T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

ORAL mTOR İNHİBİTÖRÜ EVEROLİMUS + KAPESİTABİN TEDAVİSİNİN KOLOREKTAL KAYNAKLI PERİTONİTİS KARSİNOMATOZADA ETKİNLİĞİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. MEHMET EREN YÜKSEL

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. OSMAN YÜKSEL

ANKARA

ŞUBAT 2014

İÇİNDEKİLER

TABLOLAR iii
ŞEKİLLER iv
KISATMALAR VE SİMGELER vi
TEŞEKKÜR viii
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 6
2.1.1 Peritonitis Karsinomatozanın Oluşumu 8
2.1.2 Peritonitis Karsinomatozada Evreleme Yöntemleri 11
2.1.3 Metastatik Kolorektal Kanserde Uygulanan Kemoterapi Protokolleri 14
2.1.4 Sitoredüktif Cerrahi ve İntraperitoneal Kemoterapi 17
2.2. PI3K/AKT/ mTOR Sinyal Yolu ve mTOR İnhibitörleri 18
2.2.1 Everolimus 21
2.2.2 Kapesitabin 28
2.2.3 Everolimus + Kapesitabin ile Yapılan Faz Çalışmaları 33
2.3. Caco-2 Hücre Serisi 38
2.4. BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} Fare Modeli 40
3. GEREÇ VE YÖNTEM 42
3.1. Hücre Serileri ve Kullanılan Kimyasal Maddeler 42
3.2. Deney Hayvanlarının Seçimi 43
3.3. Caco-2 Hücre Kültürünün Hazırlanışı 44
3.3.1 Caco-2 Hücrelerinin İntraperitoneal Enjeksiyonu 46
3.4. Tedavi Protokolü 47
3.5. Cerrahi Yöntem 49
4. BULGULAR 51
4.1. Kontrol Grubu 52
4.2. Everolimus Verilen Grup 57
4.3. Kapesitabin Verilen Grup 60
4.4. Everolimus ve Kapesitabin Verilen Grup 65
4.5. Verilerin İstatiksel Değerlendirmesi 70

5. TARTIŞMA 74
6. SONUÇLAR 85
7. KAYNAKLAR 87
8. ÖZET 101
9. SUMMARY 103
10. EKLER 105
10.1. Etik Kurul Kararı 105
10.2. Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu Sertifikası 106
11. ÖZGEÇMİŞ 107

TABLOLAR

Tablo 1. Everolimus ve rapamisin arasında farmakokinetik farklılıklar..... 22

Tablo 2. Kolorektal kanser tedavisinde everolimusun kullanıldığı klinik çalışmalar..... 36

Tablo 3. Everolimus ve kapesitabinin birlikte kullanıldığı klinik çalışmalar 38

Tablo 4. İnsan kolorektal adenokarsinoma hücre serileri 39

Tablo 5. Tedavi protokolü..... 48

Tablo 6. BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} farelerin ağırlıkları (gr) 51

ŞEKİLLER

Şekil 1. Kolon adenokanserinde sağkalım oranları 8

Şekil 2. Peritonel kanser indeksinde 13 abdominopelvik bölgede yer alan anatomik yapılar 13

Şekil 3. PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu 19

Şekil 4. Everolimus'un yapısal formülü 21

Şekil 5. Kapesitabin'in yapısal formülü 28

Şekil 6: Üç ardışık adımda kapesitabinin fluorourasile metabolik dönüşümü 30

Şekil 7: Certican 0,75 mg tablet 43

Şekil 8: Hücre kültür flaskında Caco-2 hücreleri 44

Şekil 9: Caco-2 hücrelerinin BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} farelere intraperitoneal olarak enjekte edilmesi 46

Şekil 10. BALB/c OlaHsd-*Foxn1*^{nu} fareye oral gavaj ile everolimusun verilmesi 48

Şekil 11. Peritoneal lavaj ve periton eksizyonu 50

Şekil 12. Kontrol grubu – 1'de sol alt kadrandan intraperitoneal tümör eksizyonu. 53

Şekil 13. Kontrol grubu – 1'de intraabdominal organlar 54

Şekil 14. BALB/c OlaHsd-*Foxn1*^{nu} farede timus bezinin olmaması 54

Şekil 15. Az diferansiye adenokarsinom 55

Şekil 16. Kontrol grubu – 2'de sol alt kadrandan intraperitoneal tümör eksizyonu 56

Şekil 17: Everolimus grubu – 1'de laparotomi. 58

Şekil 18: Everolimus grubu – 2'de sol alt kadrandan lezyon eksizyonu. 59

Şekil 19: Kapesitabin grubu – 1'de sol alt kadranda peritoneal yüzeyde tümör oluşumu 61

Şekil 20. Mezenterik lenf nodunda metastaz 62

Şekil 21. Kapesitabin – 2'de sol alt kadrandan ve diyaframdan lezyon eksizyonu 63

Şekil 22. Diyaframa infiltre az diferansiye adenokarsinom 64

Şekil 23. Everolimus ve kapesitabin birlikte verilen fare -1 66
Şekil 24. Everolimus ve kapesitabin birlikte verilen fare - 2 67
Şekil 25. Karaciğer dokusu 68
Şekil 26. Periton 69
Şekil 27. Tümör ağırlıklarının karşılaştırılması 71

KISATMALAR VE SİMGELER

Ark.: Arkadaşları

ATCC: Amerikan Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection)

Cyt D: Sitidin deaminaz

DMEM: Dulbecco besiyeri (Dulbecco's modified eagle medium)

D-PBS: Dulbecco fosfat tamponlu salin (Dulbecco's phosphate buffered saline)

5'DFCR: 5'-deoksi-S-fluorositidin

5-FU: 5-fluorourasil

eIF4E: Ökaryotik inisiasyon faktörü 4E

4EBP1: eIF4E - bağlayıcı protein 1

FDA: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (U.S. Food and Drug Administration)

FBS: Fetal bovin serum

HIPEC: Hipertermik intraperitoneal kemoterapi

iv: İntravenöz

mTOR: Memelilerde rapamisinin hedefi (mammalian target of rapamycin)

mTORC1: mTOR kompleks 1

mTORC2: mTOR kompleks 2

mSIN1: Memelilerde stresle aktive olan protein kinaz ile etkileşen protein (mammalian stress-activated protein kinase interacting protein)

PI3K: Fosfatidilinozitol-3-kinaz

PKCα: Protein kinaz Cα

Raptor: mTOR düzenleyici-ilişkili protein (regulatory-associated protein of mTOR)

Rictor: mTOR rapamisine duyarsız bileşeni (rapamycin-insensitive companion of mTOR)

S6K1: S6 kinaz 1

SGK1: Glukokortikoid ile uyarılan protein kinaz 1 (glucocorticoid-induced protein kinase 1)

TP: Timidin fosforilaz

TEŞEKKÜR

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı'ndaki tıpta uzmanlık eğitimim sırasında bana asistanı olma onurunu veren ve bu tezi yazabilmem için gereken şartları sağlayan başta Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Bülent Aytaç olmak üzere tüm değerli hocalarıma,

Hücre kültürlerinin temininden deney hayvanı modellerinin oluşturulmasına kadar birçok konuda engin bilgisi ve yardımseverliği ile projeye destek olan Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Emin Ümit Bağrıaçık'a,

Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deney Hayvanı Laboratuvarı'nda çalışma ve araştırma yapma imkânı tanıyan Prof. Dr. Tuncay Delibaşı'na,

Onlarca patoloji preparatını büyük bir titizlikle inceleyerek nazik yardımlarını esirgemeyen Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'ndan Yrd. Doç. Dr. Özgür Ekinci'ye,

Verilerin istatiksel analizini yapan Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı'ndan Uz. Dr. Emine Avcı'ya,

Teşvikleriyle beni yüreklendiren ve önerilerini esirgemeyen annem Prof. Dr. Öznur Yüksel ve kardeşim Yrd. Doç. Dr. Seniha Esen Yüksel'e teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

Genel cerrahlar, operasyon esnasında kolorektal kaynaklı peritonitis karsinomatoza ile karşılaştıklarında çoğu zaman hastalığın yaygınlığı sebebiyle hastanın inoperabl olduğunu kabul etmekte ve operasyona son vermek zorunda kalmaktadırlar. Primer cerrahi esnasında peritoneal tutulum hastaların %7'sinde saptanırken, küratif cerrahi sonrası hastaların %4-%19'unda ve kolorektal kanserin nüks ettiği hastaların %44'ünde peritonitis karsinomatoza gelişmektedir (1). Eğer tedavi edilmezse kolorektal kaynaklı peritonitis karsinomatoza teşhisinden sonra medyan sağkalım 6-9 ay arasında değişmektedir (2). Günümüzde metastatik kolorektal kanser tedavisinde uygulanan kemoterapi protokolleri bile medyan sağkalımı ancak 20,3 aya çıkarılabilmiştir (3). 5-yıllık sağkalım ise %10'un altındadır (4). Ayrıca, söz konusu kemoterapi protokolleri intravenöz girişim içermeleri ve bazı protokollerde 46 saate varan kemoterapötik ajan infüzyonlarının bulunması nedeniyle hastanın tedaviye uyumunu zorlaştırmakta ve hastanın konforunu azaltmaktadır. Peritonitis karsinomatoza tedavisinde Sugarbaker'ın önerdiği peritonektomi işlemi ve ardından intrabdominal sıcak kemoterapi uygulaması (HIPEC) ise ancak belirli hastalarda ve merkezlerde uygulanabilen, morbiditesi yüksek bir tedavi yöntemidir (5). Buna göre kolorektal kaynaklı peritonitis karsinomatoza teşhisi konan birçok hastada sadece destekleyici tedavi yöntemleri uygulanabilmektedir. Kolorektal kaynaklı peritonitis karsinomatoza teşhisi konulan hastaların sağkalımını

arttırabilmek ve tedaviye uyumlarını kolaylaştırabilmek için yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Günümüzde, kolorektal kanser kaynaklı peritonitis karsinomatoza tedavisinde interdisipliner yaklaşım benimsenmektedir. Genel cerrahlar ve medikal onkologlar işbirliği içinde çalışarak sık görülen kolorektal kanser kaynaklı peritonitis karsinomatozanın tedavisi için yeni tedavi yöntemleri araştırmaktadır. Bu konu ile ilgili olarak, Gastrointestinal Cerrahi Dergisi'nde (Journal of Gastrointestinal Surgery) 2009 yılında "İleri evre kolorektal kanserin rapamisin ve 5-FU/oksaliplatin ile etkili tedavisi ve TIMP ile izlenmesi" (Effective Treatment of Advanced Colorectal Cancer by Rapamycin and 5-FU/Oxaliplatin Monitored by TIMP) başlıklı makale yayımlanmıştır (6). Söz konusu makalenin tartışma bölümünde İsviçre Bern Üniversitesi Genel Cerrahi Servisi'nde takip edilen bir hastanın makalenin yazılmasında teşvik edici olduğu belirtilmiştir. Bahsi geçen hasta karaciğer nakli nedeniyle iki yıl süreyle immünsupresif tedavi almıştır. Hastada peritonitis karsinomatozanın eşlik ettiği kolon adenokanseri teşhis edilmiş ve bunun üzerine hastaya lokal rezeksiyon ve FOLFOX adjuvan kemoterapi uygulanmıştır. Eş zamanlı olarak hastaya immünsupresif tedavi olarak rapamisin verilmeye başlanmıştır. İki yıl sonra hasta insizyonel herni nedeniyle tekrar opere edildiğinde tek bir odak dışında hastada peritonitis karsinomatoza odağı saptanmamıştır. 2009 yılı itibariyle ilk teşhisten itibaren altı yıl geçmesine rağmen hasta halen hayattadır ve hastada peritonitis karsinomatoza bulgusu yoktur. Söz konusu bulgular kişisel gözleme dayalıdır.

Bunun üzerine Wagner ve ark. rapamisinin ileri evre kolorektal kanser üzerindeki etkisini incelemek amacıyla Balb/cOlaHsd farelere intraperitoneal CT26 fare kolon karsinomu tümör hücreleri ve atimik Nude-Foxn1^{nu} farelere intraperitoneal SW620 insan kolon karsinomu tümör hücreleri vererek deneysel kolorektal kaynaklı peritonitis karsinomatoza hayvan modelini oluşturmuşlardır. Farelerin bir grubuna sadece oral rapamisin, diğer gruba da hem oral rapamisin hem de intraperitoneal (ip) 5-FU (5-fluorourasil) verilmiştir. Rapamisin tek başına oral verildiğinde ileri evre kolorektal kanserde ilerlemeyi durdurmuştur. 5-FU ile birlikte rapamisin verildiğinde ise antitümör etkinliğinin daha da arttığı görülmüştür.

Fosfatidilinozitol-3-kinaz (PI3K)/AKT/mTOR sinyal yolu hücre proliferasyonunda, hücre büyümesinde ve anjiyogenezde merkezi bir düzenleyicidir (7). Rapamisin bakteriyel bir makrolit grubu antibiyotiktir (8). Ayrıca, rapamisin bir mTOR (memelilerde rapamisinin hedefi, mammalian target of rapamycin) inhibitörüdür. Rapamisin, FK bağlayıcı protein kompleksi FKBP-12 ile birleşerek mTOR'u inhibe eder (9). mTOR'un rapamisin tarafından inhibe edilmesi tümör proliferasyonunu ve büyümesini engellemektedir (10). Birçok rapamisin homoloğu klinik deneylerde beyin tümörleri, renal hücreli karsinom, metastatik pankreatik kanser, pankreatik nöroendokrin tümörler, metastatik meme kanseri, jinekolojik kanserler, akciğer kanseri ve sarkomlarda kullanılmıştır (6, 11-19).

Rapamisinin oral yoldan kullanılabilen türevi everolimustur. 5-FU'nun oral yoldan kullanılabilen eşdeğeri kapesitabindir (20). Metastatik kolorektal

kanserde oral kapesitabin tedavisi, hastalığın progresyonuna kadar geçen süre ve genel sağkalım göz önüne alındığında, iv 5-fluorourasil + lökovorin tedavisine denktir (21).

Everolimus subependimal büyük hücreli astrositomda, ileri evre meme kanserlerinde, progresif pankreas kaynaklı nöroendokrin tümörlerde, tüberosklerozun eşlik ettiği subependimal dev hücreli astrositomda ve ileri evre renal hücreli karsinomlarda kullanılmaktadır (22). Kapesitabin ise kolorektal kanser ve metastatik meme kanseri tedavisinde kullanılmaktadır (23). Mevcut tedavi protokolleri içinde yer almaları nedeniyle hem everolimusun hem de kapesitabinin etki-yan etki profilleri ayrıntılı olarak bilinmektedir.

Klinik çalışmalar (www.clinicaltrials.gov) internet sitesi, Amerikan Ulusal Tıp Kütüphanesi (National Library of Medicine (NLM)) tarafından Ulusal Sağlık Enstitüsü (National Institutes of Health (NIH)) bünyesinde oluşturulan resmi bir sitedir (24). Klinik çalışmalar internet sitesine kayıtlı araştırmalarda meme kanserinde, ileri evre solid tümörlerin tedavisinde, ileri evre mide kanserinde everolimus ve kapesitabinin birlikte kullanımı araştırılmaktadır. Ancak, Ocak 2014 tarihi itibariyle everolimus ve kapesitabinin özellikle kolorektal kaynaklı peritonitis karsinomatozda birlikte kullanılmasını araştıran, klinik çalışmalar internet sitesine kayıtlı, bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Wagner ve ark. oral rapamisinin 5-fluorourasil ile birlikte verildiğinde kolorektal kaynaklı peritonitis karsinomatoza fare modelinde tümör büyümesini baskıladığını göstermişlerdir. Ancak, 5-fluorourasil sadece intravenöz yoldan kullanılabilmektedir, 5-fluorourasilin oral formu yoktur. Oral yoldan

kullanılabilen kemoterapötik ajanlarla yapılan peritonitis karsinomatoza tedavisinin hastanın tedaviye uyumunu kolaylaştıracağı ve konforunu arttıracağı düşünülmüştür. Bu amaçla, oral everolimus ve oral kapesitabin tedavisinin kolorektal kaynaklı peritonitis karsinomatoza fare modelinde denenmesi planlanmıştır. Everolimus, rapamisinin oral yoldan kullanılabilen bir türevidir. Kapesitabin ise 5-flurourasilin oral yoldan kullanılabilen eşleniğidir. Bu çalışmanın amacı BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} farelerde kolorektal kaynaklı peritonitis karsinomatoza modeli oluşturarak, everolimusun tek başına veya kapesitabin ile birlikte oral yoldan verildiğinde kolorektal kaynaklı peritonitis karsinomatoza üzerine etkisini incelemektir.

2. GENEL BİLGİLER

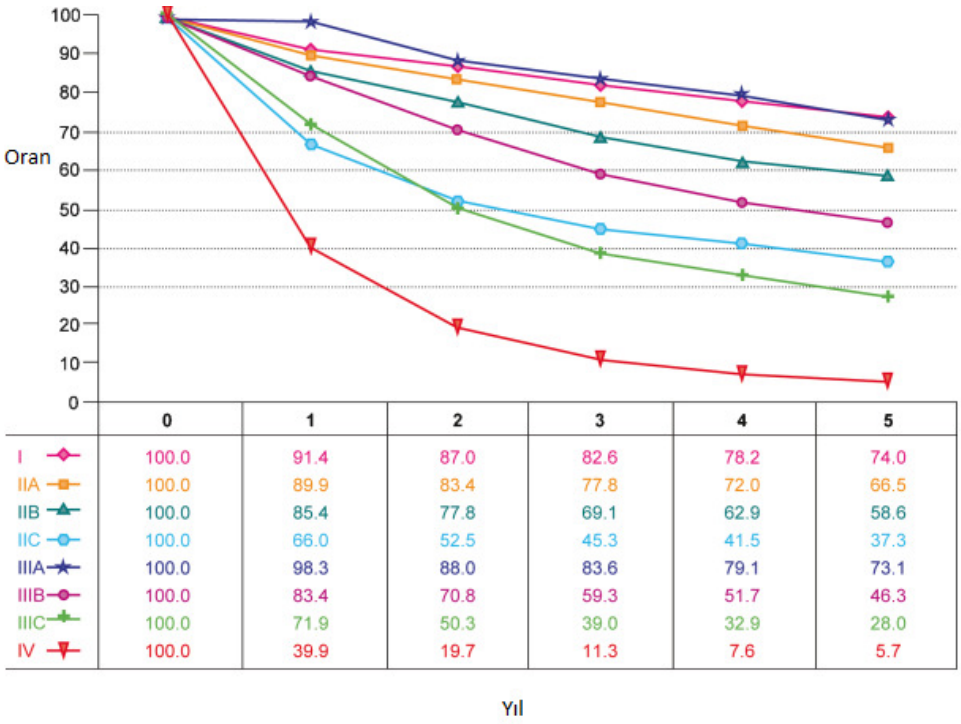
Kolorektal kanser her yıl Amerika Birleşik Devletleri'nde görülen 150,000 yeni olgu ile erkeklerde ve kadınlarda en sık görülen ikinci kanser türüdür (25). Kolorektal kanserin peritoneal yayılımı ise her yıl yaklaşık 15,000 hastada görülmektedir. Türkiye'de ise kolorektal kanser erkeklerde en sık görülen dördüncü, kadınlarda en sık görülen üçüncü kanser türüdür (26).

Kolorektal kansere sekonder gelişen peritoneal karsinomatozis peritoneal yüzeylerde solid tümör depozitlerinin oluşmasıyla karakterizedir (27). Spontan veya cerrahi işlemler esnasında primer tümörden hücrelerin dökülüp yayılmasının bu tümöral depozitlerin oluşmasına neden olduğu düşünülmektedir. Tümör implantasyonu ve büyümesi diğer organların veya periton ile kaplı yapıların invazyonuna yol açmaktadır. Peritoneal implantlar en çok omentumda, mezenterde, bağırsak yüzeyinde, Douglas poşunda, sağ parakolik alanda ve diyaframda görülmektedir.

Kolorektal kaynaklı kanseri olan hastalarda senkron peritoneal karsinomatozis görülme oranı %4,3'tür (28). Kolorektal kaynaklı senkron peritoneal metastazlar genç hastalarda (<60 yaş), ileri T evre hastalıkta, müsinöz adenokarsinomlarda, sağ kolon tümörlerinde ve tümör diferansiasyonu az olduğunda daha sık görülmektedir (28, 29) Peritoneal karsinomatozis, kolorektal kanser evrelemesinde AJCC (Amerikan Kanser Komitesi, American Joint

Committee on Cancer) Kanser Evreleme Kılavuzu 7. baskısına göre, evre IVb (M1b) olarak kabul edilmektedir (30).

Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü'nün SEER (Takip, Epidemiyoloji ve Sonuçlar Programı - Surveillance, Epidemiology, and End Results Program) programı Amerika Birleşik Devletleri'ndeki kanser istatistiklerini yayımlamaktadır (31). Söz konusu istatistiklere göre Amerika Birleşik Devletleri'nde 1998-2000 yılları arasında teşhis edilen 28,491 kolon adenokanseri olgusunun gözlemlenen sağkalım oranları aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (Şekil 1) (30). Evre I'de 7,417, Evre IIA'da 9,956, Evre IIB'de 997, Evre IIC'de 725, Evre IIIA'da 868, Evre IIIB'de 1,492, Evre IIIC'de 2,000 ve Evre IV'te 5,036 hasta yer almaktadır. Evre IV kolon kanserinde 1 yıllık sağkalım oranı %39,9, 2 yıllık sağkalım oranı %19,7, 3 yıllık sağkalım oranı %11,3, 4 yıllık sağkalım oranı %7,6 ve 5 yıllık sağkalım oranı %5,7'dir. Eğer tedavi edilmezse kolorektal kaynaklı peritoneal karsinomatoziste teşhisten sonra medyan sağkalım 6-9 ay arasında değişmektedir (2).



	0	1	2	3	4	5
I	100.0	91.4	87.0	82.6	78.2	74.0
IIA	100.0	89.9	83.4	77.8	72.0	66.5
IIB	100.0	85.4	77.8	69.1	62.9	58.6
IIC	100.0	66.0	52.5	45.3	41.5	37.3
IIIA	100.0	98.3	88.0	83.6	79.1	73.1
IIIB	100.0	83.4	70.8	59.3	51.7	46.3
IIIC	100.0	71.9	50.3	39.0	32.9	28.0
IV	100.0	39.9	19.7	11.3	7.6	5.7

Şekil 1. Kolon adenokanserinde sağkalım oranları

1998-2000 yılları arasında teşhis edilen 28,491 kolon adenokanseri olgularının yıllara ve evrelere göre yüzdesel (%) sağkalım oranları gösterilmiştir (31).

2.1.1 Peritonitis Karsinomatozanın Oluşumu

Peritoneal yayılım çok basamaklı bir sürecin sonunda oluşmaktadır (32). İlk basamak kanser hücrelerinin primer tümörün serozal yüzeyinden ayrılmasıdır. Ayrılan bu hücrelere peritoneal serbest kanser hücreleri denilmektedir. Peritoneal serbest kanser hücreleri mezotelyal hücrelere tutunmakta ve submezotelyal dokulara doğru ilerlemektedir. Daha sonra bu hücreler büyümekte ve vasküler neogenez ile metastazları oluşturmaktadır. Peritoneal yayılımda transmezotelyal ve translenfatik olmak üzere iki farklı süreç önerilmektedir (32):

Transmezotelyal metastazda peritoneal serbest kanser hücreleri direkt mezotelyuma tutunmaktadır. Normal peritoneal mezotelyal hücreler birbirlerine sıkıca tutunmakta ve bu sayede peritoneal serbest kanser hücrelerinin submezotelyal dokulara invazyonu karşısında bir engel oluşturmaktadır. Mezotelyal hücre tabakası ile submezotelyal kapiller arasındaki dokuya periton-kan bariyeri denilmektedir. Bu bariyer oksijen ve besinlerin submezotelyal kapillerden peritoneal boşluğa hareketini engellemektedir. Bu yüzden mezotelyal hücrelere tutunan birçok serbest kanser hücresi fakir nutrisyonel çevreden dolayı ölüp gitmektedir. Ancak, serbest kanser hücreleri mezotelyal hücrelere adezyon molekülleri ile gevşekçe bağlandıklarında sitokinler salgılamaktadır. Salgılanan bu sitokinler mezotelyal hücrelerin hücre iskeletlerinde fosforilasyona ve buna bağlı olarak mezotelyal hücrelerin kontraksiyonuna yol açmaktadır (33). Sonuç olarak, kanser hücreleri mezotelyal hücreler arasındaki boşluktan submezotelyal boşluğa doğru ilerlemekte ve integrinler aracılığıyla bazal membrana sıkıca tutunmaktadır (34). Kanser hücreleri motilite faktörleri ve matriks proteinazları eksprese ettiklerinde peritoneal kan bariyerini yıkarak subperitoneal dokuyu işgal edebilirler. Kanser hücreleri subperitoneal kapilleri işgal ettiklerinde kanser hücrelerinden ve stromal hücrelerden kaynaklanan büyüme faktörleri ile çoğalabilirler. Ayrıca peritoneal serbest kanser hücrelerinden salgılanan anjiogenik faktörler ile subperitoneal dokuda vasküler neogenez uyarılır (35). Sonuç olarak periton-kan bariyeri kısalır ve metastazlar için uygun ortam hazırlanmış olur.

Translenfatik metastazda perioneal serbest kanser hücreleri peritoneal yüzeylerdeki stoma denilen lenfatik açıklıklara göç ederler ve lenfatik stomaların hemen altında olan submezotelyal lenfatik boşlukta çoğalırlar. Translenfatik metastazın gerçekleşmesi için gereken metastazik basamak sayısı daha azdır. Bu yüzden, translenfatik metastaz transmezotelyal metastaza göre daha önce gerçekleşir. Büyük omentumda, kolonun appendiseal epiploikasında, diyaframın alt yüzünde, falsiform ligamanda, Douglas boşluğunda ve ince bağırsak mezenterinde birçok lenfatik orifis bulunmaktadır (32). Büyük omentumda, falsiform ligamanda ve Douglas boşluğunda birçok süt benzeri nokta (milky spot) denilen peritoneal makrofajların ve lenfositlerin bulunduğu lenf sinüsleri bulunmaktadır. Süt benzeri noktalarda lenfatik orifisler bulunmakta ve peritoneal makrofajlar lenfatik orifisler yoluyla peritoneal boşluğa mobilize olmaktadırlar. Kanser hücrelerinin ürettiği sitokinler mezotelyal hücrelerin kontraksiyonuna yol açtığında süt benzeri noktaların üzerinde yer alan stomalar açığa çıkmakta ve kanser hücreleri submezotelyal lenfatik damarlara göç etmektedir. Karaciğer kapsülünde, abdominal duvarın peritonunda, ince bağırsakların serozal yüzeyinde ve dalak kapsülünde lenfatik stomalar veya süt benzeri noktalar yoktur. Bu peritoneal bölgeler peritoneal yayılımın geç evrelerine kadar etkilenmez. Kolon kanserinde peritoneal metastazlar hem translenfatik hem de transmezotelyal metastazlar yoluyla gerçekleşmektedir.

2.1.2 Peritonitis Karsinomatozada Evreleme Yöntemleri

Görüntüleme yöntemleri peritoneal karsinomatozisi belirlemekte yetersiz kalmaktadır. Bilgisayarlı tomografi peritoneal karsinomatozu olan hastaların ancak %60'ında lezyonların boyutunu doğru olarak saptamaktadır (36). Ayrıca bilgisayarlı tomografinin sensitivitesi peritoneal implantların boyutlarıyla da ilişkilidir. 0,5 cm'den küçük nodüller bilgisayarlı tomografide %11 sensitivite ile saptanırken, 5 cm'den büyük lezyonlarda bu oran %94'tür (36).

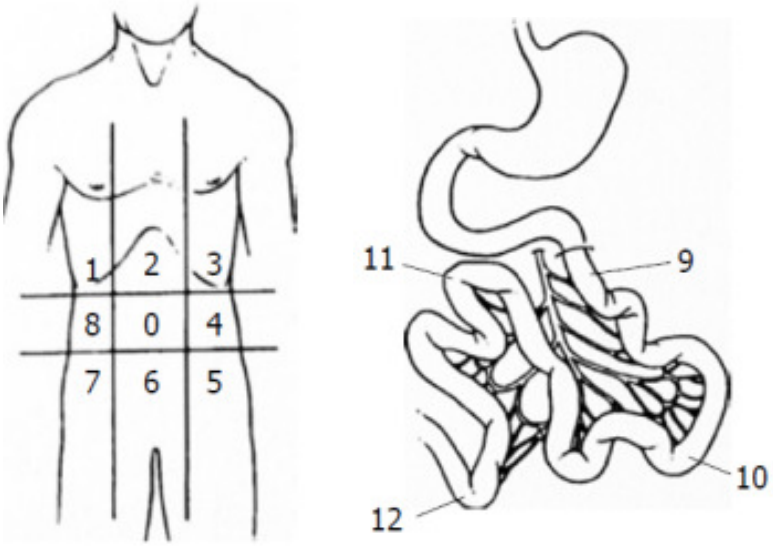
Peritoneal karsinomatozlu hastaların yarısından daha fazlasında teşhis primer kolorektal kanser nedeniyle yapılan operasyon esnasında konulmaktadır (2). Bu yüzden cerrahın peritoneal karsinomatozun yaygınlığını ayrıntılı olarak belirtmesi gerekir. Assit, intestinal obstrüksiyon gibi bulgular ileri hastalığın göstergesidir.

Peritonitis karsinomatozanın yaygınlığının tanımlanmasında Peritoneal Kanser İndeksi, Hollanda Basitleştirilmiş Kanser İndeksi ve Gilly Peritoneal Karsinomatoz Evreleme Sistemi gibi çeşitli evreleme sistemleri kullanılmaktadır (37-39). Bu evreleme sistemlerinden en yaygın olarak kullanılanı Peritoneal Kanser İndeksi'dir.

Peritoneal Kanser İndeksi ilk defa 1996 yılında Jacquet ve Sugarbaker tarafından bildirilmiştir (38). Peritoneal Kanser İndeksi, abdomen ve pelviste kanser implantının büyüklüğünü ve dağılımını değerlendirmektedir. Peritoneal Kanser İndeksi'nde abdomen ve pelvis çizgilerle 0'dan 8'e kadar numaralandırılarak dokuz bölgeye ayrılmıştır (40). İnce bağırsaklar da dört

bölgeye ayrılmıştır. Aşağıdaki şekilde görüldüğü üzere, 9 ve 10 numaralı alanlar jejunumun üst ve alt kısımlarını, 11 ve 12 numaralı kısımlar ileumun üst ve alt kısımlarını tanımlamaktadır (37). En büyük implantlara ise büyüklüğüne göre 0-3 arasında puan verilmektedir. 0: hiç implant görülmediğini, 1: en geniş çapı 0,5 cm'ye kadar olan implantların görüldüğünü, 2: çapı 0,5 cm'den büyük 5 cm'den küçük implantların olduğunu, 3: çapı 5 cm'den büyük implantların görüldüğünü belirtmektedir. Bu ölçümler bütün adezyonlar çözüldükten ve bütün pariyetal ve viseral pariyetal yüzeyler tamamen incelendikten sonra yapılmaktadır. Bu yöntem, 1-39 arasında değişen bir puan ile abdomen ve pelviste hastalığın yaygınlığını göstermektedir. Bu puan aynı zamanda tam bir sitoredüksiyonun yapılıp yapılamayacağının tahmin edilmesine yardımcı olmaktadır.

Elias ve ark. 2001 yılında yayımladıkları retrospektif çalışmalarında kolorektal kaynaklı peritonitis karsinomatoza teşhisi olup da tam rezeksiyon ve intraperitoneal kemoterapi uygulanan 64 hastayı incelemişler ve Peritoneal Kanser İndeksi puanı 16'dan daha düşük olan hastalarda sağkalımın belirgin olarak daha iyi olduğunu göstermişlerdir (41). Sugarbaker'a göre ise limit 20 puandır. Kolorektal karsinomatozisi olup da Peritoneal Kanser İndeksi puanı 20 puanın üzerinde olan hastalara sadece destekleyici tedavi uygulanmalıdır (1).



Şekil 2. Peritonel kanser indeksinde 13 abdominopelvik bölgede yer alan anatomik yapılar

Anatomik bölgelerdeki yapılar (37):

0 **Santral:** Orta hat abdominal insizyon – tüm büyük omentum – transvers kolon

1 **Sağ üst:** Sağ karaciğer lobunun superior yüzü – sağ hemidiyaframın alt yüzü – sağ retrohepatik boşluk

2 **Epigastrik:** Epigastik yağ yastığı – karaciğerin sol lobu – küçük omentum – falsiform ligaman

3 **Sol üst:** Sol hemidiyaframın alt yüzü – dalak – pankreasın kuyruğu – midenin ön ve arka yüzleri

4 **Sol flank:** İnen kolon – sol abdominal boşluk

5 **Sol alt:** Sigmoid kolonun lateralinde yer alan pelvik duvar – sigmoid kolon

6 **Pelvis:** Overler, tüpler ve uterus ile kadın internal genitalyası – mesane, Douglas boşluğu – rektosigmoid kolon

7 **Sağ alt:** Sağ pelvik duvar – çekum – apendiks

8 **Sağ flank:** Sağ abdominal boşluk – çıkan kolon

9 **Üst jejunum**, 10 **Alt jejunum**, 11 **Üst ileum**, 12 **Alt ileum**

2.1.3 Metastatik Kolorektal Kanserde Uygulanan Kemoterapi Protokolleri

Günümüzde metastatik kolorektal kanserde tek başına veya diğer ilaçlarla beraber kullanılabilen onaylanmış sekiz çeşit ilaç bulunmaktadır (42). Bu ilaçlar 5-FU, kapesitabin, irinotekan, oksaliplatin, bevacizumab, cetuksimab, aflibercept ve panitumumab'dır. Günümüzde söz konusu ilaçların kombinasyonlarıyla oluşturulan başlıca kemoterapi protokolleri şunlardır (42):

1- Alman AIO (Arbeitsgemeinschaft Internische Onkologie) rejimi (folik asit, 5-FU ve irinotekan):

İrinotekan (100 mg/m^2) 1. günde 2 saatlik infüzyon şeklinde verilir; lökovorin (500 mg/m^2) 1. günde 2 saatlik infüzyon şeklinde verilir; ardından 5-FU (2,000 mg/m^2) iv bolus olarak ambulatuar pompa ile 24 saat boyunca yılda dört kez verilir.

2- CAPOX rejimi:

Kapesitabin (1,000 mg/m^2) günde iki kez 1 ile 14. günler arasında ve oksaliplatin (70 mg/m^2) 1. ve 8 gün, her 3 haftada bir verilir.

3- Douillard rejimi (folik asit, 5-FU ve irinotekan):

İrinotekan (180 mg/m^2) 2 saatlik infüzyon şeklinde 1. gün verilir; lökovorin (200 mg/m^2) 1. ve 2. günler 2 saatlik infüzyon şeklinde verilir; ardından yükleme dozu 5-FU (400 mg/m^2) iv bolus, daha sonra 5-FU (600 mg/m^2) ambulatuar pompa ile 22 saat boyunca 1. ve 2. gün her 2 haftada bir uygulanır.

4- FOLFOX4 rejimi (oksaliplatin, leukovorin ve 5-FU):

Oksaliplatin (85 mg/m^2) 1. gün 2 saatlik infüzyon şeklinde uygulanır; lökovorin (200 mg/m^2) 1. ve 2. günlerde 2 saatlik infüzyon şeklinde uygulanır; ardından yükleme dozu 5-FU (400 mg/m^2) i.v. bolus, daha sonra 5-FU (600 mg/m^2) ambulatuar pompa ile 22 saat boyunca 1. ve 2. günde olmak üzere her 2 haftada bir uygulanır.

5- FOLFOX6 rejimi (oksaliplatin, leukovorin ve 5-FU):

Oksaliplatin (85–100 mg/m^2) 1. gün 2 saatlik infüzyon şeklinde uygulanır; lökovorin (400 mg/m^2) 1. gün 2 saatlik infüzyon şeklinde uygulanır; ardından 1. gün yükleme dozu 5-FU (400 mg/m^2) i.v. bolus olarak verilir, daha sonra 5-FU (2,400–3,000 mg/m^2) ambulatuar pompa ile 46 saat boyunca her 2 haftada 1 uygulanır.

6- FOLFIRI rejimi (folik asit, 5-FU ve irinotekan):

İrinotekan (180 mg/m^2) 1. gün 2 saatlik infüzyon şeklinde uygulanır; lökovorin (400 mg/m^2) 1. gün 2 saatlik infüzyon şeklinde uygulanır; ardından 1. gün yükleme dozu 5-FU (400 mg/m^2) i.v. bolus olarak verilir, daha sonra 5-FU (2,400–3,000 mg/m^2) ambulatuar pompla ile 46 saat boyunca her 2 haftada 1 uygulanır.

7- FUFOX rejimi:

Oksaliplatin (50 mg/m^2) ve lökovorin (500 mg/m^2) ve 5-FU (2,000 mg/m^2) her 36 günde bir 1. ,8. , 22. ve 29. günlerde 22 saatlik devamlı infüzyon şeklinde uygulanır.

8- FUOX rejimi:

Devamlı infüzyon ile 5-FU (2,250 mg/m^2) 1. , 8. , 15. , 22. , 29. ve 36. günlerde 48 saat boyunca ve oksaliplatin (85 mg/m^2) 1., 15., ve 29. günlerde her 6 haftada bir uygulanır.

9- IFL (veya Saltz) rejimi (irinotekan, 5-FU ve leukovorin):

İrinotekan (125 mg/m^2), 5-FU (500 mg/m^2) i.v. bolus ve lökovorin (20 mg/m^2) i.v. bolus olarak 6 haftanın 4'ünde her hafta verilir.

10- XELOX rejimi:

Oral kapesitabin (1,000 mg/m^2) 14 gün boyunca günde 2 kez ve oksaliplatin (130 mg/m^2) 1. gün olmak üzere 3 haftada bir verilir.

Yukarıda bahsedilen kemoterapi protokolleri uygulandığında bile metastatik kolorektal kanserde sağkalım süreleri kısadır. Hurwitz ve ark. metastatik kolorektal kanseri olan hastalara bevacizumab, irinotekan, fluorourasil ve lökovorin kemoterapi rejimini uygulamışlar ve medyan sağkalımın 20,3 ay olduğunu saptamışlardır (3). Goldberg ve ark. daha önce tedavi edilmemiş metastatik kolorektal kanserli hastalara uygulanan fluorourasil, lökoverin ve

okaliplatin kemoterapi rejimi ile genel sağkalımın 19 ay olduğunu bildirmişlerdir (43).

2.1.4 Sitoredüktif Cerrahi ve İntraperitoneal Kemoterapi

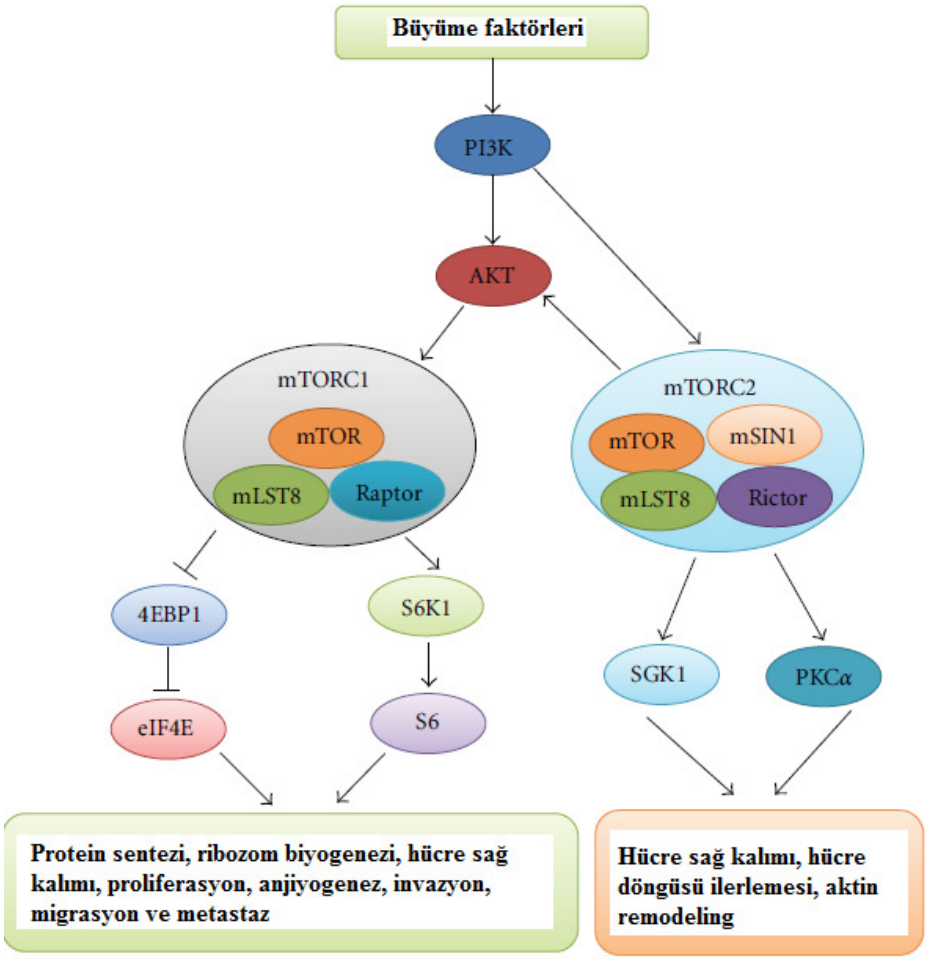
Dr. P.H. Sugarbaker 1981 yılında peritonitis karsinomatozanın lokorejyonel bir hastalık olduğunu ve küratif niyetle tedavi edilebileceğini bildirmiştir (5). Sugarbaker, makroskopik hastalığın maksimum radikal onkolojik sitoredüktif cerrahi ile azaltılması, daha sonra rezidüel mikroskopik hastalığın tedavisi için hipertermik intraoperatif intraperitoneal kemoterapi verilmesi gerektiğini Sugarbaker protokolü adı altında yayımlamıştır. Bu yöntemle kolorektal orjinli peritonitis karsinomatoza hastalarında 5 yıllık sağkalım oranının %45'e kadar çıktığını göstermiştir. Ancak, Sugarbaker protokolünün morbiditesi %25, mortalitesi ise %1,5 olarak saptanmıştır.

Günümüzde sağkalımı en çok arttıran kolorektal kaynaklı peritonitis karsinomatoza tedavi yöntemi Sugarbaker protokolüdür (5). Kolorektal kaynaklı peritonitis karsinomatoza tedavisinde en iyi sonuçlar sitoredüktif cerrahi ve hipertermik intraperitoneal kemoterapi (HIPEC) ile sağlanmaktadır. Ancak, sitoredüktif cerrahi ve hipertermik intraperitoneal kemoterapinin morbiditesi yüksektir. Ayrıca, sitoredüktif cerrahi ve hipertermik intaperitoneal kemoterapinin maliyeti yüksektir ve sadece tecrübeli cerrahlar tarafından seçilmiş hastalar üzerinde belirli merkezlerde uygulanabilmektedir.

2.2. PI3K/AKT/ mTOR Sinyal Yolu ve mTOR İnhibitörleri

Fosfatidilinozitol-3-kinaz (PI3K)/AKT/mTOR sinyal yolu hücre proliferasyonunda, hücre büyümesinde ve anjiyogenezde merkezi bir düzenleyicidir. PI3K/AKT/mTOR yolunun inhibisyonu kanser kemoterapisinde başlıca stratejilerdendir (7).

mTOR (memelilerde rapamisinin hedefi - mamalian target of rapamycin) bir serin/treonin protein kinazdır (44). mTORC1ve mTORC2 olmak üzere iki mTOR kompleksi mevcuttur (45). mTORC1 mTOR, Raptor (mTOR düzenleyici-ilişkili protein - regulatory-associated protein of mTOR) ve mLST8 içerir. mTORC2 ise mTOR, Rictor (mTOR rapamisine duyarsız bileşeni - rapamycin-insensitive companion of mTOR), mLST8 ve mSIN1 (memelilerde stresle aktive olan protein kinaz ile etkileşen protein - mammalian stress-activated protein kinase interacting protein) içerir. mTORC1 ökaryotik translasyon başlatma faktörü ED (elF4E) bağlayıcı protein (4E-BP1) ve p70S6 ribozomal kinaz (S6K) aracılığıyla protein sentezini kontrol eder (46). mTORC2 ise hücre büyümesinde yer alır. Rapamisin FK506 bağlayıcı protein (FKBP) 12 ile birleşerek mTOR aktivitesini bloke eder. mTORC1 rapamisine duyarlıdır, mTORC2 ise rapamisin etkisine ancak uzun süre maruz kalırsa rapamisine duyarlı hale gelir (47). PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu aşağıdaki şemada gösterilmiştir (45).



Şekil 3. PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu (45).

PI3K: fosfatidilinozitol-3-kinaz; mTOR: memelilerde rapamisinin hedefi - mammalian target of rapamycin; mTORC1: mTOR kompleks 1; mTORC2: mTOR kompleks 2; Raptor: mTOR düzenleyici-ilişkili protein - regulatory-associated protein of mTOR; Rictor: mTOR rapamisine duyarsız bileşeni - rapamycin-insensitive companion of mTOR; mSIN1: memelilerde stresle aktive olan protein kinaz ile etkileşen protein - mammalian stress-activated protein kinase interacting protein; eIF4E: ökaryotik inisiasyon faktörü 4E; 4EBP1: eIF4E – bağlayıcı protein 1; S6K1: S6 kinaz 1; PKCα: protein kinaz Cα; SGK1: glukokortikoid ile uyarılan protein kinaz 1.

mTOR inhibitörü rapamisin, Easter adasında bulunan *Stretomyces hygroscopicus* bakterisinin ürettiği bir makrolid antibiyotiktir (8). Rapamisinin ilk olarak güçlü bir antifungal ajan olduğu keşfedilmiştir. Daha sonra rapamisinin immünsupresif etkisi saptanmıştır. Guba ve ark. 2002 yılında rapamisinin anjiyogenezi inhibe ederek tümör büyümesini baskıladığını bildirmişlerdir (9). Rapamisinin anti-tümöral özelliklerinin keşfedilmesinden sonra rapalog adı verilen everolimus, temsirolimus ve ridaforolimus gibi rapamisin benzeri ilaçlar üretilmiştir (48).

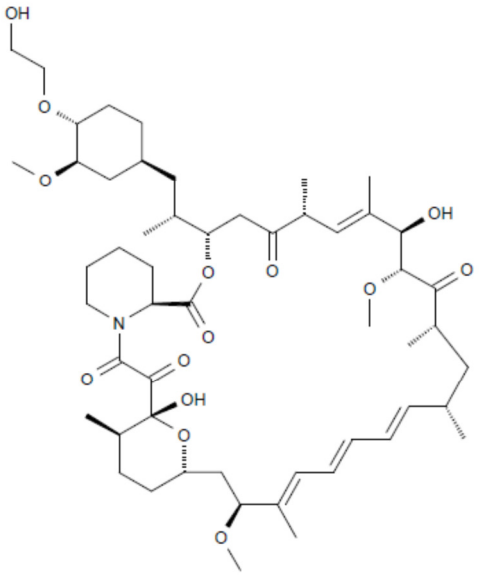
Fosfatidilinozitol 3 - kinaz (PI3K) yolunun PI3K'nın katalitik p110α alt birimini kodlayan *PIK3CA* genindeki mutasyonların aktive eden mutasyonlar ile uyarılması veya tümör baskılayıcı *PTEN*'in kaybı kolorektal kanserin de dahil olduğu birçok kanserin büyümesi ve ilerlemesi ile ilişkilidir (46, 49). PI3K'ın tümör büyümesi ve ilerlemesindeki etkilerine Akt ve mTOR aracılık eder (50, 51). PI3K/Akt yolunun inhibisyonu kolorektal kanserlerde büyümeyi azaltır, apoptozisi arttırır, kemoterapiye duyarlılığı arttırır ve metastaz yeteneğini azaltır (46, 52). Hücre sağkalımında ve proliferasyonunda yer alan proteinlerin selektif inhibisyonu hedeflenmiş tedaviye izin verirken daha az toksisiteye neden olur.

Kolorektal kanserlerin yaklaşık %40'ı mTOR'un downstream faktörü olan fosfo-S6K için kısmi ya da tam boyanma gösterir. Buna göre kolorektal kanserlerin %40'ı rapamisin duyarlıdır. Rapamisin hem direkt antiproliferatif etki ile hem de tümör anjiyogenezini inhibe ederek anti-tümör etki gösterir (6, 53). Seeliger ve ark. rapamisinin 5-FU ile uyarılan anjiogenetik 2-deoksi-riboz(dRib) ekspresyonunu engelleyerek antitümör aktiviteyi arttırdığını belirtmişlerdir (54).

Diğer çalışma grupları da rapamisinin radyasyon terapisi, DNA hasarlayan ajanlar, sisplatin, oksiplatin ve doksorubisin gibi deneysel ajanlarla sinerjistik etkilerini bildirmişlerdir (55-60).

2.2.1 Everolimus

Everolimus bir mTOR inhibitörüdür. Everolimusun moleküler formülü C53H83NO14 ve moleküler ağırlığı 958,2' dir (61). Everolimus diğer mTOR inhibitörü rapamisin ile benzer yapısal formüle sahiptir. Everolimus 40-O-(2-hydroxyetil)-rapamisin olarak da isimlendirilebilir. Everolimus'un yapısal formülü aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (61).



Şekil 4. Everolimus'un yapısal formülü (61).

Everolimus ve rapamisinin benzer etki mekanizmaları ve kimyasal yapıları olmasına karşın iki ilaç arasında farmakokinetik farklılıklar mevcuttur. Aşağıdaki tabloda everolimus ve rapamisin arasındaki farmakokinetik farklılıklar özetlenmiştir (62).

Tablo 1. Everolimus ve rapamisin arasında farmakokinetik farklılıklar

Farmakokinetik Parametre	**Everolimus**	**Rapamisin**
Rölatif biyoyararlılık (%)	20	14
Maksimum konsantrasyona ulaşma zamanı (saat)	1-2	1-2
Eliminasyon yarı-ömrü (saat)	28	62
Kararlı duruma ulaşma zamanı (gün)	4	5-7
Plazma proteinlerine bağlanma (%)	74	92

Everolimus, tek ajan olarak faz 1-3 kinik denemelerde ileri evre renal hücreli karsinomda, metastatik pankreatik kanserde, ileri evre pankreatik nöroendokrin tümörlerde, metastatik meme kanserinde, ileri evre küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde ve çeşitli ileri evre solid tümörlerde denenmiştir (11-19).

Everolimus, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA: U.S. Food and Drug Administration) tarafından beş endikasyon için onaylanmıştır (22):

1- Subependimal büyük hücreli astrositomu olan pediatrik ve yetişkin hastalarda

2- İleri evre hormon reseptörü pozitif, HER2-negatif meme kanserlerinde exemestan ile kombine edilerek

3- Progresif pankreas kaynaklı nöroendokrin tümörlerde

4- Tüberoskleroz'un eşlik ettiği subependimal dev hücreli astrositomda

5- Sunitinib ve sorafenib ile tedavinin başarısız olduğu ileri evre renal hücreli karsinomlarda

2.2.1.1 Everolimus Kullanırken Dikkat Edilmesi Gereken Noktalar

Everolimus, oral alım sonrası zirve konstantrasyonuna 1-2 saat sonra ulaşır (63). Transplant hastalarında everolimus kan konsantrasyonları 0,25-15 mg aralığındaki dozlarda doz ile doğru orantılıdır. Everolimusun tablet formu yüksek yağlı yemeklerle birlikte verildiğinde everolimusun Cmax ve AUC değerleri sırasıyla %60 ve %16 azalmaktadır. Everolimusun kan-plazma oranı konsantrasyon bağımlı olmak üzere %17 ile %73 arasında, 5 ile 5000 ng/mL aralığında, değişmektedir. Plazma proteinlerine yaklaşık %74 oranında bağlanır. Everolimus CYP3A4 ve P-glikoproteinin substratıdır. Ana metabolik yollar mono-hidroksilasyon ve O-dealkilasyondur. Siklik laktonun hidrolizi ile iki ana

metabolit oluşmaktadır. Everolimus kanda dolaşan ana bileşendir. Ana metabolitlerden hiç biri everolimusun immünsupresif etkisine belirgin şekilde katkıda bulunuyor gibi gözükmemektedir. Siklosporin alan transplant hastalarında tek doz radyonüklit işaretli everolimus verildiğinde radyoaktivitenin %80'i feçeste, %5'i ise idrarda saptanmıştır. Everolimus denge durumuna ilk doz alındıktan sonra kan ilaç seviyesinin 2-3 katına çıktığı 4. günde ulaşmaktadır. Doz sonrası Tmax 1-2 saat sonra gerçekleşmektedir. Eliminasyon yarı ömrü 28±7 saattir.

Everolimus immun sistemi baskılayıcı bir ilaçtır (63). Bu yüzden everolimus kullanan hastalarda bakteriyel, fungal, viral ve protozoal fırsatçı enfeksiyon gelişme riski artmıştır. Everolimus kullanan hastalarda fatal enfeksiyonlar ve sepsis bildirilmiştir. Polyoma virüs enfeksiyonları, BK virüs ilişkili nefropati ve JC virüs ilişkili ilerleyici multipl lökoensefalopati görülebilir. Transplantasyon hastalarında Pneumocystis jiroveci ve sitomegalovirus profilaksisi yapılması önerilmektedir. Everolimusun CYP3A4 inhibitörleri ketokonazol, itrakonazol, vorikonazol, klaritromisin, telitromisin, ritonavir ve CYP3A4 uyaranları rifampisin ve rifabutin ile birlikte kullanımı ilaç yararı risklerden fazla olmadıkça önerilmez. Everolimus kullanan hastalarda özellikle deri maligniteleri ve lenfoma açışından risk artmıştır. Transplantasyon hastalarında everolimus, siklosporin mikroemulsiyonu veya takrolimusun birlikte kullanımı serum kolesterolünü ve trigliseridlerini arttırabilir. Everolimus artmış anjiyoödem riski ile ilişkilidir. Ancak, everolimus kullanırken anjiyoödem gelişen hastaların büyük çoğunluğu ek olarak ACE inhibitörü de kullanmaktadır. Renal ve

kardiyak transplant hastalarında everolimus siklosporinin renal toksisitesini arttırabilir. Everolimusun kalsinörin inhibitörleriyle kullanımı artmış proteinüri ile ilişkilidir. Everolimus kullanılan hastalarda renal arter ve ven tromboz riski artmıştır. Everolimus diğer mTOR inhibitörleri gibi yara iyileşmesini bozabilir. Everolimusun kalsinörin inhibitörleri ile birlikte kullanımı trombotik mikroanjiyopatik bozukluklara yol açabilir. Everolimus kullanan hastalarda interstisyel akciğer hastalıkları ve enfeksiyöz olmayan pnömonitis olguları bildirilmiştir. Everolimus yeni tanı diyabetes mellitus riskini arttırmaktadır. Literatürde, mTOR inhibitörleri ile tedavi edilen hastalarda reversibl azoospermi ve oligospermi görülen olgular olduğu bildirilmiştir. Everolimus, farelerde ve ratlarda uzun dönemde karsinojenite açısından izlenmiştir ve herhangi bir onkojenik cevap gözlenmemiştir.

Hayvan çalışmalarında, everolimus düşük akut toksik potansiyel göstermiştir. Tek oral doz olarak 2000 mg/kg verilen fare veya ratlarda ölüm veya ciddi toksisite gözlenmemiştir. İnsanlarda everolimusun yüksek dozda kullanılması ile ilgili tecrübeler sınırlıdır. Transplantasyon hastalarında tek doz 25 mg everolimusun tolere edilebildiği görülmüştür.

2.2.1.2 Deney Hayvanlarında Everolimus Dozu

Rico ve ark. mTOR'un farmakolojik olarak hedeflenmesinin over granüloza hücreli tümör büyümesini engellediğini saptamışlardır (64). Rico ve ark. 3 ve 6 hafta arasında olan deney farelerine 2,5 mg/kg dozunda everolimus

verilmesi halinde, 2,5 mg/kg everolimus dozunun tümör büyümesi üzerinde herhangi bir etkisi olmadığını saptamışlardır. Tümör büyümesi üzerindeki maksimum etkinin 7,5 mg/kg everolimus dozunda olduğunu bulmuşlardır. Everolimus dozunun 7,5 mg/kg üzerinde arttırılmasının ise tümör büyümesi üzerinde ek bir yarar sağlamadığını tespit etmişlerdir.

2.2.1.3 Peritonitis Karsinomatoza Hayvan Modellerinde Everolimus

Taguchi ve ark. peritoneal yayılım olan ileri evre mide kanserlerinde everolimusun etkinliğini göstermek için peritoneal metastaza çok yatkın olan 58As1 insan mide kanseri hücre serilerini ortotopik fare modelinde kullanmışlar ve foton sayma metodu ile everolimusun peritoneal yayılımı belirgin olarak azalttığını göstermişlerdir (65).

Chu ve ark. everolimus ve tirozin kinaz inhibitörü lapatinibin etkinliğini KRAS mutasyonu olan insan kolorektal karsinoma zenograft fare modelinde test etmişler ve tek başına everolimusun da belirgin antitümör aktivite gösterdiğini saptamışlardır (66).

Mabuchi ve ark. everolimusun over kanserinde transgenik fare modelinde tümör başlangıcını ve ilerlemesini geciktirdiğini bildirmişlerdir. Tg*MISIIR-TAg* transgenik fareler bilateral epitelyal over kanseri oluşturmaktadır. Tg*MISIIR-TAg* transgenik farelere haftada iki kez 5 mg/kg dozunda oral everolimus verilmiş ve tümör yükünün plasebo verilen gruba göre yaklaşık %84 daha az olduğunu saptamışlardır. Ayrıca, everolimus ile tedavi edilen farelerin sadece %21'inde

assit oluşumu ve peritoneal yayılım görülürken, plasebo ile tedavi edilen farelerin %74'ünde assit oluşumu ve peritoneal yayılım görülmüştür. Everolimus ile tedavi edilen farelerin %30'unda erken over kanseri over içinde sınırlı kalırken, plasebo verilen bütün farelerde ileri evre over kanseri gelişmiştir (67).

2.2.1.4 Everolimus İle İnsanlar Üzerinde Faz Çalışmaları

Okamoto ve ark. 2010 yılında ileri evre solid tümörleri olan Japon hastalara günlük everolimus tedavisi verilmesi ile ilgili faz 1 çalışmalarının sonuçlarını yayınlamışlardır (15). Çalışmada dört erkek, beş kadın olmak üzere toplam dokuz hasta yer almıştır. Üç hastada kolorektal kanser, üç hastada akciğer kanseri, bir hastada özofagus kanseri, bir hastada mide kanseri ve bir hastada tiroid kanseri mevcuttur. Tümör cevabı değerlendirilebilen 7 hastanın 2'sinde (özofagus kanseri ve mide kanseri olan) 10 mg/gün everolimus tedavisi altında belirgin tümör küçülmesi gözlenmiştir.

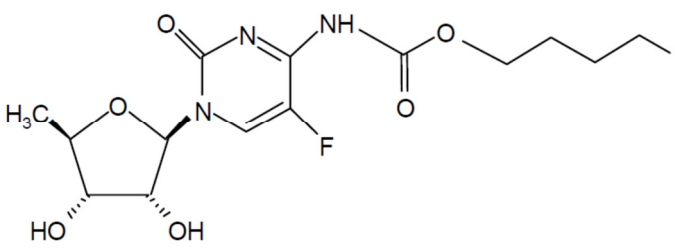
Yoon ve ark. fluoroprimidin ve platin içeren kemoterapiye dirençli ileri evre mide kanserlerinde everolimus ile faz 2 çalışmalarınının sonuçlarını 2012 yılında yayınlamışlardır (68). İleri evre mide kanserlerinde 28'er günlük döngüler halinde 5 mg'lık iki doz halinde günlük toplam 10 mg everolimus verilmesinin seçilmemiş hastalarda tatmin edici tedavi sonuçlarını sağlamadığını, sadece sınırlı sayıda olguda everolimusun aktif olduğunu tespit ettiklerini belirtmişlerdir. Bu bulgular halen devam eden faz 3 ileri evre mide kanserli seçilmemiş hastalarda salvage/kurtarma tedavisi olarak everolimus verilmesi çalışması üzerine gölge

düşürmektedir. Everolimus'un standart salvage tedavisi olabilmesi için seçilmemiş hastalarda docetaksel ve irinotekan gibi geleneksel kemoterapi yöntemlerine üstünlüğünün gösterilmesi gerekmektedir.

2.2.2 Kapesitabin

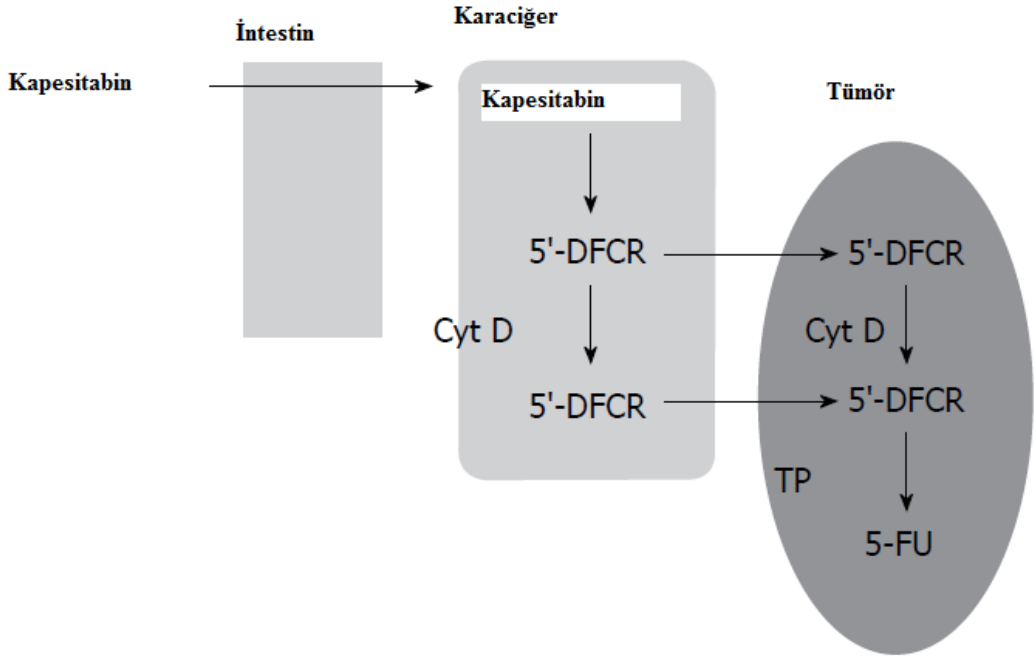
5-Fluorourasil (5-FU) 40 yıl önce kolorektal kanser tedavisine eklenmiştir ve hala kolorektal kanser tedavisinde ana tedavi rejimlerindeki yerini korumaktadır (20). 5-FU'nun kanser tedavisindeki önemine karşın 5-FU'nun yarı ömrünün kısa olması, santral damar yoluna ihtiyaç duyulması ve devamlı infüzyona ihtiyaç olması nedeniyle araştırmacıları bu ilacın oral formunu bulmaya teşvik etmiştir. 2005 yılında Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi tarafından kapesitabinin primer tümörün tamamen rezeke edildiği Dukes evre C (evre III) hastalarda adjuvant monoterapi olarak kullanılması onaylanmıştır (69).

Kapesitabinin kimyasal ismi 5'-deoks.-5-fluoro-N-[(pentiloksi) karbonil]-sitidin'dir (23). Kapesitabinin moleküler ağırlığı 359,35'dir. Kapesitabinin yapısal formula aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (23).



Şekil 5. Kapesitabin'in yapısal formülü (23).

Kapesitabin bağırsaklardan pro-ilaç olarak emilmektedir (70). Aşağıdaki şekilde görüldüğü üzere, kapesitabin bağırsaklardan emildikten sonra karaciğerde karboksilesteraz ile 5'-deoksi-S-fluorositidin'e ve sitidin deaminaz ile 5'-deoksi-S-fluorouridin'e dönüştürülmektedir. Timidin fosforilaz da 5'-deoksi-S-fluorouridin'i aktif ilaç olan 5-fluorourasil'e dönüştürmektedir. Bu reaksiyon hem tümör dokusunda hem de normal dokularda gerçekleşmektedir. Ancak, timidin fosforilaz tümör dokularının çoğunda normal sağlıklı dokuya göre daha çok bulunmaktadır. Bu da teorik olarak kapesitabinin selektif aktivasyonunu ve düşük sistemik toksisitesini açıklayabilir. Aşağıdaki şekilde üç ardışık adımda kapesitabinin fluorourasile metobolik dönüşümü gösterilmektedir (70).



Şekil 6: Üç ardışık adımda kapesitabinin fluorourasile metabolik dönüşümü (70).

5'DFCR: 5'-deoksi-S-fluorositidin, Cyt D: Sitidin deaminaz, 5-FU: 5-Fluorourasil, TP: Timidin fosforilaz

2.2.2.1 Kapesitabin ve 5-fluorourasil + Lökovorin Tedavilerinin Eşdeğerliliği

Metastatik kolorektal kanserde oral kapesitabin tedavisi, hastalığın progresyonuna kadar geçen süre ve genel sağkalım göz önüne alındığında, bolus 5-fluorourasil + lökovorin tedavisine denktir (21). Hoff ve ark. 2001 yılında oral kapesitabin ile intravenöz fluorourasil+lökovorin tedavisinin karşılaştırıldığı metastatik kolorektal kanserli 605 hasta üzerinde yapılan randomize faz 3 çalışmanın sonuçlarını yayınlamışlardır (71). Prospektif olarak randomize edilen

605 hastaya oral kapesitabin her üç haftada bir 14 gün boyunca, 5-fluorourasil + lökovorin ise intravenöz enjeksiyon ile her dört haftada bir 5 gün boyunca verilmiştir. Tümör cevap oranının kapesitabin grubunda (%24,8), 5-fluorourasil + lökovorin grubuna göre (%15,5) daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Ayrıca bolus 5-fluorourasil + lökovorin ile karşılaştırıldığında oral kapesitabin tedavisinde belirgin olarak daha az diyare, stomatit, bulantı ve alopesi görülmüştür. Ayrıca kapesitabin ile tedavi edilen grupta daha az sıklıkta grade ¾ stomatit ve grade ¾ nötropeni görülmüştür. Ancak, kapesitabin tedavisi sırasında 5-fluorourasil + lökovorin grubuna göre daha fazla el-ayak sendromu ve grade ¾ hiperbilirübinemi görülmüştür. Sonuç olarak bu çalışmada oral kapesitabinin, 5-fluorourasil + lökovorine göre objektif tümör cevabının indüksiyonunda daha aktif olduğu tespit edilmiştir. Hastalığın ilerlemesine kadar geçen süre ve sağkalım süresi kapesitabin ve 5-fluorourasil + lökovorin tedavileri karşılaştırıldığında en azından denktir. Tolerans açısından kapesitabinin bolus 5-fluorourasil + lökovorin tedavisine göre klinik olarak anlamlı yararları gösterilmiştir.

Van Cutsem ve ark. 2001 yılında yayımlanan çalışması da Hoff ve ark. sonuçlarını desteklemektedir (72). Prospektif olarak randomize edilen 602 hastaya oral kapesitabin 1,250 mg/m^2 dozundan günde iki kez 14 gün boyunca her üç haftada bir verilmiş, diğer gruba ise 4 haftalık Mayo Klinik 5-fluorourasil + lökovorin rejimi hastalık ilerlemesi veya kabul edilemez toksisite görülünceye kadar uygulanmıştır. Kapesitabin grubunda genel cevap oranı %18,9, 5-fluorourasil + lökovorin grubunda ise %15'tir. Hastalığın ilerlemesine kadar geçen medyan süre kapesitabin grubunda 5,2 ay, 5-fluorourasil + lökovorin grubunda ise

4,7 aydır. Medyan genel sağkalım süresi kapesitabin grubunda 13,2 ay ve 5-fluorourasil + lökovorin grubunda ise 12,1 aydır. Kapesitabin ile belirgin olarak daha az sıklıkta stomatit ve alopesi görülürken, kapesitabin grubunda daha yüksek oranda kutanöz el-ayak sendromu görülmektedir. Kapesitabin grubunda daha az sıklıkta grade ¾ stomatit ve nötropeni görülürken, buna bağlı olarak daha az grade ¾ nötropenik ateş ve sepsis görülmektedir. Sadece grade 3 el-ayak sendromu ve komplike olmayan grade ¾ hiperbilirübineminin kapesitabin ile daha sık görüldüğü bildirilmiştir. Sonuç olarak oral kapesitabinin etkinliğinin en azından 5-fluorourasil + lökovorin tedavisine denk olduğu gösterilmiştir. Ayrıca kapesitabin ile oral ilaç alımının rahatlığı gözlenmiştir.

2.2.2.2 Kapesitabin Kullanırken Dikkat Edilmesi Gereken Noktalar

Kapesitabin beyaz renkli toz halindedir. Kapesitabinin suda çözünürlüğü 20ºC'de 26 mg/mL'dir. Kapesitabin kanda zirve değerine 1,5 (T_{max}) saatte ulaşmaktadır. Kapesitabin ve metabolitlerinin plazma proteinlerine bağlanma oranı %60'tan azdır. Kapesitabin en çok albumine bağlanır. Kapesitabin ve metabolitleri %95 oranında idrarla atılır. Fekal atılım oranı (%2,6) düşüktür. Kapesitabin antikoagülan warfarin ile birlikte kullanıldığında INR değerini arttırmaktadır. Kapesitabin diyareye, el-ayak sendromuna, kardiyotoksisiteye, hiperbilirubinemiye yol açabilir. Kapesitabin akut olarak yüksek dozda alınırsa bulantı, kusma, diyare, gastrointestinal iritasyon ve kanamaya ve kemik iliği depresyonuna yol açabilir.

2000 mg/kg kadar verilen tek doz kapesitabinin fare, rat ve maymunlarda öldürücü olmadığı görülmüştür. Söz konusu dozlar insanlara verilen günlük dozun, mg/m^2 bazında karşılaştırıldığında, sırasıyla 2,4, 4,8 ve 9,6 katıdır.

2.2.2.3 Deney Hayvanlarında Kapesitabin Dozu

Ninomiya ve ark. HT-29 insan kolon kanser hücre serisini subkutan ve rektal olarak BALB/c-*nu/nu* farelere vermişlerdir (73). Rektal zenograft modelinde her fareye $1x10^6$ hücre rektum anterior duvarına submukozal olarak enjekte edilmiştir. Kapesitabin maksimum tolere edilen doz olan 2,1 mmol/kg/gün dozundan oral olarak tümör hücreleri ekildikten 3 hafta sonra, 3 hafta boyunca haftada 5 gün verilmiştir. Tümör hücreleri ekildikten 6 hafta sonra fareler sakrifiye edilmiştir. Sakrifikasyon sonrası tümör ağırlıkları tartılmıştır. Kapesitabin, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında HT-29 insan kolon kanser hücre serisinin subkutan verildiği grupta %60,8, rektal enjekte edildiği grupta ise %43,8 tümör büyümesini engellemiştir.

2.2.3 Everolimus + Kapesitabin ile Yapılan Faz Çalışmaları

Deenen ve ark. 2011 yılında ileri evre solid kanserleri olan hastalarda oral kapesitabin ve everolimus tedavisinin faz I çalışmalarının sonuçlarını yayınlamışlardır (74). Çalışmada, primer tümörü pankreas, major duodenal papilla, özofagus, safra kesesi, beyin, osteosarkom ve hepatoselüler kanser olan 18

hastaya kapesitabin 1,000 mg/m^2 bid ile everolimus 10 mg /gün (5 mg bid) dozunda 14 gün boyunca her üç haftada bir verilmiştir. Everolimus ile medyan tedavi süresi 70 gündür (21-414 gün). En çok bildirilen tedaviye bağlı yan etkiler yorgunluk, stomatit ve el-ayak sendromu olmakla birlikte hastalar genellikle tedaviyi iyi tolere etmişlerdir. On dört hastada tedavinin cevabı değerlendirilebilmiştir. Hastalık klinik olarak ilerlediği için, 4 hasta çalışmadan erken çıkarılmıştır. Sonuç olarak ileri evre solid malignensileri olan hastaların %39'unda uzamış klinik yararlılık görülmüştür.

Lim ve ark. 2011 yılında daha önceden tedavi görmüş metastatik mide kanserli hastalara uygulanan kapesitabin ve everolimus tedavisinin faz I çalışmalarının sonuçlarını yayınlamışlardır (75). Çalışmaya metastatik mide kanseri olup da kemoterapi sonrası hastalığında progresyon görülen 15 hasta alınmıştır. Çalışma öncelikle dört ayrı ilaç dozu ile planlanmış olsa da sonuç olarak günde iki kez 650 mg/m^2 kapesitabin ve günde iki kez 5 mg everolimus dozu tedavi için önerilmiştir. Doz kısıtlayıcı toksisite grade 3 enfeksiyon, grade 3 mukozit ve grade 3 hiperglisemi ve hiponatremi olmuştur. Medyan takip süresi 5,6 ay (2,3–8,1 ay) olup medyan ilerleme görülmeyen hastalık süresi 1,8 ay (0,8–2,8) ay olmuştur. Tümörün en uzun çapında görülen en büyük azalma %28,7 olarak belirlenmiştir.

2.2.3.1 Everolimus ve Kapesitabin İle Yapılan Klinik Çalışmalar

Klinik çalışmalar (www.clinicaltrials.gov) internet sitesi, Amerikan Ulusal Tıp Kütüphanesi (National Library of Medicine (NLM)) tarafından Ulusal Sağlık Enstitüsü (National Institutes of Health (NIH)) bünyesinde oluşturulan resmi bir sitedir (24). Söz konusu site dünyadaki en geniş klinik çalışmalar bilgi bankasıdır. 7.1.2014 tarihi itibariyle klinik çalışmalar internet adresinde 'everolimus' içeren klinik çalışma sayısı 1553'tür. Bu sayı, birçok alanda kullanılabilmesi nedeniyle araştırmacıların dikkatini çeken everolimusun giderek artan popularitesinin bir göstergesidir. Kapesitabinin yer aldığı çalışma sayısı ise 1062'dir.

7.1.2014 tarihinde klinik çalışmalar internet adresinde yayımlanan kolorektal kanser tedavisinde everolimusun tek başına veya başka etken maddelerle birlikte kullanıldığı çalışmalar (anahtar kelimeler: everolimus colon cancer, everolimus colorectal) aşağıdaki tabloda gösterilmiştir. Tabloda görüldüğü üzere kolorektal kanserli hastalarda everolimusun tek başına kullanıldığı çalışmalar olduğu gibi, everolimusun setuksimab, irinotekan, FOLFOX, bevacizumab gibi ajanlarla kombine edildiği çalışmalar da mevcuttur. Everolimusun diğer ajanlarla kombine edildiği çalışmaların everolimusun tek başına kullanıldığı çalışmalara göre sayısal üstünlüğü dikkat çekicidir. Bu da ileri evre kolorektal kanserin tedavi edilebilmesi için en iyi ilaç kombinasyonunun hangisi olduğu konusundaki arayışların sürdüğünün bir göstergesidir.

Tablo 2. Kolorektal kanser tedavisinde everolimusun kullanıldığı klinik çalışmalar

Metastatik ve Tekrarlayan Kolon Kanseri veya Baş ve Boyun Kanseri Olan Hastaların Setuksimab ve Everolimus ile Tedavisi (Cetuximab and Everolimus in Treating Patients With Metastatic or Recurrent Colon Cancer or Head and Neck Cancer)
İleri Evre Solid Malignensilerde BKM120 ve Everolimus Kullanılmasının Faz I Çalışması (Phase I Study of BKM120 and Everolimus in Advanced Solid Malignancies)
Daha Önceki Tedaviye ve Kemoterapiye Yanıt Vermeyen Metastatik Kolorektal Kanserli Hastalarda Everolimusun Etkinlik ve Güvenliği (Efficacy and Safety of Everolimus in Patients With Metastatic Colorectal Cancer Who Have Failed Prior Targeted Therapy and Chemotherapy)
Dirençli Metastatik Kolorektal Kanserli Hastalarda Everolimus ve OSI-906 (Everolimus and OSI-906 for Patients With Refractory Metastatic Colorectal Cancer)
Metastatik Kolorektal Kanserli Hastalara İrinotekan, Setuksimab ve Everolimus (Irinotecan, Cetuximab and Everolimus to Patients With Metastatic Colorectal Cancer)
İleri Evre Kolorektal Kanserin Tedavisinde Panitumumab, İrinotekan ve Everolimus Kombinasyonunun Güvenlik Çalışması (Safety Study of the Combination of Panitumumab, Irinotecan and Everolimus in the Treatment of Advanced Colorectal Cancer)
Dirençli Metastatik Kolorektal Kanserde RAD001 ve AV-951 (RAD001 and AV-951 in Patients With Refractory, Metastatic Colorectal Cancer)
Kolorektal Kanser Tedavisinde RAD001, FOLFOX ve Bevacizumab (RAD001, FOLFOX and Bevacizumab in Treatment of Colorectal Carcinoma)
Metastatik Kolorektal Kanserli Hastalarda RAD001, Setuksimab ve İrinotekan Kombinasyonunun FOLFOX (veya XELOX) ve Bevacizumab Tedavisi Sonrası

Kullanılmasının Araştırılmasının Faz I Çalışması (Phase 1 Study Investigating the Combination of RAD001, Cetuximab and Irinotecan as Second-line Therapy After FOLFOX (or XELOX) Plus Bevacizumab in Patients With Metastatic Colorectal Cancer)
Metastatik Kolorektal Kanserde (MCRC) Bevacizumab+ Everolimus Kullanılarak Genişletilmiş Kohort (Expanded Cohort for Metastatic Colorectal Cancer (MCRC) Using Bevacizumab + Everolimus)
Dirençli Kolorektal Kanserde RAD001 Faz II Çalışması (Phase II Trial of RAD001 in Refractory Colorectal Cancer)
Kolorektal Kanserde ikinci Basamak Tedavide İrinotekan+ Setuksimab +/- RAD001 Kullanılmasının Faz I/ Randomizde Faz II Çalışması (Phase I/Randomized Phase II Study of Second Line Therapy With Irinotecan + Cetuximab +/- RAD001 for Colorectal Cancer)

Everolimus ve kapesitabinin birlikte kullanıldığı klinik çalışmalar (www.clinicaltrials.gov) internet sitesine kayıtlı çalışmalar aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (anahtar kelimeler: everolimus + capecitabine). Meme kanserinde, ileri evre solid tümörlerin tedavisinde, ileri evre mide kanserinde everolimus ve kapesitabinin birlikte kullanımı araştırılmaktadır. Ancak, Ocak 2014 tarihi itibariyle everolimus ve kapesitabinin özellikle kolorektal kaynaklı peritoneal karsinomatoziste birlikte kullanılmasını araştıran, klinik çalışmalar internet sitesine kayıtlı, bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Tablo 3. Everolimus ve kapesitabinin birlikte kullanıldığı klinik çalışmalar

İleri Evre Meme Kanserinde Everolimusun Eksemestan ile Beraber veya Everolmus Tek Başına veya Kapesitabin ile Kullanılmasının Faz II Çalışması (A Phase II Study of Everolimus in Combination With Exemestane Versus Everolimus Alone Versus Capecitabine in Advance Breast Cancer)
Santral Sinir Sistemi Metastazları Olan HER-2 pozitif Meme Kanseri Tedavisinde Lapatinib, Everolimus ve Kapesitabinin Faz 1b/2 Çalışması (Phase 1b/2 Trial Using Lapatinib, Everolimus and Capecitabine for Treatment of HER-2 Positive Breast Cancer With CNS Metastasis)
İleri Evre Solid Tümörlerin Tedavisinde RAD001'in (Everolimus) Mevcut Standart Tedavi Yöntemleriyle Beraber Kullanılmasının Güvenlik ve Doz Çalışması (Safety and Dosage Study of RAD001 (Everolimus) in Combination With Current Standard of Care to Treat Advanced Solid Tumors.)
İleri Evre Mide Kanserlerinde RAD001'in Kapesitabin ve Oksaliplatin (XELOX) ile Kombinasyonu (RAD001 in Combination With Capecitabine and Oxaliplatin (XELOX) in Patients With Advanced Gastric Cancer)

2.3. Caco-2 Hücre Serisi

Caco-2 hücre serisi insan epitelyal kolorektal adenokarsinoma hücreleri olup Jorgen Fogh tarafından Sloan-Kettering Kanser Araştırma Enstitüsü'nde geliştirilmiştir (76). Caco-2 hücre serisindeki hücrelerin spontan diferensiasyonlarını başlatma yeteneği mevcuttur. Yaklaşık 20-30 günlük hücre kültürü sonrası Caco-2 hücreleri morfolojik olarak polarite ve olgun intestinal absortif hücrelere benzer fırçamsı kenar hidrolaz seviyelerini gösterirler. Daha

sonra hücreler tipik enterosit benzeri morfolojiye kavuşurlar. Caco-2 hücreleri kültürleri yapıldıktan 21 gün sonra iyi gelişmiş sıkı bağlantılar (tight junction) oluştururlar. Caco-2 hücreleri, kolon kanser hücre dizileri içinde hücre kültüründe en hızlı büyüyen hücrelerdendir (77). Caco-2 hücrelerinin ortalama iki kat artış (doubling-time) süresi 62 saattir (78). Caco-2 hücreleri sıcağa dayanıklı enterotoksin ve epidermal büyüme faktörü reseptörlerini ve keratin, retinoik asit bağlayıcı protein 1-2'yi eksprese ederler. Caco-2 hücreleri çıplak (nude) farelerde oldukça iyi diferansiye grade-2 kolon adenokarsinomu oluştururlar (79).

ATCC (Amerikan Kültür Koleksiyonu - American Type Culture Collection) bünyesinde bulunan diğer insan kolorektal adenokarsinoma hücre serileri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (80).

Tablo 4. İnsan kolorektal adenokarsinoma hücre serileri

SW620	SW48	SW948	SW1417
SW480	SW1463	SW403	SW1116
SW837	NCI-H716	C2BBe1	HT-29
NCI-H508	GPC-16	NCI-H747	SK-CO-1
NCI-H498	WiDr	Hs 257.T	HCT-8
COLO 205	LS 174T	DLD-1	COLO 201
LoVo	HCT-15	LS123	LS 180
COLO 320DM	HRT-18G	COLO 320HSR	Caco-2

2.4. BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} Fare Modeli

1966 yılında Flagan, tüyleri ve timusu olmayan ilk BALB/c çıplak (nude) fareyi tanımlamıştır (81). BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} fareler doğumdan ölüme kadar tamamen tüysüzdür ve albinodur (82). BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} farelerin 11. kromozomdaki *nu* alelinde otozomal resesif mutasyon mevcuttur. Timus bezi yoktur (83). Çıplak farelerde embriyolojik anomali gestasyonun 11. gününden itibaren farkedilebilir. Söz konusu anomali 3.brankiyal yarıktan ektodermin çoğalıp farklılaşarak servikal vezikülü oluşturamamasıdır. Sonuç olarak, 3. poştaki endoderm dejenere olarak farklılaşmak yerine kistik oluşumlara dönüşmektedir (84). BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} farelerin T lenfositleri yoktur ama B lenfositleri normal fonksiyonlarını sürdürmektedir. Bu nedenle BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} farelerde graft versus host cevabı görülmemektedir. Timus bezine bağlı immün fonksiyonlar olmadığından BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} farelere insan tümörleri verilebilir (85).

Homozigot *nu/nu* fareler birçok bakteriyel ve viral patojenin yol açabileceği enfeksiyonlara karşı hassastırlar (86). Bu yüzden çıplak farelerin izolatörlerde, laminar akım kabinlerinde veya patojen bulunmayan ortamlarda tutulmaları gerekir. Bu şartlar altında çıplak fareler normal fareler kadar uzun yaşayabilirler.

Çıplak fareye normal timus grefti yerleştirildiğinde timus dokusu çalışmaya başlar. Buna göre nude fareler timosit prekürsörlere veya timik epitele karşı toksik maddeler üretmemektedirler (11). Çıplak fareler normal doğal

öldürücü (natural killer) hücrelere sahiptirler (87). Mononükleer hücreler de mevcuttur. Çıplak farelerde makrofaj fonksiyonları artmış gözükmektedir (88). Çıplak farelerde mast hücreleri mevcuttur. Ancak, homozigot *nu/nu* farelerin popliteal lenf nodlarındaki toplam mast hücre sayıları incelenmiş ve normal BALB/c farelere göre homozigot *nu/nu* farelerde mast hücre sayısının iki kat daha fazla olduğu saptanmıştır (89).

Çıplak farelerin dişi farelerinin üremesi zordur. Homozigot erkek fareler ile heterozigot dişi fareler eşleştirilerek homozigot *nu/nu* fareler üretilmektedir. Çıplak fareler over, kolon, deri, pankreas, meme, akciğer, prostat ve beyin kanseri gibi birçok onkolojik araştırmada kullanılmışlardır (90-92).

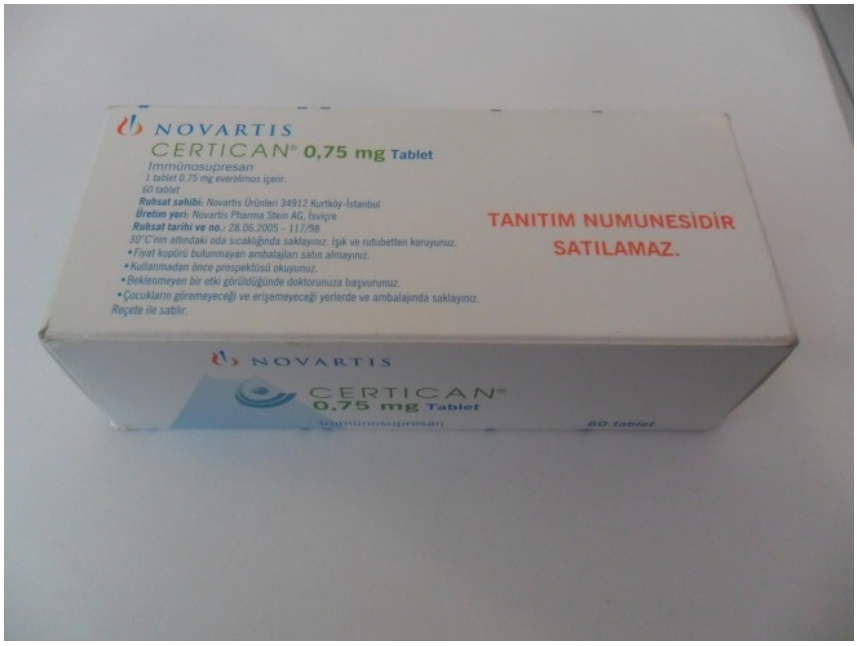
3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre Serileri ve Kullanılan Kimyasal Maddeler

Caco-2 insan epitelyal kolorektal adenokarsinoma hücreleri Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonu'ndan (American Type Culture Collection - ATCC®, Rockville, MD, ABD) satın alınmış olup Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir.

DMEM besiyeri (DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium), %10 FBS (fetal bovin serum), D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline), %0,05'lik tripsin-EDTA ve tripan mavisi (trypan blue stain %0,4) Gibco® firmasından satın alınmış olup Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir.

Kapesitabin (Xeloda 500 mg) Roche firması tarafından üretilmektedir. Everolimus (Certican 0,75 mg) ise Novartis firması tarafından üretilmektedir. Certican (Everolimus) tanıtım numunesi olarak Novartis firmasından, Xeloda (Kapesitabin) piyasadan temin edilmiştir.



Şekil 7: Certican 0,75 mg tablet

3.2. Deney Hayvanlarının Seçimi

Çalışmada 14-18 haftalık dişi, ağırlıkları 14,1-24,2 gr arasında değişen 8 adet BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} fare kullanıldı. BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} fareler Harlan (İsrail) firmasından alınmış olup Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deney Hayvanı Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} farelere bireysel havalandırmalı kafeslerde 23°C'de 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık koşullarda bakılmış olup, fareler Altromin marka 1414 TPF katalog numaralı yem ile beslenmişlerdir (93).

3.3. Caco-2 Hücre Kültürünün Hazırlanışı

Caco-2 insan epitelyal kolorektal adenokarsinoma hücreleri (American Type Culture Collection - ATCC®), %10 FBS (fetal bovine serum, Gibco®) içeren DMEM besiyerinde (DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco®) 37°C'de %5 CO_2 içeren etüvde çoğaltıldı (76, 78). Hücreler hücre kültür flask tabanını tamamen kapladığında tripsinize edildi. Ardından hücreler sayıldı ve hücrelerin canlılıklarına bakıldı.



Şekil 8: Hücre kültür flaskında Caco-2 hücreleri

Tripsinizasyon işlemi aşağıdaki gibi yapıldı:

1- Flasklardaki besi yeri döküldü.

2- 10 ml D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Gibco®) ile 2 kez yıkandı.

3- Hücrelerin üzerine 3 ml %0,05'lik tripsin-EDTA (%0,05 trypsin-EDTA Gibco®) ilave edilerek hücreler 5 dakika boyunca 37°C'de %5 CO_2 içeren etüvde bekletildi.

4- Hücreler pastör pipeti yardımıyla 50 ml'lik santrifüj tüpüne toplandı. Hücreler 1200 devir/dakika hızında 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatan atıldı. 1 ml (1000 mikrolitre) besiyeri ile pellet karıştırıldı.

Caco-2 hücrelerinin canlılığının değerlendirilmesi için 1 ml (1000 mikrolitre) besiyeri ile karıştırılan pelletten 10 mikrolitre alındı. 1,5 ml'lik Eppendorf tüpünde 10 mikrolitre pellet ile 190 mikrolitre tripan mavisi (trypan blue stain %0.4, Gibco®, seyreltme faktörü 20, 200 mikrolitre karışımda 10 mikrolitre pellet mevcut) karıştırıldı. Bu karışımdan (10 mikrolitre pellet ve 190 mikrolitre tripan mavisi) 10 mikrolitre alınarak Thoma lamına koyuldu. 5x büyütmeli ışık mikroskobunda Thoma lamında hücrelerin canlılığı ve sayısı belirlendi. (Thoma lamında dört ayrı alanda toplam 64 kare mevcut olup, her karedeki hücreler sayıldı). Dört ayrı bölgenin ortalamasını almak için, sayılan toplam hücre sayısı dörde bölündü. Bulunan ortalama hücre sayısı x 10^4 x

seyreltme faktörü x 1 (santrifüjden sonra pellet ile karıştırılan 1 ml besiyeri miktarı) formülü uygulanarak mikrolitredeki hücre sayısı belirlendi.

3.3.1 Caco-2 Hücrelerinin İntraperitoneal Enjeksiyonu

Çalışmada 14-18 haftalık dişi, ağırlıkları 14,1-24,2 gr arasında değişen 8 adet BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} fare kullanıldı. Deney grubundaki her BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} fareye 1,5 milyon (1,500,000) Caco-2 insan epitelyal kolorektal adenokarsinoma hücreleri insulin enjektörü ile intraperitoneal olarak enjekte edildi.



Şekil 9: Caco-2 hücrelerinin BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} farelere intraperitoneal olarak enjekte edilmesi

3.4. Tedavi Protokolü

Çalışmada yer alan 14-18 haftalık dişi, ağırlıkları 14,1-24,2 gr arasında değişen 8 adet BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} fare Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deney Hayvanı Üretimi ve Deneysel Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edildi.

Fareler randomize 4 gruba ayrıldı (Everolimus, Everolimus+Kapesitabin, Kapesitabin, Kontrol grubu). Her grupta iki BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} fare bulunmaktaydı. Fareler deneyden bir hafta önce laboratuvar koşullarına alınarak 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık koşullarda olmak üzere, 23°C'de barındırmış ve Altromin marka 1414 TPF katalog numaralı yem ile beslenmiştir.

Caco-2 insan epitelyal kolorektal adenokarsinoma hücrelerinin BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} farelere intraperitoneal olarak enjeksiyonundan 5 gün sonra tedaviye başlandı.

Everolimus serum fizyolojik (%0,9 NaCl) ile seyreltildi ve 7,5 mg/kg dozunda her iki günde bir 2 fareye oral yoldan gavaj ile verildi. Kapesitabin serum fizyolojik (%0,9 NaCl) ile seyreltildi. Kapesitabin farelerde maksimum tolere edilen doz olan 2,1 mmol/kg/gün (1 milimol kapesitabin 359 mg'dır) dozunda oral yoldan gavaj ile 2 adet fareye haftanın 5 günü (5/7) verildi. Kontrol grubundaki 2 adet fareye gavaj yolu ile sadece PBS verildi. (Bir adet kapesitabin (Xeloda 500 mg) tableti 635 mg, bir adet everolimus tableti (Certican 0,75 mg) 185 mg'dır.)

Tablo 5. Tedavi protokolü

	Everolimus	Everolimus + Kapesitabin	Kapesitabin	Kontrol Grubu
Fare Sayısı	2	2	2	2
Doz	7,5 mg/kg	7,5 mg/kg + 2,1 mmol/kg/gün	2,1 mmol/kg/gün	PBS



Şekil 10. BALB/c OlaHsd-*Foxn1*^{nu} fareye oral gavaj ile everolimusun verilmesi

Fareler günlük olarak takip edildi. Farelerde asit ya da tümör gelişiminin farelerin iyilik halini bozması halinde farelere 5 mg/kg ksilazin ile derin anestezi altında intrakardiyak kan alınarak ötenazi uygulanması planlandı.

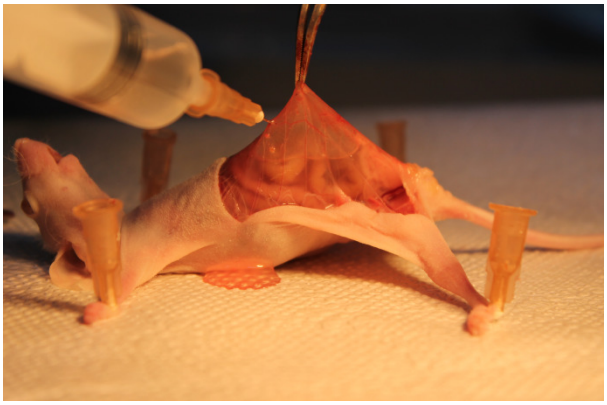
İntraperitoneal kaviteye Caco-2 hücrelerinin enjekte edilmesinden 22 gün sonra, tedaviye başladıktan 17 gün sonra, bütün deney hayvanlarına ötenazi uygulandı. Farelere intraperitoneal 50 mg/kg ketamin HCl ve 5 mg/kg ksilazin ile anestezi sağlandıktan sonra servikal dislokasyon yöntemi ile fareler sakrifiye edildi.

3.5. Cerrahi Yöntem

Orta hat insizyonu ile periton korunarak karın cildi açıldı. Enjektör ile periton geçilerek intraabdominal kaviteye serum fizyolojik (%0,9 NaCl) enjekte edildi. İntraperitoneal verilen sıvı tekrar aspire edildi. İntraabdominal periton yıkama sıvısı örnekleri sitolojik inceleme için ayrıldı. Tekrar intraperitoneal kaviteye serum fizyolojik verildi. Bu sayede peritonun havalanması ve diğer organlar zarar görmeden peritonun eksize edilmesi sağlandı. Söz konusu işlemler aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.

Daha sonra intraperitoneal enjeksiyon yerinde oluşan tümör eksize edildi. Çıkarılan toplam tümörün boyutları ölçüldü ve tümör tartıldı. Periton, mezenterik lenf nodları, karaciğer, dalak, böbrek, ince bağırsaklar, kolon, mide ve intraperitoneal enjeksiyon yerinde oluşan tümör dokusu patolojik inceleme için formol içeren saklama kaplarına konuldu.





A **B**





C **D**

Şekil 11. Peritoneal lavaj ve periton eksizyonu

A, B: %0.9 NaCl intraperitoneal olarak abdominal kaviteye verildikten sonra tekrar aspire edilmektedir. Aspire edilen sıvıda sitolojik inceleme ile malign hücre olup olmadığı araştırılmaktadır. **C, D:** Peritonun eksizyonu gösterilmektedir.

4. BULGULAR

BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} fareler everolimus, everolimus+kapesitabin, kapesitabin ve kontrol grubu olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Her grupta 2 fare bulunmaktaydı. Fareler günlük olarak tartıldı. Caco-2 kolon adenokarsinoma hücrelerinin BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} farelere intraperitoneal enjeksiyonu 0. gün olarak kabul edildi. Everolimus ve/veya kapesitabin ile tedaviye 5. günde başlandı. 22. günde fareler sakrifiye edildi. BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} farelerin 0, 5, 10, 15, 20 ve 22. günlerdeki gram (gr) cinsinden ağırlıkları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 6. BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} farelerin ağırlıkları (gr)

	0.gün	**5.gün**	**10.gün**	**15.gün**	**20.gün**	**22.gün**
Everolimus 1	24,2	24,3	24,5	25	25,4	25
Everolimus 2	15,8	19,9	20,9	20,8	21,2	20,6
Everolimus + Kapesitabin 1	19,8	15,7	16,9	17,1	17,2	16,4
Everolimus + Kapesitabin 2	19,5	19,1	19,9	20,2	20,4	19,6
Kapesitabin 1	18,6	18,4	19,5	19,5	19,9	18,5
Kapesitabin 2	17,6	18,9	19,1	19,1	19,3	19,5
Kontrol Grubu 1	22,4	22,7	23,6	24,2	24,8	25,1
Kontrol Grubu 2	14,1	16,1	16,5	16,8	17,7	17,1

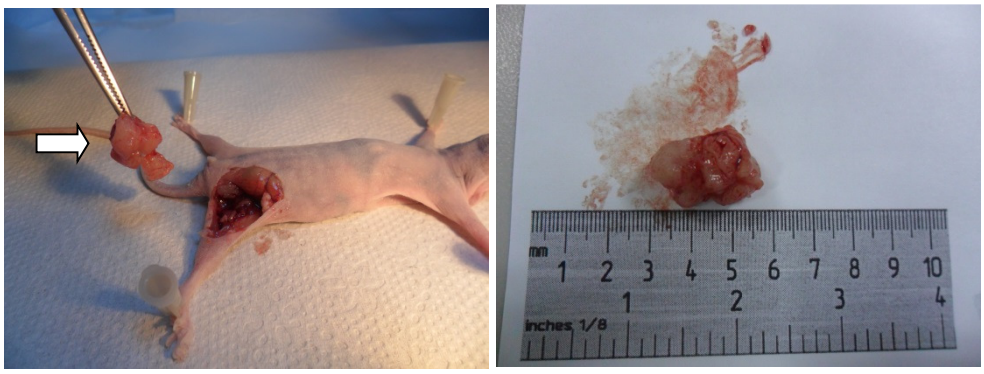
4.1. Kontrol Grubu

Kontrol grubundaki BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} farelere, Caco-2 insan kolon adenokarsinoma hücrelerinin intraperitoneal olarak enjeksiyonundan sonra, herhangi bir kemoterapi ajanı verilmedi. İntraperitoneal kaviteye Caco-2 hücrelerinin enjekte edilmesinden 22 gün sonra bütün deney hayvanlarına ötenazi uygulandı.

Kontrol grubundaki birinci farede inspeksiyonda abdomen sol alt kadranda Caco-2 hücrelerinin enjekte edildiği lokalizasyonda 1,5 cm'lik lezyon görüldü. Cilt insizyonu sonrası sol alt kadranda intraperitoneal yerleşimli olduğu görülen tümör eksize edildi. Tümör hacmi 2x1,5x1,5 cm: 4,5 cm^3 ve tümör ağırlığı 20 mg olarak saptandı. Eksplorasyonda diğer intraabdominal organlarda makroskopik tümöre rastlanmadı. Periton, mezenter lenf nodları, karaciğer, dalak, böbrek, ince bağırsaklar, kolon ve mide patolojik inceleme için eksize edildi.



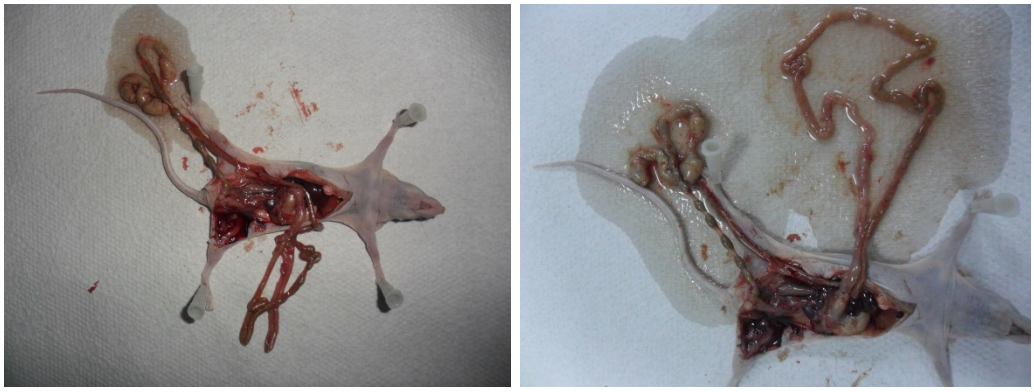
A **B** **C**



D **E**

Şekil 12. Kontrol grubu – 1'de sol alt kadrandan intraperitoneal tümör eksizyonu.

A, B, C: BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} farede abdomen sol alt kadranda yerleşimli tümöral lezyon beyaz renkli oklarla gösterilmiştir. **D, E:** Eksize edilen intraperitoneal yerleşimli 2x1,5x1,5 cm boyutlarındaki tümöral lezyon beyaz renkli okla gösterilmiştir.

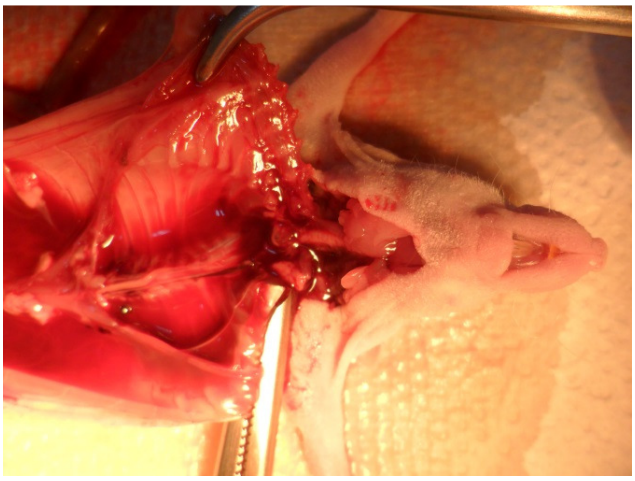


A **B**

Şekil 13. Kontrol grubu – 1'de intraabdominal organlar

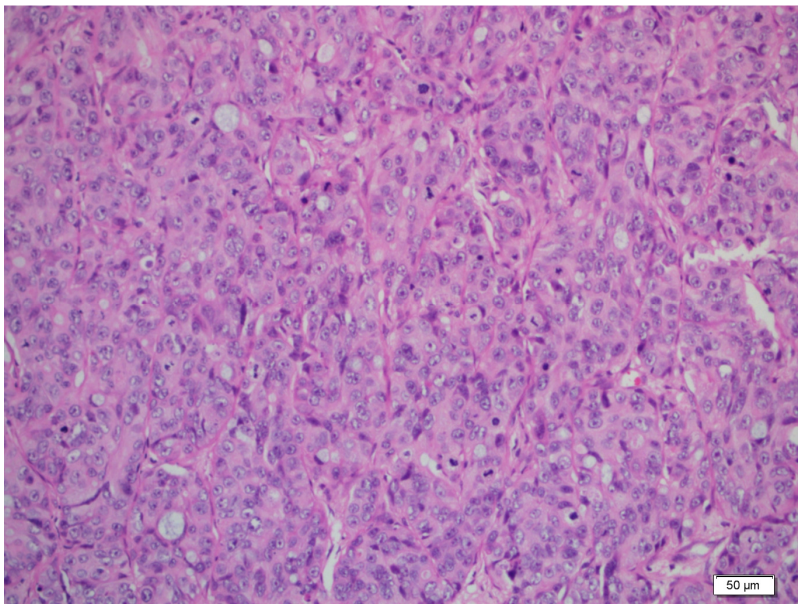
A, B: Kontrol grubunda sol alt kadrandan eksize edilen tümör dokusu dışında abdominal kavitede makroskopik tümör izlenmedi.

Kontrol grubundaki BALB/c OlaHsd-*Foxn1*^{nu} farede timus bezinin olmadığı aşağıdaki resimde gösterilmiştir.



Şekil 14. BALB/c OlaHsd-*Foxn1*^{nu} farede timus bezinin olmaması

Eksize edilen tümörün patolojik incelemesinde az diferansiye adenokarsinom saptandı. Diğer intraabdominal organlarda tümör saptanmadı. Periton yıkama sıvısının sitolojik incelemesinde tümör hücresi saptanmadı.

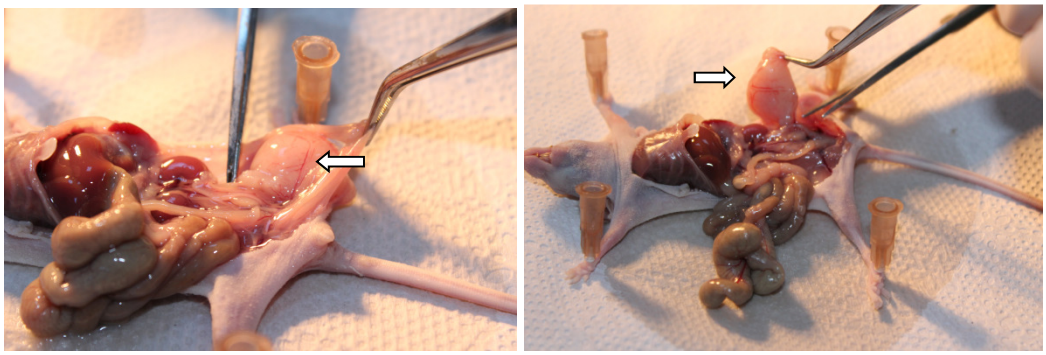


Şekil 15. Az diferansiye adenokarsinom

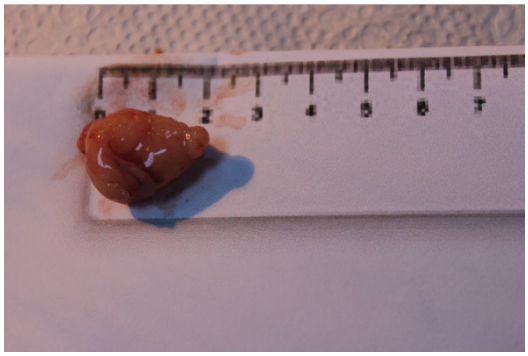
Kontrol grubundaki BALB/c OlaHsd-*Foxn1*^{nu} farenin Caco-2 insan kolon adenokarsinom hücrelerinin intraperitoneal olarak enjekte edildiği karın sol alt bölgesinden eksize edilen tümöral lezyonun patolojik incelemesinde az diferansiye adenokarsinom saptandı. Hematoksilen – eozin; x200'lük büyütme

Kontrol grubundaki ikinci farede inspeksiyonda ve eksplorasyonda abdomen sol alt kadranda Caco-2 insan kolon adenokarsinoma hücrelerinin enjekte edildiği lokalizasyonda intraperitoneal gelişen tümoral lezyon görüldü. Söz konusu lezyonun boyutlarının 2.,5x1,8x1,5 cm, ağırlığının 30 mg olduğu saptandı. Patolojik incelemede eksize edilen tümör dokusu az diferansiye

adenokarsinom olarak saptandı. Peritonda, mezenter lenf nodlarında, karaciğerde, dalakta, böbrekte, ince bağırsaklarda, kolonda ve midede tümör/ metastaz / infiltrasyon saptanmadı. Periton yıkama sıvısının sitolojik incelemesinde tümör hücresi saptanmadı.



A **B**



C

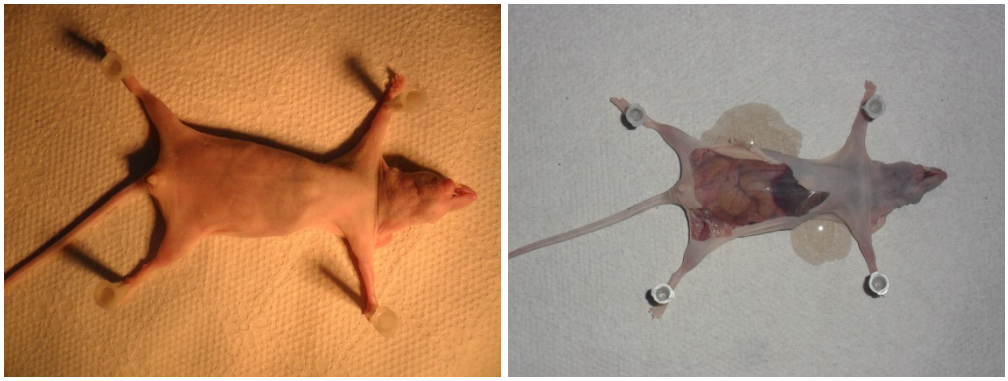
Şekil 16. Kontrol grubu – 2'de sol alt kadrandan intraperitoneal tümör eksizyonu

A, B, C: BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} farenin abdomen sol alt kadranından eksize edilen intraperitoneal yerleşimli 2,5x1,8x1,5 cm boyutlarındaki tümöral lezyon beyaz renkli oklarla gösterilmiştir.

4.2. Everolimus Verilen Grup

Caco-2 insan epitelyal kolon adenokarsinoma hücrelerinin BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} farelere intraperitoneal olarak enjeksiyonundan 5 gün sonra tedaviye başlandı. Everolimus serum fizyolojik (%0,9 NaCl) ile seyreltildi ve 7,5 mg/kg dozunda her iki günde bir 2 fareye oral yoldan gavaj ile verildi. Tedaviye başladıktan 17 gün sonra deney hayvanlarına ötenazi uygulandı.

Everolimus grubundaki birinci farede inspeksiyonda lezyon saptanmadı. Eksplorasyonda abdomen sol alt kadranda Caco-2 hücrelerinin enjekte edildiği lokalizasyonda 0,2x0,4x0,4 cm büyüklüğünde, 0,2 mg ağırlığında lezyon saptandı. Ancak, hem eksplorasyonda hem de patolojik incelemede peritonda, mezenterik lenf nodlarında, karaciğerde, dalakta, böbrekte, ince bağırsaklarda, kolonda ve midede tümör saptanmadı. Ayrıca, periton yıkama sıvısının sitolojik incelemesinde tümör hücresi saptanmadı.



A **B**



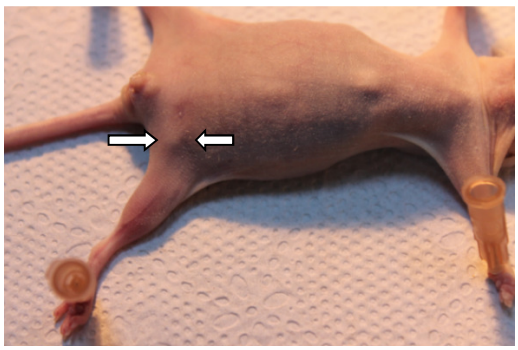
C **D**

Şekil 17: Everolimus grubu – 1'de laparotomi.

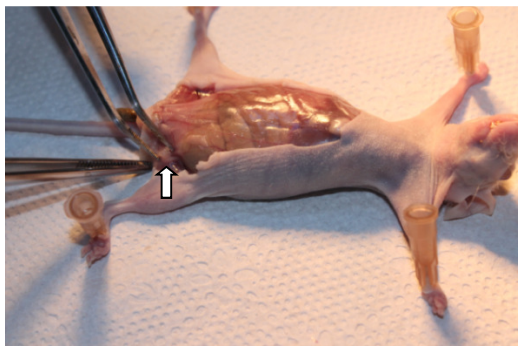
A, B: Everolimus verilen BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} farede inspeksiyonda lezyon saptanmadı.

C, D: Eksplorasyonda eksize edilen tümör dışında intraabdominal kavitede lezyon saptanmadı.

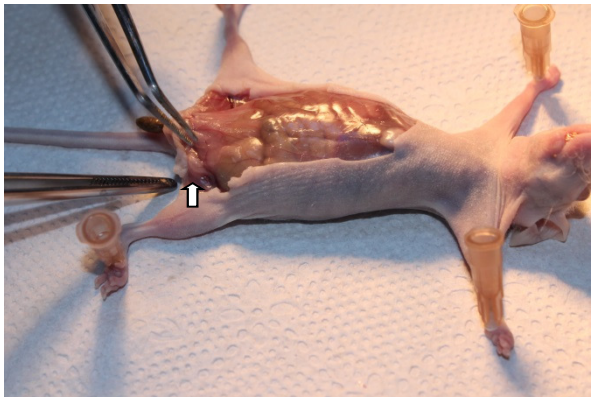
Sadece everolimus verilen ikinci farede tümör boyutu 1x0,6x0,4 cm olarak tespit edildi. Tümör ağırlığı 1,2 mg olarak saptandı.



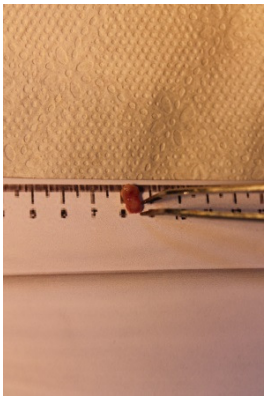
A



B



C



D

Şekil 18: Everolimus grubu – 2'de sol alt kadrandan lezyon eksizyonu.

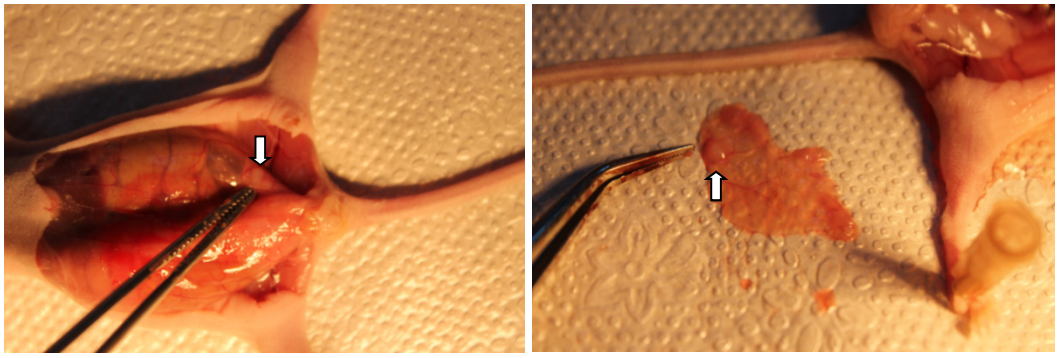
A, B, C, D: BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} farenin karın sol alt kadranından eksize edilen intraperitoneal yerleşimli 1x0.6x0.4 cm boyutlarındaki tümöral lezyon beyaz renkli oklarla gösterilmiştir.

Ayrıca, sadece everolimus verilen ikinci fareden eksize edilen intraabdominal organların patolojik incelemesinde mezenterik lenf nodlarında, peripankreatik ve perisplenik lenf nodlarında metastatik lenf nodları saptandı. Aynı zamanda ince bağırsak yüzeyinde de iki adet tümör depoziti saptandı. Ancak, periton yıkama sıvısının sitolojik incelemesinde tümör hücresi saptanmadı.

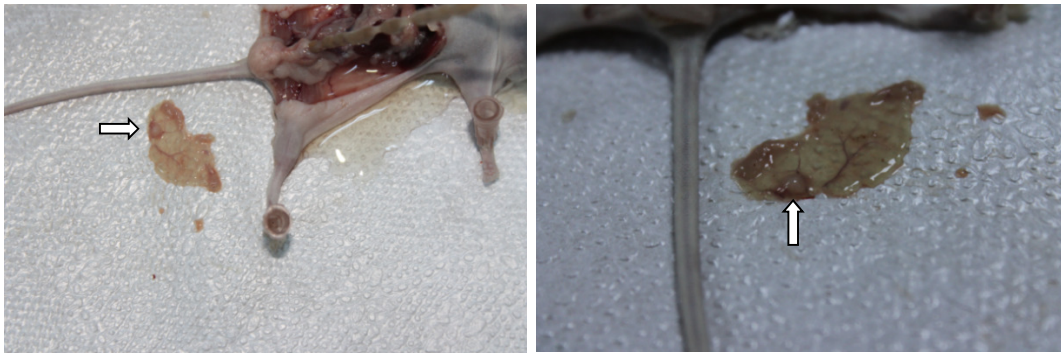
4.3. Kapesitabin Verilen Grup

Caco-2 insan epitelyal kolorektal adenokarsinoma hücrelerinin BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} farelere intraperitoneal olarak enjeksiyonundan 5 gün sonra tedaviye başlandı. Kapesitabin serum fizyolojik (%0,9 NaCl) ile seyreltildi. Kapesitabin farelerde maksimum tolere edilen doz olan 2,1 mmol/kg/gün dozunda oral gavaj ile 2 adet fareye haftanın 5 günü (5/7) verildi.

Kapesitabin verilen birinci farede eksplorasyonda tümörün periton dokusu ile beraber olduğu görüldü. Tümör boyutunun 0,2x0,1x0,3 cm olduğu saptandı. Eksplorasyonda makroskopik başka tümör dokusu saptanmadı. Periton, mezenterik lenf nodları, karaciğer, dalak, böbrekler, ince bağırsak, kolon ve mide patolojik inceleme için eksize edildi. Periton yıkama sıvısının sitolojik incelemesinde tümör hücresi saptanmadı.



A **B**

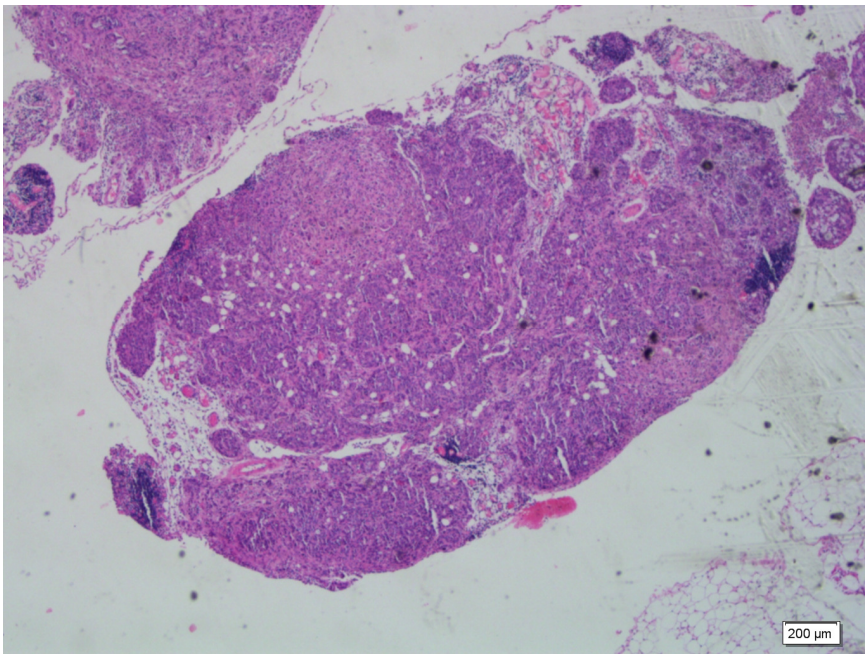


C **D**

Şekil 19: Kapesitabin grubu – 1'de sol alt kadranda peritoneal yüzeyde tümör oluşumu

A, B, C, D: BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} farede abdomen sol alt kadranda peritoneal yüzeyde tespit edilen tümöral lezyon beyaz renkli oklarla gösterilmiştir.

Mikroskopik incelemede sadece mezenterik lenf nodlarında metastaz saptandı.



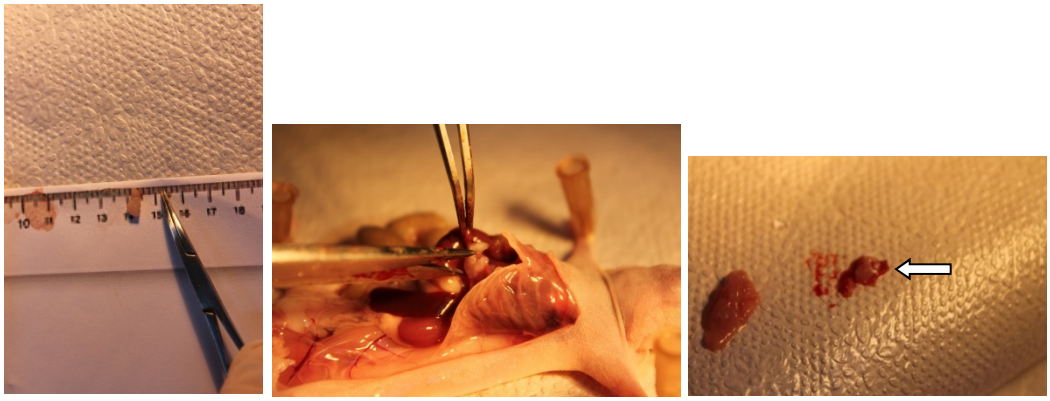
Şekil 20. Mezenterik lenf nodunda metastaz

Caco-2 hücrelerinin intraperitoneal enjeksiyonu sonrası 2,1 mmol/kg/gün dozunda oral gavaj ile kapesitabin tedavisi uygulanan BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} farede mezenterik lenf noduna metastaz gösteren az diferansiye adenokarsinom. Hematoksilen – eozin; x40'lık büyütme.

Sadece kapesitabin verilen ikinci farede tümör boyutu 0,4x0,5x0,6 cm olarak tespit edildi. Sakrifiye edilen diğer farelerden farklı olarak sol alt kadrandan eksize edilen lezyon dışında diyafram yüzeyinde tümör ile uyumlu olabilecek lezyon tespit edildi. Lezyon patolojik inceleme için eksize edildi.



A **B**

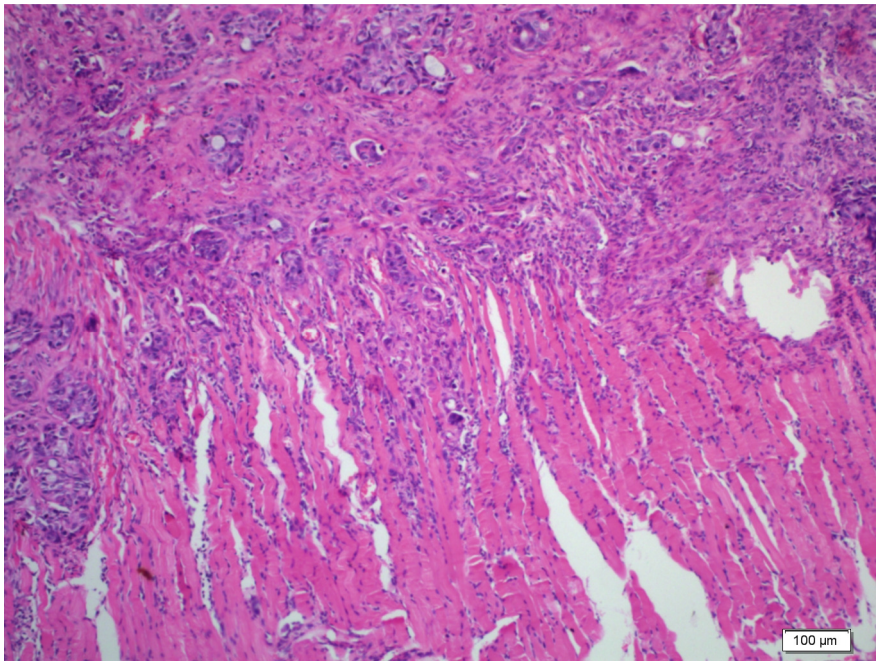


C **D** **E**

Şekil 21. Kapesitabin – 2'de sol alt kadrandan ve diyaframdan lezyon eksizyonu

A, B, C: BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} farenin karın sol alt kadranından eksize edilen intraperitoneal yerleşimli 0.4x0.5x0.6 cm boyutlarındaki tümöral lezyon beyaz renkli oklarla gösterilmiştir. **D, E:** Diyaframda tümör infiltrasyonu şüphesi üzerine lezyon patolojik inceleme için eksize edildi (ok).

Diyaframdan eksize edilen lezyonun mikroskopik incelemesinde diyafram çizgili kasına infiltre az diferansiye adenokarsinom saptandı. Ayrıca, perisplenik lenf nodlarında ve mezenterik lenf nodlarında az diferansiye adenokarsinom metastazları saptandı. Ancak, peritoneal yıkama sıvında malign hücre tespit edilmedi.



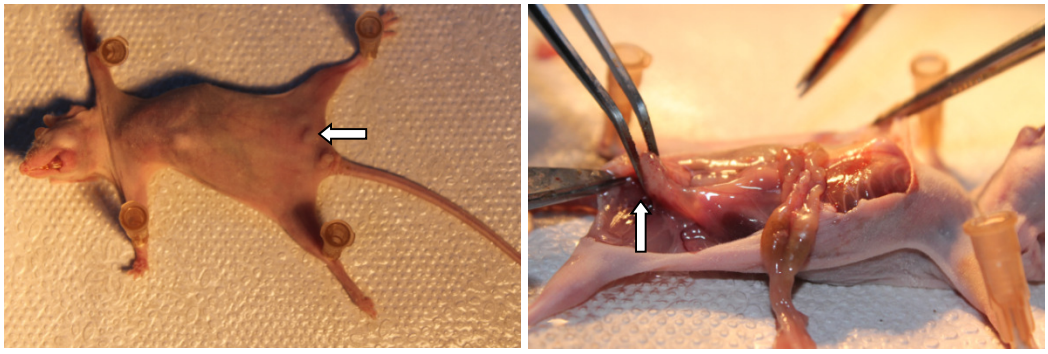
Şekil 22. Diyaframa infiltre az diferansiye adenokarsinom

Kapesitabin verilen BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} farede diyafram çizgili kasına infiltre az diferansiye adenokarsinom. Hematoksilen – eozin; x100'lük büyütme

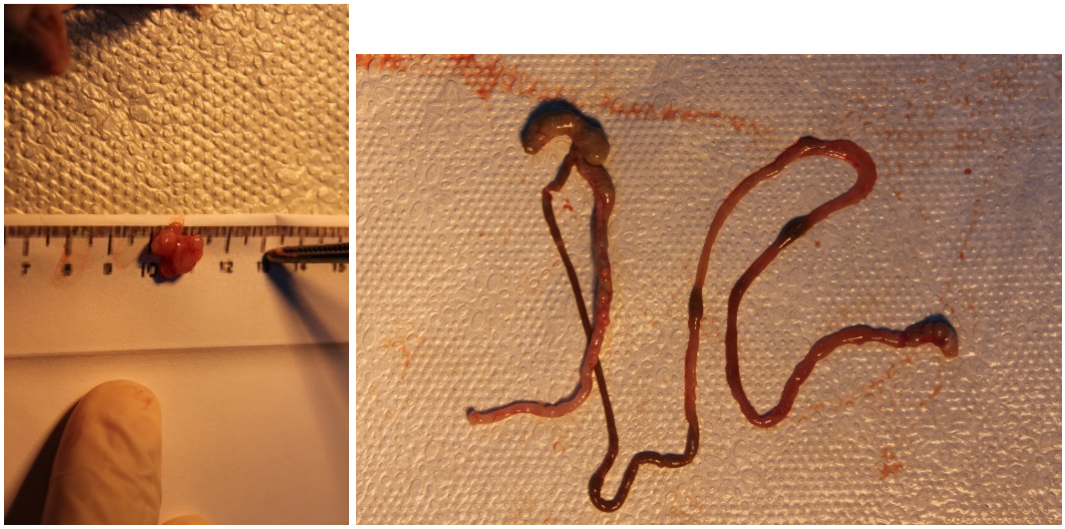
4.4. Everolimus ve Kapesitabin Verilen Grup

Caco-2 insan epitelyal kolorektal adenokarsinoma hücrelerinin BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} farelere intraperitoneal olarak enjeksiyonundan 5 gün sonra tedaviye başlandı. Kapesitabin 2,1 mmol/kg/gün dozunda haftanın 5 günü (5/7), everolimus 7,5 mg/kg dozunda her iki günde bir 2 fareye oral yoldan gavaj ile verildi. Tedaviye başladıktan 17 gün sonra deney hayvanlarına ötenazi uygulandı.

Everolimus ve kapesitabin birlikte verilen birinci farede tümör boyutu 1,2x1x0,8 cm olarak tespit edildi. Patolojik incelemede tümör dokusu az diferansiye adenokarsinom ile uyumlu idi. Ayrıca, mezenterik lenf nodlarında az diferansiye adenokarsinom metastazları tespit edildi. Periton yıkama sıvısında, peritonda, her iki böbrekte, karaciğerde, dalakta, ince ve kalın bağırsaklarlarda malign hücreler saptanmadı.



A **B**

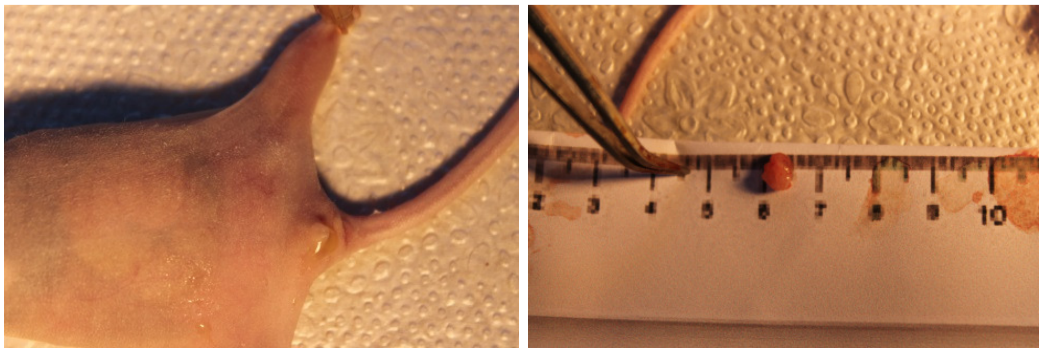


C **D**

Şekil 23. Everolimus ve kapesitabin birlikte verilen fare -1

A, B, C: BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} farenin karın sol alt kadranından eksize edilen intraperitoneal yerleşimli 1.2x1x0.8 cm boyutlarındaki tümöral lezyon beyaz renkli oklarla gösterilmiştir. **D:** İnce ve kalın bağırsaklarda makroskopik tümöre rastlanmadı.

Everolimus ve kapesitabin birlikte verilen ikinci farede tümör boyutu 0,5x0,6x0,4 cm olarak tespit edildi. Diğer intraabdominal organlarda, peritonda ve peritoneal lavaj sıvısında malign hücre saptanmadı.

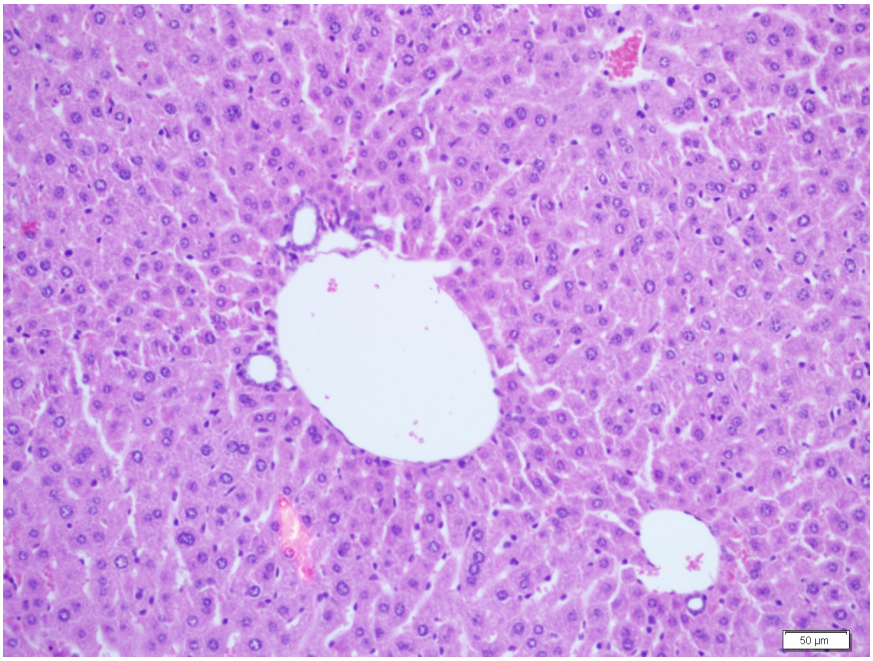


A **B**

Şekil 24. Everolimus ve kapesitabin birlikte verilen fare - 2

A: İnspeksiyonda Caco-2 hücrelerinin intraperitoneal enjeksiyonunun yapıldığı lokalizasyonda belirgin tümör büyümesi görülmemektedir. **B:** Tümör boyutu 0,5x0,6x0,4 cm'dir.

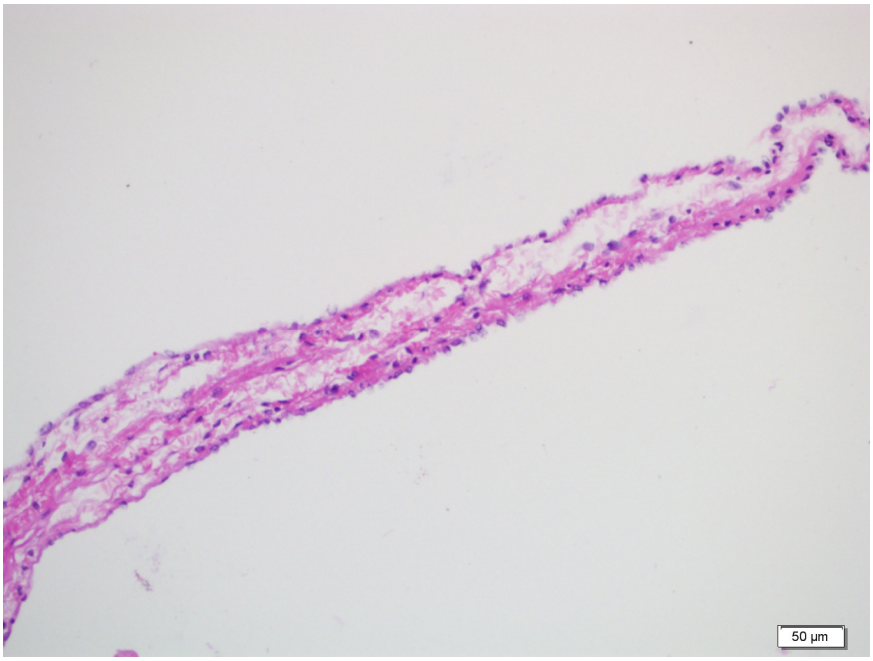
Dört gruptaki (everolimus, everolimus+kapesitabin, kapesitabin, kontrol grubu) fareler sakrifiye edildikten sonra eksize edilen karaciğer dokularının makroskopik ve mikroskopik incelemesinde akut veya kronik karaciğer toksisitesi saptanmadı. Ayrıca, dört deney grubunda karaciğer metastazına rastlanmadı.



Şekil 25. Karaciğer dokusu

Patolojik özellik göstermeyen karaciğer dokusu. İki adet portal alan ve sağ üstte bir hepatik ven görülüyor. Hematoksilen – eozin; x200'lük büyütme.

Caco-2 hücrelerinin BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} farelere intraperitoneal enjeksiyonu sonrası tüm farelerde az diferansiye adenokarsinom oluşumu izlenmiştir. Deney gruplarındaki bütün farelere peritonektomi uygulanmıştır. Periton örneklerinin patolojik incelemesinde tümör infiltrasyonu saptanmamıştır.



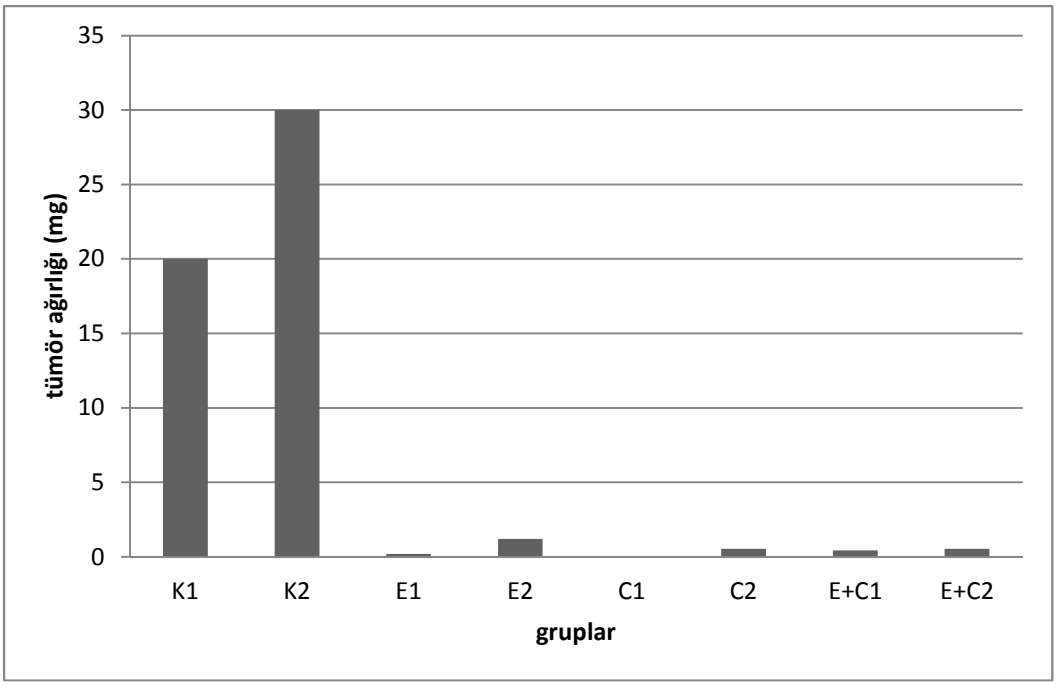
Şekil 26. Periton

Sadece kapesitabin verilen farede tümör içermeyen periton dokusu. Hematoksilen – eozin; x200'lük büyütme

4.5. Verilerin İstatiksel Değerlendirmesi

İstatistiksel analiz olarak tanımlayıcı bulgular kısmında kategorik veriler sayı, yüzde ve sürekli değişkenler ise ortalama ± standart hata, ortanca (minimum-maksimum) olarak sunulmuştur. Ölçümle belirtilen verilerin karşılaştırılmasında Kruskal Wallis Varyans Analizi kullanılmıştır. Tüm verilerde istatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak alınmıştır.

Farelerden eksize edilen tümör örnekleri tartıldı. Kontrol grubunda tümör ağırlıkları 20 mg ve 30 mg; everolimus verilen grupta 0,2 mg ve 1,2 mg; kapesitabin verilen grupta 0,03 mg ve 0,54 mg; everolimus ve kapesitabinin birlikte verildiği grupta tümör ağırlıkları 0,43 mg ve 0,54 mg'dı. Aşağıdaki grafikte görüldüğü üzere kontrol grubundaki tümör ağırlığı everolimus ve/veya kapesitabin verilen gruplara göre fazlaydı. Hem everolimus hem de kapesitabin, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, tümör büyümesini engellemişlerdi.



Şekil 27. Tümör ağırlıklarının karşılaştırılması

K: Kontrol, E: Everolimus, C: Kapesitabin, Tümör ağırlığı: mg. BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} farelerden eksize edilen tümör örneklerinin ağırlıkları gösterilmiştir. Everolimus ve/veya kapesitabin verilen farelerde tümör büyümesi belirgin olarak baskılanmıştır.

Everolimus ve/veya kapesitabin verilen BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} farelerde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, tümör büyümesinin belirgin olarak baskılandığı görüldü. Bunun üzerine farelerden eksize edilen tümörlerin ağırlıkları açısından dört grup (kontrol, everolimus, kapesitabin, everolimus+kapesitabin) arasında istatiksel olarak anlamlı fark olup olmadığına bakıldı.

Eksize edilen tümörlerin gruplara göre ağırlıklarının ortalama ve ortanca dağılımları hesaplandı. Kruskal-Wallis Varyans Analizi Testi uygulandı. Tabloda görüldüğü üzere kontrol, everolimus, kapesitabin ve everolimus+kapesitabin

grubundaki farelerden eksize edilen tümör ağırlıkları gr (gram) olarak karşılaştırıldığında dört grup arasında istatiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p: 0.227).

Tablo 6. Eksize edilen tümörlerin gruplara göre ağırlıklarının ortalama ve ortanca dağılımları

Toplam n : 8	**Ortalama±SD Ortanca(min;-maks;)**
Kontrol **n:2**	0,025±0,007 0,025(0,02-0,03)
Everolimus **n:2**	0,0007±0,21 0,0007(0,0002-0,0012)
Kapesitabin **n:2**	0,0002850±0,00036 0,0002850(0,00003-0,00054)
Everolimus + Kapesitabin **n:2**	0,000485±0,000077 0,0004850(0,00043-0,00054)
	P=0.227

Kruskal-Wallis Varyans Analizi Testi Uygulanmıştır. n: her gruptaki fare sayısı

Ayrıca, tümör büyümesinin ve kemoterapötik ajanlarla yapılan tedavinin BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} farelerin ağırlıklarına olan etkileri incelendi.

İntraperitoneal Caco-2 hücrelerinin verildiği gün 0. gün, everolimus ve/veya kapesitabin ile tedaviye başlanması 5. gün, farelerin sakrifiye edilmesi 22. gün olarak kaydedilmiştir. Farelerin gruplara ve 0, 5, 15, 20 ve 22. günlere göre ağırlıklarının ortalama ve ortanca dağılımları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tabloda görüldüğü üzere everolimus, everolimus+kapesitabin, kapesitabin ve kontrol grubundaki farelerin 0, 5, 15, 20 ve 22. günlerdeki ağırlıkları gr (gram) olarak karşılaştırıldığında dört gruptaki farelerin günlere göre ağırlıkları arasında istatiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Buna göre everolimus ve/veya kapesitabin farelerin ağırlıklarında bir değişikliğe neden olmamıştır. Everolimus ve/veya kapesitabinin yan etkisi olabilecek kilo alımı veya kaybı farelerde gözlenmemiştir.

Tablo 7. Farelerin gruplara ve günlere göre ağırlıklarının ortalama ve ortanca dağılımları

Toplam n : 8	**0. gün** Ortalama±SD Ortanca(min;-maks;)	**5. gün** Ortalama±SD Ortanca(min;-maks;)	**10. gün** Ortalama±SD Ortanca(min;-maks;)	**15. gün** Ortalama±SD Ortanca(min;-maks;)	**20. gün** Ortalama±SD Ortanca(min;-maks;)	**22. gün** Ortalama±SD Ortanca(min;-maks;)
Everolimus n:2	20±5,93 20(15,8-24,2)	22,1±3,11 22,1(19,9-24,3)	22,7±2,54 22,7(20,9-24,5)	22,9±2,96 22,9(20,8-25)	23,3±2,96 23,3(21,2-25,4)	22,8±3,11 22,8(20,6-25)
Kapesitabin + Everolimus n:2	19,65±0,21 19,65(19,5-19,8)	17,4±2,40 17,4(15,7-19,1)	18,4±2,12 18,4(16,9-19,9)	18,65±2,19 18,65(17,1-20,2)	18,8±2,26 18,8(17,2-20,4)	18±2,26 18(16,4-19,6)
Kapesitabin n:2	18,1±0,7 18,1(17,6-18,6)	18,65±0,35 18,65(18,4-18,9)	19,3±0,28 19,3(19,1-19,5)	19,3±0,28 19,3(19,1-19,5)	19,6±0,42 19,6(19,3-19,9)	19±0,7 19(18,5-19,5)
Kontrol n:2	18,25±5,86 18,25(14,1-22,4)	19,4±4,66 19,4(16,1-22,7)	20,05±5,02 20,05(16,5-23,6)	20,5±5,23 20,5(16,8-24,2)	21,25± 21,25(17,7-24,8)	21,1±5,65 21,1(17,1-25,1)
	P=0.841	**P= 0.367**	**P=0.418**	**P=0.418**	**P=0.367**	**P=0.475**

Kruskal-Wallis Varyans Analizi Testi uygulanmıştır. n: her gruptaki fare sayısı

5. TARTIŞMA

Kolorektal kanser Türkiye'de erkeklerde en sık görülen dördüncü, kadınlarda en sık görülen üçüncü, Amerika Birleşik Devletleri'nde erkeklerde ve kadınlarda en sık görülen ikinci kanser türüdür (25, 26). Kolorektal kansere sekonder gelişen peritonitis karsinomatoza, peritoneal yüzeylerde solid tümör depozitlerinin oluşmasıyla karakterizedir (27). Genel cerrahlar kolorektal kanser nedeniyle opere ettikleri hastaların %7'sinde intraoperatif peritonitis karsinomatoza ile karşılaşmaktadırlar (1). Ayrıca küratif cerrahi sonrası hastaların %4-%19'unda ve kolorektal kanserin nüks ettiği hastaların %44'ünde peritonitis karsinomatoza gelişmektedir (1). Peritonitis karsinomatoza hastalığın ileri evre olduğunu gösterir (evre IVb-M1b) (30). Eğer tedavi edilmezse kolorektal kaynaklı peritonitis karsinomatozada teşhisten sonra medyan sağkalım 6-9 aydır (2). Metastatik kolorektal kanser tedavisinde uygulanan kemoterapi protokolleri (Alman AIO, CAPOX, Douillard, FOLFOX4, FOLFOX6, FOLFIRI, FUFOX, FUOX, IFL- Saltz, XELOX) bile medyan sağkalımı ancak 20,3 aya çıkarılabilmiştir (3). Ayrıca, söz konusu kemoterapi protokolleri intravenöz girişim içermeleri ve bazı protokollerde 46 saate varan kemoterapötik ajan infüzyonlarının bulunması nedeniyle hastanın tedaviye uyumunu zorlaştırmakta ve hastanın konforunu azaltmaktadır.

Peritonitis karsinomatoza tedavisinde Sugarbaker'ın önerdiği sitoredüktif cerrahi ve hipertermik intaperitoneal kemoterapi tedavi yönteminin ise morbiditesi yüksektir ve sadece tecrübeli cerrahlar tarafından seçilmiş hastalar üzerinde belirli

merkezlerde uygulanabilmektedir (5). Buna göre kolorektal kaynaklı peritonitis karsinomatoza teşhisi konan birçok hastada sadece destekleyici tedavi yöntemleri uygulanabilmektedir. Kolorektal kaynaklı peritonitis karsinomatoza teşhisi konulan hastaların sağkalımını arttırabilmek ve tedaviye uyumlarını kolaylaştırabilmek için yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Kolorektal kaynaklı peritonitis karsinomatoza tedavisinde yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulması ile ilgili olarak hücre içi PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu dikkati çekmektedir. PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu hücre proliferasyonunda, hücre büyümesinde ve anjiyogenezde merkezi bir düzenleyicidir. PI3K/AKT/mTOR yolunun inhibisyonu kanser tedavisinde başlıca stratejilerdendir (7). Rapamisin ve everolimus gibi mTOR inhibitörleri PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunda iletimi engelleyerek hücre proliferasyonunu ve anjiogenezi azaltmakta ve bu sayede tümör büyümesini baskılamaktadır (62).

Bu konuyla ilgili olarak, Wagner ve ark. oral mTOR inhbitörü rapamisinin intravenöz 5-fluorourasil ile birlikte verildiğinde kolorektal kaynaklı peritonitis karsinomatoza fare modelinde tümör büyümesini baskıladığını göstermişlerdir (6). Rapamisinin oral yoldan kullanılabilen, rapamisine göre biyoyararlılığı daha yüksek olan türevi everolimustur. Ancak, 5-fluorourasil sadece intravenöz yoldan kullanılabilmektedir, 5-fluorourasilin oral formu yoktur. 5-FU'nun oral yoldan kullanılabilen eşleniği kapesitabindir (20). Metastatik kolorektal kanserde oral kapesitabin tedavisi, hastalığın progresyonuna kadar geçen süre ve genel sağkalım göz önüne alındığında, iv 5-fluorourasil + lökovorin tedavisine denktir (21). Oral yoldan kullanılabilen kemoterapötik ajanlarla yapılan peritonitis karsinomatoza

tedavisinin hastanın tedaviye uyumunu kolaylaştıracağı ve konforunu arttıracağı düşünülmüştür. Bu amaçla, oral mTOR inhibitörü everolimus ve oral kapesitabin tedavisinin kolorektal kaynaklı peritonitis karsinomatoza fare modelinde denenmesi planlanmıştır.

Günümüzde everolimus, subependimal büyük hücreli astrositom, ileri evre meme kanseri, progresif pankreas kaynaklı nöroendokrin tümörler, subependimal dev hücreli astrositom ve ileri evre renal hücreli karsinom gibi hastalarda tümör büyümesi ve ilerlemesini baskılayıcı etkisi nedeniyle kullanılmaktadır (22). Kapesitabin, kolorektal kanser ve metastatik meme kanseri tedavisinde kullanılmaktadır (23). Mevcut tedavi protokolleri içinde yer almaları nedeniyle hem everolimusun hem de kapesitabinin etki-yan etki profilleri ayrıntılı olarak bilinmektedir.

Tıbbi literatürde, everolimusun birçok deneysel modelde peritonitis karsinomatoza üzerine olan olumlu etkisi gösterilmiştir. Taguchi ve ark. peritoneal yayılım olan ileri evre mide kanserlerinde everolimusun etkinliğini göstermek için peritoneal metastaza çok yatkın olan 58As1 insan mide kanseri hücre serisini fare modelinde kullanmışlar ve everolimusun peritoneal yayılımı belirgin olarak azalttığını göstermişlerdir (65). Chu ve ark. everolimusun KRAS mutasyonu olan insan kolorektal karsinoma hücre serisini fare modelinde test etmişler ve tek başına everolimusun belirgin antitümör aktivite gösterdiğini saptamışlardır (66). Mabuchi ve ark. everolimusun over kanserinde transgenik fare modelinde tümör başlangıcını ve ilerlemesini geciktirdiğini bildirmişlerdir. (67). Ayrıca, insanlar üzerine yapılan çalışmalarda everolimusun tek başına kullanıldığında tümör

büyümesi üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Okamoto ve ark. ileri evre solid tümörleri olan hastalara günlük everolimus tedavisi verilmesi ile ilgili faz 1 çalışmalarının sonuçlarını yayınlamış ve özofagus ve mide kanseri olan hastalarda 10 mg/gün everolimus tedavisi altında belirgin tümör küçülmesi gözlendiğini bildirmişlerdir (15). Yoon ve ark. ise ileri evre mide kanserlerinde günlük 10 mg everolimus verilmesinin sadece sınırlı sayıda etkili olduğunu belirtmişlerdir (68).

Tıbbi literatürde söz konusu çalışmaların yanısıra everolimus ve kapesitabinin birlikte kullanıldığı insanlar üzerinde yapılan faz çalışmaları da mevcuttur. Deenen ve ark. ileri evre solid kanserleri olan hastalarda oral kapesitabin ve everolimus tedavisinin faz I çalışmalarının sonuçlarını yayınlamışlardır (74). Çalışmada, primer tümörü pankreas, major duodenal papilla, özofagus, safra kesesi, beyin, osteosarkom ve hepatoselüler kanser olan 18 hastaya kapesitabin 1,000 mg/m^2 bid ile everolimus 10 mg/gün (5 mg bid) dozunda 14 gün boyunca her üç haftada bir verilmiştir ve ileri evre solid malignensileri olan hastaların %39'unda uzamış klinik yararlılık görülmüştür. Lim ve ark. ise daha önceden tedavi görmüş metastatik mide kanserli hastalara uygulanan kapesitabin ve everolimus tedavisinin faz I çalışmalarının sonuçlarını yayınlamışlardır (75). Çalışmaya metastatik mide kanseri olup da kemoterapi sonrası hastalığında progresyon görülen 15 hasta alınmıştır. Günde iki kez 650 mg/m^2 kapesitabin ve günde iki kez 5 mg everolimus tedavisi ile medyan ilerleme görülmeyen hastalık süresinin 1,8 ay (0,8–2,8) ay olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda, tümörün en uzun çapında görülen en büyük azalma %28,7 olarak belirlenmiştir.

Yukarıda bahsedilen çalışmalarda everolimus ve kapesitabin kombine tedavisinin denendiği hasta sayısının azlığı ve everolimus+kapesitabin tedavisinin özellikle kolorektal kaynaklı peritoneal karsinomatoziste kullanılmasını araştıran bir çalışmaya rastlanmamış olması dikkat çekicidir.

Tıbbi literatürün yanısıra Amerikan Ulusal Tıp Kütüphanesi tarafından Ulusal Sağlık Enstitüsü bünyesinde oluşturulan klinik çalışmalar (www.clinicaltrials.gov) internet sitesini, dünyadaki en geniş klinik çalışmalar bilgi bankası olması sebebiyle incelemekte fayda vardır (24). Klinik çalışmalar internet sitesinde yayımlanan kolorektal kanser tedavisinde everolimusun tek başına veya başka etken maddelerle birlikte kullanıldığı çalışmalar incelendiğinde kolorektal kanserli hastalarda everolimusun tek başına kullanıldığı çalışmalar olduğu gibi, everolimusun setuksimab, irinotekan, FOLFOX, bevacizumab gibi ajanlarla kombine edildiği çalışmalar da mevcuttur. Everolimusun diğer ajanlarla kombine edildiği çalışmaların everolimusun tek başına kullanıldığı çalışmalara göre sayısal üstünlüğü dikkat çekicidir. Ayrıca, everolimus ve kapesitabinin birlikte kullanıldığı klinik çalışmalar internet sitesine kayıtlı çalışmalar incelendiğinde everolimus ve kapesitabinin birlikte kullanılmasının meme kanseri, ileri evre solid tümörler ve ileri evre mide kanseri tedavisinde denendiği görülmektedir. Ancak, Ocak 2014 tarihi itibariyle everolimus ve kapesitabinin özellikle kolorektal kaynaklı peritoneal karsinomatoziste birlikte kullanılmasını araştıran, klinik çalışmalar internet sitesine kayıtlı, bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Oral yoldan kullanılabilen everolimus ve kapesitabin ile peritonitis karsinomatoza tedavisinin hastanın tedaviye uyumunu kolaylaştıracağı ve

konforunu arttıracağı düşünülmüştür. Bu amaçla, oral everolimus kapesitabin tedavisinin kolorektal kaynaklı peritonitis karsinomatoza fare modelinde denenmesi planlanmıştır. Bunun üzerine BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} farelerde Caco-2 hücrelerinin intraperitoneal enjeksiyonu ile kolorektal kaynaklı peritonitis karsinomatoza modeli oluşturarak, everolimusun tek başına veya kapesitabin ile birlikte oral yoldan verildiğinde kolorektal kaynaklı peritonitis karsinomatoza üzerine etkisi incelenmiştir. Kolorektal kaynaklı peritonitis karsinomatoza modelinde everolimus ve/veya kapesitabin tedavisinin tümör büyümesi baskıladığı görülmüştür.

Ancak, çalışmamız Wagner ve ark. çalışmasıyla karşılaştırıldığında bazı farklı yöntemler ve sonuçlar dikkati çekmektedir. Wagner ve ark. çalışmalarında 4-6 haftalık dişi, ağırlıkları 20-25 gr arasında değişen atimik Nude-Foxn1^{nu} farelere $5x10^5$ SW620 insan kolon karsinomu tümör hücresini intraperitoneal enjekte ederek deneysel kolorektal kaynaklı peritonitis karsinomatoza hayvan modelini oluşturmuşlardır. Bizim çalışmamızda ise 14-18 haftalık dişi, ağırlıkları 14,1-24,2 gr arasında değişen atimik çıplak BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} farelere $15x10^5$ Caco-2 insan kolon karsinomu tümör hücresi intraperitoneal olarak enjekte edilerek kolorektal kaynaklı peritonitis karsinomatoza modeli oluşturulmuştur. Wagner ve ark.'nın her deney grubunda 8 adet fare bulunmaktadır. Çıplak farelerin dişi farelerinin üremesinin zor olması ve homozigot erkek fareler ile heterozigot dişi fareler eşleştirilerek homozigot *nu/nu* fareler üretilmesi nedeniyle çalışmamızda her deney grubunda 2 fare kullanılabilmiştir. Wagner ve ark. SW620 insan kolon karsinomu hücre dizisini kullanmışlardır. Amerikan Kültür

Koleksiyonu (ATCC) verilerine göre, SW620 insan kolon adenokarsinoma hücreleri çıplak farelere 10^7 sayısında subkutan olarak inoküle edilirse 21 gün içinde tümör oluşmaktadır (94).

Çalışmamızda ise Caco-2 hücre serisi insan epitelyal kolorektal adenokarsinoma hücreleri kullanılmıştır. Çünkü, Caco-2 hücreleri kolon kanser hücre dizileri içinde hücre kültüründe en hızlı büyüyen hücrelerdendir (77). Caco-2 hücrelerinin ortalama iki kat artış (doubling-time) süresi 62 saattir. Caco-2 hücreleri çıplak farelerde oldukça iyi diferansiye grade-2 kolon adenokarsinomu oluşturmaktadır (79).

Wagner ve ark. rapamisini suda çözmüş ve 0.15 mg/kg dozunda her iki günde bir farelere oral gavaj ile vermişlerdir. 5-FU ise %0.9 salin ile seyreltilerek 7. ve 14. günlerde intraperitoneal olarak 100 mg/kg, daha sonra her yedi günde bir 50 mg/kg dozunda farelere verilmiştir. Wagner ve ark.'nın çalışmasında rapamisin tek başına veya 5-FU ile kombine edildiğinde tümör büyümesini baskılamıştır. Rapamisinin rölatif biyoyararlılığı %14'tür, everolimusun biyoyararlılığı ise %20'dir (62). Bu nedenle, çalışmamızda rapamisine göre oral biyoyararlılığı daha yüksek olan everolimus kullanılmıştır.

Çalışmamızda, fareler randomize 4 gruba (Everolimus, Everolimus+Kapesitabin, Kapesitabin, Kontrol grubu) ayrılmıştır. Rico ve ark. 7,5mg/kg dozunda everolimusun deney farelerinde over granüloza hücreli tümör büyümesini maksimum etkiyle engellediğini saptamışlardır (64). Rico ve ark. 2,5 mg/kg everolimus dozunun tümör büyümesi üzerinde herhangi bir etkisi olmadığını, everolimus dozunun 7,5 mg/kg üzerinde arttırılmasının ise tümör

büyümesi üzerinde ek bir yarar sağlamadığını tespit etmişlerdir. Bu bulgular ışığında, everolimus serum fizyolojik (%0,9 NaCl) ile seyreltilmiş ve 7,5 mg/kg dozunda her iki günde bir 2 fareye oral yoldan gavaj ile verilmiştir. Ninomiya ve ark. HT-29 insan kolon kanser hücre serisini subkutan ve rektal olarak BALB/c-*nu/nu* farelere vermişlerdir (73). Kapesitabinin maksimum tolere edilen dozu olan 2,1 mmol/kg/gün olarak farelere verilmesinin tümör büyümesini engellediğini saptamışlardır. Bu nedenle, kapesitabin serum fizyolojik (%0,9 NaCl) ile seyreltilmiştir ve maksimum tolere edilen doz 2,1 mmol/kg/gün (1 milimol kapesitabin 359 mg'dır) oral yoldan gavaj ile 2 adet fareye haftanın 5 günü (5/7) verilmiştir. Kontrol grubundaki 2 adet fareye gavaj yolu ile sadece PBS verilmiştir. Wagner ve ark.'nın çalşmasında olduğu gibi kolon kanser hücrelerinin farelere intraperitoneal olarak enjeksiyonundan 5 gün sonra tedaviye başlanmıştır ve tümör inokulasyonundan 22 gün sonra fareler sakrifiye edilmiştir.

Wagner ve ark.'nın kontrol grubundaki farelerde assit ve tümör yükü nedeniyle kilo artışı olduğunu, diğer farelerde ise kilo değişikliği olmadığını belirtmişlerdir. Çalışmamızda dört gruptaki farelerin ağırlıkları arasında istatiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Buna göre everolimus ve/veya kapesitabin tedavisi farelerin ağırlıklarında bir değişikliğe neden olmamıştır. Everolimus ve/veya kapesitabinin yan etkisi olabilecek kilo alımı veya kaybı farelerde gözlenmemiştir. Ayrıca, farelerde assit oluşumu saptanmamıştır.

Çalışmamızda sakrifikasyon sonrası kontrol grubundaki farelerde tümör büyümesinin sadece Caco-2 adenokarsinom hücrelerinin enjekte edildiği lokalizasyonda geliştiği saptanmıştır. Halbuki Wagner ve ark. SW620 kolon

kanseri hücreleri ekilen kontrol grubundaki farelerde yaygın intraabdominal tutulum olduğunu ve assit oluştuğunu bildirmişlerdir. Kontrol grubundaki farelerde, Caco-2 hücrelerinin kolon kanser hücre serileri içinde hücre kültüründe en hızlı büyüyen hücrelerden olmalarına ve Caco-2 hücrelerinin sayısının iki kat artış süresinin ortalama 62 saat olmasına rağmen SW620 hücreleri gibi intraabdominal yayılım göstermemiş olmaları dikkat çekicidir. Çalışmamızda, Wagner ve ark.'nın yaptıklarına ek olarak sakrifikasyon sonrası farelerin peritoneal lavaj sıvısından örnekler alınıp sitolojik inceleme için ayrılmıştır. Ayrıca, tümörün peritoneal yayılımını değerlendirmek açısından deney gruplarındaki bütün farelere peritonektomi işlemi uygulanmıştır.

Çalışmamızda kontrol grubundaki farelerden eksize edilen mezenterik lenf nodları, karaciğer, dalak, böbrek, ince ve kalın bağırsak, mide ve periton örneklerinde malign hücrelere rastlanmamıştır. Farelerden eksize edilen tümör örnekleri tartılmıştır. Kontrol grubunda tümör ağırlıkları 20 mg ve 30 mg; everolimus verilen grupta 0,2 mg ve 1,2 mg; kapesitabin verilen grupta 0,03 mg ve 0,54 mg; everolimus ve kapesitabinin birlikte verildiği grupta tümör ağırlıkları 0,43 mg ve 0,54 mg olarak saptanmıştır. Kontrol grubundaki farelerde oluşan tümörlerin diğer gruptaki farelerden eksize edilen tümörlerden yaklaşık x20 kat daha büyük olmasına karşın, kontrol grubundaki farelerde tümörün büyümesinin sadece Caco-2 hücrelerinin inokülasyon yeriyle sınırlı kaldığı tespit edilmiştir. Sadece everolimus verilen bir farede mezenterik ve peripankreatik metastatik lenf nodları saptanmıştır. Ayrıca ince bağırsak serozasında tümör depozitleri görülmüştür. Sadece everolimus verilen diğer farede ise tümör büyümesi Caco-2

hücrelerinin enjeksiyonunun yapıldığı lokalizasyon ile sınırlıdır. Sadece kapesitabin tedavisinin uygulandığı farelerden birinde mezenterik lenf nodlarında tutulum saptanırken, diğer farenin diyafram yüzeyinde, perisplenik ve mezenterik lenf nodlarında az diferansiye adenokarsinom hücreleri tespit edilmiştir. Everolimus ve kapesitabin tedavisinin beraber uygulandığı farenin birinde mezenterik lenf nodunda tutulum görülürken, diğer farede sadece tümörün ekildiği bölgede malign hücreler izlenmiştir. Everolimus ve kapesitabin tedavisinin Caco-2 adenokarsinom hücrelerinin enjeksiyonunun yapıldığı bölgede primer tümör büyümesini baskıladığı görülmüştür. Fakat, gruplar içinde ve gruplar arasında tümör yayılımının farklılıkları dikkat çekicidir. Everolimus ve everolimus+kapesitabin verilen farelerin ikisinde primer tümörün intraperitoneal yayılımı görülmezken, everolimus, kapesitabin, everolimus+kapesitabin verilen diğer farelerde primer tümörün intraperitoneal yayılımı tespit edilmiştir.

Yukarıdaki bulguların ışığında, mTOR inhibitörü everolimus oral yoldan tek başına veya kapesitabin ile birlikte verildiğinde kolorektal kanser kaynaklı peritonitis karsinomatoza fare modelinde tümör büyümesini baskılamıştır. Everolimus ve/veya kapesitabin ile yapılan tedavide karaciğer toksisitesi veya mortalite izlenmemiştir. Bu sonuçlar, oral yoldan verilen kemoterapötik ajanlarla yapılan tedavide herhangi bir damar yolunun açılmasına ve infüzyon pompasının kullanılmasına gerek olmadığı için, kolorektal kaynaklı peritonitis karsinomatoza tedavisinde hastanın tedaviye uyumunu kolaylaştıracağı ve konforunu arttıracağı düşünülmesi nedeniyle umut vericidir. Çalışmamız, oral kemoterapötik ajanlar yoluyla kolorektal kaynaklı peritonitis karsinomatoza tedavisi yapılıp

yapılamayacağını araştırması nedeniyle özgün bir çalışmadır. Ancak, sonuçların istatiksel olarak anlamlı olabilmesi için daha büyük deney gruplarıyla çalışılmasına ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR

1. BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} farelere Caco-2 insan kolon adenokarsinoma hücrelerinin intraperitoneal olarak verilmesiyle kolorektal kaynaklı peritonitis karsinomatoza modeli oluşturulabilmektedir.
2. Kolorektal kaynaklı peritonitis karsinomatoza oluşturulan BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} fareler dört gruba ayrılmıştır (everolimus, everolimus+kapesitabin, kapesitabin ve kontrol grubu). Caco-2 hücrelerinin farelere intraperitoneal olarak enjeksiyonu 0. gün olarak belirlenmiştir. Caco-2 hücrelerinin intraperitoneal enjeksiyonundan 5 gün sonra tedaviye başlanmıştır. Everolimus 7,5 mg/kg dozunda her iki günde bir, kapesitabin 2,1 mmol/kg/gün dozunda haftanın beş günü (5/7) oral yoldan gavaj ile verilmiştir. İntraperitoneal enjeksiyondan 22 gün sonra deney hayvanlarına ötenazi uygulanmıştır. Farelerin 0, 5, 15, 20 ve 22. günlerdeki ağırlıkları gr (gram) olarak karşılaştırıldığında dört gruptaki farelerin günlere göre ağırlıkları arasında istatiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Everolimus ve/veya kapesitabin tedavisi farelerde kilo kaybına veya artışına yol açmamıştır.
3. Kolorektal kaynaklı peritonitis karsinomatoza oluşturulan BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} farelerden eksize edilen tümör örnekleri tartıldığında kontrol grubunda tümör ağırlıkları 20 mg ve 30 mg; everolimus verilen grupta 0,2 mg ve 1,2 mg; kapesitabin verilen grupta 0,03 mg ve 0,54 mg; everolimus ve kapesitabinin birlikte verildiği grupta

tümör ağırlıkları 0,43 mg ve 0,54 mg olarak saptanmıştır. Buna göre, mTOR inhibitörü everolimus oral yoldan tek başına veya kapesitabin ile birlikte verildiğinde tümör büyümesini baskılamıştır. Söz konusu modelde, tek başına verilen oral kapesitabin tedavisi de tümör büyümesini baskılamıştır. Ancak, farelerden eksize edilen tümör ağırlıkları gr (gram) olarak karşılaştırıldığında dört grup arasında istatiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p=0.227). Sonuçların istatiksel olarak anlamlı olabilmesi için daha büyük deney gruplarıyla çalışılmasına ihtiyaç vardır.

4. Everolimus ve/veya kapesitabin ile yapılan tedavide akut veya kronik toksisite saptanmamıştır.
5. Everolimus ve/veya kapesitabin ile yapılan tedavide mortalite izlenmemiştir.

7. KAYNAKLAR

1. Rampone B. Peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. In: Cidón EU, editor. The Challenge of Colorectal Cancer: A Review Book. Kerala, India: Research Signpost; 2011. p. 213-25

2. Ihemelandu CU, Shen P, Stewart JH, Votanopoulos K, Levine EA. Management of peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer. Semin Oncol. 2011;38(4):568-75. Epub 2011/08/04.

3. 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. 2004;350(23):2335-42. Epub 2004/06/04.

4. Gill S, Thomas RR, Goldberg RM. Review article: colorectal cancer chemotherapy. Aliment Pharmacol Ther. 2003;18(7):683-92. Epub 2003/09/27.

5. Gomez Portilla A, Cendoya I, Olabarria I, Martinez de Lecea C, Gomez Martinez de Lecea C, Gil A, et al. The European contribution to "Sugarbaker's protocol" for the treatment of colorectal peritoneal carcinomatosis. Rev Esp Enferm Dig. 2009;101(2):97-102, 3-6. Epub 2009/04/02.

6. Wagner M, Roh V, Strehlen M, Laemmle A, Stroka D, Egger B, et al. Effective treatment of advanced colorectal cancer by rapamycin and 5-FU/oxaliplatin monitored by TIMP-1. J Gastrointest Surg. 2009;13(10):1781-90. Epub 2009/07/01.

7. Sabbah DA, Brattain MG, Zhong H. Dual inhibitors of PI3K/mTOR or mTOR-selective inhibitors: which way shall we go? Curr Med Chem. 2011;18(36):5528-44. Epub 2011/12/17.

8. Sehgal SN. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. Transplant Proc. 2003;35(3 Suppl):7S-14S. Epub 2003/05/14.

9. Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, et al. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. Nat Med. 2002;8(2):128-35. Epub 2002/02/01.

10. Strimpakos AS, Karapanagiotou EM, Saif MW, Syrigos KN. The role of mTOR in the management of solid tumors: an overview. Cancer Treat Rev. 2009;35(2):148-59. Epub 2008/11/18.

11. A phase 2 study with a daily regimen of the oral mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) in patients with metastatic clear cell renal cell cancer. Cancer. 2009;115(11):2438-46. Epub 2009/03/24.

12. Ellard SL, Clemons M, Gelmon KA, Norris B, Kennecke H, Chia S, et al. Randomized phase II study comparing two schedules of everolimus in patients with recurrent/metastatic breast cancer: NCIC Clinical Trials Group IND.163. J Clin Oncol. 2009;27(27):4536-41. Epub 2009/08/19.

13. Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, et al. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. Lancet. 2008;372(9637):449-56. Epub 2008/07/26.

14. O'Donnell A, Faivre S, Burris HA, 3rd, Rea D, Papadimitrakopoulou V, Shand N, et al. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the oral mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus in patients with advanced solid tumors. J Clin Oncol. 2008;26(10):1588-95. Epub 2008/03/12.

15. Okamoto I, Doi T, Ohtsu A, Miyazaki M, Tsuya A, Kurei K, et al. Phase I clinical and pharmacokinetic study of RAD001 (everolimus) administered daily to Japanese patients with advanced solid tumors. Jpn J Clin Oncol. 2010;40(1):17-23. Epub 2009/09/29.

16. Soria JC, Shepherd FA, Douillard JY, Wolf J, Giaccone G, Crino L, et al. Efficacy of everolimus (RAD001) in patients with advanced NSCLC previously treated with chemotherapy alone or with chemotherapy and EGFR inhibitors. Ann Oncol. 2009;20(10):1674-81. Epub 2009/06/25.

17. Tabernero J, Rojo F, Calvo E, Burris H, Judson I, Hazell K, et al. Dose- and schedule-dependent inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway with everolimus: a phase I tumor pharmacodynamic study in patients with advanced solid tumors. J Clin Oncol. 2008;26(10):1603-10. Epub 2008/03/12.

18. Wolpin BM, Hezel AF, Abrams T, Blaszkowsky LS, Meyerhardt JA, Chan JA, et al. Oral mTOR inhibitor everolimus in patients with gemcitabine-refractory metastatic pancreatic cancer. J Clin Oncol. 2009;27(2):193-8. Epub 2008/12/03.

19. Yao JC, Shah MH, Ito T, Bohas CL, Wolin EM, Van Cutsem E, et al. Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. N Engl J Med. 2011;364(6):514-23. Epub 2011/02/11.

20. Hirsch BR, Zafar SY. Capecitabine in the management of colorectal cancer. Cancer Manag Res. 2011;3:79-89. Epub 2011/06/02.

21. Ducreux M, Bennouna J, Hebbar M, Ychou M, Lledo G, Conroy T, et al. Capecitabine plus oxaliplatin (XELOX) versus 5-fluorouracil/leucovorin plus oxaliplatin (FOLFOX-6) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer. Int J Cancer. 2011;128(3):682-90. Epub 2010/05/18.

22. Institue NC. FDA Approval for Everolimus. [updated 07.03.2013; Erişim Tarihi: 04.01.2014]; Erişim Adresi: http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-everolimus.

23. Roche. Xeloda 2014 [Erişim Tarihi: 15.01.2014]; Erişim Adresi: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2005/020896s016lbl.pdf.

24. ClinicalTrials.gov. ClinicalTrials.gov Background. 2014 [Erişim Tarihi: 01.07.2014]; Erişim Adresi: http://clinicaltrials.gov/ct2/about-site/background.

25. Esquivel J. Current status of colorectal cancer with peritoneal carcinomatosis. Ann Surg Oncol. 2010;17(7):1968-9. Epub 2010/02/27.

26. Başkanlığı THSKKD. 2009 Kanser İnsidansları 2009 [Erişim Tarihi: 09.02.2014]; Erişim Adresi: http://www.kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri.html.

27. Klaver YL, Lemmens VE, Nienhuijs SW, Luyer MD, de Hingh IH. Peritoneal carcinomatosis of colorectal origin: Incidence, prognosis and treatment options. World J Gastroenterol. 2012;18(39):5489-94. Epub 2012/11/01.

28. Segelman J, Granath F, Holm T, Machado M, Mahteme H, Martling A. Incidence, prevalence and risk factors for peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer. Br J Surg. 2012;99(5):699-705. Epub 2012/01/31.

29. Lemmens VE, Klaver YL, Verwaal VJ, Rutten HJ, Coebergh JW, de Hingh IH. Predictors and survival of synchronous peritoneal carcinomatosis of colorectal origin: a population-based study. Int J Cancer. 2011;128(11):2717-25. Epub 2010/08/18.

30. Edge SB, American Joint Committee on Cancer. AJCC cancer staging manual. 7th ed. New York: Springer; 2010. xiv, 648 p. p.

31. Institute NC. Surveillance, Epidemiology, and End Results Program Turning Cancer Data Into Discovery. 2014 [Erişim Tarihi: 09.01.2014]; Erişim Adresi: http://seer.cancer.gov/.

32. Yonemura Y KT, Bandou E, Tsukiyama G, Endou Y, Miura M. The Natural History of Free Cancer Cells in the Peritoneal Cavity. In: Moreno GS-, editor. Advances in Peritoneal Oncology. 2007 ed. Heidelberg: Springer; 2007. p. 11.

33. Yonemura Y, Endou Y, Nojima M, Kawamura T, Fujita H, Kaji M, et al. A possible role of cytokines in the formation of peritoneal dissemination. Int J Oncol. 1997;11(2):349-58. Epub 1997/08/01.

34. Kawamura T, Endo Y, Yonemura Y, Nojima N, Fujita H, Fujimura T, et al. Significance of integrin alpha2/beta1 in peritoneal dissemination of a human gastric cancer xenograft model. Int J Oncol. 2001;18(4):809-15. Epub 2001/03/17.

35. Yonemura Y, Endo Y, Tabata K, Kawamura T, Yun HY, Bandou E, et al. Role of VEGF-C and VEGF-D in lymphangiogenesis in gastric cancer. Int J Clin Oncol. 2005;10(5):318-27. Epub 2005/10/26.

36. Koh JL, Yan TD, Glenn D, Morris DL. Evaluation of preoperative computed tomography in estimating peritoneal cancer index in colorectal peritoneal carcinomatosis. Ann Surg Oncol. 2009;16(2):327-33. Epub 2008/12/04.

37. Harmon RL, Sugarbaker PH. Prognostic indicators in peritoneal carcinomatosis from gastrointestinal cancer. Int Semin Surg Oncol. 2005;2(1):3. Epub 2005/02/11.

38. Jacquet P, Sugarbaker PH. Clinical research methodologies in diagnosis and staging of patients with peritoneal carcinomatosis. Cancer Treat Res. 1996;82:359-74. Epub 1996/01/01.

39. Gilly FN, Carry PY, Sayag AC, Brachet A, Panteix G, Salle B, et al. Regional chemotherapy (with mitomycin C) and intra-operative hyperthermia for digestive cancers with peritoneal carcinomatosis. Hepatogastroenterology. 1994;41(2):124-9. Epub 1994/04/01.

40. Cotte E, Passot G, Gilly FN, Glehen O. Selection of patients and staging of peritoneal surface malignancies. World J Gastrointest Oncol. 2010;2(1):31-5. Epub 2010/12/17.

41. Elias D, Blot F, El Otmany A, Antoun S, Lasser P, Boige V, et al. Curative treatment of peritoneal carcinomatosis arising from colorectal cancer by complete resection and intraperitoneal chemotherapy. Cancer. 2001;92(1):71-6. Epub 2001/07/10.

42. Institute NC. Colon Cancer Treatment. 2014 [updated 02.08.2013; Erişim Tarihi: 06.01.2014]; Stage IV and Recurrent Colon Cancer Treatment]. Erişim Adresi: http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/colon/HealthProfessional/Page9#Reference9.47.

43. Goldberg RM, Sargent DJ, Morton RF, Fuchs CS, Ramanathan RK, Williamson SK, et al. Randomized controlled trial of reduced-dose bolus fluorouracil plus leucovorin and irinotecan or infused fluorouracil plus leucovorin and oxaliplatin in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: a North American Intergroup Trial. J Clin Oncol. 2006;24(21):3347-53. Epub 2006/07/20.

44. Ballou LM, Lin RZ. Rapamycin and mTOR kinase inhibitors. J Chem Biol. 2008;1(1-4):27-36. Epub 2009/07/02.

45. Gao W, Li JZ, Chan JY, Ho WK, Wong TS. mTOR Pathway and mTOR Inhibitors in Head and Neck Cancer. ISRN Otolaryngol. 2012;2012:953089. Epub 2012/01/01.

46. Gulhati P, Cai Q, Li J, Liu J, Rychahou PG, Qiu S, et al. Targeted inhibition of mammalian target of rapamycin signaling inhibits tumorigenesis of colorectal cancer. Clin Cancer Res. 2009;15(23):7207-16. Epub 2009/11/26.

47. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, et al. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. Mol Cell. 2006;22(2):159-68. Epub 2006/04/11.

48. Francipane MG, Lagasse E. mTOR pathway in colorectal cancer: an update. Oncotarget. 2013. Epub 2014/01/08.

49. Philp AJ, Campbell IG, Leet C, Vincan E, Rockman SP, Whitehead RH, et al. The phosphatidylinositol 3'-kinase p85alpha gene is an oncogene in human ovarian and colon tumors. Cancer Res. 2001;61(20):7426-9. Epub 2001/10/19.

50. Roy HK, Olusola BF, Clemens DL, Karolski WJ, Ratashak A, Lynch HT, et al. AKT proto-oncogene overexpression is an early event during sporadic colon carcinogenesis. Carcinogenesis. 2002;23(1):201-5. Epub 2002/01/05.

51. Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. Cancer Cell. 2007;12(1):9-22. Epub 2007/07/07.

52. Rychahou PG, Jackson LN, Silva SR, Rajaraman S, Evers BM. Targeted molecular therapy of the PI3K pathway: therapeutic significance of PI3K subunit targeting in colorectal carcinoma. Ann Surg. 2006;243(6):833-42; discussion 43-4. Epub 2006/06/15.

53. Nozawa H, Watanabe T, Nagawa H. Phosphorylation of ribosomal p70 S6 kinase and rapamycin sensitivity in human colorectal cancer. Cancer Lett. 2007;251(1):105-13. Epub 2006/12/19.

54. Seeliger H, Guba M, Koehl GE, Doenecke A, Steinbauer M, Bruns CJ, et al. Blockage of 2-deoxy-D-ribose-induced angiogenesis with rapamycin counteracts a thymidine phosphorylase-based escape mechanism available for colon cancer under 5-fluorouracil therapy. Clin Cancer Res. 2004;10(5):1843-52. Epub 2004/03/12.

55. Eshleman JS, Carlson BL, Mladek AC, Kastner BD, Shide KL, Sarkaria JN. Inhibition of the mammalian target of rapamycin sensitizes U87 xenografts to fractionated radiation therapy. Cancer Res. 2002;62(24):7291-7. Epub 2002/12/25.

56. Cejka D, Preusser M, Fuereder T, Sieghart W, Werzowa J, Strommer S, et al. mTOR inhibition sensitizes gastric cancer to alkylating chemotherapy in vivo. Anticancer Res. 2008;28(6A):3801-8. Epub 2009/02/05.

57. Grunwald V, DeGraffenried L, Russel D, Friedrichs WE, Ray RB, Hidalgo M. Inhibitors of mTOR reverse doxorubicin resistance conferred by PTEN status in prostate cancer cells. Cancer Res. 2002;62(21):6141-5. Epub 2002/11/05.

58. Leelawat K, Narong S, Udomchaiprasertkul W, Leelawat S, Tungpradubkul S. Inhibition of PI3K increases oxaliplatin sensitivity in cholangiocarcinoma cells. Cancer Cell Int. 2009;9:3. Epub 2009/01/09.

59. Shi Y, Frankel A, Radvanyi LG, Penn LZ, Miller RG, Mills GB. Rapamycin enhances apoptosis and increases sensitivity to cisplatin in vitro. Cancer Res. 1995;55(9):1982-8. Epub 1995/05/01.

60. Zhang YJ, Tian XQ, Sun DF, Zhao SL, Xiong H, Fang JY. Combined inhibition of MEK and mTOR signaling inhibits initiation and progression of colorectal cancer. Cancer Invest. 2009;27(3):273-85. Epub 2009/02/06.

61. Novartis. Afinitor (Everolimus) 2013 [updated 11.2013; Erişim Tarihi: 4.1. 2014]; Prescribing Information]. Erişim Adresi: http://www.pharma.us.novartis.com/product/pi/pdf/afinitor.pdf.

62. Gabardi S, Baroletti SA. Everolimus: a proliferation signal inhibitor with clinical applications in organ transplantation, oncology, and cardiology. Pharmacotherapy. 2010;30(10):1044-56. Epub 2010/09/30.

63. Novartis. Certican. 2014 [Erişim Tarihi: 14.01.2014]; Erişim Adresi: http://www.novartis.com.au/DownloadFile.aspx?t=p&f=cer.pdf&dateid.

64. Rico C, Lague MN, Lefevre P, Tsoi M, Dodelet-Devillers A, Kumar V, et al. Pharmacological targeting of mammalian target of rapamycin inhibits ovarian granulosa cell tumor growth. Carcinogenesis. 2012;33(11):2283-92. Epub 2012/08/09.

65. Taguchi F, Kodera Y, Katanasaka Y, Yanagihara K, Tamura T, Koizumi F. Efficacy of RAD001 (everolimus) against advanced gastric cancer with peritoneal dissemination. Invest New Drugs. 2011;29(6):1198-205. Epub 2010/06/10.

66. Chu C, Noel-Hudson MS, Boige V, Goere D, Marion S, Polrot M, et al. Therapeutic efficiency of everolimus and lapatinib in xenograft model of human colorectal carcinoma with KRAS mutation. Fundam Clin Pharmacol. 2013;27(4):434-42. Epub 2012/03/31.

67. Mabuchi S, Altomare DA, Connolly DC, Klein-Szanto A, Litwin S, Hoelzle MK, et al. RAD001 (Everolimus) delays tumor onset and progression in a transgenic mouse model of ovarian cancer. Cancer Res. 2007;67(6):2408-13. Epub 2007/03/17.

68. Yoon DH, Ryu MH, Park YS, Lee HJ, Lee C, Ryoo BY, et al. Phase II study of everolimus with biomarker exploration in patients with advanced gastric

cancer refractory to chemotherapy including fluoropyrimidine and platinum. Br J Cancer. 2012;106(6):1039-44. Epub 2012/02/22.

69. Institute NC. FDA Approval for Capecitabine. 2014 [Erişim Tarihi: 09.01.2014]; Erişim Adresi: http://www.cancer.gov/cancertopics/druginfo/fda-capecitabine.

70. Koukourakis GV, Zacharias G, Tsalafoutas J, Theodoridis D, Kouloulias V. Capecitabine for locally advanced and metastatic colorectal cancer: A review. World J Gastrointest Oncol. 2010;2(8):311-21. Epub 2010/12/17.

71. Hoff PM, Ansari R, Batist G, Cox J, Kocha W, Kuperminc M, et al. Comparison of oral capecitabine versus intravenous fluorouracil plus leucovorin as first-line treatment in 605 patients with metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase III study. J Clin Oncol. 2001;19(8):2282-92. Epub 2001/04/17.

72. Van Cutsem E, Twelves C, Cassidy J, Allman D, Bajetta E, Boyer M, et al. Oral capecitabine compared with intravenous fluorouracil plus leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer: results of a large phase III study. J Clin Oncol. 2001;19(21):4097-106. Epub 2001/11/02.

73. Ninomiya I, Terada I, Yoshizumi T, Takino T, Nagai N, Morita A, et al. Anti-metastatic effect of capecitabine on human colon cancer xenografts in nude mouse rectum. Int J Cancer. 2004;112(1):135-42. Epub 2004/08/12.

74. Deenen MJ, Klumpen HJ, Richel DJ, Sparidans RW, Weterman MJ, Beijnen JH, et al. Phase I and pharmacokinetic study of capecitabine and the oral mTOR inhibitor everolimus in patients with advanced solid malignancies. Invest New Drugs. 2012;30(4):1557-65. Epub 2011/08/03.

75. Lim T, Lee J, Lee DJ, Lee HY, Han B, Baek KK, et al. Phase I trial of capecitabine plus everolimus (RAD001) in patients with previously treated metastatic gastric cancer. Cancer Chemother Pharmacol. 2011;68(1):255-62. Epub 2011/04/29.

76. Smetanova L, Stetinova V, Svoboda Z, Kvetina J. Caco-2 cells, biopharmaceutics classification system (BCS) and biowaiver. Acta Medica (Hradec Kralove). 2011;54(1):3-8. Epub 2011/05/06.

77. Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA, Eknaes M, Hektoen M, et al. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. Oncogenesis. 2013;2:e71. Epub 2013/09/18.

78. ATCC. Caco-2 (ATCC® HTB-37™) 2014 [Erişim Tarihi: 4.1.2014]; Specifications]. Erişim Adresi: http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-37.aspx?geo_country=tr#specifications.

79. ATCC. Caco-2 (ATCC® HTB-37™) 2014 [Erişim Tarihi: 4.1.2014]; Characteristics]. Erişim Adresi: http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-37.aspx?geo_country=tr#characteristics.

80. ATCC. Colorectal adenocarcinoma cell line. 2014 [Erişim Tarihi: 4.1.2014]; Erişim Adresi: http://www.lgcstandards-atcc.org/Search_Results.aspx?dsNav=Ntk:PrimarySearch|colorectal+adenocarcinoma|3|,Ny:True,Ro:0,N:1000552&searchTerms=colorectal+adenocarcinoma&redir=1.

81. Flanagan SP. 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. Genet Res. 1966;8(3):295-309. Epub 1966/12/01.

82. Laboratories H. BALB/c Nude Mice. 2014 [Erişim Tarihi: 13.01.2014]; Erişim Adresi: http://www.harlan.com/products_and_services/research_models_and_services/research_models/balbc_nude_mice.hl.

83. Pantelouris EM. Absence of thymus in a mouse mutant. Nature. 1968;217(5126):370-1. Epub 1968/01/27.

84. Cordier AC, Heremans JF. Nude mouse embryo: ectodermal nature of the primordial thymic defect. Scand J Immunol. 1975;4(2):193-6. Epub 1975/01/01.

85. Spang-Thomsen M, Visfeldt J. Homozygous nu/nu mice with transplanted human malignant tumors. Am J Pathol. 1976;84(1):193-6. Epub 1976/07/01.

86. Harlan. Foxn1nu. 2014 [Erişim Tarihi: 13.01.2014]; Erişim Adresi: http://harlanisrael.com/nu.pdf.

87. Hasui M, Saikawa Y, Miura M, Takano N, Ueno Y, Yachie A, et al. Effector and precursor phenotypes of lymphokine-activated killer cells in mice with severe combined immunodeficiency (scid) and athymic (nude) mice. Cell Immunol. 1989;120(1):230-9. Epub 1989/04/15.

88. Cheers C, Waller R. Activated macrophages in congenitally athymic "nude mice" and in lethally irradiate mice. J Immunol. 1975;115(3):844-7. Epub 1975/09/01.

89. Wlodarski K, Morrison K, Rose NR. Effects of nu gene on the numbers of mast cells in lymph nodes. Scand J Immunol. 1982;15(1):105-8. Epub 1982/01/01.

90. van Weerden WM, Romijn JC. Use of nude mouse xenograft models in prostate cancer research. Prostate. 2000;43(4):263-71. Epub 2000/06/22.

91. Lange TS, Stuckey AR, Robison K, Kim KK, Singh RK, Raker CA, et al. Effect of a vitamin D(3) derivative (B3CD) with postulated anti-cancer activity in an ovarian cancer animal model. Invest New Drugs. 2010;28(5):543-53. Epub 2009/07/08.

92. Pourgholami MH, Akhter J, Wang L, Lu Y, Morris DL. Antitumor activity of albendazole against the human colorectal cancer cell line HT-29: in vitro and in a xenograft model of peritoneal carcinomatosis. Cancer Chemother Pharmacol. 2005;55(5):425-32. Epub 2004/11/27.

93. Altromin. TPF-Total Pathogen Free Diets. 2014 [Erişim Tarihi: 15.01.2014]; Erişim Adresi: http://www.altromin.com/products/standard-diets/tpf-total-pathogen-free-diets/).

94. ATCC. SW620 Characteristics. 2014 [Erişim Tarihi: 11.02.2014]; Erişim Adresi: http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CCL-227.aspx?geo_country=tr#characteristics.

8. ÖZET

Oral mTOR İnhibitörü Everolimus + Kapesitabin Tedavisinin Kolorektal Kaynaklı Peritonitis Karsinomatozada Etkinliği

Oral mTOR inhibitörü rapamisinin kolorektal kanserde tümör büyümesini baskılayıcı etkisi vardır. Tümör büyümesinin baskılanması oral rapamisinin intravenöz 5-fluorourasil ile birlikte verilmesiyle arttırılabilir. Ancak, 5-fluorourasil sadece intravenöz yoldan kullanılabilmektedir, 5-fluorourasilin oral formu yoktur. Oral yoldan kullanılabilen kemoterapötik ajanlarla yapılan peritonitis karsinomatoza tedavisinin hastanın tedaviye uyumunu kolaylaştıracağı ve konforunu arttıracağı düşünülmüştür. Bu amaçla, oral everolimus ve oral kapesitabin tedavisinin kolorektal kaynaklı peritonitis karsinomatoza fare modelinde denenmesi planlanmıştır. Everolimus, rapamisinin oral yoldan kullanılabilen bir türevidir. Kapesitabin ise 5-flurourasilin oral yoldan kullanılabilen eşleniğidir. Metastatik kolorektal kanserde oral kapesitabin tedavisi, hastalığın progresyonuna kadar geçen süre ve genel sağkalım göz önüne alındığında, iv 5-fluorourasil tedavisine denktir. Bu çalışmanın amacı BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} farelerde kolorektal kaynaklı peritonitis karsinomatoza modeli oluşturarak, everolimusun tek başına veya kapesitabin ile birlikte oral yoldan verildiğinde kolorektal kaynaklı peritonitis karsinomatoza üzerine etkisini incelemektir.

BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} farelere Caco-2 insan kolon adenokarsinoma hücrelerinin intraperitoneal olarak verilmesiyle kolorektal kaynaklı peritonitis karsinomatoza modeli oluşturulmuştur. Kolorektal kaynaklı peritonitis karsinomatoza oluşturulan BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} fareler, her grupta iki farenin olduğu, dört gruba ayrılmıştır (everolimus, everolimus+kapesitabin, kapesitabin ve kontrol grubu). Caco-2 hücrelerinin intraperitoneal enjeksiyonundan 5 gün sonra tedaviye başlanmıştır. Everolimus 7,5 mg/kg dozunda her iki günde bir, kapesitabin 2,1 mmol/kg/gün dozunda haftanın beş günü (5/7) oral yoldan gavaj ile farelere verilmiştir. İntraperitoneal tümör hücresi enjeksiyonundan 22 gün sonra farelere ötenazi uygulanmıştır.

Kolorektal kaynaklı peritonitis karsinomatoza oluşturulan BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} farelerden eksize edilen tümör örnekleri incelendiğinde mTOR inhibitörü everolimusun oral yoldan tek başına ve kapesitabin ile birlikte verildiğinde tümör büyümesini baskıladığı görülmüştür. Ancak, dört grup arasında tümör ağırlıkları açısından istatiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0.227$). Sonuçların istatiksel olarak anlamlı olabilmesi için daha büyük deney gruplarıyla çalışılmasına ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: mTOR, everolimus, kapesitabin, peritonitis karsinomatoza, kolon kanseri

9. SUMMARY

Effectiveness of Oral Everolimus + Capecitabine Treatment on Peritoneal Carcinomatosis of Colorectal Origin

The mTOR inhibitor rapamycin has antitumor activity in colorectal cancer, and suppresses peritoneal carcinomatosis, even with oral administration. Tumor suppression can further be enhanced when oral rapamycin is combined with 5-fluorouracil. However, 5 - fluorouracil can only be used intravenously. Chemotherapeutic agents, that can be used orally in the treatment of peritoneal carcinomatosis, are thought to facilitate the patient's adherence to treatment, and to increase patient's comfort. For this purpose, oral everolimus and oral capecitabine therapy in peritoneal carcinomatosis of colorectal origin is planned to be tested on a mouse model. Oral mTOR inhibitor everolimus is an analog of rapamycin. Capecitabine is as effective as iv 5-fluorouracil, and can be administered orally. The purpose of this study is to administer everolimus alone, and in conjuction with capecitabine orally in experimental nude mouse model to examine the effect on colorectal peritoneal carcinomatosis.

An animal model of peritoneal carcinomatosis of colorectal origin was established by transplanting Caco-2 colon adenocarcinoma cells in BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} mice. Mice were divided into four groups (everolimus, everolimus+capecitabine, capecitabine, and control group). There were two mice in each group. Five days after tumor inoculation, treatment was initiated. Everolimus was administered orally at 7,5 mg/kg every 2 days. Capecitabine was

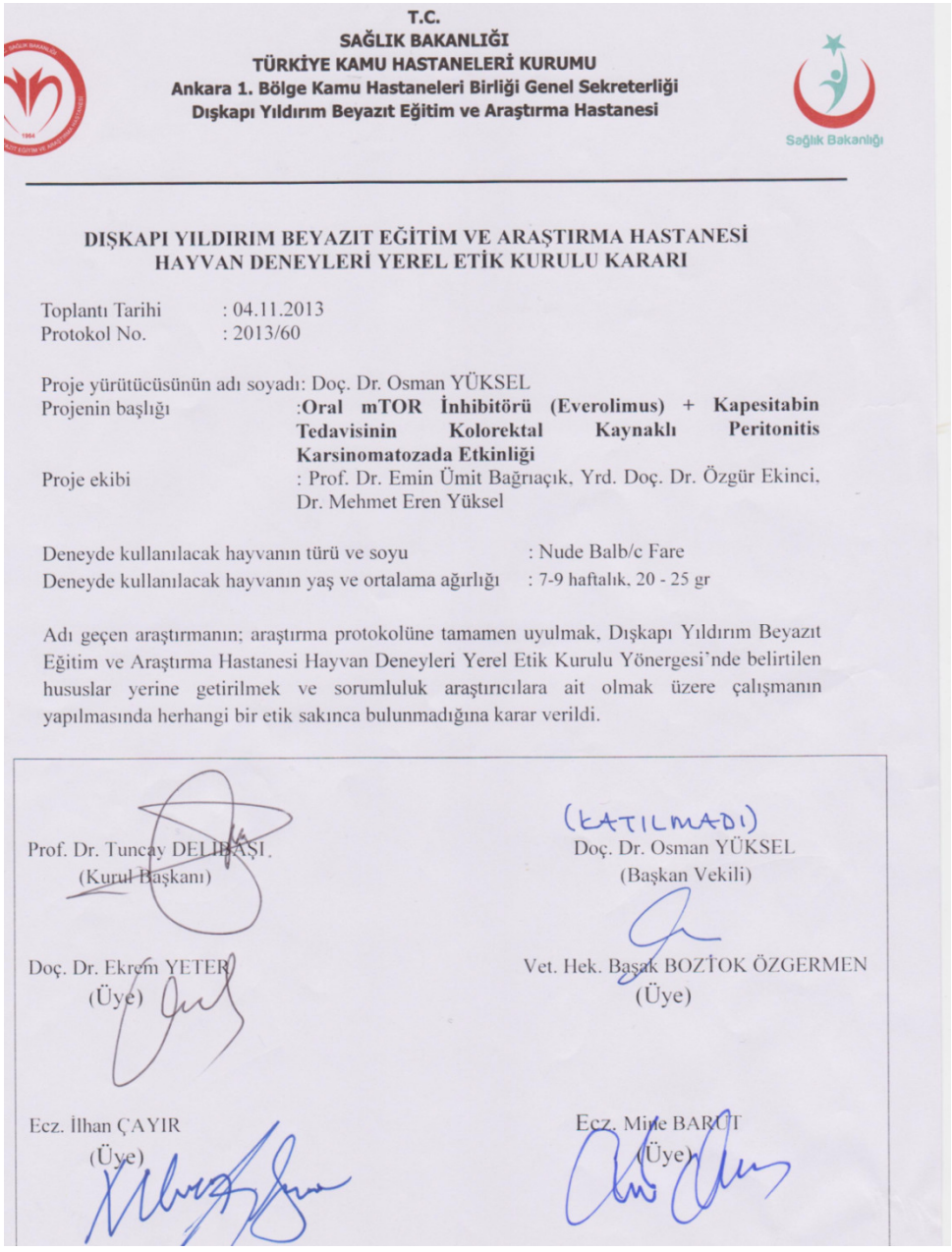
adminitered orally at 2,1 mmol/kg/day every 5 days in a week (5/7). Mice were sacrified 22 days after tumor inoculation.

The tumor samples excised from the peritoneal cavity of BALB/cOlaHsd-*Foxn1*^{nu} mice revealed that oral mTOR inhibitor everolimus alone, and in combination with capecitabine suppressed tumor growth. Comparing the tumor weight, however, there was no statistically significant difference within four groups (p=0.227). In order to reach statistically significant data, sample size should be increased.

Key words: mTOR, everolimus, capecitabine, peritoneal carcinomatosis, colon cancer

10. EKLER

10.1. Etik Kurul Kararı



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
Ankara 1. Bölge Kamu Hastaneleri Birliği Genel Sekreterliği
Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi

Sağlık Bakanlığı

DIŞKAPI YILDIRIM BEYAZIT EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 04.11.2013
Protokol No. : 2013/60

Proje yürütücüsünün adı soyadı: Doç. Dr. Osman YÜKSEL
Projenin başlığı :**Oral mTOR İnhibitörü (Everolimus) + Kapesitabin Tedavisinin Kolorektal Kaynaklı Peritonitis Karsinomatozada Etkinliği**
Proje ekibi : Prof. Dr. Emin Ümit Bağrıaçık, Yrd. Doç. Dr. Özgür Ekinci, Dr. Mehmet Eren Yüksel

Deneyde kullanılacak hayvanın türü ve soyu : Nude Balb/c Fare
Deneyde kullanılacak hayvanın yaş ve ortalama ağırlığı : 7-9 haftalık, 20 - 25 gr

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırıcılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına karar verildi.

Prof. Dr. Tuncay DELİBAŞI
(Kurul Başkanı)

(KATILMADI)
Doç. Dr. Osman YÜKSEL
(Başkan Vekili)

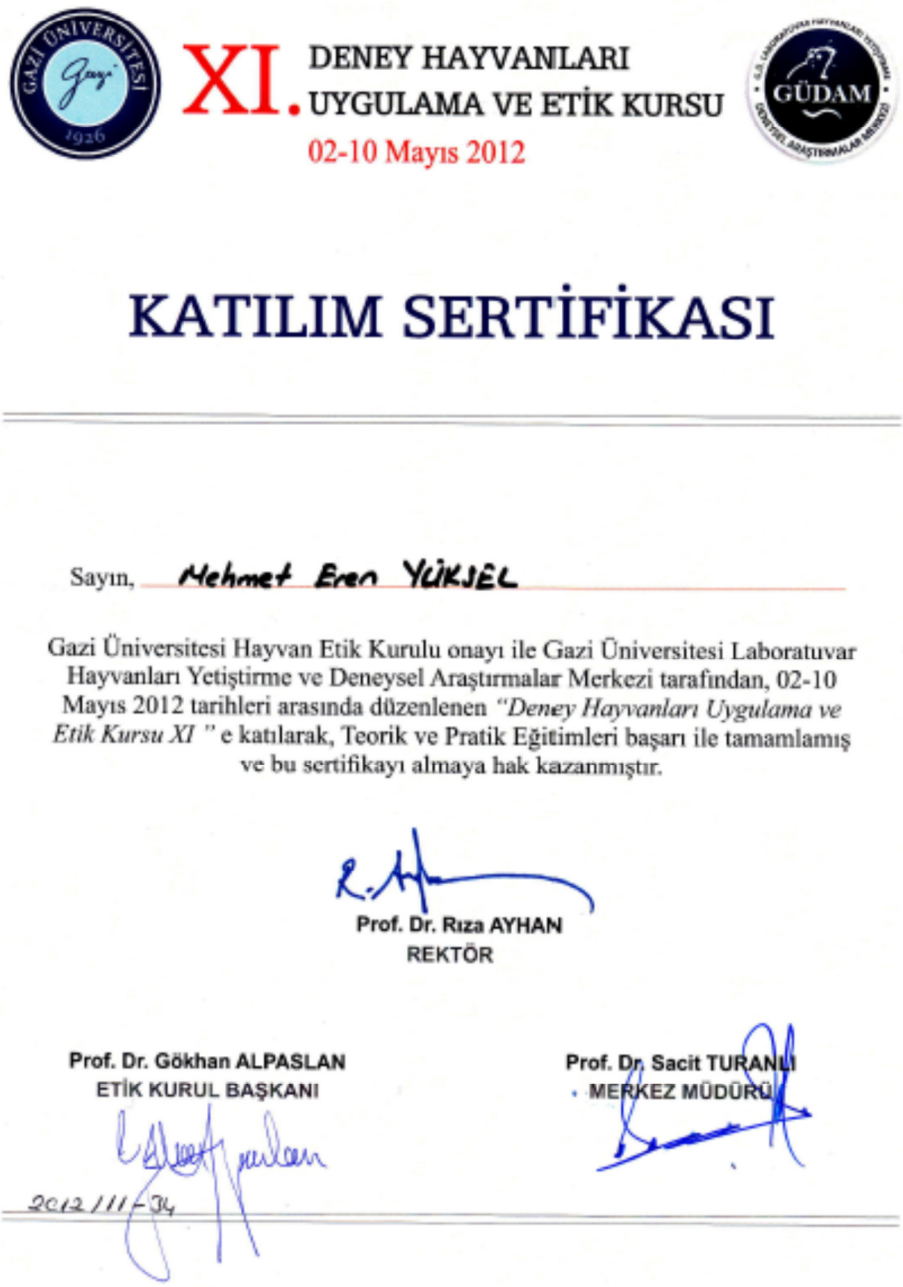
Doç. Dr. Ekrem YETER
(Üye)

Vet. Hek. Başak BOZTOK ÖZGERMEN
(Üye)

Ecz. İlhan ÇAYIR
(Üye)

Ecz. Mine BARUT
(Üye)

10.2. Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu Sertifikası



XI. DENEY HAYVANLARI UYGULAMA VE ETİK KURSU

02-10 Mayıs 2012

KATILIM SERTİFİKASI

Sayın, Mehmet Eren YÜKSEL

Gazi Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu onayı ile Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi tarafından, 02-10 Mayıs 2012 tarihleri arasında düzenlenen *"Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu XI "* e katılarak, Teorik ve Pratik Eğitimleri başarı ile tamamlamış ve bu sertifikayı almaya hak kazanmıştır.

Prof. Dr. Rıza AYHAN
REKTÖR

Prof. Dr. Gökhan ALPASLAN
ETİK KURUL BAŞKANI

Prof. Dr. Sacit TURANLI
MERKEZ MÜDÜRÜ

2012/111-34

11. ÖZGEÇMİŞ

Mehmet Eren Yüksel

Doğum Yeri-Tarihi: Ankara / 17.03.1980

Eğitim:

Tıpta Uzmanlık Eğitimi

2008-2014 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Yüksek Lisans

2004-2007 Dresden Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyomühendislik Master Programı, Dresden, Almanya

Üniversite

1998-2004 Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara, Türkiye

Lise

1991-1998 Ankara Atatürk Anadolu Lisesi, Ankara, Türkiye

İş Deneyimi

11.2008- 2014 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

2008-07.2008 Greifswald Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Greifswald, Almanya

2007-2008 Fachkrankenhaus Coswig, Göğüs Hastalıkları Hastanesi, Dresden, Almanya

Yabancı Diller

İngilizce (Toefl Notu: 270 (637), Test tarihi: 18.12.2003), (KPDS Notu: 95/100, Test tarihi:18.11.2012), (YDS Notu: 96/10, Test tarihi: 01.09.2013)

Almanca (TestDaf Notu: 4/5, Test tarihi: 27.06.2006)

Yayınlar

Kitaplar:

M.E. Yüksel, "Amerika Birleşik Devletleri'nde Tıpta Uzmanlık Eğitimi, Türk Öğrenciler İçin Rehber*",* Gazi Kitabevi, Temmuz, 2012. ISBN: 978-605-5543-81-5.

M.E.Yüksel, "Almanya'da Tıp ve Tıpta Uzmanlık Eğitimi, Türk Öğrenciler İçin Rehber", Gazi Kitabevi, Ağustos, 2011. ISBN: 978-605-5804-98-5.

Kitap Bölüm Çevirisi:

Tezel E., "Pilonidal Hastalığın Cerrahi Tedavisi", Nobel Kitabevi, 2009. ISBN: 978-975-5670-57-6.

Makaleler:

Ulusal Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler:

M.E. Yüksel, Türkoğlu M., Aygencel G., "Bir Dahili Yoğun Bakım Ünitesinde Multipl Sistem Atrofili Hasta, A Multiple System Atrophy Patient in a Medical

Intensive Care Unit.", Yoğun Bakım Dergisi Journal of Intensive Care Medicine, cilt:9, sayı:4 (208-213), 2011.

Tezler:

M.E.Yüksel, "Atomic Force Microscopy of Changes in Cell Morphology after Scrapie Infection", Master of Science, Dresden Teknik Üniversitesi, Dresden, Almanya, Eylül 2006.

Poster Sunumları:

A.Z.Anadol, E.Tezel, M.E.Yüksel, E.Ersoy. Kasık Fıtığı Onarımında Klasik Lichtenstein Yöntemi ile Kendiliğinden Yapışan Yamanın Karşılaştırılması, Video Sunum, 3.Ulusal Fıtık Kongresi, 12-15 Ekim 2011, Antalya.

M.Akın, M.E.Yüksel, H.Karabacak, S.Tuncer, G.Yılmaz, O.Kurukahvecioğlu. Fibroadenom ve Duktal Karsinoma in situ Birlikteliği, Olgu Sunumu. 11.Ulusal Meme Hastalıkları Kongresi, 5-9 Ekim 2011, Antalya.

M.E.Yüksel, L.Lützkendorf, G.Höffken, D.Koschel, "Malignes Pleuromesotheliom durch natürliche Asbestexposition", 9. Herbsttagung der Mitteldeutschen Gesellschaft für Pneumologie, Pneumologie, 10.2007, sayı 9, vol.61., Almanya.

Diğer Akademik Çalışmalar

USMLE (United States Medical Licensing Examination) ECFMG sertifikasi: Ekim 2010.

Almanya Tıp Diploması Denklik Sınavı (29.08.2007), Chemnitz, Almanya.

Burslar

Türk Eğitim Vakfı(TEV) & Alman Akademik Değişim Servisi (DAAD) Yüksek Lisans Bursu, 2004-2006.

Sertifikalar

XI. Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu, Katılım Sertifikası, Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi (GÜDAM), 2-10 Mayıs 2012.

Temel Laparoskopi Kursu, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Laparoskopik Cerrahi Eğitim Ünitesi, Gölbaşı, Ankara, 4-6 Ocak 2011.