



**SIÇANLARDA 4NQO İLE İNDÜKLENEN AĞIZ İÇİ
KANSER MODELLERİNDE D VİTAMİNİ EKSİK
VE/VEYA KOLESTEROLCE ZENGİN DİYETLERİN
NEOPLASTİK SÜREÇTE HÜCRE İÇİ ENERJİ
METABOLİZMASI ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Rasim GÜMÜŞ

**Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ**

**2022
Her hakkı saklıdır.**



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SIÇANLARDA 4NQO İLE İNDÜKLENEN AĞIZ İÇİ KANSER
MODELLERİNDE D VİTAMİNİ EKSİK VE/VEYA KOLESTEROLCE
ZENGİN DİYETLERİN NEOPLASTİK SÜREÇTE HÜCRE İÇİ ENERJİ
METABOLİZMASI ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Rasim GÜMÜŞ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2022

Her hakkı saklıdır

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

28 / 06 / 2022

Rasim GÜMÜŞ

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SIÇANLARDA 4NQO İLE İNDÜKLENEN AĞIZ İÇİ KANSER MODELLERİNDE D VİTAMİNİ EKSİK VE/VEYA KOLESTEROLCE ZENGİN DİYETLERİN NEOPLASTİK SÜREÇTE HÜCRE İÇİ ENERJİ METABOLİZMASI ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Rasim GÜMÜŞ

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ

Diyet ve beslenme alışkanlıkları karsinogenik süreçler sırasında kritik öneme sahiptir. Hastalarda yüksek kolesterolün kritik nedenleri arasında süt ve süt ürünlerinin tüketiminin olması ve sebze ile meyvelerin vitaminler açısından önemli kaynaklar olması göz önünde bulundurularak, D vitamini eksikliği (VDE) ve yüksek kolesterolün oral skuamöz hücreli karsinomdaki (OSHK) olası rollerini glikolizin modüle edilmesi aracılığıyla araştırılması amaçlanmıştır. Başlangıçta 23 OSHK hastası ile yaş ve cinsiyetçe eşleştirilmiş 30 kontrol bireyin toplam kolesterol, LDL, HDL, trigliserid, LDH ve D vitamini düzeyleri karşılaştırılmıştır ve Pearson Analizini kullanarak bu parametrelerin birbirleri ile korelasyonları incelenmiştir. Gen seti zenginleştirme analizi için GEO veri setleri kullanılmıştır. VDE ve yüksek kolesterolün karsinogenez sırasındaki katkısını glikolizin olası modülasyonu yoluyla araştırmak için 4-nitrokinolin-1-oksit ile indüklenen *in vivo* oral karsinogenez modelleri kullanılmıştır. Ardından sırasıyla ELISA ve qRT-PCR kullanarak sıçan ağız içi tümör doku örneklerinde kolesterol, laktat ve glikolizle ilgili gen ifade seviyeleri ölçülmüştür. VDE ve yüksek kolesterolün tek başına ve birlikte 4NQO ile indüklenen *in vivo* kanser modellerinde daha büyük tümörlerin oluşumuna yol açtığını ve bu tümörlerin oluşumunun glikoliz inhibisyonu ile baskılandığı gösterilmiştir. Sonuç olarak, oral karsinogenez sırasında yüksek kolesterol ve VDE'nin ortak katkısını ve bu sürecin temel olarak tümör hücrelerinde enerji metabolizmasının değişimiyle gerçekleştiği bildirilmiştir.

2022, 51 sayfa

Anahtar Kelimeler: Ağız İçi Skuamöz Hücre Karsinomu, Vitamin D Eksikliği, Kolesterol, LDL, Glikoliz, 4NQO

ABSTRACT

MS. Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF VITAMIN D DEFICIENT AND/OR CHOLESTEROL-RICH DIETS ON INTRACELLULAR ENERGY METABOLISM DURING THE NEOPLASTIC PROCESS IN 4NQO-INDUCED ORAL CANCER RAT MODELS

Rasim GUMUS

Erzurum Technical University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Omer Faruk KARATAS

Diets and nutritional habits are critical during carcinogenic processes, where a diet poor in fruits and vegetables and rich in meat and other foods of animal origin promote carcinogenesis. Considering the vegetables and fruits as important sources for vitamins and dairy products as critical causes for high cholesterol in patients, we aimed at investigating the possible involvement of Vitamin D deficiency (VDD) and high cholesterol together in oral squamous cell carcinoma (OSCC) through modulating glycolysis. We initially compared total cholesterol, LDL, HDL, triglycerides, LDH, and Vitamin D levels of 23 OSCC patients and age and gender matched 30 control individuals and analyzed their correlation using Pearson's Analysis. Then, we used GEO datasets for gene set enrichment analysis. We used 4-nitroquinoline-1-oxide induced *in vivo* oral carcinogenesis models to investigate the contribution of VDD and high cholesterol during carcinogenesis via possible modulation of glycolysis. We, furthermore, measured the cholesterol and gene expression levels in rat tongue tumor tissue samples using ELISA and qRT-PCR, respectively. We found that VDD and high cholesterol co-exist in OSCC patients and deregulation of cholesterol and Vitamin D levels results in enrichment of genes related to glycolysis. We, additionally, demonstrated that VDD and high cholesterol on their own and together led to formation of larger tumors in 4NQO induced *in vivo* cancer models, which is suppressed by glycolysis inhibition. In conclusion, we reported collaborative contribution of high cholesterol and VDD during oral carcinogenesis, which is mainly carried out via altering energy metabolism in tumor cells.

2022, 51 pages

Keywords: Oral squamous cell carcinoma, Vitamin D deficiency, Cholesterol, LDL, glycolysis, 4NQO

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimimin tamamlanması ve bu tez çalışmasına kadar geçen süre içerisinde, çalışmalarında gerekli bilgi ve tecrübelerini paylaşan, her türlü anlayış, ilgi ve sabrı gösteren, üzerimde çok büyük emekleri olan değerli danışman hocam Doç. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ'a

Yüksek lisans eğitimim boyunca hoşgörü ve sabırla her konuda bana destek olan, bilimsel ve deneysel anlamda yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Özel ÇAPIK, Abdulmelik AYTATLI, Ahsen KILIÇ, Fatma ŞANLI, Gülnur KUŞDEMİR ve Neslişah BARLAK'a

Bu zorlu süreçte desteğini bir an bile esirgemeyen, her anımda yanımda olan sevgili nişanlım Gözde PERVANE'ye

Bu günlere ulaşmamda en büyük katkı sahibi olan, varlıklarıyla her zaman güç aldığım saygı değer babam Halil GÜMÜŞ'e, annem Hanife GÜMÜŞ'e, ablam Gözde ARGİN'a, abim Bekir Sami GÜMÜŞ'e ve kardeşim Fethiye GÜMÜŞ'e

Sonsuz Teşekkürler.

Rasim GÜMÜŞ

Haziran 2022

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Ağız İçi Skuamöz Hücreli Karsinom Agresif Bir Kanser Türüdür	1
1.2. OSHK İçin En Önemli Risk Faktörü Sigara ve Alkol Kullanımıdır	1
1.3. Vitamin D Eksiliği OSHK Riskini Arttırmaktadır Fakat Tek Başına Karsinogenez İçin Yeterli Değildir	2
1.4. D Vitamini Eksikliği Kolesterol Sentez Yolağı Üzerinden Hücrenin Glikolizi Tercih Etmesine Yol Açabilir.....	3
1.4.1. Karsinogenez İçin Enerji Metabolizmasının Yeniden Düzenlenmesi Bir Gerekliliktir	3
1.4.2. D vitamini eksikliği hücre içi kolesterol sentezinin artmasına yol açabilir.....	4
1.4.3. Artan hücre içi kolesterol seviyesi lxr aracılığıyla asetil coa üretimini azaltır ve glikolizi artırır	6
1.5. 4-Nitrokinolin 1-Oksit ile İndüklenmiş Mürin Kanser Modelleri Ağız İçi Kanserlerin Çalışılması İçin İdealdir	7
2. KAYNAK ÖZETLERİ	9
3. MATERYAL VE YÖNTEM	11
3.1. Materyal.....	11
3.2. Yöntem	15
3.2.1. <i>In Vivo</i> deneyler.....	15
3.2.1.1. Sıçanların temini ve barındırılması.....	15
3.2.1.2. Deney grupları ve beslenmeleri	16
3.2.2. Hastalar ve hastalara ait biyokimyasal veriler	20
3.2.3. <i>In Silico</i> analiz	21
3.2.4. 4-Nitroquinoline-1-Oxide (4NQO) ile indüklenen ağız içi karsinogenez modeli	21
3.2.5. 2-Deoksi-D-Glikoz (2DG) uygulaması	21
3.2.6. Sıçan kan örneklerinin biyokimyasal analizi	22
3.2.7. Dil lezyonlarının histopatolojik incelemesi	22
3.2.8. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kullanılarak sıçan dil dokularında kolesterol düzeylerinin tespiti	22

3.2.9. RNA ekstraksiyonu, tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi ve kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qrt-PZR).....	23
3.2.10. İstatistiksel analiz.....	24
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	25
4.1. OSHK Hastalarında Tespit Edilen Yüksek Kolesterol ve Düşük D Vitamin Seviyeleri Birbiriyle Negatif İlişkilidir	25
4.2. Kolesterol ve D Vitamini Seviyelerinin Deregülasyonu, Glikoliz İle İlişkili Genleri Zenginleştirir	27
4.3. Yüksek Kolesterol ve D Vitamini Eksikliği, 4NQO Oral Kanser Sıçan Modelinde Glikolizin Deregülasyonu Yoluyla Karsinogenezi Teşvik Eder.....	36
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	43
KAYNAKLAR	46
EKLER	50
EK 1	50
EK 2	51

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler Açıklama

°	Derece
kg	Kilogram
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
mg	Miligram
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
nm	Nanometre
%	Yüzde

Kisaltmalar

CO ₂	Karbondioksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
GEO	Gene Expression Omnibus
HDL	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HMG-CoA	3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA
İP	İntraperitoneal
Insig-1	Insulin-induced gene-1
LDH	Laktat Dehidrogenaz
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LDL-R	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Reseptörü
LXR	Liver X Reseptörü
OSHK	Oral Skuamöz Hücreli Karsinom
PDC	Piruvat Dehidrogenaz Kompleksi
PDK	Piruvat Dehidrojenaz Kinaz
Ppm	Milyonda Bir Birim

RXR	Retinoid X Reseptörü
SREBP	Sterol Düzenleyici Element Bağlayıcı Protein
VDE(Δ VD)	Vitamin D Eksik
VDR	Vitamin D Reseptörü
2DG	2-Deoksi-D-Glikoz
4-NQO	4-nitrokinolin 1-oksit



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. 1,25-(OH)2D3 Insig-2 ifadesini transkripsiyonel olarak artırmaktadır.....	5
Şekil 1.2. Vitamin D eksikliği hücre içi kolesterol seviyesini yükseltir.....	5
Şekil 1.3. Hücre içi kolesterol seviyesinin artması hücreyi glikolize yönlendirir.....	7
Şekil 4.1. OSHK hastaları ile onlara yaş ve cinsiyetçe denk 30 kontrol bireyin total kolesterol, LDL, HDL, trigliserid ve vitamin D düzeyleri.....	25
Şekil 4.2. OSHK hastaları ile onlara yaş ve cinsiyetçe denk 30 kontrol bireyin total kolesterol, LDL, HDL, trigliserid ve vitamin D parametrelerinin birbirleri ile korelasyonları.....	26
Şekil 4.3. Gene Expression Omnibus (GEO) veri tabanında yer alan, halka açık GSE68986 veri setinin GEO2R in silico aracı kullanılarak analizi sonucu farklı ifade edilen genlerin nokta çizim (dot plot) gösterimi (Şekil 4.3a) ve farklı ifade edilen genlerin gen seti zenginleştirme analizi (Şekil 4.3b) sonuçları.....	28
Şekil 4.4. Gene Expression Omnibus (GEO) veri tabanında yer alan, halka açık GSE47461 veri setinin GEO2R in silico aracı kullanılarak analizi sonucu farklı ifade edilen genlerin nokta çizim (dot plot) gösterimi (Şekil 4.4a) ve farklı ifade edilen genlerin gen seti zenginleştirme analizi (Şekil 4.4b) sonuçları.....	30
Şekil 4.5. Gene Expression Omnibus (GEO) veri tabanında yer alan, halka açık GSE8961 veri setinin GEO2R in silico aracı kullanılarak analizi sonucu farklı ifade edilen genlerin nokta çizim (dot plot) gösterimi (Şekil 4.5a) ve farklı ifade edilen genlerin gen seti zenginleştirme analizi (Şekil 4.5b) sonuçları.....	32
Şekil 4.6. Gene Expression Omnibus (GEO) veri tabanında yer alan, halka açık GSE60956 veri setinin GEO2R in silico aracı kullanılarak analizi sonucu farklı ifade edilen genlerin nokta çizim (dot plot) gösterimi (Şekil 4.6a) ve farklı ifade edilen genlerin gen seti zenginleştirme analizi (Şekil 4.6b) sonuçları.....	34
Şekil 4.7. OSHK hastaları ile onlara yaş ve cinsiyetçe denk 30 kontrol bireyin LDH düzeyleri ile LDH düzeylerinin diğer biyokimyasal parametreler ile korelasyonu.....	35
Şekil 4.8. Çalışma grupları için oluşturulan deney dizaynı.....	36

Şekil 4.9. 10. haftada serum total kolesterol, LDL, HDL, trigliserid ve vitamin D seviyeleri.....	37
Şekil 4.10. Sıçanların deneysel prosedür sürecindeki kilo takipleri.....	38
Şekil 4.11. 27. haftada serum total kolesterol, LDL, HDL, trigliserid ve vitamin D seviyeleri.....	39
Şekil 4.12. Sıçanların dillerinde oluşan tümörler ve bu tümörlerin histopatolojik incelenmesi sonucu elde edilen H&E görüntüleri.....	40
Şekil 4.13. Tümör dokularında total kolesterol ve glikoliz ilişkili genlerin ifade seviyeleri.....	41



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan cihazların listesi	11
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar, kitler ve sarf malzemelerin listesi.....	13
Çizelge 3.3. Çalışma kapsamında kullanılan deney grupları ve bu gruplar için diyet uygulamaları.....	16
Çizelge 3.4. Normal diyet formülasyonu.....	17
Çizelge 3.5. Vitamin D eksik diyet formülasyonu.....	18
Çizelge 3.6. Yüksek kolesterolü vitamin D eksik diyet formülasyonu.....	19
Çizelge 3.7. Yüksek kolesterolü vitamin D eksik diyet formülasyonu.....	20
Çizelge 3.8. Primer listesi ve dizileri.....	24

1. GİRİŞ

1.1. Ağız İçi Skuamöz Hücreli Karsinom Agresif Bir Kanser Türüdür

Baş ve boyun kanserleri, farenks, gırtlak, yemek borusu ve ağız içi kanserlerini içerir ve tipik olarak agresiflikleri ve yüksek ölüm riskleri ile karakterize edilmektedir (Hashibe et al. 2007; Rothenberg and Ellisen 2012). Ağız içi kanserleri ise baş ve boyun bölgesinde en sık görülen kanser türüdür ve ağız içi mukozasında herhangi bir yerde oluşabilme potansiyeli ile birlikte en çok ağız tabanı ve dilde görülmektedir (Noguti et al. 2012). Ağız içi kanserleri arasında en sık görülen ise ağız içi skuamöz hücreli karsinomdur (OSHK) ve %50'nin altında olan 5 yıllık sağ kalım oranı ile ilerlemiş meme veya prostat kanseri hastalarındaki kadar düşük bir sağ kalım oranına sahiptir (Warnakulasuriya 2009). Son 40 yıl içerisinde OSHK için çok sayıda yeni tedavi stratejisi geliştirilmiş olmasına rağmen, OSHK insidans ve mortalitesi artmış, buna karşılık hastaların 5 yıllık sağ kalım oranında ve yaşam kalitesinde herhangi bir ilerleme görülememiştir (Warnakulasuriya 2009). Hatta bu tedavilerin sıklıkla konuşma kaybı, çiğneme ve yutma bozuklukları, kozmetik deformite ve psikolojik rahatsızlıklarla sonuçlandığı bilinmektedir (Kademani et al. 2008). Dolayısıyla, OSHK'lı hastaların ölüm oranını etkili bir şekilde azaltmak ve yaşam kalitelerini arttırabilmek için, OSHK oluşum ve gelişiminin altında yatan moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılması ve bu bilgilerin erken tanı, tedavi ve önleme için yeni yaklaşımlara dönüştürülmesi bir gerekliliktir.

1.2. OSHK İçin En Önemli Risk Faktörü Sigara ve Alkol Kullanımıdır

OSHK oldukça karmaşık bir etiyolojiye sahiptir ve oluşumunda genetik-çevresel etkileşimlerin rol oynadığı bilinmektedir (Williams 2000; Ram et al. 2011). Tütün ve alkol kullanımı, diyet yetersizlikleri, sifilis, insan papiloma virüsü ve kronik kandidiyazis de dahil olmak üzere oral kanserle ilişkili çok sayıda risk faktörü mevcuttur (Ram et al. 2011). Bunların arasında en büyük risk faktörleri olarak tüm vakaların %90'ından sorumlu olan sigara kullanımı ve ağır alkol tüketimi gösterilmektedir (Stoner and Gupta 2001). Bunun yanı sıra taze meyve ve sebzelerin bulunmadığı bir diyetin de bu kanser türüne yakalanma riskini arttırdığı ortaya konulmuştur (Stoner and Gupta 2001). Ne var

ki diyet ve oral kanser riski arasındaki ilişkiyi moleküler düzeyde inceleyen çok çalışma bulunmamaktadır.

1.3. Vitamin D Eksiliği OSHK Riskini Arttırmaktadır Fakat Tek Başına Karsinogenez İçin Yeterli Değildir

Karsinogenez süreci, hücrel DNA'ya verilen hasar ile başlamaktadır. Serbest oksijen radikalleri ve nitrozamin benzeri kimyasalları da içeren çeşitli maruziyetler DNA'ya zarar vererek özellikle hücre bölünmesi, DNA onarımı ve apoptoz ile ilişkili genlerdeki mutasyonların birikmesi sonucunda karsinogeneze yol açabilecek değişikliklere neden olmaktadır (Chainani-Wu et al. 2011).

Yiyeceklerdeki belirli bileşiklerin ise kansere karşı koruyucu olabildikleri bilinmektedir (Chainani-Wu et al. 2011). Örneğin, antioksidan özelliklere sahip olan C ve E vitaminlerinin serbest oksijen radikallerine maruziyeti azaltarak DNA hasarını önleyebildikleri, özellikle turunçgiller benzeri bitkilerde bolca bulunan terpenlerin ise, hücre döngüsünün ilerlemesini etkileyebildikleri ve apoptozu indükleyebildikleri ortaya konulmuştur (Greenwald et al. 2001).

Günümüze dek yapılan birçok epidemiyolojik ve klinik öncesi çalışmalarda D vitamini eksikliğinin çeşitli hastalıkların ilerlemesinde ve kansere yakalanma ve kanser ilişkili ölümlerdeki rolü dikkat çekmektedir (Fathi et al. 2019). Dolaşımdaki D vitamin seviyesinin yüksek olmasının, çeşitli kanser türlerinin (mesane, meme, kolorektal, mide, yumurtalık, böbrek, hematolojik, akciğer, prostat, baş ve boyun, pankreas karaciğeri ve ayrıca cilt) ilerleme risklerinin azalması ile yakından ilişkili olduğu ortaya konulmuş, D vitamininin kanser hücrelerinin çoğalmasını engelleyebileceği gösterilmiştir (Deuster et al. 2017; Fathi et al. 2019). Ayrıca, D vitamininin fizyolojik olarak aktif formu olan kalsitriolün özellikle ağız içi kanserlerindeki anti-neoplastik aktivitesinin varlığı yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda gösterilmiştir (Meier et al. 2007; Osafi et al. 2014). OSHK hastalarında ise ciddi düzeyde D vitamini eksikliği olduğu ortaya konulmuştur (Grimm et al. 2015).

Diğer taraftan, D vitamini eksikliği olan farelerde dil epitelinin proliferasyon kapasitelerinin arttığı gösterilmiş, ancak herhangi bir morfolojik veya histolojik anormalliğe sebep olmadığı ortaya konulmuştur. Bu durum D vitamini eksikliğini tek başına, oral epitelyal homeostasisinin değiştirilmesi ve karsinogenez oluşumu için yeterli olmadığı sonucuna varılmasına yol açmıştır (Yuan et al. 2014).

1.4. D Vitamini Eksikliği Kolesterol Sentez Yolağı Üzerinden Hücrenin Glikolizi Tercih Etmesine Yol Açabilir

1.4.1. Karsinogenez için enerji metabolizmasının yeniden düzenlenmesi bir gerekliliktir

Neoplastik yapıların özünü temsil eden kronik ve çoğu zaman kontrolsüz hücre çoğalması, sadece hücre proliferasyonunun kontrolünün kaybedilmesi ile alakalı değil, aynı zamanda hücre büyümesi ve bölünmesi için gerekli olan enerji metabolizmasının düzenlenmesi ile de ilişkilidir. Aerobik koşullar altında, normal hücreler ilk önce sitozolde glikoliz ile hücresel glikozu piruvata dönüştürüp ardından da mitokondride CO₂'e kadar işler. Anaerobik koşullar altında ise, glikoliz tercih edilir ve piruvatın küçük bir kısmı mitokondriye gönderilmektedir. Kanser hücreleri ise, oksijen varlığında bile, glikoz metabolizmasını ve dolayısıyla enerji üretimini yeniden programlayarak, enerji metabolizmalarını büyük ölçüde glikoliz ile sınırlandırılırlar. İlk olarak Otto Warburg tarafından gözlemlenen bu durum 'aerobik glikoliz olarak adlandırılmaktadır (Hanahan and Weinberg 2011).

Kanser hücrelerindeki glikoliz tercihi, mitokondriyal oksidatif fosforilasyona göre glikolizle ATP üretiminin nispeten zayıf verimi göz önüne alındığında, oldukça anlaşılmalıdır. Uzun zaman önce unutulmuş (Potter 1958) ve yakın zamanda yeniden canlandırılan hipotezlere göre (Vander Heiden et al. 2009) artan glikoliz, glikolitik ara basamaklar sonucunda üretilen ve nükleozitler ile amino asitlerin sentezinde kullanılan öncül maddelerin üretilmesi için gerekli çeşitli biyosentetik yolların aktivasyonunu sağlar; ki bu da yeni hücrelerin oluşturulması için gerekli olan makromoleküllerin ve organellerin biyosentezini kolaylaştırmaktadır. Dahası Warburg benzeri metabolizma, hızla bölünen embriyonik dokularda da görülmektedir bu durumda glikolizin bir kez daha

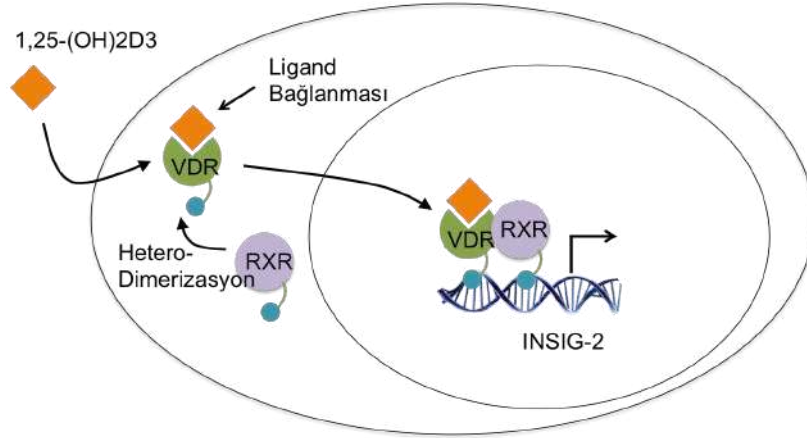
aktif hücre çoğalması için gerekli olan büyük ölçekli biyosentetik programların desteklenmesinde rol oynadığını göstermektedir (Hanahan and Weinberg 2011).

Bu bilgiler göz önüne alındığında karsinogenez sürecinde karsinojenlere maruziyetin yanı sıra hücre içi enerji metabolizmasının yeniden programlanmasına yol açacak değişikliklerin olmasının gerekliliği de görülmektedir.

1.4.2. D vitamini eksikliği hücre içi kolesterol sentezinin artmasına yol açabilir

Özellikle sigara içen bireylerde görülen D vitamini eksikliği (Jiang et al. 2016; Ren et al. 2016), sigara ilişkili kanserler için artmış bir risk faktörü olarak değerlendirilmektedir (Wu et al. 2016). D vitamini eksikliği, son dönemde yapılan bir çalışmada Kuzey Çinli bireylerde artmış total serum kolesterolü ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterol seviyeleri ile ilişkili olarak gösterilmiştir. Bu çalışmada, D vitamini eksikliği kaynaklı kolesterol konsantrasyonunun artmasının, kolesterolün yıkımının azalmasından ziyade de kolesterol biyosentezinin artmasından kaynaklı olduğu ortaya konulmuştur (Li et al. 2016).

Insulin-induced gene-1 (Insig-1) ve homoloğu Insig-2, kolesterol ve yağ asitlerinin sentezini aktive eden zara bağlı transkripsiyon faktörleri olan sterol düzenleyici element bağlayıcı proteinlerin (SREBP-1, SREBP-2) proteolitik aktivasyonunu bloke eden endoplazmik retikuluma yerleşik 2 önemli proteini kodlamaktadır. Pre-adiposit hücrelerinde yapılan bir çalışmada, 1,25-(OH)₂D₃'ün Retinoid X reseptörü (RXR) ve Vitamin D reseptörünün (VDR) heterodimerine bağlanıp Insig-2 geninin promoter bölgesinde 1,25-(OH)₂D₃ cevap elemanı üzerinden Insig-2 ifadesini arttırdığı ortaya konulmuştur (Şekil 1.1) (Lee et al. 2005).



Şekil 1.1. 1,25-(OH)2D3 Insig-2 ifadesini transkripsiyonel olarak artırmaktadır

Ayrıca, D vitamini eksikliği durumunda, VDR transkripsiyonel aktivitesinin ve Insig-2 ifadesinin azaldığı, buna bağlı olarak SREBP-2 ifadesi ve aktivitesinin arttığı bulunmuştur (Li et al. 2016). Bir transkripsiyon faktörü olan SREBP-2, kolesterol sentezinde [örn. HMG-CoA (3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA) redüktaz ve DHCR7] ve kolesterol alımında [LDL-R (LDL reseptörü)] yer alan birçok genin ifadesini düzenler (Goldstein et al. 2006). Dolayısıyla, D vitamini eksikliği durumunda sürekli aktif olan SREBP-2 hücre içi kolesterol seviyesinin yükselmesine hem kolesterol sentezinin artması hem de dolaşımdaki kolesterolün hücre içine alınmasını indüklemesi aracılığıyla sebep olmaktadır (Şekil 1.2.).



Şekil 1.2. Vitamin D eksikliği hücre içi kolesterol seviyesini yükseltir

Literatürde ağız içi kanserlerinde vitamin D eksikliğine bağlı olarak hücre içi kolesterol seviyesi değişimine yönelik *in vitro* ve *in vivo* bilgi bulunmamaktadır.

1.4.3. Artan hücre içi kolesterol seviyesi LXR aracılığıyla asetil CoA üretimini azaltır ve glikolizi artırır

Hücre içi kolesterol seviyesinin artması SREBP-2 aracılığıyla negatif geri dönüt mekanizmasını aktifleştirmektedir. Bu doğrultuda, SREBP-2 aracılığıyla oluşturulan oksiterol ligandları LXR nükleer reseptörüne bağlanarak LXR'nin RXR ile heterodimer yapılar oluşturmasına, böylelikle LXR hedef genlerinin ifadelerinin artmasına yol açtığı bulunmuştur. Hücre içi kolesterolü hücre dışına pompalayan ABCA1 bu hedef genlerden birisidir. Artan hücre içi kolesterol seviyesine paralel olarak hücrede ABCA1 ifadesi de artmaktadır (Wong et al. 2006).

Bunun yanı sıra hücre içi kolesterolün azaltılmasında kolesterol sentezi yolağında substrat olarak kullanılan asetil CoA'nın oluşumunun engellenmesi de önemli bir alternatiftir. En önemli hücre içi asetil CoA kaynağı glikoliz sonucunda üretilen piruvattan piruvat dehidrogenaz kompleksi (PDC) aracılığıyla mitokondride üretilen asetil CoA'dır (Pietrocola et al. 2015). PDC tarafından oluşturulan mitokondri kaynaklı asetil-CoA eksikliğinin hepatik *de novo* lipojenik yolaktaki genlerin ifadesini azalttığı gösterilmiştir (Mahmood et al. 2016).

PDC hem transkripsiyonel hem de post-transkripsiyonel olarak kontrol edilen bir protein kompleksidir (Stacpoole 2017). Kompleksin enzimatik aktivitesindeki değişikliklere, esas olarak, yapısındaki enzimlerden birisi olan piruvat dehidrogenazın üç serin bölgesinden herhangi birinin fosforilasyonu aracılık etmektedir. Piruvat dehidrogenazın fosforilasyonu tüm kompleksi inaktif hale getirir. PDC'nin fosforilasyonu, insanlarda %70 homoloji gösteren dört piruvat dehidrogenaz kinaz izoformu (PDK1-4) tarafından katalize edilmektedir (Stacpoole 2017).

SREBP-2 aracılı LXR aktivasyonunun, PDK4'ün ifadesini arttırdığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Sugden and Holness, 2006). PDK4'ün, hem *in vitro* farklılaşmış insan primer adipositlerinde hem de farklılaştırılmış mürin 3T3-L1 hücrelerinde LXR agonisti GW3965 tarafından yukarı yönlü regüle edildiği de bildirilmiştir. Ayrıca, aynı çalışmada LXR'nin aktivasyonunun, PDC'nin PDK4'e bağlı

1. GİRİŞ

içme suyuna katılan 4NQO, ağız boşluğu ve özofagusta karsinomu indüklerken sindirim kanalının geri kalanında, akciğer veya karaciğerde karsinom oluşumuna neden olmaz. Bu yönüyle, 4NQO kaynaklı bu karsinogenez modeli insan ağız içi karsinogenezinin birçok yönünü simüle eder (Tang et al. 2004). Ayrıca, 4NQO ile indüklenen karsinogenezde, insan ağız içi karsinogenez sürecinde görülen histolojik, moleküler ve kromozomal değişikliklere benzer değişiklikler görülmektedir. Bu nedenlerle, 4NQO aracılı karsinogenez, ağız içi kanserlerde bulunan moleküler değişiklikleri araştırmak için ideal bir modeldir (Kanojia and Vaidya 2006).

4NQO, maruz kalan hücrelerde DNA'ya bağlanarak adenozin-guanozin dönüşümlerine ve oksidatif stres aracılığıyla DNA zincir kırıklarına sebep olarak karsinogenez sürecini başlatır. Tüm bu değişikliklerin bütün karsinojenleri tarafından tetiklenen genetik değişikliklere benzer olması nedeniyle, 4NQO, bütün maruziyetini model organizmalarda taklit etmek için kullanılan bir karsinojendir (Vitale-Cross et al. 2009).

Bu çalışma kapsamında öncelikle 4NQO ile indüklenmiş mürin ağız içi kanser modellerinde D vitamini eksikliğinin ve yüksek kolesterolün ayrı ayrı ve birlikte neoplastik oluşum üzerindeki ve glikolizin inhibisyonunun bu süreçlere etkileri incelenmiştir. Sonrasında incelenen gruplarda oluşan neoplastik yapılarıdaki kolesterol miktarı ve glikoliz seviyesi kolorimetrik testlerle değerlendirilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Warnakulasuriya ve arkadaşları 2009 yılında ağız içi skuamöz hücreli karsinomun görülme sıklığının yüksek olduğunu ve düşük bir sağ kalım oranına sahip olduğunu göstermiştir.

Fathi ve arkadaşları 2019 yılında epidemiyolojik ve klinik öncesi çalışmalarda D vitamini eksikliğinin çeşitli hastalıkların ilerlemesinde, kansere yakalanma ve kanser ilişkili ölümlerde rol aldığını ortaya koymuşlardır.

Osafi ve arkadaşları 2014 yılında D vitamininin fizyolojik olarak aktif formu olan kalsitriolün ağız içi kanserlerinde anti-neoplastik aktivitesinin varlığını *in vivo* ve *in vitro* deneylerde tespit etmişlerdir.

Yuan ve arkadaşları 2014 yılında D vitamini eksikliği olan farelerin dil epitel hücrelerinde herhangi bir morfolojik veya histolojik anormalliğe sebep olmadan dil epitelinin proliferasyon kapasitelerini artırdığını, dolayısıyla D vitamini eksikliğinin tek başına oral epitelyal homeostasisinin değiştirilmesinde ve karsinogenez oluşumunda yeterli olmadığını ortaya koymuşlardır.

Weinberg ve arkadaşları 2011 yılında kanser hücrelerinin oksijen varlığında, glikoz metabolizmasını ve dolayısıyla enerji üretimini yeniden programlayarak, enerji metabolizmalarının büyük ölçüde glikoliz ile sınırlandırıldığını göstermişlerdir. Ayrıca glikolizin aktif hücre çoğalması için gerekli olan büyük ölçekli biyosentetik programların desteklenmesinde rol oynadığını ortaya koymuşlardır.

Li ve arkadaşları 2016 yılında D vitamini eksikliğini Kuzey Çinli bireylerde artmış total serum kolesterolü ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterol seviyeleri ile ilişkilendirerek, D vitamini eksikliği kaynaklı kolesterol konsantrasyonunun artmasının, kolesterolün yıkımının azalmasından ziyade kolesterol biyosentezinin artmasından kaynaklı olduğu göstermişlerdir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Wong ve arkadaşları 2006 yılında hücre içi kolesterol seviyesinin artmasının SREBP-2 aracılığıyla negatif geri dönüt mekanizmasını aktifleştirdiğini göstererek, SREBP-2 aracılığıyla oluşturulan oksiterol ligandlarının da LXR nükleer reseptörüne bağlanarak LXR'nin RXR ile heterodimer yapılar oluşturduğunu buna bağlı olarak LXR hedef genlerinin ifadelerinin artmasına sebep olduğunu ortaya koymuşlardır.

Goldstein ve arkadaşları 2006 yılında bir transkripsiyon faktörü olan SREBP-2'nin, kolesterol sentezinde [örn. HMG-CoA (3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA) redüktaz ve DHCR7] ve kolesterol alımında [LDL-R (LDL reseptörü)] yer alan birçok genin ifadesini düzenlediğini Hücre içi kolesterolün azaltılmasında kolesterol sentez yolağında substrat olarak kullanılan asetil CoA'nın oluşumunun engellenmesinin önemli bir alternatif olduğu göstermişlerdir. Ayrıca piruvattan, piruvat dehidrogenaz kompleksi (PDC) aracılığıyla mitokondride üretilen asetil CoA'nın eksikliğinin glikoliz sonucunda hepatic *de novo* lipojenik yolaktaki genlerin ifadesini azalttığını göstermişlerdir.

Kanojia ve arkadaşları 2006 yılında 4NQO ile indüklenen karsinogenezde, insan ağız içi karsinogenez sürecinde görülen histolojik, moleküler ve kromozomal değişikliklere benzer değişiklikler olduğunu dolayısıyla 4NQO aracılı karsinogenezin, ağız içi kanserlerde bulunan moleküler değişiklikleri araştırmak için ideal bir model olduğunu ortaya koymuşlardır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu tez çalışmasının *in vivo* deneyleri, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezinde (ATADEM) gerçekleştirilmiştir.

In vitro deneylerinin tamamı, Erzurum Teknik Üniversitesi Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezinde (YÜTAM) gerçekleştirilmiştir.

3.1. Materyal

Yapılan deneylerde kullanılan cihazlar Çizelge 3.1’de kullanılan kitler, kimyasal maddeler ve sarf malzemeler Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

Deney hayvanlarına verilen normal diyet formülasyonu Tablo 3.1’de, Vitamin D eksik diyet formülasyonu Tablo 3.2’de, yüksek kolesterolü yem formülasyonu Tablo 3.3’te, yüksek kolesterolü ve Vitamin D eksik yem formülasyonu ise Tablo 3.4’te gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan cihazların listesi

Materyal	Marka	Kullanım Amacı
Derin Dondurucu (-20°C)	Temprow	20°C’de saklanması gereken kimyasalların ve sıçanlara verilecek yemlerin depolanması için kullanılmıştır.
Buzdolabı (4°C)	Edesa	+4°C’de saklanması gereken kimyasallar için kullanılmıştır.
Derin Dondurucu (-80°C)	ESCO Lexicon	Sıçanlardan elde edilen dokularının, RNA ve cDNA örneklerinin stoklanması için kullanılmıştır.
Epoch Spektrofotometre	BioTek EPOCH	RNA örneklerinin konsantrasyon ölçümünde kullanılmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Çizelge 3.1. (Devam)

Termal döngü cihazı (PZR)	SensQuest Labcycler	cDNA örneklerinin çoğaltılması için kullanılmıştır.
TissueLyser LT	Qiagen	Sıçan dokularının parçalanmasında kullanılmıştır.
Multiskan GO UV/Vis Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific	RNA konsantrasyonlarının ölçümü için kullanılmıştır.
Laminar air-flow (Class II Safety Cabinet)	ESCO NordicSafe™	Tüm steril ortam çalışmalarında kullanılmıştır.
İnkübatör	ESCO Celculture CO ₂ Incubator	Tüm inkübasyon işlemlerinde kullanılmıştır.
Mikropipet	Axypet	Tüm deneylerde kullanılacak sıvı malzemelerin miktarlarını hacimsel olarak doğru şekilde elde etmek amacıyla kullanılmıştır.
Çok Kanallı pipet	Axypet	ELISA deneylerinde kullanılacak sıvı malzemelerin miktarlarını hacimsel olarak doğru şekilde elde etmek amacıyla kullanılmıştır.
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Zentrifugen	RNA izolasyonu aşamalarında ve plazma ayrıştırmada kullanılmıştır.
Vorteks	Wisd Wisemix VM-10	Katı-sıvı karışımlarının homojen olarak dağılması için kullanılmıştır. (4NQO vb.)
Otoklav	Tomy SX-500E	Steril olarak kullanılması gereken materyallerin sterilizasyonunu sağlamak amacıyla kullanılmıştır.
Saf Su Cihazı	Millipore Direct- Q-3 UV	Steril olması gereken solüsyonların hazırlanmasında kullanılmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Çizelge 3.1. (Devam)

Analitik Terazi (0,0001)	Shimadzu ATX 224	4NQO ve 2DG gibi kimyasalların hassas bir şekilde tartımını sağlamak için kullanılmıştır.
Dijital Hassas Terazi (0,1 g/30 kg)	Necklife	Sıçanların ve yemlerin doğru bir şekilde tartılması için kullanılmıştır.
Au5800	Beckman Coulter	Sıçanlardan elde edilen plazmaların biyokimyasal değerlerini ölçmek amacı ile kullanılmıştır.

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan kimyasallar, kitler ve sarf malzemelerin listesi

Materyal	Temin Edilen Firma	Kullanım Amacı
Phosphate Buffered Saline (PBS) 1x	EcoTech Biotechnology	ELISA deneylerinde plate kuyularının yıkanmasında kullanılmıştır.
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich®	4NQO kimyasalını çözmek için kullanılmıştır.
4NQO (4-Nitrokinolin N-oksit)	J&K Scientific	Sıçanlarda ağız kanseri modelinin oluşturulması amacı ile kullanılmıştır.
2DG (2-Deoksi D-glukoz)	Acros Organics	Glikolizi baskılamak amacı ile kullanılmıştır.
TRIZol	Gibco®	Dokudan RNA izole etmek amacı ile kullanılmıştır.
İzopropanol	Sigma-Aldrich®	RNA izolasyonun aşamalarında kullanılmıştır.
Kloroform	Sigma-Aldrich®	RNA izolasyonu aşamasında faz oluşturmak amacı ile kullanılmıştır.
Sevoflurane	AbbVie	Sıçanlara anestezi uygulamak amacı ile verilmiştir.
Serum Fizyolojik	Bioflex	2-deoksi D-glikozu çözmek amacı ile kullanılmıştır.
Polikarbonat sıçan kafesi	Orchid Scientific	Sıçanların barındırılması amacı ile kullanılmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Çizelge 3.2. (Devam)

Polikarbonat su şişeleri	Orchid Scientific	Sıçanların su ihtiyaçlarını gidermek amacı ile kullanılmıştır.
Cerrahi set	Kruuse	Sıçanlara nekropsi yapılması amacı ile kullanılmıştır.
Enjektör	BeyanLab	Deri altına 2DG enjeksiyonu için kullanılmıştır.
0.22 µm Steril Filtre	IsoLab	Sıçanlara enjekte edilecek 2DG'un sterile etmek amacı ile kullanılmıştır.
Plazma Tüpleri	BD Vacutainer	Kandan plazmayı ayırtmak amacı ile kullanılmıştır.
Lactate Assay Kit, Colorimetric	Sigma-Aldrich®	Dokudaki laktat seviyesinin ölçümü amacı ile kullanılmıştır.
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems	RNA'dan cDNA elde etmek amacı kullanılmıştır.
Primerler	Oligomer	Örneklerdeki farklı genlerin ifade seviyesindeki değişimleri göstermek amacı ile kullanılmıştır.
5x HOT FIREPol® EvaGreen®qPCR Supermix	Solis Biodye	Gerçek zamanlı PZR yapmak amacı ile kullanılmıştır.
Total Cholesterol Assay Kit	SunRed Biological Technology	Dokulardaki kolesterol seviyesini ölçmek amacı ile kullanılmıştır.
Kontrol Sıçan Yemi	Arden Araştırma	Kontrol sıçan grubunun beslenmesi için kullanılmıştır.
D Vitamini Eksik Sıçan Yemi	Arden Araştırma	D Vitamini eksik sıçan grubunun beslenmesi amacı ile kullanılmıştır.
Yağ İçeriğince Zengin Sıçan Yemi	Arden Araştırma	Yağ içeriğince zengin sıçan grubunu beslenmesi amacı ile kullanılmıştır.

Çizelge 3.2 (Devam)

D Vitamini Eksik ve Yağ İçeriğince Zengin Sıçan Yemi	Arden Araştırma	D Vitamini eksik ve yağ içeriğince zengin sıçan grubunun beslenmesi amacı ile kullanılmıştır.
------------------------------------------------------	-----------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------

3.2. Yöntem

3.2.1. *In Vivo* Deneyle

Tez çalışmasında kullanılacak sıçanlar Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinden (ATADEM) temin edilmiş ve tüm hayvan deneyleri çalışmaları bu merkezde gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın tüm uygulamaları Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (AÜHADYEK) tarafından verilen 10.05.2018 tarihli ve 77040475-000E.1800140631-1851 sayılı yazısı ve 121 numaralı karar ile onaylanmıştır.

3.2.1.1. Sıçanların temini ve barındırılması

Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden 100-150 gr ağırlığında toplam 48 adet 4 haftalık erkek Sprague-Dawley sıçan alındı. Deneysel işlemler sırasında sıçanlar patojen içermeyen koşullarda $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta %50-60 bağıl nemde 12 saat aydınlık/12 saat karanlık foto periyot döngüsünde (8:00-20:00) tutuldu. Her kafeste 6 sıçan olacak şekilde rastgele 8 gruba (grup başına $n=5$ veya 6 sıçan) ayrıldılar. Çalışma kapsamında oluşturulacak her grupta kaç denek olması gerektiği, <http://www.lasec.cuhk.edu.hk/sample-size-calculation.html> adresindeki güç analizi robotu kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasındaki farkın 1,5 kat, anlamlılık sınırının 0,01 olarak belirlendiğinde %80 güç düzeyine göre ve standart sapma değerinin gruplarda %20'den düşük olacağı düşünüldüğünde her gruba yaklaşık 6 sıçan düştüğü hesaplanmıştır.

Aylık hazırlanan diyetler lipit oksidasyonunu önlemek için kullanılıncaya kadar derin dondurucuda saklanmıştır. Deney süresince sıçan ağırlığı dikkate alınarak yem ve içme suyu günlük olarak değiştirilmiştir. Sıçanların vücut ağırlıkları haftada iki kez ölçülmüştür. Tüm hayvanlar, genel anestezi sevoflurane altında kardiyak ponksiyon yoluyla kan örnekleri alındıktan sonra kurban edilmiştir.

3.2.1.2. Deney grupları ve beslenmeleri

Çalışma süresi boyunca kullanılan deney hayvanlarının diyet, 4NQO ve glikoliz inhibitörü 2-DG'nin hangi gruplara uygulandığı Tablo 3.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. Çalışma kapsamında kullanılan deney grupları ve bu gruplar için diyet uygulamaları.

Grup	Sıçan Sayısı	4NQO	Vitamin D eksik diyet	Yağ içeriğince zengin diyet	Glikoliz İnhibitörü (2-deoxy-D-glucose)
1	6	-	-	-	-
2	6	+	-	-	-
3	6	+	+	-	-
4	6	+	+	-	+
5	6	+	-	+	-
6	6	+	-	+	+
7	6	+	+	+	-
8	6	+	+	+	+

1. Grup: Bu gruptaki 6 adet deney hayvanına içme suyu olarak musluk suyu verilmiştir. Diyetleri ise Tablo 3.4.'de gösterilen (0,79% kalsiyum, 2.000 IU/kg kolekalsiferol (Vitamin D3), %5,8 kkal/gr yağ ve %44,3 kkal/gr karbonhidrat) içeriğe sahip, kontrol grubu diyetidir. Sıçanların diyetlere ve içme suyuna erişimi ağırlıklarının %15'i olacak şekilde sağlanmıştır.

2. Grup: Bu gruptaki 6 adet deney hayvanına içme suyuna postnatal 10. haftadan itibaren 30 ppm dozda 4NQO kimyasalı eklenmiştir. Diyetleri ise Tablo 3.4.'de gösterilen (0,79% kalsiyum, 2.000 IU/kg kolekalsiferol (Vitamin D3), %5,8 kkal/gr yağ ve %44,3 kkal/gr karbonhidrat) içeriğe sahip, kontrol grubu diyetidir. Sıçanların diyetlere ve içme suyuna erişimi ağırlıklarının %15'i olacak şekilde sağlanmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Çizelge 3.4. Normal diyet formülasyonu

Yem İçeriği	Gr (%)	Kcal (%)
Kazein	200	1.400
L-Sistin	3	21
Mısır nişastası	550	3.850
Maltodekstrin	150	1.050
Sakaroz	0	0
Selüloz, BW200	50	350
Mısır Yağı	25	175
Palmiye Yağı	20	140
Mineral Karışımı S10026	10	70
DiKalsiyum fosfat	13	91
Kalsiyum karbonat	5,5	38,5
Potasyum sitrat, 1H ₂ O	16,5	115,5
Vitamin Karışımı V10001	10	70
Kolin Bitartrat	2	14

3. Grup: Bu gruptaki 6 adet deney hayvanına içme suyuna postnatal 10. haftadan itibaren 30 ppm dozda 4NQO kimyasalı eklenmiştir. Diyetleri ise Tablo 3.5.'de gösterilen (0,79% kalsiyum, %5,8 kkal/gr yağ ve %44,3 kkal/gr karbonhidrat) içeriğe sahip, vitamin D eksik yem diyetidir. Sıçanların diyetlere ve içme suyuna erişimi ağırlıklarının %15'i olacak şekilde sağlanmıştır.

4. Grup: Bu gruptaki 6 adet deney hayvanına içme suyuna postnatal 10. haftadan itibaren 30 ppm dozda 4NQO kimyasalı eklenmiştir. Diyetleri ise Tablo 3.5.'de gösterilen (0,79% kalsiyum, %5,8 kkal/gr yağ ve %44,3 kkal/gr karbonhidrat) içeriğe sahip, vitamin D eksik yem diyetidir. Sıçanların diyetlere ve içme suyuna erişimi ağırlıklarının %15'i

3. MATERYAL ve YÖNTEM

olacak şekilde sağlanmıştır. Postnatal 22. haftadan itibaren ise haftada 2 kere olacak şekilde glikoliz inhibitörü olan 2DG intraperitoneal olarak verilmiştir.

Çizelge 3.5. Vitamin D eksik diyet formülasyonu

Yem İçeriği	Gr (%)	Kcal (%)
Kazein	200	1.400
L-Sistin	3	21
Mısır nişastası	550	3.850
Maltodekstrin	150	1.050
Sakaroz	0	0
Selüloz, BW200	50	350
Mısır Yağı	25	175
Palmiye Yağı	20	140
Mineral Karışımı S10026	10	70
DiKalsiyum fosfat	13	91
Kalsiyum karbonat	5,5	38,5
Potasyum sitrat, 1H ₂ O	16,5	115,5
Vitamin Karışımı V10001	10	70
Kolin Bitartrat	2	14

5. Grup: Bu gruptaki 6 adet deney hayvanına içme suyuna postnatal 10. haftadan itibaren 30 ppm dozda 4NQO kimyasalı eklenmiştir. Diyetleri ise Tablo 3.6.'de gösterilen (0,79% kalsiyum, 2.000 IU/kg kolekalsiferol (Vitamin D3), %60 kkal/gr yağ ve %20 kkal/gr karbonhidrat) içeriğe sahip, yüksek kolesterollü yem diyetidir. Sıçanların diyetlere ve içme suyuna erişimi ağırlıklarının %15'i olacak şekilde sağlanmıştır.

6. Grup: Bu gruptaki 6 adet deney hayvanına içme suyuna postnatal 10. haftadan itibaren 30 ppm dozda 4NQO kimyasalı eklenmiştir. Diyetleri ise Tablo 3.6.'de gösterilen (0,79% kalsiyum, 2.000 IU/kg kolekalsiferol (Vitamin D3), %60 kkal/gr yağ ve %20 kkal/gr karbonhidrat) içeriğe sahip, yüksek kolesterollü yem diyetidir. Sıçanların diyetlere ve içme suyuna erişimi ağırlıklarının %15'i olacak şekilde sağlanmıştır. Postnatal 22. haftadan itibaren ise haftada 2 kere olacak şekilde glikoliz inhibitörü olan 2DG intraperitoneal olarak verilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Çizelge 3.6. Yüksek kolesterolü diyet formülasyonu

Yem İçeriği	Gr (%)	Kcal (%)
Kazein	200	1.400
L-Sistin	3	21
Mısır nişastası	550	3.850
Maltodekstrin	150	1.050
Sakaroz	0	0
Selüloz, BW200	50	350
Mısır Yağı	25	175
Palmiye Yağı	20	140
Mineral Karışımı S10026	10	70
DiKalsiyum fosfat	13	91
Kalsiyum karbonat	5,5	38,5
Potasyum sitrat, 1H ₂ O	16,5	115,5
Vitamin Karışımı V10001	10	70
Kolin Bitartrat	2	14
Kolesterol	17,42	121,94

7. Grup: Bu gruptaki 6 adet deney hayvanına içme suyuna postnatal 10. haftadan itibaren 30 ppm dozda 4NQO kimyasalı eklenmiştir. Diyetleri ise Tablo 3.7.'de gösterilen (0,79% kalsiyum, 2.000 IU/kg kolekalsiferol (Vitamin D3), %60 kkal/gr yağ ve %20 kkal/gr karbonhidrat) içeriğe sahip, yüksek kolesterolü ve vitamin D eksik yem diyetidir. Sıçanların diyetlere ve içme suyuna erişimi ağırlıklarının %15'i olacak şekilde sağlanmıştır.

8. Grup: Bu gruptaki 6 adet deney hayvanına içme suyuna postnatal 10. haftadan itibaren 30 ppm dozda 4NQO kimyasalı eklenmiştir. Diyetleri ise Tablo 3.7.'de gösterilen (0,79% kalsiyum %60 kkal/gr yağ ve %20 kkal/gr karbonhidrat) içeriğe sahip, yüksek kolesterolü ve vitamin D eksik yem diyetidir. Sıçanların diyetlere ve içme suyuna erişimi ağırlıklarının %15'i olacak şekilde sağlanmıştır. Postnatal 22. haftadan itibaren ise haftada 2 kere olacak şekilde glikoliz inhibitörü olan 2DG intraperitoneal olarak verilmiştir.

Çizelge 3.7. Yüksek kolesterolü vitamin D eksik diyet formülasyonu

Yem İçeriği	Gr (%)	Kcal (%)
Kazein	200	1.400
L-Sistin	3	21
Mısır nişastası	550	3.850
Maltodekstrin	150	1050
Sakaroza	0	0
Selüloz, BW200	50	350
Mısır Yağı	25	175
Palmiye Yağı	20	140
Mineral Karışımı S10026	10	70
DiKalsiyum fosfat	13	91
Kalsiyum karbonat	5,5	38,5
Potasyum sitrat, 1H ₂ O	16,5	115,5
Vitamin Karışımı V10001	10	70
Kolin Bitartrat	2	14
Kolesterol	17,42	121,94

3.2.2. Hastalar ve hastalara ait biyokimyasal veriler

OSHK hastalarında kolesterol ve Vitamin D seviyelerinin değerlendirilmesi adına retrospektif bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda (Erzurum, Türkiye) 2016-2021 yılları arasında oral skuamöz hücreli karsinom (OSHK) tanısı histopatolojik analizle doğrulanan toplam 23 hasta ve kanser olmayan, saptanabilir semptomları bulunmayan 30 sağlıklı birey çalışmaya dahil edilmiştir. Biyokimyasal veriler Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesi (Erzurum, Türkiye) tıbbi kayıt sistemi kullanılarak retrospektif olarak toplanmıştır. Atatürk Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu (Erzurum, Türkiye) bu çalışmada yapılan tüm işlemleri onaylamıştır (B.30.2.ATA.0.01.00/130).

3.2.3. *In Silico* analiz

Gene Expression Omnibus (GEO) veri tabanında yer alan, halka açık GSE68986, GSE47461, GSE48961 ve GSE60956 veri setleri GEO2R *in silico* aracı kullanılarak ve standart parametreler izlenerek analiz edilmiştir. Farklı ifade edilen genlerin nokta çizim (dot plot) gösterimleri, GEO2R analizinden çevrimiçi olarak alınmıştır. Farklı ifade edilen genlerin gen seti zenginleştirme analizi, Web tabanlı Gen Set Analysis Toolkit (WebGestalt) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Liao et al. 2019).

Suda çözünür bir sentetik kinolin türevi olan oral kanserojen 4NQO dimetil sülfoksit (DMSO) içinde 30 mg/ml konsantrasyonda çözülmüştür (Minicucci et al. 2009; Oballe et al. 2018). Konsantre 4NQO çözeltisi 30 ppm'lik son konsantrasyona ulaşmak için içme suyunda seyreltilip ve ışıktan korunarak 4°C'de saklanmıştır. Sıçanlara doğum sonrası 10. haftaya kadar normal içme suyu verilmiştir. Daha sonra kontrol grubu dışındaki tüm sıçanlara 17 hafta boyunca 30 ppm 4NQO'lu içme suyu verilmiştir.

3.2.4. 4-Nitroquinoline-1-Oxide (4NQO) ile indüklenen ağız içi karsinogenez modeli

Suda çözünür bir sentetik kinolin türevi olan oral kanserojen 4NQO dimetil sülfoksit (DMSO) içinde 30 mg/ml konsantrasyonda çözülmüştür (Minicucci et al. 2009; Oballe et al. 2018). Konsantre 4NQO çözeltisi 30 ppm'lik son konsantrasyona ulaşmak için içme suyunda seyreltilip ve ışıktan korunarak 4°C'de saklanmıştır. Sıçanlara doğum sonrası 10. haftaya kadar normal içme suyu verilmiştir. Daha sonra kontrol grubu dışındaki tüm sıçanlara 17 hafta boyunca 30 ppm 4NQO'lu içme suyu verilmiştir.

3.2.5. 2-Deoksi-D-Glikoz (2DG) uygulaması

2DG, %0,9 tuzlu su tamponu içerisinde çözülmüştür. Bu çalışmada kullanılan 2DG (0.75 g/kg) dozu daha önceki çalışmalara göre belirlenmiş ve steril koşullarda taze olarak hazırlanmıştır (Wang et al. 2015). Doğum sonrası 22. haftadan itibaren 4, 6 ve 8. gruplara intraperitoneal (IP) olarak 2DG uygulaması dört hafta boyunca haftada iki kez

olacak şekilde uygulanmıştır. Diğer gruplara, test gruplarına paralel olarak intraperitoneal (IP) enjeksiyon yoluyla sadece %0,9 tuz su tamponu verilmiştir.

3.2.6. Sıçan kan örneklerinin biyokimyasal analizi

Doğum sonrası 10. haftada, spontan hareketleri azaltmak için genel anestezi sevoflurane uygulaması sonrasında kardiyak ponksiyon yoluyla insülin iğnesi kullanılarak her sıçandan maksimum 500 µl hacimde kan örnekleri alınmıştır. Ayrıca, doğum sonrası 27. haftada, aynı yöntem kullanılarak ağır anestezi altında her sıçandan 4 ml hacimde kan örnekleri alınarak sıçanlar kurban edilmiştir. Kan alındıktan sonra, numuneler hemen serum ayırımı için 3.000 rpm'de 10 dakika 4°C'de santrifüjlenerek, alikotlandı ve biyokimyasal analize kadar 80°C'de saklanmıştır. Serumdaki total kolesterol, LDL, HDL, trigliserid, LDH ve D vitamini seviyeleri Beckman Coulter AU5800 cihazı kullanılarak ölçülmüştür.

3.2.7. Dil lezyonlarının histopatolojik incelemesi

Sıçan dil lezyonlarının hacimleri, aşağıda verilen formüle göre ölçülmüştür (uzunluk x genişlik x yükseklik x 6 x π/6) (Al-Koshab et al. 2020). Dil lezyonları uzunlamasına disekte edildi ve lezyon bölümleri hematoksilin ve eozin (H&E) ile boyandı. H&E boyanmış dil lezyonları, oral karsinogenez sırasında glikolizin düzenlenmesi yoluyla VDE ve/veya yüksek kolesterol diyetinin etkilerini belirlemek için histopatolojik olarak analiz edilmiştir.

3.2.8. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kullanılarak sıçan dil dokularında kolesterol düzeylerinin tespiti

Sıçanlar kurban edildikten sonra dil dokuları disekte edilerek ve dil dokusu lezyonları hemen toplanmıştır. Daha sonra lezyonlar eşit hacimlere bölündü ve analize kadar -80°C'de saklanmıştır. Lipit ekstraksiyonu için yaklaşık 20-30 mg numune tartılmıştır ve sıvı nitrojen kullanılarak toz haline getirilmiştir. Öğütülmüş doku örnekleri, bir paslanmaz çelik boncuk ve 200 µl soğuk PBS içeren steril bir mikro santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Örnekler TissueLyser LT (Qiagen) kullanılarak 50 Hz'de 10 dakika

homojenize edildikten sonra 4°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra homojenatlar 3000 rpm'de 20 dakika 4°C'de santrifüj edildi ve süpernatantlar dikkatlice yeni bir tüpe aktarılmıştır. Doku örneklerindeki kolesterol seviyeleri, ticari bir kit (SunRed Biological Technology Co., Ltd., Şangay, Çin) kullanılarak standart bir ELISA prosedürüne göre belirlenmiştir.

Tüm deneyler en azından iki tekrar halinde gerçekleştirilmiştir. Absorbans değerleri, Epoch 2 Mikroplaka Spektrofotometresi (BioTek) kullanılarak ölçülmüştür.

3.2.9. RNA ekstraksiyonu, tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi ve kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR)

Dil lezyonlarındaki glikoliz ilişkili 6PF2K ve PKM2 genlerinin ifade değişimleri gerçek zamanlı PZR kullanılarak (qRT-PZR) analiz edilmiştir. Dil dokusu örneklerinden toplam RNA, TRIZol Reagent (Invitrogen, ABD) kullanılarak ve üreticinin protokolü takip edilerek çıkarılmıştır. RNA'nın kalitesi ve miktarı, Multiskan GO UV/Vis Spektrofotometresi (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak değerlendirilmiştir. Eşit miktarlarda toplam RNA'dan cDNA sentezi, High Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti (Applied Biosystem, ABD) kullanılarak yapılmıştır. qRT-PZR reaksiyonları, üreticinin talimatları izlenerek 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis Bio-Dyne) ve Tablo 3.8'de listelenen primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gen ifadeleri β -aktin'e normalize edilmiştir ve mRNA ifadesinin değerlendirilmesi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi kullanılarak yapılmıştır (Livak and Schmittgen 2001).

Çizelge 3.8. Primer listesi ve dizileri

Gen	Dizi
6PF2K-F	5'- CTGGTGGCACTGGAAGATGT-3'
6PF2K-R	5'- CTTGAAGGCATTCTGCTTGGC-3'
PKM2-F	5'- GCTTCCCGATCTGTGGAGAT-3'
PKM2-R	5'- TCTCAGGTCCCTTTGTATCCAG-3'
β -actin-F	5'- CTATCCTGGCCTCACTGTCC-3'
β -actin-R	5'- AACGCAGCTCAGTAACAGTC-3'

3.2.10. İstatistiksel analiz

Veriler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. Farkların istatistiksel olarak anlamlılığı Student t testi ile test edilmiştir. 0,05'e eşit veya daha küçük bir p değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Verilerin görselleştirilmesi için GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) kullanılmıştır.

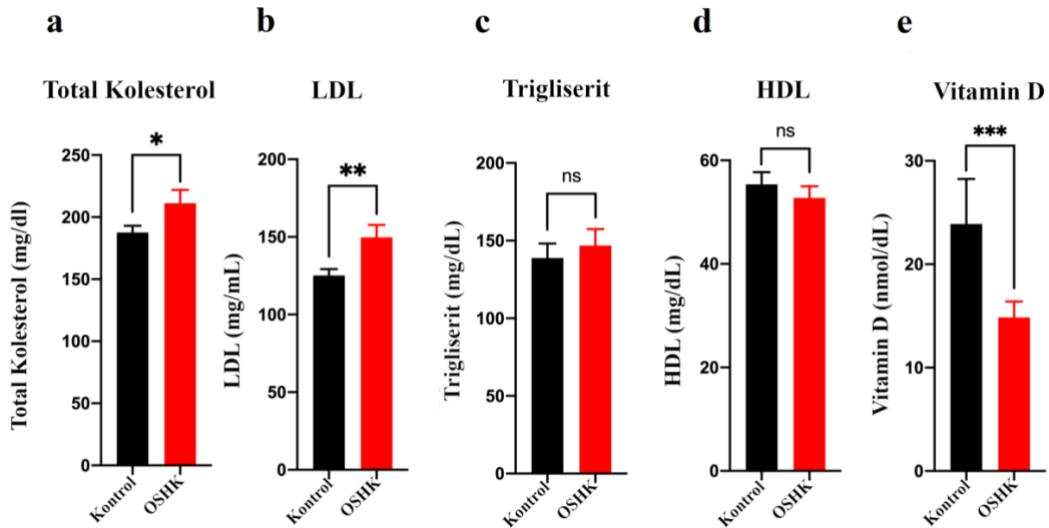


4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. OSHK Hastalarında Tespit Edilen Yüksek Kolesterol ve Düşük D Vitamin Seviyeleri Birbiriyle Negatif İlişkilidir

OSHK ve VDE ile yüksek kolesterol arasındaki ilişkiyi incelemek için, başlangıçta 23 OSHK hastasının ve yaş ve cinsiyet uyumlu 30 kontrol bireyin total kolesterol, LDL, HDL, trigliserid ve D vitamini düzeylerini retrospektif olarak analiz edilmiştir. OSHK hastaları ve kontrol bireylerinin ortalama yaşı sırasıyla $55,43 \pm 13,70$ ve $58,60 \pm 13,89$ idi ($p=0,40$). OSHK hastaları 16 kadın ve 14 erkekten, kontrol grubu ise 11 kadın ve 12 erkekten oluşmaktadır ($p=0,69$).

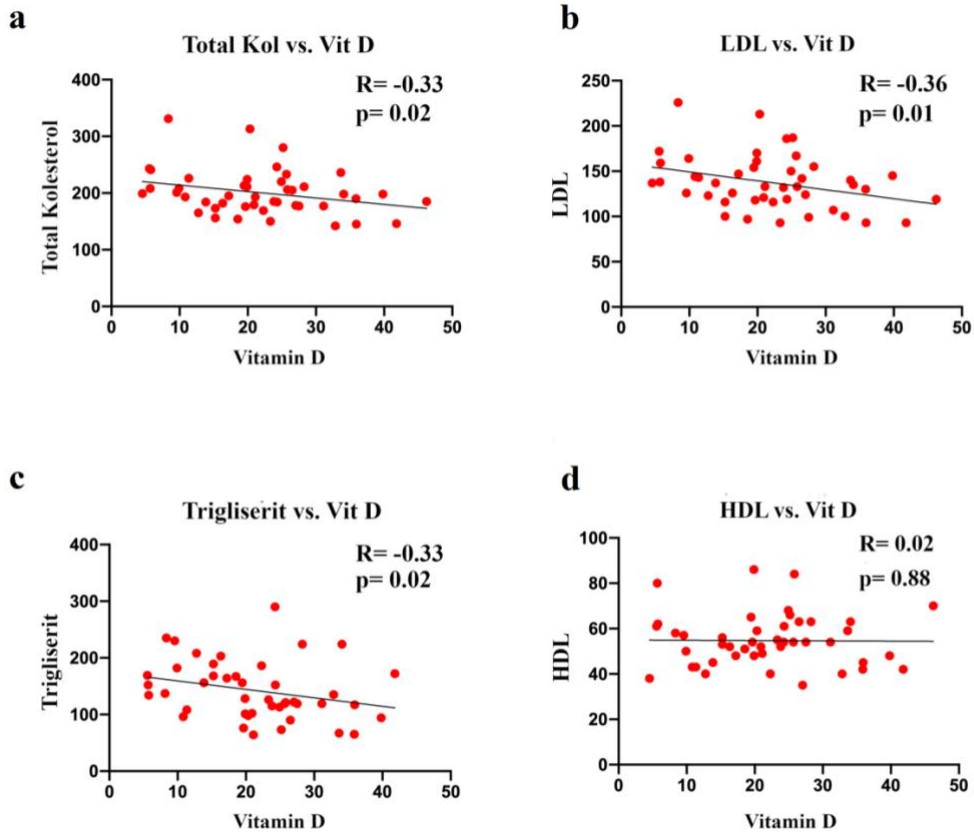
Bulgularımız, OSHK hastalarında total kolesterol (Şekil 4.1a) ve LDL (Şekil 4.1b) düzeylerinin kontrol bireylere kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğunu gösterirken, bu gruplar arasında trigliserid (Şekil 4.1c) ve HDL (Şekil 4.1d) düzeylerinde önemli bir değişiklik olmadığını göstermiştir. Ek olarak, kontrollere kıyasla çalışmaya dahil edilen OSHK hastalarında ortalama D vitamini seviyesi anlamlı derecede düşük olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.1e).



Şekil 4.1. OSHK hastaları ile onlara yaş ve cinsiyetçe denk 30 kontrol bireyin total kolesterol, LDL, HDL, trigliserid ve vitamin D düzeyleri.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Kolesterol metabolizması ile ilgili biyokimyasal parametrelerin D vitamini seviyeleri ile korelasyonlarını araştırmak için bu çalışmaya katılan tüm bireylerin verilerini kullanarak Pearson Korelasyon analizi yapılmış ve elde edilen bulgular D vitamini seviyelerinin total kolesterol (Şekil 4.2a) ve LDL seviyeleri ile negatif korelasyon gösterdiğini ortaya koymuştur. (Şekil 4.2b). Ek olarak, D vitamini ve trigliserid seviyeleri marjinal olarak negatif korelasyon göstermiştir (Şekil 4.2c). D vitamini ve HDL düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (Şekil 4.2d). Hastalarda yüksek kolesterol ve düşük D vitamini düzeylerinin bir arada bulunması göz önüne alındığında, OSHK karsinogenezinde birlikte yer alabilecekleri önerilebilir.

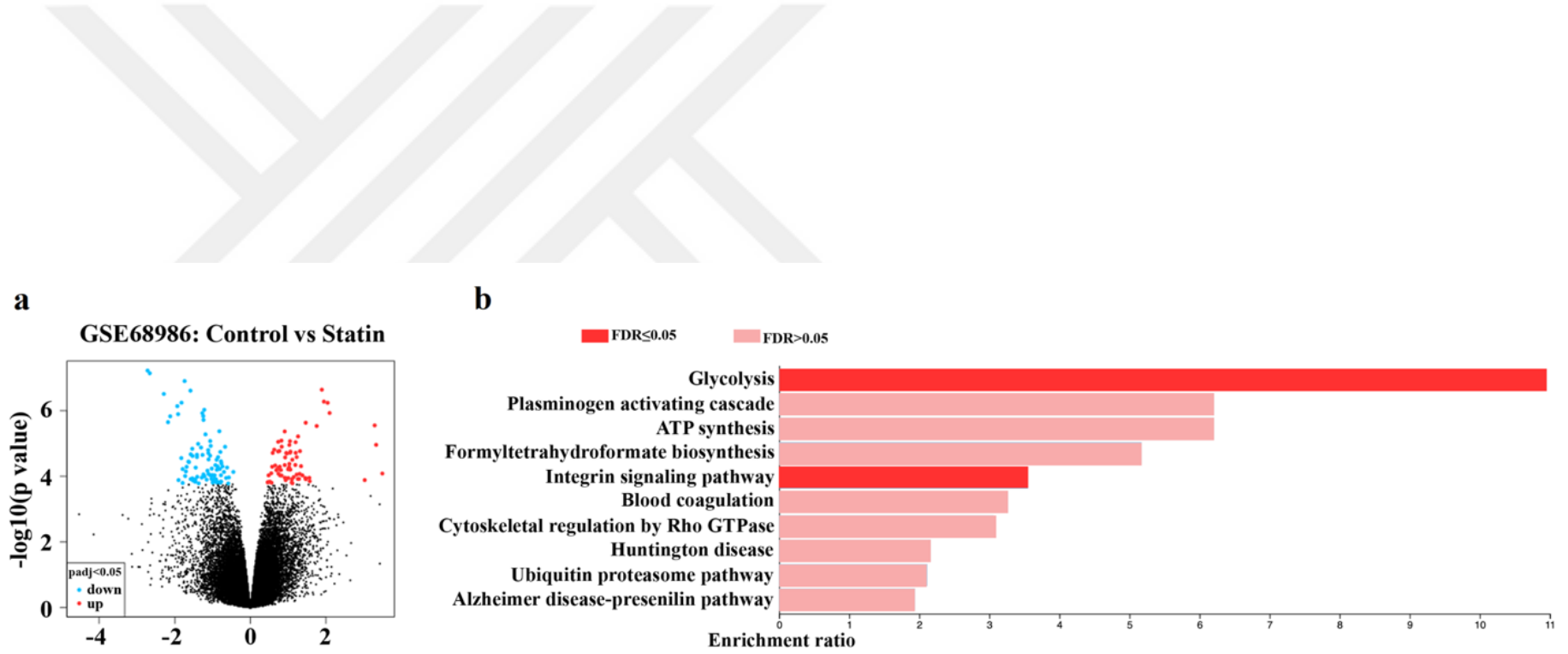


Şekil 4.2. OSHK hastaları ile onlara yaş ve cinsiyetçe denk 30 kontrol bireyin total kolesterol, LDL, HDL, trigliserid ve vitamin D parametrelerinin birbirleri ile korelasyonları.

4.2. Kolesterol ve D Vitamini Seviyelerinin Deregölasyonu, Glikoliz ile İlişkili Genleri Zenginleştirir

Kolesterol ve vitamin D seviyelerinin deregölasyonu ile ilgili potansiyel mekanizmaları daha fazla araştırmak amacıyla GEO veri tabanındaki bir kısım veri kümelerini kullanarak gen seti zenginleştirme analizi yapılmıştır. İlk olarak, kontrol numunelerinin kolesterol inhibitörü olan statinler ile muamele edilmiş numunelerle karŐılaŐtırıldıđı GSE68986 ve GSE47461 veri kümelerini analiz edilmiştir.

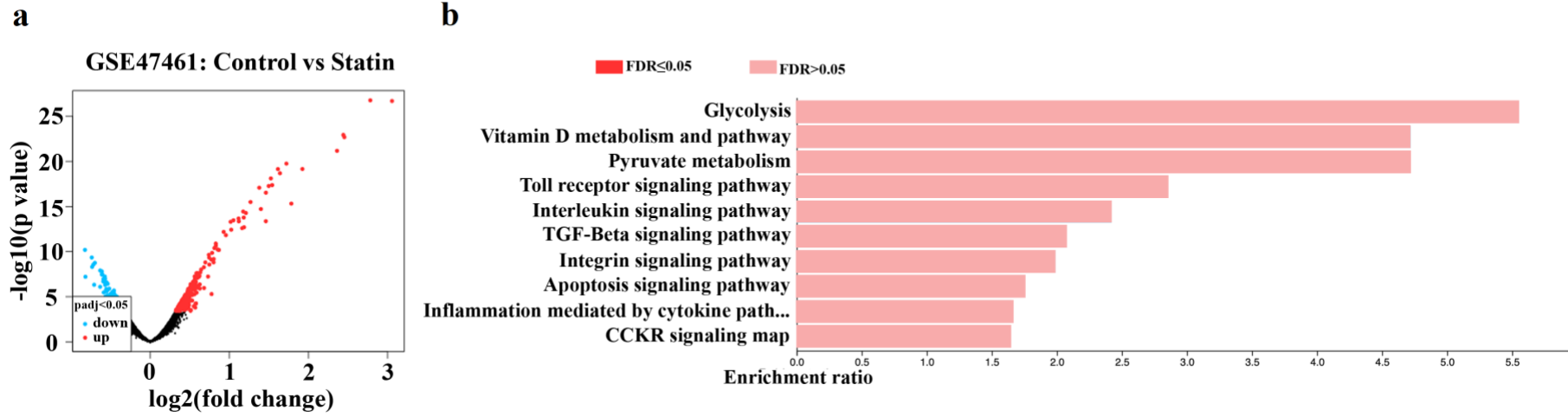
İlk veri setinde, 48 saat boyunca 10 μ M Lovastatin veya DMSO ile muamele edilen SKOV3 ve OVCAR5 yumurtalık karsinomu hücrelerinin gen ifade profili incelendi. GEO2R ile yapılan analiz, statin ile muamele edilen yumurtalık karsinomu hücrelerinde 57 genin yukarı regüle edildiğini ve 81 genin aŐađı regüle edildiğini gösterdi (Şekil 4.3a). İlginç bir şekilde, WebGestalt aracı kullanılarak bu farklı şekilde ifade edilen genlerin gen seti zenginleştirme analizi, glikolizin önemli bir zenginleŐtirilmiŐ metabolik yolak olduğunu ortaya çıkmıştır. (Şekil 4.3b).



Şekil 4.3. Gene Expression Omnibus (GEO) veri tabanında yer alan, halka açık GSE68986 veri setinin GEO2R in silico aracı kullanılarak analizi sonucu farklı ifade edilen genlerin nokta çizim (dot plot) gösterimi (Şekil 4.3a) ve farklı ifade edilen genlerin gen seti zenginleştirme analizi (Şekil 4.3b) sonuçları.

Daha sonra, 8.0uM pravastatin ile tedavi edilen Calu-1 akciğer kanseri hücrelerinin veya tedavi edilmeyen hücrelerin kullanıldığı, halka açık GSE47463 veri setini analiz edilmiştir ve statin tedavisinde 5000'den fazla genin farklı şekilde eksprese edildiği gösterilmiştir (Şekil 4.4a). Benzer şekilde, diferansiyel olarak eksprese edilen ilk 100 genin gen seti zenginleştirme analizi, en zenginleŐtirilmiŐ metabolik yollardan biri olarak glikolize işaret etmiştir (Şekil 4.4b).

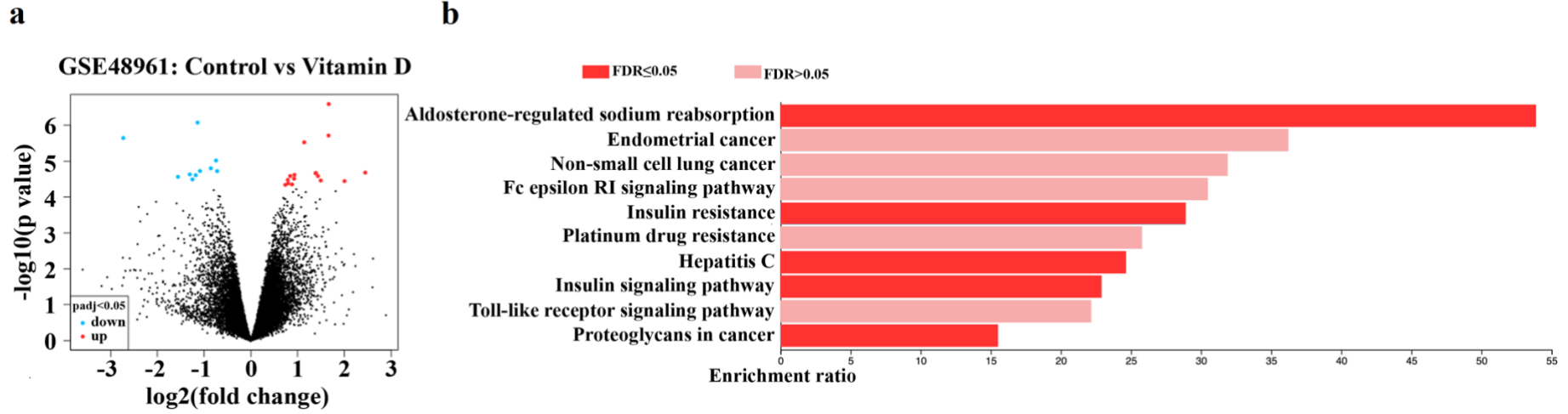




Şekil 4.4. Gene Expression Omnibus (GEO) veri tabanında yer alan, halka açık GSE47461 veri setinin GEO2R in silico aracı kullanılarak analizi sonucu farklı ifade edilen genlerin nokta çizim (dot plot) gösterimi (Şekil 4.4a) ve farklı ifade edilen genlerin gen seti zenginleştirme analizi (Şekil 4.4b) sonuçları.

D vitamininin gen ifade profili üzerindeki etkisini görmek için, tiyoasetamid (TAA) ile indüklenen sıçan intrahepatik kolanjiyokarsinom modelinde 6 IU/gram D vitamini takviyesinin yapıldığı GSE48961 veri kümesi kullanılmıştır ve D vitamini takviyeli sıçanlarda oluşan kolanjiyokarsinom tümörlerinde deregüle olmuŐ 26 gen saptanmıŐtır (Şekil 4.5a). Bu genlerin, glikoliz metabolizması ile ilgili olduğu bilinen insülin direnci ve insülin sinyal yolu ile yakından ilişkili olduğu bulunmuştur (Şekil 4.5b).

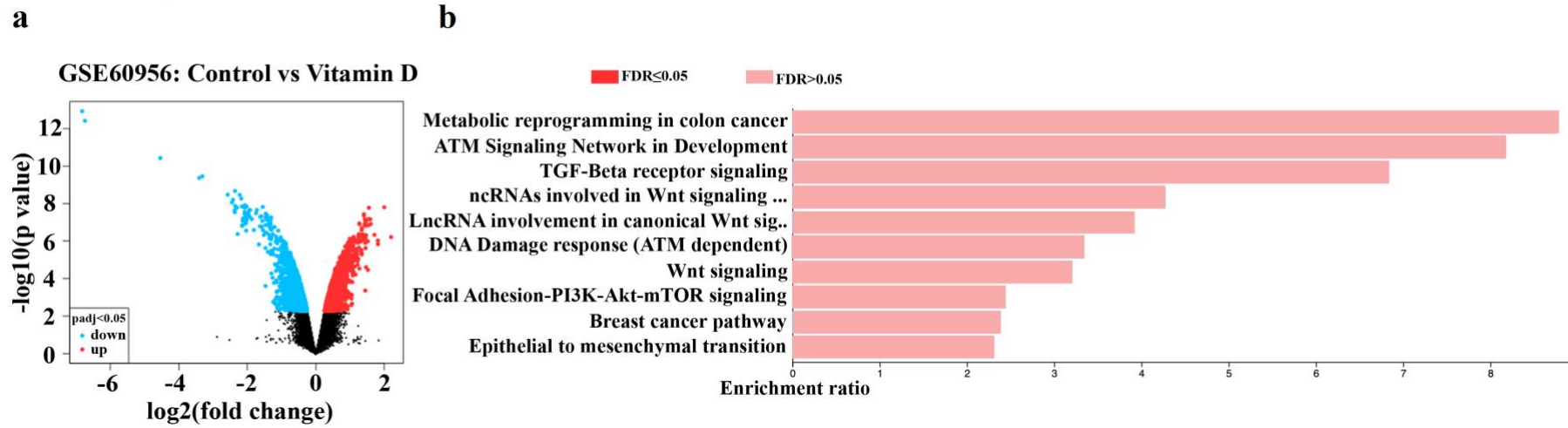




Şekil 4.5. Gene Expression Omnibus (GEO) veri tabanında yer alan, halka açık GSE48961 veri setinin GEO2R in silico aracı kullanılarak analizi sonucu farklı ifade edilen genlerin nokta çizim (dot plot) gösterimi (Şekil 4.5a) ve farklı ifade edilen genlerin gen seti zenginleştirme analizi (Şekil 4.5b) sonuçları.

Son olarak, 24 saat boyunca 100 nM kalsitriol ile muamele edilen prosta-sferlerin incelendiği GSE60956 veri kümesi üzerinde yapılan analizde; p değeri 0,0001'den düşük olan 92 genin ifadesini deđiŐtiđini göstermiştir (Şekil 4.5a). Gen seti zenginleştirme analizi de bu genlerin kanserde metabolik yeniden programlama ile ilgili olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 4.5b).



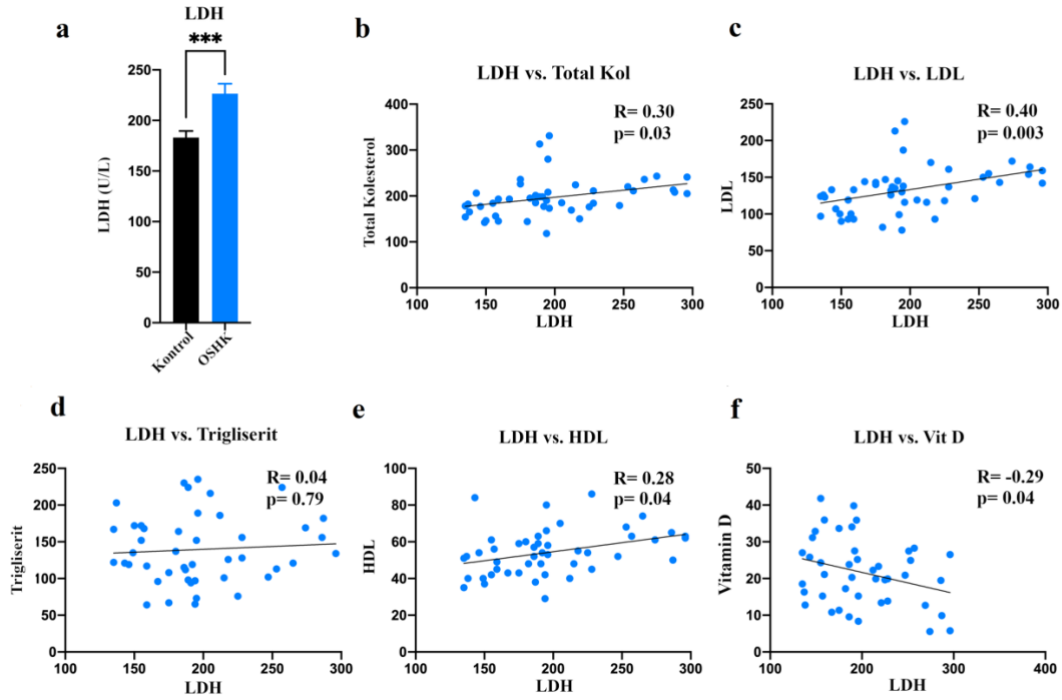


Şekil 4.6. Gene Expression Omnibus (GEO) veri tabanında yer alan, halka açık GSE60956 veri setinin GEO2R in silico aracı kullanılarak analizi sonucu farklı ifade edilen genlerin nokta çizim. (dot plot) gösterimi (Şekil 4.6a) ve farklı ifade edilen genlerin gen seti zenginleştirme analizi (Şekil 4.6b) sonuçları.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Bu bulgular, OSHK hastalarında glikoliz ile ilgili klinik parametreleri araştırmamıza neden olmuştur. Hasta kohortumuzdaki OSHK hastaları için rutin olarak izlenen tek biyokimyasal bulgu olan LDH, OSHK hastalarında kontrol bireylerle kıyaslandığında anlamlı derecede arttığı gösterilmiştir. (Şekil 4.7a). İlginç bir şekilde, LDH seviyeleri, total kolesterol (Şekil 4.7b) ve LDL (Şekil 4.7c) ile pozitif ve vitamin D seviyeleri ile negatif korelasyon göstermiştir (Şekil 4.7d). Trigliserid seviyeleri LDH ile korelasyon göstermemiştir (Şekil 4.7e). HDL ise beklenenin aksine LDH ile pozitif korelasyon göstermiştir (Şekil 4.8f).

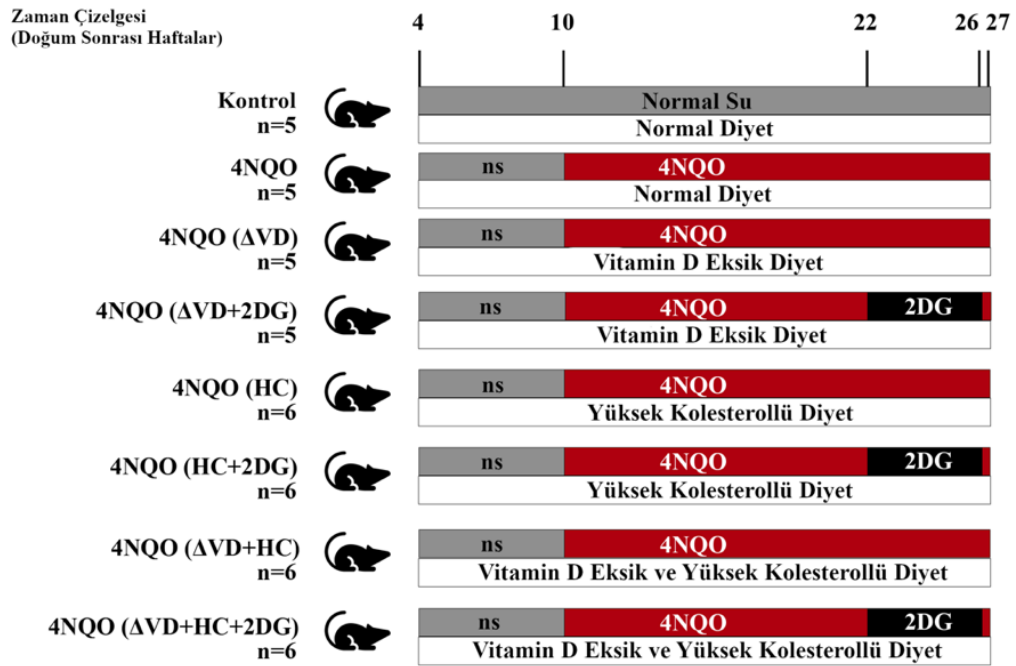
Bu sonuçlar, yüksek kolesterol ve VDE'nin, glikoliz metabolizmasının deregülasyonu yoluyla OSHK tümörigenezinde rol oynayabileceğine işaret etmektedir.



Şekil 4.7. OSHK hastaları ile onlara yaş ve cinsiyetçe denk 30 kontrol bireyin LDH düzeyleri ile LDH düzeylerinin diğer biyokimyasal parametreler ile korelasyonu.

4.3. Yüksek Kolesterol ve D Vitamini Eksikliği, 4NQO Oral Kanser Sıçan Modelinde Glikolizin Dereğülasyonu Yoluyla Karsinogenezi Teşvik Eder

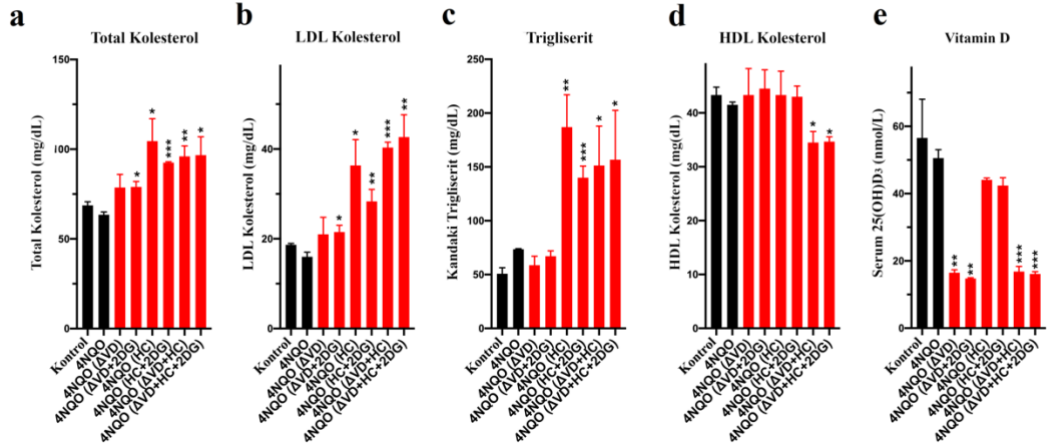
Daha sonra OSHK karsinogenezi sırasında yüksek kolesterol ve VDE'nin tek başına ve birlikte potansiyel katılımını araştırmak için *in vivo* 4NQO sıçan oral kanser modeli kullanılmıştır. Sprague Dawley sıçanlarını doğum sonrası 4. haftadan deneysel prosedürün sonuna kadar normal [kontrol ve 4NQO grupları], D vitamini eksik [4NQO(Δ VD) ve 4NQO(Δ VD+2DG) grupları], yüksek kolesterolü [4NQO(HC) ve 4NQO(HC+2DG) grupları] ve D vitamini eksik/yüksek kolesterolü [4NQO(Δ VD+HC) ve 4NQO(Δ VD+HC+2DG) grupları] diyetler ile beslenmeye başlanmıştır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Çalışma grupları için oluşturulan deney dizaynı

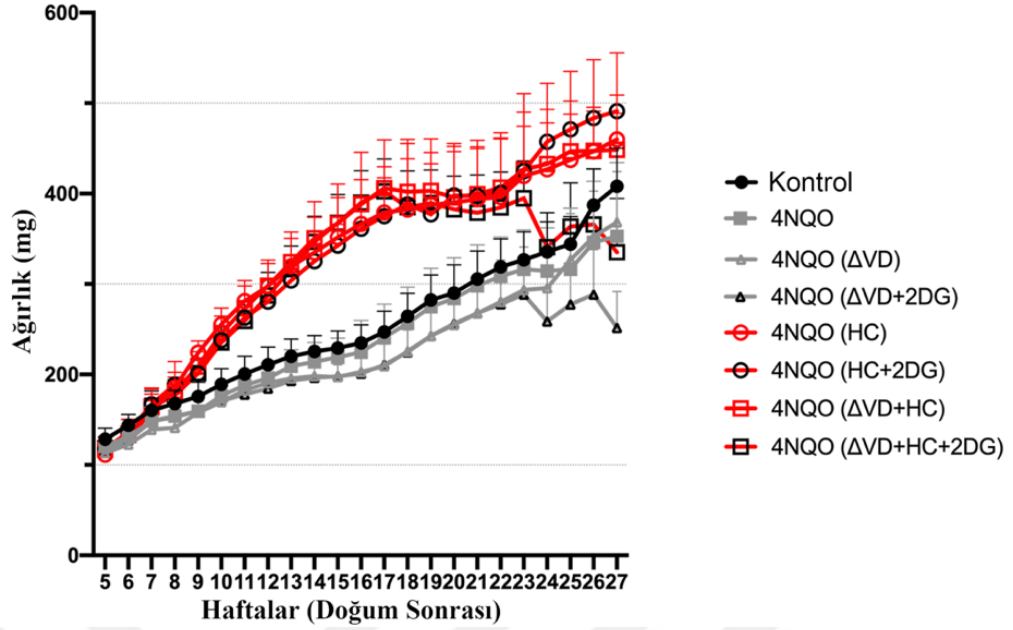
Doğum sonrası 10. haftada yüksek kolesterolü diyetlerle beslenen gruplarda kan total kolesterol (Şekil 4.9a), LDL (Şekil 4.9b) ve trigliserid (Şekil 4.9c) seviyelerindeki artış doğrulanmıştır. VDE/yüksek kolesterolü beslenen gruplarda düşük HDL seviyesi tespit edilmiştir (Şekil 4.9d). VDE diyet ile beslenen gruplarda ise vitamin D düzeylerinin anlamlı olarak daha düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.9e).

Doğum Sonrası 10. Hafta



Şekil 4.9. 10. haftada serum total kolesterol, LDL, HDL, trigliserid ve vitamin D seviyeleri.

Kan kolesterolünün yüksek ve vitamin D düzeylerinin düşük olduğunu doğruladıktan sonra kontrol grubu dışındaki tüm grupların içme sularına 4NQO ekleyerek karsinogenез işlemine başlanmıştır (Şekil 4.8). Deney bitene kadar sıçanların ağırlıkları takip edilmiş ve yüksek kolesterolü diyetle beslenen sıçanların kilo alımı gösterilmiştir (Şekil 4.10).

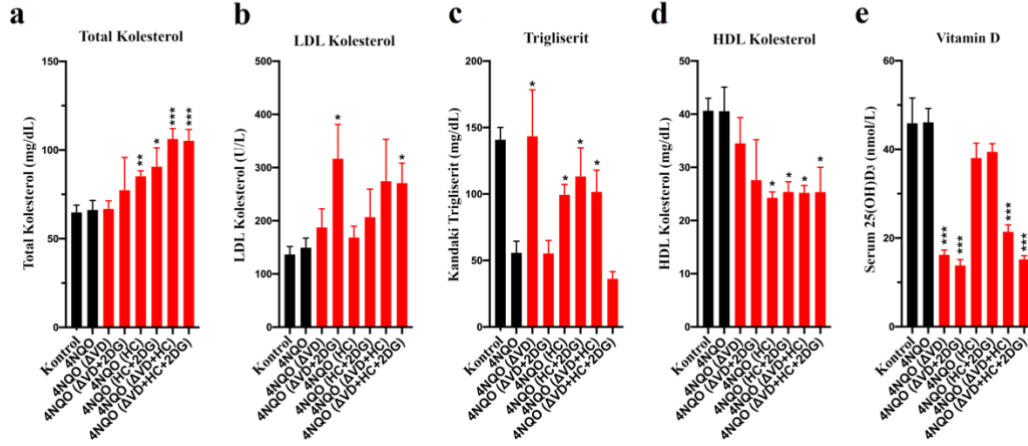


Şekil 4.10. Sıçanların deneysel prosedür sürecindeki kilo takipleri. 4NQO(ΔVD+2DG)

4NQO(HC+2DG) ve 4NQO (DVD+HC+2DG) gruplarında glikolizin inhibe edilmesi için sıçanlara 4 hafta süreyle haftada iki kez intraperitoneal olarak 2DG enjeksiyonu yapıldıktan sonra, tüm sıçanlar kurban edildi ve periferik kan örneklerini ve ağız boşluğunda tümör kitlesi olan tüm dokular toplanmıştır.

Deneysel prosedür sırasında yüksek kolesterol ve düşük vitamin D seviyelerinin korunduğunu doğrulamak için deneyin sonunda kan kolesterolü ve vitamin D seviyelerini tekrar analiz edilmiştir. Yüksek kolesterol diyeti ile beslenen sıçanlarda total kolesterol ve trigliserid seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.11a ve c). Doğum sonrası 10. haftadaki kadar belirgin olmasa da doğum sonrası 27. haftada yüksek kolesterollü diyetle beslenen sıçanlarda LDL seviyelerinin de yüksek olduğu tespit edilmiştir. (Şekil 4.11b). Yüksek kolesterol diyeti ile beslenen gruplarda HDL düzeyinde düşüş de doğrulanmıştır (Şekil 4.11d). Ek olarak, VDE diyet ile beslenen gruplarda vitamin D seviyeleri önemli ölçüde daha düşük olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.11e). İlginç bir şekilde, 2DG uygulaması VDE diyet ile beslenen sıçanlarda vücut ağırlığı kaybı ile sonuçlanmıştır, ancak sadece yüksek kolesterol diyeti ile beslenenlerde kilo kaybı gözlenmemiştir (Şekil 4.10).

Doğum Sonrası 27. Hafta

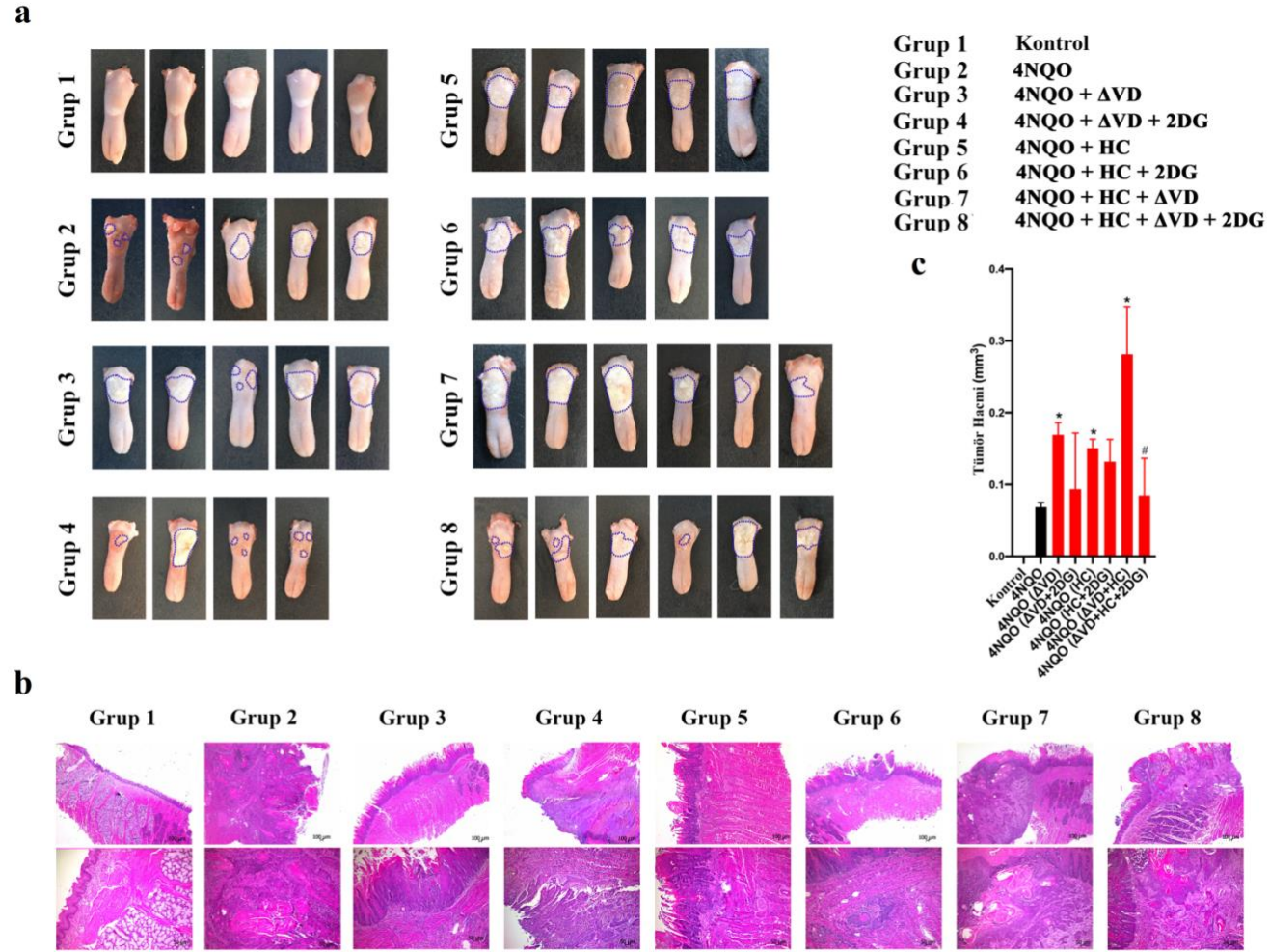


Şekil 4.11. 27. haftada serum total kolesterol, LDL, HDL, trigliserid ve vitamin D seviyeleri.

4-NQO ile muamele neticesinde tüm gruplardaki sıçanların dillerinde displazi ve skuamöz hücreli karsinom dahil lezyonların oluşumunun indüklendiği görülmüştür.

Kontrol grubundaki sıçanların dillerinde lezyon olmadığı görülmüştür (Şekil 4.12 a ve b). VDE diyet ile beslenen sıçanların tümörleri 4NQO grubuna göre daha büyük olduğu görülmüştür. Benzer şekilde, yüksek kolesterol de daha büyük tümörlerin gelişmesine yol açmıştır. Daha da ilginç, sıçanlarda yüksek kolesterol ve D vitamini eksikliğinin bir arada bulunması, yalnızca yüksek kolesterol veya VDE diyet ile beslenen sıçanlara kıyasla çok daha büyük tümörlerin gelişmesine yol açmıştır (Şekil 4.12a ve c). Diğer yandan, sıçanların 2DG ile muamele edilmesi, tüm gruplarda tümör büyümesinin inhibisyonu ile sonuçlanmıştır (Şekil 4.12a ve c). Tek başına yüksek kolesterol veya VDE diyet ile beslenen sıçanlarda tümör inhibisyonu anlamlı olmasa da 2DG yüksek kolesterol/VDE diyet ile beslenen sıçanlarda tümör oluşumunu anlamlı olarak baskılamıştır (Şekil 4.12.a ve c).

Bu bulgular, yüksek kolesterol ve vitamin D eksikliğinin birlikte glikoliz metabolizmasını deregüle ederek OSHK tümör oluşumunu indüklediğini göstermiştir.

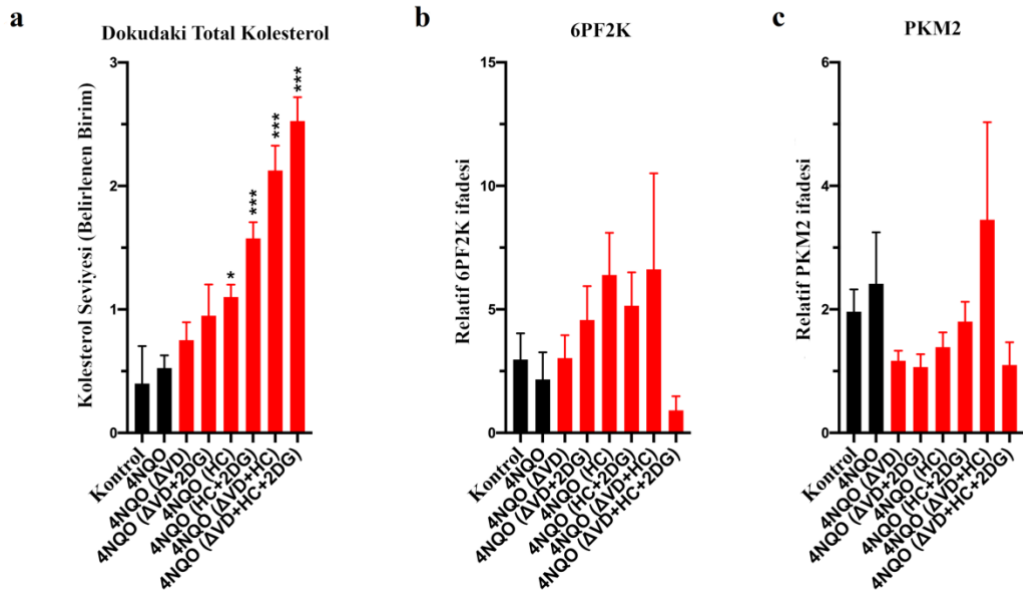


Şekil 4.12. Sıçanların dillerinde oluşan tümörler (4.12a), bu tümörlerin histopatolojik incelenmesi sonucu elde edilen H&E görüntüleri (4.12b) ve oluşan tümör hacimleri (4.12c).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Bu bulgular, yüksek kolesterol ve vitamin D eksikliğinin birlikte glikoliz metabolizmasını deregüle ederek OSHK tümör oluşumunu indüklediğini göstermiştir.

Tümör dokularında değişen kolesterol ve glikoliz metabolizmasını doğrulamak için, ilk olarak kolesterol seviyeleri değerlendirilmiştir. Deney sonuçlarımız, VDE'nin anlamlı olmasa da doku kolesterol düzeylerinde artışa neden olduğunu göstermiştir. İlginç bir şekilde, yüksek kolesterol/VDE diyet ile beslenen sıçanların tümör doku örnekleri, en yüksek hücre içi kolesterol seviyelerine sahip olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.13a). Dokulardaki laktat seviyesini ölçmek için yapılan deneylerde bütün dokular için optik dansite seviyeleri referans aralığının çok üstünde tespit edilmiştir. Dolayısıyla bütün gruplarda elde edilen sonuçlar birbirleri ile çok yakın çıkmıştır.



Şekil 4.13. Tümör dokularında total kolesterol ve glikoliz ilişkili genlerin ifade seviyeleri.

Ardından, deney gruplarında oluşan tümör dokularında glikoliz metabolizmasının değiştiğine dair kanıt elde edebilmek için glikoliz ile ilişkili 2 genin (6PF2K ve PKM2) ifade seviyelerini mRNA düzeyinde incelemek için qRT-PZR yapılmıştır. Yüksek kolesterol ve/veya VDE diyet ile beslenen grupların tümör doku örneklerinin yüksek 6PF2K ifadesine sahip olduğunu, en yüksek ifadenin 4NQO(DVD+HC) grubunda olduğunu ve bu ifadenin sıçanlar 2DG ile muamele edildiğinde güçlü bir şekilde inhibe edildiği bulunmuştur (Şekil 4.13b). Paralel olarak, PKM2 ifadesinin ölçümü, yalnızca

yüksek kolesterol veya vitamin D eksik diyetle beslenen sıçanların tümör örneklerinde değişmediğini göstermiştir. Ancak yüksek kolesterol/vitamin D eksik diyetle beslenen grupta ifadenin göreceli olarak daha yüksek olduğu bulunmuştur. İlginç bir şekilde, 2DG muamelesi, yüksek kolesterol/vitamin D eksik diyetle beslenen farelerin tümörlerinde PKM2 ifadesini azalttığı ortaya konulmuştur (Şekil 4.13c).

Tüm bu bulgular, oral karsinogenez sırasında yüksek kolesterol ve VDE'nin ortak katkısını ve bu sürecin temel olarak tümör hücrelerinde enerji metabolizmasını değişimiyle gerçekleştiğini ortaya koymuştur.



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Kimyasallar ve serbest oksijen radikalleri gibi çeşitli maruziyetler sonucunda DNA'nın zarar görmesi ile karsinogenez başlar ve özellikle hücre bölünmesi, DNA onarımı ve apoptoz ile ilişkili genlerde mutasyonların birikmesine yol açmaktadır (Chainani-Wu et al. 2011). Diyet ve beslenme alışkanlıkları karsinogenik süreçler sırasında kritik öneme sahiptir. Meyve ve sebzeler açısından fakir, et ve diğer hayvansal gıdalardan açısından zengin bir diyetin karsinogenezi desteklediği bilinmektedir (Bravi et al. 2013). Orofaringeal kanserler söz konusu olduğunda, bu diyet kombinasyonunun sigara ve yüksek alkol tüketimi ile birlikte 10 ila 20 kat daha fazla orofaringeal kanser riskine neden olduğu retrospektif bir analizde rapor edilmiştir (Bravi et al. 2013). Hastalarda yüksek kolesterolün kritik nedenleri olarak süt ürünlerinin tüketimi olduğu ve sebze ile meyvelerin vitaminler için önemli kaynaklar olduğu göz önünde bulundurarak, VDE ve yüksek kolesterolün OSHK oluşumu ve gelişimi için olası rollerini glikolizin modüle edilmesi ile araştırmayı amaçlanmıştır.

Son dönemde yapılan epidemiyolojik ve pre-klinik çalışmalar, düşük serum vitamin D düzeylerinin veya VDE'nin kanser dahil birçok hastalığın ilerlemesinde rol oynadığını ve bu durumların kansere bağlı ölümlerde rolleri olduğunu ortaya koymuştur (Fathi et al. 2019). Diğer yandan, dolaşımdaki yüksek vitamin D seviyesinin, baş ve boyun kanseri dahil olmak üzere farklı kanser türlerinin ilerleme riskinin azalmasıyla yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (Fathi et al. 2019). Ayrıca *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, vitamin D'nin fizyolojik olarak aktif bir formu olan kalsitriolün özellikle oral kanserlerde anti-neoplastik potansiyelini göstermiş ve oral kanser hastalarında ciddi bir VDE tespit edilmiştir (Meier et al. 2007; Osafi et al. 2014; Grimm et al. 2015).

VDE'ye bağlı kolesterol konsantrasyonundaki artışın, kolesterol yıkımındaki azalmadan ziyade kolesterol biyosentezindeki artıştan kaynaklandığının ortaya konulduğu yakın tarihli bir çalışmada, Kuzey Çinli bireylerde artan toplam serum kolesterolü ve LDL kolesterol seviyelerinin VDE ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Li et al. 2016). VDE'nin VDR transkripsiyonel aktivitesinde ve Insig-2 ifadesinde azalmaya ve ardından SREBP-2 ifadesinde ve aktivitesinde artışa yol açtığı gösterilmiştir (Li et al. 2016). Bir transkripsiyon faktörü olan SREBP-2, kolesterol sentezi ve kolesterol alımı ile

ilgili gen ifadelerinin düzenlenmesinde rol almaktadır. Bu nedenle, VDE'si olan hastaların dokularında sürekli ifade edilen SREBP-2'nin yalnızca kolesterol sentezini artırmakla kalmayıp aynı zamanda dolaşımdaki kolesterolün hücre içine alımını da indükleyerek hücre içi kolesterol düzeylerinde artışa neden olduğu bulunmuştur (Goldstein et al. 2006).

Artan hücre içi kolesterol seviyelerinin, SREBP-2 yoluyla negatif geri besleme mekanizmalarını aktive ettiği gösterilmiştir. SREBP-2 tarafından oluşturulan oksisterol ligandlarının, kolesterol efflux genlerini yukarı regüle eden Liver X Receptor (LXR)'ye bağlandığı, bu şekilde LXR'nin RXR ile heterodimer yapılar oluşturmasına neden olduğu ve böylece LXR hedef genlerinin ifadelerini arttırdığı bulunmuştur. Hücre içi kolesterolü hücre dışına pompalayan ABCA1, bu hedef genlerden biridir. Artan hücre içi kolesterol düzeyine paralel olarak hücrede ABCA1 ifadesi de artmaktadır (Wong et al. 2006). Hücre içi kolesterolü düşürmenin önemli alternatiflerinden birinin kolesterol sentezinde substrat olarak kullanılan asetil CoA oluşumunu engelliyor olması ilginçtir. En önemli hücre içi asetil CoA kaynağı, glikoliz sonucu üretilen piruvattan piruvat dehidrojenaz kompleksi (PDC) tarafından mitokondride üretilmesidir (Pietrocola et al. 2015).

PDC hem transkripsiyonel hem de transkripsiyon sonrası seviyelerde kontrol edilen bir protein kompleksidir (Stacpoole 2017). Kompleksin enzimatik aktivitesindeki değişim, esas olarak, yapısındaki enzimlerden biri olan piruvat dehidrojenazın üç serin bölgesinden herhangi birinin fosforilasyonu ile gerçekleşir. Piruvat dehidrojenazın fosforilasyonu tüm kompleksi inaktif hale getirir. PDC'nin fosforilasyonu insanlarda %70 homoloji gösteren dört piruvat dehidrojenaz kinaz izoformu (PDK1-4) tarafından katalize edilir (Stacpoole 2017). SREBP-2 aracılı LXR aktivasyonunun PDK4 ifadesini arttırdığı daha önce gösterilmiştir (Sugden and Holness 2006). Ayrıca PDK4'ün LXR agonisti GW3965 tarafından yukarı regüle edildiği *in vitro* olarak hem farklılaştırılmış insan birincil adipositlerinde hem de farklılaştırılmış mürin 3T3-L1 hücrelerinde gösterilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada, LXR aktivasyonunun PDC'nin PDK4'e bağlı fosforilasyonuna neden olduğu, dolayısıyla PDC aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir (Stenson et al. 2009). PDC aktivitesindeki azalma asetil CoA üretiminde azalmaya ve dolayısıyla mitokondriyal solunumda azalmaya neden olmaktadır. Tüm bu bulgular, birlikte hücre içi kolesterol seviyesini etkileyen ve daha sonra PDC aktivitesini ve piruvattan asetil CoA

üretimini değiştirerek glikolizi modüle eden VDE ve kolesterol koşullarının birbiriyle ilişkili olduğunu göstermektedir.

Neoplastik oluşumların özünü temsil eden kronik ve sıklıkla kontrolsüz hücre çoğalması, yalnızca hücre çoğalmasının kontrolünün kaybıyla değil, aynı zamanda hücre büyümesi ve bölünmesi için gerekli olan enerji metabolizmasının düzenlenmesiyle de ilişkilidir. Aerobik koşullar altında, normal hücreler önce hücresel glikozu sitozolde glikoliz ile piruvata dönüştürür ve ardından mitokondride CO₂'ye kadar işler. Anaerobik koşullar altında, glikoliz tercih edilir ve piruvatın küçük bir kısmı mitokondriye gönderilir. Kanser hücreleri ise oksijen varlığında bile glikoz metabolizmasını ve dolayısıyla enerji üretimini yeniden programlayarak, 'aerobik glikoliz' olarak adlandırılan glikoliz ile enerji metabolizmalarını büyük ölçüde sınırlandırır (Hanahan and Weinberg 2011).

Bu çalışmada, OSHK hastalarında VDE ve yüksek kolesterolün bir arada bulunduğunu ve birbirleri ile korelasyon gösterdiğini, ayrıca kolesterol ve D vitamini düzeylerinin deregülasyonunun glikoliz ile ilgili genlerin zenginleşmesine yol açtığı bulunmuştur. Daha sonra, VDE ve yüksek kolesterolün tek başına ve birlikte 4NQO ile indüklenen *in vivo* kanser modellerinde daha büyük tümörlerin oluşumuna yol açtığını ve bu tümörlerin oluşumunun glikoliz inhibisyonu ile baskılandığı gösterilmiştir.

Sonuç olarak, yüksek kolesterol ve VDE'nin ayrı ayrı oral karsinogenez sürecine katkı yaptıkları gösterilmiş olmakla birlikte bu iki durumun birlikteliğinin oral karsinogenez sürecini daha güçlü bir şekilde etkilediği ortaya konulmuştur. Daha da önemlisi, bu sürecin temel olarak tümör hücrelerinde enerji metabolizmasının değişimiyle gerçekleştiği açığa çıkarılmıştır.

KAYNAKLAR

- Al-Koshab, M., Alabsi, A. M., Mohd Bakri, M., Ali-Saeed, R. and Selvi Naicker, M. 2020. Antitumor activity of *ficus deltoidea* extract on oral cancer: an in vivo study. *Journal of Oncology*, 54(9), 54-68.
- Bravi, F., Bosetti, C., Filomeno, M., Levi, F., Garavello, W., Galimberti, S., Negri, E. and La Vecchia, C. 2013. Foods, nutrients and the risk of oral and pharyngeal cancer. *British Journal of Cancer*, 10(9), 2904-2910.
- Chainani-Wu, N., Epstein, J. and Touger-Decker, R. 2011. Diet and prevention of oral cancer: strategies for clinical practice. *Journal of the American Dental Association*, 166(9), 142-149.
- Deuster, E., Jeschke, U., Ye, Y., Mahner, S. and Czogalla, B. 2017. Vitamin D and VDR in gynecological Cancers-A systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*, 118(18), 418-26.
- El-Rouby, D. H. 2011. Histological and immunohistochemical evaluation of the chemopreventive role of lycopene in tongue carcinogenesis induced by 4nitroquinoline-1-oxide. *Archives of Oral Biology*, 56(45), 664-671.
- Fathi, N., Ahmadian, E., Shahi, S., Roshangar, L., Khan, H., Kouhsoltani, M., Maleki Dizaj, S. and Sharifi, S. 2019. Role of vitamin D and vitamin D receptor (VDR) in oral cancer. *Biomedicine Pharmacotherapy*, 10(9), 391-401.
- Goldstein, J. L., DeBose-Boyd, R. A. and Brown, M. S. 2006. Protein sensors for membrane sterols. *Cell*, 12(4), 35-46.
- Greenwald, P., Clifford, C. K. and Milner, J. A. 2001. Diet and cancer prevention. *European Journal of Cancer*, (37), 948-965.
- Grimm, M., Cetindis, M., Biegner, T., Lehman, M., Munz, A., Teriete, P. and Reinert, S. 2015. Serum vitamin D levels of patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC) and expression of vitamin D receptor in oral precancerous lesions and OSCC. *Medicina Oral Patologia Oral Cirugia Bucal*, (20), 88-95.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, (144), 646-74.
- Hashibe, M., Brennan, P., Benhamou, S., Castellsague, X., Chen, C., Curado, M. P., Dal Maso, L., Daudt, A. W., Fabianova, E., Fernandez, L., Wunsch-Filho, V., Franceschi, S., Hayes, R. B., Herrero, R., Koifman, S., La Vecchia, C., Lazarus, P., Levi, F., Mates, D., Matos, E., Menezes, A., Muscat, J., Eluf-Neto, J., Olshan, A. F., Rudnai, P., Schwartz, S. M., Smith, E., Sturgis, E. M., Szeszenia-Dabrowska, N., Talamini, R., Wei, Q., Winn, D. M., Zaridze, D., Zatonski, W., Zhang, Z. F., Berthiller, J. and Boffetta, P. 2007. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer

- Epidemiology Consortium. *Journal of the National Cancer Institute*, (99), 777-789.
- Jiang, C. Q., Chan, Y. H., Xu, L., Jin, Y. L., Zhu, T., Zhang, W. S., Cheng, K. K. and Lam, T.H. 2016. Smoking and serum vitamin D in older Chinese people: cross-sectional analysis based on the Guangzhou Biobank Cohort Study. *BMJ Open*, (6), 946-954.
- Kademani, D., Bell, R. B., Schmidt, B. L., Blanchaert, R., Fernandes, R., Lambert, P., Tucker, W. M. 2008. Oral and maxillofacial surgeons treating oral cancer: a preliminary report from the american association of oral and maxillofacial surgeons task force on oral cancer. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, (66), 2151-2157.
- Kanojia, D. and Vaidya, M. M. 2006. 4-nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. *Oral Oncology*, (42), 655-667.
- Lee, S., Lee, D. K., Choi, E. and Lee, J. W. 2005. Identification of a functional vitamin D response element in the murine *Insig-2* promoter and its potential role in the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Molecular Endocrinology*, (19), 399-408.
- Li, S., He, Y., Lin, S., Hao, L., Ye, Y., Lv, L., Sun, Z., Fan, H., Shi, Z., Li, J., Feng, R., Na, L., Wang, Y., Li, Y. and Sun, C. 2016. Increase of circulating cholesterol in vitamin D deficiency is linked to reduced vitamin D receptor activity via the *Insig-2/SREBP-2* pathway. *Molecular Nutrition Food Research*, (60), 798-809.
- Liao, Y., Wang, J., Jaehnig, E. J., Shi, Z. and Zhang, B. 2019. WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs. *Nucleic Acids Research*, (47), 199-205.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ Method. *Methods*, (25), 402-408.
- Mahmood, S., Birkaya, B., Rideout, T.C. and Patel, M. S. 2016. Lack of mitochondriogenerated acetyl-CoA by pyruvate dehydrogenase complex downregulates gene expression in the hepatic de novo lipogenic pathway. *Am Journal Physiol Endocrinol Metab*, (311), 117-127.
- Meier, J. D., Enepekides, D. J., Poirier, B., Bradley, C. A., Albala, J. S. and Farwell, D. G. 2007. Treatment with 1-alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 (vitamin D3) to inhibit carcinogenesis in the hamster buccal pouch model. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, (133), 1149-1152.
- Minicucci, E. M., da Silva, G. N., Ribeiro, D. A. and Favero Salvadori, D. M. 2009. No mutations found in exon 2 of gene *p16CDKN2A* during rat tongue carcinogenesis induced by 4nitroquinoline-1-oxide. *J Mol Histol*, (40), 71-76.

- Noguti, J., De Moura, C. F., De Jesus, G. P., Da Silva, V. H., Hossaka, T. A., Oshima, C. T. and Ribeiro, D. A. 2012. Metastasis from oral cancer: an overview. *Cancer Genomics Proteomics*, (9), 329-335.
- Oballe, H. J. R., Muniz, F. W. M. G., Bueno, C. C., Klein, I. P., Carrard, V. C., Rösing, C. K. and Gaio, E. J. 2018. Spontaneous alveolar bone loss after 4NQO exposure in Wistar rats. *Archives of Oral Biology*, (89), 44-48.
- Osafi, J., Hejazi, A., Stutz, D. D., Keiserman, M. A., Bergman, C. J. and Kingsley, K. 2014. Differential effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on oral squamous cell carcinomas in vitro. *Journal of Dietary Supplements*, (11), 145-154.
- Pietrocola, F., Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., Madeo, F. and Kroemer, G. 2015. Acetyl coenzyme A: a central metabolite and second messenger. *Cell Metabolism*, (21), 805-821.
- Potter, V. R. 1958. The biochemical approach to the cancer problem. *Fed Proc*, (17), 691-697.
- Ram, H., Sarkar, J., Kumar, H., Konwar, R., Bhatt, M. L. and Mohammad, S. 2011. Oral cancer: risk factors and molecular pathogenesis. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, (10), 132-137.
- Ren, W., Gu, Y., Zhu, L., Wang, L., Chang, Y., Yan, M., Han, B. and He, J. 2016. The effect of cigarette smoking on vitamin D level and depression in male patients with acute ischemic stroke. *Comprehensive Psychiatry*, (65), 9-14.
- Rothenberg, S. M. and Ellisen, L. W. 2012. The molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of Clinical Investigation*, (122), 51-57.
- Stacpoole, P. W. 2017. Therapeutic Targeting of the Pyruvate Dehydrogenase Complex/Pyruvate Dehydrogenase Kinase (PDC/PDK) Axis in Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, (109), 65-73.
- Stenson, B. M., Rydén, M., Steffensen, K. R., Wåhlén, K., Pettersson, A. T., Jocken, J. W., Arner, P. and Laurencikiene, J. 2009. Activation of liver X receptor regulates substrate oxidation in white adipocytes. *Journal of Endocrinology*, (150), 04-13.
- Stoner, G. D. and Gupta, A. 2001. Etiology and chemoprevention of esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of Carcinogenesis*, (22), 37-46.
- Sugden, M. C. and Holness, M. J. 2006. Mechanisms underlying regulation of the expression and activities of the mammalian pyruvate dehydrogenase kinases. *Journal of Physiology and Biochemistry*, (112), 139-149.
- Tang, X. H., Albert, M., Scognamiglio, T. and Gudas, L. J. 2009. A DNA methyltransferase inhibitor and all-trans retinoic acid reduce oral cavity carcinogenesis induced by the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *Cancer Prevention Research (Phila)*, (2), 1100-1110.

- Tang, X. H., Knudsen, B., Bemis, D., Tickoo, S. and Gudas, L. J. 2004. Oral cavity and esophageal carcinogenesis modeled in carcinogen-treated mice. *Clinical Cancer Research*, (10), 301-313.
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. and Thompson, C. B. 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, (324), 1029-1033.
- Vitale-Cross, L., Czerninski, R., Amornphimoltham, P., Patel, V., Molinolo, A. A. and Gutkind, J. S. 2009. Chemical carcinogenesis models for evaluating molecular-targeted prevention and treatment of oral cancer. *Cancer Prevention Research (Phila)*, (2), 419-422.
- Wang, Z., Zhang, L., Zhang, D., Sun, R., Wang, Q. and Liu, X. 2015. Glycolysis inhibitor 2deoxy-D-glucose suppresses carcinogen-induced rat hepatocarcinogenesis by restricting cancer cell metabolism. *Molecular Medicine Reports*, (11), 1917-1924.
- Warnakulasuriya, S. 2009. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Journal of Oral Science*, (45), 309-316.
- Williams, H. K. 2000. Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. *Journal of Pathology*, (53), 165-172.
- Wong, J., Quinn, C. M. and Brown, A. J. 2006. SREBP-2 positively regulates transcription of the cholesterol efflux gene, ABCA1, by generating oxysterol ligands for LXR. *Biochemical Journal*, (400), 485-491.
- Wu, X., Cheng, J. and Yang, K. 2016. Vitamin D-Related gene polymorphisms, Plasma 25Hydroxy-Vitamin D, cigarette smoke and Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Risk. *International Journal of Molecular Sciences*, (17), 85-99.
- Yuan, F. N., Valiyaparambil, J., Woods, M. C., Tran, H., Pant, R., Adams, J. S. and Mallya, S. M. 2014. Vitamin D signaling regulates oral keratinocyte proliferation in vitro and in vivo. *International Journal of Oncology*, (44), 1625-1633.

Tezden Üretilmiş Yayınlar:

Received: 24 August 2021 | Revised: 6 December 2021 | Accepted: 8 December 2021
 DOI: 10.1111/odi.14117

ORIGINAL ARTICLE



Low vitamin D and high cholesterol facilitate oral carcinogenesis in 4NQO-induced rat models via regulating glycolysis

Rasim Gumus^{1,2} | Ozel Capik^{1,2} | Betul Gundogdu³ | Arzu Tatar⁴ |
 Konca Altinkaynak⁵ | Ozlem Ozdemir Tozlu¹ | Omer Faruk Karatas^{1,2} 

¹Molecular Biology and Genetics
 Department, Erzurum Technical
 University, Erzurum, Turkey

²Cancer Therapeutics Laboratory, High
 Technology Application and Research
 Center, Erzurum Technical University,
 Erzurum, Turkey

³Department of Medical Pathology,
 Faculty of Medicine, Ataturk University,
 Erzurum, Turkey

⁴Department of Otorhinolaryngology
 Diseases, Faculty of Medicine, Ataturk
 University, Erzurum, Turkey

⁵Department of Medical Biochemistry,
 School of Medicine, University of Health
 Sciences, Istanbul, Turkey

Correspondence

Omer Faruk Karatas, Department of
 Molecular Biology and Genetics, Erzurum
 Technical University, Omer Nasuhi Bilmen
 Mah. Havaalani Yolu Cad. No: 53 Yakutiye,
 Erzurum, Turkey.
 Email: faruk.karatas@erzurum.edu.tr

Funding information

This work was supported by the Scientific
 and Technological Research Council of
 Turkey, Grant/Award Number: 119Z195

Abstract

Objectives: Diets and nutritional habits are critical during carcinogenic processes, where a diet poor in fruits and vegetables and rich in meat and other foods of animal origin facilitates carcinogenesis. In this study, we aimed at investigating the possible involvement of vitamin D deficiency (VDD) and high cholesterol (HC) together in oral squamous cell carcinoma (OSCC) through modulating glycolysis.

Subjects and Methods: We compared total cholesterol, LDL, HDL, triglycerides, LDH, and vitamin D levels of OSCC patients and control individuals. We used GEO datasets for gene set enrichment and 4-nitroquinoline-1-oxide induced *in vivo* oral carcinogenesis models to investigate contribution of VDD and HC during carcinogenesis via possible modulation of glycolysis.

Results: We found that VDD and HC co-exist in OSCC patients, and deregulation of cholesterol and vitamin D levels results in enrichment of genes related to glycolysis. We, then, demonstrated that VDD and HC on their own and together facilitated the formation of larger tumors in 4NQO-induced *in vivo* cancer models, which are suppressed by glycolysis inhibition.

Conclusion: We reported collaborative contribution of HC and VDD during oral carcinogenesis, which is mainly carried out via altering energy metabolism in tumor cells.

KEYWORDS

4NQO, cholesterol, glycolysis, LDL, oral squamous cell carcinoma, vitamin D deficiency

Tezden Üretilmiş Uluslararası Kongre Sunum :

1st INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON RECENT ADVANCES IN
FUNDAMENTAL AND APPLIED SCIENCES (ISFAS-2021)

LOW VITAMIN D AND HIGH CHOLESTEROL LEVELS PROMOTE THE
PROGRESSION OF ORAL CANCER IN 4NQO INDUCED ORAL
CARCINOGENESIS MODELS VIA REGULATING GLYCOLYSIS

Rasim Gumus, B.Sc.^{1,2,†}, Ozel Capik, M.Sc.^{1,2,†}, Betül Gundogdu, M.D.³, Arzu
Tatar, M.D.⁴, Konca Altinkaynak, M.D.⁵, Ozlem Ozdemir Tozlu, Ph.D.¹, Omer
Faruk Karatas, Ph.D.^{1,2,*}

¹Molecular Biology and Genetics Department, Erzurum Technical University, Erzurum, Turkey

²Cancer Therapeutics Laboratory, High Technology Application and Research Center, Erzurum Technical
University, Erzurum, Turkey

³Department of Medical Pathology, Faculty of Medicine, Ataturk University, Erzurum, Turkey

⁴Department of Otorhinolaryngology Diseases, Faculty of Medicine, Ataturk University, Erzurum,
Turkey

⁵Department of Medical Biochemistry, School of Medicine, University of Health Sciences, Istanbul,
Turkey

Corresponding author: faruk.karatas@erzurum.edu.tr
(ORCID: 0000-0002-0379-2088)

ABSTRACT

Diets and nutritional habits are critical during carcinogenic processes, where a diet poor in fruits and vegetables and rich in meat and other foods of animal origin promote carcinogenesis. Considering the vegetables and fruits as important sources for vitamins and dairy products as critical causes for high cholesterol in patients, we aimed at investigating the possible involvement of Vitamin D deficiency (VDD) and high cholesterol together in oral squamous cell carcinoma (OSCC) through modulating glycolysis. We initially compared total cholesterol, LDL, HDL, triglycerides, LDH, and Vitamin D levels of 23 OSCC patients and age and gender matched 30 control individuals and analyzed their correlation using Pearson's Analysis. Then, we used GEO datasets for gene set enrichment analysis. We used 4-nitroquinoline-1-oxide induced *in vivo* oral carcinogenesis models to investigate the contribution of VDD and high cholesterol during carcinogenesis via possible modulation of glycolysis. We, then, measured the cholesterol and gene expression levels in rat tongue tumor tissue samples using ELISA and qRT-PCR, respectively. We found that VDD and high cholesterol co-exist in OSCC patients and deregulation of cholesterol and Vitamin D levels results in enrichment of genes related to glycolysis. We, then, demonstrated that VDD and high cholesterol on their own and together led to formation of larger tumors in 4NQO induced *in vivo* cancer models, which is suppressed by glycolysis inhibition. In conclusion, we reported collaborative contribution of high cholesterol and VDD during oral carcinogenesis, which is mainly carried out via altering energy metabolism in tumor cells. This work was supported by The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) (grant number 119Z195).

Keywords: Oral squamous cell carcinoma; Vitamin D deficiency; Cholesterol; LDL; glycolysis; 4NQO.