



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

**ÇAPRAZ BAĞLI HYALÜRONİK ASİT JELİNİN FARE
MODELİNDE KOLON KANSERİ PERİTONEAL
İMLANTASYONU ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. İsmail Burak GÖK

Antalya, 2021



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

**ÇAPRAZ BAĞLI HYALÜRONİK ASİT JELİNİN FARE MODELİNDE
KOLON KANSERİ PERİTONEAL İMPLANTASYONU ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. İsmail Burak GÖK

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sezer GÜRER

“Kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir. (Proje No: TTU-2021-5548)

Antalya, 2021

TEŞEKKÜR

Cerrahi eğitimime başladığımdan beri hem bilgisi ve deneyimiyle hem de insanlığıyla hep arkamızda duran değerli hocam Prof.Dr. Sezer Gürer'e,

Eğitimim süresince ilgi, alakalarını eksik etmeyen ve bize örnek olan değerli hocalarıma,

Gece ve gündüzümüz birlikte geçen, aileden daha yakın olduğumuz asistan arkadaşlarıma, özellikle eşkıdemim Uzm.Dr.Alim Akbarov'a,

Başımдан büyük işlere kalkıştığım laboratuvar çalışmaları sürecinde bana her şekilde yardımcı olan, laboratuvarını bana açan, kıymetli hocam Prof. Dr. Akın Yeşilkaya ve sabrı ve titizliğiyle, yaptığım planların elimde patlamasından beni kurtaran Dr. Sayra Dilmaç'a,

Hayatımın her döneminde destekçim olan ve bugünlere gelmemde en büyük emeği olan biricik annem, babam ve ablalarıma,

Eşim, dostum ve yol arkadaşım Uzm.Dr. Hande Şener Gök 'e,

Teşekkürü bir borç bilirim.

ÖZET

Amaç: Kolorektal kanserler dünyada kanser ilişkili ölümlerde ikinci sıradadır. Özellikle peritoneal metastaz varlığı hastalık ilişkili ve genel sağkalımı önemli ölçüde düşürmektedir. Bu çalışmada çapraz bağlı hyalüronik asit hidrojelinin kolon kanser hücrelerinin migrasyon, invazyon ve peritoneal implantasyon yetisi üzerindeki etkilerin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: HT-29 hücre hattı kullanılmış ve çapraz bağlı hyalüronik asit hidrojel varlığında *in vitro* Transwell migrasyon ve invazyon metodu, *in vivo* Balb/c fare xenograft intraperitoneal tümör modeliyle veriler elde edilmiştir. Deney grubuna haftalık intraperitoneal hidrojel uygulaması yapılmış ve 5. haftada deneklere ötenazi yapıp, vücut boşlukları açılıp incelenmiştir. Tespit edilen implantlar tartılarak gruplar arasında analiz edilmiştir.

Bulgular: Çapraz bağlı hyalüronik asit varlığında özellikle HT-29 hücrelerinin invazyon ve migrasyon yeteneğinin belirgin olarak azaldığı görüldü (her ikisi için $p < 0.0001$). Fare modelinde ise haftalık intraperitoneal hidrojel enjeksiyonuyla 5. haftada kontrol grubundaki farelerin %77'sinde tümör implantı görülürken, deney grubundaki hiç bir farede peritoneal implanta rastlanmadı.

Sonuç: Çapraz bağlı hyalüronik asit hidrojelinin *in vitro* ve *in vivo* deneylerde HT-29 hücrelerinin invazyon, migrasyon ve implantasyon oranlarını düşürdüğü gözlenmiştir. Klinikte uygulanabilirliğini belirlemek için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: kolon kanseri, çapraz bağlı hyalüronik asit, hayvan modeli

ABSTRACT

Objective: Colorectal cancers cause the second most common cancer-related death in the world as of 2020. The presence of peritoneal metastases significantly reduces disease-related and overall survival. In this study, we aimed to investigate the effects of cross-linked hyaluronic acid hydrogel on the migration, invasion and peritoneal implantation ability of HT-29 human colon cancer cells.

Method: HT-29 cell line was used and data were obtained by utilizing *in vitro* Transwell migration and invasion assay, *in vivo* Balb/c mouse xenograft intraperitoneal tumor model in the presence of cross-linked hyaluronic acid hydrogel. Weekly intraperitoneal hydrogel injections were applied to the experimental group and at the 5th week, the subjects were euthanized and their body cavities were opened and examined. Detected peritoneal implants were weighed and analyzed between groups.

Results: In the presence of cross-linked hyaluronic acid, it was observed that the invasion and migration ability of HT-29 cells decreased significantly ($p < 0.0001$ for both). In the mouse model, with weekly intraperitoneal hydrogel injection, tumor implantation was observed in 77% of the mice ($n=7$) in the control group at week 5, while no peritoneal implant was found in any subject in the experimental group.

Conclusion: We observed that cross-linked hyaluronic acid hydrogel reduces the invasion, migration and implantation rates of HT-29 cells in *in vitro* and *in vivo* experiments. Further studies are needed to determine its clinical applicability.

Keywords: colon cancer, cross linked hyaluronic acid, animal model

İÇİNDEKİLER

Kısaltmalar Dizini	vi
Tablo ve Şemalar Dizini	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kolorektal Kanserler	4
2.1.1. İnsidans ve Tarama Stratejileri	4
2.1.2. Risk Faktörleri	5
2.1.3. Patogenez	6
2.1.4. Metastaz Yolları	8
2.1.5. Evreleme	9
2.1.6. Tedavi	9
2.2. Periton, Anatomi ve Fizyoloji	11
2.2.1. Peritoneal İnflamatuvar Yanıt	12
2.2.2. Peritoneal Karsinomatozis ve İnflamatuvar Yanıt	13
2.2.3. Anjiyogenez	16
2.3. Hyalüronik Asit ve Çapraz Bağlı Hyalüronik Asit	17
2.3.1. Tarihi	17
2.3.2. Yapısı, Sentezi ve Özellikleri	19
2.3.3. Fonksiyonları ve Hücre Metabolizmasındaki Rolü	20
2.3.4. Kullanım Alanları	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Kullanılan Cihazlar, Model ve Numaralar	25
3.2. Kullanılan Sarf Malzemeler	25
3.3. Kullanılan Kimyasallar, Enzimler ve Stok Kodları	26
3.4. Denekler	26
3.5. Hücre Hattı	26
3.6. Yöntem	27
3.6.1. Solüsyonların Hazırlanması	27
3.6.2. HT-29 Hücre Hattının Revivifiye Edilmesi	27
3.6.3. HT-29 Hücre Hattının Rutin Pasajı	27
3.6.4. Hücre Migrasyon ve İnvazyon Deneyi	28
3.6.5. Peritoneal İmplantasyon Deneyi	29
4. SONUÇLAR	30
4.1. Migrasyon Deneyi	30

4.2. İnvazyon Deneyi	30
4.3. İmplantasyon Deneyi	31
5. TARTIŞMA	32
6. KAYNAKLAR	35



KISALTMALAR DİZİNİ

ACS	American Cancer Society
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ÇBHA	Çapraz Bağlı Hyalüronik Asit
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FBS	Foetal Bovine Serum
FIT	Fekal İmmünohistokimya Testi
HA	Hyalüronik Asit
HAS2	Hyaluronan Sentaz – 2
HGF/SF	Hepatocyte growth factor/scatter factor)
HIF	Hypoxia Induced Factor
HIPEC	Hipertermik İntraperitoneal Kemoterapi
HÜKÜK	Hücre Kültür Kütüphanesi
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IGF	Insulin Like Growth Factor
KRK	Kolorektal Kanser
MMP	Matriks Metalloproteinaz
MR	Manyetik Rezonans
NO	Nitrik Oksit
PAI	Plasminogen Activator Inhibitor
PBS	Phosphate Buffered Saline
PECAM	Platelet-Endothelial Adhesion Molecule
PFA	Paraformaldehit
PS	Penisilin-Streptomisin
PTEN	Phosphatase and Tensin Homologue
RHAMM	Receptor for Hyaluronan Mediated Motility
SMA	Smooth Muscle Actin
TGF	Transforming Growth Factor
TIMP	Tissue Inhibitor Metalloproteinase
TNM	Tümör-Nod-Metastaz
VCAM	Vascular Adhesion Molecule
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

TABLO VE ŞEKİLLER DİZİNİ

Tablo - 1 Hyalüronik Asidin Boyutlarına Göre Bazı Fonksiyonları	21
Şekil - 1 Hyalüronik Asit Monomeri	19
Şekil - 2 Hyalüronik Asidin Farklı Molekül Ağırlıklarında Hücre Membranından Çekirdeğe Kadar Olan Sinyalizasyon Yolakları	22
Şekil - 3 ÇBHA, HT-29 Kolon Kanseri Hücrelerinin <i>in vitro</i> Migrasyon ve İnvazyonunu Engellemektedir	30
Şekil - 4 Deneklerden Çıkarılan Tümör İmplantları	31



1. GİRİŞ

Problemin Tanımı ve Önemi

Kolorektal kanserler(KRK), kalın bağırsak ve rektum dokusundan köken alan malign hastalıklar grubudur. Sıklıkla epitelyal dokudan basamaklı biçimde malign transformasyon sonucu gelişir. Bu şekilde gelişen tümörler adenokarsinom olarak adlandırılır ve kolorektal karsinomların büyük çoğunluğunu oluşturur.

2020 yılı itibariyle kolorektal kanserler, dünyada en çok görülen kanser türünde üçüncü ve kansere bağlı ölümlerde ikinci sırada yer almaktadır(1). Devam eden küresel demografik ve epidemiyolojik değişiklikler kanser türlerinin sağlık sistemleri üzerine yükünü arttırmaya devam etmekte olup 2030 yılına kadar yeni kolorektal kanser olgularının 2.2 milyona çıkacağı ve kolorektal kansere bağlı yıllık ölümlerin 1.1 milyona çıkacağı tahmin edilmektedir(2).

Kolorektal kanser olgularında karsinogenezis çoğunlukla hayat tarzına ve yaşa bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Avrupa genelinde kolorektal kanser için 5 yıllık sağ kalım %60'dan azdır. Sağkalım oranları, tümör yatağında mikroskopik tümör bırakmayacak şekilde(R0) yapılan cerrahi rezeksiyon ile yakından ilişkilidir(3). R0 bir cerrahinin mümkün olması ise tümöral yerleşim, derinlik, metastatik lenf nodları, peritoneal metastatik tutulum, uzak organ metastazlarına bağlıdır. Yeni cerrahi teknikler sayesinde bölgesel lenf nodları dahil primer tümörden etkilenen organlar embriyolojik planlar hizasında çıkarılmaktadır. Tedavide cerrahi ön planda olmakla beraber adjuvan veya neoadjuvan sistemik kemoterapi, intraperitoneal kemoterapi, radyoterapi ve moleküler hedefli ajanlar da hastanın klinik özelliklerine göre uygun olan şekillerde kullanılır.

Peritoneal metastazlar, ilk tanı esnasında KRK hastalarının yaklaşık %5-10'unda mevcuttur. Bu metastatik implantlar ilk tanı esnasında mevcut(senkron) olabileceği gibi küratif amaçlı yapılan operasyondan sonraki takiplerde(metakron) de ortaya çıkabilir. Cerrahi sonrasında nükseden hastaların %20-50'sinde metakron peritoneal hastalık ortaya çıkmaktadır.

Peritoneal yüzey, kolon kanserinde en sık üçüncü, rektal kanserde en sık dördüncü metastaz bölgesidir. Peritoneal metastazlar diğer metastaz bölgelerine kıyasla daha kötü sağkalım ile ilişkilendirilmiştir(4-6). Literatürde obstrüksiyon,

perforasyon(spontan veya iatrojenik), pT4 tümör, pT3 müsinöz veya taşlı yüzük hücreli kanser, intraoperatif sitoloji pozitifliği, peritona yapışık tümör, ovaryan metastaz veya lateral cerrahi sınır pozitifliği olan hastaların cerrahi sonrası peritoneal metastaz gelişme hususunda yüksek risk taşıdığı bildirilmektedir. Ancak Honoré ve ark.'larının 2013'te yayınladığı sistematik analizde peritoneal karsinomatozis gelişme riski sadece sitoloji, tümör ilişkili perforasyon, ovaryan metastaz, cerrahi sırasındaki görülen (tamamen rezeke edilse de) peritoneal implant varlığıyla ilişkilendirilmiştir (7–11).

Amerika Birleşik Kanser Komitesi(American Joint Committee on Cancer/AJCC) 'nin yayınladığı Kanser Evreleme Kılavuzu'nda peritoneal metastatik hastalık uzak metastaz olarak(pM1c) kabul edilmektedir(12). Önceki yıllarda peritoneal metastatik hastalıkta küratif bir cerrahi önerilmezken yayınlanan güncel yönergeler ileri derecede deneyimli merkezlerde kısıtlı peritoneal metastazı olan hastalar için sitoredüktif cerrahi ve hipertermik intraperitoneal kemoterapinin(HIPEC) kullanılabileceğini ifade etmektedir(13). Buna rağmen peritoneal hastalıkta sadece sistemik kemoterapiyle ortalama 12 aylık bir sağkalım bildirilmektedir(14). Uygun hastalarda yapılan sitoredüktif cerrahi ve HIPEC sonrasında bildirilen 5 yıllık sağkalım oranları ise %23.4 – 52 arasında değişmektedir(15).

Hyalüronik asit(HA), insan vücudunda bilhassa bağ doku olmak üzere çeşitli dokularda yaygın olarak bulunan bir glikozaminoglikan bileşiktir. Yara iyileşmesi, hücre göçü ve inflamasyonda önemli rol oynar(16). HA'nın insan vücudunda sentez-yıkım döngüsü son derece hızlıdır(17). *In vivo* ortamda normal zincir formunun yarı ömrünün çok kısa olması sebebiyle tıbbi kullanımda çapraz bağ oluşturulmuş formu kullanılmaktadır(ÇBHA). ÇBHA hidrojelleri oküler cerrahide hacim koruyucu, osteoartritte intraartiküler, estetik girişimlerde dolgu maddesi olarak, jinekolojide intrauterin adhezyonların engellenmesinde ve abdominal cerrahide peritoneal adhezyonların oluşumunun engellenmesinde kullanılmaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalar over ve mide tümörlerinin peritoneal implantasyonunun engellenmesinde(18,19) ve çeşitli kemoterapötik ajanların hedef dokuya taşınmasında bir platform olarak gelecek vaadeden sonuçlar bildirmektedir(20–23).

Araştırmanın Amacı

Bu araştırmada ÇBHA hidrojelinin insan kolon kanser hücrelerinin migrasyonu ve invazyonuna etkisinin *in vitro*, hücrelerin peritoneal implantasyona etkisinin fare modelinde *in vivo* incelenmesi amaçlanmaktadır.

In vitro kısımda ÇBHA hidrojelinin insan kolon kanseri hücrelerinin migrasyon ve invazyon yetisine etkisi ölçülecektir. Eğer bu fonksiyonları engelliyorsa etkinin görüldüğü ÇBHA konsantrasyonunun öğrenilmesi planlanmıştır.

In vivo kısımda ÇBHA hidrojelinin fare modelinde peritoneal implantların oluşumuna etkisi değerlendirilecektir. Gruplar arasında peritoneal implantlar toplam kütle ve sayı olarak karşılaştırılacak ve ÇBHA uygulamasının tümörün implantasyonunu engelleyip engellemediği, engelliyor veya azaltıyorsa bunun oranı belirlenecektir.

Araştırma Hipotezi

ÇBHA hidrojeli insan kolon kanser hücrelerinin *in vitro* invazyon ve migrasyon fonksiyonlarını, *in vivo* peritoneal implantasyon fonksiyonunu engeller mi?

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolorektal Kanserler

2.1.1. İnsidans ve Tarama Stratejileri

Dünya Sağlık Örgütü tarafından yayınlanan GLOBOCAN veritabanından edinilen bilgilere göre kolorektal kanserler erkeklerde üçüncü ve kadınlarda ikinci en sık görülen kanser tipidir.

Türkiye’de 2020 yılında toplam 21191 yeni kolorektal kanser vakası görüldüğü bildirilmiştir. Bu da yeni tanı kanser vakalarının %9.1’ine tekabül etmektedir. Kanser sebepli ölümlerde ise 10723 kişi(%8.4) ile mide kanserinin ardından en ölümcül 3. kanserdir(24).

Kolorektal kanser olgularının çoğunda kanseröz lezyon adenomatöz poliplerden başlayan ve kabaca 10 yıllık bir süreçte basamaklı bir transformasyon geçirmektedir. Kolon ve rektum lümeni nispeten kolay erişilebilir olduğundan bu zaman aralığında erken teşhis mümkün olabilmektedir. Bu sebeple bir çok ülke ve organizasyon orta riskli nüfusta 50 yaş üstüne rutin tarama önermektedir(25). Amerikan Kanser Topluluğu (ACS), 45 yaşında kolorektal kanser taramasına başlamayı “nitelikli” vasıfta önerirken, 50 yaş üstüne ise en kuvvetli öneri düzeyinde tavsiye etmektedir(26). Bu öneri kuvveti farklılığı 45-50 yaş arasında taramayı destekleyen kanıtların yeterince olgunlaşmaması olarak bildirilmektedir. Türkiye ‘de T.C Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü tarafından yayınlanan Kolorektal Kanser Tarama Programı Ulusal Standartları’nda 50 yaş üstü orta riskli bireylere iki yılda bir fekal immünohistokimya testi (FIT) ve on yılda bir kolonoskopi yapılması hedeflenmektedir. Birinci derece akrabalarında kolorektal kanser, adenomatöz polip, ülseratif kolit, Crohn hastalığı, kalıtsal polipozis olan yüksek riskli bireylerde ise tarama yaşı 40’tan başlamaktadır(27). Yine bu program dahilinde en son iki testi negatif olan 70 yaşındaki bireylerde tarama programı sonlandırılmaktadır. Literatürde kolonoskopi, sigmoidoskopi ve FIT’in sekizinci dekatın ortalarına kadar maliyet etkin olduğu savunulmaktadır(28). Ancak hastaların 75 yaşından daha yaşlı olmasının, kronik hastalıklar hesaba katılmadığında bile kolonoskopi ilişkili komplikasyon riskini arttıran bağımsız bir değişken olduğu bildirilmiştir(29).

2.1.2 Risk Faktörleri

Çevresel ve genetik faktörler KRK riskini arttırmaktadır(30–34). Genetik faktörler mevcut oldukları kişilerde riski bariz biçimde arttırsa da KRKların çoğu sporadik olarak ortaya çıkmaktadır.

KRK insidansı 50 yaşından sonra hızla artmakta olup vakaların %90'ı 50 yaş üstünde görülmektedir(2,35). Tarama stratejileri bu mantık üzerine oturtulmaktadır. Ailesel Adenomatöz Polipozis ve Lynch Sendromu ilişkili olgular, KRK'ların yaklaşık %5'ine tekabül etmektedir ve bu hastaların %80-90'ında 45 yaş öncesi en az bir kanser gelişmektedir(36,37). Herhangi bir sendromla ilişkili olmasa da birinci derecede yakınlarda KRK öyküsü kanser riskini normal toplumun 2 katına çıkardığı gösterilmiştir. Bu risk KRK bulunan akraba sayısı arttıkça ve tanı konma yaşı 50'nin altındaysa belirgin olarak yükselmektedir(38,39).

Ülseratif kolit ve kolorektal tümörler arasındaki ilişki uzun süredir bilinmektedir. KRK riski inflamasyonun şiddeti, kolonun tutulum oranı ve hastalığın süresi ile doğru orantılıdır. Pankolitli hastalarda KRK gelişme riski normal nüfusa kıyasla 5 ila 15 kat daha fazla iken sadece sol kolon tutulumu olan kişilerde bu oran 3 katıdır. 10 hastalık yılında kümülatif KRK gelişme oranı %2 olarak bildirilirken, 30 hastalık yılında bu oran %18'e varmaktadır(40,41).

Batı tarzı diyet olarak hayvansal yağlardan zengin ve liften fakir beslenen nüfuslarda kolorektal kanserlerin daha sık geliştiği gözlenmiştir. Doymuş ve çoklu doymamış yağlar, kırmızı et, işlenmiş et ürünlerinden zengin diyet KRK riskini arttırsa da bu artışın karşılaştırılan nüfuslarda istikrarlı olmaması kişilerin genetik altyapısı ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir(34,42). Obezite ve diyabetin hem KRK riskini hem de KRK ilişkili ölüm riskini arttırdığı gösterilmiştir(31–33).

Sigara ve KRK ilişkisinin incelendiği tüm çalışmalarda sigara içenlerde kolonik polip insidansı, KRK ve KRK ilişkili ölüm riskinin arttığı bildirilmektedir(30).

Üreterosigmoidostomi yapılan hastalarda(43), pelvik radyoterapi alan hastalarda(44) ve akromegali hastalarında da(45) KRK riskinin arttığı bildirilmektedir.

2.1.3. Patogenez

Genetik Yolaklar: Kolorektal kanserin basamaklı biçimde malign transformasyonu aynı zamanda bu kanserin oluşumunda rol oynayan genetik ve moleküler mekanizmaların daha kolay ortaya çıkarılmasını sağlamıştır. Genetik mutasyonlar onkogenleri aktive ederek veya tümör supresör genleri deaktive ederek hücreleri kanserleşmeye yatkın hale getirmektedir. Bu mutasyonların birikimi aynı anda devam edebilen üç yolakta toplanabilir(46):

- Heterozigotisme Kaybı: Bir kromozomun bir kısmının kaybı ile ortaya çıkmaktadır. KRKların yaklaşık %80'inin bu yolak üzerinden oluştuğu tahmin edilmektedir.

- Mikrosatellit İstabilite: DNA replikasyonu sırasında oluşan mismatch hatalarının onarımında sorun oluşması ile ortaya çıktığı düşünülmektedir. Bu mekanizma, ilk olarak Lynch Sendromu'nda tanımlanmış ancak daha sonra kendiliğinden gelişen çoğu tümörde de tespit edilmiştir.

- CpG Adacık Metilasyonu: Bu yolakta genlerin mutasyonu yerine farklı metilasyon alanları ile inaktive olması söz konusudur.

Polipler: Günümüzde kolorektal karsinomların büyük çoğunluğunun adenomatöz karakterdeki poliplerden geliştiği kabul edilmektedir(47). Polip histolojik tipten bağımsız olarak lümenin kabarıklık her hangi bir yapı olarak tanımlanmaktadır. Kolorektal polipler neoplastik, hiperplastik, hamartomatöz veya inflamatuvar olarak sınıflandırılabilir:

- Neoplastik: 50 yaş üstü toplumda yaygındır. Malign dejenerasyon riski polipin boyutu ve tipi ile ilişkilidir. Tübüler adenomlar vakaların yaklaşık %5'inde kanserle ilişkilendirilirken villöz adenomlarda bu oran vakaların yaklaşık yarısına tekabül etmektedir. Aynı şekilde subsantimetrik poliplerde invazif karsinom nadir olup boyut genişledikçe hızla artmaktadır(48).

Toplumdaki tarama stratejileri bu karakteristik özellikler üzerine bina edilmiştir. Bilhassa saplı polipler saptandığında kolonoskopik olarak çıkarılmaya müsaittir. Sapsız yani sesil polipler için ise sıvı enjekte ederek zeminden kabartma(saline lift), parçalayarak snare ile eksizyon ve endoskopik mukozal rezeksiyon(EMR) gibi ileri teknikler gerekebilir. Rektal sesil polipler için ise cerrahi tercih edilebilir. Sesil polipler eksize edilirken daha sonraki takibi veya cerrahiye yönlendirmek açısından

eksizyon alanına tatuaj(çekum hariç) yapılabilir. Güncel yönergelerde bütün poliplerde, eğer polibin tamamı çıkarılamadıysa veya olumsuz histopatolojik özelliklere sahipse(submukozal 1 mm'den derin invazyon, polipektomi sınır pozitifliği, kötü diferansiyasyon, tümör tomurcuklanması veya lenfovasküler invazyon) cerrahi girişimlerin planlanması önerilmektedir(48).

-Hiperplastik: Genel nüfusta kolon mukozasında son derece yaygın olarak tespit edilir. Boyutları 5 mm'den küçüktür ve displazi görülmediğinden premalign olarak değerlendirilmez. Ancak adenomatöz poliplerden kolonoskopik olarak ayrımı yapılamadığından sıklıkla polipektomi yapılır. İki santimden büyük hiperplastik poliplerde ise malign dejenerasyon ihtimali vardır(47).

-Hamartamatöz(Juvenil): Çoğu tipi çocukluk çağında görülür ancak her yaşta ortaya çıkabilir. Kanama, intususepsiyon veya obstrüksiyon oluşturabilir. Aynı şekilde adenomatöz poliplerden ayrımı yapılamadığından polipektomi gereklidir. Ailesel juvenil polipozis ve Peutz-Jeghers sendromu, Cronkite-Canada sendromu, Cowden Sendromunda görülen polipler bu tiptendir.

-İnflamatuvar(Psödopolipler): İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında, amibik, iskemik ve şistozomal kolit zemininde görülür. Malign olmasa da adenomatöz poliplere benzediğinden polipektomi gerekir(48).

Kalıtsal Kolorektal Karsinomlar: Kolorektal kanserlerin çoğunluğu sporadiktir. Kalıtsal kolorektal kanser sendromları ise incelendiğinde özellikle kolonda malign süreçlerin anlaşılması için önemli bilgiler sağlaması açısından her iki tür için önemlidir. Kalıtsal kolorektal kanserlerin patofizyolojisinde yer alan bütün genetik süreçler sporadik tipte de mevcut bulunmuştur(36,37).

-Ailesel Adenomatöz Polipozis: KKK'ların %1'ini oluşturur. Hastalarda genellikle puberteden hemen sonra bütün kolon yüzeyinde yüzlerce adenomatöz polip gelişir. Tanı anında hastaların %80'inden fazlasında kolonik polip mevcuttur ve bu hastaların %75'inde polip sayısı 50'yi aşmaktadır. Hastaların 5. dekada kadar kanser gelişme riski %100'dür. Tanısı bilinen kişilerin akrabalarında 10-15 yaşından itibaren sigmoidoskopi ile takibi yapılır. Gastrointestinal sistemin tamamında polip oluşumu görülebilir(49,50).

-Atenüe Ailesel Adenomatöz Polipozis: Hastalığın daha hafif seyreden bilinen bir varyantıdır. Klasik varyanta kıyasla daha geç yaşta, daha az ve ağırlıklı olarak sağ kolona yerleşen polipler oluşur.

-Lynch Sendromu(Herediter nonpolipozis kolon kanseri): KRK'ların %1-3'ünü oluşturur. Otozomal dominant geçişli mismatch tamirindeki hatalar sonucunda meydana gelir. Dördüncü dekatta başlangıç gösterir ve etkilenen kişilerin %70'inde kanser gelişmektedir. Vücudun diğer alanlarındaki malignitelerle ilişkilendirilmiştir. Aile öyküsü olan risk altındaki kişilerin taranması ve takibi için ailedeki hastalığın en erken çıkma yaşından 10 yıl öncesinde yıllık kolonoskopi tavsiye edilmektedir. Aynı şekilde hastalıktan etkilenen, doğurganlığını tamamlamış kadınlarda profilaktik histerektomi ve bilateral salpingo-ooferektomi önerilmektedir(49).

-Ailesel Non-Sendromik Kolorektal Kanser: KRK'ların %10-15'ine tekabül etmektedir. Ailedeki hasta kişi sayısı arttıkça kanser gelişme riski %35'e kadar artmaktadır. 40 yaşında başlayıp her 5 yılda bir tarama kolonoskopisi önerilmektedir(37).

2.1.4. Metastaz Yolları

Kolon ve rektum kanserleri büyük çoğunlukla mukozadan ortaya çıkar, bağırsak duvarını sonra komşu dokuları ve diğer organları tutar. Bu büyüme ve direkt yayılım sonucunda hem kolonda hem de komşu üreterlerde obstrüksiyon gözlenebilir. KRK'ların en sık yayıldığı yol lenfatik yolaklardır(51).

Lenfatik yol: Bölgesel lenf nodları kolorektal karsinomlar için en sık görülen yayılma yoludur. Genellikle uzak metastaz veya peritoneal karsinomatozdan önce görülür. Tümör boyutu, kötü diferansiyasyon, lenfovasküler invazyon ve bilhassa invazyon derinliği arttıkça nodal tutulum olma ihtimali de artar. Epitel doku içerisinde in situ yerleşimli karsinomların(Tis) lenf nodu tutulumu olmadığı varsayılmaktadır. Lenf nodlarındaki metastazların sayısı arttıkça sağkalım azalmaktadır. Lenfatik yayılım ilişkili kolon segmentinin venlerinin akışını takip eder. Rektumda ise proksimal kısım superior rektal venler yoluyla inferior mezenterik vene drene olurken, distal rektumda orta rektal damarları takip eder. İnternal iliak venlerle ilişkili lenf nodlarına yayılım nadirdir(52).

Hematojen yol: Kolorektal kanserlerde en sık hematojen yayılım yeri karaciğerdir. Portal venöz sistem tümöral hücreleri taşır ve karaciğer sinüzoidlerinde metastatik yapılar oluşur. Yine lenfatik metastazlarda olduğu gibi ihtimal tümör boyutu ve evresinin artmasıyla artış gösterir. Bir diğer uzak metastaz bölgesi akciğerler olsa da tek başına tutulumu nadirdir(53).

Direkt yayılım: Tümörün çevre dokuyu direkt infiltrasyonu ile görülür. Ayrıca serozayı aşmış tümörlerde tümörün iç basıncı, intraabdominal organlar veya peritonun sürtünme hareketi gibi sebeplerle malign hücreler periton içerisine serbest olarak dökülüp diffüz peritoneal metastazlar oluşturabilir(53). Peritoneal karsinomatozis olarak adlandırılan bu durum sağkalımı ve prognozu oldukça kötüleştirmektedir. Ayrıca multifokal KRK olan hastalarda tümörlerin klonalitesi üzerine yapılan incelemeler benzer bir mekanizma ile intralüminal yayılım oluşabileceğinin altını çizmektedir(54).

2.1.5. Evreleme

Kolorektal kanserlerde evreleme tümörün invazyon derinliği, nodal tutulum ve uzak metastazların düzeyine göre yapılır(55). Bunun için American Joint Committee on Cancer (AJCC) 'ın geliştirdiği Tümör-Nod-Metastaz (TNM) evreleme sistemi kullanılır. Evre I hastalık nodal tutulumu olmayan(N0), mukozayı aşmış ve submukoza(T1) veya muskularis propria (T2) tabakasına sınırlanmış adenokarsinomu tariflemektedir. Evre II hastalık ise nodal tutulum olmadan, organın duvarını aşarak subserozal alan veya peritonla kaplı olmayan perikolik ve perirektal dokuya(T3) veya diğer organ/dokulara veya visseral peritona(T4) invaze adenokarsinomu ifade etmektedir. Evre III hastalıkta tümör invazyonuna bakmaksızın nodal tutulum(N1 ve N2) mevcuttur ancak uzak metastaz bulunmamaktadır. Evre IV hastalıkta ise uzak metastaz(M1) söz konusudur. Hastalığın evresi 5 yıllık sağkalım ile koreledir.

2.1.6. Tedavi

Genel Prensipler: Son yıllarda kanser biyolojisi ve patofizyolojisi hakkındaki bilgilerin ilerlermesiyle yeni hedefe yönelik tedaviler geliştirilse de cerrahi, kolorektal kanser hastalarının esas tedavisini oluşturmaktadır. Cerrahi ise primer

tümör bölgesinden daha santral lenfatiklere doğru sıralı ve düzenli bir şekilde tümöral yayılımı savunan Halsted prensiplerine uygun planlanmaktadır. Bu prensiplerin tam olarak uygunluğu tartışılrsa da özellikle kolon ve mezenterinin embriyolojik gelişim planlarından diseksiyonu ve eksizyonu daha düşük lokal nüks ve daha iyi sağkalım ile ilişkilendirilmiştir(56).

Cerrahi: Kolorektal kanserlerde küratif cerrahide tümörün yerleşik olduğu kolorektal segmentin, yeterli cerrahi sınırın, ilişkili vasküler yatak ve lenfatik dokuları içeren mezenterin enblok çıkarılması amaçlanmaktadır. Lenfatik kanaliküller esas olarak submukoza ve subserozada yer almakta olup kolon duvarı boyunca yaklaşık 1 cm'den daha az lenfatik dağılım izlenmektedir. Bu sebeple kolon kanserlerinde tümörden 5 cm uzaklığa kadar eksizyon yeterli kabul edilmektedir(57). Bilhassa neoadjuvan tedavi almış rektal yerleşimli tümörlerde distal 2 cm'lik bir cerrahi sınır bile yeterli olabilmektedir. Şüphede kalınan durumlarda intraoperatif frozen inceleme soru işaretlerini giderebilmektedir.

Kemoterapi: Yeni tanı KRK vakalarının yaklaşık %80'inde küratif rezeksiyon yapılmaktadır ancak bu hastaların %40'ında tespit edilememiş mikrometastazlardan ötürü nüks hastalık gelişmektedir(58). Adjuvan kemoterapinin amacı bu tip yüksek riskli hastalardaki nüks oranını azaltmak ve genel sağkalımı arttırmaktır. Evre III hastalarda standart olarak adjuvan tedavi verilmekte olup bu hususta yapılan meta-analizlerden elde edilen veriler bu metodu desteklemektedir(59,60). Evre II hastalıkta ise klinik ve patolojik olarak kötü prognoz işaretçileri varlığında (kötü histolojik diferansiyasyon, obstrüksiyon/perforasyon ile geliş, lenfovasküler invazyon, primer rezeksiyonda 12'den az lenf nodu çıkarılması ve tümör evresinin ileri olması) kullanılması önerilmektedir(61).

Bütün kanser türlerinde yakın zamandaki gelişmeler hastalardaki spesifik moleküler hedefler ve biyomarkere yönelik yeni ajanların tedaviye girmesine önayak olmuştur(62,63).

Radyoterapi: MR görüntüleme veya transrektal endoskopik ultrason ile cT3 veya cT4 olarak yeni tanı alan bütün rektal adenokarsinomlarda kemoterapiye ek olarak veya tek başına radyoterapinin kullanımı önerilmektedir(64). Radyoterapi büyük boyutlu tümörlerin boyutunun küçültülmesi veya hastalığın evresinin

düşürülmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bütün hastaların radyoterapiye iyi yanıt vermediği ve hastaların hem genel sağlığını hem de hayat kalitesini etkileyebilecek tedavi ile ilişkili toksisitenin oluşabileceği göz önünde bulundurulmalıdır(65).

Ayrıca neoadjuvan radyoterapi özellikle dar erkek pelvisinde cerrahi zorluğu arttıracak şekilde cerrahi planların kaybolmasına yol açabilen aşırı doku ödemi ve radyasyon hasarına müteakip fibrozise sebep olmaktadır(66).

2.2. Periton, Anatomi ve Fizyoloji

Periton, bazal lamina üzerine oturmuş basit düz yüzeyli stratifiye yassı epitel ve altında yatan areolar bağ dokusundan oluşur ve vücuttaki en geniş yüzeyli seröz membrandır. Mezotelyal hücreler hücrelerarası bağlantılar ile bağlıdır ve yüzeylerinde mikrovilluslar mevcuttur(67).

Abdominal boşluğu kaplayan kısmına parietal periton, bazı organları kaplayıp seroza tabakası oluşturan kısmına ise visseral periton adı verilir. Bu iki kısmın arasında kalan erişkinlerde 50-100 mL kayganlaştırıcı seröz sıvı içeren boşluk peritoneal kaviteyi oluşturur. Bu sıvı sayesinde herhangi bir noktaya fiks olmayan batin içi organlar ve omentum birbiri üzerinden serbestçe hareket edebilmektedir.

Peritoneal sıvı, kapiller ve peritoneal boşluk arasındaki basınç farkından kaynaklı olarak endotelyal hücrelerin arasındaki yarıklar, aquaporin-1 kanalları, küçük ve orta boyutlu kanallardan Starling kuvvetleri ve ultrafiltrasyon mekanizmalarıyla peritoneal boşluğa (erişkin insanlarda 0.1 mL/dk) akar(68). Mezotelyal tabakadan çevredeki hücrelerarası alana ve buradan lenfatiklere geçer(69). İnflamasyon, intravasküler onkotik basıncın düşmesi, septik durumlar, lenfatik sistemin tıkanıklıkları ve malign hadiselerde periton içi sıvının hacmi artabilir (assit).

Yoğun olarak omentum ve subdiyafragmatik alanlarda yer alan geniş ağızlı lenfatik stomata da batin içi sıvının lenfatik kanallar aracılığıyla anterior mediastene veya duktus torasikus 'a geçişte rol oynamaktadır.

Periton sıvısı pH'ı 7.5-8.0 arasında olup bir miktar tamponlama kapasitesi de mevcuttur. Peritoneal sıvının bu akış döngüsü ve kimyasal karakterinden yararlanılarak vücuttaki çeşitli atık maddeler peritoneal diyaliz yapılarak uzaklaştırılabilir(70).

Büyüme faktörleri, besin maddeleri, sitokinler, kemokinler ve lökositler periton sıvısı ve kan arasında devirdaim halindedir. Monositler ve makrofajlar bu lökositlerin %50-90'ını oluşturur ve normal durumda peritoneal alandan debris ve patojenlerin fagosite edilip lenfatik sistem yardımıyla atılmasını sağlar(71). Normal dinlenme safhasında ve akut inflamasyon durumlarında sinyalizasyon ile immün sistem öğelerinin periton boşluğuna geçişi sağlanır.

Periton sıvısında ikinci sırada en çok bulunan hücreler ise B1 lenfositlerdir. Özellikle düşük antijen aktivitesi ve geniş spesifiteye sahip IgM ve IgA'nın kaynağı olan bu lenfositlerin aktivasyon sinyali ile IgM yapımına başladığı ve sonrasında ikincil lenfoid organlara göç ettiği tespit edilmiştir(72).

2.2.1. Peritoneal İnflamatuvar Yanıt

Periton boşluğunda hasar sonrasında veya inflamasyon oluşturan hasar veya patojen ilişkili moleküler paternlerin varlığı ile lokal veya yaygın inflamasyon yanıtı oluşur. Klasik inflamasyondan sonra ödem ve fibrojenik eksudanın oluşumu görülür.

Peritoneal tamir mekanizmalarında erken dönemde hasarlı hücrelerden salınan inflamatuvar sinyallerle uyanan mezotelyal hücreler ve inflamatuvar lökositler rol oynamaktadır. İlerleyen safhalarında anjiyogenez, hücre göçü ve hücre dışı matriksin yapımının düzenlenmesi öne çıkmaktadır(73). Yaralanma sonrası proliferasyon diğer epitelyal dokularda olduğu gibi yara uçlarından değil, yaralanan yüzeyin tamamından başlar. Bu şekilde fibrin, histamin, monositler, granülositler, makrofajlar ve mezotelyal hücreler içeren protein oranı yüksek bir eksuda haline gelen periton sıvısı tamir sürecini yönetir(71). Bu sıvı birkaç saat içerisinde daha yoğun hale gelir ve nötrofiller fibrin iplikçiklerine tutunarak yaralanan alanı kaplar. Makrofajlar fagositik aktivitelerini artırır, reaktif oksijen radikalleri üretir ve ek mezotelyal hücreleri ve fibroblastları aktive eder. 72 saat içerisinde adhezyonlar gelişir ve periton yüzeyinin aktif fibrinolitik karakteri bu süreci dengeler. Mezotelyal hücreler saik ile mezenşimal hücrelere dönüşebilir ve bu olayı takiben TGF- β bağımlı oluşan hareketli fibroblastoid hücreler alfa-SMA upregülasyonu ile tip 1 kollajen sentezini sağlar. Mezotelyal kökenli miyofibroblastların da dokuda hücrelerarası matriks proteinlerinin birikmesinde ve tamir edilen dokunun kontraksiyonunda rol oynadığı gösterilmiştir(73,74).

2.2.2. Peritoneal Karsinomatozis ve İnflamatuvar Yanıt

Serozayı aşan tümörlerde peristaltik hareketlerin oluşturduğu mekanik travmayla beraber neoplastik hücreler spontan olarak periton üzerine dökülür. Dökülen bu malign hücre grupları peritonda taşınır. Taşınan bu hücreler uzak peritona yapışır ve subperitoneal aralığa invaze olur. Bunu takip eden anjiogenez metastatik büyümeye olanak sağlar(75).

a) Tümör hücrelerinin primer tümörden dökülmesi: Tümör hücreleri, yüksek interstisyel sıvı basıncı, hücrelerarası matriks, artmış ozmotik basınç ve primer neoplastik lezyondaki hücrelerarası adhezyonu sağlayan e-kadherin gibi moleküllerin ekspresyonunun azalması ile serozaya invaze olmuş kolorektal tümörlerden peritoneal boşluğa dökülür(76). Cerrahi esnasında da tümör rüptürü, tümör hücreleri içeren lenfatik kanalların ve damarların kesilmesi ile peritoneal tohumlanma(seeding) oluşabilir. Peritoneal lavaj sitolojisi kullanarak uzak metastazı olmayan kolorektal vakalarında peritoneal serbest tümör hücrelerin varlığını inceleyen çalışmaların sonuçları %2.1-52 arasında değişmektedir(77–79).

b) Tümör hücrelerinin intraperitoneal transportu: Tümör hücreleri peritona döküldükten sonra peritondaki diğer partiküller gibi taşınırlar. Bu süreçte epitelyal karakterde olan tümör hücreleri, aktin mikrofılaman sistemlerinin ciddi bir değişimiyle aktinden zengin membran çıkıntıları oluşturarak göçe ve invazyona yatkın mezenkimal karakterler kazanır. Bu değişim proto-onkogenler tarafından büyüme faktörleri, reseptörleri ve aracı sinyal moleküllerinin patolojik ekspresyonu ile teşvik edilir(80).

Transport sürecinin primer tümör lokalizasyonu, periton sıvısı hidrodinamiği, nefes alırken diyafragmanın oluşturduğu akıntı kuvveti ve yerçekimine bağlı olarak belirli rotalarla gerçekleştiği gösterilmiştir(51). Buna bağlı olarak peritoneal kavitenin subfrenik alan, omentum minus, mezenter, diyafram ve parakolik oluklar gibi çeşitli alanlarında metastatik oluşumlar daha sık görülmektedir. Aynı şekilde tümörün histolojik alt tipi de yayılım paternini etkileyebilmektedir. Müsinöz karakterdeki adenokarsinomların peritoneal yayılımının diğer tiplerden daha yaygın

olduğu gösterilmiştir(51,81). Cerrahi travma sonrasında oluşan peritoneal adhezyonlar da peritoneal taşınımı etkileyebilir.

c) Uzak peritona yapışma: Serbest KRK hücrelerinin uzak periton dokusuna yapışması transmezotelyal yayılım ve translenfatik metastaz olarak iki ana süreçle gerçekleşir. Transmezotelyal yayılımda serbest tümör hücreleri peritonun en iç tabakası olan mezotelyuma direkt olarak yapışır. Mezotelyum, damarın endotel tabakasına benzer şekilde lökosit geçişinde kullanılan adhezyon molekülleri eksprese eder ve tümör hücrelerinin invazyonu esnasında bu molekülleri kullandığı düşünülmektedir(82).

Mezotelyal hücreler yüzeylerinde immüogloblin üst ailesinden ICAM-1(intercellular adhesion molecule-1), PECAM-1(platelet-endothelial adhesion molecule-1) ve VCAM-1(vascular adhesion molecule-1) moleküllerini eksprese eder(83). Cerrahi travma sebebiyle veya tümör hücrelerinden salınan pro-inflamatuvar sitokinler adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırır ve mezotelyal hücrelerin kontraksiyonunu artırarak bazal membranın ortaya çıkmasına sebep olur(84). Tümör hücreleriyle bazal membranın laminar ağının etkileşimleri $\beta 1$ integrin alt ünitesi üzerinden yürümektedir(85).

Bir glikozaminoglikan olan hyalüronik asit, mezotelyal hücreler tarafından salgınır ve hücre etrafına bir manto gibi yerleşir(86). Hyalüronik asit mezotelyumu enfeksiyonlardan ve lenfositlerin sitotoksik etkilerinden korur. İkinci olarak hyalüronik asit tümör hücreleri tarafından eksprese edilen CD44 etkileşimi ile tümörün mezotelyuma adhezyonunda rol oynar(73,87). CD44 neoplastik ve normal hücrelerin yüzeyinde yaygın olarak eksprese olan bir glikoprotein olup hücre göçü, homotipik ve heterotipik hücre adhezyonunda göre alır.

Translenfatik yayılımda ise serbest tümör hücreleri lenfatik stoma açıklıklarından submezotelyal lenfatik kanallara erişim sağlar. Lenfatik stomalar lenfatik kılcalların açık uçları olup omentum, epiploik apendiksler, diyafram, falsiform ligaman, Douglas poşu ve ince bağırsak mezenterinde bulunurlar. Ayrıca bu kanal ağzları immünkompetan hücrelerin toplandığı süt lekisine benzer noktalar(milky spots) halinde özelleşmiş yapılar içerir.

İleri derecede vasküler bir mikroçevre oluşturan bu yapılar peritoneal karsinomatozis gelişiminde tümör hücrelerinin erken dönemde yaşamasını kolaylaştırır. Tam mekanizmalar aydınlatılamamış olsa da ayrıca mezotelyumdan VEGF(Vascular endothelial growth factor) salınımıyla anjiogenezi uyararak bu alanlarda tümör gelişimine katkıda bulunduğu düşünülmektedir(88).

d) Subperitoneal boşluğa invazyon: Yüzeyle yapışık tümör hücrelerinin invazyonu için mezotelyal tabakaya penetre olmaları gerekmektedir. Bunun için mezotelyal kontraksiyon sonrasında oluşan aralıklardan veya mezotelyal tabakanın direkt hasarlanması kullanılabilir. Mezotelyal hücreler tarafından üretilen HGF/SF(Hepatocyte growth factor/scatter factor) mezotelyal hasar onarımında bu hücrelerin detaçmanını, motilitesini ve proliferasyonunu indükler. c-MET protoonkogeni tarafından kodlanan HGF'nin tirozin kinaz reseptörüne bağlanması invazif bir büyüme süreci başlatır(89). Bu mekanizma normalde embriyolojik doku gelişimi ve organogeneizde rol oynarken tümör tarafından invazif ve metastatik olanakları arttırmak için kullanılır(90).

Tümör hücreleri tarafından indüklenen apoptoz ile mezotelyal katmanın hasarlanması görülebilir. Jayne ve ark., üç boyutlu *in vitro* insan periton dokusu modelini kullanarak KRK hücre hatlarının dış mezotelyal tabakaya hızlıca adhere olduğu göstermiştir. Yapışan hücrelerin büyük çoğunluğu invazyon oluşturmada mezotelyal yüzeyde profilerasyon geçirirken, bu hücrelerin bir kısmının membran parçalanması, sitoplazma küçülmesi ve nükleer fragmentasyon ile karakterize mezotelyal apoptoza sebep olduğu ve submezotelyal alana invazyon gösterdiği keşfedilmiştir(91).

Mezotelyuma penetrasyonu takiben tümör hücreleri integrin aracılıklı adhezyon mekanizmalarıyla bazal membrana tutunur. Proteazlar yardımıyla periton ve submezotelyal arteriyel kılcal damarlar arasındaki doku olan periton-kan bariyeri yıkılarak invazyona devam edilir. Tümör hücreleri, mezotelyal hücreler, çevredeki fibroblastlar, inflamatuvar hücreler ve makrofajlar hücrelerarası matrisin öğelerinin yıkımından sorumlu matris metalloproteinaz (MMP) enzimleri salgılar(92). MMP aktivasyonu ve bu

enzimlerin inhibitörleri olan TIMP(tissue inhibitor metalloproteinase) tipi enzimlerin etkisi normalde bir denge halinde olup tümör hücreleri tarafından yıkım lehine bozulmaktadır. Çeşitli MMP alttiplerinin düzeylerinin yükselmesinin KRK hastalarında daha kötü prognoz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir(93,94).

e) Proliferasyon: Malign hücrelerin büyüme için ihtiyaç duyduğu maddeler otokrin ve parakrin döngüler halinde büyüme faktörleri ve reseptörlerinin sentezi artırılarak ve sürekli bir proliferasyon durumu oluşturarak sağlanır(95). Bu süreçte hem EGFR(epidermal growth factor receptor) hem de IGF-1 (insulin like growth factor-1) rol oynar(96).

EGFR ErbB hücre yüzey reseptör ailesinde olup EGF ve TGF α gibi çeşitli ligantlar tarafından aktive edilebilir. EGFR tirozin kinaz alanlarında otofosforilasyon sonrası tümör hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu ve sağkalımını düzenleyen transdüksiyon sinyal kaskadı başlatılır(97).

IGF-1 ve liganda karşılık gelen transmembran reseptör molekülü hücre büyüme ve gelişmesinin düzenlenmesinde rol alır. Varghese ve ark.(96), karaciğer veya peritoneal metastazları olan KRK tümörlerinden aldıkları örneklerde IGF-1'in üretimi ve ekspresyonunda belirgin artış saptamıştır. Fuchs ve ark.. (98) ise IGF-1'in endojen bir antagonisti olan IGF-Bağlayıcı Protein-3'ün artmış plazma seviyelerinin birinci sıra kemoterapiye artmış yanıt ve kanser ilerlemesine kadar olan sürede uzama ile ilişkilendirmiştir.

2.2.3. Anjiyogenez

Mevcut olan kan damarlarından yeni damarların oluşması olarak tanımlanan anjiyogenez, tümör ve metastazların büyüme ve gelişmesinde büyük önem arz etmektedir. Tümör hücreleri oksijen için halihazırdaki damarları ve besin için stromal hücreleri kullanır. Ancak bu hücreler submezotelyal kapillerlerden 150 mikrondan daha uzakta yerleştğinde oksijen ve besin maddeleri periton-kan bariyerinden geçememekte ve hipoksi ilişkili apoptoza uğramaktadır(99). Bundan ötürü, tümör hücreleri tarafından üretilen anjiyogenik faktörler tarafından anjiyogenez tetiklenir. HIF-1(hypoxia induced factor-1) ve VEGF bu süreçte önemli rol oynar(100).

HIF-1 alfa ve beta alt ünitelerinden oluşan ve VEGF dahil anjiyogenezin indüksiyonunda görev alan genlerin transkripsiyonunu aktive eden heterodimerik bir proteindir. Beta alt ünitesi düzenli olarak eksprese edilirken alfa alt ünitesinin ekspresyonu hücre içerisindeki oksijen düzeylerinin düşmesi ile artar(101). Varghese ve ark., peritoneal metastazlarda HIF-1 α 'nın ekspresyonunun arttığını bildirmiştir(96). Greijer ve ark., HIF-1'in normal kolorektal mukoza, adenom ve karsinomlardaki ekspresyonunu incelemiş ve adenom ve karsinomlarda arttığını gözlemlemiştir(102).

2.3 Hyalüronik Asit ve Çapraz Bağlı Hyalüronik Asit

Polisakkaritler, proteinler, nükleik asitler gibi makromoleküller biyopolimerler olarak isimlendirilir. Hayatın temel taşları olan süreçler bu grupların etkileşimi ile gerçekleşir.

Hyalüronik asit yaklaşık 80 yıl önce keşfedilse de fonksiyonları üzerine yapılan çalışmalar hala yeni veriler elde etmektedir. Neredeyse bütün vücut dokularında mevcut olan bu madde hücre aktivitesi, bölünmesi, migrasyonu, kromatin yapısının değişimi ve gen aktarımında rol oynamaktadır.

2.3.1. Tarihi

1918 yılında Levene ve Lopez-Suarez vitroz cisim ve umbilikal kord kanından yeni bir polisakkarit izole etmiş ve buna “mukoitin-sülfürik asit” adını vermiştir(103). Bu maddenin daha sonra hyalüronik asit ve beraberinde sülfatlı glikozaminoglikanlardan oluştuğu öğrenilmiştir.

Hyalüronik asidin keşfedildiği yıllarda polisakkaritler ve bunların organik yaşamla ilişkileri bilinmekteydi. Mukustan elde edilen mukopolisakkaritler fazla miktarda suyu bağlayabildikleri için akışkan olmayan, kayganlaştırıcı özelliklere sahipti.

1934 yılında Meyer ve Palmer sığırların gözlerinden yüksek molekül ağırlıklı bir polisakkarit izole etmiş ve saydam cam liflerine benzediği için hyaloid(camsı)'dan gelen *hyalüronik asit* adını vermiştir. İzole edilen polisakkaritte üronik asitler ve amino şekerler ve pentoz olduğu tespit edilmiştir(104). Bunların artefakt olduğu daha sonraları ortaya çıkarılmış olup HA'da sülfat grupları ve pentoz olmadığı

kanıtlanmıştır. Ayrıca tekrar edebilen disakkarit kalıntısının molekül ağırlığı 397 dalton olarak tespit edilmiştir.

Sonraki yıllarda araştırmacılar çeşitli hayvan organlarından HA izole etmiş ve bütün omurgalı dokularında yer aldığı kanısına varılmıştır.

1928 yılında Duran-Reynals tavşan testislerinde bulduğu biyolojik olarak aktif bileşiği siyah mürekkep ile subkütanöz olarak enjekte ettiğinde bağ dokusunda mürekkebin yayılışının son derece hızlı olduğunu gözlemlemiştir. Bu bileşiğin doku arasındaki biyopolimerleri depolimerize eden bir enzim içerdiği tespit edilmiş olup bu enzime “Duran-Reynals yayılım faktörü” ismi verilmiştir. Günümüzde bu enzim hyalüronidaz olarak adlandırılmaktadır.

1937 yılında Kendal grup a ve c *streptococcus* kapsüllerinden hyalüronik asiti izole etmeyi başarmıştır. Günümüzde endüstriyel hyalüronik asit üretiminin en istikrarlı kaynağı bu metota dayalı üretimdir(105).

1951 yılında Ogston ve Stainer su bazlı bir çözeltide HA makromolekülünün yapısı üzerine yaptıkları çalışmayla bir çok fiziksel özelliğinin aydınlatılmasını sağlamıştır. Bu polisakkaritin derişimi arttığında viskozite ve akış gradyentlerinin arttığı ve buna birbirine komşu moleküllerin birbiri içine geçmesinin sebep olduğu kaydedilmiştir. Işık saçılması deneyleri ise irregüler sarmal yapısında olduğunu göstermiştir(106,107).

HA'nın X ışınları ile sterilizasyonu denenirken solüsyonun akışkanlığının tamamen değiştiği gözlenmiş ve bu etki gamma ışınları ve diğer iyonizan radyasyon ile elde edilmiştir. Polisakkarit radyolizi olarak adlandırılan bu süreç polimer degradasyonu ve serbest radikal oluşumu ile ilişkilidir.

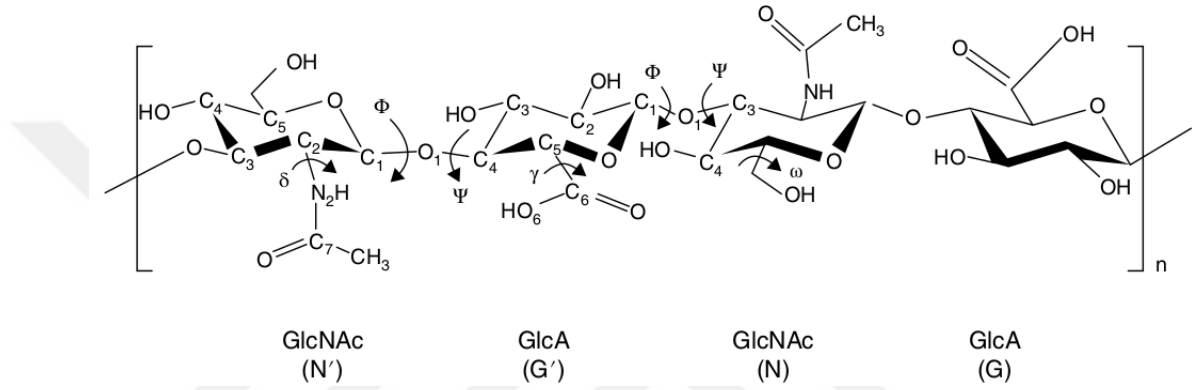
1943 yılında Gamaleya sahra hastanesinde donmaya bağlı yaraları olan askerler için “yenilenme faktörü” olarak isimlendirdiği umbilikal kord ekstraktı içeren bandajlar kullanmıştır. Bu tedavinin olumlu etkisinde umbilikal kord yapısında bulunan HA'nın payı aşıkardır. 1950'ye gelindiğinde Balazs retinal detaçman tedavisi için protez olarak HA kullanmayı araştırmıştır. 70'li yıllarda ise HA postoperatif lens yapışıklıklarında, ve artritten muzdarip yarış atlarının eklemlerinde kullanılmaya başlanmıştır.

Bu alanlardan sonra göz cerrahisinde yaygın olarak yer bulan HA, estetik tıpta enjekte edilebilen ürünlerde başı çekmiştir.

2.3.2 Yapısı, Sentezi ve Özellikleri

Polimerlerin davranışları ve özellikleri sadece birincil molekülün yapısıyla değil polimerize olan moleküllerin birbirleriyle etkileşimi ve oluşan makromolekülün üç boyutlu yapısı ile de belirlenir.

Hyalüronik asit makromolekülleri, ardı ardına sıralanmış ve kurallı olarak tekrar eden D-glukronik asit ve N-asetil-D-glukozamin kalıntılarından oluşan anyonik lineer polisakkaritlerdir. Aminoşeker D-glukronik aside B-(1-4) glikozit bağı ile, glukronik asit de aminoşekere B-(1-3)-glikozidik bağ ile bağlıdır.



Şekil -1: Hyalüronik asit monomeri

Moleküldeki hidrojen atomlarının yerleşimi nedeniyle bir kısmı hidrofobikken karboksil, hidroksil ve asetamid grupları hidrofilik özellik gösterir. Yapısındaki polar ve apolar parçalar nedeniyle organik dokudaki yerleşiminde tabaka, zincir, sarmal, çubuksu, ağısı birçok farklı konfigürasyon alabilir.

HA makromolekülleri birbiriyle esas olarak hidrojen bağları ile etkileşir. Sudaki çözeltisinde polar parçalar ile su molekülleri arasında hidrojen bağları oluşur. Bu sebepten ötürü birbirinden çok farklı fiziksel ve kimyasal özelliklere yol açan çok sayıda konfigürasyona ulaşabilir.

HA makromoleküler konfigürasyonunun en önemli belirleyicisi katyondur. HA ve tek valanslı iyonlarla tuzları suda iyi çözünür ve düşük konsantrasyonlarda(%1-4) bile viskozitesi yüksek solüsyonlar oluşturur. Yüksek konsantrasyonlarda ise viskozitesi çok yüksek psödo-jel oluşumu gözlenir.

İki veya daha fazla valanslı katyonların HA solüsyonuna eklenmesi sonrasında moleküller arası çapraz bağlar oluşur ve su oranı yüksek ve istikrarlı jel yapısı gelişir.

2.3.3 Fonksiyonları ve Hücre Metabolizmasındaki Rolü

HA'nın, farklı moleküler ağırlık fraksiyonlarında farklı fonksiyonlar gösterdiği bilinmektedir(108). 400 000 Da ve üstü ağırlıkta anjiyogenez(109), hücre proliferasyonu(110) , migrasyonunu engeller ve immünsuppresif etki göstermektedir(111,112). Polimer parçalarının boyutu 50 000 – 100 000 Da arasına düşürüldüğünde bu baskılayıcı aktivite ortadan kalkar, immünite, hücre proliferasyonu ve migrasyonu uyarılmaya başlar(108). Orta boyuttaki(25-50 disakkarit uzunluğunda) parçalar immüностimülan, güçlü anjiogenetik aktivite gösterir ve inflamatuvar süreçleri hızlandırır(113–115). Küçük boyutlu oligosakkaritler ısı-şok proteinlerinin ekspresyonunu tetikler ve antiapoptoz faktörü olarak görev alır(116). Bu kadar geniş bir yelpaze oluşturan bu sonuçlar biyopolimer konsantrasyonundaki değişiklikler, safsızlık, farklı hücre tiplerindeki HA reseptör ekspresyon farklılıkları gibi durumlarla kısmen açıklanabilse de HA'nın boyut bağımlı geniş spektrumlu aktivitesi ve HA parçalarının düzenleyici sistemler için güçlü sinyal molekülleri olarak kullanıldığı aşıkardır(108). HA'ın farklı polimer boyutlarında rol aldığı bazı süreçler Tablo-1'de verilmiştir.

HA'nın moleküler ağırlığına göre yaptığı farklı görevler evrimsel bir bakış açısından bakıldığında anlam kazanmaktadır. HA'dan zengin glikokaliks'in hücrelerarası ekstrasellüler matriksten daha önce geliştiği tahmin edilmektedir(117). Perisellüler matriksin ilk polimer karbohidrat üyelerinin sadece yapısal özellik gösterip muhtemelen bilgi içermemekteydi. Ancak evrimsel süreçler devam ederken hücrelerin aldığı hasarlarla HA polimerleri bozulmaya ve yıkıma uğramış ve yıkım ürünleri ortaya çıkmış olabilir. Yaşayan sistemler bu yıkım ürünlerini hücrelerin hasar alması sinyalleri olarak kabul edecek şekilde evrimleşmiş ve bu polimer parçalarını hayatta kalma ve yenilenme mekanizmalarına dahil etmiş olabilir. Zira bu erken dönem şeker parçacıkları genetik materyal içermese de veri yoğunluğu açısından oldukça zengindir. Günümüzdeki organik sistemlerde bu moleküller boyutlarına göre hücreler ve proteinler üzerinde oldukça spesifik bölgelerle ilişkilendirilmektedir.

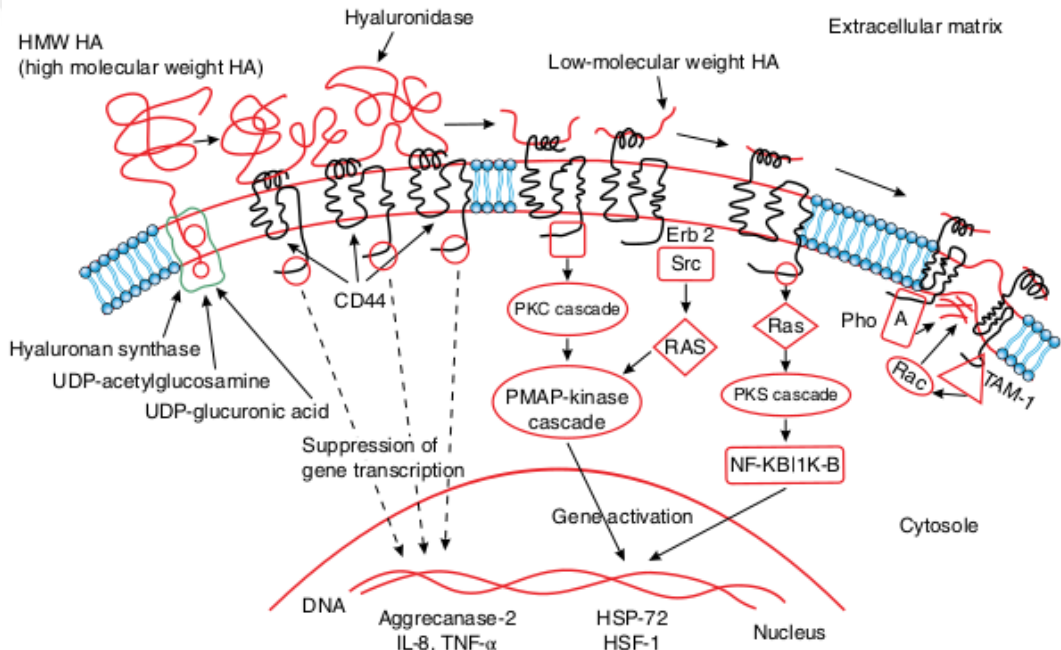
Sakkarit sayısı	Fonksiyon
Büyük molekül boyutlu HA 1000-5000	Anjiyogenez inhibisyonu (109)
	İmmünsupresyon(111)
	Fagositozun inhibisyonu(118)
	HA sentezinin inhibisyonu(119)
HA Parçaları	
~1000	İnflamatuvar sitokinlerin indüksiyonu(120,121)
	PAI-1 uyarılması(122)
	Ürokinaz uyarılması(122)
10-40	CD44 klivajının uyarılması(113)
	Tümör hücre göçünün uyarılması(113)
8-32	Anjiyogenez stimülasyonu(123)
	Tümör neovaskülarizasyonunun stimülasyonu(124)
~15	Düz kas hücre çoğalmasının baskılanması(125)
12	Endotelial hücre farklılaşması (126)
	Tümör hücrelerinde PTEN upregülasyonu(127)
10	Oosit yüzeyinde matriks HA'sının yer değiştirmesi(128)
6	HA kablo oluşumunun baskılanması(129)
	Kondrositlerde NO ve MMP indüksiyonu (130,131)
	Kondrositlerde HAS2 indüksiyonu(130)
4-6	Dendritik hücrelerde sitokin sentezinin uyarılması (121,132)
	MMP transkripsiyonu(133)
4	Heat Shock Protein 72 ekspresyonunun indüklenmesi(134)
	Apoptozis baskılanması(134)
	Kemotaksis indüksiyonu(108)
	“Heat shock factor-1” upregülasyonu(134)
	Fas upregülasyonu(135)
	Proteoglikan sülfatlanmasının baskılanması(136)

Tablo 1 . Hyalüronik Asidin Boyutlarına Göre Bazı Fonksiyonları; HA: Hyalüronik Asit, PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor-1, PTEN: Phosphatase and Tensin Homolog, NO: Nitrik Oksit, MMP: Matriks Metalloproteinaz, HAS2: Hyaluronan Sentaz-2

HA ile ilişkili reseptör ailesi “hyadherinler” olarak adlandırılır(137,138) ve omurgalı canlıların birçok dokusunda sitoplazma membranı yüzeyinde, serbest

olarak ve ekstrasellüler matrikste mevcuttur. Bu reseptörler arasında bilhassa CD44 ve RHAMM (Receptor for Hyaluronan Mediated Motility) fonksiyonları ve davranışları yönünden ilgi çekmektedir.

CD44, transmembran bir proteindir ve HA için yüksek afiniteye sahip olsa da kollajenler ve matriks metalloproteinazlar gibi başka ligandlarla da etkileşim gösterebilmektedir. CD44 alternatif uçbirleştirmeye (splicing) uğrayarak farklı alttipler halinde eksprese edilir. Her boyuttaki HA molekülü CD44 ile etkileşebilir ve bu etkileşimler sonucu birbirinden son derece farklı metabolik yanıtlar oluşabilmektedir(114,139) (Şekil - 2)



Şekil – 2 Hyalüronik asidin farklı molekül ağırlıklarında hücre membranından çekirdeğe kadar olan sinyalizasyon yolları (145)

RHAMM (HMMR[Hyalüronan İlişkili Motilite Reseptörü] veya CD168 olarak da bilinir) hücre membranının iç yüzeyinde bulunan bir proteindir. TGF-B gibi başka bir uyarı sonrasında bilinmeyen bir mekanizma ile hücre membran dış yüzeyine taşınır ve CD44 ile bağlantı kurarak HA varlığında fokal adhezyonu (140) ve hücre motilitesini etkilediği ve tirozin kinaz yolağını aktive ettiği gösterilmiştir. Ayrıca RHAMM'ın, MAPK yolağı, c-src ve rho kinaz üzerinden ERK1,2 aktivasyonunun

şiddetini ve süresini uzattığı gösterilmiştir(141). Tolg ve ark., RHAMM'ı kodlayan genin deneysel modellerdeki delesyonunun CD44 varlığında bile ERK1,2 aktivitesini hafiflettiği ve dermal fibroblastların motilitesini azalttığı gösterilmiştir(142). Yine aynı çalışmada RHAMM'ın başka bir fonksiyonunun intrasellüler veziküllerde tutulan CD44'ün hücre membranına taşınması üzerine olduğunun da altı çizilmiştir.

2.3.4. Kullanım Alanları

Eстетik Tıp: HA kozmetik biliminin dikkatini önce ağırlığının kat kat üstünde su tutabilmesiyle toplamış ve nemlendirici maske gibi uygulamalarda kendine yer bulmuştur. Son yüzyılda çapraz bağ ile kimyasal olarak stabilize edilmiş HA intradermal dolgu ve çeşitli başka biyoaktif kimyasalların teslim mekanizması olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Artroloji: Kondrositlerin glukozamin sentezi yetisinin azalması osteoartrit gelişiminde ana faktörlerden biridir. Osteoartritli hastaların sinoviyal sıvısında HA sentezi ve konantrasyonu sağlıklı bireylere göre 2-3 kat daha azdır. Bu sebeple kıkırdak yüzeylerin sürtünmesi ve hasarlanması artmaktadır. Bu sebeple sentez için gerekli prekürsörler olan glukozamin ve kondroitin sülfatın oral veya subkütan yolla verilmesi tedavide kullanılır. Bir diğer yaklaşım da yüksek molekül ağırlıklı HA'nın direkt intraartiküler enjeksiyonudur. HA uygulamasının sinoviyal sıvının özelliklerini geri kazanmasını, inflamasyonun azaltılmasını, anabolik/katabolik süreçlerin anaboli lehine tetiklenmesini sağladığını gösteren veriler mevcuttur(136,143,144).

Oftalmoloji: Göz küresinin irrigasyonunda, korneal kurulukta yüzeysel olarak veya katarakt cerrahisi sırasında ön kamaraya enjeksiyon ile HA içeren bileşikler oftalmolojide yaygın olarak kullanılmaktadır.

Onkoloji: HA'nın klinik olarak malign süreçlerde kullanımı araştırılmaktadır. Yüksek molekül ağırlıklı HA'nın tümör hücrelerinin membran reseptörlerine bağlanarak hücre göçü ve metastazını azalttığı gösterilmiştir(18,19,141,142). Ayrıca yüksek molekül ağırlıklı HA, invazyon için gerekli olan CD44 klivajını(87,113–115,139,140) ve invazyon sonrasında proliferasyon için gerekli olan anjiyogenezisi (124,145) de inhibe etmektedir. Ancak bu etkilerin büyük

moleköl ağırlığında geçerli olduğu ve hem doku hem de tümör hücreleri tarafından salınan hyaluronidaz enziminin bu etkileri azaltabileceği veya küçük molekül ağırlıklı HA oluşturarak tersine çevirebileceği akılda tutulmalıdır (Bkz Tablo-1). Yakın tarihli çalışmalar ÇBHA hidrojelinin özellikle kemoterapötik ajanlar için bir ilaç teslim mekanizması olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Hem HA spesifik reseptörleri overeksprese eden tümör tiplerinde(146,147), hem antitümör ilaçların nanojel formülasyonu ile kaplanarak hedef doku konsantrasyonunun arttırılıp verilen toplam dozun azaltılmasında(148,149), hem de ilaç direncini azaltacak ek ajanların kemoterapötiklerle beraber taşınmasında(150–152) kullanılabileceği bildirilmiştir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma öncesinde hem Akdeniz Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu(15.06.2020 tarihli 128 no'lu karar) hem de Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu(08.07.2020 tarih 487 no'lu karar) onayı alınmıştır. Ayrıca çalışmada kullanılan malzemelerin bir kısmı Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi(BAP) yardımıyla temin edilmiştir(TTU-2021-5548).

3.1.Kullanılan Cihazlar, Model ve Numaralar

Santrifüj cihazı – Nüve NF 400 Masaüstü Santrifüj Cihazı, NÜVE Sanayi Malzemeleri İmalat ve Tic A.Ş., Ankara/Türkiye

CO₂ İnkübatör – Heracell 150 CO₂ İnkübatör, Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts/A.B.D.

İnvert Mikroskop – Olympus CKX41 İnvert Mikroskop, Olympus Corporation, Tokyo/Japonya

Biyogüvenlik Kabini – Esco Airstream® Class II Biyogüvenlik Kabini, Esco Life Sciences, Singapur/Singapur

Su Banyosu – Memmert WNB10 Su Banyosu, Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach/Almanya

3.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

Hücre kültür flaskları T25 ve T75, Filtre kapaklı – ISOLAB GmbH / Almanya

Serolojik pipet 5 mL – SPL Life Sciences, Gyeonggi / Güney Kore

Serolojik pipet 10 mL – SPL Life Sciences, Gyeonggi / Güney Kore

Serolojik pipet 50 mL – SPL Life Sciences, Gyeonggi / Güney Kore

15 mL steril falkon tüpler - SPL Life Sciences, Gyeonggi / Güney Kore

50 mL steril falkon tüpler - SPL Life Sciences, Gyeonggi / Güney Kore

8 mikrometre porlu polikarbonat 24 mm Transwell ® membran plakası – Corning Incorporated, New York / ABD

3.3. Kullanılan Kimyasallar, Enzimler ve Stok Kodları

Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM) (4.5 g/l glikozlu) – BI01-055-1A – Biological Industries, Beit-Haemek/İsrail

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(PBS), without Calcium and Magnesium, 500 mL – BI02-023-1A - Biological Industries, Beit-Haemek/İsrail

Foetal Bovine Serum (FBS) S. American Grade – BI04-007-1A - Biological Industries, Beit-Haemek / İsrail

Penisilin-Streptomisin Solüsyonu(PS) – BI03-031-1B - Biological Industries, Beit-Haemek / İsrail

Tripsin EDTA Solüsyonu C(%0.05), EDTA (%0.02) – BI03-053-1B - Biological Industries, Beit-Haemek / İsrail

Çapraz Bağlı Hyalüronik Asit Jeli – BioRegen Biomedical (Changzhou) Co.,Ltd., Jiangsu, Çin Halk Cumhuriyeti

MaxGel™ Hücre dışı Matriks Jeli – E0282-1ML - Sigma-Aldrich, Missouri / A.B.D.

Paraformaldehyde, CAS 30525-89-4 - Merck KGaA, Darmstadt / Almanya

Giemsa solüsyonu – WPSGGS – Net Kimyasal Boyaları Üretimi Sanayi Tic. Ltd. Şti. - Ankara / Türkiye

3.4. Denekler

6 haftalık 18 adet Balb/c kobay fare (9 dişi, 9 erkek) Kobay D.H.L. A.Ş.'den (Ankara, Türkiye) temin edildi.

3.5. Hücre Hattı

T.C. Şap Enstitüsü Müdürlüğü bünyesinde bulunan Hücre Bankası ve HÜKÜK Laboratuvarı'ndan “HT29 / An1” adlı grade II insan kolon adenokarsinomu hücreleri kriyovial içerisinde kuru buz transportunda temin edildi. Hücre kültürü ile ilgili işlemler için HÜKÜK tarafından hücrelerle beraber verilen yönergeler takip edildi.

3.6. Yöntem

3.6.1. Solüsyonların Hazırlanması

Kültür Vasatı: Biyogüvenlik kabini içerisinde hazır temin edilen 500 mL DMEM içerisine 10 mL FBS solüsyonu ve 1 mL PS solüsyonu eklenerek rutin kullanılan kültür vasatı hazırlandı.

Paraformaldehit Çözeltisi: 4 gr toz %4 derişim olacak şekilde PFA 100 mL PBS içerisine eklendi. Biyogüvenlik kabininde, çözelti karıştırılarak ~+70°C 'ye ısıtıldı. PFA solüsyonu soğutuldu, filtrelendi ve alikotlanarak -20 °C 'de saklandı.

3.6.2. HT-29 Hücre Hattının Revivifiye Edilmesi

Kriyoprezerve halde bulunan HT-29 kriyovialı 37 °C su banyosuna koyuldu ve 1 dakika boyunca içerisinde az miktarda buz kalana kadar nazıkçe döndürülerek çözüldü. Dış%70 alkol ile silinerek biyogüvenlik kabinine alındı. İçerisinde önceden 37 °C 'ye ısıtılmış kültür vasatı bulunan santrifüj tüpüne aktarıldı. 200 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Pipetajdan sonra hücre sayımı yapıldı ve içerisinde kültür vasatı bulunan T75 flaska ekildi ve 37 C'de %5 CO₂ ortamda inkübasyona alındı.

3.6.3. HT-29 Hücre Hattının Rutin Pasajı

Günlük kontrol edilen besiyerlerinde pasaj zamanlaması kültür ortamı %90 konfluense ulaşmaya yakın veya pH değişimi olduğunda hücreler logaritmik fazdan çıkmadan hücre hattının özelliklerine uygun usülde gerçekleştirildi. Öncelikle kültür şişesinden kültür vasatı uzaklaştırıldı ve PBS kullanılarak kültür flaskının yüzeyi adhere hücreler bozulmayacak şekilde nazıkçe yıkandı ve ardından yıkama solüsyonu uzaklaştırıldı. Daha önceden ısıtılmış Tripsin-EDTA solüsyonu T75 flask için 4 mL olacak şekilde eklendi. 5 dakika boyunca flask inkübe edildi ve mikroskop altında tam detaçman olduğu teyit edildi. Detaçmanın gerçekleşmediği görüldüğü durumlarda 2 dakika daha inkübasyona devam edildi. 8 mL kültür vasatı eklenerek tripsin inhibe edildi. Hücreler 15 mL'lik falkon tüpe alındı ve 5 dakika boyunca 200 g'de santrifüj edildi. Santrifüjü takiben süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelleti kültür vasatıyla tekrar süspanse edildi.

Hücreler sayıldı ve gerekli hücre miktarına göre 1:3 veya 1:10 seyreltme ile içine önceden kültür vasatı konulmuş yeni flasklara alındı ve flasklar inkübatöre yeniden yerleştirildi.

3.6.4. Hücre Migrasyon ve İnvazyon Deneyi

HT-29 hücre hattından elde edilen hücrelerin farklı konsantrasyondaki ÇBHA çözeltilerinde migrasyonunun ölçülmesi için ilk olarak Boyden'in tanımladığı(153); Pijuan ve ark'ın tarif ettiği metodolojiye uygun olarak(154) aşağıda tarif edilen şekilde yapıldı.

Kültürden alınan ve tripsinize edilen 5×10^5 hücre iki farklı konsantrasyonlardaki (mL başına 500 ve 1000 μg) ÇBHA jel içeren ve FBS içermeyen DMEM ortamında tekrar suspanse edildi. Bu çözeltilerden imalatçı firmanın belirlediği hacimde 1,5 mL solüsyon Transwell plakanın üst odacığına konuldu ve alt odacığına kemoatraktant olarak %10 FBS içeren DMEM çözeltisi konuldu. Migrasyon için 24 saat 37 °C %5 CO₂ ortamında inkübe edildikten sonra alt ve üst kuyucuklardaki çözelti aspire edildi. Bunu takiben %4 PFA çözeltisi hem alt hem de üst kuyucuğa eklendi ve 15 dk süreyle oda sıcaklığında bekletilerek hücrelerin fiksasyonu sağlandı. Plakaların hem alt hem de üst kısımları nazikçe PBS ile 2'şer defa yıkandı ve plakalar yerlerine yerleştirildi. Plakaların Giemsa boya ile muamelesinden sonra PBS yıkaması tekrarlandı ve mikroskop altında önce görünen bütün hücreler hem de pamuklu çubuk ile plakaların üstü temizlendikten sonra migrate olan hücreler fotoğrafları çekilerek sayıldı. Her plakadan plaka başına 6 adet alandan görüntü alındı ve manuel sayım yapılarak plakaların ortalaması alındı ve gruplar arasında karşılaştırıldı.

Hücre invazyon deneyinde ise migrasyon deneyi için kullanılan metodolojinin aynısı uygulandı. Ancak yukarıda bahsedilen deney fazından önce Transwell plakaları soğutuldu ve membranlarına FBS içermeyen DMEM ile +4 °C ortamda 1:3 oranında karıştırılarak hazırlanan MaxGel™ ekstrasellüler matriks jeli solüsyonu ile muamele edildi ve 2 saat boyunca 37 °C'de inkübe edilerek jel formunun oluşması sağlandı.

3.6.5. Peritoneal İmplantasyon Deneyi

Peritoneal implantasyon için Okazaki ve ark.'ın intraperitoneal xenograft tümör metodu esas alındı (155). Kültür ortamında logaritmik büyüme fazındaki hücreler tripsinize edildi ve sayıldı. Sayma lamında metilen mavisi de eklenerek hücrelerin viabilitesinin %90 üstünde olduğu görüldü. Mililitre başına en az 5×10^6 hücre enjektörlere alındı ve 21G enjektör ucu takılarak, uygun saha temizliğini takiben ve fareler 30 derece baş aşağı tutularak, her fareye 200 μ L intraperitoneal yolla enjekte edildi. 2 saat beklendikten sonra deney grubundaki farelere her fareye 200 μ L PBS içerisinde çözülmüş olarak 200 μ g ÇBHA hidrojel intraperitoneal olarak enjekte edildi. Aralarında 7 gün olacak şekilde toplam 4 defa daha deney grubunda ÇBHA enjeksiyonu yinelenildi. 5. haftada fareler tartıldı ve mevzuata uygun olarak intraperitoneal ketamin verilmesini takiben servikal dislokasyon uygulanarak ötanazi gerçekleştirildi. Laparotomi yapıldı ve 4x binoküler ışıklı lens altında bütün peritoneal alanlar değerlendirildi, ve implantların yeri not edilerek çıkarıldı. Diyafragma açıldı ve plevra da aynı şekilde değerlendirildi. Akciğer ve karaciğer çıkarıldı ve dilimlenerek makroskopik metastaz açısından değerlendirildi. İmplantlar hassas terazide tartıldı ve parafin fiksasyon için patoloji laboratuvarına aktarıldı.

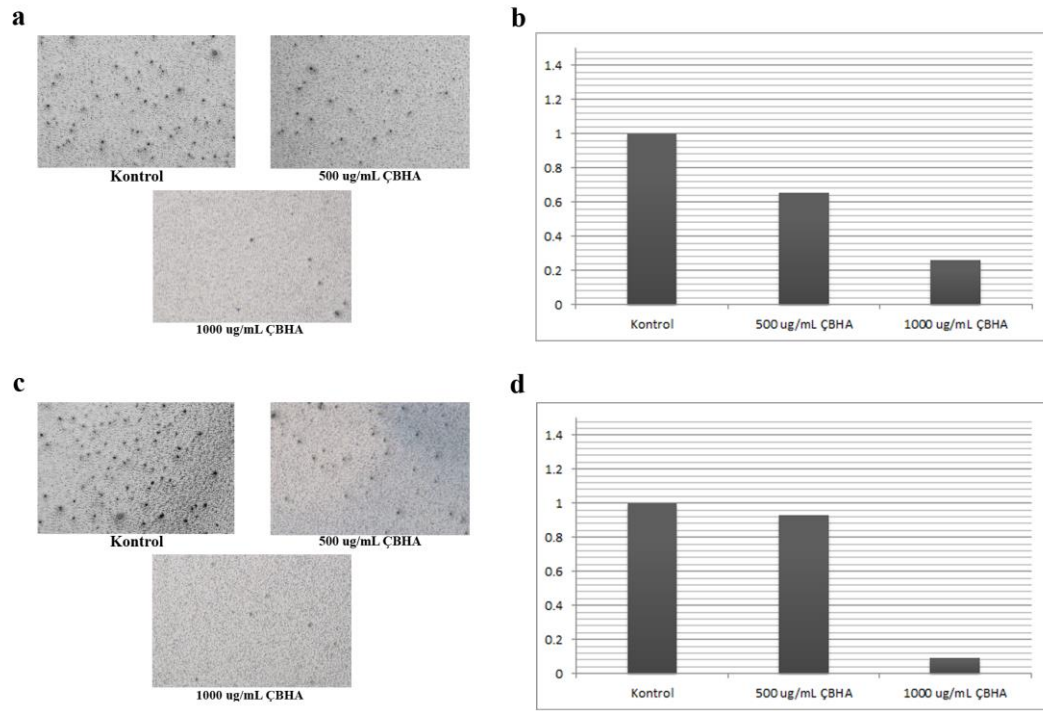
4. SONUÇLAR

4.1. Migrasyon Deneyi

Transwell® plaka ile yapılan migrasyon deneyinde 500 ug/mL ve 1000 ug/mL konsantrasyonlarında ÇBHA'nın, kontrol grubuna göre HT-29 migrasyonunu belirgin olarak engellediği görüldü ($p=0.000096$) (Şekil 3 – a, b).

4.2. İnvazyon Deneyi

ECM Gel ® ile muamele edilmiş Transwell® plaka ile yapılan invazyon deneyinde 500 ug/mL ve 1000 ug/mL konsantrasyonlarında ÇBHA'nın, kontrol grubuna göre HT-29 invazyonunu belirgin olarak engellediği görüldü ($p=0.000101$) (Şekil 3-c, d).



Şekil – 3: ÇBHA, HT-29 kolon kanser hücrelerinin in vitro migrasyon ve invazyonunu engellemektedir. **a:** HT-29 hücrelerinin migrasyon aktivitesini temsil eden fotomikrograflar; **b:** HT-29 hücrelerinin çeşitli ÇBHA konsantrasyonlarda rölatif migrasyon oranları ($p=0.000096$); **c:** HT-29 hücrelerinin invazyon aktivitesini temsil eden fotomikrograflar; **d:** HT-29 hücrelerinin çeşitli ÇBHA konsantrasyonlarda rölatif invazyon oranları ($p=0.000101$) | ÇBHA: Çapraz bağlı hyalüronik asit

4.3. İmplantasyon Deneyi

Fareler sağlam olarak teslim alındı ve deney süresinin uzunluğu göz önünde bulundurularak cinsiyet ve deney grubuna göre ayrı kafeslerde tutuldu. Enjeksiyonları takiben hiçbir farede yanlış enjeksiyon hedefini düşündürecek komplikasyon gelişmedi. Kontrol grubundaki erkek fare kafesinde üstünlük hiyerarşisini sağlamak üzere fareler arasında kavga geliştiği görüldü ve 4 erkek farenin her biri ayrı kafeslere alındı. Deney süresince deneklerin hiçbirinde davranış değişikliği gelişmedi.

İlk enjeksiyondan sonraki 5. haftada fareler tartıldı. Tek yönlü ANOVA analizinde gruplar arasında ağırlıklar yönünden farklılık görülmedi ($p=0.4304$).

Tartmayı takiben yapılan ötanazi ve nekropside kontrol grubundaki 9 fareden 7'sinde(%77.78) toplam 12 adet peritoneal tümör implantları tespit edildi (Şekil 4). Deney grubunda ise peritoneal implant görülmedi. Organlar çıkarılıp dilimlendiğinde deneklerin hiçbirinde makroskopik karaciğer veya akciğer metastazları izlenmedi.

İmplantların ortalama ağırlığı 1.75 mg olarak tartıldı(SS=0.97 mg; min-max=0.66-4.19).



Şekil – 4: Deneklerden çıkarılan tümör implantları (gruplandırılmış)

5. TARTIŞMA

KRK'lar dünyada en çok görülen kanser türleri arasında üçüncü sırada yer almaktadır ve bu hastalık için 5 yıllık sağkalım oranları %60'dan azdır(2). KRK tedavisinde güncel olarak cerrahi, adjuvan/neoadjuvan sistemik kemoterapi ve radyoterapi kullanılmaktadır(3). KRK tanısı alan hastaların %50-60'ında başka bölgelerde metastaz gelişir(156,157). Metastatik KRK'lı hastaların %17'sinde peritoneal karsinomatosis görülmektedir. Peritoneal metastazları olan hastalarda hastaliksız sağkalım ve genel sağkalım oranları metastaz olmayan hastalara göre belirgin olarak düşüktür(4). Peritoneal hastalığı olan hastalarda tedavi amacı palyatiftir ve esas olarak sistemik tedaviyi kapsar.

Peritoneal metastazlar kendiliğinden oluşabileceği gibi küratif cerrahi sırasında tümör hücrelerinin dökülmesi ile de gelişebilir. Özellikle serozal invazyonu olan tümörlerde bu risk daha çok öne çıkmaktadır(158). Cerrahi sırasında "no-touch" tekniğinden uzaklaşma, peritümöral perforasyon, obstrüksiyon gibi faktörler bu riski daha da arttırabilmektedir.

HA, biyouyumlu bir bariyer olarak bu noktada önem arz etmektedir. Cerrahi alanlarda ilk olarak intrauterin adhezyonların engellenmesinde kullanılmaya başlanmıştır(159). Bunu takiben diğer jinekolojik cerrahilerde de kullanılması araştırılmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir (160).

Endojen HA ve malign süreçlerin ilişkisine daha önceki yıllarda yapılan çalışmalarla işaret edilse de, Toole (161,162)eksternal HA uygulanmasıyla tümör hücrelerinin yapışma, büyüme ve invazifliğinin arttırılabileceğini öne sürmüştür.

Sikkink ve ark.(163) 2004 yılında, HA bazlı anti-adhezyon membranı kullanarak fare ve sıçanlarda oluşturdukları kolon kanser(sırasıyla 26-B ve CC-531 hücre hatları) ve peritoneal hasar modelinde HA membranının kullanımının daha az adhezyon ile ilişkili olduğunu bildirmiş ancak tümöral implantların gelişimini etkilemediğini belirtmiştir.

Haverlag ve ark..(164), WAG sıçanlarında CC-531 sıçan kolon kanser hücre hattı kullanarak oluşturdukları deney modelinde %0.4 HA içeren solüsyonun tümör hücrelerinin *in vitro* adhezyonunu kısmen engellediğini ancak *in vivo* deneyde bu etkinin görülmediğini bildirmiştir. Bu iki çalışmanın çıkarımlarının HA membran

ve solüsyonunun ÇBHA'nın fiziksel özelliklerine sahip olmaması ve çapraz bağlı olmayan HA polimerinin *in vivo* hızla yıkıma uğramasına bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Ancak solüsyon ve membranın üreticisinin yasal sorunlar yaşaması (165) ve ABD federal hükümetine tazminat ödeyerek bu ürünleri pazardan çekmesi bu varsayımın doğrulanmasını şimdilik imkansız kılmaktadır.

Literatürde ÇBHA'nın *in vivo* degradasyon profili için kesin veri sağlayan bir yayın olmasa da hayvan modellerinde dokulara yapılan implantları karşılaştıran Piacquadio ve ark.(166) ÇBHA'nın intradermal enjeksiyonunu takiben 52 haftaya kadar dokuda tespit edilebildiğini belirtmiştir. Ancak dermisteki metabolik süreçlerin intraperitoneal benzer turnover reaksiyonlarından daha farklı hızda olabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır.

Pang ve ark.(19), hayvan modelinde yaptıkları çalışmada ÇBHA'nın ovaryan kanser hücrelerinin peritoneal metastazlarının büyüme ve gelişimini engellediğini göstermiştir. Lan ve ark.(18) ise, gastrik ve hepatik kanser hücre hatlarının kullanıldığı hayvan modeli çalışmalarında intraperitoneal ÇBHA uygulamasının CD44 ve RHAMM inhibitörleri varlığında bile bu hücrelerin peritoneal implantasyonunu ve gelişimini engellediğini göstermiştir.

Çalışmamızda, *in vitro* modelde ÇBHA jelinin eklenmesiyle HT-29 kolon kanseri hücrelerinin migrasyon ve invazyon yetisinin belirgin olarak inhibe olduğu görülmüştür. Büyük molekül ağırlıklı HA polimerlerinin hücre motilitesini ve büyümesini reseptör ilişkili yollar üzerinden inhibe ettiği bilinmektedir(110). Ayrıca ÇBHA hidrojeli elektrik yükü ve çok sayıda ligandın bağlanabileceği moleküler yapısı sebebiyle ortamdaki hücrelerin hareketlerini ve birbirleriyle etkileşimlerini fiziksel olarak da engellemektedir. Deneyimizde bu inhibisyon, özellikle invazyon üzerinde ve ÇBHA konsantrasyonu 1000 µg/mL derişiminin üzerine çıktığında çok belirgin olarak ortaya çıkmaktadır. Rölatif migrasyon, 500 µg/mL derişimde neredeyse yarıya, 1000 µg/mL'de ise kontrolün beşte birine inmektedir. Rölatif invazyon ise 500 µg/mL ÇBHA varlığında önemli ölçüde değişmezken, bu konsantrasyon 1000 µg/mL'ye çıktığında 10 kat azalmaktadır (migrasyon için $p=0.000096$, invazyon için $p=0.000101$).

Balb/c farelerde xenograft tümör modelinin kullanıldığı *in vivo* deneyimizde ise ÇBHA'nın tümör hücrelerinin intraperitoneal uygulanmasından 2 saat sonra intraperitoneal verilmesinin ve 1 hafta arayla ÇBHA enjeksiyonunun yenilenmesinin peritoneal metastatik kitlelerin oluşmasına engel olduğu görülmüştür ($p < 0.000001$). Bu durum hem deney öncesi hipotezimiz ile hem de hayvan modelinde ÇBHA kullanan diğer araştırmacıların sonuçları ile büyük oranda uyuşmaktadır. Ancak diğer deneylerin aksine deney grubunda ve kontrol grubundaki 2 denekte nekropside tümör implantlarına hiç rastlanmaması xenograftlara karşı belirgin bir konak immün yanıtının gelişmiş olabileceğini düşündürmektedir. Eğer bu immün yanıt oluşmamış olsaydı ÇBHA'ya atfettiğimiz inhibisyon etkisinin, daha hafif ancak yine de belirgin olarak görülebileceği kanaatindeyiz.

Çalışmamızdaki deney modelleri denekler ve patolojik durumla alakalı birçok değişkeni kontrol altına almamızı sağlasa da bütçe kısıtlılığundan ötürü ÇBHA'nın deneydeki etki mekanizmasını açıklayacak reseptör etkileşimleri değerlendirilememiştir. Özellikle hayvan deney modelinde tümör hücreleri üzerindeki CD44 ve RHAMM reseptörlerine yönelik monoklonal antikolar ile muamele edilmesinin, ÇBHA'nın esas inhibisyon etkisinin reseptör üzerinden mi yoksa makromolekülün fizikokimyasal özellikleri üzerinden mi gerçekleştiğinin ortaya çıkarılmasına yardımcı olabileceğini düşünmekteyiz.

Deneyde kullanılan ÇBHA hidrojelci tarafımızca sentezlenmemiş olup, ticari olarak satın alınmıştır. Literatürdeki bu ürünün mevcut dökümantasyonunda yer almayan müstahzardaki ek katkı maddelerinin varlığı, molekülün çapraz-bağlanma oranı ve polimerin boyutu için üretici firmayla iletişime geçilmiş ve müstahzarda katkı maddesinin olmadığı, çapraz bağlanma oranının ~%5 olduğu ve molekül boyutunun 1,5 MDa olarak kabul edilebileceği belirtilmiştir. Bu sebepten ürünün özellikleri, içerisindeki katkı maddeleri konusunda üretici firmanın beyanı esas alınmıştır.

6. KAYNAKLAR

1. World Health Organization International Agency for Research on Cancer (IARC). GLOBOCAN 2020: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2020.; 2020 [İnternet]. [a.yer 03 Ocak 2021]. Erişim adresi: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/8-Colon-fact-sheet.pdf>
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, vd. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136(5):E359-86.
3. Benson AB, Venook AP, Al-Hawary MM, Arain MA, Chen Y-J, Ciombor KK, vd. Colon Cancer, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Cancer Netw J Natl Compr Canc Netw*. 2021;19(3):329-59.
4. Franko J, Shi Q, Meyers JP, Maughan TS, Adams RA, Seymour MT, vd. Prognosis of patients with peritoneal metastatic colorectal cancer given systemic therapy: an analysis of individual patient data from prospective randomised trials from the Analysis and Research in Cancers of the Digestive System (ARCAD) database. *Lancet Oncol*. Aralık 2016;17(12):1709-19.
5. Klaver YLB, Simkens LHJ, Lemmens VEPP, Koopman M, Teerenstra S, Bleichrodt RP, vd. Outcomes of colorectal cancer patients with peritoneal carcinomatosis treated with chemotherapy with and without targeted therapy. *Eur J Surg Oncol EJSO*. 01 Temmuz 2012;38(7):617-23.
6. Lemmens VE, Klaver YL, Verwaal VJ, Rutten HJ, Coebergh JWW, Hingh IH de. Predictors and survival of synchronous peritoneal carcinomatosis of colorectal origin: A population-based study. *Int J Cancer*. 2011;128(11):2717-25.
7. Kerscher AG, Chua TC, Gasser M, Maeder U, Kunzmann V, Isbert C, vd. Impact of peritoneal carcinomatosis in the disease history of colorectal cancer management: a longitudinal experience of 2406 patients over two decades. *Br J Cancer*. Nisan 2013;108(7):1432-9.
8. Honoré C, Goéré D, Souadka A, Dumont F, Elias D. Definition of Patients Presenting a High Risk of Developing Peritoneal Carcinomatosis After Curative Surgery for Colorectal Cancer: A Systematic Review. *Ann Surg Oncol*. 01 Ocak 2013;20(1):183-92.

9. Nagata H, Ishihara S, Hata K, Muro K, Kaneko M, Yasuda K, vd. Survival and Prognostic Factors for Metachronous Peritoneal Metastasis in Patients with Colon Cancer. *Ann Surg Oncol*. 01 Mayıs 2017;24(5):1269-80.
10. Enblad M, Graf W, Birgisson H. Risk factors for appendiceal and colorectal peritoneal metastases. *Eur J Surg Oncol*. 01 Temmuz 2018;44(7):997-1005.
11. van Gestel YRBM, Thomassen I, Lemmens VEPP, Pruijt JFM, van Herk-Sukel MPP, Rutten HJT, vd. Metachronous peritoneal carcinomatosis after curative treatment of colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol EJSO*. 01 Ağustos 2014;40(8):963-9.
12. Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, vd., editörler. *AJCC Cancer Staging Manual* [Internet]. 8. bs. Springer International Publishing; 2017 [a.yer 13 Ocak 2021]. Erişim adresi: <https://www.springer.com/gp/book/9783319406176>
13. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero A, Van Krieken JH, Aderka D, vd. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 01 Ağustos 2016;27(8):1386-422.
14. Glehen O, Osinsky D, Beaujard AC, Gilly FN. Natural history of peritoneal carcinomatosis from nongynecologic malignancies. *Surg Oncol Clin N Am*. 01 Temmuz 2003;12(3):729-39.
15. Flood M, Narasimhan V, Waters P, Ramsay R, Michael M, Warriar S, vd. Survival after cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for colorectal peritoneal metastases: A systematic review and discussion of latest controversies. *Surg J R Coll Surg Edinb Irel*. 03 Ekim 2020;
16. Selyanin MA, Boykov PYa, Khabarov VN, Polyak F. *Hyaluronic Acid: Preparation, Properties, Application in Biology and Medicine* [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2015 [a.yer 13 Ocak 2021]. Erişim adresi: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781118695920>
17. Delpech B, Girard N, Bertrand P, Courel MN, Chauzy C, Delpech A. Hyaluronan: fundamental principles and applications in cancer. *J Intern Med*. Temmuz 1997;242(1):41-8.

18. Lan T, Pang J, Wu Y, Zhu M, Yao X, Wu M, vd. Cross-linked hyaluronic acid gel inhibits metastasis and growth of gastric and hepatic cancer cells: in vitro and in vivo studies. *Oncotarget*. 31 Ağustos 2016;7(40):65418-28.
19. Pang J, Jiang P, Wang Y, Jiang L, Qian H, Tao Y, vd. Cross-linked hyaluronan gel inhibits the growth and metastasis of ovarian carcinoma. *J Ovarian Res*. 06 Mart 2018;11(1):22.
20. Lee SY, Kang MS, Jeong WY, Han D-W, Kim KS. Hyaluronic Acid-Based Theranostic Nanomedicines for Targeted Cancer Therapy. *Cancers*. 10 Nisan 2020;12(4).
21. Yang C, Li C, Zhang P, Wu W, Jiang X. Redox Responsive Hyaluronic Acid Nanogels for Treating RHAMM (CD168) Over-expressive Cancer, both Primary and Metastatic Tumors. *Theranostics*. 2017;7(6):1719-34.
22. Rao NV, Yoon HY, Han HS, Ko H, Son S, Lee M, vd. Recent developments in hyaluronic acid-based nanomedicine for targeted cancer treatment. *Expert Opin Drug Deliv*. 2016;13(2):239-52.
23. Kim K, Choi H, Choi ES, Park M-H, Ryu J-H. Hyaluronic Acid-Coated Nanomedicine for Targeted Cancer Therapy. *Pharmaceutics*. 30 Haziran 2019;11(7).
24. Global Cancer Observatory: Turkey Cancer Fact Sheet. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. [İnternet]. [a.yer 17 Ocak 2021]. Erişim adresi: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/792-turkey-fact-sheets.pdf>
25. Winawer SJ, Fletcher RH, Miller L, Godlee F, Stolar MH, Mulrow CD, vd. Colorectal cancer screening: clinical guidelines and rationale. *Gastroenterology*. Şubat 1997;112(2):594-642.
26. Qaseem A, Crandall CJ, Mustafa RA, Hicks LA, Wilt TJ, Clinical Guidelines Committee of the American College of Physicians. Screening for Colorectal Cancer in Asymptomatic Average-Risk Adults: A Guidance Statement From the American College of Physicians. *Ann Intern Med*. 05 Kasım 2019;171(9):643-54.
27. Kolorektal Kanser Tarama Programı Ulusal Standartları [İnternet]. [a.yer 17 Ocak 2021]. Erişim adresi: <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-tarama->

standartlari/listesi/kolorektal-kanser-tarama-program%C4%B1-ulusal-standartlar%C4%B1.html

28. van Hees F, Zauber AG, Klabunde CN, Goede SL, Lansdorp-Vogelaar I, van Ballegooijen M. The appropriateness of more intensive colonoscopy screening than recommended in Medicare beneficiaries: a modeling study. *JAMA Intern Med.* Ekim 2014;174(10):1568-76.
29. Causada-Calo N, Bishay K, Albashir S, Al Mazroui A, Armstrong D. Association Between Age and Complications After Outpatient Colonoscopy. *JAMA Netw Open.* 01 Haziran 2020;3(6):e208958.
30. Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, Raimondi S, Lowenfels AB, Maisonneuve P. Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *JAMA.* 17 Aralık 2008;300(23):2765-78.
31. Jiang Y, Ben Q, Shen H, Lu W, Zhang Y, Zhu J. Diabetes mellitus and incidence and mortality of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Eur J Epidemiol.* Kasım 2011;26(11):863-76.
32. Yuhara H, Steinmaus C, Cohen SE, Corley DA, Tei Y, Buffler PA. Is diabetes mellitus an independent risk factor for colon cancer and rectal cancer? *Am J Gastroenterol.* Kasım 2011;106(11):1911-21; quiz 1922.
33. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med.* 24 Nisan 2003;348(17):1625-38.
34. Figueiredo JC, Hsu L, Hutter CM, Lin Y, Campbell PT, Baron JA, vd. Genome-wide diet-gene interaction analyses for risk of colorectal cancer. *PLoS Genet.* Nisan 2014;10(4):e1004228.
35. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut.* Nisan 2017;66(4):683-91.
36. Burt RW, DiSario JA, Cannon-Albright L. Genetics of colon cancer: impact of inheritance on colon cancer risk. *Annu Rev Med.* 1995;46:371-9.
37. Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, vd. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary

nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology*. Mayıs 1993;104(5):1535-49.

38. Taylor DP, Stoddard GJ, Burt RW, Williams MS, Mitchell JA, Haug PJ, vd. How well does family history predict who will get colorectal cancer? Implications for cancer screening and counseling. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. Mayıs 2011;13(5):385-91.

39. Tuohy TMF, Rowe KG, Mineau GP, Pimentel R, Burt RW, Samadder NJ. Risk of colorectal cancer and adenomas in the families of patients with adenomas: a population-based study in Utah. *Cancer*. 01 Ocak 2014;120(1):35-42.

40. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*. Nisan 2001;48(4):526-35.

41. Ekbom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med*. 01 Kasım 1990;323(18):1228-33.

42. Thanikachalam K, Khan G. Colorectal Cancer and Nutrition. *Nutrients*. 14 Ocak 2019;11(1).

43. Woodhouse C. Guidelines for monitoring of patients with ureterosigmoidostomy. *Gut*. Ekim 2002;51(Suppl 5):v15-6.

44. Baxter NN, Tepper JE, Durham SB, Rothenberger DA, Virnig BA. Increased risk of rectal cancer after prostate radiation: a population-based study. *Gastroenterology*. Nisan 2005;128(4):819-24.

45. Delhougne B, Deneux C, Abs R, Chanson P, Fierens H, Laurent-Puig P, vd. The prevalence of colonic polyps in acromegaly: a colonoscopic and pathological study in 103 patients. *J Clin Endocrinol Metab*. Kasım 1995;80(11):3223-6.

46. Carethers JM, Jung BH. Genetics and Genetic Biomarkers in Sporadic Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. Ekim 2015;149(5):1177-1190.e3.

47. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, vd. Genetic Alterations during Colorectal-Tumor Development. *N Engl J Med*. 01 Eylül 1988;319(9):525-32.

48. Shaukat A, Kaltenbach T, Dominitz JA, Robertson DJ, Anderson JC, Cruise M, vd. Endoscopic Recognition and Management Strategies for Malignant Colorectal

Polyps: Recommendations of the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. Kasım 2020;159(5):1916-1934.e2.

49. Kanth P, Grimmer J, Champine M, Burt R, Samadder JN. Hereditary Colorectal Polyposis and Cancer Syndromes: A Primer on Diagnosis and Management. *Am J Gastroenterol*. Ekim 2017;112(10):1509-25.

50. Kennedy RD, Potter DD, Moir CR, El-Youssef M. The natural history of familial adenomatous polyposis syndrome: A 24year review of a single center experience in screening, diagnosis, and outcomes. *J Pediatr Surg*. Ocak 2014;49(1):82-6.

51. Carmignani CP, Sugarbaker TA, Bromley CM, Sugarbaker PH. Intraperitoneal cancer dissemination: mechanisms of the patterns of spread. *Cancer Metastasis Rev*. Aralık 2003;22(4):465-72.

52. Zhang C, Zhang L, Xu T, Xue R, Yu L, Zhu Y, vd. Mapping the spreading routes of lymphatic metastases in human colorectal cancer. *Nat Commun*. 24 Nisan 2020;11(1):1993.

53. Pretzsch E, Bösch F, Neumann J, Ganschow P, Bazhin A, Guba M, vd. Mechanisms of Metastasis in Colorectal Cancer and Metastatic Organotropism: Hematogenous versus Peritoneal Spread. *J Oncol*. 2019;2019:7407190.

54. Simmer F, van der Linden RLA, Ligtenberg MJL, Ylstra B, van der Post RS, Nagtegaal ID, vd. Multifocal Colorectal Cancer-Do Intraluminal Metastases Occur? *Gastroenterology*. Nisan 2021;160(5):1853-5.

55. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershengwald JE, Brookland RK, vd. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(2):93-9.

56. Matsuda T, Yamashita K, Hasegawa H, Oshikiri T, Hosono M, Higashino N, vd. Recent updates in the surgical treatment of colorectal cancer. *Ann Gastroenterol Surg*. Mart 2018;2(2):129-36.

57. Rocha R, Marinho R, Aparício D, Fragoso M, Sousa M, Gomes A, vd. Impact of bowel resection margins in node negative colon cancer. *SpringerPlus*. 11 Kasım 2016;5(1):1959.

58. Lombardi L, Gebbia V, Silvestris N, Testa A, Colucci G, Maiello E. Adjuvant Therapy in Colon Cancer. *Oncology*. 2009;77(1):50-6.
59. Dubé S, Heyen F, Jenicek M. Adjuvant chemotherapy in colorectal carcinoma: results of a meta-analysis. *Dis Colon Rectum*. Ocak 1997;40(1):35-41.
60. Gray R. 5'fluorouracil (FU) and folinic acid (FA) in either the weekly "Roswell Park" or the 4-weekly "Mayo" regimen should be standard chemotherapy for colon cancer. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. Eylül 2003;39(14):2110.
61. Jonker DJ, Spithoff K, Maroun J, Gastrointestinal Cancer Disease Site Group of Cancer Care Ontario's Program in Evidence-based Care. Adjuvant systemic chemotherapy for Stage II and III colon cancer after complete resection: an updated practice guideline. *Clin Oncol R Coll Radiol G B*. Haziran 2011;23(5):314-22.
62. National Guideline Alliance part of the Royal College of Obstetricians and Gynaecologists (UK). Use of molecular biomarkers to guide systemic therapy: Colorectal cancer (update): Evidence review B1 [Internet]. London: National Institute for Health and Care Excellence (UK); 2020 [a.yer 04 Eylül 2021]. Erişim adresi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559933/>
63. Lieu CH, Corcoran RB, Overman MJ. Integrating Biomarkers and Targeted Therapy Into Colorectal Cancer Management. *Am Soc Clin Oncol Educ Book Am Soc Clin Oncol Annu Meet*. Ocak 2019;39:207-15.
64. Feeney G, Sehgal R, Sheehan M, Hogan A, Regan M, Joyce M, vd. Neoadjuvant radiotherapy for rectal cancer management. *World J Gastroenterol*. 07 Eylül 2019;25(33):4850-69.
65. Couwenberg AM, Burbach JPM, van Grevenstein WMU, Smits AB, Consten ECJ, Schiphorst AHW, vd. Effect of Neoadjuvant Therapy and Rectal Surgery on Health-related Quality of Life in Patients With Rectal Cancer During the First 2 Years After Diagnosis. *Clin Colorectal Cancer*. Eylül 2018;17(3):e499-512.
66. Ashburn JH, Kalady MF. Radiation-Induced Problems in Colorectal Surgery. *Clin Colon Rectal Surg*. Haziran 2016;29(2):85-91.
67. Blackburn SC, Stanton MP. Anatomy and physiology of the peritoneum. *Semin Pediatr Surg*. Aralık 2014;23(6):326-30.

68. Rippe B, Davies S. Permeability of Peritoneal and Glomerular Capillaries: What are the Differences According to Pore Theory? *Perit Dial Int.* 01 Mayıs 2011;31(3):249-58.
69. Flessner MF. Peritoneal transport physiology: insights from basic research. *J Am Soc Nephrol.* 01 Ağustos 1991;2(2):122-35.
70. Nolph KD. Peritoneal dialysis. Springer Science & Business Media; 2013. 950 s.
71. Heel KA, Hall JC. Peritoneal defences and peritoneum-associated lymphoid tissue. *Br J Surg.* Ağustos 1996;83(8):1031-6.
72. Stoermann B, Kretschmer K, Düber S, Weiss S. B-1a cells are imprinted by the microenvironment in spleen and peritoneum. *Eur J Immunol.* Haziran 2007;37(6):1613-20.
73. Mutsaers SE, Prêle CM-A, Pengelly S, Herrick SE. Mesothelial cells and peritoneal homeostasis. *Fertil Steril.* Ekim 2016;106(5):1018-24.
74. Rout UK, Saed GM, Diamond MP. Transforming growth factor-beta1 modulates expression of adhesion and cytoskeletal proteins in human peritoneal fibroblasts. *Fertil Steril.* Temmuz 2002;78(1):154-61.
75. Jayne D. Molecular biology of peritoneal carcinomatosis. *Cancer Treat Res.* 2007;134:21-33.
76. Hayashi K, Jiang P, Yamauchi K, Yamamoto N, Tsuchiya H, Tomita K, vd. Real-time imaging of tumor-cell shedding and trafficking in lymphatic channels. *Cancer Res.* 01 Eylül 2007;67(17):8223-8.
77. Lloyd JM, McIver CM, Stephenson S-A, Hewett PJ, Rieger N, Hardingham JE. Identification of early-stage colorectal cancer patients at risk of relapse post-resection by immunobead reverse transcription-PCR analysis of peritoneal lavage fluid for malignant cells. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 Ocak 2006;12(2):417-23.
78. Bae SJ, Shin US, Ki Y-J, Cho SS, Moon SM, Park SH. Role of peritoneal lavage cytology and prediction of prognosis and peritoneal recurrence after curative surgery for colorectal cancer. *Ann Coloproctology.* Aralık 2014;30(6):266-73.

79. Rossi Del Monte S, Ranieri D, Mazzetta F, Kazemi Nava A, Raffa S, Torrisi MR, vd. Free peritoneal tumor cells detection in gastric and colorectal cancer patients. *J Surg Oncol*. 01 Temmuz 2012;106(1):17-23.
80. Yilmaz M, Christofori G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev*. Haziran 2009;28(1-2):15-33.
81. Hugén N, van de Velde CJH, de Wilt JHW, Nagtegaal ID. Metastatic pattern in colorectal cancer is strongly influenced by histological subtype. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. Mart 2014;25(3):651-7.
82. Bracke ME. Role of adhesion molecules in locoregional cancer spread. *Cancer Treat Res*. 2007;134:35-49.
83. Jonjić N, Peri G, Bernasconi S, Sciacca FL, Colotta F, Pelicci P, vd. Expression of adhesion molecules and chemotactic cytokines in cultured human mesothelial cells. *J Exp Med*. 01 Ekim 1992;176(4):1165-74.
84. van Rossen ME, Hofland LJ, van den Tol MP, van Koetsveld PM, Jeekel J, Marquet RL, vd. Effect of inflammatory cytokines and growth factors on tumour cell adhesion to the peritoneum. *J Pathol*. Nisan 2001;193(4):530-7.
85. van Grevenstein WMU, Hofland LJ, van Rossen MEE, van Koetsveld PM, Jeekel J, van Eijck CHJ. Inflammatory Cytokines Stimulate the Adhesion of Colon Carcinoma Cells to Mesothelial Monolayers. *Dig Dis Sci*. 01 Ekim 2007;52(10):2775-83.
86. Heldin P, Pertoft H. Synthesis and assembly of the hyaluronan-containing coats around normal human mesothelial cells. *Exp Cell Res*. Ekim 1993;208(2):422-9.
87. Harada N, Mizoi T, Kinouchi M, Hoshi K, Ishii S, Shiiba K, vd. Introduction of antisense CD44S cDNA down-regulates expression of overall CD44 isoforms and inhibits tumor growth and metastasis in highly metastatic colon carcinoma cells. *Int J Cancer*. 01 Ocak 2001;91(1):67-75.
88. Gerber SA, Rybalko VY, Bigelow CE, Lugade AA, Foster TH, Frelinger JG, vd. Preferential attachment of peritoneal tumor metastases to omental immune aggregates and possible role of a unique vascular microenvironment in metastatic survival and growth. *Am J Pathol*. Kasım 2006;169(5):1739-52.

89. Ma PC, Maulik G, Christensen J, Salgia R. c-Met: structure, functions and potential for therapeutic inhibition. *Cancer Metastasis Rev.* Aralık 2003;22(4):309-25.
90. Boccaccio C, Comoglio PM. Invasive growth: a MET-driven genetic programme for cancer and stem cells. *Nat Rev Cancer.* Ağustos 2006;6(8):637-45.
91. Jayne DG, O’Leary R, Gill A, Hick A, Guillou PJ. A three-dimensional in-vitro model for the study of peritoneal tumour metastasis. *Clin Exp Metastasis.* 1999;17(6):515-23.
92. Kataoka H, Tanaka H, Nagaike K, Uchiyama S, Itoh H. Role of cancer cell-stroma interaction in invasive growth of cancer cells. *Hum Cell.* Mart 2003;16(1):1-14.
93. Sunami E, Tsuno N, Osada T, Saito S, Kitayama J, Tomozawa S, vd. MMP-1 is a prognostic marker for hematogenous metastasis of colorectal cancer. *The Oncologist.* 2000;5(2):108-14.
94. K T, K M, H I, M I, T Y, H I, vd. Serum matrix-metalloproteinase-1 is a bona fide prognostic marker for colorectal cancer. *Ann Surg Oncol.* 09 Temmuz 2010;17(12):3362-9.
95. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature.* 18 Kasım 2004;432(7015):332-7.
96. Varghese S, Burness M, Xu H, Beresnev T, Pingpank J, Alexander HR. Site-Specific Gene Expression Profiles and Novel Molecular Prognostic Factors in Patients with Lower Gastrointestinal Adenocarcinoma Diffusely Metastatic to Liver or Peritoneum. *Ann Surg Oncol.* 01 Aralık 2007;14(12):3460-71.
97. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol.* Temmuz 1995;19(3):183-232.
98. Fuchs CS, Goldberg RM, Sargent DJ, Meyerhardt JA, Wolpin BM, Green EM, vd. Plasma insulin-like growth factors, insulin-like binding protein-3, and outcome in metastatic colorectal cancer: results from intergroup trial N9741. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 Aralık 2008;14(24):8263-9.

99. Olcina MM, Leszczynska KB, Senra JM, Isa NF, Harada H, Hammond EM. H3K9me3 facilitates hypoxia-induced p53-dependent apoptosis through repression of APAK. *Oncogene*. 11 Şubat 2016;35(6):793-9.
100. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 04 Mart 2011;144(5):646-74.
101. Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, vd. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood*. 15 Ocak 2005;105(2):659-69.
102. Greijer AE, Delis-van Diemen PM, Fijneman RJA, Giles RH, Voest EE, van Hinsbergh VWM, vd. Presence of HIF-1 and related genes in normal mucosa, adenomas and carcinomas of the colorectum. *Virchows Arch Int J Pathol*. Mayıs 2008;452(5):535-44.
103. Levene PA, López-Suárez J. MUCINS AND MUCOIDS. *J Biol Chem*. 01 Ekim 1918;36(1):105-26.
104. Meyer K, Palmer JW. THE POLYSACCHARIDE OF THE VITREOUS HUMOR. 1934;
105. Kendall FE, Heidelberger M, Dawson MH. A SEROLOGICALLY INACTIVE POLYSACCHARIDE ELABORATED BY MUCOID STRAINS OF GROUP A HEMOLYTIC STREPTOCOCCUS. *J Biol Chem*. 01 Mart 1937;118(1):61-9.
106. Laurent TC, Gergely J. LIGHT SCATTERING STUDIES ON HYALURONIC ACID. *J Biol Chem*. Ocak 1955;212(1):325-33.
107. Ogston AG, Stanier JE. The dimensions of the particle of hyaluronic acid complex in synovial fluid. *Biochem J*. Ekim 1951;49(5):585-90.
108. Stern R, Asari AA, Sugahara KN. Hyaluronan fragments: An information-rich system. *Eur J Cell Biol*. Ağustos 2006;85(8):699-715.
109. Feinberg RN, Beebe DC. Hyaluronate in vasculogenesis. *Science*. 10 Haziran 1983;220(4602):1177-9.
110. Morrison H, Sherman LS, Legg J, Banine F, Isacke C, Haipek CA, vd. The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44. *Genes Dev*. 15 Nisan 2001;15(8):968-80.

- 111.McBride WH, Bard JB. Hyaluronidase-sensitive halos around adherent cells. Their role in blocking lymphocyte-mediated cytolysis. *J Exp Med*. 01 Şubat 1979;149(2):507-15.
- 112.Delmage JM, Powars DR, Jaynes PK, Allerton SE. The selective suppression of immunogenicity by hyaluronic acid. *Ann Clin Lab Sci*. Ağustos 1986;16(4):303-10.
- 113.Sugahara KN, Murai T, Nishinakamura H, Kawashima H, Saya H, Miyasaka M. Hyaluronan Oligosaccharides Induce CD44 Cleavage and Promote Cell Migration in CD44-expressing Tumor Cells *. *J Biol Chem*. 22 Ağustos 2003;278(34):32259-65.
- 114.Cho Y, Lee H-W, Kang H-G, Kim H-Y, Kim S-J, Chun K-H. Cleaved CD44 intracellular domain supports activation of stemness factors and promotes tumorigenesis of breast cancer. *Oncotarget*. 20 Nisan 2015;6(11):8709-21.
- 115.Okamoto I, Kawano Y, Murakami D, Sasayama T, Araki N, Miki T, vd. Proteolytic release of CD44 intracellular domain and its role in the CD44 signaling pathway. *J Cell Biol*. 26 Kasım 2001;155(5):755-62.
- 116.Xu H, Ito T, Tawada A, Maeda H, Yamanokuchi H, Isahara K, vd. Effect of hyaluronan oligosaccharides on the expression of heat shock protein 72. *J Biol Chem*. 10 Mayıs 2002;277(19):17308-14.
- 117.Hedman K, Kurkinen M, Alitalo K, Vaheri A, Johansson S, Höök M. Isolation of the pericellular matrix of human fibroblast cultures. *J Cell Biol*. Nisan 1979;81(1):83-91.
- 118.Forrester JV, Balazs EA. Inhibition of phagocytosis by high molecular weight hyaluronate. *Immunology*. Temmuz 1980;40(3):435-46.
- 119.Lüke HJ, Prehm P. Synthesis and shedding of hyaluronan from plasma membranes of human fibroblasts and metastatic and non-metastatic melanoma cells. *Biochem J*. 01 Ekim 1999;343 Pt 1:71-5.
- 120.Noble PW, Lake FR, Henson PM, Riches DW. Hyaluronate activation of CD44 induces insulin-like growth factor-1 expression by a tumor necrosis factor-alpha-dependent mechanism in murine macrophages. *J Clin Invest*. Haziran 1993;91(6):2368-77.

- 121.Johnson LA, Jackson DG. Hyaluronan and Its Receptors: Key Mediators of Immune Cell Entry and Trafficking in the Lymphatic System. *Cells*. 12 Ağustos 2021;10(8):2061.
- 122.Horton MR, Olman MA, Bao C, White KE, Choi AM, Chin BY, vd. Regulation of plasminogen activator inhibitor-1 and urokinase by hyaluronan fragments in mouse macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. Ekim 2000;279(4):L707-715.
- 123.West DC, Hampson IN, Arnold F, Kumar S. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science*. 14 Haziran 1985;228(4705):1324-6.
- 124.Rooney P, Kumar S, Ponting J, Wang M. The role of hyaluronan in tumour neovascularization (review). *Int J Cancer*. 03 Mart 1995;60(5):632-6.
- 125.Evanko SP, Angello JC, Wight TN. Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Nisan 1999;19(4):1004-13.
- 126.Takahashi Y, Li L, Kamiryo M, Asteriou T, Moustakas A, Yamashita H, vd. Hyaluronan fragments induce endothelial cell differentiation in a CD44- and CXCL1/GRO1-dependent manner. *J Biol Chem*. 24 Haziran 2005;280(25):24195-204.
- 127.Ghatak S, Misra S, Toole BP. Hyaluronan oligosaccharides inhibit anchorage-independent growth of tumor cells by suppressing the phosphoinositide 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem*. 11 Ekim 2002;277(41):38013-20.
- 128.Camaioni A, Hascall VC, Yanagishita M, Salustri A. Effects of exogenous hyaluronic acid and serum on matrix organization and stability in the mouse cumulus cell-oocyte complex. *J Biol Chem*. 25 Eylül 1993;268(27):20473-81.
- 129.de la Motte CA, Hascall VC, Drazba J, Bandyopadhyay SK, Strong SA. Mononuclear leukocytes bind to specific hyaluronan structures on colon mucosal smooth muscle cells treated with polyinosinic acid:polycytidylic acid: inter-alpha-trypsin inhibitor is crucial to structure and function. *Am J Pathol*. Temmuz 2003;163(1):121-33.

130. Knudson CB, Knudson W. Hyaluronan and CD44: modulators of chondrocyte metabolism. *Clin Orthop*. Ekim 2004;(427 Suppl):S152-162.
131. Takahashi K, Goomer RS, Harwood F, Kubo T, Hirasawa Y, Amiel D. The effects of hyaluronan on matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), interleukin-1 β (IL-1 β), and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) gene expression during the development of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. Mart 1999;7(2):182-90.
132. Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, vd. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med*. 07 Ocak 2002;195(1):99-111.
133. Fieber C, Baumann P, Vallon R, Termeer C, Simon JC, Hofmann M, vd. Hyaluronan-oligosaccharide-induced transcription of metalloproteases. *J Cell Sci*. 15 Ocak 2004;117(Pt 2):359-67.
134. Xu H, Ito T, Tawada A, Maeda H, Yamanokuchi H, Isahara K, vd. Effect of hyaluronan oligosaccharides on the expression of heat shock protein 72. *J Biol Chem*. 10 Mayıs 2002;277(19):17308-14.
135. Fujii K, Fujii Y, Hubscher S, Tanaka Y. CD44 is the physiological trigger of Fas up-regulation on rheumatoid synovial cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 01 Ağustos 2001;167(3):1198-203.
136. Solorsh M, Hardingham TE, Hascall VC, Kimura JH. Separate effects of exogenous hyaluronic acid on proteoglycan synthesis and deposition in pericellular matrix by cultured chick embryo limb chondrocytes. *Dev Biol*. Mart 1980;75(1):121-9.
137. Turley EA, Noble PW, Bourguignon LYW. Signaling Properties of Hyaluronan Receptors *. *J Biol Chem*. 15 Şubat 2002;277(7):4589-92.
138. McDonald J, Hascall VC. Hyaluronan Minireview Series. *J Biol Chem*. Şubat 2002;277(7):4575-9.
139. Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Ocak 2003;4(1):33-45.

140. Hyaluronan and the hyaluronan receptor RHAMM promote focal adhesion turnover and transient tyrosine kinase activity. *J Cell Biol.* 02 Temmuz 1994;126(2):575-88.
141. Hamilton SR, Fard SF, Paiwand FF, Tolg C, Veiseh M, Wang C, vd. THE HYALURONAN RECEPTORS CD44 AND RHAMM (CD168) FORM COMPLEXES WITH ERK1,2, WHICH SUSTAIN HIGH BASAL MOTILITY IN BREAST CANCER CELLS. *J Biol Chem.* 01 Haziran 2007;282(22):16667-80.
142. Tolg C, Hamilton SR, Nakrieko K-A, Kooshesh F, Walton P, McCarthy JB, vd. Rhamm-/- fibroblasts are defective in CD44-mediated ERK1,2 mitogenic signaling, leading to defective skin wound repair. *J Cell Biol.* 18 Aralık 2006;175(6):1017-28.
143. Wang C-T, Lin Y-T, Chiang B-L, Lin Y-H, Hou S-M. High molecular weight hyaluronic acid down-regulates the gene expression of osteoarthritis-associated cytokines and enzymes in fibroblast-like synoviocytes from patients with early osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 01 Aralık 2006;14(12):1237-47.
144. Tobetto K, Yasui T, Ando T, Hayaishi M, Motohashi N, Shinogi M, vd. Inhibitory effects of hyaluronan on [¹⁴C]arachidonic acid release from labeled human synovial fibroblasts. *Jpn J Pharmacol.* Ekim 1992;60(2):79-84.
145. Stern R, Asari AA, Sugahara KN. Hyaluronan fragments: an information-rich system. *Eur J Cell Biol.* Ağustos 2006;85(8):699-715.
146. Saneja A, Arora D, Kumar R, Dubey RD, Panda AK, Gupta PN. CD44 targeted PLGA nanomedicines for cancer chemotherapy. *Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci.* 30 Ağustos 2018;121:47-58.
147. Yang C, Li C, Zhang P, Wu W, Jiang X. Redox Responsive Hyaluronic Acid Nanogels for Treating RHAMM (CD168) Over-expressive Cancer, both Primary and Metastatic Tumors. *Theranostics.* 2017;7(6):1719-34.
148. Roy A, Bhattacharyya M, Ernsting MJ, May JP, Li S-D. Recent progress in the development of polysaccharide conjugates of docetaxel and paclitaxel. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2014;6(4):349-68.

- 149.Varshosaz J, Taymouri S, Ghassami E. Supramolecular Self-Assembled Nanogels a New Platform for Anticancer Drug Delivery. *Curr Pharm Des.* 2017;23(35):5242-60.
- 150.Li X, Pan Y, Zhou J, Yi G, He C, Zhao Z, vd. Hyaluronic acid-modified manganese dioxide-enveloped hollow copper sulfide nanoparticles as a multifunctional system for the co-delivery of chemotherapeutic drugs and photosensitizers for efficient synergistic antitumor treatments. *J Colloid Interface Sci.* 23 Temmuz 2021;605:296-310.
- 151.Xu Y, Yao Y, Wang L, Chen H, Tan N. Hyaluronic Acid Coated Liposomes Co-Delivery of Natural Cyclic Peptide RA-XII and Mitochondrial Targeted Photosensitizer for Highly Selective Precise Combined Treatment of Colon Cancer. *Int J Nanomedicine.* 2021;16:4929-42.
- 152.Han M, Lv Q, Tang X-J, Hu Y-L, Xu D-H, Li F-Z, vd. Overcoming drug resistance of MCF-7/ADR cells by altering intracellular distribution of doxorubicin via MVP knockdown with a novel siRNA polyamidoamine-hyaluronic acid complex. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 28 Ekim 2012;163(2):136-44.
- 153.Boyden S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med.* 01 Mart 1962;115:453-66.
- 154.Pijuan J, Barceló C, Moreno DF, Maiques O, Sisó P, Marti RM, vd. In vitro Cell Migration, Invasion, and Adhesion Assays: From Cell Imaging to Data Analysis. *Front Cell Dev Biol.* 2019;7:107.
- 155.Okazaki M, Fushida S, Harada S, Tsukada T, Kinoshita J, Oyama K, vd. Establishing a xenograft mouse model of peritoneal dissemination of gastric cancer with organ invasion and fibrosis. *BMC Cancer.* 05 Ocak 2017;17(1):23.
- 156.Lee W-S, Yun SH, Chun H-K, Lee W-Y, Yun H-R, Kim J, vd. Pulmonary resection for metastases from colorectal cancer: prognostic factors and survival. *Int J Colorectal Dis.* Haziran 2007;22(6):699-704.
- 157.Van Cutsem E, Nordlinger B, Adam R, Köhne C-H, Pozzo C, Poston G, vd. Towards a pan-European consensus on the treatment of patients with colorectal liver metastases. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. Eylül 2006;42(14):2212-21.

- 158.Bastiaenen VP, Aalbers AGJ, Arjona-Sánchez A, Bellato V, Bilt JDW van der, D'Hoore AD, vd. Risk of metachronous peritoneal metastases in patients with pT4a versus pT4b colon cancer: An international multicentre cohort study. *Eur J Surg Oncol*. 01 Eylül 2021;47(9):2405-13.
- 159.Acunzo G, Guida M, Pellicano M, Tommaselli GA, Di Spiezio Sardo A, Bifulco G, vd. Effectiveness of auto-cross-linked hyaluronic acid gel in the prevention of intrauterine adhesions after hysteroscopic adhesiolysis: a prospective, randomized, controlled study. *Hum Reprod Oxf Engl*. Eylül 2003;18(9):1918-21.
- 160.Liu C, Lu Q, Zhang Z, Xue M, Zhang Y, Zhang Y, vd. A Randomized Controlled Trial on the Efficacy and Safety of a New Crosslinked Hyaluronan Gel in Reducing Adhesions after Gynecologic Laparoscopic Surgeries. *J Minim Invasive Gynecol*. 01 Temmuz 2015;22(5):853-63.
- 161.Toole BP. Hyaluronan promotes the malignant phenotype. *Glycobiology*. Mart 2002;12(3):37R-42R.
- 162.Toole BP, Wight TN, Tammi MI. Hyaluronan-cell interactions in cancer and vascular disease. *J Biol Chem*. 15 Şubat 2002;277(7):4593-6.
- 163.Sikkink CJJM, Postma VA, Reijnen MMPJ, De Man B, Bleichrodt RP, Van Goor H. Hyaluronan-based antiadhesive membrane has no major effect on intraperitoneal growth of colonic tumour cells. *Eur Surg Res Eur Chir Forsch Rech Chir Eur*. Nisan 2004;36(2):123-8.
- 164.R. Haverlag MEE van R MP van den Tol, F Bonthuis, RL Marquet, J Jeekel. Hyaluronate-based Coating Solution for Prevention of Surgical Adhesions has no Major Effect on Adhesion and Growth of Intraperitoneal Tumour Cells. *Eur J Surg*. 17 Eylül 1999;165(8):791-5.
- 165.Genzyme Corporation to Pay \$32.5 Million to Resolve Criminal Liability Relating to Seprafilm [Internet]. 2015 [a.yer 31 Ağustos 2021]. Erişim adresi: <https://www.justice.gov/opa/pr/genzyme-corporation-pay-325-million-resolve-criminal-liability-relating-seprafilm>
- 166.Piacquadio D, Jarcho M, Goltz R. Evaluation of hylan b gel as a soft-tissue augmentation implant material. *J Am Acad Dermatol*. 01 Nisan 1997;36(4):544-9.