



T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



**DOKTORA TEZİ**

**YÜKSEK MOLEKÜLER AĞIRLIKLIL HIALURONİK ASİT İLE UYARILMIŞ  
WVOX'UN BAŞ VE BOYUN KANSERİNDEKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

**CEREN ORHAN**

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Ayşe Nur BUYRU**

**Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı**

**Tıbbi Biyoloji, Doktora Programı**

**Temmuz, 2025**

## TEZ KABUL VE ONAYI

Ceren ORHAN tarafından, Prof. Dr. Ayşe Nur BUYRU danışmanlığında hazırlanan "YÜKSEK MOLEKÜLER AĞIRLIKLI HYALURONİK ASİT İLE UYARILMIŞ WWOX'UN BAŞ VE BOYUN KANSERİNDEKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI" başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 21/07/2025 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

### Tez Jürisi

	İmza	Sonuç
DANIŞMAN	Prof. Dr. Ayşe Nur BUYRU	<input checked="" type="checkbox"/>
	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	Kabul <input type="checkbox"/> Ret
ÜYE	Prof. Dr. Turgut ULUTİN	<input checked="" type="checkbox"/>
	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	Kabul <input type="checkbox"/> Ret
ÜYE	Doç. Dr. Emrah YÜCESAN	<input checked="" type="checkbox"/>
	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Nörogenetik Anabilim Dalı	Kabul <input type="checkbox"/> Ret
ÜYE	Prof. Dr. Evrim KÖMÜRCÜ BAYRAK	<input checked="" type="checkbox"/>
	İstanbul Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	Kabul <input type="checkbox"/> Ret
ÜYE	Doç. Dr. Süreyya BOZKURT	<input checked="" type="checkbox"/>
	İstinye Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	Kabul <input type="checkbox"/> Ret



Yeğenim Derin Ben Moussa'ya ithaf ediyorum.

## **BÜTÇE DESTEKLERİ**

### **YÜKSEK MOLEKÜLER AĞIRLIKLI HYALURONİK ASİT İLE UYARILMIŞ WVOX'UN BAŞ VE BOYUN KANSERİNDEKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Bu tez çalışmasını TÜBİTAK 2211-C Yurt İçi Öncelikli Alanlara Yönelik Doktora Burs Programı desteklemiştir.

## TEŞEKKÜR

Yaşantımın her evresinde olduğu gibi doktora sürecimde de desteklerini esirgemeyen, dünyaya gelerek yaşayabileceğim en güzel sevgiyi yaşatan yeğenim Derin başta olmak üzere anneme, babama ve kız kardeşime;

Yaklaşık 10 yıldır yanında yürüdüğüm Danışman Hocam Prof. Dr. Nur Buyru'ya;

Gerek akademik hayatta gerekse kişisel hayatımda konu her ne olursa olsun yanımda olduklarını bildiğim ve güvendiğim can dostlarım Dr. Duygu Aslan, Dr. Asuman Çelebi, Dr. Didem Seven ve MSc. Günay Galamiyeva'ya;

Geçirdiğim bu 10 yıllık Cerrahpaşa serüveninde her daim kapılarını çaldığımda yardımına koşan Nörolojik Bilimler Enstitüsünden hocalarım Prof. Dr. Duygu Gezen Ak ve Prof. Dr. Erdinç Dursun'a, arkadaşlarım Dr. Merve Alaylıoğlu, Dr. Büşra Şengül Yediel ve tüm BNHAL laboratuvar ekibine;

Doktora sürecimde dirsek dirseğe sınavlara girdiğimiz, beraber ter akıttığımız dönem arkadaşlarım Dr. Dilara Kamer Çolak ve Dr. Metehan Karataş'a;

Tüm bu süreçte MolGen laboratuvarından gelmiş geçmiş tüm arkadaşlarım ile geminin son yolcuları olduğumuz MSc. Ayşegül Soysal ve BSc. Ayça Dütükçü'ye;

Tüm doktora sürecini yürütmemi sağlayan, ayakta durmama yardımcı olan 100/2000 YÖK Doktora Bursu Programına ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'ın sağladığı "2211-C Yurt İçi Öncelikli Alanlara Yönelik Doktora Burs Programına sağladıkları destek için teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI.....	ii
BÜTÇE DESTEKLERİ .....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ .....	ix
TABLO LİSTESİ.....	xi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	xii
ÖZET .....	xiv
ABSTRACT .....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE .....	2
2.1. Baş ve Boyun Kanseri (BBK).....	2
2.2. Baş ve Boyun Kanserinde TNM Evreleme.....	4
2.3. Baş ve Boyun Kanseri Epidemiyolojisi .....	6
2.4. Baş ve Boyun Kanserinin Risk Faktörleri ve Etiyolojisi .....	6
2.5. Baş ve Boyun Kanserinde Klinik Bulgular ve Semptomlar .....	7
2.6. Baş ve Boyun Kanserinde Tanı ve Tedavi Yaklaşımları .....	7
2.6.1. Hyaluronik Asitin Fonksiyonları.....	8
2.6.2. Tedavide Hyaluronik Asitin Yeri.....	8
2.7. Hyaluronik Asitin Baş ve Boyun Kanselerindeki Rolü.....	9
2.7.1. Hyaluronik Asit Metabolizması ve SHBBK’de Sentezi .....	10
2.7.2. CD44 Aracılı Sinyal Yolakları ve Hücrel Etkiler .....	11
2.7.3. Hyaluronik Asitin Moleküler Ağırlığına Bağlı Tümör Davranışları .....	12
2.7.4. Hyaluronik Asitin Prognostik Önemi.....	12
2.7.5. Tedavide HA Hedeflenmesi .....	13
2.7.6. Hyaluronik Asitin Tümör Mikroçevresi ile Etkileşimi .....	13
2.8. WWOX Geni ve Proteini .....	14

2.9. WWOX ve Kanser .....	16
2.9.1. WWOX'un Baş ve Boyun Kanserindeki Yeri .....	17
<b>3. YÖNTEM .....</b>	<b>19</b>
3.1. Moleküler Yerleştirme (Molecular Docking) .....	19
3.2. Hücre Kültürü .....	19
3.3. Hücrelerin Sayımı ve 6-Kuyulu, 24-Kuyulu Plakalara Ekimi .....	20
3.4. Yüksek Moleküler Ağırlıklı Hyaluronik Asit Uygulaması .....	21
3.5. Hücre Canlılık Testi (MTT Assay) .....	21
3.6. LDH Sitotoksosite Testi .....	22
3.7. HA ELISA Ölçümü .....	22
3.8. Anneksin V-FITC Apoptoz Assay .....	23
3.9. RNA Eldesi .....	24
3.10. cDNA Sentezi .....	24
3.11. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Tepkimesi (GZ-PZT) .....	25
3.12. Sitoplazmik ve Çekirdek Proteinlerinin Eldesi .....	27
3.13. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi .....	28
3.14. Western Blot .....	29
3.15. İstatistiksel Analiz .....	30
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>31</b>
4.1. Moleküler Yerleştirme Sonuçları .....	31
4.2. Yüksek Moleküler Ağırlıklı Hyaluronik Asit Uygulama Sonuçları .....	32
4.3. LDH Sitotoksosite Sonuçları .....	33
4.4. HA ELISA Sonuçları .....	34
4.5. Anneksin V-FITC Apoptoz Assay Sonuçları .....	36
4.6. Apoptotik Yolak Düzenleyici Genlerin İfade Düzeyleri .....	37
4.7. WWOX ve HYAL1 Genlerinin İfade Düzeyleri .....	44
4.8. WWOX ve HYAL1 Protein İfade Düzeyleri .....	47
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>49</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>54</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>55</b>
<b>İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI .....</b>	<b>62</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa No

Şekil 2.1: Baş ve boyun kanserinde yer alan anatomik bölgeler ( <i>National Cancer Institute</i> ) ...	3
Şekil 2.2: WWOX geninin dokulardaki ifade düzeyi (GTExPortal, (Coorens ve ark., 2025))	15
Şekil 2.3: WWOX proteini katlanma yapısı (AlphaFold veritabanı, <a href="https://alphafold.ebi.ac.uk/">https://alphafold.ebi.ac.uk/</a> ) .....	16
Şekil 3.1: Thoma lamında sayımı yapılan alanlar .....	21
Şekil 4.1: Moleküler Yerleştirme Skoru.....	31
Şekil 4.2: C4 cebi ve ligand bağlantısı .....	32
Şekil 4.3: IC50 hesaplaması sonuçları.....	33
Şekil 4.4: Hücre canlılık (MTT) sonuçları .....	33
Şekil 4.5: LDH Sitotoksosite Sonuçları .....	34
Şekil 4.6: HA ELISA standartları.....	35
Şekil 4.7: Örneklerin hyaluronik asit miktarları .....	35
Şekil 4.8: Apoptoz Assay Sonuçları. Sol üst kadran nekrotik hücreleri, sağ üst kadran geç apoptotik hücreleri ve sağ alt kadran ise erken apoptotik hücreleri göstermektedir. ....	36
Şekil 4.9: CASP3 ifade değişimleri .....	37
Şekil 4.10: BCL2 ifade değişimleri .....	38
Şekil 4.11: BAX ifade değişimleri .....	39
Şekil 4.12: CASP7 ifade değişimleri .....	40
Şekil 4.13: CASP8 ifade değişimleri .....	41
Şekil 4.14: CASP9 ifade değişimleri .....	42
Şekil 4.15: BCL-XL ifade değişimleri .....	43
Şekil 4.16: p53 ifade değişimleri.....	44
Şekil 4.17: WWOX ifade değişimleri.....	45

Şekil 4.18: HYAL1 ifade değişimleri.....	46
Şekil 4.19: WB bant görüntüsü .....	47



## TABLO LİSTESİ

	<b>Sayfa No</b>
Tablo 2.1: Baş ve boyun kanserinde TNM evreleme .....	5
Tablo 3.1: Büyüme medyumunun içeriği .....	19
Tablo 3.2: Tez çalışmasında kullanılan primerlerin dizileri.....	26
Tablo 3.3: SDS-PAGE yükleme tamponu içeriği.....	28
Tablo 4.1: Yüksek molekül ağırlıklı hyaluronik asit uygulanmış SCC-25 hücre hatlarında WWOX ve HYAL1 proteinlerinin yoğunlukları.....	48

## SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
<b>ABD</b>	: Amerika Birleşik Devletleri
<b>ADP</b>	: Adenozin difosfat
<b>AMPK</b>	: AMP-aktive protein kinaz
<b>ATP</b>	: Adenozin trifosfat
<b>Bcl-2</b>	: B hücre lenfoma 2
<b>cDNA</b>	: Komplemanter DNA
<b>CF</b>	: Fruktoz grubu
<b>COX-2</b>	: Siklooksijenaz-2
<b>CYP2E1</b>	: Sitokrom P450 2E1
<b>DAPI</b>	: 4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DCFH-DA</b>	: 2',7'-Diklorodihidroflüorescein diasetat
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>EDTA</b>	: Etilendiamintetraasetik asit
<b>FAD</b>	: Flavin adenin dinükleotid
<b>GAPDH</b>	: Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
<b>GSH</b>	: Glutasyon
<b>GSSG</b>	: Oksitlenmiş glutasyon
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen peroksit
<b>HCl</b>	: Hidroklorik asit
<b>HPLC</b>	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
<b>ICAM-1</b>	: Hücrelerarası adezyon molekülü-1
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	: İnterlökin-1 beta
<b>IL-6</b>	: İnterlökin-6
<b>LDH</b>	: Laktat dehidrogenaz
<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>mRNA</b>	: Mesajcı RNA
<b>mtDNA</b>	: Mitokondriyal DNA
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	: Nükleer faktör kappa B

<b>NO</b>	: Nitrik oksit
<b>OD</b>	: Optik dansite
<b>OS</b>	: Oksidatif stres
<b>PBS</b>	: Fosfat tamponlu salin
<b>PCR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>qRT-PCR</b>	: Kantitatif Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>RT-PCR</b>	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
<b>SDS-PAGE</b>	: Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
<b>SOD</b>	: Süperoksit dismutaz
<b>STB</b>	: Standart tedavi bileşiği
<b>TBARS</b>	: Tiyobarbitürik asit reaktif maddeler
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	: Tümör nekroz faktör-alfa
<b>VEGF</b>	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

## ÖZET

### DOKTORA TEZİ

#### YÜKSEK MOLEKÜLER AĞIRLIKLI HYALURONİK ASİT İLE UYARILMIŞ WVOX'UN BAŞ VE BOYUN KANSERİNDEKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI Ceren ORHAN

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tıbbi Biyoloji, Doktora Programı

Danışman: Prof. Dr. Ayşe Nur BUYRU

Bu tez çalışmasında, yüksek moleküler ağırlıklı hyaluronik asit (HMW-HA)'in baş ve boyun kanserindeki biyolojik etkileri ve bu etkinin tümör baskılayıcı WVOX geni ile ilişkisi araştırılmıştır. SCC-25 kanser ve HET-1A normal hücre hatlarında yapılan uygulamalarda, HMW-HA'nın hücre canlılığı, sitotoksinite, apoptoz göstergeleri ve hyaluronidaz (HYAL1) düzeyleri üzerindeki etkileri analiz edilmiştir. Moleküler yerleştirme çalışmaları ile HMW-HA'nın WVOX proteini ile olası bağlanma bölgeleri belirlenmiş; RT-qPCR ve Western blot analizleri ile WVOX ve ilişkili genlerin ifade düzeyleri değerlendirilmiştir. Bulgular, HMW-HA'nın WVOX ifadesini artırdığını ve bazı apoptozla ilişkili genlerin ifadesini değiştirdiğini göstermiştir. Bu sonuçlar, HMW-HA ve WVOX'un birlikte hedeflenmesinin baş ve boyun kanserlerinde potansiyel bir tedavi stratejisi olabileceğine işaret etmektedir.

Temmuz 2025 , 80 sayfa.

**Anahtar kelimeler:** WVOX, Hyaluronik Asit, Baş ve Boyun Kanseri

## **ABSTRACT**

**[Ph.D. THESIS]**

**[INVESTIGATION OF THE ROLE OF HIGH MOLECULAR WEIGHT HYALURONIC ACID STIMULATED WWOX IN HEAD AND NECK CANCER ]**

**[Ceren ORHAN]**

**İstanbul University-Cerrahpaşa  
Institute of Graduate Studies  
Department of Medical Biology  
Medical Biology Doctoral Program**

**[Supervisor: Prof. Dr. Ayşe Nur BUYRU ]**

[In this thesis study, the biological effects of high molecular weight hyaluronic acid (HMW-HA) in head and neck cancer and its potential interaction with the tumor suppressor gene WWOX were investigated. Applications were conducted on the SCC-25 cancer cell line and the HET-1A normal epithelial cell line to evaluate the effects of HMW-HA on cell viability, cytotoxicity, apoptotic markers, and hyaluronidase (HYAL1) levels. Molecular docking analyses were performed to identify potential binding sites of HMW-HA on the WWOX protein. Additionally, RT-qPCR and Western blot analyses were employed to assess the expression levels of WWOX and related genes. The findings demonstrated that HMW-HA upregulated WWOX expression and modulated the expression of certain apoptosis-related genes. These results suggest that co-targeting HMW-HA and WWOX may represent a promising therapeutic strategy in head and neck cancers. ]

July 2025, [80] pages.

**Keywords:** [ WWOX, Hyaluronic Acid, Head and Neck Cancer ]

## 1. GİRİŞ

Baş ve boyun kanserleri (BBK), dünya genelinde en sık görülen yedinci kanser grubunu oluşturan, histolojik ve anatomik çeşitliliği yüksek malignitelerden biridir. Sıklıkla skuamöz hücreli karsinom formunda görülen bu tümörler; etiyoloji, klinik seyir ve tedaviye yanıt açısından heterojen bir tablo sergiler. Bu karmaşık yapının etkin yönetimi, biyobelirteçlere ve moleküler hedeflere dayalı kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesini zorunlu kılar.

Son yıllarda, hücrel mikroçevrenin yeniden şekillendirilmesinde etkili olan ekstrasellüler matriks (ECM) bileşenleri, tümör biyolojisinde önemli hedefler haline gelmiştir. Bu bileşenlerden biri olan hyaluronik asit (HA), özellikle CD44 aracılığıyla hücre proliferasyonu, invazyonu ve metastazda rol alarak kanser progresyonuna katkıda bulunur. HA'nın moleküler ağırlığına bağlı olarak değişen biyolojik etkileri, onu hem prognostik bir belirteç hem de terapötik bir hedef haline getirir.

Diğer yandan, WWOX (WW domain-containing oxidoreductase) geni, başta skuamöz hücreli karsinom (SHBBK) olmak üzere birçok solid tümörde baskılanmış olarak gözlemlenen bir tümör baskılayıcıdır. FRA16D bölgesinde yer alan bu gen, özellikle p53 ile iş birliği yaparak apoptoz, hücre döngüsü regülasyonu ve DNA hasar yanıtında görev almaktadır. Literatürde, WWOX'un düşük ifadesinin kötü prognoz ve tedavi direnci ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir.

Bu çalışmada, yüksek moleküler ağırlıklı hyaluronik asidin (HMW-HA) baş ve boyun kanseri hücre hattında WWOX ifadesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çalışmada hem in vitro hücre kültürü modelleri hem de moleküler biyoloji teknikleri kullanılarak, HMW-HA'nın WWOX aracılığıyla apoptoz, hücre canlılığı, hyaluronidaz aktivitesi ve gen/protein düzeylerindeki değişimleri değerlendirilmiştir. Bu bağlamda, HA-WWOX ekseninin baş-boyun kanserlerindeki terapötik potansiyeli ortaya konmaya çalışılmıştır.

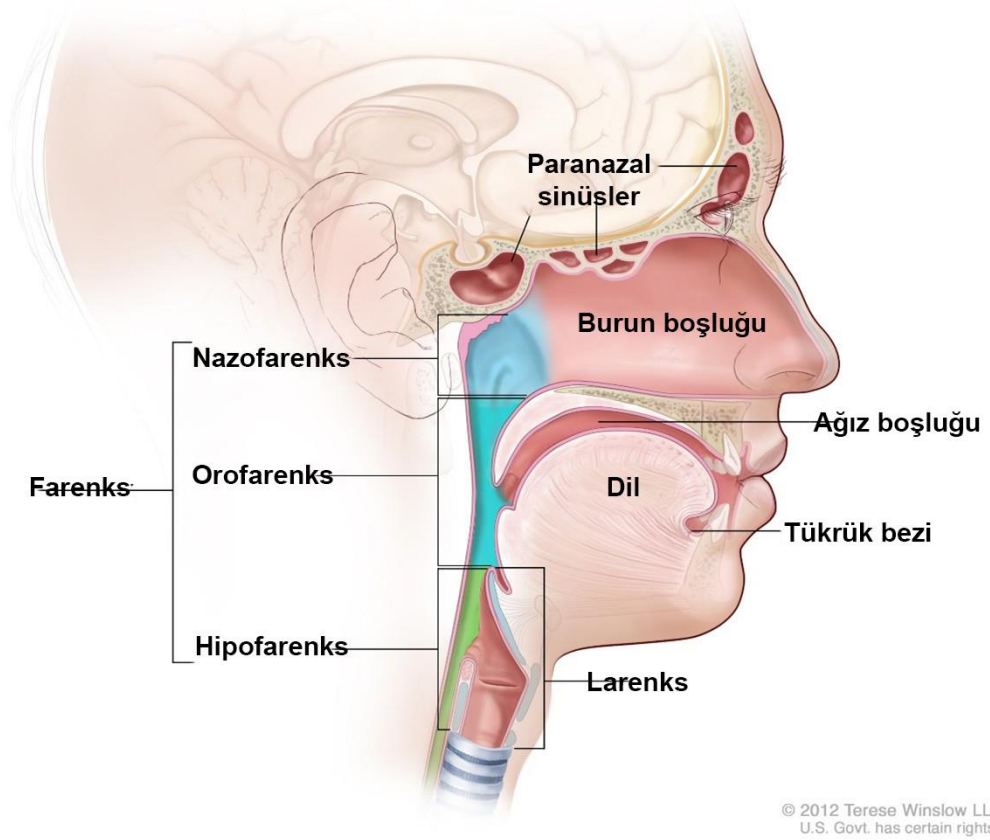
## 2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nun 2022 yılında yayınladığı GLOBOCAN verilerine göre kanser tanısı almış 20 milyon yeni vaka ve kansere bağlı 9,7 milyon ölüm gerçekleşmiş olup 5 yılda kanser tanısı alan kişilerin sayısının 53 milyonu bulacağını ileri sürmektedirler (Aupérin, 2020, Bray ve ark., 2024). Tüm insan kanserleri arasında baş ve boyun kanserleri; kanser biyolojisi, epidemiyolojisi ve tedavi zorlukları açısından en karmaşık grubu oluşturmaktadır.

### 2.1. Baş ve Boyun Kanseri (BBK)

BBK; paranasal sinüsler, burun boşluğu, ağız boşluğu, farinks ve larinksin epitel dokularında ortaya çıkan karmaşık bir habis oluşumdur (Argiris ve ark., 2008). Bu geniş anatomik dağılım, her biri kendine özgü klinik özellikler ve tedavi yaklaşımları gerektiren birçok alt bölgeyi kapsamaktadır. Ağız boşluğu; ağız, dil, diş etleri ve dudak kanserlerini içerirken, farinks kanserleri nazofarinks, orofarinks ve hipofarinks olarak alt bölgelere ayrılmaktadır (Şekil 2.1) (Aupérin, 2020). Larinks kanserleri ses kutusunu (voice box) etkilerken, salya bezleri, burun ve sinüslerde de farklı baş ve boyun maligniteleri gelişebilir (Aupérin, 2020).

## Baş ve Boyun Kanseri Bölgeleri



**Şekil 2.1:** Baş ve boyun kanserinde yer alan anatomik bölgeler (*National Cancer Institute*)

Baş ve boyun kanserleri çoğunlukla epitel yüzeyden köken aldığı için yaklaşık %90'ı skuamöz hücreli karsinom (SHBBK) olarak sınıflandırılır (Aupérin, 2020). Bu durum, baş ve boyun kanserlerinin anatomik çeşitliliği ile tezat oluşturarak tedavi standartlarının belirlenmesinde hem fırsatlar hem de zorluklar yaratır. Skuamöz hücre kökeni, bu kanserlerin biyolojik davranışı, tedaviye yanıtı ve metastazı etkiler (Argiris ve ark., 2008).

Baş ve boyun bölgesinin anatomik karmaşıklığı, multidisipliner tedavi yaklaşımlarını zorunlu kılar. Tedavi ekipleri genellikle baş ve boyun cerrahları, medikal onkologlar, radyasyon onkologları, radyologlar, plastik cerrahlar ve diş hekimlerinden oluşur. Ayrıca fiziksel ve ergoterapi uzmanları, konuşma ve yutma terapistleri ile beslenme uzmanları gibi destekleyici bakım uzmanları, hasta yönetiminde kritik rol oynar (Argiris ve ark., 2008).

## 2.2. Baş ve Boyun Kanserinde TNM Evreleme

Baş ve boyun kanserlerinde tümör boyutunu ve yayılımını standart bir şekilde değerlendirerek prognoz ve tedavi planlaması için TNM evreleme sistemi (Tablo 2.1) kullanılır. Bu sistem, primer tümörün özelliklerini (T), bölgesel lenf nodu tutulumunu (N) ve uzak metastaz varlığını (M) kapsamaktadır ve fiziki muayene, görüntüleme, cerrahi bulgular ile patoloji sonuçlarını bir araya getirerek en doğru evrelemenin yapılmasını hedefler (Huang and O'Sullivan, 2017, Zanoni ve ark., 2019). Hastalar I'den IV'e kadar sayısal evrelere ve gerektiğinde a/b/c alt bölümlere ayrılarak risk gruplarına ayrılır; böylece, benzer sağkalım oranlarına sahip homojen gruplar elde edilirken farklı evreler arasında anlamlı prognoz ayrımları korunur (Lydiatt ve ark., 2017). Amerikan Ortak Kanser Komitesi (AJCC) Kanser Evreleme Klavuzunun 8. baskısında insan papilloma virüsü (HPV)-pozitif orofarinks kanserleri için ayrı bir evreleme algoritması tanımlayarak, p16-pozitif tümörlerin farklı biyolojik davranış ve daha iyi sağkalım gösterdiğini kabul eder (Monden ve ark., 2019, Huang and O'Sullivan, 2017). Ayrıca farengeal kanserler tek başlık yerine nazofarenks, HPV-negatif orofarenks + hipofarenks ve HPV-pozitif orofarenks olarak üçe ayırmışlardır ve her alt bölgeye özgü kriterler getirmişlerdir (Monden ve ark., 2019, Lydiatt ve ark., 2017). Extranodal uzanım (ENE) ise viral ilişkili kanserler ile mukoza melanomu hariç tüm baş ve boyun kanserlerinde N kategorisine dahil edilerek, klinik ve patolojik bulgularla belirlenip yüksek prognostik değeri olan minör ve majör ENE ayrımı yapılmıştır (Monden ve ark., 2019, Zanoni ve ark., 2019).

**Tablo 2.1:** Baş ve boyun kanserinde TNM evreleme

<b>Kategori</b>	<b>Alt Kategori</b>	<b>Tanım</b>
<b>T (Primer Tumor)</b>	T0	Primer tumorün tanımlanamaması
	T1	≤2 cm (HPV-pozitif orofarinks kanserleri için)
	T2	>2–4 cm (HPV-pozitif orofarinks kanserleri için)
	T3	>4 cm veya lingual epiglot uzanımı (HPV-pozitif orofarinks kanserleri için)
	T4a	Orta derecede ilerlemiş lokal hastalık; genellikle cerrahi olarak rezektabl
	T4b	Çok ileri lokal hastalık; sıklıkla multimodal tedavi gerektirir
<b>N (Lenf Nodları)</b>	N0	Bölgesel lenf nodu tutulumu yok
	N1-N2	Klinik evrelemede boyut ve lateraliteye, patolojik evrelemede tutulan nod sayısına göre sınıflama
	N2a	Tek küçük boyutlu nod; extranodal uzanım yok
	N3b	Herhangi çapta extranodal uzanım var (minör veya majör ENE)
<b>M (Metastaz)</b>	M0	Uzak metastaz yok
	M1	Uzak metastaz var

**ENE (Extranodal Uzanım):** Minör ENE, kapsülden ≤2 mm uzanım; Majör ENE, kapsülden >2 mm veya çıplak gözle görülebilir invazyon.

### 2.3. Baş ve Boyun Kanseri Epidemiyolojisi

SHBBK, dünya genelinde yedinci en sık görülen kanser olup, GLOBOCAN verilerine göre yılda 890.000 yeni vaka ve 450.000 ölümle sonuçlanır (Barsouk ve ark., 2023, Bray ve ark., 2024). Bu küresel yk, tüm kanser tanılarının yaklaşık %4,5'ini ve kanserle ilişkili ölümlerin %4,6'sını oluşturur. Sıklık dağılımları coğrafi ve demografik olarak belirgin farklılıklar gösterir; Güney ve Güneydoğu Asya, Orta ve Doğu Avrupa ile Güney Amerika'da daha yüksek oranlar görülür (Barsouk ve ark., 2023). Erkeklerde kadına oranla yaklaşık 2:1'lik bir fark vardır; bu durum da tarihsel olarak tütün ve alkol kullanımındaki farklılıklardan kaynaklanır. Ancak, son epidemiyolojik eğilimler, özellikle gelişmiş ülkelerde genç nüfus ve kadınlarda risk faktörlerinin değişimiyle HPV ilişkili kanserlerin artışına işaret eder (Barsouk ve ark., 2023). Bu farklılıklar, sigara içme alışkanlıklarındaki değişimler ve HPV prevalansındaki artışla ilişkilendirilir (Barsouk ve ark., 2023).

### 2.4. Baş ve Boyun Kanserinin Risk Faktörleri ve Etiyolojisi

Baş ve boyun kanserlerinin başlıca risk faktörleri arasında tütün kullanımı, alkol tüketimi, HPV enfeksiyonu ve çeşitli çevresel maruziyetler yer alır. Tütün ve alkolün birlikte kullanılması, bu kanserlerin yaklaşık %75'inden sorumlu olup; ağır ve eşzamanlı kullanıldığı durumda, kanser riskini 40 kata kadar artırabilen sinerjistik etki gösterir (Barsouk ve ark., 2023, Gormley ve ark., 2022). Tütünün karsinojenik etkileri sigara, puro, pipo ve çiğneme tütünü de dahil olmak üzere tüm formlarını kapsar (Gormley ve ark., 2022).

Yüksek riskli HPV tipleri, özellikle orofarinks kanserlerinde giderek daha önemli bir etiyolojik faktör haline gelmiştir (Barsouk ve ark., 2023, Gormley ve ark., 2022). Daha çok genç bireyleri etkileyen HPV ilişkili baş ve boyun kanserleri sigara-alkol ilişkili olana kıyasla daha iyi prognoza sahiptir. Bu durumda ortalama sağkalım süresi 130 ay olarak bildirilirken, sigara-alkole bağlı hastalıklarda bu süre 20 ay olarak bildirilmiştir (Barsouk ve ark., 2023). Gelişmiş lkelerde HPV ilişkili vakaların, sigara ve alkol kaynaklı olanların insidansını aşması beklenmektedir (Barsouk ve ark., 2023).

Ek risk faktörleri arasında ttnsz olsa bile ağız kanseri riskini belirgin şekilde artıran betel cevizi (paan) iğneme bulunur. Bu alışkanlık Güney ve Güneydoğu Asya'da yaygın olarak gözlenmektedir ve bu bölgelerdeki yüksek insidansa katkıda bulunmaktadır (Barsouk ve ark., 2023, Gormley ve ark., 2022). Mesleki maruziyetler, yetersiz ağız sağlığı ve beslenme

eksiklikleri gibi çevresel faktörler de baş ve boyun kanseri gelişimine katkı sağlar (Gormley ve ark., 2022). Epstein–Barr virüsü ise özellikle nazofarinks karsinomlarıyla ilişkilendirilen diğer önemli bir infeksiyöz ajandır (Vasudevan and Yom, 2021).

## 2.5. Baş ve Boyun Kanserinde Klinik Bulgular ve Semptomlar

Baş ve boyun kanserleri, primer tümör yeri ve hastalığın yaygınlığına bağlı olarak çeşitlenen semptomlarla ortaya çıkar. Boyun, çene veya ağızda kalıcı kitleler; primer tümör veya metastatik lenf nodu tutulumunu işaret edebilir (Bradley ve ark., 2024). İyileşmeyen ağız ülserleri, ağız boşluğu kanserli hastaların çoğunda karşılaşılan sık bir bulgu olarak belirtilir (Bradley ve ark., 2024).

BBK, kritik anatomik yapıların tutulumu nedeniyle fonksiyonel bozukluklarla da seyredebilmektedir. Farinks veya yemek borusunu etkileyen tümörler, yutma güçlüğüne (disfaji) neden olarak yiyeceğin takılma hissi veya yutma sırasında ağrıya yol açabilir (Bradley ve ark., 2024). Larinks tutulumu veya yaygın olarak görülen ağız boşluğundaki tümörleşme konuşma bozukluklarına neden olabilirken; işitme kaybı veya kulak ağrısı ise işitsel sistem yakınlarındaki yapıların tutulumunu göstermektedir (Bradley ve ark., 2024).

Açıklanamayan kilo kaybı, kalıcı boğaz ağrısı ve kronik öksürük gibi sistemik semptomlar, ileri evre hastalık veya belirli anatomik tutulumları düşündürür (Bradley ve ark., 2024). Hastaların yaklaşık üçte ikisi ileri evrede tanı alır ve bu durum tedavi sonuçları ile sağkalım oranları üzerinde olumsuz etki gösterir (Argiris ve ark., 2008).

## 2.6. Baş ve Boyun Kanserinde Tanı ve Tedavi Yaklaşımları

Baş ve boyun kanseri tanısı; klinik değerlendirme, görüntüleme yöntemleri ve histopatolojik bulguların birlikte değerlendirilmesi ile yapılır. İlk değerlendirme, tütün ve alkol kullanımı, aile öyküsü ve çevresel maruziyetler gibi risk faktörleri üzerine ayrıntılı öykü alımını kapsar (Galbiatti ve ark., 2013). Ardından fiziki muayene, lenf nodu değerlendirmesi, ağız boşluğu muayenesi ve kraniyal sinir fonksiyonlarının incelenmesiyle kesin tanı konur (Georgopoulos and Liu, 2015).

Görüntüleme, tümör yayılımı ve tedavi planlamasında kritik rol oynar. Bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans görüntüleme ve pozitron emisyon tomografisi gibi ileri

yöntemler; tümörün boyutları, çevre yapılarla ilişkisi ve bölgesel veya uzak metastaz varlığı hakkında detaylı bilgi sağlamaktadır (Vishwanath ve ark., 2020).

Kesin tanı, malignite varlığını doğrulayan ve tümör özelliklerini belirleyen doku biyopsisi ve histopatolojik incelemeyi gerektirir. Biyopsi yaklaşımı, lezyonun yerine ve erişilebilirliğine göre; basit prosedürlerden, derin yerleşimli tümörlere yönelik cerrahi yaklaşımlara kadar değişmektedir (Abou-Foul ve ark., 2024).

Tedavide; cerrahi teknikler, radyoterapi uygulamaları ve sistemik tedavi seçeneklerindeki gelişmelerle önemli ölçüde ilerleme kaydedilmiştir. Başlıca tedavi modaliteleri; cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve hedefe yönelik tedavilerdir. Tedavi seçimi, tümör yeri, evre, hasta durumu ve organ koruyucu yaklaşımlar gibi birçok etkene bağlı olarak yapılır (Anderson ve ark., 2021).

İmmünoterapi alanındaki son gelişmeler, baş ve boyun kanseri yönetiminde yeni bir yol açmıştır. İmmün kontrol noktası inhibitörleri, hem nüks/metastatik dönemde hem de küratif tedavi rejimlerinde klinik fayda sağlamaktadır.

### **2.6.1. Hyaluronik Asitin Fonksiyonları**

Hyaluronik asit, dokularda yaygın olarak bulunan doğal bir glikozaminoglikandır ve moleküler ağırlığına bağlı olarak farklı biyolojik etkiler gösterir. Yüksek moleküler ağırlıklı HA (HMW-HA), dokuların bütünlüğünü koruyup anti-inflamatuar etkiler sağlarken, düşük moleküler ağırlıklı HA parçaları inflamatuvar yanıtları tetikleyebilir (Jiang ve ark., 2011, Lee-Sayer ve ark., 2015). Kanser mikroçevresinde HA, özellikle CD44 gibi reseptörler aracılığıyla tümör hücrelerinin proliferasyon, invazyon ve metastaz süreçlerinde önemli roller üstlenir (Vishwanath ve ark., 2020). Ayrıca, HA bazlı nanomateryaller, yüksek CD44 ekspresyonu gösteren kanser hücrelerini ve tümör ilişkili immün hücreleri hedefleyerek immünoterapötik ajanların etkinliğini artırmakta ve sistemik toksisiteyi azaltmaktadır (Kim ve ark., 2018, Lee ve ark., 2023, Pashkina ve ark., 2025).

### **2.6.2. Tedavide Hyaluronik Asitin Yeri**

Hyaluronik asit (HA), hem bağıışıklık düzenleyici bir ajan hem de gelişmiş bir ilaç taşıma sistemi olarak kanser immünoterapisinde önemli bir potansiyele sahip çok yönlü bir biyomateryal olarak öne çıkmaktadır. Ekstrasellüler matrikste bol miktarda bulunan doğal bir glikozaminoglikan olan HA, moleküler ağırlığına bağlı olarak çift yönlü immünolojik özellikler

gösterir. Yüksek moleküler ağırlıklı HA dokunun bütünlüğünü ve anti-inflamatuar yanıtları desteklerken, düşük moleküler ağırlıklı parçalanmış HA inflamatuvar yolları uyarabilir ve bağışık sistem hücrelerinin aktivasyonunu arttırabilir (Jiang ve ark., 2011, Lee-Sayer ve ark., 2015). Kanser tedavisinde, HA-temelli nano-materyaller; yüksek düzeyde CD44 ifade eden kanser hücreleri ve tümör ilişkili immün hücreleri ve immünoterapötik ajanların belirli hücreleri özgün şekilde hedeflemesini sağlayarak sistemik toksisiteyi en aza indirger (Lee ve ark., 2023, Kim ve ark., 2018, Pashkina ve ark., 2025). Ayrıca HA, protein bazlı aşular için etkili bir immünolojik adjuvan olarak işlev görmektedir. Antijenin immünojenitesini artırarak, güçlendirici doz gereksinimini azaltır ve antijenlerin enflamasyon oluşturmada lenf nodlarına taşınmasını kolaylaştırır (Dalla Pietà ve ark., 2021). Son yıllarda yapılan çalışmalar, HA-temelli taşıma sistemlerinin aynı anda tümör hücrelerinde immünojenik hücre ölümünü uyarabildiğini, tümör ilişkili miyeloid hücreleri anti-tümör fenotiplere doğru modüle edebildiğini ve immün kontrol noktası inhibitör tedavilerinin etkinliğini artırabildiğini göstererek kombine kemoterapi-immünoterapi yaklaşımları için ümit vaat eden bir strateji ortaya koymuştur (Rodella ve ark., 2025, Lee ve ark., 2023).

## **2.7. Hyaluronik Asitin Baş ve Boyun Kanserlerindeki Rolü**

HA, SHBBK ilerlemesinin kritik düzenleyicilerinden biri olarak görev yapmaktadır. Hem tümör dokularında hem de hasta tükürük örneklerinde HA düzeyinin yükselmiş olduğu rapor edilmiştir. Araştırmalar, SHBBK hastalarında HA düzeylerinin sağlıklı kontrollere kıyasla 4,9 kat daha yüksek olduğunu gösterirken, HA parçacıklarının moleküler ağırlık dağılımının tümör invazyonu ve tedavi direncini önemli ölçüde etkilediği bildirilmiştir (Franzmann ve ark., 2003). Ayrıca, 50 larenks kanserli hastadan ve 50 kontrol grubundan toplanan tükürük ve doku örneklerinde hyaluronidaz olarak görev yapan HYAL-1 ifadesindeki artış, hem HA'nın hem de hyaluronidazların larenks kanserinde rol alabileceğini göstermektedir (İnan ve ark., 2019) HA-CD44 reseptör eksenini, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve onun altındaki sinyal yollarını etkinleştirerek kanser hücre çoğalmasını, invazyonu ve kemoterapi direncini desteklemede merkezi rol oynamaktadır (Wang and Bourguignon, 2006, Kavitha ve ark., 2023). HPV-pozitif tümörler rezidüel p53 etkinliği ile viral onkoprotein (E6 ve E7) aracılı yollar üzerinden işlev gösterirken, HPV-negatif tümörler doğrudan tümör baskılayıcı genlerin baskılanması ile gelişmektedir. (Sun ve ark., 2020). Bu bulgular, HA metabolizmasının hem prognostik bir biyobelirteç hem de potansiyel bir terapötik hedef olarak

konumlanmasını sağlamış olup, hyaluronidaz temelli tedaviler geleneksel kanser tedavilerinin etkinliğini artırma potansiyeli taşımaktadır.

### 2.7.1. Hyaluronik Asit Metabolizması ve SHBBK'de Sentezi

Baş-boyun skuamöz hücreli karsinomda hyaluronik asit metabolizması hem sentez hem de yıkım enzimleri aracılığı ile tümör mikroçevresini etkiler. Hyaluronik asit sentezinin 3 izoformu (HAS1, HAS2, HAS3), ürettikleri HA polimerlerinin moleküler ağırlıklarına göre ayrılırlar: HAS1 200–2.000 kDa; HAS2 >2.000 kDa; HAS3 ise 100–1.000 kDa aralığında zincirler sentezler (Chen ve ark., 2018). Pan-kanser analizleri, HAS1 ifadesinin SHBBK dokularında normal dokuya kıyasla anlamlı derecede artmış olduğunu ve bunun da malign dönüşümde etkili olduğunu göstermektedir (Bao ve ark., 2023). Buradaki ifade artışı hem HAS3 aracılığıyla HA sentezini hem de HYAL-1 ve HYAL-3 aracılığıyla HA yıkımını kontrol eden ΔNp63 transkripsiyonel programı tarafından düzenlenir (Compagnone ve ark., 2017).

Hyaluronidazlar tarafından gerçekleştirilen HA yıkımı sonucu ortaya çıkan, farklı moleküler ağırlıklarda parçacıklar kanserin ilerlemesi üzerinde farklı biyolojik etkilere sahiptir. HYAL1, 20 kDa'dan küçük HYAL2 ise 20–50 kDa parçacıklar üretirken, her iki enzim de SHBBK tümörlerinde yüksek düzeyde ifade edilir. Bu enzimlerin etkinliği sonucunda, tümör mikroçevresinde 500 kDa'dan büyük yapısal komponentlerden 30 kDa'dan küçük pro-inflamatuar parçalara kadar farklı büyüklükte moleküller oluşur. HA'nın sürekli sentez ve yıkımı, molekül ağırlık geçişlerinin doğrudan kanser hücresi davranışını etkilediği dinamik bir sistem yaratmaktadır. Düşük molekül ağırlıklı parçalar genellikle invazyon ve metastazı teşvik ederken, yüksek moleküler ağırlıklı HA'nın koruyucu etkileri olabileceği düşünülmektedir (Chen ve ark., 2018).

Çalışmalar, HAS1 ifadesinin kromozomal kararsızlık, mikronükleus oluşumu ve sentrozom anormallikleri gibi kanser ilerlemesinin karakteristik özelliklerini tetiklediğini gösterir. Hücre bölünmesi süreçlerini değiştirebilen hücre içi kısa HA birikimi, klonal çeşitlilik ve genetik kararsızlık oluşturarak tümör evrimini hızlandırır. HAS1-ifade eden hücrelerde mikroçevredek oranlarının kontrole kıyasla anlamlı derecede yüksek olması, HA metabolizmasının agresif kanserlere özgü genomik kararsızlığa doğrudan katkıda bulunur (Nguyen ve ark., 2017).

### 2.7.2. CD44 Aracılı Sinyal Yolakları ve Hücresel Etkiler

CD44 reseptörü, baş-boyun kanserlerinde hyaluronik asit sinyalinin birincil aracısı olarak hem hücre adezyon molekülü hem de onkogenik yolakların kritik düzenleyicisi olarak işlev görür. CD44 ekspresyonu, normal dokuya kıyasla SHBBK örneklerinde anlamlı derecede yüksektir ve özellikle Evre 1, Grade 2 tümörlerde en üst düzeye çıkar. Bu artış, kötü sağkalım sonuçlarıyla güçlü biçimde ilişkili olup, özellikle HPV-negatif tümörlerde ve TP53 mutasyonu taşıyan örneklerde daha belirgin olarak görülmektedir (Kavitha ve ark., 2023).

HA-CD44 etkileşimi, membran reseptör kompleksleri oluşturarak doğrudan EGFR sinyalini etkinleştirir. HA bağlandığında CD44, EGFR ile birleşip fosforillenerek ERK yolağının etkinleşmesini tetikler. Bu sinyal yolağı, kanser hücresinin çoğalma ve göçünü destekler; anti-CD44 antikor tedavisinin HA aracılı EGFR fosforillenmesi ve ERK etkişenleşmesini durdurduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Wang and Bourguignon, 2006). Klinik açıdan,  $\Delta$ Np63 kaynaklı CD44 ifadesinin artması, EGFR sinyalinin etkinleşmesi ve ABCC1 ifadesinin artışıyla ilişkili olduğu gözlemlenmiştir ki bu durum da kemoterapi direncine neden olur (Compagnone ve ark., 2017).

CD44 ayrıca SHBBK'de kanser kök hücrelerinin belirteci olarak görev yapar; Lin<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup> alt popülasyonu, artmış kendini yenileme kabiliyeti, tümör başlatma potansiyeli ve konvansiyonel tedavilerde dirence neden olur. Bu durum da CD44-aracılı HA sinyalinin en agresif hücre popülasyonlarını koruduğunu ve genişlettiğini gösterir. CD44-HA etkileşimi aynı zamanda hücrelerin epitel-mezenkimal geçiş (EMT) sürecini düzenleyerek invazyon ve metastazı destekler (Trapasso and Allegra, 2012).

Farklı moleküler ağırlıktaki HA parçalarının CD44 ile etkileşimi, tümör progresyon paternlerini belirleyen farklı hücresel yanıtlar oluşturur. Yüksek moleküler ağırlıklı HA (>500 kDa), hücre-hücre temas inhibisyonunu taklit ederek büyümenin durmasına yol açabilirken; küçük fragmanlar (<10 kDa), farklı sinyal mekanizmaları aracılığıyla proliferasyona neden olur. Moleküler ağırlığa bağımlı bu sinyallenme, HA'nın kanserde hem başlatıcı hem de engelleyici etkileri göstermesinin ardındaki karmaşık rolü açıklar (Karousou ve ark., 2023).

### 2.7.3. Hyaluronik Asitin Moleküler Ağırlığına Bağlı Tümör Davranışları

Tümör mikroçevresindeki HA fragmanlarının moleküler ağırlık dağılımı, kanser progresyonu üzerindeki biyolojik etkilerini belirler. Yüksek moleküler ağırlıklı HA (>500 kDa), doku yapısını koruyarak yapısal destek sağlama ve invazyonu engelleme yoluyla antitümorojenik özellikler sergilemektedir. Chen ve ark.'nın yaptığı çalışmada, 500 kDa HA içeren hidrojellerde kültüre edilen kanser hücrelerinin invaziv potansiyelinin, daha düşük moleküler ağırlıklı HA fragmanlarına maruz kalanlara göre anlamlı biçimde azaldığını göstermişlerdir (Chen ve ark., 2018). Bu koruyucu etki, yüksek moleküler ağırlıklı HA'nın MAPK ve Akt yollarını inhibe ederek matris metalloproteinaz (MMP) üretimini baskılamasından kaynaklandığı ileri sürülmektedir (Chang ve ark., 2012, Chen ve ark., 2018).

Orta (50–350 kDa) ve düşük (<30 kDa) moleküler ağırlıklı HA parçaları ise çoğalma, adezyon ve invazyonu kolaylaştıran matris yıkıcı enzimlerin salgısını arttırarak aktif olarak kanser progresyonunu destekler. Düşük moleküler ağırlıklı parçalar, pro-inflamatuar ve pro-angiyojenik özellikleriyle tümör büyümesi ve metastaz için elverişli mikroçevre oluşturur (Chen ve ark., 2018). Hyaluronidaz aktivitesiyle bu fragmanların oluşumu, pozitif bir geri bildirim döngüsü yaratarak daha fazla enzim üretimi ve matrisin yeniden şekillenmesini tetikler.

Yüksek hyaluronidaz etkinliği gösteren tümörlerin ise artan düşük moleküler ağırlıklı parça üretimleri nedeniyle daha invaziv ve kötü prognozlu olduğu bildirilmiştir. SHBBK hastalarının tükürük örneklerinde HA ve hyaluronidaz aktivitesinin sırasıyla 4,9 ve 3,7 kat artmış olması, sentez ve yıkım dengesinin değiştiğini göstermektedir (Franzmann ve ark., 2003).

### 2.7.4. Hyaluronik Asitin Prognostik Önemi

HA ve ilgili reseptörlerin ifadelerinin düzeyleri, hasta sağkalımı ve hastalık progresyonu ile ilişkili olduğu için prognostik değer taşımaktadır. Yüksek stromal HA ifadesi, özellikle HPV-negatif oral kavite kanserlerinde nüksüz sağkalımın kötü olması ile ilişkilidir. Bu prognostik önem, HPV-negatif orofaringeal kanserlerde gözlenmemekte, baş-boyun bölgesinin farklı anatomik konumlarında alt tiplere özgü mekanizmaların farklı olduğuna işaret eder (Sun ve ark., 2020).

RHAMM (receptor for hyaluronic acid-mediated motility) da SHBBK'de umut vadeden bir prognostik belirteç olarak öne sürülmektedir. Örneklerin %73'ünde protein düzeyinde tespit edilen RHAMM ifadesi, artmış hücre proliferasyonu ve azalmış hasta sağkalımı ile

ilişkilidir (Schmitt ve ark., 2009, Shigeishi ve ark., 2014). RHAMM tetramerlerini tanıyan HLA-A2<sup>+</sup> hastaların %0,06–0,13'ü CD8<sup>+</sup> efektor T hücrelerinin interferon- $\gamma$  ve granzyme B salgıladığı gözlemlenmiştir ki bu durum da aktif immün tanımayı gösterir (Schmitt ve ark., 2009).

### 2.7.5. Tedavide HA Hedeflenmesi

HA'nın SHBBK progresyonundaki merkezi rolü, enzimatik deplezyon stratejilerinden hedefe yönelik ilaç taşıma sistemlerine kadar çeşitli terapötik yaklaşımları gündeme getirmektedir. PEGillenmiş insan hyaluronidaz (PEGPH20), tümör mikroçevresinden HA'yı enzimatik olarak temizleyerek ilaç dağılımını ve tedavi etkinliğini artırmayı amaçlayan bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır. Faz III klinik çalışmalarda kemoterapi kombinasyonları sınırlı başarı gösterse de, PEGPH20'nin tümör oksijenasyonunu iyileştirerek radyosensitizasyon sağlama potansiyeli umut vadetmektedir (Seki ve ark., 2022).

Hyaluronidaz, konvansiyonel SHBBK tedavilerine adjuvan olarak da klinik fayda sağlamaktadır; ileri evre baş-boyun tümörlü 48 hastada radyoterapi ve kemoterapiye eşlik eden hyaluronidaz kullanımının, beş yıllık nüksüz sağkalımı %47'ye çıkardığı ileri sürülmüştür. Kemoterapi rejimi cisplatin, ve hyaluronidaz kombinasyonunu içerirken; mukozit, bulantı, ve periferik nöropati gibi yan etkiler rapor edilmiştir (Klocker ve ark., 1998).

HA-CD44 eksenini, CD44-ekspresör hücre yüzeylerine özgü nanotaşıyıcı sistemlerle hedefe yönelik ilaç salımı için fırsatlar sunmaktadır. Bu HA-temelli nanotaşıyıcılar, CD44<sup>+</sup> kanser hücrelerini seçici olarak hedeflerken normal dokularda sistemik toksisiteyi azaltır (Xu ve ark., 2023).

### 2.7.6. Hyaluronik Asitin Tümör Mikroçevresi ile Etkileşimi

Baş-boyun skuamöz hücreli karsinomun mikroçevresi; kanser hücreleri, stromal bileşenler ve immün hücreler arasında karmaşık etkileşimlere sahiptir. HA bu ilişkilerin merkezi düzenleyicisidir. Tümör sınır bölgelerinde farklı moleküler ağırlıklı HA konsantrasyonları, invazyon yolları oluşturarak kötü prognostik sonuçlarla ilişkilendirilir (Chen ve ark., 2018). Stromal kanser ilişkili fibroblastlar ve Hyal2<sup>+</sup> myeloid kaynaklı baskılayıcı hücreler arasındaki etkileşim, HA parçalanmasını artırarak pro-inflamatuar fragman birikimine yol açar ve tümör ilerlemesini destekleyen iltihabi bir ortam yaratır. HA-zengin stroma myeloid türevli baskılayıcı hücrelerin PD-L1<sup>+</sup> tumor ilişkili makrofajlara dönüşümüne neden olarak immunosupresif bir mikroçevre oluşturur. Bu durum, immünoterapilere yanıtı

engellediğinden SHBBK hastalarında değişken tedavi sonuçlarını açıklamaktadır (Donelan ve ark., 2022).

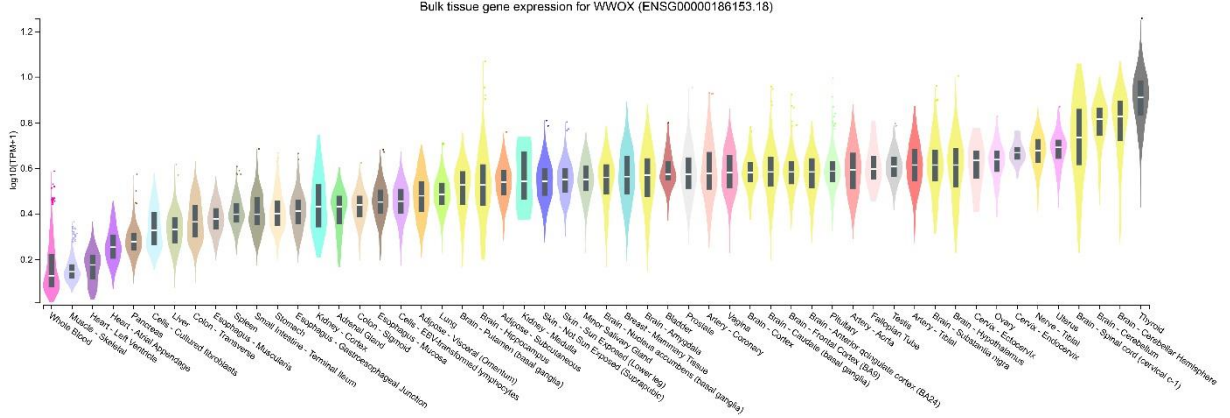
Anjiyogenez açısından, düşük moleküler ağırlıklı HA parçaları endothelial hücre CD44 reseptörlerini tetikleyip Ezrin yolunu etkinleştirerek yeni damar oluşumuna neden olmaktadır. Buna karşın uzun HA fragmentleri, Merlin sinyalini etkinleştirerek proliferasyonu baskılar (Karousou ve ark., 2023).

HA'nın bu dinamik mikroçevresel etkileri, onun sadece fiziksel bir bileşen olmadığını, aynı zamanda hücre içi sinyal yollarında doğrudan görev alan bir düzenleyici olduğunu gösterir (Jiang ve ark., 2011). Hyaluronidaz enzimleri, HA'nın parçalanmasıyla tümör mikroçevresindeki dinamikleri doğrudan yönlendirir. Hyaluronidaz-2 (HYAL2) ifade eden myeloid kaynaklı baskılayıcı hücreler (MDSC'ler), HA üreten kanser ilişkili fibroblastlarla etkileşerek pro-inflamatuar HA parçalarının birikimine yol açar (Donelan ve ark., 2022). Bu parçalar sadece immünosupresif mikroçevreyi güçlendirmekle kalmaz, aynı zamanda HYAL2/WWOX/SMAD4 sinyal ağı aracılığıyla hücre içi tümör baskılayıcı mekanizmaları düzenler.

Hyaluronan ile WWOX arasındaki ilişki, ekstraselüler matriks sinyallemesi ile tümör baskılama mekanizmalarının kritik bir kesişimini oluşturmaktadır. Araştırmalar, bu moleküllerin HYAL2 ve SMAD4'ü içeren karmaşık bir sinyal ağına katılarak hücre ölümü, kanser ilerlemesi ve tedaviye yanıtları düzenlediklerini göstermektedir (Hsu ve ark., 2017, Taouis ve ark., 2021, Hsu ve ark., 2016). Bu yolak, ekstraselüler matriks bileşenlerinin hücre içi tümör baskılayıcı fonksiyonları doğrudan nasıl etkileyebileceğini ortaya koyarak kanser biyolojisi ve potansiyel terapötik hedefler hakkında yeni görüşler ortaya çıkarmaktadır.

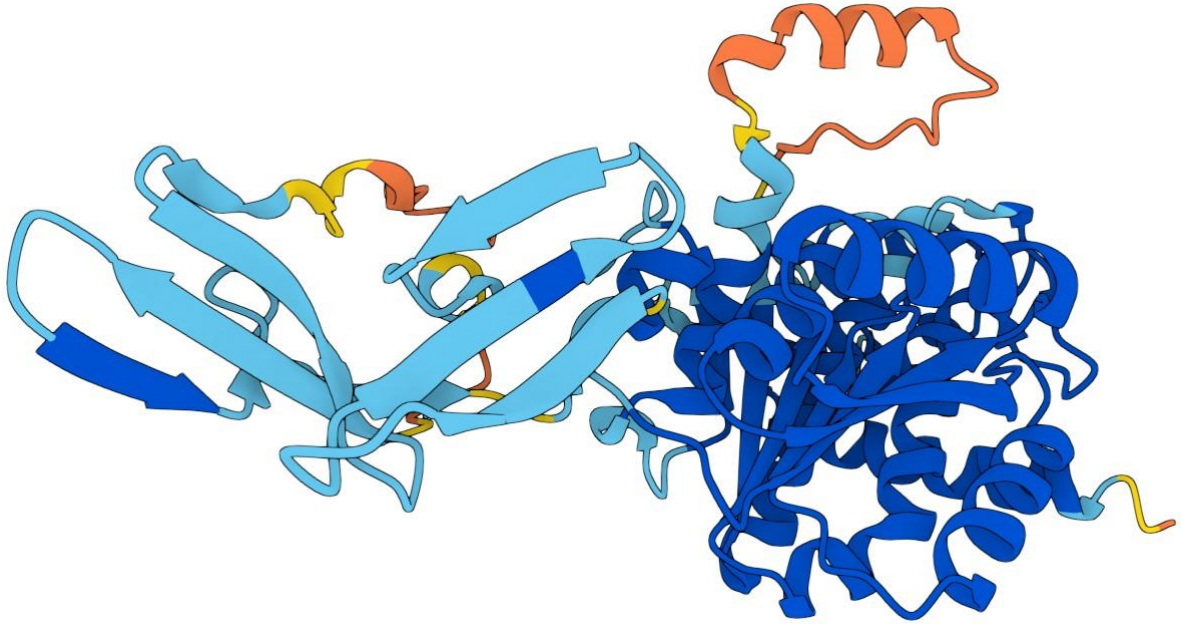
## 2.8. WWOX Geni ve Proteini

WWOX geni, kromozomun 16q23.3-q24.1'in replikatif stres koşullarında kromozomal kırılma ve delesyonlara yüksek duyarlılık gösteren FRA16D kırılğan bölgesinde konumlanır (Koşla ve ark., 2020, Ehaideb ve ark., 2018). Çoğu insan genine kıyasla farklı bir yapıya sahip olan WWOX geni 1.1 megabazı aşan DNA'sı içinde yalnızca 414 amino asitlik bir protein kodlar. Bu istisnai gen uzunluğu, primer transkriptinin %98'den fazlasını intronik dizilerin oluşturduğu en uzun genler arasında yer almasını sağlar (Lee ve ark., 2021). WWOX geni en yüksek düzeyde tiroid dokusunda, en düşük düzeyde ise düz kasta ifade edilir (Şekil 2.2).



**Şekil 2.2:** WWOX geninin dokulardaki ifade düzeyi (GTExPortal, (Coorens ve ark., 2025))

WWOX, karmaşık alternatif splicing ile birçok transkript varyantı üretebilen dokuz ekzon içermektedir. Ana transkript FORII, tüm ekzonları kapsayarak tam uzunlukta 414 amino asitlik proteini üretirken, FORI gibi alternatif transkriptler farklı ekzon kombinasyonları sonucu üretilir (Paige ve ark., 2001, Lee ve ark., 2021). Alternatif splicing etkinlikleri, kanserle ilişkili transkript varyantlarının oluşumunu artırarak, ekzon 5-8 kaybı gibi kısa transkriptlerin ortaya çıkmasına ve sonuçta tümör baskılayıcı etkinliğin yitirilmesine neden olur (Paige ve ark., 2001). WWOX'un tam transkripsiyonu uzun sürdüğü için özellikle hızla bölünen hücrelerde bir hücre döngüsünün uzunluğuna eşit ya da daha fazla zaman alması, gen uzunluğunun transkripsiyonel düzenleme üzerindeki işlevsel etkisini vurgular (Lee ve ark., 2021). WWOX proteini, N-ucunda yer alan iki WW alanı ve C-ucunda bulunan bir SDR alanından oluşan yapısıyla, hem protein-protein etkileşimlerinde işlev gösterirken hem de katalitik bir rol üstlenebilir (Farooq, 2015, Lee ve ark., 2021). Yaklaşık 46 kDa ağırlığındaki bu protein (Şekil 2.3), prolin-içeren motifleri (PPXY, LPXY, LPXF) tanıyan birinci WW alanı (WW1) aracılığıyla birçok etkileşimde rol oynamaktadır (Saigo ve ark., 2018, Farooq, 2015). İkinci WW alanı (WW2), ilk alanın bağlanma aktivitesini düzenleyen bir şaperon gibi işlev görmektedir (Farooq, 2015). C-ucundaki SDR alanı ise NAD(P)(H)-bağımlı oksidoredüktaz süper ailesine ait olarak, hücrel steroid ve retinoidlerin redoks reaksiyonlarına katalizör olarak katkı sağlayabilir (Abu-Remaileh and Aqeilan, 2014, Mahmud ve ark., 2021).



**Şekil 2.3:** WWOX proteini katlanma yapısı (AlphaFold veritabanı, <https://alphafold.ebi.ac.uk/>)

WW alanları arasında bulunan nükleer lokalizasyon sinyali, WWOX'un sitoplazmik ve çekirdek arasında taşınmasına izin vererek hem sitoplazmik sinyalizasyonu hem de çekirdek yazılımsal düzenlemeyi koordine etmesini sağlar (Mahmud ve ark., 2021).

## 2.9. WWOX ve Kanser

WWOX; hücre ölümü, hücre döngüsü kontrolü, DNA hasar yanıtı ve metabolik yolların düzenlemesi gibi süreçleri düzenleyen bir proteindir (Koşla ve ark., 2019, Koşla ve ark., 2020). Temel mekanizma, p73, c-Jun, AP-2 $\gamma$ , ErbB4 ve Gli1 gibi transkripsiyon faktörlerini sitoplazmada tutarak çekirdekteki etkinliklerini engeller (Koşla ve ark., 2019). Metabolik olarak ise WWOX, HIF1 $\alpha$ 'ya bağlanarak onun kararlılığını düşürmekte ve Warburg etkisini tersine çevirerek mitokondriyal oksidatif metabolizmayı destekler; böylece kanser hücrelerinin tipik glikoliz bağımlılığını engeller (Abu-Remaileh and Aqeilan, 2014, Koşla ve ark., 2020). WWOX eksikliği glukoz alımını artırıp laktat üretimini yükseltirken mitokondriyal solunumu azaltmaktadır; bu da tümör büyümesine neden olur (Abu-Remaileh and Aqeilan, 2014).

Meme, akciğer, karaciğer, mide, over ve pankreas kanserlerinde heterozigotluk kaybı ve ifadesinin azalması WWOX'un tümör baskılayıcı olarak görür (Saigo ve ark., 2018, Ehaideb ve ark., 2018, Koşla ve ark., 2020). Knudson'un çift vuruş hipotezine benzer biçimde, eksikliği

çoğu tümörde gözlemlense de tam bialelik inaktivasyon nadiren görülmekle birlikte daha çok hücre hatlarına özgü olduğu ileri sürülmüştür (Lewandowska ve ark., 2009, Saigo ve ark., 2018). WWOX, p53 aracılı apoptoz yanıtlarını güçlendirip, TNF- $\alpha$ -bağlı ölüm sinyalini desteklerken DNA onarım mekanizmalarıyla genom bütünlüğünü koruyarak kanser gelişimini engeller (Saigo ve ark., 2018, Kośla ve ark., 2020). Özellikle glioblastomada düşük WWOX ifadesi yüksek invazyon ve radyasyona dirençle, yüksek ifade ise artmış radyasyon hasarı ve azalmış çoğalma ile ilişkilidir (Kośla ve ark., 2019, Kośla ve ark., 2020).

### 2.9.1. WWOX'un Baş ve Boyun Kanserindeki Yeri

SHBBK tümör dokularında WWOX ifadesi normal komşu mukoza ile karşılaştırıldığında anlamlı şekilde azalır. 80 SHBBK tümör örneği üzerinde yapılan bir çalışmada, vakaların %76,3'ünde WWOX ifadesinin normal dokulara kıyasla azaldığı ve ifade düzeylerinde 3,5 katlık istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandığı bildirilmiştir (Ekizoglu ve ark., 2015). Aynı durum başka bir çalışmada, baş ve boyun bölgesindeki farklı anatomik alanları kapsayan tümör tiplerinde de gözlenir; örneğin oral skuamöz hücreli karsinomda vakaların %50'sinde WWOX ifadesinde değişiklik tespit edilmiş ve bazı tümörlerde transkriptlerin tamamen kaybolduğu ileri sürülmüştür (Pimenta ve ark., 2006). Ayrıca WWOX'un azalan ifadesi Dvl proteinlerinin çekirdeğe geçişini arttırarak SHBBK'nin ilerlemesinde rol aldığı bildirilmiştir (Celebi ve ark., 2020).

WWOX ifade düzeyindeki azalma, hastalığın ilerlemesi ve tümör özellikleriyle ilişki göstermektedir. Özellikle ileri evre tümör örnekleri ve skuamöz hücreli karsinom histolojisine sahip vakalarda bu azalma gözlenir (Ekizoglu ve ark., 2015). Larenks kanserinde WWOX ifade kaybı hastaların %46,8'inde gözlenmiş olup, ifade düzeyi ile tümör ilerlemesi arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur (Çağlar ve ark., 2013). Ayrıca nazofarenks karsinomu dokularında da WWOX ifadesi azalmakta; düşük ifade düzeyi, hastalığın ilerlemesi ve lenf nodu metastazı ile ilişkilidir (Qin ve ark., 2017, Mo ve ark., 2017).

Çeşitli mekanizmalarla WWOX'un baskılanmasının altında yatan süreçler, baş ve boyun kanseri tedavisi için farklı terapötik yaklaşımlar ortaya çıkarmaktadır. DNA metillenmesi veya histon modifikasyonlarını hedefleyen epigenetik yaklaşımlar, hipermetile promotere sahip tümörlerde WWOX ifadesi yeniden kazandırılabilirliğini düşündürmektedir (Gürsel Ürün ve ark., 2023). Benzer şekilde, miR-134'e yönelik antisense oligonükleotidler veya küçük molekülü inhibitörler, mikroRNA aracılı baskılama yaşayan

tümörlerde WWOX işlevini geri getirebildiği ileri sürülmüştür (Liu ve ark., 2014). Preklinik çalışmalarda, kanser hücrelerinde WWOX ifadesinin geri kazandırılmasının tümörjeniteyi önemli ölçüde azalttığı ve konvansiyonel tedavilere duyarlılığı artırdığı gösterilmiştir (Yang ve ark., 2017, Mo ve ark., 2017).

Bu tez çalışmasında biz de benzer amaçla yola çıkarak baş ve boyun kanserinde moleküler ağırlığı yüksek hyaluronik asitin WWOX üzerindeki etkisini araştırmayı amaçladık. Araştırma sorularımız:

- Moleküler ağırlığı yüksek hyaluronik asitin baş-boyun kanserli ve normal hücre hatları üzerindeki hücre etkinliği nedir?
- Moleküler ağırlığı yüksek hyaluronik asit ile muamele edilmiş hücre hatlarında WWOX'un etkinliğini arttırarak kanserleşme önlenbilir mi?
- WWOX'un ifade düzeyi nasıl etkileniyor, hücresel yerleşiminde bir değişiklik gerçekleşiyor mu?
- Moleküler ağırlığı yüksek hyaluronik asitin normal ve kanserli hücrelerdeki etkinliği nedir?

Sorularına cevap bulmak için bu çalışma tasarlanmıştır.

### 3. YÖNTEM

#### 3.1. Moleküler Yerleştirme (Molecular Docking)

Moleküler Yerleştirme için AutoDock Vina'yı kullanan CB-Dock2 web tabanlı platform kullanıldı (Liu ve ark., 2022). CB-Dock2 iki farklı iş akışı sunmaktadır. Bunlardan ilki sadece proteindeki potansiyel bağlanma boşluklarını tespit eden "Search Cavities" iş akışı, diğeri ise hem boşlukları tespiti hem de bu boşluklar üzerinde gerçekleştirilen otomatik kör yerleştirme "Auto Blind Docking" iş akışıdır. Biz çalışmamızda Auto Blind Docking iş akışını kullandık.

#### 3.2. Hücre Kültürü

Hücre hattı deneyleri, normal yemek borusu HET-1A (Kat.No. CRL-2692, ATCC, ABD) ve skuamöz hücreli dil kanseri SCC-25 (Kat.No. CRL-1628, ATCC, ABD) hücre hatları kullanılarak gerçekleştirildi.

*Hücrelerin açılması:* Kriyotüp içerisinde gelen hücreler 37°C olarak ayarlanmış su banyosunda çözüldükten sonra DMEM-F12 (Kat.No. 11320033, Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak hazırlanan büyüme medyumuna alındı (Tablo 3.1). 37°C'de ısıtılan medyum, 15ml'lik santrifüj tüpüne aktarılıp üzerine kriyotüpte bulunan 1ml'lik çözelti eklendi. 125xg'de 5dk santrifüjlendikten sonra üstte kalan sıvı uzaklaştırılıp pelet üzerine 1ml büyüme medyumunu eklenerek çözülmesi sağlandıktan sonra içinde 10ml büyüme medyumunu bulunan T25 kültür flasklarına ekildi. Hem HET-1A, hem de SCC-25 hücre hatları için aynı işlem uygulandı.

**Tablo 3.1:** Büyüme medyumunun içeriği

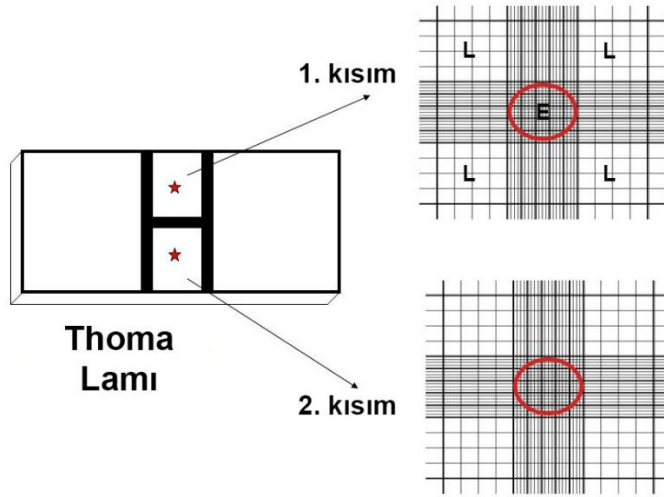
DMEM-F12 bazal medyumuna;
- 400ng/ml hidrokortizon
- %10 fetal bovin serum (FBS)
- 100U/ml penisilin-streptomisin karışımı eklendi.

*Hücrelerin pasajlanması:* Converted ışık mikroskopunda incelendiğinde minimum %70 hücre yoğunluğana ulaşıldığı zaman pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Büyüme medyumu flasktan uzaklaştırılarak, hücrelerin yapışmış olduğu flask tabanından kaldırılması için 3ml Tripsin EDTA eklenerek 4-5dk süreyle %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C'lik etüvde inkübe edildi. Daha sonra tripsinin etkinliğini durdurmak amacıyla tripsin miktarının 2 katı 6ml büyüme medyumu eklendi ve kazıma işlemi sonrası hücreler 15ml'lik santrifüj tüplerine alınarak 125xg'de 5dk süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst sıvı atılarak hücre sayımını gerçekleştirmek için üzerine 1ml büyüme medyumu eklenip karıştırıldı. Sayımı yapılan hücrelerden  $7 \times 10^5$  hücre alınarak içinde 10ml büyüme medyumu içeren yeni flaslara ekim gerçekleştirildi.

*Hücrelerin dondurulması:* Pasajlama işlemi sonunda yeterli miktarda ekim gerçekleştirildikten sonra kullanılmayan hücreler  $1 \times 10^6$  adet olacak şekilde kriyotüplere alınarak üzeri 950µl büyüme medyumu ile tamamlanarak, hücrelerin donma aşamasında patlamasını önlemek amacıyla 50µl Dimetil Sülfoksit (DMSO) eklenerek sıvı azot içerisinde saklandı.

### **3.3. Hücrelerin Sayımı ve 6-Kuyulu, 24-Kuyulu Plakalara Ekimi**

Açıldıktan sonra 4 pasaj geçiren hücreler yeterli yoğunluğa ulaştığında flasktan kaldırılarak santrifüjlendi. Elde edilen hücre ve büyüme medyumu karışımından 10µl alınarak 1,5ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve üzerine 10µl tripan mavisi (Kat.No. 15250061, Thermo Fisher Scientific, ABD) eklenerek thoma lamı üzerindeki üst ve alt alanlara alındı. Thoma lamındaki her iki bölge de sayılarak aşağıdaki formüle göre 1ml'de yer alan hücre sayısı hesaplandı (Şekil 3.1).



**Şekil 3.1:** Thoma lamında sayımı yapılan alanlar

1ml'deki hücre sayısı aşağıdaki formül ile hesaplandı.

$$1\text{ml'de hücre sayısı} = \frac{1. \text{Kısımdaki hücre sayısı} + 2. \text{Kısımdaki hücre sayısı}}{2} \times \text{Dilüsyon Katsayısı} (1) \times 10^4$$

Sayım tamamlandıktan sonra RNA ve protein eldesi için 6-kuyulu plakanın her bir kuyusuna  $3 \times 10^5$  hücre, MTT, LDH Assay ve Annexin-V Assay deneyleri için 24-kuyulu plakanın her bir kuyusuna  $5 \times 10^4$  hücre, hyaluronik asit ölçümü için ise 96-kuyulu plakalara  $1 \times 10^4$  adet hücre ekildi.

#### 3.4. Yüksek Moleküler Ağırlıklı Hyaluronik Asit Uygulaması

Normal (HET-1A) ve kanser (SCC-25) hücre hatları T25 flaklarda etüvde  $37^\circ\text{C}$ 'de %5  $\text{CO}_2$ 'de hücreleri üretilmiş ve pasajlaması gerçekleştirilmiştir. İlk 4 pasajını tamamlayan hücrelere farklı derişimlerde (0-25-50-100-200  $\mu\text{g/ml}$ ) yüksek moleküler ağırlıklı hyaluronik asit (HMW-HA, 2,000,000-2,400,000Da) (Kat.No. 73641, Merck, ABD) uygulanmıştır.

#### 3.5. Hücre Canlılık Testi (MTT Assay)

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide kullanılarak farklı derişimlerde HMW-HA ile muamele edilmiş hücre hatlarının hücre canlılık durumları incelenmiştir. MTT analizinde her bir deney grubu için 96 kuyulu plakalara yaklaşık 1000 hücre ekildi. HMW-HA uygulaması sonrasında medyumunu değiştirilen hücrelerin üzerine  $10\mu\text{l}$  MTT

çözültüsü eklenip etüvde 37°C’de %5 CO<sub>2</sub>’de 4 saat bekletildikten sonra tüm kuyulara 50µl DMSO eklenip 10dk süreyle etüvde 37°C’de %5 CO<sub>2</sub>’de bekletilerek ELISA okuyucuda 540nm’de absorbans değerleri ölçüldü ve buna dayanarak uygun HMW-HA miktarı belirlendi.

### 3.6. LDH Sitotoksisite Testi

MTT testine ek olarak IC<sub>50</sub>’si belirlenen deney gruplarına LDH sitotoksisite testi yapıldı. LDH sitotoksisite testi için “CyQuant LDH Cytotoxicity Assay Kit” (Kat.No. C20301, Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanıldı.

Kit protokolüne göre; seri dilüsyonu yapılan hücreler (0-10000 cells/100µl) iki set ve üçerli tekrarlar şeklinde 96 kuyulu plakalara ekildi. Bu iki setten ilki Maksimum LDH Salınımı veren hücrelerin lizatlarını oluşturacak olup, ikinci set ise Spontan LDH Salınımı veren hücreleri oluşturacaktır. Hücre ekildikten sonra gece boyunca 37°C’de %5 CO<sub>2</sub>’de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra Maksimum LDH Salınımı setinde yer alan örneklerin üzerine 10µl parçalama solüsyonu eklenip pipetlenerek karıştırıldı. Spontan LDH Salınımı setinde yer alanlara ise aynı miktarda steril su eklenip pipetle karıştırıldı. Ardından 37°C’de %5 CO<sub>2</sub>’de 45dk süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında tüm örneklerin üzerine 50µl medyum eklendikten sonra yine tüm örneklerin üzerine 50µl reaksiyon karışımından eklenerek pipetlemesi yapıldı ve oda sıcaklığında 30dk süreyle ışıktan korunarak inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında 50µl durdurucu solüsyon eklenerek tüm örnekler 490nm ve 680nm’de okundu.

LDH sitotoksisite testinin analizi için önce Maksimum LDH Salınımı grubundaki örneklerin 490 nm’deki absorbansından 680 nm’deki absorbans değeri çıkarılarak LDH aktivitesi hesaplandı. Aynı işlem Spontan LDH Salınımı grubundaki örnekler için de tekrarlandı. Son olarak, her bir numunenin sitotoksisite oranını belirlemek üzere, Maksimum LDH Salınımı grubunda elde edilen LDH aktivitesi değerlerinden Spontan LDH Salınımı grubundaki karşılık gelen değerler çıkarıldı.

### 3.7. HA ELISA Ölçümü

HA ELISA ölçümü, All species Hyaluronic Acid ELISA Kit (Kat.No. LS-F24989, LifeSpan BioSciences, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. MTT sonrası HMW-HA miktarı

belirlendikten sonra hücreler tekrar 24-kuyulu plakaya ekildi. Hücreler yeterli yoğunluğa ulaştıklarında toplanarak, hücre lizatı elde edilmek üzere işleme alındı.

*Hücre lizatı için*, 24-kuyulu plakadan toplanan hücreler 1X PBS ile 3 kez yıkandı ve sonikatörde %20 güç 5 döngü 20sn olacak şekilde parçalama işlemi gerçekleştirildi. 2-8°C'de 1500xg'de 10dk santirifüjlenerek süpernatant toplandı. Elde edilen lizatlar kullanılıncaya kadar -80°C'de saklandı.

Her bir örnek; 1:100 olacak şekilde sulandırıldı. Std1 (400 ng/ml), Std2 (133,3 ng/ml), Std3 (44,43 ng/ml), Std4 (14,81 ng/ml), Std5 (4,937 ng/ml), Std6 (1,646 ng/ml), Std7 (0,548 ng/ml) ve Std0 (0 ng/ml) olmak üzere 8 farklı standart hazırlandı.

Standartlar ve örnekler hazırlandıktan sonra 96-kuyulu plakanın her bir kuyusuna ayrı ayrı 50'şer µl standartlar ve örnekler eklendi. Üzerine 50 µl Tespit Reaktif A eklendikten sonra 37°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyulardaki sıvı boşaltılarak 350 µl Yıkama Solüsyonu ile 3 kez kuyuların yıkanması gerçekleştirildi. Yıkama solüsyonu her eklendiğinde kuyuda yaklaşık 1-2dk süreyle bekletildi. Son yıkamadan sonra 96-kuyulu plaka ters çevrilerek kurutma kağıdı yardımı ile emdirilerek kurutuldu.

Daha sonra her bir kuyuya Tespit Reaktif B eklenerek 37°C'de 30dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tekrar Yıkama Çözeltilisi ile 5 kez yıkama işlemi gerçekleştirildi. Yıkama işleminden sonra her bir kuyuya 90 µl TMB solüsyonu eklendi ve 37C'de 15dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası her bir kuyuya 50 µl Durdurma Solüsyonu ilave edilerek 450nm'de ölçüm alındı.

### **3.8. Anneksin V-FITC Apoptoz Assay**

Anneksin V Apoptoz Assay, eBioscienc Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Kat.No. BMS500FI-100, Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Hücreler önce PBS ile pipetlenerek yıkandı. Ardından 200µl'lik 1X Bağlanma Tamponu ile süspanse edilip hücre yoğunluğu 3x10<sup>5</sup> hücre/ml olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra elde edilen bu karışımdan 195 µl alarak üzerine 5 µl Annexin V-FITC eklendi ve karışım oda sıcaklığında 10dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler tekrar 200 µl Bağlanma Tamponu ile yıkandı ve 190 µL taze tampon içinde süspanse edildi. Son adımda 10 µl, 20 µg/ml'lik Propidium İyodür eklenerek hücrelerin apoptotik ve nekrotik oranları, akış sitometrisi analizi

ile değerlendirildi. Apoptozun değerlendirilmesi, sadece APC pozitif hücreler ile erken apoptozu, APC ve PI çift pozitif hücrelerin varlığı ile de geç apoptozun değerlendirilmesi gerçekleştirildi.

### 3.9. RNA Eldesi

PureLink™ RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak RNA izolasyonu, üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirildi. Yaklaşık  $1 \times 10^6$  hücreye 500  $\mu$ l lizis tamponu ve 5  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptolanol eklenip, hücreler  $2600 \times g$ 'de 5dk santrifüj edildi. Üstteki süpernatant alındıktan sonra, hücre kalıntılarına %70'lik soğuk etanol eklenip karışım filtrelili kolona aktarıldı ve  $12000 \times g$ 'de 30sn santrifüj edildi. Bu aşamadan sonra kolon yeni bir toplama tüpüne yerleştirip 500  $\mu$ l birinci yıkama tamponu uygulandı, ardından  $12000 \times g$ 'de 30sn santrifüj yapıldı. Atılan yıkama çözeltisinin ardından 700  $\mu$ l ikinci yıkama tamponu eklendi ve aynı hızda 30 sn'lik santrifüj işlemi iki kez daha tekrarlandı. Yıkama artıklarını tamamen uzaklaştırmak için son olarak  $12000 \times g$ 'de 2 dk santrifüj edildi. Kolondaki RNA, 80  $\mu$ l RNaz içermeyen su eklenerek  $12000 \times g$ 'de 2 dk santrifüjlendi ve 1,5ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Elde edilen total RNA, cDNA sentezi öncesinde Nanodrop spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, ABD) ile saflık ve yoğunluk ölçümleri yapıp cDNA sentezinde kullanıldı.

### 3.10. cDNA Sentezi

RNA örnekleri, saflık ve yoğunluk ölçümlerine göre 200 ng/ $\mu$ l olacak şekilde ayarlandı ve RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Kat.No. K1622, Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Her bir örnek için 12  $\mu$ l'lik ön-inkübasyon karışımı hazırlandı; bu karışımda 100  $\mu$ M'lik rastgele primerden 1  $\mu$ l (son derişim 5  $\mu$ M), kalıp RNA'dan cDNA sentezi için toplamda 200 ng ve hacmi 12  $\mu$ l olacak şekilde nükleaz içermeyen su ve RNA karışımı hazırlandı. Bu karışım  $80^\circ\text{C}$ 'de 3 dakika inkübe edildikten sonra 5 dakika buz üzerinde bekletildi. Ardından cDNA sentez karışımına 4  $\mu$ l 5X ters transkripsiyon tamponu (son derişim 1X), 2  $\mu$ l 10 mM dNTP (1 mM), 1  $\mu$ l (20 U/ $\mu$ l) RNaz baskılayıcı (1 U/ $\mu$ l) ve 1  $\mu$ l (200 U/ $\mu$ l) ters transkriptaz enzimi (10 U/ $\mu$ l) eklendi. Hazırlanan cDNA sentez karışımı her bir örneğe dağıtılarak ısı döngü cihazında önce  $37^\circ\text{C}$ 'de 90dk ve  $94^\circ\text{C}$ 'de 2dk süreyle inkübe edilerek cDNA sentezi tamamlandı.

### 3.11. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Tepkimesi (GZ-PZT)

HMW-HA uygulanmış SCC-25, uygulama yapılmamış SCC-25 ve HET-1A hücre hatlarında WWOX, HYAL1 ve apoptozda görev alan genlerden CASP3, BCL2, BAX, CASP7, CASP8, CASP9, BCL-XL ve p53 genleri ile referans gen olarak G6PD ifade düzeyleri GZ-PZT yöntemi ile Lightcycler 480-II (Roche, İSVİÇRE) cihazı kullanılarak analiz edildi. GZ-PZT analizinde, PowerUP™ SYBR® Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, ABD) içeren karışım kullanıldı. Tepkimeler, 96 kuyuluk plakada, her örnek hedef ve kontrol gen primerlerine ayrılmış ayrı kuyularda gerçekleştirildi. Bu tez çalışmasında kullanılan primer dizileri Tablo 3.2’de gösterilmiştir.



**Tablo 3.2:** Tez çalışmasında kullanılan primerlerin dizileri

<b>Primer Adı</b>	<b>Primer Dizisi</b>
WVOX İleri Primer	5'-CACGCGGGGTCACGTCGAA-3'
WVOX Geri Primer	5'-TGGTGGCAGCTCCCTGTTGC-3'
HYAL1 İleri Primer	5'-CTGTCTGAGAAGCTAGTCTTGA-3'
HYAL1 Geri Primer	5'-CTGTGGTAAGTAAAGAATGTCAC-3'
CASP3 İleri Primer	5'-GGAAGCGAATCAATGGACTCTGG-3'
CASP3 Geri Primer	5'-GCATCGACATCTGTACCAGACC-3'
BCL2 İleri Primer	5'-TCGCCCTGTGGATGACTGA-3'
BCL2 Geri Primer	5'-CAGAGACAGCCAGGAGAAATCA-3'
BAX İleri Primer	5'-TGGCAGCTGACATGTTTTCTGAC-3'
BAX Geri Primer	5'-TCACCCAACCACCCTGGTCTT-3'
CASP7 İleri Primer	5'-CGGAACAGACAAAGATGCCGAG-3'
CASP7 Geri Primer	5'-AGGCGGCATTTGTATGGTCCTC-3'
CASP8 İleri Primer	5'-AGAAGAGGGTCATCCTGGGAGA-3'
CASP8 Geri Primer	5'-TCAGGACTTCCTTCAAGGCTGC-3'
CASP9 İleri Primer	5'-GTTTGAGGACCTTCGACCAGCT-3'
CASP9 Geri Primer	5'-CAACGTACCAGGAGCCACTCTT-3'
BCL-XL İleri Primer	5'-GCCACTTACCTGAATGACCACC-3'
BCL-XL Geri Primer	5'-AACCAGCGGTTGAAGCGTTCCT-3'
p53 İleri Primer	5'-CCTCAGCATCTTATCCGAGTGG-3'
p53 Geri Primer	5'-TGGATGGTGGTACAGTCAGAGC-3'
G6PD İleri Primer	5'-ATGCCTTCCATCAGTCGGATACA-3'
G6PD Geri Primer	5'-ATAGCCCACGATGAAGGTGTTTTC-3'

Her gen için 15 µL'lik GZ-PZT reaktifi: 7,5 µL 2X PowerUP™ SYBR® Green Master Mix, 0,5 µL ileri primer (10 µM stok; final 200 nM), 0,5 µL geri primer (10 µM stok; final 200 nM), 3 µL cDNA şablonu ve 2,5 µL nükleaz içermeyen su eklenerek toplam hacim 15 µL'ye tamamlandı.

GZ-PZT termal döngüsü: Reaksiyon öncelikle enzimin etkinleştirilmesi ve çift zincirin ayrılması amacıyla 1 döngüde 95°C'de 15dk (4,4°C/sn rampa hızı), uzaması için de 95°C'de 15sn (4,4°C/sn), 62°C'de 30sn (2,2°C/sn) ve 72°C'de 30sn (4,4°C/sn) 38 döngüden oluşmuştur; uzama adımının sonunda tek kanallı floresans okuma alındı ve yine 1 döngüden oluşan 50°C'de 10sn (2,2°C/sn)'nin ardından erime eğrisi analizi için sıcaklık 0,11°C/sn hızla 95°C'ye yükseltilirken kesintisiz floresans ölçümü yapıldı.

Deney sonrası elde edilen eşik değerleri (Ct – Cycle Threshold) LightCycler Software ile analiz edildi. Hücre hatlarında HMW-HA uygulaması yapılmış ve yapılmamış SCC-25 hücre hatları ile uygulama yapılmamış SCC-25 ve HET-1A (sırasıyla kanser ve normal) hücre hatlarında belirtilen genlerin ifadeleri ile aynı örneklerdeki G6PD gen ifadesi karşılaştırması  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  yöntemi ile gerçekleştirildi (Schmittgen and Livak, 2008).  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  yöntemine göre hesaplanan değerler 0,9 ile 1,1 aralığında yorumlandı. Buna göre; 0,9'un altındaki değerler gen ifadesinin kontrol grubuna göre azaldığını, 0,9–1,1 arasındakilerde değişim olmadığını, 1,1'in üzerindeki değerlerde ise gen ifadesinin arttığını göstermektedir.

### 3.12. Sitoplazmik ve Çekirdek Proteinlerinin Eldesi

WVOX ve HYAL1 proteinlerinin Western blot analizine hazırlanması için Nuclear Extraction Kit (Chemicon International – ABD) kullanıldı. Hücre kültürü ve HMA-HA ile muamele edilmiş hücreler toplandıktan sonra PBS ile yıkandı. İlk olarak 100 µl 10X sitoplazmik liziz tamponu, 900 µl distile su, 0,5 µl DTT (1:2000), 1 µl proteaz inhibitörü (1:1000) ve parçalama boncukları hücre üzerine eklendi. Homojenizatörde 10dk süreyle hücreler parçalandı ve ardından 8000×g'de 20 dk (4 °C) santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant, sitoplazmik protein fraksiyonu olarak yeni bir 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılıp –80°C'de saklandı. Pellet'te kalan çekirdek materyali ise 1X çekirdek liziz tamponu, DTT (1:2000) ve proteaz inhibitörü (1:1000) eklenerek tekrar santrifüj edildi (4°C), ve ardından çalkalayıcı üzerinde 1 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Ardından 16000×g'de 5dk (4°C) santrifüj edilerek çekirdek fraksiyonu yeni bir tüpe alınıp –80°C'ye kaldırıldı. Western blot için

örnek hazırlığı tamamlanmadan önce, protein konsantrasyonu Thermo Fisher Scientific (ABD) marka Nanodrop spektrofotometre ile belirlendi.

### 3.13. Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

SDS-PAGE için “Bolt Bis-Tris Plus Mini Protein Gels, 4-12%, 1.0 mm, WedgeWell format” (Kat.No. NW04120BOX, Thermo Fisher Scientific, ABD) hazır jel kullanıldı. Örneklerin sitoplazmik ve çekirdek proteinleri her bir kuyuya eşit miktarda (300µg protein) yükleme yapılacak şekilde hazırlandı. Yükleme için proteinlerin üzerine 10µl yükleme tamponu (Tablo 3.3) eklenerek ikincil ve üçüncül yapılarının bozulması için ısı döngü cihazında 95°C’de 10dk süreyle bekletilip ardından buz üzerine alındı. Mini Gel Tank (Kat.No. A25977, Thermo Fisher Scientific, ABD)’a NuPAGE MES SDS Running Buffer (20X) (Kat.No. NP0002, Thermo Fisher Scientific, ABD) yürütme tamponu olarak 1X olacak şekilde tank dolduruldu ve örnekler yüklendikten sonra 250V, 500mA ve 50W’ta 20dk süreyle yürütüldü. Her jelin ilk ve son kuyusuna sırasıyla MagicMark XP Western Protein Standard (Kat.No. LC5603, Thermo Fisher Scientific, ABD) ve BlueRAY Prestained Protein Ladder (Kat.No. PM006-0500, GeneDireX, Taiwan) protein standartları yüklendi. Yürütme işleminden sonra örneklerin membrana aktarımı için blotlama işlemine geçildi.

**Tablo 3.3:** SDS-PAGE yükleme tamponu içeriği

Kimyasal Adı	Miktar
1M Tris (pH 6,8)	1 ml
Gliserin	1,6 ml
B-merkaptotanol	400 µl
%10’luk SDS	2 ml
Üzeri distile su ile 8 ml’ye tamamlanır	

### 3.14. Western Blot

Blotlama işlemi, iBlot 2 Jel Transfer Cihazı (Kat.No. IB21001, Thermo Fisher Scientific) ve iBlot 2 Transfer Stacks nitroselüloz membran (Kat.No. IB23001, Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak transfer edildi. Aktarım 20V'de 1dk, 23V'de 4dk ve 25V'de 2 dk şeklinde toplam 13 dk'da gerçekleştirildi. Transfer tamamlandıktan sonra membranlar PBST içinde 4°C'de saklandı.

Bloklama adımında membranlar, %5 yağsız süt tozu içeren PBST'den oluşan bloklama tamponunda, oda sıcaklığında ve sallayıcı üzerinde 2 saat süreyle inkübe edildi. Ardından membran, PBST ile 3 kez 10dk yıkandı ve birincil antikorun uygulanmasına geçildi.

Birincil antikor uygulaması için membranlar, %5 yağsız süt tozu içeren PBST karışımı içerisinde 1:1000 dilüsyonda WWOX antikor (Kat.No. AF6399, R&D System, ABD), HYAL1 antikor (Kat.No. sc-101340, Santa Cruz Biotechnology, ABD) ve  $\beta$ -aktin antikor (Kat.No. sc-130656, Santa Cruz Biotechnology, ABD) bulunan ortamda gece boyunca 4°C'de çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında 3 kez PBST ile 10dk süreyle yıkaması yapılarak ikincil antikor uygulamasına geçildi.

İkincil antikor uygulaması için membranlar, %3 yağsız süt tozu içeren PBST karışımı içerisinde HYAL1 ve  $\beta$ -aktin antikorları için 1:5000 dilüsyonda keçi anti-fare antikor (Kat.No. sc-2005, Santa Cruz Biotechnology, ABD) ve WWOX antikor için ise 1:7000 dilüsyonda keçi anti-koyun antikor (Kat.No. HAF016, R&D System, ABD) içeren ortamda 2 saat süreyle çalkalayıcıda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında membranlar 3 kez PBST ile 10dk süreyle yıkaması yapılarak görüntüleme aşamasına geçildi.

-Membranın üzerine 1 ml Novex ECL Chemiluminescent Substrate Reagent (Kat.No. WP20005, Thermo Fisher Scientific, ABD) eklenerek 5dk süreyle karanlıkta muamele edildikten sonra Micro Chemi 4.2-DNR Bio-Imaging System ile görüntülendi. Elde edilen görüntülerin "ImageJ" yazılımı ile protein bant yoğunlukları belirlendi.

### 3.15. İstatistiksel Analiz

Bu tez çalışmasının istatistiksel analizleri ve deney sonuçlarının grafiklendirme işlemleri GraphPad Prism v10.5.0 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analiz testinin belirlenmesi amacıyla öncelikle Shapiro-Wilk normalite testi uygulanmış olup, p değeri 0,05'ten büyük olan verilerin normal dağılım gösterdiği kabul edilmiştir ve parametrik testler kullanılmıştır. p değeri 0,05'ten küçük olan veriler ise normal dağılım göstermediğinden parametrik olmayan alternatifleri ile değerlendirme gerçekleştirilmiştir. Buna bağlı olarak bağımlı örneklem grupları normal dağılım gösteren veri setlerinde Paired Sample T-Testi kullanılarak gerçekleştirilmiş olup, normal dağılım göstermeyen gruplar Wilcoxon Signed Rank Test ile değerlendirilmiştir. Bağımsız grupların istatistiksel değerlendirmesi ise Independent Samples T-Test veya parametrik olmayan alternatifi Mann-Whitney U Testi ile gerçekleştirilmiştir.

## 4. BULGULAR

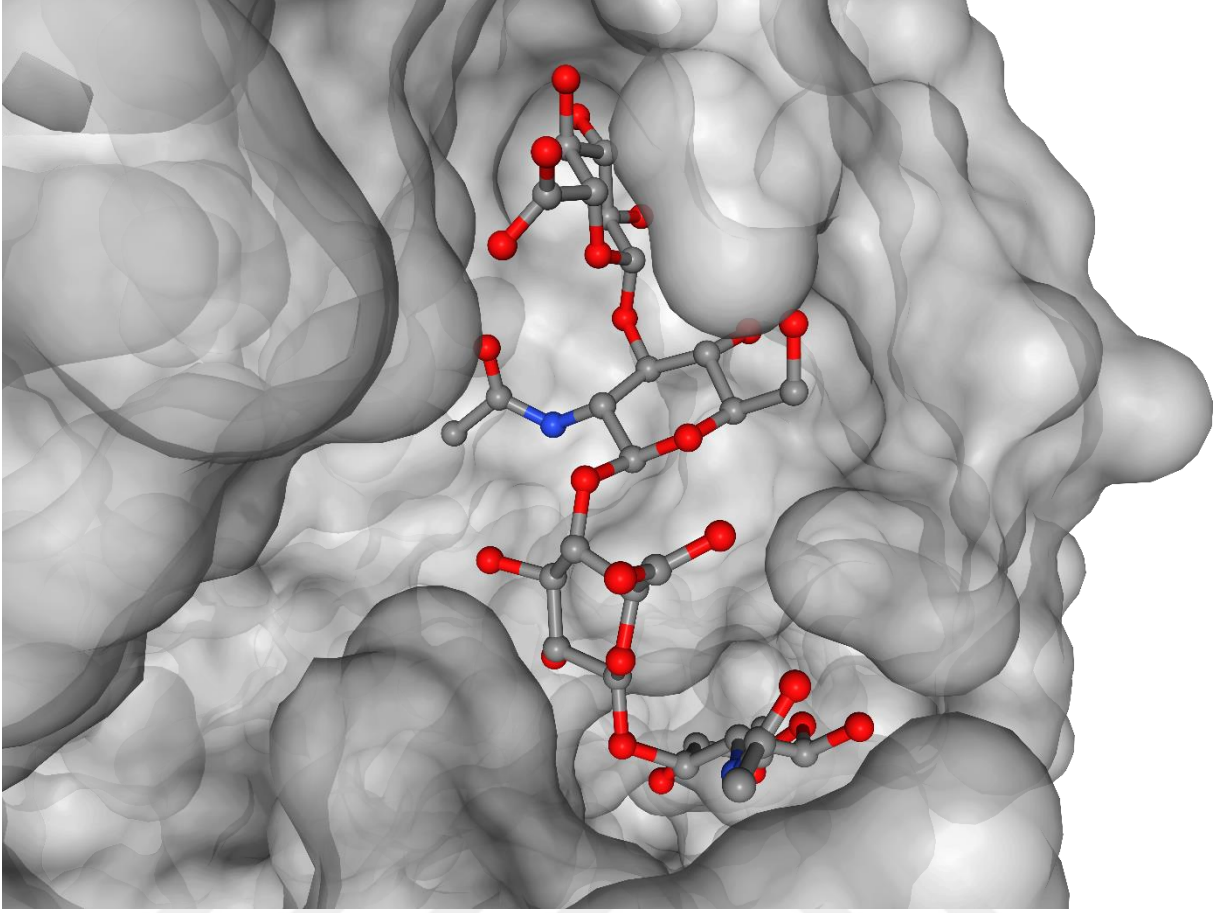
### 4.1. Moleküler Yerleştirme Sonuçları

Moleküler yerleştirme analizinde C1 cebi -9.0 kcal/mol'lük bağlanma enerjisiyle en yüksek skoru elde etmesine rağmen, bu cebin büyük hacmi nedeniyle ligand ile temas eden yüzey alanının dağılabileceği ve bağlanma etkileşiminin zayıflayabileceği öngörülmüştür. Buna karşılık, 353 Å<sup>3</sup> hacme sahip olan C4 cebi, ligandın boyutlarıyla daha uyumlu bir yapı sergilemiş ve bu nedenle optimum bağlanma için daha uygun bir hedef bölge olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.1).

CurPocket ID	Vina $\Delta G$ score	Cavity $\Delta G$ volume (Å <sup>3</sup> )	Center (x, y, z)	Docking size (x, y, z)	Contact residues
C1	-9.0	2939	-1, 14, -3	27, 27, 27	<a href="#">View</a>
C4	-8.9	353	10, 6, -3	27, 27, 27	<a href="#">View</a>
C2	-7.9	840	-14, -2, 17	27, 27, 27	<a href="#">View</a>
C5	-7.5	280	-17, -7, -1	27, 27, 27	<a href="#">View</a>
C3	-7.2	392	-33, 3, 22	27, 27, 27	<a href="#">View</a>

**Şekil 4.1:** Moleküler Yerleştirme Skoru

Ligandın C4 cebi (hacim: 353 Å<sup>3</sup>) (Şekil 4.2) ile elde edilen -8,9 kcal/mol'lük bağlanma enerjisi, C1 cebi ile karşılaştırılabilir düzeyde güçlü bir etkileşime işaret etmektedir. C4'ün ligand hacmiyle daha uyumlu yapısı, su girişini sınırlayıp ligand-protein temasını artırarak bu skoru mümkün kılmış olabilir.



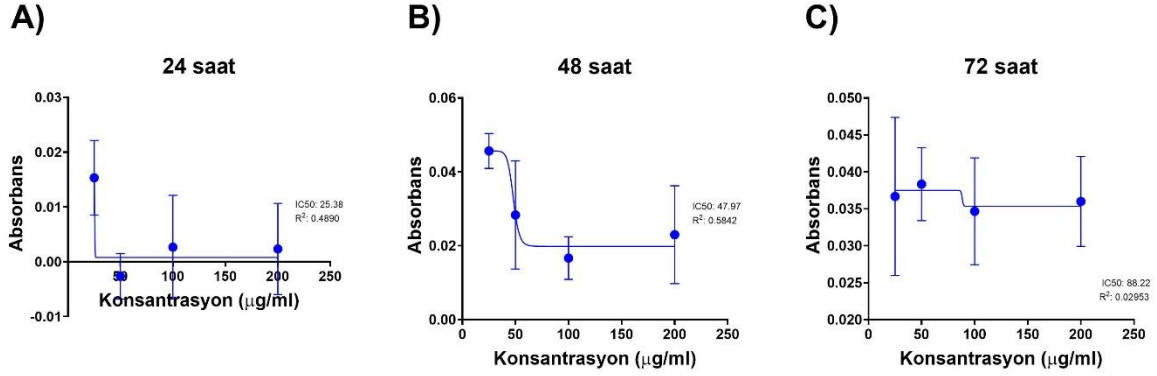
**Şekil 4.2:** C4 cebi ve ligand bağlantısı

C4 cebinin ligand-protein etkileşim analizinde, katalitik SDR motifini taşıyan Tyr293 ve Lys297 kalıntıları liganda yakın konumlanmıştır; bu bağlanma WWOX'un kofaktör bölgesinde etkinliğinin değişmesine neden olacağını düşündürmektedir. Hidrofobik yan zincirler (Ile136, Phe138, Ala154, Cys155, Leu182, Leu184, Ala185, Val231, Met327, Ile331, Met352) ligand gövdesini çevirerek su girişini sınırlar; aynı zamanda Asn133, Ser134, Glu139, Arg156, Arg160, Glu163, Arg167, Asp183, Ser259, Ser329, His332, Arg333 gibi polar kalıntılar ek hidrojen bağı ve iyonik etkileşim olanağı sunar. Bu kombinasyon,  $-8,9$  kcal/mol'lük güçlü bağlanma enerjisini makul kılar. Elde edilen bu sonuçlar HMW-HA, WWOX proteinin etkinliğinde rol alacağını düşündürmektedir.

#### 4.2. Yüksek Moleküler Ağırlıklı Hyaluronik Asit Uygulama Sonuçları

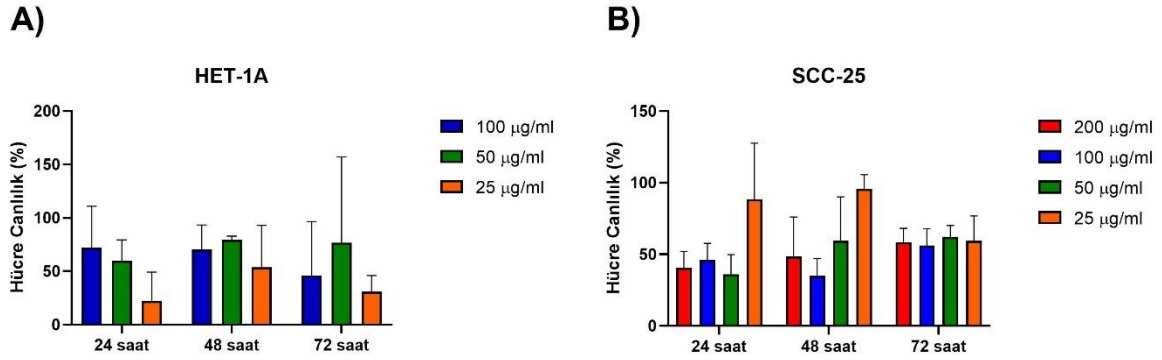
Yüksek moleküler ağırlıklı HA SCC-25 hücre hattına 0-25-50-100-200  $\mu\text{g/ml}$  olacak şekilde 24 saat, 48 saat ve 72 saat sürelerde, HET-1A hücre hattında ise yine aynı sürelerde 0-25-50-100  $\mu\text{g/ml}$  olacak şekilde uygulanmıştır. Ardından MTT analizine alınan hücrelerde

IC50 değeri 48 saat 100 µg/ml olacak şekilde (Şekil 4.3) belirlenmiştir. Bu doz, maddenin hücre canlılığı üzerindeki yarı maksimal inhibisyon etkisini göstermek amacıyla hesaplanmıştır. IC50 değerinin belirlenmesi, sonraki deneysel analizlerde kullanılacak uygun konsantrasyonun belirlenmesi açısından referans noktası olarak kullanılmıştır.



Şekil 4.3: IC50 hesaplaması sonuçları

48 saat 100 µg/ml uygulanan HA HET-1A hücrelerinin canlılık yüzdesi yaklaşık %80 olarak bulunmuş olup (Şekil 4.3, A), SCC-25 hücrelerinde ise %35 bulunmuştur. (Şekil 4.3, B).

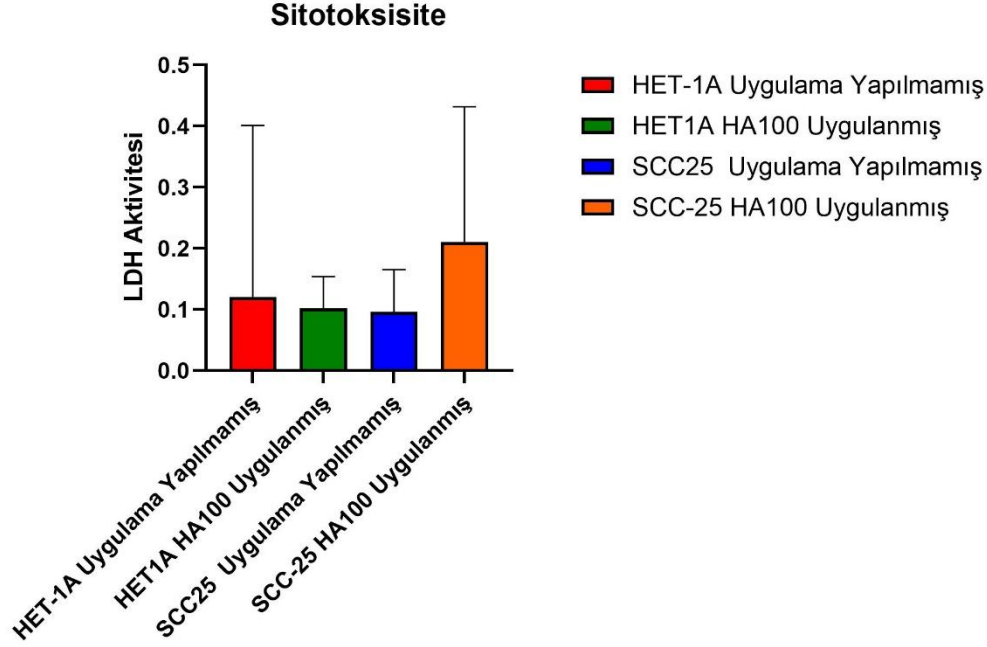


Şekil 4.4: Hücre canlılık (MTT) sonuçları

### 4.3. LDH Sitotoksosite Sonuçları

48 saat süreyle 100 µg/ml olarak uygulanan yüksek molekül ağırlıklı hyaluronik asitin hücrede oluşturduğu sitotoksositeyi tespit etmek amacıyla hücrelerin LDH salınım miktarlarının ölçümü gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlara göre yüksek molekül ağırlıklı hyaluronik asitin HET-1A hücrelerinde LDH salınımını yaklaşık %15 oranında azalttığı, SCC-25 kanser hücrelerinde ise yaklaşık %50 oranında arttırdığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar ele alındığında

yüksek molekül ağırlıklı hyaluronik asitin normal hücrede toksisiteyi azalttığı, kanser hücresinde ise toksisiteyi arttırdığı gözlenmektedir (Şekil 4.5).

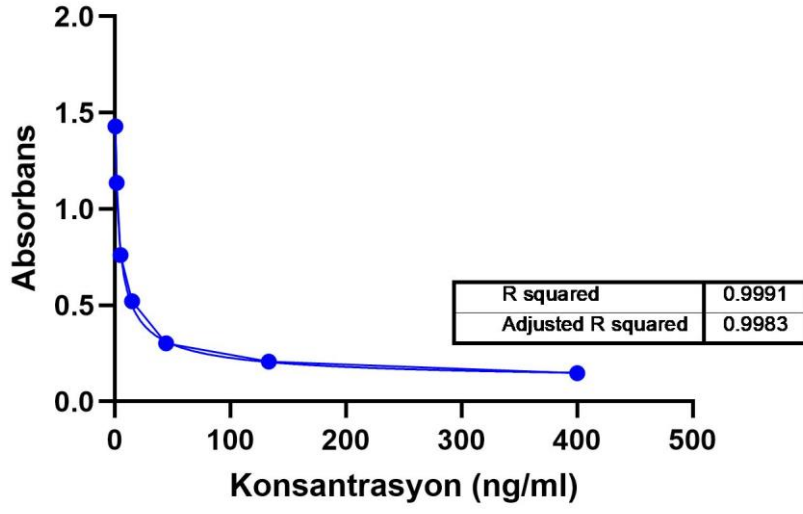


Şekil 4.5: LDH Sitotoksisite Sonuçları

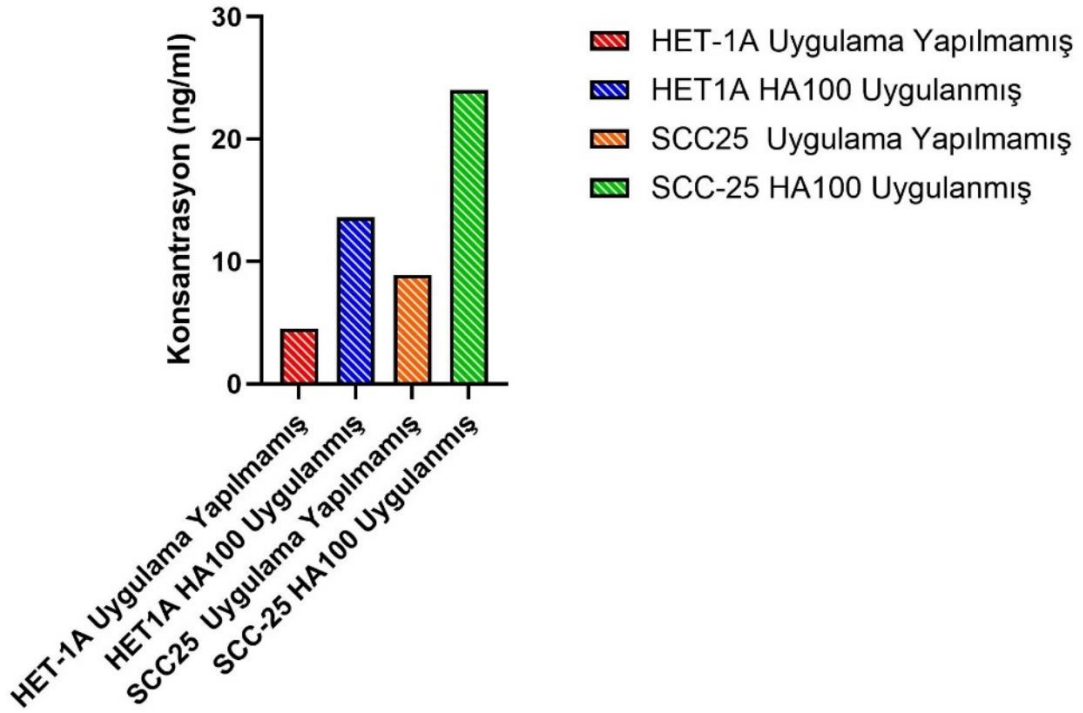
#### 4.4. HA ELISA Sonuçları

Yüksek molekül ağırlıklı hyaluronik asit uygulaması sonrası elde edilen hücrelerde hyaluronik asitin gerçekten hücre içine geçip geçmediğini belirleyebilmek amacıyla uygulama yapılan HET-1A ve SCC-25 hücreler ile uygulama yapılmayan hücrelerdeki hyaluronik asit miktarlarını ELISA yöntemi ile tespit edildi.

Elde ettiğimiz verilere göre ölçüm için hazırladığımız standartlar son derece yeterli olup (R squared: 0.9991) (Şekil 4.6), HET-1A hücre hattında yaklaşık 1,5 kat, SCC-25 hücre hattında ise yaklaşık 2,5 kat hyaluronik asit miktar artışı gözlemlendi (Şekil 4.7).



Şekil 4.6: HA ELISA standartları

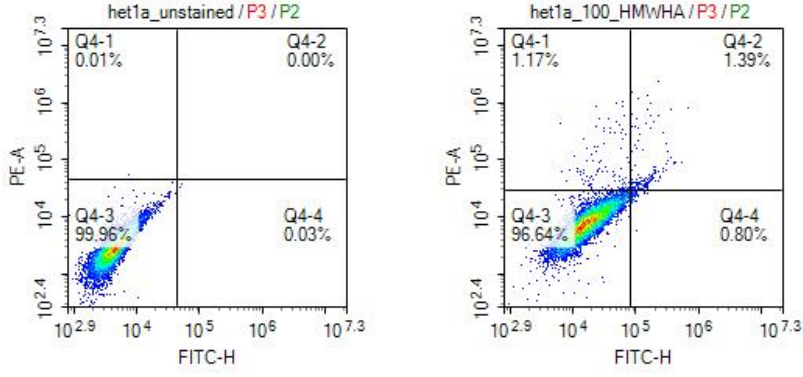


Şekil 4.7: Örneklerin hyaluronik asit miktarları

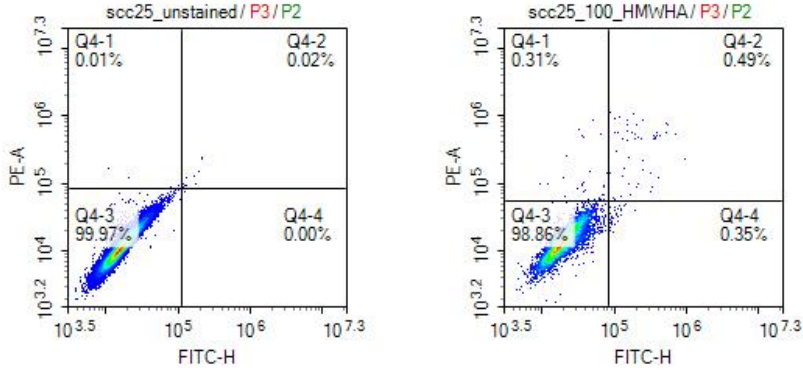
#### 4.5. Anneksin V-FITC Apoptoz Assay Sonuçları

Şekil 4.8’de görüldüğü üzere yüksek molekül ağırlıklı hyaluronik asit uygulanan SCC-25 hücrelerinin apoptoza veya nekroza gitmediği gözlemlendi.

A)



B)

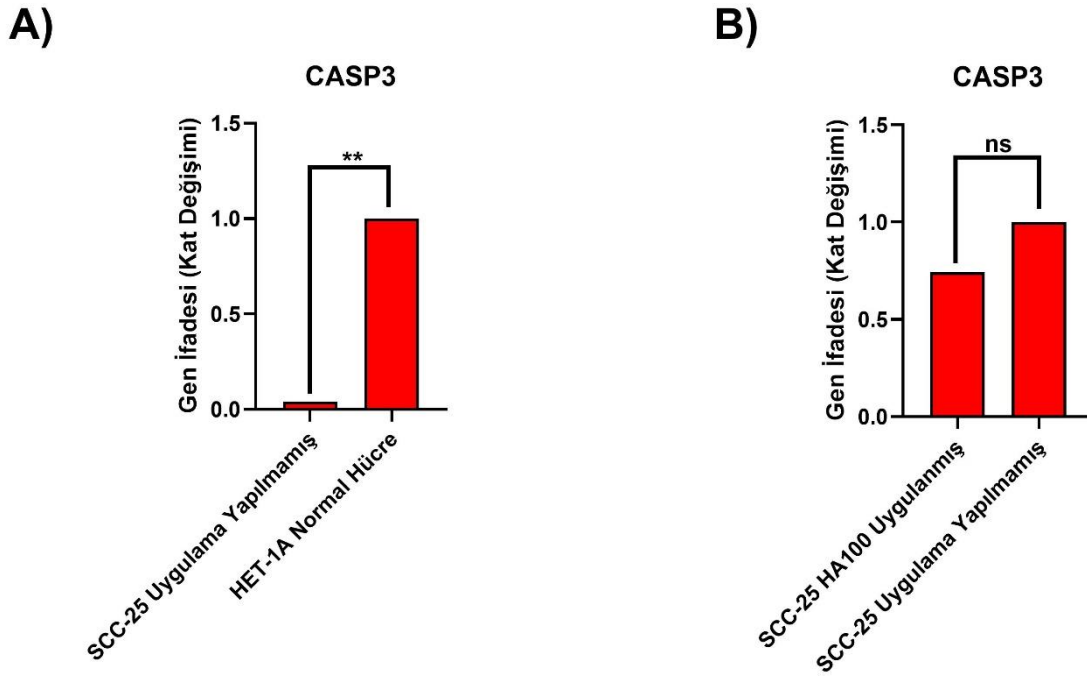


**Şekil 4.8:** Apoptoz Assay Sonuçları. Sol üst kadrant nekrotik hücreleri, sağ üst kadrant geç apoptotik hücreleri ve sağ alt kadrant ise erken apoptotik hücreleri göstermektedir.

#### 4.6. Apoptotik Yolak Düzenleyici Genlerin İfade Düzeyleri

Annexin V-FITC analizi sonucunda, yüksek moleküler ağırlıklı HA uygulanan hücrelerde belirgin bir apoptoz sinyali tespit edilememesi üzerine, bu yanıtın olası nedenlerini araştırmak amacıyla bu yolakta düzenleyici olarak görev yapan genlerin (CASP3, BCL2, BAX, CASP7, CASP8, CASP9, BCL-XL ve p53) mRNA ifade düzeyleri karşılaştırıldı.

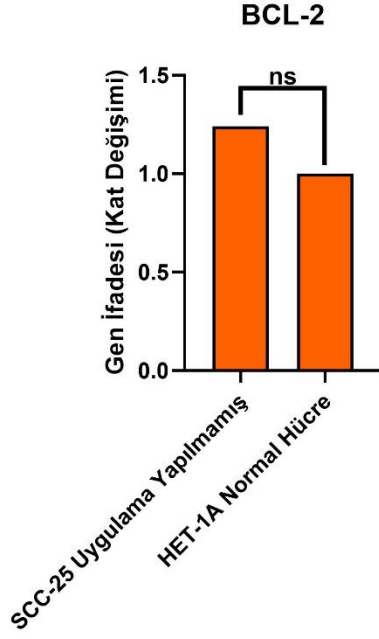
CASP3 gen ifadesi, SCC-25 kanser hücresinde HET-1A normal hücreye göre %96 oranında düşük bulunurken ( $p=0.0011$ ), yüksek moleküler ağırlıklı HA uygulamasından sonra bu azalma oranı %26'ya gerilemiştir ( $p=0.125$ ) (Şekil 4.9). Bu durum, yüksek moleküler ağırlıklı HA uygulamasının CASP3 geninin ifadesini yaklaşık 18 kat arttırdığını göstermektedir. Bu artış, uygulamanın gen ifadesi üzerindeki düzenleyici etkisine işaret etmektedir.



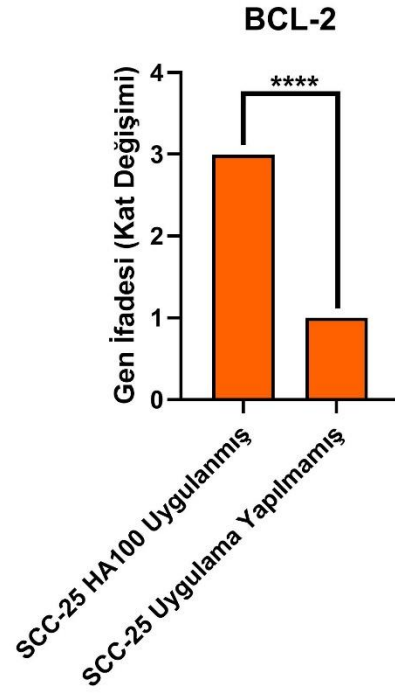
Şekil 4.9: CASP3 ifade değişimleri

BCL2 geni, SCC-25 kanser hücresinde HET-1A normal hücreye göre %24 oranında yüksek bulunurken ( $p=0.6799$ ), yüksek moleküler ağırlıklı HA uygulamasından sonra bu artışın yaklaşık 2,5 kat daha arttığı gözlemlenerek BCL2 geninin ifade düzeyinde %200 oranında arttığı belirlenmiştir ( $p<0,0001$ ) (Şekil 4.10).

A)



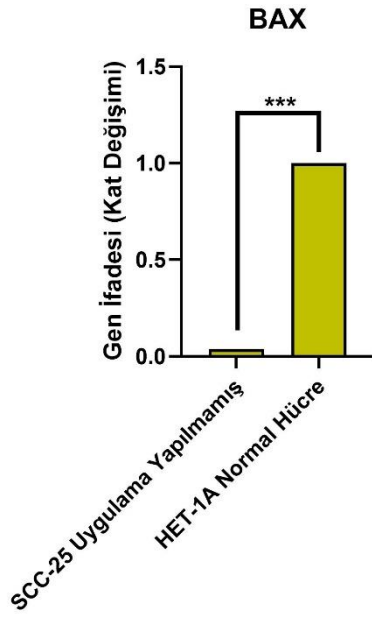
B)



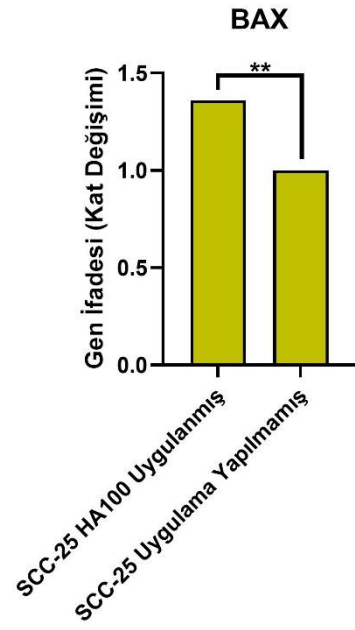
Şekil 4.10: BCL2 ifade değişimleri

BAX gen ifadesi, SCC-25 kanser hücresinde HET-1A normal hücreye göre %97 oranında düşük bulunurken ( $p=0.0002$ ), yüksek moleküler ağırlıklı HA uygulamasından sonra BAX geninin ifadesinde %36 oranında artış gözlemlenmiştir ( $p=0,002$ ) (Şekil 4.11). Bu değişim, yüksek moleküler ağırlıklı HA uygulamasının BAX geninin ifadesini yaklaşık 36 kat arttırdığını göstermektedir.

A)



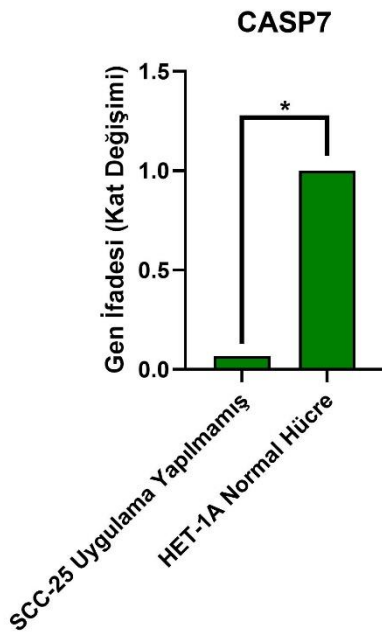
B)



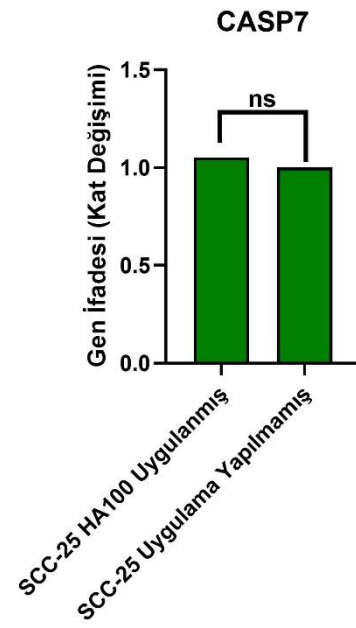
Şekil 4.11: BAX ifade değişimleri

CASP7 gen ifadesi, SCC-25 kanser hücresinde HET-1A normal hücreye göre %93 oranında düşük bulunurken ( $p=0.0207$ ), yüksek moleküler ağırlıklı HA uygulamasından sonra uygulama yapılmamış SCC-25 hücrelerine göre CASP7 geninin ifadesinde bir değişim gözlemlenmemiştir (Şekil 4.12). Ancak genel duruma bakıldığında, yüksek molekül ağırlıklı HA'nın CASP7 ifadesini yaklaşık 15 katlık bir artışa neden olduğu görülmektedir.

A)



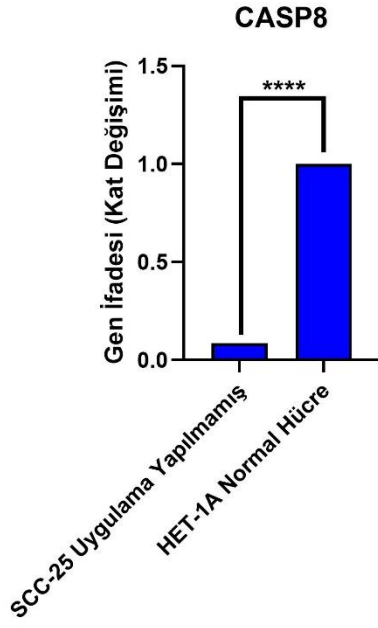
B)



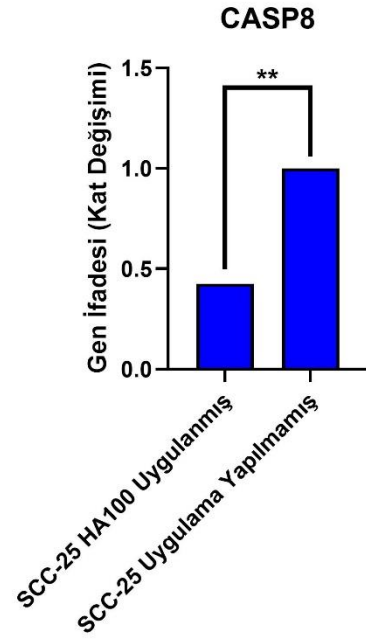
Şekil 4.12: CASP7 ifade değişimleri

CASP8 gen ifadesi, SCC-25 kanser hücresinde HET-1A normal hücreye göre %91 oranında düşük bulunurken ( $p < 0.0001$ ), yüksek moleküler ağırlıklı HA uygulamasından sonra uygulama yapılmamış SCC-25 hücrelerine göre CASP7 geninin ifadesi %60'a gerilemiş ( $p = 0.0021$ ) (Şekil 4.13) ve CASP8'in ifadesinde yaklaşık 5 katlık bir artış gözlenmiştir.

A)



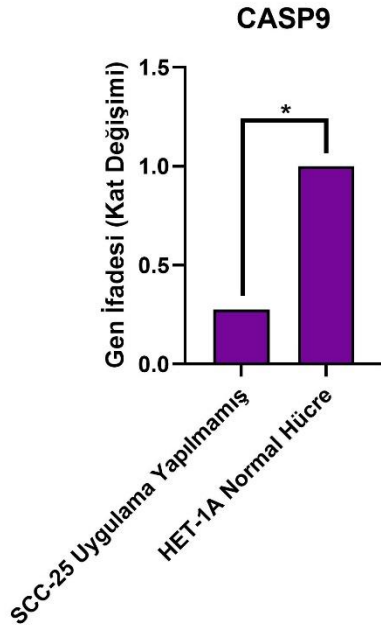
B)



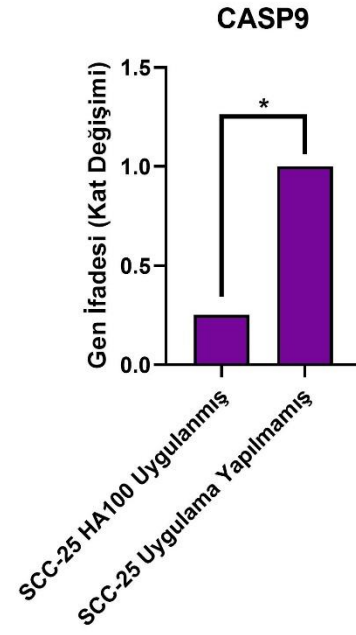
Şekil 4.13: CASP8 ifade değişimleri

CASP9 geni, SCC-25 kanser hücresinde HET-1A normal hücreye göre %72 oranında istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunurken ( $p=0,0108$ ), yüksek moleküler ağırlıklı hyaluronik asit uygulamasından sonra ifadesindeki azalma benzer düzeyde kalmış (%75) ( $p=0,0436$ ) (Şekil 4.14), yüksek moleküler ağırlıklı hyaluronik asit uygulamasının CASP9 gen ifadesi üzerinde bir etki gözlenmemiştir.

A)

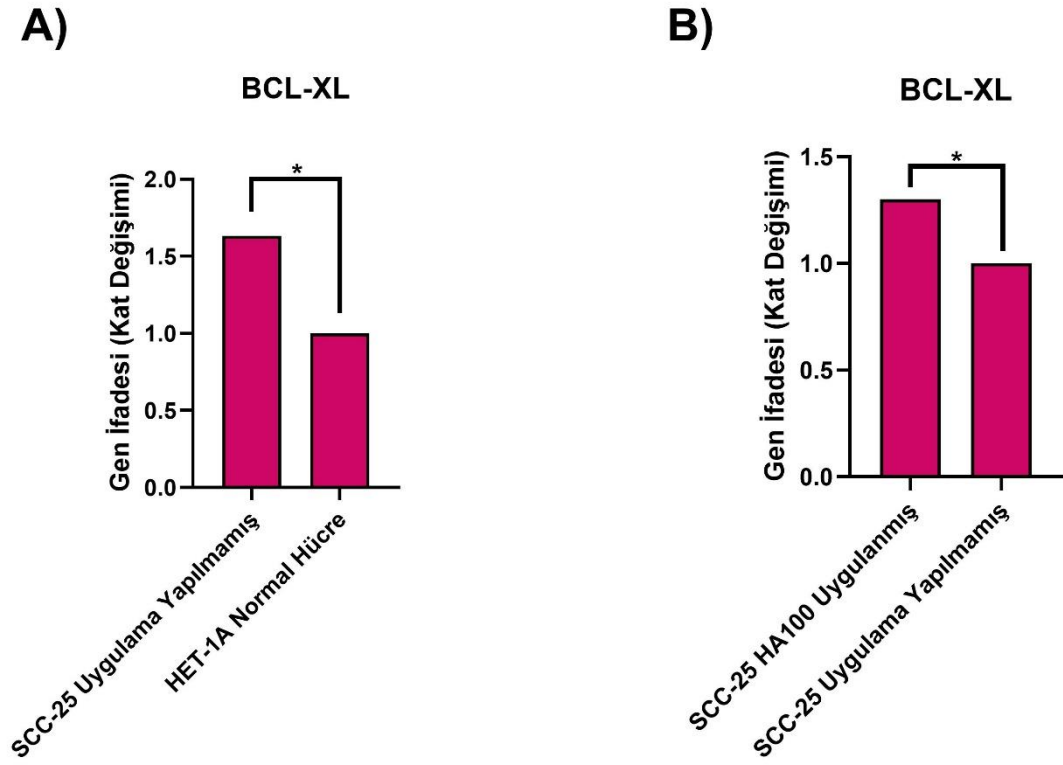


B)



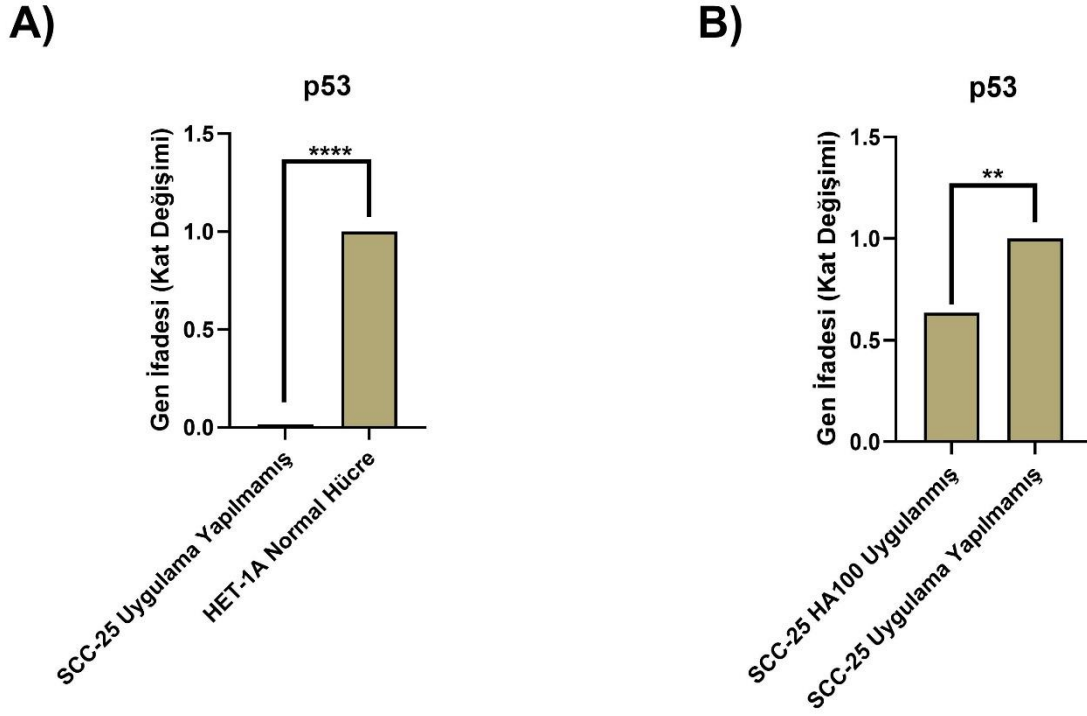
Şekil 4.14: CASP9 ifade değişimleri

BCL-XL gen ifadesi, SCC-25 kanser hücresinde HET-1A normal hücreye göre %63 oranında yüksek bulunurken ( $p=0,0465$ ), yüksek moleküler ağırlıklı HA uygulamasından sonra uygulama yapılmamış SCC-25 hücrelerine göre BCL-XL geninin ifadesindeki artış %30'a gerilemiş ( $p=0,0146$ ) (Şekil 4.15) ve CASP8'in ifadesinde yaklaşık 1 katlık bir azalma gözlenmiştir.



Şekil 4.15: BCL-XL ifade değişimleri

p53 gen ifadesi, SCC-25 kanser hücresinde HET-1A normal hücreye göre %98 oranında düşük bulunurken ( $p < 0,0001$ ), yüksek moleküler ağırlıklı HA uygulamasından sonra uygulama yapılmamış SCC-25 hücrelerine göre p53 geninin ifadesindeki bu azalma %37'ye gerilemiştir ( $p = 0,0078$ ) (Şekil 4.16). p53'ün ifadesinde yaklaşık 37 katlık bir artış gözlenmiştir.



Şekil 4.16: p53 ifade değişimleri

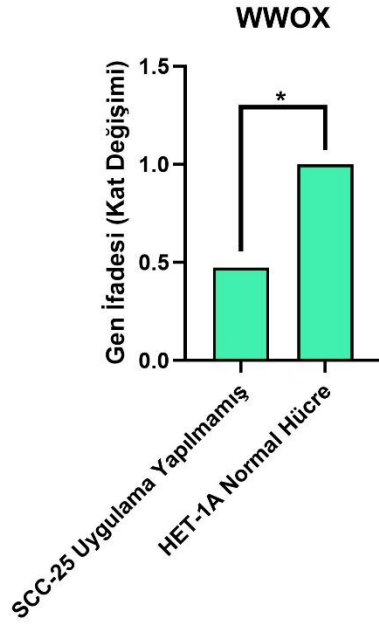
Yüksek molekül ağırlıklı hyaluronik asit uygulaması sonrasında pro-apoptotik etki gösteren BAX geninde artış gözlenmesine rağmen, diğer apoptotik yolak düzenleyici genlerin (CASP3, BCL2, CASP7, CASP8, CASP9, BCL-XL ve p53) ifadelerindeki ufak değişikliklerin hücrelerin apoptoza gitmesine yeterli olmadığı gözlemlenmektedir.

#### 4.7. WWOX ve HYAL1 Genlerinin İfade Düzeyleri

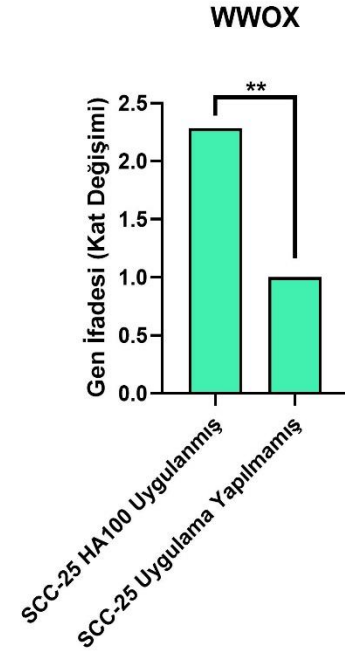
WWOX gen ifadesi, SCC-25 kanser hücresinde HET-1A normal hücreye göre %53 oranında düşük bulunurken ( $p = 0,0429$ ), yüksek moleküler ağırlıklı HA uygulamasından sonra uygulama yapılmamış SCC-25 hücrelerine göre WWOX geninin ifadesindeki bu azalma

yaklaşık %130 oranında artacak şekilde değişmiştir ( $p=0,0025$ ) (Şekil 4.17). Bu değişim, yaklaşık 5 katlık bir artışa karşılık gelmekte olup, uygulamanın WWOX genini etkinleştirdiği anlaşılmaktadır.

**A)**

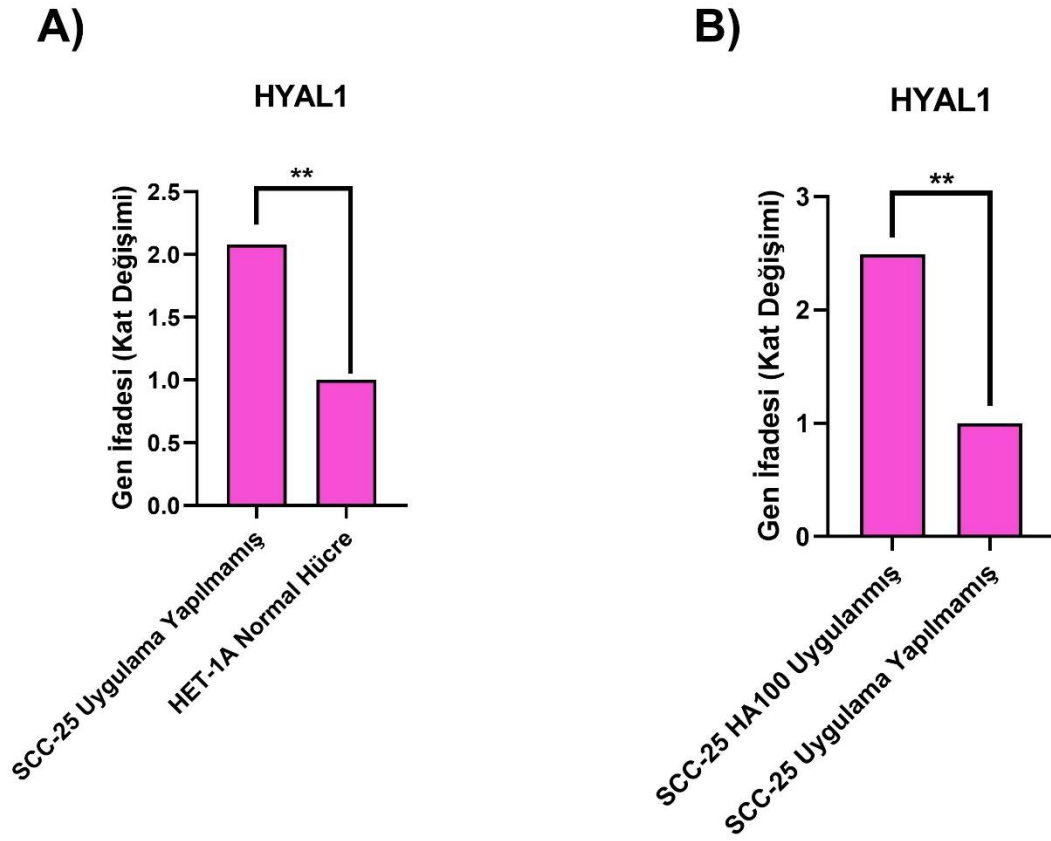


**B)**



**Şekil 4.17:** WWOX ifade değişimleri

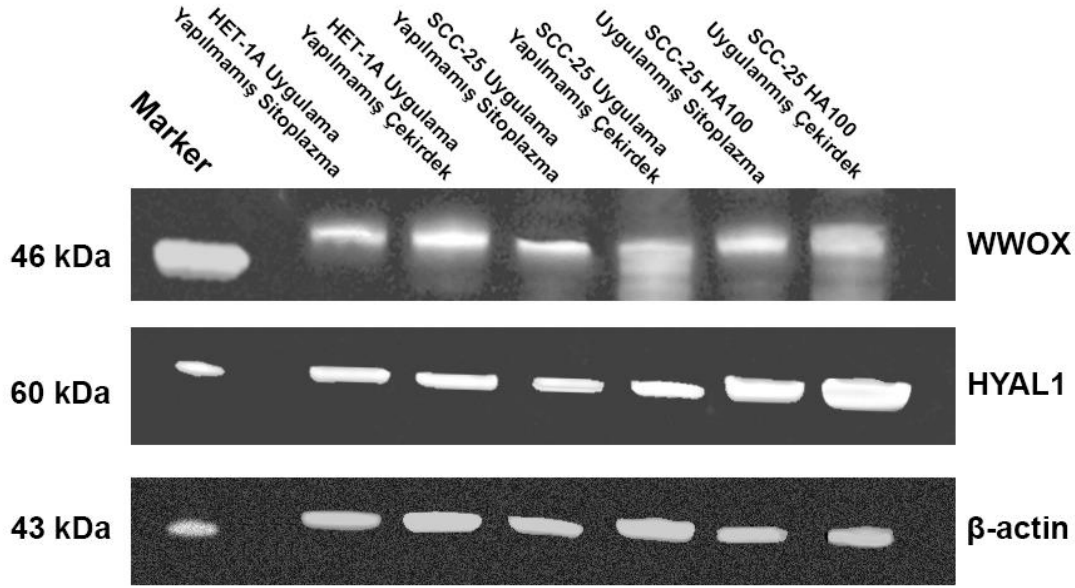
HYAL1 gen ifadesi, SCC-25 kanser hücresinde HET-1A normal hücreye göre %108 oranında yüksek bulunurken ( $p=0,0025$ ), yüksek moleküler ağırlıklı HA uygulamasından sonra uygulama yapılmamış SCC-25 hücrelerine göre HYAL1 geninin ifadesindeki bu artış yaklaşık %149'a çıkmıştır ( $p=0,0014$ ) (Şekil 4.18). Bu değişim, HYAL1 ifadesini yaklaşık 1,2 kat arttırdığını göstermektedir.



Şekil 4.18: HYAL1 ifade değişimleri

#### 4.8. WWOX ve HYAL1 Protein İfade Düzeyleri

SCC-25 kanser hücre hattı ve HET-1A normal hücre hattı ile yüksek molekül ağırlıklı hyaluronik asit uygulaması yapılan SCC-25 kanser hücre hattında WWOX ve HYAL1 proteinlerinin sitoplazma ve çekirdekteki düzeyleri incelendi (Şekil 4.19).



Şekil 4.19: WB bant görüntüsü

WWOX proteini HET-1A hücre hattında %50 oranında hem sitoplazmada hem çekirdekte bulunurken HYAL1 proteini %49 oranında sitoplazmada, %51 oranında çekirdekte bulunmaktadır. SCC-25 hücre hattında ise WWOX proteini %48 oranında sitoplazmada bulunurken, %52 oranında çekirdekte bulunurken, HYAL1 proteini ise %45 oranında sitoplazmada %55 oranında çekirdekte bulunmaktadır. Yüksek molekül ağırlıklı hyaluronik asit uygulanmış SCC-25 hücre hattında ise WWOX proteini %33 oranında sitoplazmada bulunurken %67 oranında çekirdekte bulunurken, HYAL1 proteini ise %40 sitoplazmada bulunurken %60 çekirdekte bulunduğu görülmüştür (Tablo 4.1).

**Tablo 4.1:** Yüksek molekül ağırlıklı hyaluronik asit uygulanmış SCC-25 hücre hatlarında WWOX ve HYAL1 proteinlerinin yoğunlukları

		Bant Yoğunluğu	Yüzde (%)
WWOX	Sitoplazma	45288,74	33
	Çekirdek	91536,95	67
HYAL1	Sitoplazma	14236,15	40
	Çekirdek	20920,30	60

Buna bağlı olarak WWOX ve HYAL1 protein ifadelerinde HET-1A ve SCC-25 hücre hatlarında dikkate değer bir değişim saptanmamışken moleküler ağırlığı yüksek hyaluronik asit uygulanmış SCC-25 hücre hattında WWOX proteini ifadesi 1,7 kat artarken, HYAL1 protein ifadesi 2,2 kat artmıştır.

## 5. TARTIŞMA

Moleküler yerleştirme analizinde elde edilen -8,9 kcal/mol'lük bağlanma enerjisi değeri, güçlü bir protein-ligand etkileşimine işaret etmektedir. Literatürde, moleküler yerleştirme çalışmalarında -8 kcal/mol ve üzeri değerler güçlü bağlanma afinitesi olarak kabul edilmekte ve bu değerlerin biyolojik aktivite için yeterli olduğu belirtilmiştir (Brenk ve ark., 2006). Bağlanma enerjisinin moleküler yerleştirme sonuçlarına etkisi, protein-ligand kompleksinin kararlılığını ve etkileşim gücünü değerlendirmede kritik öneme sahiptir.

C4 cebinin 353 Å<sup>3</sup> hacmiyle ligand hacmiyle uyumlu yapısı, literatürdeki bulgularla paralel olarak, optimum bağlanma için uygun boyut seçiciliğinin önemini desteklemektedir (Brenk ve ark., 2006). WWOX proteinin katalitik SDR motifini taşıyan Tyr293 ve Lys297 kalıntılarının liganda yakın konumlanması, literatürde belirtilen WWOX'un etkinliğinin düzenlenmesindeki kritik amino asitlerin rolüyle uyumludur (Schrock and Huebner, 2015, Lo ve ark., 2015). Bu nedenle yüksek molekül ağırlıklı hyaluronik asitin WWOX etkinliği üzerinde etkisi olabileceğini düşündürmektedir.

MTT analizinde SCC-25 hücrelerinde %35 canlılık, HET-1A hücrelerinde ise %80 canlılık saptanmıştır. Bu belirgin fark, uygulanan 100 µg/ml yüksek molekül ağırlıklı HA'nın özellikle kanser hücrelerinde canlılığı azaltıcı bir etki gösterdiğini düşündürmektedir. Literatürde HMW-HA'nın normal hücreleri korurken kanser hücrelerine karşı sitotoksik etki gösterebildiği belirtilmiştir (Price ve ark., 2018, Luo and Prestwich, 1999). Uyguladığımız doz aralığı bu çalışmalarla uyumlu olup, HMW-HA'nın yüksek molekül ağırlığının >1 MDa büyüklüğünün bu etkide kritik rol oynadığı bilinmektedir (Price ve ark., 2018, Pashkina ve ark., 2025).

LDH sitotoksosite sonuçları, HMW-HA'nın normal hücrelerde toksisiteyi %15 azaltırken kanser hücrelerinde %50 arttırması, literatürdeki HMW-HA'nın ikili etkisini desteklemektedir (Price ve ark., 2018, Michalczyk ve ark., 2022). Bu durum literatüre göre, HMW-HA'nın CD44 reseptörü aracılığıyla farklı hücre tiplerinde farklı sinyal yollarını etkinleştirmesinden kaynaklandığını düşündürmektedir (Chanmee ve ark., 2015, Chiesa ve ark., 2022). Athanassiou-Papaefthymiou ve ark. yaptığı çalışmada baş-boyun kanserlerinde CD44

ekspresyonunun artmış olması, HMW-HA'nın bu kanser türünde özellikle etkili olabileceğini öne sürmektedir (Athanassiou-Papaefthymiou ve ark., 2014).

HA ELISA sonuçlarında HET-1A hücrelerinde hyaluronik asitin 1,5 kat, SCC-25 hücrelerinde 2,5 kat artış, HMW-HA'nın hücre içine etkin girişini göstermektedir. Bu çalışmada HMW-HA uygulaması sonrasında SCC-25 ve HET-1A hücrelerinde gözlenen HA artışı, hücre alımının etkinliğini ortaya koymaktadır. HYAL1'in HA'yı düşük moleküler ağırlıklı formlara parçalayarak tümör mikroçevresini değiştirmesi, SCC-25 hücrelerinde gözlenen HA artışı ile birlikte değerlendirildiğinde, HA metabolizmasının kanser biyolojisinde etkili bir rol oynadığını göstermektedir (Posey ve ark., 2003, Stern and Jedrzejak, 2006, Schmaus and Sleeman, 2014).

Annexin V-FITC analizi sonuçlarında SCC-25 hücrelerinin apoptoza gitmediği gözlenmiştir. Bu bulgu, HMW-HA'nın apoptoz dışında farklı hücre ölüm mekanizmalarını etkinleştirebileceğini düşündürmektedir. Literatürde, HMW-HA'nın her zaman klasik apoptoz yolağını aktive etmediği, bazı durumlarda otofaji veya diğer hücre ölüm mekanizmalarını tetiklediği bildirilmektedir (Tong ve ark., 2022). Kanser hücrelerinde apoptoz dışında piroptoz, ferroptoz ve otofajik hücre gibi alternatif ölüm yolları da bulunmaktadır (Tait ve ark., 2014, Tong ve ark., 2022). Özellikle kemoterapiye yanıt olarak apoptotik hücre ölümünün piroptozla dönüşebileceği gösterilmiştir (Tong ve ark., 2022). Bu bulgular, HMW-HA'nın SCC-25 hücrelerinde gözlenen sitotoksik etkisinin piroptoz veya diğer alternatif ölüm yolları aracılığıyla gerçekleşebileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda, apoptotik yolak düzenleyici genlerin arasında yer alan pro-apoptotik genlerin mRNA ifade düzeyleri değerlendirilmiştir. SCC-25 kanser hücrelerinde CASP3 gen ifadesinin normal HET-1A hücrelerine kıyasla %96 azaldığı ( $p=0.0011$ ) ve HMW-HA uygulaması sonrası bu azalmanın %26'a gerilediği ( $p=0.125$ ) ancak hala normal düzeye ulaşmadığı gözlenmiştir. Bu bulgu, HMW-HA'nın apoptoz gen ekspresyonunu modüle edebileceğini, ancak tam bir geri dönüş sağlamayabileceğini desteklemektedir (Tanne ve ark., 2013, Sugita ve ark., 2022). Benzer şekilde, CASP7 geninin SCC-25 kanser hücrelerinde HET-1A normal hücrelere göre anlamlı derecede düşük ifade edilmesi (%93), CASP7'nin başta apoptoz olmak üzere hücre ölüm mekanizmalarındaki rolüne işaret etmektedir. Bu bulgu, kaspaz ailesi üyelerinin birçok kanser türünde baskılandığını gösteren literatürle uyumludur (Palmerini ve ark., 2001, Olsson and Zhivotovsky, 2011, Vilella-Arias ve ark., 2013). Yüksek moleküler ağırlıklı HA uygulamasının SCC-25 hücrelerinde CASP7 ekspresyonunda anlamlı

bir değişiklik oluşturmaması, HA'nın doğrudan apoptoz yolaklarını etkinleştirmediğini dūřündürmektedir. Bununla birlikte, genel analizde yüksek moleküler ağırlıklı HA'nın CASP7 ifadesinde gözlenen yaklaşık 15 katlık artış, HA'nın tümör mikroçevresinde apoptoz yanıtını değiştirebileceğini ve bu etkinin hücre tipine, uygulama koşullarına veya mikroçevresel faktörlere bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir. Bu nedenle, HA'nın apoptoz ve CASP7 ifadesi üzerindeki etkilerinin daha ayrıntılı çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir. CASP8, apoptozun başlatıcı kaspazlarından biridir ve özellikle ekstrinsik (ölüm reseptörü aracılı) apoptozda rol oynar. Literatürde, birçok kanser türünde (örneğin meme, karaciğer) düşük CASP8 ekspresyonunun kötü prognozla ilişkili olduğu ve apoptoz direncine katkı sağladığı gösterilmiştir (Peng ve ark., 2023). Çalışmamızda CASP8 ifadesinin az olması (%91), tümör hücrelerinin immün yanıtta kaçmasına ve sağkalım avantajı kazanmasına neden olduğunu dūřündürmektedir. HMW-HA uygulaması sonrası CASP8 ifadesinde kısmi bir artış gözlenmiş olsa da (azalma oranı %91'den %60'a geriliyor) bu artış apoptozu tetiklemeye yeterli olmamıştır. CASP9 gen ifadesi SCC-25 hücrelerinde normal hücrelere göre %72 oranında azalmış ve HMW-HA uygulaması bu oranı değiştirmemiştir. CASP9, mitokondriyal (intrinsik) apoptoz yolunun başlatıcı kaspazıdır ve hücre içi stres yanıtlarında önemli rol oynar. Literatürde, CASP9'un düşük ifadesinin veya fonksiyon kaybının çeşitli kanserlerde apoptozun engellenmesine ve tümör gelişimine katkı sağladığı belirtilmiştir (Avrutsky and Troy, 2021). CASP9'un etkinliğini yitirmesi, özellikle kanser hücrelerinde kemoterapiye direnç ve sağkalım ile ilişkilidir. Ayrıca, CASP9 sadece apoptozu değil, aynı zamanda nekroptoz gibi alternatif hücre ölüm yolaklarını da düzenleyebilir (Avrutsky and Troy, 2021). Son olarak, HMW-HA uygulaması sonrasında p53 gen ifadesindeki %37 azalma, tümör baskılayıcı fonksiyonun kaybına işaret etmektedir. Literatürde p53'ün %50'den fazla insan kanserinde mutasyona uğradığı ve bunun kanser gelişiminde kritik rol oynadığı bilinmektedir (Wang ve ark., 2023, Ozaki and Nakagawara, 2011). HMW-HA uygulaması sonrasında p53 ifadesindeki iyileşme (%98'dan %37'a düşen azalma), HMW-HA'nın p53 üzerinde düzenleyici etkisinin olduğunu göstermekle birlikte kanser hücrelerini apoptozla göndermekte tek başına yeterli gelmemektedir.

Çalışmamızda, apoptoz sürecinin negatif düzenleyicileri arasında yer alan anti-apoptotik genlerin ifadesi de incelenmiştir. SCC-25 hücrelerinde BCL2 gen ifadesi başlangıçta %24 oranında yüksek bulunurken ( $p=0.6799$ ) ve yüksek moleküler ağırlıklı HA uygulaması sonrasında bu artış 2,5 kat daha arttığı gözlenmiştir ( $p<0.0001$ ). BCL2 genindeki bu artış, pro-ve anti-apoptotik faktörler arasındaki dengenin tümör lehine kaydığını göstermektedir. Literatürde, BCL2 ailesinin fosforilasyon durumuna bağlı olarak farklı fonksiyonlar

gösterebildiği ve bu durumun BCL2 ekspresyonundaki artışla ilişkili olabileceği belirtilmektedir (Liu ve ark., 2024, Palabiyik, 2025). Benzer şekilde, BCL-XL geni SCC-25 hücrelerinde normal hücelere göre %63 oranında yüksek bulunurken, yüksek moleküler ağırlıklı HA uygulaması sonrasında bu artış %30'a gerilemiştir. BCL-XL, BCL2 ailesinin anti-apoptotik bir üyesi olarak hücreleri apoptozdan korur ve bu yolla tümör hücrelerinin sağkalımını artırır. Literatürde BCL-XL'nin aşırı ekspresyonunun melanom, glioblastom ve çeşitli solid tümörlerde tümör progresyonu, anjiyogenez ve kemoterapiye direnç ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Trisciuoglio ve ark., 2017). HMW-HA uygulaması sonrası BCL-XL ekspresyonunda gözlenen bu kısmi azalma, tümör hücrelerinin sağkalım avantajının bir miktar azaltılabileceğini düşündürmektedir. Ancak BCL-XL seviyesinin halen yüksek seyretmesi, apoptoz direncinin sürdüğünü ve hücrelerin tam anlamıyla apoptoza yönlendirilmediğini göstermektedir.

WFOX geni ifadesi SCC-25'te %53 azalırken ( $p=0.0429$ ), yüksek moleküler ağırlıklı HA uygulaması sonrası %130 oranında artmıştır ( $p=0.0025$ ). WFOX genindeki 5 kat artış, literatürde WFOX'un tümör baskılayıcı fonksiyonunun restore edilmesiyle uyumludur (Pospiech ve ark., 2018, Lo ve ark., 2015, Schrock and Huebner, 2015). WFOX'un kanser hücrelerindeki ifadesinin artışının, hücrelerin kemoterapötik ajanlara duyarlılığını arttırdığı bildirilmektedir (Lo ve ark., 2015). WFOX'un baş-boyun kanserlerinde prognostik önemi, bu artışın klinik değerini desteklemektedir (Celebi ve ark., 2020, Ekizoglu ve ark., 2015). Çalışmamızda SCC-25 kanser hücrelerinde WFOX proteininin çekirdekdeki oranı %52 iken, yüksek moleküler ağırlıklı hyaluronik asit (HMW-HA) uygulaması sonrasında bu oran %67'ye yükselmiştir. Ayrıca, toplam WFOX protein ifadesinde 1,7 kat artış gözlenmiştir. Bu bulgular, WFOX'un hem ifadesinde hem de çekirdeğe geçişinde anlamlı bir artış olduğunu göstermektedir. Literatürde, WFOX'un tümör baskılayıcı bir protein olduğu ve ifadesinin birçok kanser türünde azaldığı gösterilmiştir (Park ve ark., 2004, Chang ve ark., 2018). Özellikle baş-boyun skuamöz hücreli karsinom (SHBBK) ve diğer solid tümörlerde WFOX kaybı, tümör progresyonu ve metastaz ile ilişkilendirilmiştir (Park ve ark., 2004, Ekizoglu ve ark., 2015, Celebi ve ark., 2020, Khawaled ve ark., 2020). Western blot analizlerinde, kanser hücrelerinde WFOX ifadesinin azalmasının protein düzeyinde de doğrulandığı ve WFOX kaybı olan hücrelerde çekirdek fonksiyonlarının bozulduğu gösterilmiştir (Park ve ark., 2004, Aqeilan ve ark., 2004, Bozkurt and Ates, 2020). Ayrıca, WFOX'un çekirdekdeki varlığının artmasının, hücresel sinyal yolları üzerinde belirgin tümör baskılayıcı etkiler

oluşturabileceği, özellikle de Wnt ve TGF- $\beta$  gibi yolakların düzenlenmesinde rol aldığı bildirilmiştir (Celebi ve ark., 2020, Khawaled ve ark., 2020).

HYAL1 gen ifadesi SCC-25'te %108 oranında artarken ( $p=0.0025$ ), yüksek moleküler ağırlıklı HA uygulaması sonrası bu artış %149'a yükselmiştir ( $p=0.0014$ ). HYAL1 geninde gözlenen 1,2 katlık artışın, yüksek moleküler ağırlıklı HA uygulamasının ardından bu yapının daha küçük parçalara ayrılmasını sağlamak üzere, hyaluronik asit parçalanmasında görevli HYAL1 enziminin ekspresyonunun artmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Literatürde, hyaluronik asidin düşük moleküler ağırlıklı formlarının kanserojen etkilere sahip olabileceği belirtilmiştir (Price ve ark., 2018). Literatürde HYAL1'in konsantrasyona bağlı olarak hem onkogen hem de tümör baskılayıcı fonksiyonlara sahip olduğu belirtilmektedir. Larenks kanserinde yapılan çalışmalar, HYAL1 ifadesinin normal dokulara göre 2,5 kat arttığını göstermiştir. Bu artışın kanser progresyonuna katkıda bulunabileceği, HYAL-1 geninin ve HA katabolizma ürünlerinin hedeflenmesinin gelecekte larenks kanseri tedavisinde kullanılabileceği belirtilmektedir (İnan ve ark., 2019). Baş-boyun skuamöz hücreli karsinomunda HYAL1'in tümör kaynaklı ana hyaluronidaz olduğu ve ifadesinin normal kontrollere kıyasla tükürükte artmış olduğu gösterilmiştir (İnan ve ark., 2019, Franzmann ve ark., 2003). HYAL1 proteini SCC-25 hücrelerinde çekirdekte %55 oranında bulunurken, HMW-HA uygulaması sonrası bu oran %60'a çıkmıştır. Toplam HYAL1 protein ifadesinde ise 2,2 kat artış saptanmıştır. Bu sonuçlar, HMW-HA'nın HYAL1 ifadesinin ve çekirdeğe geçişini artırdığını göstermektedir. Literatürde, HYAL1'in yüksek ifadesinin meme, prostat ve mesane kanserlerinde tümör büyümesi, invazyon ve anjiyogenezi artırdığı gösterilmiştir. Western blot analizleriyle, HYAL1'in hem sitoplazmik hem de çekirdekte çeşitli kanser hücrelerinde miktarının yüksek olduğu ve bu artışın hücre proliferasyonu ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. (Puissant and Boonen, 2016, Tan ve ark., 2011). Ayrıca aynı gen ailesinden gelen HYAL2 ile benzer protein alanını taşıdığından Hsu ve ark. yaptığı çalışma göz önüne alındığında aynı HYAL2 gibi HYAL1'in de WWOX'u çekirdeğe taşıdığını düşündürmektedir (Hsu ve ark., 2016).

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada elde edilen bulgular, HMW-HA'nın antitümör etkisinin moleküler mekanizmalarını aydınlatmakta ve literatürdeki mevcut bilgileri desteklemektedir. Baş-boyun kanserleri özelinde değerlendirildiğinde HMW-HA'nın bu kanser türünde özellikle etkili olabileceğini göstermektedir. WWOX ve HYAL1 proteinlerinin rol oynadığı mekanizmalar, yeni terapötik yaklaşımlar için umut verici hedefler sunmaktadır. Özellikle WWOX'un çekirdeğe translokasyonunun artması ve tümör baskılayıcı fonksiyonunun restore edilmesi, hedefli tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde önemli bir bulgu olarak değerlendirilmektedir. Ancak, apoptoz dışındaki hücre ölüm mekanizmalarının (piroptoz, ferroptoz, otofajik hücre ölümü) detaylı incelenmesi ve bu mekanizmaların HMW-HA etkisiyle nasıl etkileneceğinin anlaşılması gerekmektedir. Ayrıca, bu bulgularının *in vivo* çalışmalarla doğrulanması ve klinik çalışmalara geçiş için detaylandırılması kritik öneme sahiptir. Gelecekte yapılacak çalışmalarda, baş-boyun kanserlerinin alt tiplerinin (HPV-pozitif/negatif, farklı anatomik lokalizasyonlar) HMW-HA tedavisine yanıtlarının karşılaştırılması, kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi açısından değerli olacaktır. Ayrıca WWOX/HYAL1 birlikteliğinin ko-immünpresipitasyon deneyi ile belirlenmesi ve HMW-HA'nın normal hücrede kemoterapi etkilerinin giderilmesindeki rolü ve kemoterapik ajanlarla birlikte kullanıldığında kemoterapi direnci üzerindeki etkisinin belirlenmesi gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

- Abou-Foul, A. K., Henson, C., Chernock, R. D., Huang, S. H., Lydiatt, W. M., McDowell, L., O'Sullivan, B., Perez-Ordóñez, B., Robinson, M., Nankivell, P. C., Ruiz-Bravo, E., Chiosea, S. I., Green, T. M., Hunter, K. D., Hwang, J. S., Koljenovic, S., Koppes, S. A., Larsen, S. R., Lo, A. W. I., Costes-Martineau, V., Mittal, N., Mori, T., Nagao, T., Panayiotides, I. G., Pinto, C. A. L., Scheckenbach, K., Seethala, R. R., Ulhøi, B. P., Vingiani, A., Zhang, Y., Yom, S. S. and Mehanna, H. 2024. Standardised definitions and diagnostic criteria for extranodal extension detected on histopathological examination in head and neck cancer: Head and Neck Cancer International Group consensus recommendations. *Lancet Oncol*, 25, e286-e296.
- Abu-Remaileh, M. and Aqeilan, R. I. 2014. Tumor suppressor WWOX regulates glucose metabolism via HIF1 $\alpha$  modulation. *Cell Death & Differentiation*, 21, 1805-1814.
- Anderson, G., Ebadi, M., Vo, K., Novak, J., Govindarajan, A. and Amini, A. 2021. An Updated Review on Head and Neck Cancer Treatment with Radiation Therapy. *Cancers (Basel)*, 13.
- Aqeilan, R. I., Pekarsky, Y., Herrero, J. J., Palamarchuk, A., Letofsky, J., Druck, T., Trapasso, F., Han, S. Y., Melino, G., Huebner, K. and Croce, C. M. 2004. Functional association between Wwox tumor suppressor protein and p73, a p53 homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 4401-6.
- Argiris, A., Karamouzis, M. V., Raben, D. and Ferris, R. L. 2008. Head and neck cancer. *Lancet*, 371, 1695-709.
- Athanassiou-Papaefthymiou, M., Shkeir, O., Kim, D., Divi, V., Matossian, M., Owen, J. H., Czerwinski, M. J., Papagerakis, P., McHugh, J., Bradford, C. R., Carey, T. E., Wolf, G. T., Prince, M. E. and Papagerakis, S. 2014. Evaluation of CD44 variant expression in oral, head and neck squamous cell carcinomas using a triple approach and its clinical significance. *International journal of immunopathology and pharmacology*, 27, 337-349.
- Aupérin, A. 2020. Epidemiology of head and neck cancers: an update. *Current Opinion in Oncology*, 32, 178-186.
- Avrutsky, M. I. and Troy, C. M. 2021. Caspase-9: A Multimodal Therapeutic Target With Diverse Cellular Expression in Human Disease. *Front Pharmacol*, 12, 701301.
- Bao, X., Ran, J., Kong, C., Wan, Z., Wang, J., Yu, T., Ruan, S., Ding, W., Xia, L. and Zhang, D. 2023. Pan-cancer analysis reveals the potential of hyaluronate synthase as therapeutic targets in human tumors. *Heliyon*, 9, e19112.
- Barsouk, A., Aluru, J. S., Rawla, P., Saginala, K. and Barsouk, A. 2023. Epidemiology, Risk Factors, and Prevention of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Med Sci (Basel)*, 11.
- Bozkurt, N. and Ates, O. 2020. Analysis of WWOX gene expression and protein levels in pterygium. *Int Ophthalmol*, 40, 1949-1953.
- Bradley, P. T., Lee, Y. K., Albutt, A., Hardman, J., Kellar, I., Odo, C., Randell, R., Rousseau, N., Tikka, T., Patterson, J. M. and Paleri, V. 2024. Nomenclature of the symptoms of head and neck cancer: a systematic scoping review. *Front Oncol*, 14, 1404860.

- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I. and Jemal, A. 2024. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 74, 229-263.
- Brenk, R., Vetter, S. W., Boyce, S. E., Goodin, D. B. and Shoichet, B. K. 2006. Probing molecular docking in a charged model binding site. *J Mol Biol*, 357, 1449-70.
- Celebi, A., Orhan, C., Seyhan, B. and Buyru, N. 2020. Silencing of Wwox Increases Nuclear Import of Dvl proteins in Head and Neck Cancer. *J Cancer*, 11, 4030-4036.
- Chang, C. C., Hsieh, M. S., Liao, S. T., Chen, Y. H., Cheng, C. W., Huang, P. T., Lin, Y. F. and Chen, C. H. 2012. Hyaluronan regulates PPAR $\gamma$  and inflammatory responses in IL-1 $\beta$ -stimulated human chondrosarcoma cells, a model for osteoarthritis. *Carbohydr Polym*, 90, 1168-75.
- Chang, R., Song, L., Xu, Y., Wu, Y., Dai, C., Wang, X., Sun, X., Hou, Y., Li, W., Zhan, X. and Zhan, L. 2018. Loss of Wwox drives metastasis in triple-negative breast cancer by JAK2/STAT3 axis. *Nature Communications*, 9, 3486.
- Chanmee, T., Ontong, P., Kimata, K. and Itano, N. 2015. Key Roles of Hyaluronan and Its CD44 Receptor in the Stemness and Survival of Cancer Stem Cells. *Front Oncol*, 5, 180.
- Chen, J. E., Pedron, S., Shyu, P., Hu, Y., Sarkaria, J. N. and Harley, B. A. C. 2018. Influence of Hyaluronic Acid Transitions in Tumor Microenvironment on Glioblastoma Malignancy and Invasive Behavior. *Front Mater*, 5.
- Chiesa, E., Greco, A., Riva, F., Dorati, R., Conti, B., Modena, T. and Genta, I. 2022. CD44-Targeted Carriers: The Role of Molecular Weight of Hyaluronic Acid in the Uptake of Hyaluronic Acid-Based Nanoparticles. *Pharmaceuticals (Basel)*, 15.
- Compagnone, M., Gatti, V., Presutti, D., Ruberti, G., Fierro, C., Markert, E. K., Vousden, K. H., Zhou, H., Mauriello, A., Anemone, L., Bongiorno-Borbone, L., Melino, G. and Peschiaroli, A. 2017.  $\Delta$ Np63-mediated regulation of hyaluronic acid metabolism and signaling supports HNSCC tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, 13254-13259.
- Coorens, T. H. H., Guillaumet-Adkins, A., Kovner, R., Linn, R. L., Roberts, V. H. J., Sule, A., Van Hoose, P. M., Bell, T., Blanchard, T., Hernandez, R., Linn, R., Taylor, D., VonDran, M., Ahooyi, T. M., Beitra, D., Bernieh, A., Delaney, M., Faith, M., Fattahi, E., Footer, D., Gilbert, M., Guambaña, S., Gulino, S., Hanson, J., Hattrell, E., Heinemann, C., Kreeb, J., Leino, D., McDevitt, L., Palmieri, A., Pfeiffer, M., Pryhuber, G., Rossi, C., Rasool, I., Roberts, R., Salehi, A., Savannah, E. A., Stachowicz, K., Stokes, D., Suplee, L., Van Hoose, P., Wilkins, B. J., Williams-Taylor, S., Zhang, S., Ardlie, K. G., Getz, G., Lappalainen, T., Montgomery, S. B., Aguet, F., Anderson, L., Bernstein, B., Choudhary, A., Domenech, L., Gaskell, E., Johnson, M., Liu, Q., Marderstein, A. R., Nedzel, J., Okonda, J., Padhi, E. M., Rosano, M., Russell, A. J. C., Walker, B., Sestan, N., Gerstein, M., Milosavljevic, A., Borsari, B., Cho, H., Clarke, D., Deveau, A., Galeev, T., Gobeske, K., Hameed, I., Huttner, A., Jensen, M., Jiang, Y., Li, J., Liu, J., Liu, Y., Ma, J., Mane, S., Meng, R., Nadkarni, A., Ni, P., Park, S., Petrosyan, V., Pochareddy, S., Salamon, I., Xia, Y., Yates, C., Zhang, M., Zhao, H., Conrad, D. F., Feng, G., Brady, F., Boucher, M., Carbone, L., Castro, J., del Rosario, R., Held, M., et al. 2025. The human and non-human primate developmental GTEx projects. *Nature*, 637, 557-564.
- Çağlar, O., Tezel, G., Ruaçan, A. and Sözeri, B. 2013. Prognostic Significance of Fhit and Wwox Proteins Expression in Laryngeal Cancer. *Otolaryngology*, 3, 148.
- Dalla Pietà, A., Carpanese, D., Grigoletto, A., Tosi, A., Dalla Santa, S., Pedersen, G. K., Christensen, D., Meléndez-Alafort, L., Barbieri, V., De Benedictis, P., Pasut, G.,

- Montagner, I. M. and Rosato, A. 2021. Hyaluronan is a natural and effective immunological adjuvant for protein-based vaccines. *Cellular & Molecular Immunology*, 18, 1197-1210.
- Donelan, W., Dominguez-Gutierrez, P. R. and Kusmartsev, S. 2022. Deregulated hyaluronan metabolism in the tumor microenvironment drives cancer inflammation and tumor-associated immune suppression. *Front Immunol*, 13, 971278.
- Ehaideb, S. N., Al-Bu Ali, M. J., Al-Obaid, J. J., Aljassim, K. M. and Alfadhel, M. 2018. Novel Homozygous Mutation in the WWOX Gene Causes Seizures and Global Developmental Delay: Report and Review. *Transl Neurosci*, 9, 203-208.
- Ekizoglu, S., Bulut, P., Karaman, E., Kilic, E. and Buyru, N. 2015. Epigenetic and genetic alterations affect the WWOX gene in head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One*, 10, e0115353.
- Farooq, A. 2015. Structural insights into the functional versatility of WW domain-containing oxidoreductase tumor suppressor. *Exp Biol Med (Maywood)*, 240, 361-74.
- Franzmann, E. J., Schroeder, G. L., Goodwin, W. J., Weed, D. T., Fisher, P. and Lokeshwar, V. B. 2003. Expression of tumor markers hyaluronic acid and hyaluronidase (HYAL1) in head and neck tumors. *Int J Cancer*, 106, 438-45.
- Galbiatti, A. L., Padovani-Junior, J. A., Maniglia, J. V., Rodrigues, C. D., Pavarino É, C. and Goloni-Bertollo, E. M. 2013. Head and neck cancer: causes, prevention and treatment. *Braz J Otorhinolaryngol*, 79, 239-47.
- Georgopoulos, R. and Liu, J. C. 2015. Examination of the patient with head and neck cancer. *Surg Oncol Clin N Am*, 24, 409-21.
- Gormley, M., Creaney, G., Schache, A., Ingarfield, K. and Conway, D. I. 2022. Reviewing the epidemiology of head and neck cancer: definitions, trends and risk factors. *Br Dent J*, 233, 780-786.
- Gürsel Ürün, Y., Budak, M. and Usturalı Keskin, E. 2023. Methylation status, mRNA and protein expression of the SMAD4 gene in patients with non-melanocytic skin cancers. *Mol Biol Rep*, 50, 7295-7304.
- Hsu, L. J., Chiang, M. F., Sze, C. I., Su, W. P., Yap, Y. V., Lee, I. T., Kuo, H. L. and Chang, N. S. 2016. HYAL-2-WWOX-SMAD4 Signaling in Cell Death and Anticancer Response. *Front Cell Dev Biol*, 4, 141.
- Hsu, L. J., Hong, Q., Chen, S. T., Kuo, H. L., Schultz, L., Heath, J., Lin, S. R., Lee, M. H., Li, D. Z., Li, Z. L., Cheng, H. C., Armand, G. and Chang, N. S. 2017. Hyaluronan activates Hyal-2/WWOX/Smad4 signaling and causes bubbling cell death when the signaling complex is overexpressed. *Oncotarget*, 8, 19137-19155.
- Huang, S. H. and O'Sullivan, B. 2017. Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. *Curr Treat Options Oncol*, 18, 40.
- İnan, H. C., Yener, M., Buyru, N., Çelebi, A., Yilmaz, M. and Çomunoğlu, N. 2019. The investigation of hyaluronic acid and hyaluronidase-1 levels as tumour marker in larynx cancer. *Clin Otolaryngol*, 44, 914-918.
- Jiang, D., Liang, J. and Noble, P. W. 2011. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiol Rev*, 91, 221-64.
- Karousou, E., Parnigoni, A., Moretto, P., Passi, A., Viola, M. and Vigetti, D. 2023. Hyaluronan in the Cancer Cells Microenvironment. *Cancers (Basel)*, 15.
- Kavitha, L., Vijayashree Priyadharsini, J., Kattula, D., Rao, U. K. M., Balaji Srikanth, R., Kuzhalmozhi, M. and Ranganathan, K. 2023. Expression of CD44 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma-An In-Silico Study. *Glob Med Genet*, 10, 221-228.
- Khawaled, S., Nigita, G., Distefano, R., Oster, S., Suh, S.-S., Smith, Y., Khalaileh, A., Peng, Y., Croce, C. M., Geiger, T., Seewaldt, V. L. and Aqeilan, R. I. 2020. Pleiotropic tumor

- suppressor functions of WWOX antagonize metastasis. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5, 43.
- Kim, J. H., Moon, M. J., Kim, D. Y., Heo, S. H. and Jeong, Y. Y. 2018. Hyaluronic Acid-Based Nanomaterials for Cancer Therapy. *Polymers (Basel)*, 10.
- Klocker, J., Sabitzer, H., Raunik, W., Wieser, S. and Schumer, J. 1998. Hyaluronidase as additive to induction chemotherapy in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Lett*, 131, 113-5.
- Kośla, K., Kałuzińska, Ż. and Bednarek, A. K. 2020. The WWOX gene in brain development and pathology. *Exp Biol Med (Maywood)*, 245, 1122-1129.
- Kośla, K., Płuciennik, E., Styczeń-Binkowska, E., Nowakowska, M., Orzechowska, M. and Bednarek, A. K. 2019. The WWOX Gene Influences Cellular Pathways in the Neuronal Differentiation of Human Neural Progenitor Cells. *Front Cell Neurosci*, 13, 391.
- Lee-Sayer, S. S., Dong, Y., Arif, A. A., Olsson, M., Brown, K. L. and Johnson, P. 2015. The where, when, how, and why of hyaluronan binding by immune cells. *Front Immunol*, 6, 150.
- Lee, C. S., Choo, A., Dayan, S., Richards, R. I. and O'Keefe, L. V. 2021. Molecular Biology of the WWOX Gene That Spans Chromosomal Fragile Site FRA16D. *Cells*, 10.
- Lee, Y., Shinn, J., Xu, C., Dobson, H. E., Neamati, N. and Moon, J. J. 2023. Hyaluronic acid-bilirubin nanomedicine-based combination chemoimmunotherapy. *Nature Communications*, 14, 4771.
- Lewandowska, U., Zelazowski, M., Seta, K., Byczewska, M., Pluciennik, E. and Bednarek, A. K. 2009. WWOX, the tumour suppressor gene affected in multiple cancers. *J Physiol Pharmacol*, 60 Suppl 1, 47-56.
- Liu, C. J., Shen, W. G., Peng, S. Y., Cheng, H. W., Kao, S. Y., Lin, S. C. and Chang, K. W. 2014. miR-134 induces oncogenicity and metastasis in head and neck carcinoma through targeting WWOX gene. *Int J Cancer*, 134, 811-21.
- Liu, Z., Hou, P., Fang, J., Shao, C., Shi, Y., Melino, G. and Peschiaroli, A. 2024. Hyaluronic acid metabolism and chemotherapy resistance: recent advances and therapeutic potential. *Mol Oncol*, 18, 2087-2106.
- Lo, J. Y., Chou, Y. T., Lai, F. J. and Hsu, L. J. 2015. Regulation of cell signaling and apoptosis by tumor suppressor WWOX. *Exp Biol Med (Maywood)*, 240, 383-91.
- Luo, Y. and Prestwich, G. D. 1999. Synthesis and selective cytotoxicity of a hyaluronic acid-antitumor bioconjugate. *Bioconjug Chem*, 10, 755-63.
- Lydiatt, W. M., Patel, S. G., O'Sullivan, B., Brandwein, M. S., Ridge, J. A., Migliacci, J. C., Loomis, A. M. and Shah, J. P. 2017. Head and Neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin*, 67, 122-137.
- Mahmud, M. A. A., Noguchi, M., Domon, A., Tochigi, Y., Katayama, K. and Suzuki, H. 2021. Cellular Expression and Subcellular Localization of Wwox Protein During Testicular Development and Spermatogenesis in Rats. *J Histochem Cytochem*, 69, 257-270.
- Michalczyk, M., Humeniuk, E., Adamczuk, G. and Korga-Plewko, A. 2022. Hyaluronic Acid as a Modern Approach in Anticancer Therapy-Review. *Int J Mol Sci*, 24.
- Mo, L., Li, W., Shi, X., Yang, Z., Li, X., Qin, L., Luo, Y. and Mo, W. 2017. WWOX suppresses proliferation and induces apoptosis via G2 arrest and caspase 3 pathway in nasopharyngeal carcinoma cells. *Int J Clin Exp Pathol*, 10, 11526-11535.
- Monden, N., Asakage, T., Kiyota, N., Homma, A., Matsuura, K., Hanai, N., Kodaira, T., Zenda, S., Fujii, H., Tahara, M., Yokota, T., Akimoto, T., Iwae, S., Onitsuka, T., Ogawa, T., Okano, S., Takahashi, S., Shimizu, Y., Yonezawa, K. and Hayashi, R. 2019. A review

- of head and neck cancer staging system in the TNM classification of malignant tumors (eighth edition). *Jpn J Clin Oncol*, 49, 589-595.
- Nguyen, N., Kumar, A., Chacko, S., Ouellette, R. J. and Ghosh, A. 2017. Human hyaluronic acid synthase-1 promotes malignant transformation via epithelial-to-mesenchymal transition, micronucleation and centrosome abnormalities. *Cell Commun Signal*, 15, 48.
- Olsson, M. and Zhivotovsky, B. 2011. Caspases and cancer. *Cell Death & Differentiation*, 18, 1441-1449.
- Ozaki, T. and Nakagawara, A. 2011. Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers (Basel)*, 3, 994-1013.
- Paige, A. J., Taylor, K. J., Taylor, C., Hillier, S. G., Farrington, S., Scott, D., Porteous, D. J., Smyth, J. F., Gabra, H. and Watson, J. E. 2001. WWOX: a candidate tumor suppressor gene involved in multiple tumor types. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 11417-22.
- Palabiyik, A. A. 2025. The role of Bcl-2 in controlling the transition between autophagy and apoptosis (Review). *Mol Med Rep*, 32.
- Palmerini, F., Devilard, E., Jarry, A., Birg, F. and Xerri, L. 2001. Caspase 7 downregulation as an immunohistochemical marker of colonic carcinoma. *Hum Pathol*, 32, 461-7.
- Park, S. W., Ludes-Meyers, J., Zimonjic, D. B., Durkin, M. E., Popescu, N. C. and Aldaz, C. M. 2004. Frequent downregulation and loss of WWOX gene expression in human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*, 91, 753-9.
- Pashkina, E., Bykova, M., Berishvili, M., Lazarev, Y. and Kozlov, V. 2025. Hyaluronic Acid-Based Drug Delivery Systems for Cancer Therapy. *Cells*, 14.
- Peng, F., Zhu, F., Cao, B. and Peng, L. 2023. Multidimensional Analysis of PANoptosis-Related Molecule CASP8: Prognostic Significance, Immune Microenvironment Effect, and Therapeutic Implications in Hepatocellular Carcinoma. *Genet Res (Camb)*, 2023, 2406193.
- Pimenta, F. J., Gomes, D. A., Perdigão, P. F., Barbosa, A. A., Romano-Silva, M. A., Gomez, M. V., Aldaz, C. M., De Marco, L. and Gomez, R. S. 2006. Characterization of the tumor suppressor gene WWOX in primary human oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer*, 118, 1154-8.
- Posey, J. T., Soloway, M. S., Ekici, S., Sofer, M., Civantos, F., Duncan, R. C. and Lokeshwar, V. B. 2003. Evaluation of the prognostic potential of hyaluronic acid and hyaluronidase (HYAL1) for prostate cancer. *Cancer Res*, 63, 2638-44.
- Pospiech, K., Pluciennik, E. and Bednarek, A. K. 2018. WWOX Tumor Suppressor Gene in Breast Cancer, a Historical Perspective and Future Directions. *Front Oncol*, 8, 345.
- Price, Z. K., Lokman, N. A. and Ricciardelli, C. 2018. Differing Roles of Hyaluronan Molecular Weight on Cancer Cell Behavior and Chemotherapy Resistance. *Cancers (Basel)*, 10.
- Puissant, E. and Boonen, M. 2016. Monocytes/Macrophages Upregulate the Hyaluronidase HYAL1 and Adapt Its Subcellular Trafficking to Promote Extracellular Residency upon Differentiation into Osteoclasts. *PLoS One*, 11, e0165004.
- Qin, L., Li, X., Lin, Z., Li, H., Mo, Y., Su, F., Mo, W. and Yang, Z. 2017. EBV-LMP1 regulating AKT/mTOR signaling pathway and WWOX in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*, 10, 8619-8625.
- Rodella, G., Pr at, V., Gallez, B. and Malfanti, A. 2025. Design Strategies for Hyaluronic Acid-based Drug Delivery Systems in Cancer Immunotherapy. *J Control Release*, 383, 113784.
- Saigo, C., Kito, Y. and Takeuchi, T. 2018. Cancerous Protein Network That Inhibits the Tumor Suppressor Function of WW Domain-Containing Oxidoreductase (WWOX) by Aberrantly Expressed Molecules. *Front Oncol*, 8, 350.

- Schmaus, A. and Sleeman, J. P. 2014. Hyaluronidase-1 expression promotes lung metastasis in syngeneic mouse tumor models without affecting accumulation of small hyaluronan oligosaccharides in tumor interstitial fluid. *Glycobiology*, 25, 258-268.
- Schmitt, A., Barth, T. F., Beyer, E., Borchert, F., Rojewski, M., Chen, J., Guillaume, P., Gronau, S., Greiner, J., Möller, P., Riechelmann, H. and Schmitt, M. 2009. The tumor antigens RHAMM and G250/CAIX are expressed in head and neck squamous cell carcinomas and elicit specific CD8+ T cell responses. *Int J Oncol*, 34, 629-39.
- Schmittgen, T. D. and Livak, K. J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*, 3, 1101-8.
- Schrock, M. S. and Huebner, K. 2015. WWOX: a fragile tumor suppressor. *Exp Biol Med (Maywood)*, 240, 296-304.
- Seki, T., Saida, Y., Kishimoto, S., Lee, J., Otowa, Y., Yamamoto, K., Chandramouli, G. V., Devasahayam, N., Mitchell, J. B., Krishna, M. C. and Brender, J. R. 2022. PEGPH20, a PEGylated human hyaluronidase, induces radiosensitization by reoxygenation in pancreatic cancer xenografts. A molecular imaging study. *Neoplasia*, 30, 100793.
- Shigeishi, H., Higashikawa, K. and Takechi, M. 2014. Role of receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM) in human head and neck cancers. *J Cancer Res Clin Oncol*, 140, 1629-40.
- Stern, R. and Jedrzejewski, M. J. 2006. Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chem Rev*, 106, 818-39.
- Sugita, S., Naito, Y., Zhou, L., He, H., Hao, Q., Sakamoto, A. and Lee, J. W. 2022. Hyaluronic acid restored protein permeability across injured human lung microvascular endothelial cells. *FASEB Bioadv*, 4, 619-631.
- Sun, S., Won, H. S., Hong, S. A., Hong, J. H., Jo, H., Lee, H., Kim, O., Lee, M. A. and Ko, Y. H. 2020. Prognostic implications of stromal hyaluronic acid protein expression in resected oropharyngeal and oral cavity cancers. *Korean J Intern Med*, 35, 408-420.
- Tait, S. W., Ichim, G. and Green, D. R. 2014. Die another way--non-apoptotic mechanisms of cell death. *J Cell Sci*, 127, 2135-44.
- Tan, J. X., Wang, X. Y., Su, X. L., Li, H. Y., Shi, Y., Wang, L. and Ren, G. S. 2011. Upregulation of HYAL1 expression in breast cancer promoted tumor cell proliferation, migration, invasion and angiogenesis. *PLoS One*, 6, e22836.
- Tanne, Y., Tanimoto, K., Okuma, S., Kunitatsu, R., Hirose, N., Mitsuyoshi, T. and Tanne, K. 2013. Effects of hyaluronan oligosaccharides on apoptosis of human gingival fibroblasts. *Open Journal of Stomatology*, 3, 19-24.
- Taouis, K., Driouch, K., Lidereau, R. and Lallemand, F. 2021. Molecular Functions of WWOX Potentially Involved in Cancer Development. *Cells*, 10.
- Tong, X., Tang, R., Xiao, M., Xu, J., Wang, W., Zhang, B., Liu, J., Yu, X. and Shi, S. 2022. Targeting cell death pathways for cancer therapy: recent developments in necroptosis, pyroptosis, ferroptosis, and cuproptosis research. *Journal of Hematology & Oncology*, 15, 174.
- Trapasso, S. and Allegra, E. 2012. Role of CD44 as a marker of cancer stem cells in head and neck cancer. *Biologics*, 6, 379-83.
- Trisciuglio, D., Tupone, M. G., Desideri, M., Di Martile, M., Gabellini, C., Buglioni, S., Pallocca, M., Alessandrini, G., D'Aguzzo, S. and Del Bufalo, D. 2017. BCL-XL overexpression promotes tumor progression-associated properties. *Cell Death & Disease*, 8, 3216.
- Vasudevan, H. N. and Yom, S. S. 2021. Nasopharyngeal Carcinoma and Its Association with Epstein-Barr Virus. *Hematol Oncol Clin North Am*, 35, 963-971.

- Vilella-Arias, S. A., Rocha, R. M., da Costa, W. H., Zequi Sde, C., Guimarães, G. C., Verjovski-Almeida, S., Soares, F. A. and Reis, E. M. 2013. Loss of caspase 7 expression is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma clear cell subtype. *Urology*, 82, 974.e1-7.
- Vishwanath, V., Jafarieh, S. and Rembielak, A. 2020. The role of imaging in head and neck cancer: An overview of different imaging modalities in primary diagnosis and staging of the disease. *J Contemp Brachytherapy*, 12, 512-518.
- Wang, H., Guo, M., Wei, H. and Chen, Y. 2023. Targeting p53 pathways: mechanisms, structures and advances in therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8, 92.
- Wang, S. J. and Bourguignon, L. Y. 2006. Hyaluronan and the interaction between CD44 and epidermal growth factor receptor in oncogenic signaling and chemotherapy resistance in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 132, 771-8.
- Xu, J., Chen, S., Yang, J., Nie, Z., He, J., Zhao, Y., Liu, X., Zhang, J. and Zhao, Y. 2023. Hyaluronidase-trigger nanocarriers for targeted delivery of anti-liver cancer compound. *RSC Advances*, 13, 11160-11170.
- Yang, W., Wang, X. M., Yuan, H. Y., Liu, Z. H., Gao, S. and Peng, L. 2017. Exploring the mechanism of WWOX growth inhibitory effects on oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*, 13, 3198-3204.
- Zanoni, D. K., Patel, S. G. and Shah, J. P. 2019. Changes in the 8th Edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) Staging of Head and Neck Cancer: Rationale and Implications. *Curr Oncol Rep*, 21, 52.

# İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI



Sayfa 2 of 85 - Bütünlük Genel Bakış

Gönderi Kimliği trncoid::1:3290100547

## 6% Genel Benzerlik

Her veri tabanı için çıkarılan kaynaklar da dâhil tüm eşleşmelerin kombine toplamı.

### Rapordan Filtrelenen

- Bibliyografya
- Alıntılanan Metin

### Hariç tutulacaklar

- 1 Çıkarılan Kaynak
- 29 Çıkarılan Eşleşme

### Ön Sıradaki Kaynaklar

- 4% İnternet kaynakları
- 4% Yayınlar
- 2% Gönderilen çalışmalar (Öğrenci Makaleleri)

### Bütünlük Bayrakları

#### İnceleme için 0 Bütünlük Bayrağı

Herhangi bir şüpheli metin manipülasyonu belirlenmedi.

Sistemimizin algoritmaları bir belgede, onu normal bir gönderiden ayırabilecek her türlü tutarsızlığı derinlemesine inceler. Tuhaf bir şey fark edersek incelemeniz için bayrak ekleriz.

Bir Bayrak mutlaka bir sorun olduğunu göstermez. Ancak daha fazla inceleme için dikkatinizi vermenizi öneririz.



Sayfa 2 of 85 - Bütünlük Genel Bakış

Gönderi Kimliği trncoid::1:3290100547