Akım sitometri incelemede tek başına atorvastatin, tek başına bortezomib ve atorvastatin + bortezomib kombine uygulamasında kontrol grubuna göre belirgin apoptoz tespit edildi (ŞekiB). Kontrol gruplarında (sadece besiyeri ile muamele edilen) hücrelerin canlılığını koruduğu saptandı, hücrelerde canlılık oranı %96,91 idi. Tek başına bortezomib uygulanan ve akım sitometri cihazında sayılan 7792 hücrenin %93,4'ünde (7470 hücre) apoptoz saptandı ($p<0,001$). Tek başına atorvastatin uygulanan 7512 hücrenin %91,31'inde (6692 hücre) apoptoz mevcut iken ($p<0,001$) bortezomib + atorvastatin kombine ilaç uygulanan 8183 hücrenin %96,06'sında (7821 hücre) apoptoz saptandı ($p<0,001$). Tek başına bortezomib grubuna göre kombine ilaç grubunda apoptoz açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır ($p=0,008$).



Şekil 2. Atorvastatin'in U266 hücrelerindeki sitotoksik etkisi. B.Bortezomib'in U266 hücrelerindeki sitotoksik etkisi. C.U266 hücrelerinde Atorvastatin ve Bortezomib'in kombinasyonunun sitotoksik etkisi



Şekil 3. Akım sitometrisi ile U266 hücrelerindeki atorvastatin, bortezomib ve kombinasyon tedavisinin apoptoz üzerindeki etkisi. a) Kontrol grubunda 7830 (%96,91) canlı hücre mevcut; b) DMSO grubunda 9265 hücre (%92,65) canlı, c) methanol grubunda ise 8068 hücre (%91,46) canlı d) Sadece Bortezomib uygulanan deney grubunda 7792 (%93,49) hücre erken apoptotik fazda; e) Sadece atorvastatin uygulanan grupta 7512 (%91,31) hücrenin erken apoptotik fazda idi; f) Kombinasyon tedavisinde (Atorvastatin+Bortezomib) 8183 (%96,06) hücrenin erken apoptotik fazda olduğu gözlemlendi.



Şekil 4. Akım sitometride gruplar arası Annexin – FITC ile boyanma. İlaç gruplarında kontrol gruplarına göre belirgin boyanma izlenmekte

5. TARTIŞMA

MM tedavisinde iyileşme olmasına rağmen hastalık kürabl değildir. Yeni ilaçların keşfi ile tedavi etkinliğinde artma sağlanabilmişken gelişen yan etkilerin yönetimi de büyük önem taşımaktadır. Daratumumab gibi monoklonal antikorların kullanılması ile tedavi başarısında iyileşme olmasına rağmen ilacın maliyeti, hastanede uygulanma zorunluluğu ve infüzyon reaksiyonu gibi yan etkiler ilacın kullanımını sınırlamaktadır. Günümüzde MM tedavisinde pratik, kolay uygulanabilir (tercihen oral), yan etki oranı düşük ve maliyet etkin yeni ilaçlara ihtiyaç olduğu açıktır.

Statinlerin antineoplastik özellikleri farklı malign hastalıklarda araştırılmıştır. Doksanlı yılların başından bu yana Statinlerin antikanser özelliğine de sahip olduğu bilinmekte ancak kanser tedavisinde statin kullanımının ne derece yararlı olduğu tartışma konusu olmaya devam etmektedir (32). Statinlerin antineoplastik etkisi, hücre kültürü ve hayvan modellerinde kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiştir. Statinlerin kanser tedavilerinde uygulanmasına ilişkin yayınlanmış çalışmaların büyük çoğunluğu, retrospektif kohort çalışmaları veya gözlemsel çalışmalarda belirli kanser türleri için elde edilen verilerin meta-analizlerinden oluşmaktadır. Hastaların kanser tanısından önce statin kullanım durumunu araştıran çalışmalar, teşhisten önce statin kullanımının pankreas kanseri, özofagus adenokarsinomu ve beyin kanseri riskinin daha düşük olmasıyla ilişkili olduğunu ancak meme kanseri, prostat kanseri veya endometriyal kanser ile ilişkili olmadığını göstermiştir (33-38). Tanıdan önce düzenli statin kullanımının, pankreas kanseri, mide kanseri, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu, meme kanseri, akciğer kanseri, serviks kanseri, prostat kanseri, böbrek kanseri ve endometriyal kanser hastalarında sağkalımı statin kullanmayan veya düzenli kullanmayanlara kıyasla orta derecede uzattığı gösterilmiştir (39-46).

Hematolojik malignitelerde de statinlerin anti-neoplastik etkileri araştırılmıştır. Xia ve ark. (47) akut myeloid lösemi (AML) hücrelerinde lovastatinin apoptoz mekanizmasında kritik bir rol oynadığı sonucuna varmışlardır. Yine Weide ve ark. (48) yüksek doz simvastatinin yeni tanı konan veya nükseden AML hasta gruplarında akut myeloid lösemi blast hücreleri üzerindeki etkinliğini araştırmış ve simvastatin tedavisinin geranilgeranilasyon inhibisyonu ile kemosenesitizasyonu arttırdığını bildirmişlerdir. Yavaşoğlu ve ark. ise (49) kronik lenfositik lösemili hastalarda kolesterol yüksekliği ve hastalık evresi arasında ilişki olduğunu göstermişlerdir.

Pradelli ve ark. (50) statin kullanımı ile hematolojik malignite alt grupları arasındaki riski inceledikleri gözlemsel meta-analizlerinde; lösemi ve lenfoma riskinde anlamlı azalma bulurken, MM riskinde istatistiksel anlamlılık saptamamıştır. Epstein ve ark. (51) Kanser Araştırma Ağını (Cancer Research Network) kullanarak yaptıkları çalışmalarında MM tanısından 48-72 ay önce başlanmış olan statin kullanımının, kullanmayanlara kıyasla MM gelişme riskini %20-28 oranında azalttığını göstermişlerdir. Statin kullanımına yakın zamanda başlanması ise MM riski ile ilişkili bulunmamıştır. Ponvilawan ve ark. (52) yaptıkları statin ve MM arasındaki ilişkiyi inceleyen kapsamlı meta-analiz çalışmasında statin alan hastalarda MM riskini, statin almayanlara göre anlamlı derecede daha düşük saptamıştır.

Dmoszynska ve ark. (53) hücre kültür çalışmalarında sadece lovastatin veya sadece talidomid ile indüklenen apoptoza kıyasla lovastatin + talidomid tarafından indüklenen daha yüksek apoptoz oranı tespit etmişlerdir. Janosi ve ark. (54) yaptığı çalışmada ise mevastatinin U266 insan myelom hücrelerinde hücre döngüsü duraklaması ve kaspaz 3 bağımlı apoptozu indüklediği bulunmuştur. Terzi ve ark. (55) U266 myelom hücre hattında statinlerin sitotoksik etkilerini karşılaştırmış, simvastatin ve atorvastatinin güçlü antikanser aktivite gösterdiğine dikkat çekmişlerdir.

Literatür taramasında statin ve standart kanser terapilerinin beraber yapıldığı faz III çalışmalarında sağkalım ve progresyonsuz sağkalım üzerinde anlamlı bir sonuç elde edilmediği görüldü. Farklı statin ilaçlarının kendi aralarında ve ekstrahepatik dokularda birikme özellikleri arasında farklılıklar bulunmaktadır (18). Bu ilaçlar oldukça geniş bir aile olmasına rağmen, bu ailedeki ajanların gösterdiği pleiotropik etkiler birbirinden farklı olabilir. Bu durum ileride yapılacak olan araştırmalarda statin seçiminin ve statinlerin kemoterapi ilaçlarıyla farklı kombinasyonların araştırılması gerekliliğinin önemini göstermektedir.

Bu uzmanlık tezi MM hastalığının tedavisinde statin kullanımının etkinliği/güvenilirliği ve atorvastatinin mevcut standart tedavi olan bortezomib ile birlikte etkinliğinin araştırılması için yapıldı. Atorvastatinin MM hücre hattındaki sitotoksik etkisi ve apoptoz üzerine etkisi incelendi. Sonuçlar atorvastatinin güçlü antikanser aktivite gösterdiğini ortaya çıkardı. Çalışmamızda ‘Kontrol, Bortezomib, Atorvastatin ve Bortezomib+Atorvastatin’ olmak üzere toplam 4 grup dizayn edildi. Atorvastatin 5 ile 200 µM arasında doza bağımlı bir şekilde etki gösterdi. Diğer yandan 100 ile 1000 nM arasında

değişen dozlardaki bortozemibte doza bağımlı bir etki görülmedi. Optimum dozlarda hem bortezomib hem de atorvastatinin birlikte kullanıldığı grupta ise atorvastatinin bortezomibin etkisini arttırdığı gözlemlendi. Ayrıca aynı deney gruplarında akım sitometri ile Annexin V kullanılarak hücrelerin apoptoz oranları belirlendi. Atorvastatin ve bortezomibin birlikte muamelesi tek başına bortezomib kullanımından daha etkili bir apoptoz sağlamıştır.

Bizim sonuçlarımız U266 hücre hattında atorvastatinin antikanser özelliği olduğunu gösterdi. Elde edilen bulgular, MM tedavisinde bortezomibin statinler ile kullanımının önünün açılabilceğini göstermektedir. Yaptığımız çalışmanın sonuçları ve diğer çalışmalar da göz önüne alındığında statinlerin MM tedavisinde kullanılabilmesinin yararlı olabileceği kanaatindeyiz. Bir ajan olarak statinlerin MM üzerindeki etkileri in-vivo olarak da kanıtlanabilirse daha ileri klinik çalışmalar için gösterge olabilir.

Sonuçta uzmanlık tezi olarak yapılan bu çalışmada in-vitro olarak atorvastatinin ve bortezomib ile kombinasyonunun myelom hücre dizisindeki etkilerini inceledik. Tek başına atorvastatin myelom hücre serilerinde hem hücre proliferasyonunda azalma ve hem de apoptozda indüklemeye oluşturdur. Atorvastatinin bortezomib ile beraber kullanılması ise tek başına bortezomib kullanımından daha çok hücrenin apoptoz ile indüklenmesine neden oldu. Bu sonuçlar atorvastatin ile bortezomibin sinerjistik etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Atorvastatinin myelom hücre serilerindeki bu etkileri ilacın myelom tedavisinde özellikle standart tedavilere yanıt vermeyen hastalarda bir umut olabileceğini destekler niteliktedir. İlacın tüm dünyada yaygın olarak kullanılması, kolay elde edilmesi, ucuz ve yan etki profili açısından güvenli sayılması henüz kürahl olmayan ve tedavi seçenekleri pahalı olan MM hastalığında kullanılabileceğini düşündürmektedir. Özellikle kardiyovasküler ve dislipidemi komorbiditesi olan refrakter MM tanılı hastalarda atorvastatin tedavide değerlendirilebilir bir ajan olabilir.

İn-vitro çalışmamızın sonuçlarına bakıldığında farklı myelom hücre serileri üzerinde atorvastatin ve diğer statin türlerinin araştırılması ve kıyaslanması ardından statinlerin myelomlu hastalarda kullanılabilir düşüncesinin klinik çalışmalar ile desteklenmesi yararlı olacaktır.

6. ÖZET

MYELOM TEDAVİSİNDE STATİNLER BORTEZOMİB'İN ETKİSİNİ ARTIRIYOR MU?

Amaç - hipotez: Multipl myelom tedavisinde kür sağlanamaması nedeni ile yeni ve farklı yolları etkileyen ajanlara gereksinim duyulmaktadır. Statin kullanan hastalarda malign hastalıkların daha az görülmesi statinlerin antineoplastik etkileri olabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmada kolesterol sentezinden sorumlu ve hücre proliferasyonunda önemli rol oynayan mevalonat yolağı üzerine etki gösteren statinlerin, bortezomib ile beraber etkisinin hastalığın tedavisine katkısının olup olmayacağı araştırıldı. MM hücre kültüründe statinlerin bortezomib ile beraber kullanıldığında plazma hücreleri üzerine etkisinin incelenmesi amaçlandı.

Yöntem: Çalışmada U266 myelom hücre serisi kullanıldı. Hücreler RPMI 1640 besiyerinde %10 ısı ile inaktive edilmiş Fetal Sığır Serum, 100 U / ml penisilin, 100 mg / ml streptomisin, 200mM L-glutamin ortamında ve %5 CO₂, 37 °C atmosferde ve 75 cm² polistiren flaklarda büyütüldü. Bortezomib ve atorvastatin için IC₅₀ değerleri belirlendi. Belirlenen dozlarda bortezomib, atorvastatin ve kombine ilaç uygulanarak MTS/PMS deneyi ile canlılık ve Annexin V-FITC ile apoptoz değerlendirildi.

Bulgular: MTS/PMS deneyi ile bortezomib, atorvastatin ve kombine ilaç gruplarında canlılığın azaldığı tespit edildi. Akım sitometri deneyinde ise tek başına bortezomib grubuna göre kombine ilaç grubunda apoptoz açısından istatistiksel anlamlı fark saptandı (p=0,008).

Sonuç: Çalışmanın sonucunda atorvastatin ile U266 MM hücre serisinde canlılıkta azalma ve apoptozda indüklenme izlendi. Bununla birlikte MM tedavisinde kullanılan bortezomib ile atorvastatin birlikte uygulandığında, bortezomibin etkinliğini arttırdığı saptandı. Farklı statinler ile farklı MM hücre serilerinde yapılacak daha fazla in vitro çalışma, faz III çalışmaları için yol gösterici olacaktır.

Anahtar kelimeler: Multipl Myelom, Atorvastatin, Bortezomib

7. SUMMARY

DO STATINS IMPROVE THE EFFECT OF BORTEZOMIB IN MYELOMA TREATMENT?

Objective - hypothesis: There is still a need for agents that affect new and different pathways due to the incurability of the disease. Considering that malignant diseases are less common in patients using statins, in this study, it was investigated whether the effect of statins, which act on the mevalonate pathway, which is responsible for cholesterol synthesis and plays an important role in cell proliferation, together with bortezomib, will contribute to the treatment of the disease. It was aimed to examine the effects of statins on plasma cells when used together with bortezomib in MM cell culture.

Method: U266 myeloma cell line was used in the study. Cells were grown in RPMI 1640 medium in %10 heat-inactivated Fetal Bovine Serum, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 200 mM L-glutamine and %5 CO₂, 37 °C atmosphere and 75 cm² polystyrene flasks. IC50 values of bortezomib and atorvastatin were determined. Viability with MTS/PMS assay and apoptosis with Annexin V-FITC were evaluated by administering the determined doses of bortezomib, atorvastatin and combined drug

Results: Viability decreased in bortezomib, atorvastatin and combined drug groups with MTS/PMS experiment. In the flow cytometry experiment, a statistically significant difference was found in the combined drug group in terms of apoptosis compared to the bortezomib group alone (p=0,008).

Conclusion: As a result of the study, a decrease in viability and induction of apoptosis were observed in the U266 MM cell line with atorvastatin. However, when bortezomib and atorvastatin used in the treatment of MM were administered together, it was found that bortezomib increased its effectiveness. Further in vitro studies with different statins in different MM cell lines will guide phase III studies.

Keywords: Multiple myeloma, Bortezomib, Atorvastatin

8. KAYNAKLAR

1. Kumar SK, Rajkumar V, Kyle RA, van Duin M, Sonneveld P, Mateos MV et al. Multiple myeloma. *Nat Rev Dis Primers* 2017;3:17046. doi: 10.1038/nrdp.2017.46.
2. Brigle K, Rogers B. Pathobiology and diagnosis of multiple myeloma. *Semin Oncol Nurs* 2017;33:225-236.
3. Drayson M, Tang LX, Drew R, Mead GP, Carr-Smith H, Bradwell AR. Serum free light-chain measurements for identifying and monitoring patients with nonsecretory multiple myeloma. *Blood* 2001;97:2900-2.
4. Pinto V, Bergantim R, Caires HR, Seca H, Guimarães JE, Vasconcelos MH. Multiple Myeloma: Available therapies and causes of drug resistance. *Cancers (Basel)* 2020;12 407. doi: 10.3390/cancers12020407.
5. Singhal S, Mehta J, Desikan R, Ayers D, Roberson P, Eddlemon P, et al. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 1999;341:1565-71.
6. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, Irwin D, Stadtmauer EA, Facon T et al. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med* 2005;352:2487-98
7. Zanzwar S, Nandakumar B, Kumar S. Immune-based therapies in the management of multiple myeloma. *Blood Cancer J* 2020;10:84. doi: 10.1038/s41408-020-00350-x.
8. Mohty M, Malard F, Mohty B, Savani B, Moreau P, Terpos E. The effects of bortezomib on bone disease in patients with multiple myeloma. *Cancer* 2014;120:618-23.
9. Zhang P, Liu B. Statin use and the risk of multiple myeloma: a PRISMA-compliant meta-analysis. *Ann Hematol* 2020;99:1805-12.
10. Wong WW, Dimitroulakos J, Minden MD, Penn LZ. HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. *Leukemia* 2002;16:508-19.

11. Hassanabad AF. Current perspectives on statins as potential anti-cancer therapeutics: clinical outcomes and underlying molecular mechanisms. *Transl Lung Cancer Res* 2019;8:692-99.
12. van de Donk NW, Kamphuis MM, van Kessel B, Lokhorst HM, Bloem AC. Inhibition of protein geranylgeranylation induces apoptosis in myeloma plasma cells by reducing Mcl-1 protein levels. *Blood* 2003;102:3354-62.
13. Cafforio P, Dammacco F, Gernone A, Silvestris F. Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells. *Carcinogenesis* 2005;26:883-91.
14. Zaleska M, Mozenska O, Bil J. Statins use and cancer: an update. *Future Oncol* 2018;14:1497-509.
15. Wong WW, Dimitroulakos J, Minden MD, Penn LZ. HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. *Leukemia* 2002;16:508-19.
16. Göbel A, Rauner M, Hofbauer LC, Rachner TD. Cholesterol and beyond - The role of the mevalonate pathway in cancer biology. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2020;1873:188351. 10.1016/j.bbcan.2020.188351.
17. Drucker L, Afensiev F, Radnay J, Shapira H, Lishner M. Co-administration of simvastatin and cytotoxic drugs is advantageous in myeloma cell lines. *Anticancer Drugs* 2004;15:79-84.
18. Longo J, van Leeuwen JE, Elbaz M, Branchard E, Penn LZ. Statins as anticancer agents in the era of precision medicine. *Clin Cancer Res* 2020; 26: 5791-5800.
19. van de Donk NW, Kamphuis MM, Lokhorst HM, Bloem AC. The cholesterol lowering drug lovastatin induces cell death in myeloma plasma cells. *Leukemia* 2002;16:1362-71.
20. Schmidmaier R, Baumann P, Simsek M, Dayyani F, Emmerich B, Meinhardt G. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin overcomes cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma by geranylgeranylation of Rho protein and activation of Rho kinase. *Blood* 2004;104:1825-32.

21. Schmidmaier R, Simsek M, Baumann P, Emmerich B, Meinhardt G. Synergistic antimyeloma effects of zoledronate and simvastatin. *Anticancer Drugs* 2006;17:621-9.
22. Morgan MA, Sebil T, Aydilek E, Peest D, Ganser A, Reuter CW. Combining p
renylation inhibitors causes synergistic cytotoxicity, apoptosis and disruption of
RAS-t o-MAP kinase signalling in multiple myeloma cells. *Br J Haematol.* 2005;130:912-
25.
23. van der Spek E, Bloem AC, Lokhorst HM, van Kessel B, Bogers-Boer L, van de Donk
NW. Inhibition of the mevalonate pathway potentiates the effects of lenalidomide in
myeloma. *Leuk Res* 2009; 33: 100-8.
24. Li JL, Li YJ, Chao YJ, Lin LX, Ouyang MH, Peng YB, et al. Cholesterol requirement
for growth of IR983F and P3X63-Ag8-U1 myeloma cells in serum-free medium. *Cytobios.*
1991;68:15-22.
25. Sato JD, Kawamoto T, Okamoto T. Cholesterol requirement of P3-X63-Ag8 and X63-
Ag8.653 mouse myeloma cells for growth in vitro. *J Exp Med.* 1987;165:1761-6.
26. E van der Spek, AC Bloem, NW van de Donk, LH Bogers, R van der Griend, MH
Kramer et al. Dose-finding study of high-dose simvastatin combined with standard
chemotherapy in patients with relapsed or refractory myeloma or lymphoma. *Haematologica*
2006;91:542-5.
27. Schmidmaier R, Baumann P, Bumeder I, Meinhardt G, Straka C, Emmerich B. First
clinical experience with simvastatin to overcome drug resistance in refractory multiple
myeloma. *Eur J Haematol* 2007;79:240-3.
28. Yavasoglu I, Tombuloglu M, Kadikoylu G, Donmez A, Cagiran S, Bolaman Z.
Cholesterol levels in patients with multiple myeloma. *Ann Hematol* 2008;87: 223-8.
29. Afzal A, Fiala MA, Gage BF, Wildes TM, Sanfilippo K. Statins reduce mortality in
multiple myeloma: a population-based us study. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*
2020;20:937-43.

30. Brånvall E, Ekberg S, Eloranta S, Wåsterlid T, Birmann BM, Smedby KE. Statin use is associated with improved survival in multiple myeloma: A Swedish population-based study of 4315 patients. *Am J Hematol* 2020;95:652-61.
31. Zhang P, Liu B. Statin use and the risk of multiple myeloma: a PRISMA-compliant meta-analysis. *Ann Hematol.* 2020;99:1805-12.
32. Matuszewicz L, Czogalla A, Sikorski AF. Attempts to use statins in cancer therapy: An update. *Tumour Biol.* 2020; 42: 32662332.
33. Zhang, Y., Liang, M., Sun, C., Qu, G., Shi, T., Min, M et al. Statin use and risk of pancreatic cancer: An updated meta-analysis of 26 studies. *Pancreas* 2019;48:142-50
34. Thomas T, Loke Y, Beales ILP. Systematic review and meta-analysis: Use of statins is associated with a reduced incidence of oesophageal adenocarcinoma. *J Gastrointest Cancer.* 2018;49:442-54
35. Chen BK, Chiu HF, Yang CY. Statins are associated with a reduced risk of brain cancer: a population-based case-control study. *Medicine (Baltimore).* 2016;95: 3392. 10.1097/MD.00000000000003392
36. Meijer D, van Moorselaar RJA, Vis AN, Bijnsdorp IV. Prostate cancer development is not affected by statin use in patients with elevated PSA levels. *Cancers (Basel).* 2019;11:953. 10.3390/cancers11070953.
37. Kantor ED, Lipworth L, Fowke JH, Giovannucci EL, Mucci LA, Signorello LB. Statin use and risk of prostate cancer: Results from the Southern Community Cohort Study. *Prostate* 2015;75:1384-93.
38. Sperling CD, Verdoodt F, Friis S, Dehlendorff C, Kjaer SK. Statin use and risk of endometrial cancer: a nationwide registry-based case-control study. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2017;96:144-9.
39. Hamada T, Khalaf N, Yuan C, Babic A, Morales-Oyarvide V, Qian ZR, et al. Statin use and pancreatic cancer risk in two prospective cohort studies. *Journal of gastroenterology* 2018;53:959-66.

40. Spence AD, Busby J, Hughes CM, Johnston BT, Coleman HG, Cardwell CR. Statin use and survival in patients with gastric cancer in two independent population-based cohorts. *Pharmacoepidemiology and drug saf* 2019;28:460-70.
41. Lebo NL, Griffiths R, Hall S, Dimitroulakos J, Johnson-Obaseki S. Effect of statin use on oncologic outcomes in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2018 40:1697-706.
42. Wu QJ, Tu C, Li YY, Zhu J, Qian KQ, Li WJ et al. Statin use and breast cancer survival and risk: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 2015;6:42988-3004.
43. Song MK, Shin BS, Ha CS, Park WY. Would lipophilic statin therapy as a prognostic factor improve survival in patients with uterine cervical cancer? *Int J Gynecol Cancer*. 2017;27:1431-7.
44. Tan P, Wei ., Yang L, Tang Z, Cao D, Liu L, et al. The effect of statins on prostate cancer recurrence and mortality after definitive therapy: a systematic review and meta-analysis. *Scientific reports* 2016;6:2910. doi: 10.1038/srep29106.
45. Nayan M, Punjani N, Juurlink DN, Finelli A, Austin PC, Kulkarni GS, Uleryk E, Hamilton RJ. Statin use and kidney cancer survival outcomes: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev* 2017;52:105-16.
46. Feng CH, Miller CM, Tenney ME, Lee NK, Yamada SD, Hasan Y. Statin use significantly improves overall survival in high-grade endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2016;26:1642-9.
47. Xia Z, Tan MM, Wong WW, Dimitroulakos J, Minden MD, Penn LZ. Blocking protein geranylgeranylation is essential for lovastatin-induced apoptosis of human acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* 2001;15:1398-407.
48. van der Weide K, de Jonge-Peeters S, Huls G, et al. Treatment with high-dose simvastatin inhibits geranylgeranylation in AML blast cells in a subset of AML patients. *Exp Hematol* 2012;40:177-86.
49. Yavasoglu I, Sargin G, Yilmaz F, Altindag S, Akgun G, Tombak A, et al. Cholesterol levels in patients with chronic lymphocytic leukemia. *journal of the national medical association* 2017;109:23-7.

50. Pradelli D, Soranna D, Zambon A, Catapano A, Mancina G, La Vecchia C et al. Statins use and the risk of all and subtype hematological malignancies: a meta-analysis of observational studies. *Cancer Med* 2015 4:770-80.
51. Epstein MM, Divine G, Chao CR, Wells KE, Feigelson HS, Scholes D, et al. Statin use and risk of multiple myeloma: An analysis from the cancer research network. *International journal of cancer* 2017;141 480-7.
52. Ponvilawan B, Charoenngam N, Rittiphairoj T, Ungprasert P. Receipt of statins is associated with lower risk of multiple myeloma: systematic review and meta-analysis. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2020;20: 399-413.
53. Dmoszynska A, Podhorecka M, Klimek P, Grzasko N. Lovastatin and thalidomide have a combined effect on the rate of multiple myeloma cell apoptosis in short term cell cultures. *Eur J Clin Pharmacol* 2006;62:325-9.
54. Jánosi J, Sebestyén A, Bócsi J, Barna G, Nagy K, Vályi-Nagy I et al. Mevastatin-induced apoptosis and growth suppression in U266 myeloma cells. *Anticancer Res* 2004;24:1817-22.
55. Terzi H, Altun A, Sencan M. In vitro comparison of the cytotoxic effects of statins on U266 myeloma cell line. *Indian J Med Res* 2019;150: 630-42012; 122:253-70.