

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AOC3'ÜN İNFLAMATUAR VE NEOPLASTİK KOLON HASTALIKLARINDAKİ
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Uzm. Bio. Özge ÖZCAN

Kök Hücre Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA
2024

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AOC3'ÜN İNFLAMATUAR VE NEOPLASTİK KOLON HASTALIKLARINDAKİ
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Uzm. Bio. Özge ÖZCAN

Kök Hücre Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Aytekin AKYOL

ANKARA

2024

**AOC3'ÜN İNFLAMATUAR VE NEOPLASTİK KOLON
HASTALIKLARINDAKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Özge ÖZCAN

Danışman: Prof. Dr. Aytekin AKYOL

Bu tez çalışması 15.08.2024 tarihinde jürimiz tarafından "Kök Hücre Doktora Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Y. Çetin Kocaefe

(Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ABD)

Üye:

Prof. Dr. Ayşen Özcan

(Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü)

Üye:

Prof. Dr. Erkan Yılmaz

(Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü)

Üye:

Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu

(Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü)

Üye:

Dr. Öğr. Üyesi Cansu Saka Özdemir

(Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü)

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

16 Ağustos 2024

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kâğıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾

o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾

o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

Tarih

İmza

Özge ÖZCAN

i

“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

⁽¹⁾ Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

⁽²⁾ Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkânı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü ve fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

⁽³⁾ Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan iş birliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun** önerisi ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir.

* Tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.**

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, Prof. Dr. Aytekin AKYOL danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

İmza

Özge ÖZCAN

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan değerli hocam Prof. Dr. Aytekin Akyol'a, tez izleme komitemde yer alan ve tez çalışmamın her aşamasında tecrübelerini benimle paylaşan Prof. Dr. Çetin Kocaefe ve Prof. Dr. Erkan Yılmaz'a teşekkür ediyorum.

Verdikleri eğitimle bir sürü kıymetli bilimsel bilgi edindiğim Kök Hücre Bilimleri Anabilim Dalı hocalarına ve Kök Hücre Merkezi'ndeki arkadaşlarıma çok teşekkür ediyorum.

Tüm deneylerimi yaptığım ve bir sürü tecrübe kazandığım Transgenik Hayvan Teknolojileri Uygulama ve Araştırma Merkezi hocalarına ve birlikte çalıştığım ekip arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Son olarak kendimi bulma yolculuğumda her zaman koşulsuz bir şekilde yanımda olan, birlikte büyümeye devam ettiğim sevgili eşim Muhammed Fahrettin Özcan'a; bana bu hayata dair birçok şey öğreten ve her zaman "iyi ki bizi seçmiş" dediğim biricik güzel kızım Defne Özcan'a ; benim bu günlere gelmemi sağlayan, desteklerini bir gün bile esirgemeyen ve her zaman iyi ki böyle güzel bir aileye sahip olmuşum dediğim başta rahmetli babam Selçuk Atcı'ya, annem Ayten Atcı'ya ve abim Erhan Atcı'ya çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması sırasında, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK), 1001- Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı tarafından fonlanan 120S967 nolu proje kapsamında bursiyer olarak destek aldığım için de TÜBİTAK'a da ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Özcan, Ö, AOC3'ün İnflamatuar ve Neoplastik Kolon Hastalıklarındaki Rolünün Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre Programı Doktora Tezi, Ankara, 2024. AOC3 geni kromozom 17 üzerinde yer alan ve inflamasyon sürecinde lökosit trafiğinde yer alan AOC3 (VAP-1) proteinini kodlamaktadır. AOC3 endotel, adiposit, perisit, miyofibroblast ve düz kas gibi pek çok farklı hücre grubu tarafından ifade edilmektedir. Membran bağlı ve soluble olmak üzere iki formu bulunan AOC3 proteini gastrointestinal sistem içerisinde stromal hücrelerden olan miyofibroblastlar tarafından da ifade edilmektedir. Bu tez çalışması kapsamında *Aoc3*'ün *in vivo* fare hastalık modellerinde kolit ve kolorektal karsinogenez gelişimi üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda, ilk olarak; Finlandiya Turku Üniversitesinden temin edilen *Aoc3* nakavt farelerin genotipi doğrulanmıştır. Ayrıca *Aoc3* nakavt ve yabanıl farelerdeki *Aoc3* ifadesi arasındaki değişim karşılaştırılmıştır. İkinci olarak; Dekstran Sülfat Sodyum (DSS) kolit modeli için kullanılacak DSS'nin konsantrasyonu optimize edilmiştir. Üçüncü olarak; akut kolit modeli oluşturulmuş ve *Aoc3* nakavt farelerin, yabanıl kontrol farelerine göre kolite daha yatkın oldukları gözlenmiştir. Dördüncü olarak; *Aoc3* nakavt ve yabanıl farelere Azoksimetan (AOM), DSS ve AOM/DSS kombinasyonu uygulanmış ve takip süreleri sonunda inflamasyonla indüklenen kolon kanseri açısından kolonları incelenmiştir. Ancak AOM/DSS uygulaması *Aoc3* mutant farelerin sağ kalımını çok kısalttığı için denek sayısındaki azalmaya bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilememiştir. Bunun üzerine beşinci ve son olarak; *Apc*+/- mutant fareler ile *Aoc3* nakavt fareler çaprazlanarak *Apc*+/- *Aoc3*+/, *Apc*+/- *Aoc3*+/- ve *Apc*+/- *Aoc3*-/- farelerden oluşturulan üç grup takip edilmiş ve sakrifikasyon sonrasında *Apc*+/- *Aoc3*-/- farelerdeki kolon polip sayılarında *Apc* +/- *Aoc3* +/+ farelere göre istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak; *Aoc3* nakavt farelerin DSS ile indüklenen kolit oluşumuna ve kolonik tümörogeneze yabanıl farelere göre daha yatkın olduğu *in vivo* hastalık modelinde bu çalışma kapsamında gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: AOC3, Kolit, APC, Kolorektal Kanser, AOM, DSS

ABSTRACT

Ozcan, O, Investigation of The Role of Aoc3 in Inflammatory and Neoplastic Colon Diseases, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Department of Stem Cell Sciences Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2024. The *AOC3* gene is located on chromosome 17 and encodes the protein AOC3 (VAP-1), which is involved in leukocyte trafficking during inflammation. AOC3 is expressed by many different cell groups such as endothelium, adipocytes, pericytes, myofibroblasts and smooth muscle. AOC3 protein, which has two forms, membrane-bound and soluble, is also expressed by myofibroblasts, which are stromal cells in the gastrointestinal tract. The aim of this thesis was to investigate the effects of Aoc3 on the development of colitis and colorectal carcinogenesis in *in vivo* mouse disease models. In this context, firstly, the genotype of *Aoc3* knockout mice obtained from Turku University, Finland was confirmed. In addition, the changes in *Aoc3* expression in *Aoc3* knockout and wild-type mice were compared. Secondly, the concentration of DSS to be used for Dextran Sulfate Sodium (DSS) colitis model was optimized. Third, an acute colitis model was established and it was observed that *Aoc3* knockout mice were more prone to colitis than wild-type control mice. Fourth, *Aoc3* knockout and wild-type mice were treated with Azoxymethane (AOM), DSS and AOM/DSS combination and their colons were examined for development of inflammation-induced colon cancer at the end of the follow-up period. However, AOM/DSS treatment significantly shortened the survival of *Aoc3* mutant mice, but statistically significant results could not be obtained due to the decrease in the number of subjects. Fifth and finally, *Apc*^{+/-} mutant mice were crossed with *Aoc3* knockout mice and three groups of *Apc*^{+/-} *Aoc3*^{+/+}, *Apc*^{+/-} *Aoc3*^{+/-} and *Apc*^{+/-} *Aoc3*^{-/-} mice were followed up and it was found that there was a statistically significant increase in the number of colonic polyps in *Apc*^{+/-} *Aoc3*^{-/-} mice compared to *Apc*^{+/-} *Aoc3*^{+/+} mice after sacrifice. In conclusion, this study demonstrated that *Aoc3* knockout mice are more susceptible to DSS-induced colitis and colonic tumorigenesis than wild-type mice in an *in vivo* disease model.

Keywords: *AOC3*, Colitis, *APC*, Colorectal Cancer, AOM, DSS

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kolorektal Kanser	3
2.1.1. Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri	3
2.1.2. Karsinogenezin Moleküler Mekanizması	3
2.1.3. Klasik Yolak ve Apc Geni	4
2.1.4. Apc Mutant Fare Modelleri	5
2.2. Kolorektal Kanser ve İnflamasyon	7
2.3. Kript Yapısı ve Epitelyal Hücrelerin Özellikleri	8
2.3.1. İntestinal Kök Hücreler	11
2.4. İntestinal Kök Hücre Nişi	12
2.4.1. Miyofibroblastlar ve Biyobelirteçleri	13
2.5. AOC3 (Bakır içeren amin oksidaz-3)	14
2.6. Aoc3'ün İnflamasyondaki Rolü	16
2.7. Aoc3'ün Kolon Kanserindeki Rolü	17
2.8. Kolit ilişkili Kolon Kanseri Oluşturmak için Uygulanan Kimyasal Ajanlar	19
2.8.1. Dekstran Sülfat Sodyum (DSS)	19
2.8.2. Azoksimetan (AOM)	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23

3.1. Aoc3 -/- ve Apc +/- Farelerin Temini ve Genotiplenmesi	23
3.1.1. Fare Kuyruğundan DNA İzolasyonu	23
3.1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	24
3.1.3. Multipleks PZR	27
3.1.4. Agaroz Jel Elektroforezi	27
3.2. Aoc3 -/- ve WT Farelerin Üretilmesi	27
3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması	28
3.4. DSS Konsantrasyonu Belirlemek için Yapılan Pilot Deney	28
3.5. Akut Kolit Modeli Oluşturulması	28
3.6. Deney Gruplarına Azoksimetan (AOM) ve DSS uygulaması	29
3.7. Distal Kolondan RNA İzolasyonu ve Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR	30
3.8. BrdU (5 Bromo 2' Deoxyuridin) Boyaması	32
3.9. İstatistiksel Analiz	32
4. BULGULAR	33
4.1. Aoc3 -/- Homozigot Farelerin Genotiplerinin Doğrulanması	33
4.2. Aoc3 -/- ve WT Farelerin Üretilmesi	35
4.3. Deney Gruplarının Oluşturulması	37
4.4. DSS Konsantrasyonu Optimizasyonu	38
4.5. Akut Kolit Modeli Oluşturulması	44
4.6. Aoc3'ün Kolit ilişkili Kolon Kanserindeki Etkisinin Araştırılması	47
4.7. Apc +/- Arka Planında Aoc3'ün Kolon Tümörü Gelişimi Üzerine Etkisi	52
5. TARTIŞMA	59
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	64
7. KAYNAKLAR	65
8. EKLER	77
EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri	
EK-2: Turnitin Ekran Görüntüsü	
EK-3: Dijital Makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	81

SİMGELER ve KISALTMALAR

ACTB	β -actin
AOC3	Bakır içeren Amin Oksidaz-3
AOM	Azoksimetan
APC	Adenomatöz Polipozis Koli
CBC	Crypt-base columnar cells
CD	Chron's Hastalığı
cDNA	Komplementer DNA
CIMP	CpG adası metilatör fenotipi
COX	Siklooksijenaz
CRISPR/Cas9	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9
Ct	Cycle Threshold
DSS	Dekstran Sülfat Sodyum
ENU	Etilnitrosourea
FAP	Familyal Adenomatöz Polipozis
FFPG	Formalinle Fikse Parafine Gömülü
H&E	Hematoksilen ve Eozin
İBH	İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları
İKH	İntestinal Kök Hücreler
kDa	Kilodalton
KRK	Kolorektal Kanser
LGR5	Leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5
LOX	Lipoksijenaz
MAM	Metil Azoksimetanol
Min	Çoklu Bağırsak Neoplazisi
NF-kB	Nükleer Faktör Kappa B
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qPCR	Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
UC	Ülseratif Kolit
VAP1	Vasküler Adhezyon Protein-1

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Kromozomal instabilite için adenom-karsinom dizilim modeli	4
2.2. Apc geninin 750.kodonunda mutasyon meydana gelen farelerin sekans sonucu	6
2.3. İntestinal kök hücre nişi	9
2.4. Miyofibroblast ve Fibroblast kültürlerinin mikrodizin gen ifadesi profili	14
2.5. Aoc3 geninin yapısı ve genotiplerin Southern Blot ve PZR ile doğrulanması	15
2.6. Kan-Doku arasındaki lökosit trafiğinde Aoc3'ün rolü	16
2.7. Kolon kansinomu desmoplastik stromasında AOC3 ifadesi	18
2.8. DSS ile indüklenen kolit oluşumu	20
2.9. Kolon Kanserinin AOM Modeli	21
3.1. Aom (10mg/ml) ve DSS uygulaması	29
4.1. C57BL/6 Homozigot 4 erkek farenin genotiplerinin agaroz jeldeki görüntüsü	33
4.2. WT ve Aoc3-/- farelerin kantitatif gerçek zamanlı PZR analiz sonucu	34
4.3. Deney gruplarının oluşturulması	35
4.4. Het x Het çiftleşmesinden doğan 36 Dişi (D), 28 Erkek (E) farenin genotipi	36
4.5. WT ve Aoc3-/- farelerin proksimal kolonlarının H&E boyaması	37
4.6. Deney gruplarının 6.günlük vücut ağırlığı takibi	39
4.7. Farklı konsantrasyonlarda DSS uygulanan farelerin kolon uzunluklarının morfolojik analizi	40
4.8. Farklı konsantrasyonlarda DSS uygulanan farelerin ortalama kolon uzunluklarının karşılaştırması	41
4.9. DSS uygulanan deney gruplarının kesit görüntüleri	43
4.10. WT ve Aoc3-/- farelerin histolojik aktivite indeksleri	44
4.11. Akut Kolit oluşturmada 9 günlük vücut ağırlığı takibi	45
4.12. Ortalama 4.günde başlayan rektal kanama görüntüsü	45
4.13. Akut kolit modeli Sağkalım analizi	46
4.14. Deney gruplarının 14 haftalık vücut ağırlığı takibi	47
4.15. Deney gruplarının 14 haftalık sağ kalım analizi	48

4.16. Yalnız DSS ve AOM/DSS uygulanan farelerin kolon polip dağılımları	49
4.17. Distal Kolon Makroskopik Görüntüsü	50
4.18. AOM/DSS uygulanan WT ve Aoc3 ^{-/-} fare kolonlarının H&E boyaması	51
4.19. Apc ^{+/-} arka planında Aoc3 ^{+/+} , Aoc3 ^{+/-} ve Aoc3 ^{-/-} farelerin elde edilmesi	52
4.20. Apc ve Aoc3 genotiplenmeleri sonucunda elde edilen jel görüntüleri	53
4.21. Apc ^{+/-} Aoc3 ^{-/-} (A-B) ve Apc ^{+/-} Aoc3 ^{+/+} (C-D) Makroskopik Görüntüleri	54
4.22. Apc ^{+/-} arka planında Aoc3 ^{+/+} , Aoc3 ^{+/-} ve Aoc3 ^{-/-} farelerin intestinal ve kolondaki polip dağılımları	55
4.23. Apc ^{+/-} Aoc3 ^{-/-} ve Apc ^{+/-} Aoc3 ^{+/+} farelerinde gastrointestinal sistemin H&E ve ince bağırsak adenomalarının BrdU boyaması	57

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
3.1. Aoc3 Gen Bölgesinin WT Sekansı için PZR Reaksiyonu	25
3.2. Aoc3 Gen Bölgesinin Neo-R Sekansı için PZR Reaksiyonu	25
3.3. Aoc3 PZR programı	25
3.4. Apc Gen Bölgesinin PZR Reaksiyonu	26
3.5. Aoc3 PZR programı	26
3.6. Multipleks PZR Reaksiyonu	27
3.7. cDNA Sentezi Reaksiyon Bileşenleri	31
3.8. cDNA PZR Programı	31
3.9. Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR için Kullanılan Primer Sekansları	31
3.10. Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR Reaksiyon Koşulları	31
3.11. Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR Programı	32
4.1. Kantitatif gerçek zamanlı PZR ortalama Ct değerleri ve standart sapmaları	34
4.2. Kontrol ve Deney Grupları	37
4.3. Pilot Deney için Deney Grupları	38
4.4. Farklı konsantrasyonlarda DSS uygulanan farelerin ortalama kolon uzunlukları	40
4.5. Kolit Şiddetini Değerlendirmek Amacıyla Kullanılan Histolojik Parametreler ve Skorlar	42
4.6. Apc +/- Aoc3-/-, Apc +/- Aoc3 +/- and Apc +/- Aoc3 +/- farelerde intestinal ve kolon poliplerinin ortalama sayısı	56

1. GİRİŞ

Kolorektal kanser dünya genelinde en yaygın görülen üçüncü kanser türüdür. Bu kanser kromozomal instabilite, mikrosatellit instabilite ve CpG adalarının metilasyonu veya hepsinin birlikte gerçekleşmesiyle meydana gelmektedir. Kromozomal instabilite kolorektal kanserin klasik yolağı olarak da bilinmekle birlikte birçok genin ardı ardına mutasyonu ve bazı yolların ifadelerindeki değişimlerle karakterize edilmektedir. İlk meydana gelen mutasyon APC tümör baskılayıcı geninde olmakla birlikte bu mutasyon Wnt sinyalinin aktivasyonuna neden olmaktadır. Mutasyonların birikmesi ile birlikte normal dokudan sırasıyla adenom ve karsinom gelişimi meydana gelmektedir.

Kolon kanseri birçok faktör aracılığıyla gerçekleşebileceğı gibi bu etkenlerden bir tanesi de inflamasyondur. İnflamasyon ilişkili kolon kanseri gelişiminde sıralama ve mutasyon meydana gelen genlerin yerleri değişiklik göstermektedir. Mukozada meydana gelen uzun süreli inflamasyon sonucunda inflamatuvar bağırsak hastalıkları gelişmektedir. İnflamasyon sırasında ilk olarak epitelyal bariyer hasar görmekte ve mukozal epitelden kript lümenine nötrofil çıkışı sağlanmaktadır. İnflamasyon sırasında kript yapısında ve mikroçevresinde pek çok değişiklik meydana gelmektedir. Bunlardan bir tanesi intestinal kök hücre nişini oluşturan Stromal hücrelerden miyofibroblastlardır.

Miyofibroblastlar intestinal dokuda hasar meydana geldikten sonra iyileşmenin gerçekleşmesi için önemli rol oynamaktadır. Miyofibroblastların inflamatuvar bağırsak hastalıklarında ve kolorektal kanserdeki rolünü araştırmak için pek çok çalışma yapılmıştır. Miyofibroblastlar oldukça heterojen dağılıma sahiptir. Tanımlanmasında kullanılan pek çok farklı biyobelirteç bulunmaktadır. Bunlar arasında bu tez çalışması kapsamında da araştırılan AOC3 bu hücre grubuna spesifik biyobelirteçlerden birisidir. AOC3 (Bakır içeren amin oksidaz-3) aynı zamanda VAP-1 (Vasküler adezyon proteini-1) olarak da bilinmektedir.

AOC3 kromozom 17 üzerinde yer alan bir gen olmakla birlikte adipositler, perisitler, endotelyal, düz kas ve miyofibroblast hücreleri tarafından ifade edilmektedir. AOC3'ün hem doku bağımlı hem de soluble formu bulunmaktadır.

Adhezyon fonksiyonu sayesinde normal şartlarda intraselüler vezikül içerisinde yer alan AOC3 herhangi bir hasar olduğunda vezikül dışına çıkarak endotel hücre membranına bağlanır ve hasarlı bölgeye lökosit akışını sağlayarak lökosit üzerindeki AOC3 reseptörleri sayesinde birbirleriyle bağlantı kurarlar. Böylece hasar meydana gelen bölgeye lökosit akışını düzenleyerek inflamasyona katkı sağlamaktadır. Enzimatik fonksiyonu sayesinde ise bu amin oksidaz aldehit, reaktif oksijen türleri ve amonyağa dönüşerek inflamasyonun şiddetini artırmaktadır. AOC3'ün inflamasyonu artırmasından dolayı birçok ilaç firması AOC3 inhibitörleri geliştirmiştir.

İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında ve kolorektal kanserde AOC3 ifadesini araştıran pek çok çalışma yapılmıştır. AOC3 inhibitörü uygulanan çalışmalarda ise inflamasyonun azaldığı gösterilmiştir.

Kolon kanserinde AOC3 ifadesi araştırıldığında ise intestinal miyofibroblastlar tarafından ifade edilen AOC3'ün hastalığın prognozu ile birlikte azalmaya başladığı gözlenmiştir. Sonuç olarak inflamatuvar bağırsak hastalıklarında hem soluble hem de membran bağımlı formunda AOC3'ün ifadesinde artış meydana gelirken, kolorektal kanserde hastalığın ilerlemesi ile birlikte AOC3 ifadesinde azalma olduğu açığa çıkarılmıştır. Ancak tüm bunlar altında yatan mekanizma tam olarak bilinmemektedir.

Bu tez çalışması kapsamında, Aoc3 mutant farelere kolit ilişkili kanser geliştirmede kullanılan Azoksimetan, Dekstan Sülfat Sodyum gibi genotoksik ve kimyasal ajanlar uygulandı. Böylece inflamasyon ve kolon kanseri süreçlerinde AOC3 ifadesinin yokluğu nasıl bir etki gösterecek araştırıldı. Aynı zamanda akut kolit modeli oluşturulacak ve yine AOC3'ün kolit modeli üzerindeki etkisi incelenecektir. Son olarak 2018 yılında laboratuvarımızda üretilmiş olan Apc mutant fareler ile Aoc3 mutant fareler çaprazlandı. Hem Apc mutasyonu hem de Aoc3 mutasyonu taşıyan farelerin kontrol gruplarına göre geliştirdiği tümör sayısı, dağılımı ve sağkalım üzerindeki etkisi araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kolorektal Kanser

2.1.1. Epidemiyolojisi ve Risk Faktörleri

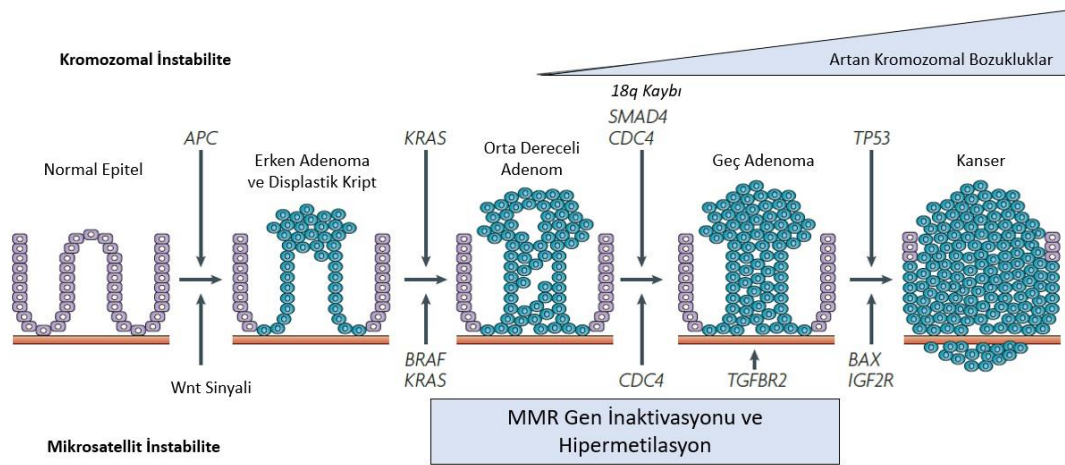
Kolorektal kanser (KRK) yaygın ve ölümcül bir hastalıktır. Dünya genelinde erkekler arasında en yaygın üçüncü kanser iken kadınlar arasında en yaygın ikinci kanser türüdür (1,2). KRK risk faktörleri arasında genetik ve çevresel birçok etken bulunmaktadır. Aile ve kişisel öyküsü (inflamatuar bağırsak hastalığı, şeker hastalığı, kolon polipleri, kolesistektomi), yaşam tarzı (alkol ve sigara tüketimi, diyet) ve yaş, ırk, sosyoekonomik faktörler ve bağırsak mikrobiyotası KRK riskinin artışında oldukça önemlidir (3,4).

2.1.2. Karsinogenezin Moleküler Mekanizması

Kolorektal kanser temelde kromozomal instabilite, CpG adası metilatör fenotipi (CIMP) ve mikrosatellit instabilite gibi 3 farklı mekanizmanın kombinasyonu veya tek tek meydana gelmesiyle oluşur. Klasik yolak olarak da kabul edilen kromozomal instabilite yolağı KRK vakalarının %80-85'ini oluşturmaktadır (5). Klasik yolak Adenomatöz Poliposis Koli (APC) mutasyonu ile başlar. Tümör baskılayıcı gen olan APC'de meydana gelen fonksiyon kaybı sonucunda hücre kontrolsüz bir şekilde büyümeye ve bölünmeye başlar. Daha sonra bu değişimi KRAS onkogeninin aktivasyonu ve p53'ü kodlayan TP53 tümör baskılayıcı genindeki mutasyonlar takip eder (6,7). Mikrosatellit instabilite DNA onarım mekanizmalarının kaybına bağlı olarak gelişir. Tekrarlanan kısa DNA dizisini onarma yeteneğı mikrosatellit kararsızlığı olan tümörlerde azalır. Bu tümörlerde sık mutasyona uğrayan genler arasında MLH1, MSH2, MSH6, PMS1 ve PMS2 yer almaktadır (8,9). CpG adalarının metilasyonu da KRK'nın gelişmesinde yer almaktadır. Tümör baskılayıcı genlerin promoterlarındaki CpG adalarının metillenmesi transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasına engel olur. Bu genlerin transkripsiyonel olarak susturulması da KRK gelişiminde önemli rol oynamaktadır (10).

2.1.3. Klasik Yolak ve Apc Geni

Klasik yolak daha çok tümörlerde anöploidi ve heterozigosite kaybına neden olan kromozom sayısındaki bozukluklar ve moleküler değişimlerle ilişkilidir. Bu yolakta yer alan tümör baskılayıcı genlerin ve onkogenlerin art arda mutasyona uğraması sonucunda hücreler düzensiz olarak çoğalmaya ve tümör gelişimine neden olmaya başlar. Bu genler arasında *APC*, *KRAS*, *PIK3CA*, *TGF-β* ve *TP53* yer almaktadır (11,12).



Şekil 2.1. Kromozomal instabilite için adenom-karsinom dizilim modeli. (Walther, A ve ark. (65)'den alınmıştır.)

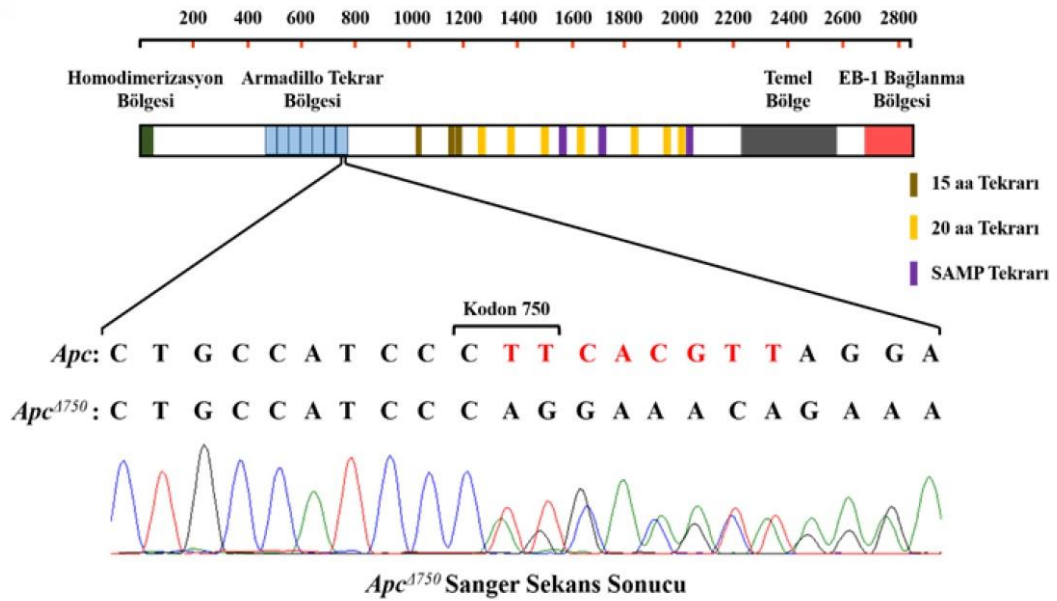
APC, tümör baskılayıcı bir gendir. 21 ekzona sahip olan bu gen kromozom 5 üzerinde yer almakta ve 310kDa protein kodlamaktadır (13,14). *APC* mutasyonları germline veya somatik gelişebilir. Germline mutasyonlar familial adenomatous polyposis (FAP) gelişimine neden olurken, somatik *APC* mutasyonları sporadik tümör gelişimine neden olur (15). Aynı zamanda kodlanan *APC* multi domain bir protein olup hücre migrasyonu, adhezyonu, proliferasyonu, diferansiyasyonu ve kromozom segregasyonu gibi birçok hücresel proseste yer almaktadır (16).

2.1.4. Apc Mutant Fare Modelleri

APC'nin fonksiyonlarını araştırmak için günümüze kadar birçok fare ve sıçan modeli yapılmıştır. Çoklu bağırsak neoplazisi (Min) olarak tanımlanan fare modeli etilnitrosourea (ENU) mutajenez taramasında ortaya çıkmıştır. *Apc*^{Min/+} fareleri ilk 1990 yılında kodon 851'de anlamsız kodona yol açan bir mutasyon içermesiyle oluşturulmuş ve *APC*'nin tümör baskılayıcı fonksiyonlarını araştırmak için birçok çalışmada kullanılmıştır. Ancak bu model ince bağırsakta polip içermesi ve iyi huylu adenomlar oluşturmasından dolayı birçok sınırlamaya sahiptir. Daha sonra birçok farklı *Apc*^{Min/+} fare üretilmiştir. Bu farelerle farklı sayılarda ve bağırsak üzerinde farklı dağılımlarda adenom (polip) geliştirilmiştir. Bu fare modelleri sayesinde kolon tümörü oluşmasında yer alan önemli yolaklar keşfedilmiş ancak birçok cevapsız soruda açığa çıkmıştır. Bunlar arasında farklı laboratuvarlarda aynı model analiz edilmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı fenotipik farklılıklar gözlenmiştir. Bu durum yabanıl ve *Apc* kayıp oranlarının farklılığı, Wnt sinyal yolağında meydana gelen farklılıklar, çevresel faktörler ve kullanılan teknolojiler ile açıklanmaya çalışılmıştır. Ayrıca C57BL6 farelerde *APC* geninin 15 ekzonunun silindiği bir model daha oluşturulmuş ve intestinal polip dağılımlarının *Apc*^{Min/+} farelerle aynı olduğu gözlemlenmiştir (17-20).

Son zamanlarda gelişen genom düzenleme teknolojileri kolon kanseri araştırmalarında önemli bir rol oynamaktadır. Bu teknolojiler sayesinde rneğin; CAC-Cre veya CDX2-Cre transgenlerinin ifadesiyle *APC*'nin inaktive edildiği yeni modeller yapılmıştır (21,22). Bu modellerin kolon spesifik polip geliştirmeleri en büyük avantajlarıdır. Ancak yine de insan kolon kanserine benzerliği az olup polip geliştirme sıklıkları düşüktür. O yüzden insan KRK vakalarını daha fazla yansıtacak olan kolona özgü polip geliştiren *Apc* fare modellerinin oluşturulmasına yönelik çabalar oldukça önemlidir (23).

H.Ü. Transgenik Hayvan Teknolojileri U.A. Merkezi'nde 2018 yılında TÜBİTAK 1001 projesi (Proje no: 215S926) kapsamında CRISPR/Cas9 yöntemi kullanılarak *Apc* geninin 16.ekzonunda, 750.kodondan itibaren 8 nükleotid delesyonu sonucu çerçeve kayması mutasyonuna sahip *Apc*^{+/-} mutant fareler üretilmiştir (24,25).



Şekil 2.2. *Apc* geninin 750.kodonunda mutasyon meydana gelen farelerin sekans sonucu. (Uzun S ve ark. (25)'ten alınmıştır.)

Mutasyon meydana getirilen fare ırkı FVB/N olup bu farelerin az polip geliştirip uzun süre yaşadıkları gözlemlendikten sonra C57BL/6J ırkına geri çaprazlanmıştır. Geri çaprazlama sonucunda farelerin polip sayısında artış gözlenmiştir. Bu tez kapsamında da C57BL/6J *Apc* mutant fareler kullanılmıştır.

2.2. Kolorektal Kanser ve İnflamasyon

İnflamatuvar bağırsak hastalığına (İBH) sahip hastaların kolon kanseri olma riski oldukça yüksektir (26). Ülseratif Kolit (UC) ve Chron's hastalığını (CD) içeren inflamatuvar bağırsak hastalıkları tüm gastrointestinal sistemi etkileyen kronik tedavi edilemeyen bir hastalıktır (27). İnflamatuvar bağırsak hastalığına sahip hastalarda KRK gelişimi için genetik ve epigenetik değişikliklerin olması gerektiğini bilmekteyiz. Sporadik KRK ve Kolit ilişkili KRK gelişiminde benzer genetik değişiklikler meydana gelmektedir. Bu benzerlikler arasında tümör baskılayıcı genlerin inaktive edilmesi, onkogenlerin aktive edilmesi ve genetik instabilite yer almaktadır. Ancak bu değişikliklerin meydana gelme sıklığı ve zamanlamaları birbirlerinden farklıdır. Örneğin; APC mutasyonu kolit ilişkili KRK'da sporadik KRK'ya göre daha az sıklıkta ve sıralama olarak da daha sonra meydana gelmektedir. Ayrıca sporadik KRK'da sıralama; normal mukoza, adenoma, displazi ve karsinoma şeklinde iken, kolit ilişkili KRK'da sıralama; inflamasyon, displazi ve karsinoma şeklindedir (28,29).

Mukozada meydana gelen kronik inflamasyon inflamatuvar bağırsak hastalıklarına ve daha sonra karsinom gelişimine neden olmaktadır. İnflamasyon şiddeti ve hastalığın süresi karsinom gelişiminde oldukça etkilidir. Çünkü kronik inflamasyon oksidatif stresin, epitelyal hücre proliferasyonunun ve angiyojenizin artmasını destekleyerek tümörogeneze katkı sağlamaktadır (30,31). Bu süreçte inflamasyona bağlı kanser gelişimini engellemek amacıyla kullanılan anti-inflamatuvar ilaçlar oldukça önemlidir (32). İnflamasyonda immün hücreler, inflamatuvar hücreler, kemokinler, sitokinler ve siklooksijenaz (COX), lipoksijenaz (LOX) gibi birçok pro-inflamatuvar mediatörler rol oynamaktadır. Tüm bu bileşenler tümör hücrelerinin çoğalmasını, büyümesini ve invazyonunu etkileyebilmektedir. Pro-inflamatuvar mediatörler ve reaktif oksijen/nitrojen türleri KRK gelişiminde önemli rol oynamaktadır. O yüzden COX inhibitörleri, COX-LOX inhibitörleri, iNOS inhibitörleri gibi anti-inflamatuvar ajanlar ve sentetik ajanlar kullanılarak inflamasyon ve KRK baskılanabilir (33,34).

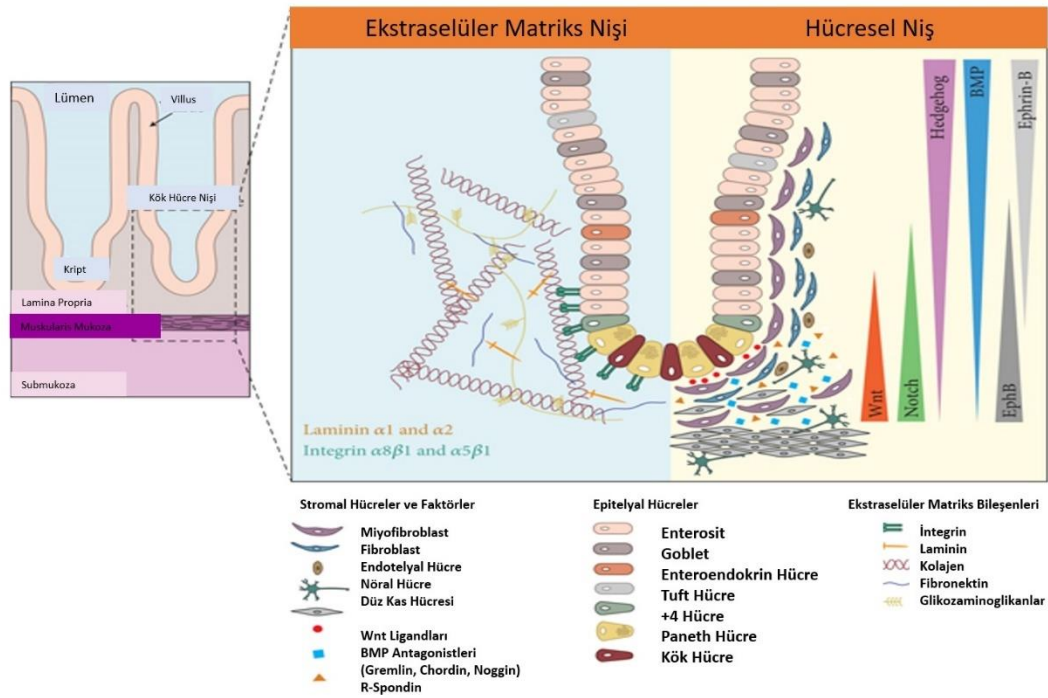
İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında genetik yatkınlık, çevresel faktörler, bağırsak mikrobiyotası ve bağışıklık tepkileri önemli rol oynamaktadır (35).

Günümüzde İBH'nin etiyojisi çok iyi bilinmemektedir. Ancak çeşitli savunma mekanizmaları İBH'nin neden olduğu enfeksiyonları en aza indirmeyi amaçlamaktadır. Bunun için gastrointestinal sistemin özelliklerini ve hücre karakteristiklerini iyi anlamak, İBH'larında yer alan biyomoleküler mekanizmaların tanımlanmasına yardımcı olabilir ve bu tür kronik bozukluklara yönelik tedavilerin geliştirilmesinde yeni fikirlerin ortaya çıkmasına olanak sağlayabilir (36,37).

2.3. Kript Yapısı ve Epitelyal Hücrelerin Özellikleri

Gastrointestinal kanal mukoza, submukoza, muskularis eksterna ve seroza olmak üzere dört tabakadan oluşmaktadır. En iç tabaka olan mukoza epitel, lamina propria ve muskularis mukoza olmak üzere üç tabakadan oluşur (38). Bağırsak epiteli, tek katmanlı basit bir epitel yapısına sahip olmasına rağmen maruz kaldığı mekanik, kimyasal ve biyolojik hasarlara karşı oldukça dayanıklıdır. Kriptleri oluşturan epitel hücreleri kript tabanındaki kök hücrelerin sürekli bölünmesiyle yenilenir. Bu hücreler özelleşmiş epitelyal ve mezenkimal hücreler tarafından beslenir, korunurlar ve birlikte bağırsak kök hücre nişini oluştururlar. Bağırsak kök hücreleri ve erken progenitör hücreler, sınırlı niş alanı ve dolayısıyla köklüğü koruma veya yeniden kazanma yeteneği için rekabet eder. Bunu yapamayan hücreler, altı farklı olgun hücre tipinden birine farklılaşır ve villusa doğru yukarı doğru hareket ederek 3-5 gün sonra bağırsak lümenine dökülürler (39).

İnflamatuar bağırsak hastalıklarında histopatolojik olarak mukozal yapı ve lamina propriada hücresel anormallik gözlenir. Hastalığın aktivitesi nötrofil granülosit infiltrasyonu ve epitel bariyerin hasarı ile ölçülmektedir. Tanı koyma aşamasında histolojik olarak hastalığın zamanı ve aktivitesi oldukça önemlidir. Erken teşhis ve uzun süre devam eden hastalık karşılaştırıldığında mikroskopik görünümünde farklılıklar ortaya çıkmaktadır. Yine çocukluk çağında başlayan İBH histopatolojisi ile yetişkin yaşta başlayan İBH arasında da farklılık gözlenmektedir (40). Hastalığın histolojik aktivitesi değerlendirilirken inflamasyon şiddeti, ülserasyon, kript hasarı gibi parametrelere dikkat edilmektedir.



Şekil 2.3. İntestinal kök hücre nişi. (Meran, L ve ark. (47)'dan alınmıştır.)

Doku hasarı sonucunda inflamatuvar yanıt aşamasında birçok hücre tipi koordineli şekilde çalışmaya başlamaktadır. Yaralanan bölgeye gelen ilk hücre tipi nötrofillerdir. Daha sonra monositler, lenfositler (NK hücreleri, T hücreleri ve B hücreleri) ve mast hücreleri gelmektedir. Monositler makrofajlara ve dendritik hücrelere de farklılaşabilir ve hasarlı dokulara alınabilirler (41-43). Aktive edilen mast hücreleri, sitokinler, kemokinler, histamin, proteazlar, prostaglandinler, lökotrienler ve sergilisin proteoglikanlar dahil olmak üzere çeşitli inflamatuvar araçları serbest bırakırlar (44). İnflamasyon uyarısı sonucunda hasarlı bölgeye hücre alımı gerçekleştikten sonra immün hücreler lokal inflamatuvar mediatörleri hasarlı bölgeye çağırmaı artırmakta ve devam ettirmektedir (45,46).

Bağırsak epiteli, kript- villus yapısında birden fazla hücre grubunun rol oynadığı tek bir tabakadan oluşur. Kript tabanında intestinal kök hücreler (İKH) yer almaktadır ve bu kök hücreler sayesinde epitel dokusu düzenli olarak yenilenmektedir. İntestinal kök hücreler; Enterosit, Goblet, Enteroendokrin, Tuft ve Paneth hücrelerine farklılaşan transit amplifikasyon yavru hücreleri üretmektedir.

Farklılaşan hücrelerin göçü villus ucuna kadar devam etmekte ve burada ölen hücreler lümeneye dökülmektedir. Bu hücreler arasında yer alan Paneth hücreleri ise kripta tabanına doğru göç etmekte ve burada yaklaşık 6-8 hafta kalmaktadır. Stromal hücreler ve epitelyal hücreler arasında Wnt, Notch, Hedgehog, BMP, EphB ve Ephrin-B sinyalizasyonu bulunmaktadır (47-49).

Nükleusları bazala yakın ve mikrovilluslu prizmatik hücreler olan enterositler lümeneden dolaşım sistemine besinlerin taşınmasını sağlayan özelleşmiş absorbtif hücrelerdir. Absorbsiyonun yanı sıra salgılama özelliğine de sahip enterositler su ve elektrolit salgılanması için gerekli enzimleri üretmektedir. Bu sayede sindirim ve absorpsiyonun daha rahat gerçekleşmesi sağlanmaktadır. Aynı zamanda birbirleriyle olan sıkı bağlantılar sayesinde bariyer görevi göstermektedir (50).

Goblet hücreleri intestinal kök hücrelerden farklılaşan epitelyal tabakayı oluşturan kadeh şeklindeki diğer hücre tipleridir. Goblet hücrelerinin temel görevi müküs salgılamak ve koruyucu bir mukus tabakası oluşturmaktır. Notch sinyali enterosit farklılaşmasını kontrol ederken gama-sekretaz inhibe edildiğinde Notch sinyali bloklanır ve Notch sinyalinin nükleusa girmesi engellenir. Bu inhibisyon ve değişim sonucunda goblet hücreleri oluşmaktadır. Bir başka transkripsiyon faktörü olan Spdef ise goblet hücre olgunlaşması için gereklidir. Goblet hücreleri intestinal homeostazın korunmasında da önemli rol oynamaktadır. İnflamatuar bağırsak hastalıklarında goblet hücre sayısı ve boyutları büyük ölçüde azalmaktadır. Ayrıca inflamasyon sonucunda koruyucu mukus bariyeri bozulmakta ve kolit meydana gelmektedir (51-53).

Gastrointestinal sistemin epitelinde dağınık olarak yer alan enteroendokrin hücreleri yemek ile ilgili bir uyarana karşı birçok hormon salgılamaya başlamaktadır. Enteroendokrinler genel olarak salgıladıkları hormonlara göre sınıflandırılırlar. Serotonin gibi bazı hormonlar tüm gastrointestinal boyunca üretilmektedir (54). İnsülin salınımı, sindirim ve absorpsiyonun düzenlenmesi gibi birçok yolağa etki ederek intestinal homeostazı kontrol etmektedir. Enteroendokrin hücrelerin oluşumunda Neurog3 ifadesi oldukça önemlidir. Neurog3 knockout farelerde bu ifade

yokluğunda ince ve kalın bağırsakta enteroendokrin hücrelerin gelişemediği gözlenmişken midede enteroendokrin hücre popülasyonunda azalmaya neden olduğu bulunmuştur. Neurog3 yanı sıra Neurod1, Isl1, PDX1, NKX6 ve NKX2-2'de enteroendokrin için oldukça önemli transkripsiyon faktörleridir (55-58).

Sayıları çok az olan tuft hücreleri ise herhangi bir uyarana karşı İnterlökin-25, prostoglandin E2 ve D2, asetilkolin gibi birçok efektör molekül salgılamaktadır. İnsanda tuft hücreleri sikloosijenaz-1 enziminin ifade edilmesi ile tanımlanabilmektedir. Tuft hücrelerinin inflamatuvar bağırsak hastalıkları ile ilişkisini inceleyen sadece birkaç çalışma vardır (59). İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında interlökin-25 oldukça önemli rol oynamaktadır. Tuft hücreleri de interlökin-25 salgıladığı için bu hücrelerin inflamatuvar bağırsak hastalıklarında potansiyel bir terapötik olabileceği düşünülmektedir. Ancak İBH'de birçok immün hücresi interlökin-25 üretmektedir. Yapılan çalışmalarda tuft hücrelerinin rolü spesifik olarak araştırılmadığı için İnterlökin-25 seviyesindeki bu artışın sebebinin tam olarak Tuft hücrelerinden kaynaklandığı söylenememektedir (60,61).

Kript tabanında yer alan Paneth hücreleri ilk olarak 1872 yılında Gustav Albert Schwalbe tarafından keşfedilmiştir (62). Paneth hücreleri bağırsak epitelindeki önemli salgı hücreleri olmakla birlikte kript yapısının korunmasında da görev almaktadır. Paneth hücrelerinde Wnt sinyalizasyonu önemli rol oynamaktadır. Chron hastalığında Paneth hücrelerinin detaylı analizi yapılmış ve hastalığın bu hücre grubunun hasarıyla ilişkili olduğu gözlenmiştir (63). Paneth hücreleri kript tabanında bulunan ve epitelin düzenli olarak yenilenmesini sağlayan intestinal kök hücrelere yardımcı olan faktörler salgıladığı da bilinmektedir. Paneth hücrelerinin işlevinde meydana gelen bozukluklar kronik inflamatuvar bağırsak hastalığının ilerlemesine katkıda bulunmaktadır (64).

2.3.1. İntestinal Kök Hücreler

İntestinal kök hücreler kript tabanında yer alan ve epitelin düzenli olarak yenilenmesini sağlayan hücrelerdir. Bu kök hücrelerin kriptteki konumları ve davranışları hakkında pek çok farklı hipotez bulunmaktadır. Bunlar hipotezlerden

birisi paneth hücreleri arasında yer alan kript CBC hücreleri tanımlanmasıyla birlikte yapılan bazı araştırmalarda bu CBC hücrelerinin gerçek intestinal kök hücreleri temsil ettiği öne sürülmüştür. Başka bir hipoteze göre ise intestinal kök hücrelerin +4 pozisyonunda bulunduğu ve genellikle terminal olarak Paneth hücrelerine dönüştüğü söylenmektedir (66-68).

İntestinal kök hücrelerin tanımlanması için birçok biyobelirteç önerilse de biline en genel geçer biyobelirteç LGR5'tir. LGR5 hem ince bağırsak hem de kalın bağırsak için biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Lgr5 pozitif CBC'lerin gastro intestinal sistemdeki tüm olgun epitelyal hücreler için multipotent olduğu gösterilmiştir (69). Ayrıca LGR5 kaybı kript yapısının yenilenmesini etkilediği gibi neoplastik süreci de tetiklemektedir.

İnflamasyon sırasında epitel dokunun yeniden onarımında görev alan en önemli hücre topluluğu intestinal kök hücrelerdir. Hayatta kalan tek bir kript kök hücresi sayılarını artırıp kriptin tekrar yenilenmesini hatta yeni kardeş kriptaların oluşmasını sağlayabilmektedir. İnflamatuvar bağırsak hastalıklarında NF- κ B aktivasyonu ile İnterlökin- 1,6,8,12, siklooksijenaz-2, TNF- α ve bFGF gibi birçok faktör ifade edilmeye başlanmaktadır (70). Böylece bağırsak epiteli meydana gelen hasara karşı rejeneratif bir yanıt başlatmaktadır ancak bu yanıt çok kompleks olup kök hücrelerin bu yanıtta kaderi ve proliferasyonun biyolojik sonuçları pek bilinmemektedir (71).

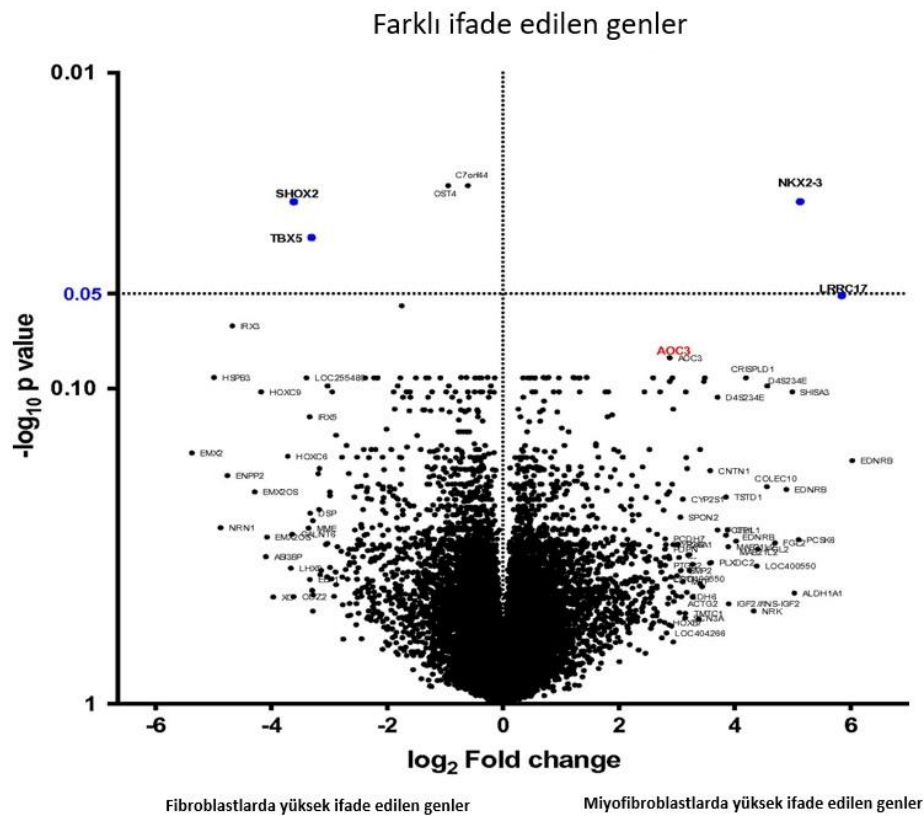
2.4. İntestinal Kök Hücre Nişi

İntestinal kök hücrelerin homeostazını sağlayan kript çevresinde bir mikroçevre bulunmaktadır. Bu mikroçevre ekstraselüler matriks ve hücrel bir nişten oluşmaktadır. Ekstraselüler matriks; kolajen lifleri, integrinler, fibronektin filamentleri, lamininler ve glikozaminoglikanlardan oluşan destekleyici bir ağdan oluşurken, hücrel niş; endotel hücreler, nöral hücreler, perikriptal miyofibroblastlar, fibroblastlar ve düz kas hücrelerinden oluşur (47).

2.4.1. Miyofibroblastlar ve Biyobelirteçleri

Epitel ve muskularis mukoza arasında olan lamina propria mezenkimal hücreler bulunmaktadır. Bu hücre tiplerinden bir tanesi miyofibroblastlardır. Miyofibroblastlar intestinal dokuda herhangi bir hasar meydana gelmesi sonucunda dokunun yenilenmesinde önemli bir role sahip kontraktıl hücrelerdir. Yara iyileşmesi süreçlerinde fibroblastlar miyofibroblastlara farklılaşabilmektedir. Miyofibroblastlar biyobelirteç olarak CD90, vimentin ve α -SMA pozitif iken düz kas hücrelerinden farklı olarak Desmin bakımından negatiftirler (72,73). Subepitelyal miyofibroblastlar epitelyal büyüme, farklılaşmada rol almakta ve aynı zamanda enteroidlerin büyümesini kolaylaştırmaktadır. İnflamatuar bağırsak hastalıklarında miyofibroblastlar matriks metalloproteinazlar (MMP) üreterek ekstraselüler matriksin yeniden şekillenmesinde rol oynar (74,75). Farklı tümörlerin tümör stromasındaki miyofibroblastlar araştırıldığında ise bu hücrelerin heterojenliği ve miyofibroblast miktarındaki farklılıklar göze çarpmaktadır (76). Stromada miyofibroblast sayısındaki artış kötü prognozla ilişkilendirilmektedir (77-81). Bu yüzden tümör ve miyofibroblast arasındaki ilişkisi araştırmak tümörü yok etmek için potansiyel terapötik yollardan birisi olabilir.

Hsia ve ark. tarafından 2016 yılında miyofibroblastları fibroblastlardan ayırt etmek için yapılan çalışma kapsamında tüm genom mikrodizi mRNA-ekspresyon profilleri analiz edilmiş ve bu iki hücre tipi arasında Aoc3, NKX2-3 ve LRRC17 gibi genlerin anlamlı ölçüde farklı ifade edildiği gözlenmiştir (82). Prof. Dr. Aytekin Akyol danışmanlığında 2018 yılında Katipoğlu K. tarafından yapılan tez çalışma kapsamında ise perikriptal ve subepitelyal miyofibroblastlar için immünohistokimyasal olarak tanınmayı sağlayacak biyobelirteçler araştırılmış ve kolon kanseri vakalarında ZEB1, TMEM119, AOC3, PR2D3, MYH11, CD146, CD56'nın ifadelerinin incelenmesine karar verilmiştir. Çalışmanın sonucunda Aoc3 ifadesinin miyofibroblastları fibroblastlardan ayırt etmek için kullanılabilecek potansiyel bir biyobelirteç olduğu gözlemlenmiş ve literatürdeki bilgileri desteklemiştir (83).



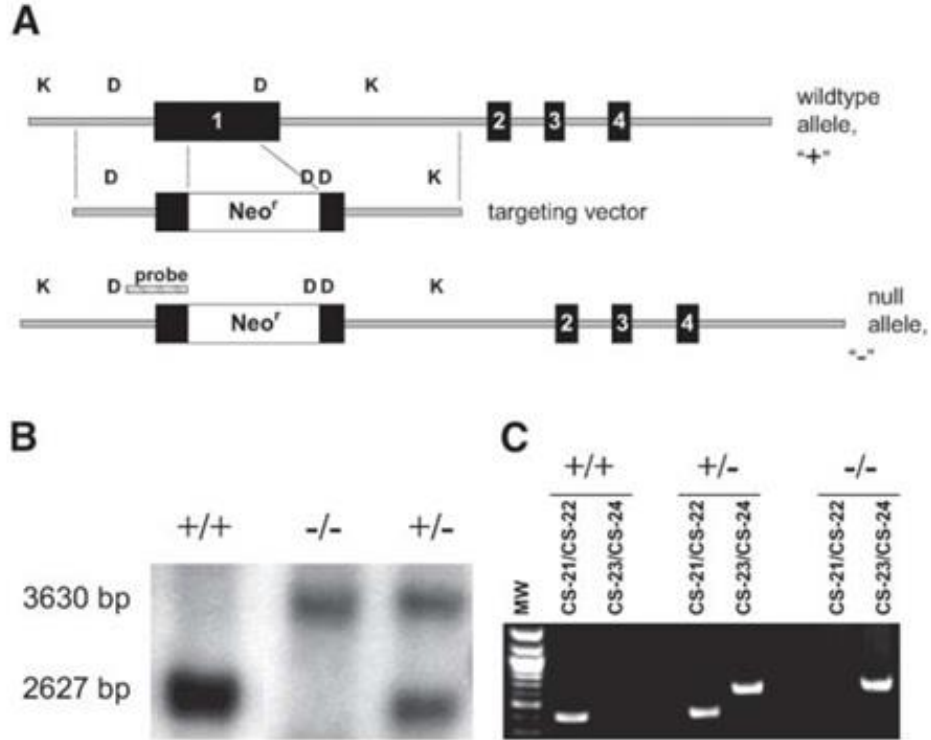
Şekil 2.4. Miyofibroblast ve Fibroblast kültürlerinin mikrodizin gen ifadesi profili.

(Hsia, LT ve ark. (82)'den alınmıştır.)

2.5. AOC3 (Bakır içeren amin oksidaz-3)

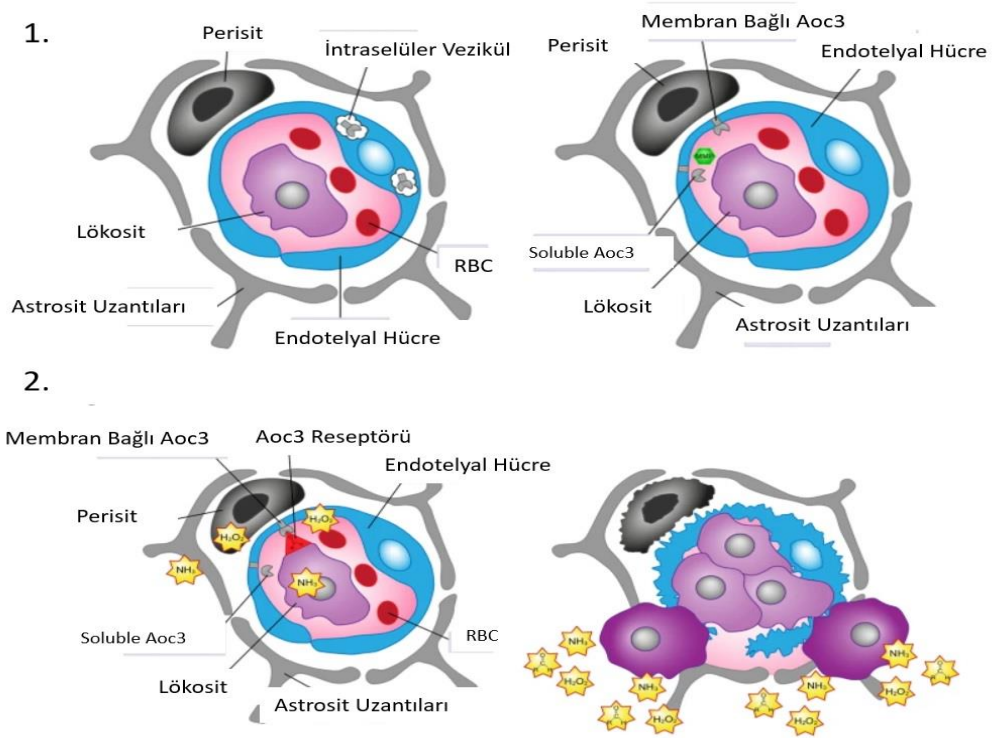
Aoc3 semikarbazid duyarlı amin oksidaz ailesine ait bir primer amin oksidazdır. Vasküler Adezyon protein-1 (VAP-1) olarak da bilinen Aoc3 herhangi bir inflamasyon sonucunda pro-inflamatuar olarak rol oynamaktadır. AOC3 geni 17 kromozomda yer almaktadır. Bu gen, 180 kDa büyüklüğünde kalp şeklinde bakır bağımlı sialize homodimerik glikoproteini sentezlemektedir (84,89). Yaklaşık 90kDa büyüklüğünde olan her bir monomer ise bakır, kalsiyum ve N-asetilglukozamin içermektedir (90). Aoc3 endotelyal, düz kas, adiposit ve perisitler gibi birçok hücre grubunda ifade edilmektedir. Aoc3'ün fonksiyonlarını araştırmak için Stolen ve ark. 2005 yılında Aoc3 homozigot fare üretmiştir. Genin fonksiyonunu bozmak için ilk ekzonuna Neomisin direnç kaseti konulmuştur. Southern Blot ve PZR ile genotip doğrulaması yapılmıştır. Fare ırkı olarak 129S2 kullanılmış ve Aoc3'ün lökosit

trafiğinde rol oynadığını açığa çıkarılmıştır (85). Fareler daha sonra başka araştırma grupları tarafından C57BL/6J ırkına geri çaprazlanmış ve bu tez kapsamında da bu C57BL/6J Aoc3^{-/-} fareler kullanılmıştır.



Şekil 2.5. Aoc3 geninin yapısı ve genotiplerin Southern Blot ve PZR ile doğrulanması (Stolen, CM ve ark. (85)'ten alınmıştır.).

İntraselüler veziküller içerisinde depolanan Aoc3 inflamasyon sırasında hızlıca endotelial hücrelerinin lümen yüzeyine transloke olurlar. Aoc3'ün aynı zamanda soluble formu da bulunmaktadır. Soluble formu ise endotelial yüzeyine bağlanmış Aoc3'ün matris metalloproteinazlar tarafından kesilmesiyle oluşmaktadır (Şekil 2.5.1.). Aoc3'ün oksidasyon sonucunda aldehit, amonyak ve reaktif oksijen türleri açığa çıkmaktadır (91). Endoteldeki Aoc3 lökosit üzerindeki Aoc3 reseptörüne bağlandığında açığa çıkan bu ürünlerde inflamasyonun şiddetini artırmaktadır (Şekil 2.5.2) (86-88).



Şekil 2.6. Kan-Doku arasındaki lökosit trafiğinde Aoc3'ün rolü. (Boyer, DS ve ark. (84)'den alınmıştır.)

2.6. Aoc3'ün İnflamasyondaki Rolü

Aoc3'ün hem adheziv hem de enzimatik bu iki özelliği inflamasyona katkı sağlamaktadır. Bu yüzden inflamasyonda Aoc3 inhibisyonu oldukça önemlidir (92,93). Farede geliştirilen inflamasyon modellerinde Aoc3 inhibisyonun göz, akciğer, romatoid artrit, karaciğer ve inme gibi birçok hastalıkta etkili olduğu gözlenmiştir (94,95). Bu yüzden birçok ilaç firması Aoc3 inhibitörü geliştirmiştir. Bunlar arasında en yaygın kullanılanlardan birisi LJP1207 inhibitörüdür. Bunun yanı sıra birçok fare-insan kimerik monoklonal antikor geliştirilerek Aoc3'ün lökosit trafiğindeki rolü bozulmuştur (96-98). Aynı zamanda pek çok inflamatuvar hastalık modelinde umut vaadeden bir monoklonal olan BTT-1023 tam insan monoklonal antikoruda geliştirilmiştir (99).

Salter-Cid LM ve ark tarafından 2005 yılında yapılan çalışmada SJL/J erkek farelerde oksazolon kaynaklı kolit oluşturulmuş ve semikarbazid duyarlı amin oksidaz (SSAO) inhibitörü olan LJP 1207(10 mg/kg) inhibitörü uygulandığında inflamasyonun azaldığı gözlenmiştir (100). 2020 yılında Cui ve ark. tarafından yapılan çalışma kapsamında ise sigara kullanan inflamatuvar bağırsak hastalığına sahip hastalarda Aoc3 ifadesinin yüksek olduğu gösterilmiştir (101). Özellikle soluble Aoc3 ifadesi ile ilgili çalışmaların bulguları inflamatuvar bağırsak hastalıklarında ve kolorektal kanserde karşılaştırıldığında çok fazla çelişmektedir. Soluble Aoc3 ifadesi inflamatuvar bağırsak hastalıklarında yüksek çıkarken, kolorektal kanserde düşük olarak gözlenmektedir.

2.7. Aoc3'ün Kolon Kanserindeki Rolü

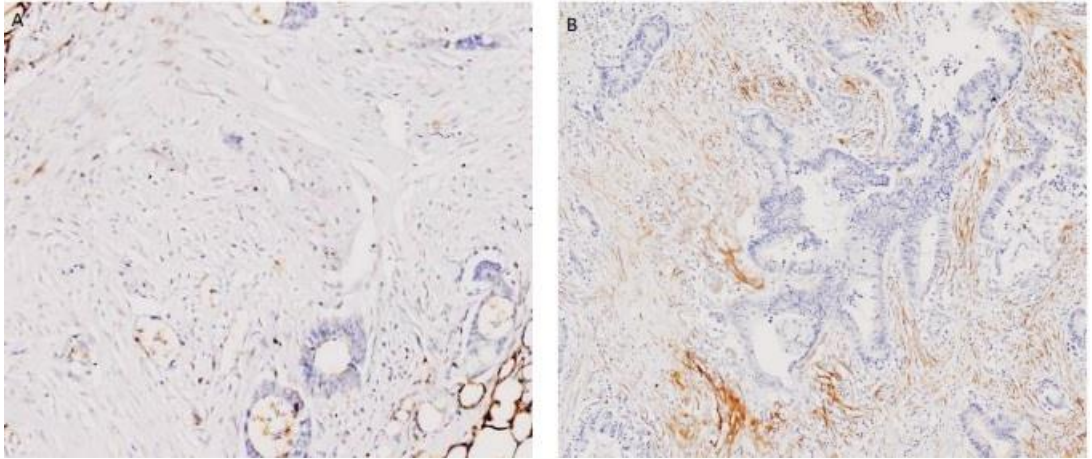
Aoc3'ün inflamatuvar bağırsak hastalıklarındaki (özellikle kolit ilişkili) rolü hakkında çok fazla araştırma olmamasına rağmen kolorektal kanser ile ilişkisi hakkında pek çok yayın bulunmaktadır. Aoc3'ün soluble ve membran bağlı iki formu kanser prognozu ile oldukça ilişkilidir.

2016 yılında Ward ve ark. tarafından yapılan çalışmada Aoc3'ün hem soluble hem de membran bağlı formunun kolorektal kanserdeki ifadesi değerlendirilmiştir. 31 tane KRK tanısı konulmuş olan hastanın serumlarındaki soluble ve membran bağlı Aoc3 seviyesi kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı Western Blot ile gösterilmiştir. Aoc3 seviyesindeki bu azalmanın altındaki moleküler mekanizma tam olarak bilinmemekle birlikte bu durum tümör hücreleri tarafından anti-tümör immün hücrelerinin tümör mikroçevresine alımını önlemek için geliştirdiği bir mekanizma olabilir şeklinde açıklanmıştır (102).

2009 yılında Toiyama ve ark. tarafından yapılan çalışma kapsamında da 100 kolorektal kanserli hasta ve 33 sağlıklı hasta üzerinde soluble Aoc3 seviyeleri ELİSA ile analiz edilmiştir. İlk aşamada soluble Aoc3 seviyesinin kontrole göre yüksek olduğu gözlenirken hastalık ilerledikçe Aoc3 seviyesinde azalma gerçekleşmiştir. Düşük Aoc3 seviyesi olan hastaların prognozunun yüksek Aoc3 seviyesine sahip olanlara göre önemli ölçüde kötü olduğu bulunmuştur (103).

2023 yılında Zawawi ve ark. tarafından yapılan çalışma kapsamında da kanser ilişkili fibroblastlarda ifade edilen Aoc3'deki kolorektal kanserin ilerlemesiyle değişimi araştırılmış ve Aoc3 ifadesinin azaldığı gösterilmiştir (104).

2018 yılında Katipoğlu K. tarafından yapılan tez çalışması kapsamında da Aoc3 ifadesinin kolorektal kanser vakalarındaki kaybı yukarıda verilen birçok araştırmayı desteklemektedir (83).



Şekil 2.7. Kolon karsinomu desmoplastik stromasında AOC3 ifadesi. (Katipoğlu, K (83)'den alınmıştır.).

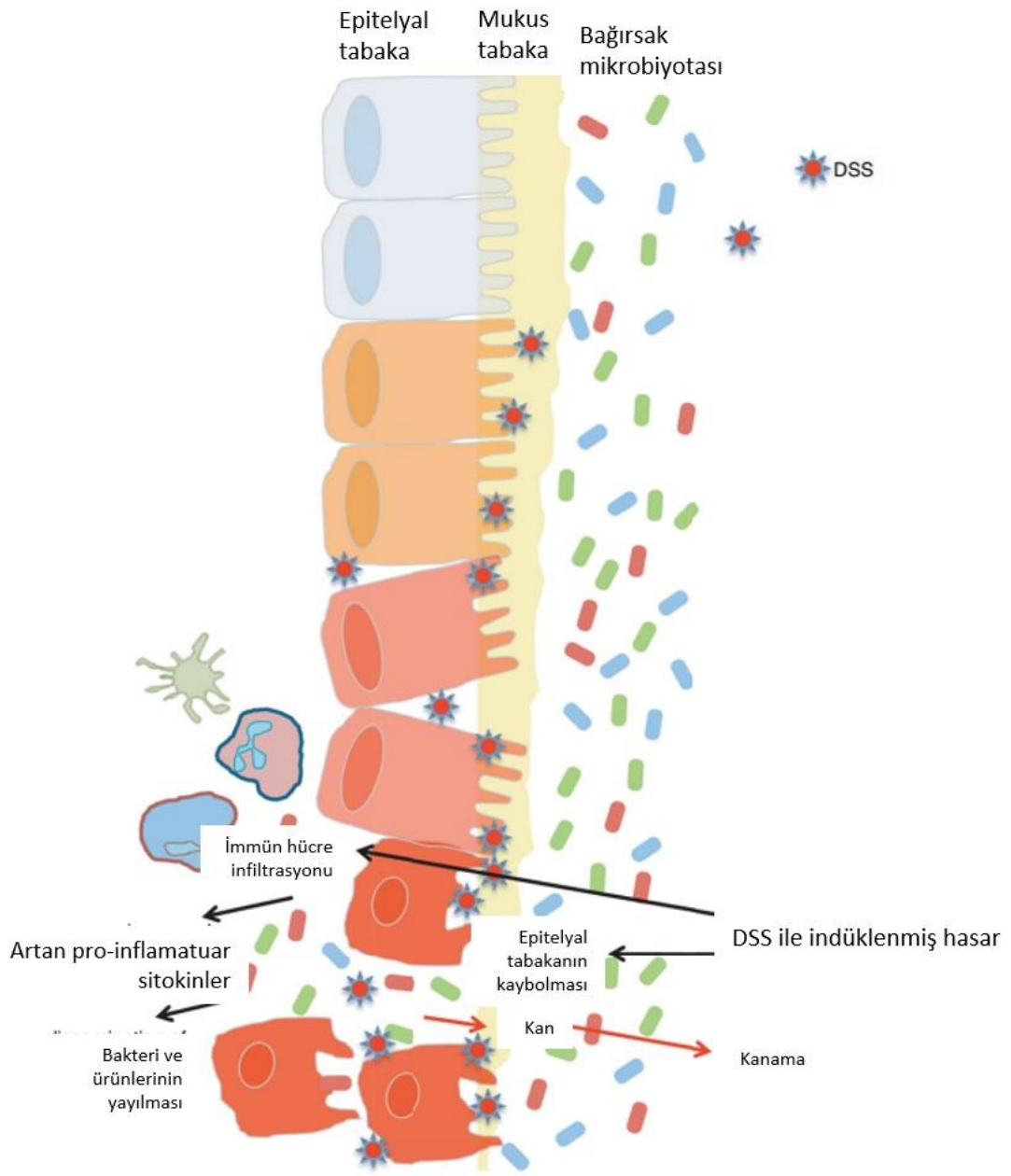
Günümüze kadar bunlar gibi yapılan birçok çalışma KRK'da Aoc3 ifadesinin azaldığı bulgusunu desteklemektedir (105). Aoc3 ifadesi ince bağırsak ve kolon arasında bile farklılık gösterebilir. Normal dokulardaki miyofibroblastların heterojenitesi ve farklılıklar tümör gruplarında da benzer şekilde yansımaktadır (82).

2.8. Kolit ilişkili Kolon Kanseri Oluşturmak için Uygulanan Kimyasal Ajanlar

İnflamasyon ilişkili kolorektal kanser araştırmaları için AOM/DSS kimyasal uygulamaları oldukça yaygındır (106). Dekstran Sülfat Sodyum (DSS), kolon epiteline direk olarak zarar veren kimyasal bir ajandır. İçme suyuna karıştırlarak uygulanan bu kimyasal ajanın inflamasyon geliştirmek için kullanımı oldukça kolaydır. DSS kullanımında süre, verilme siklusu, konsantrasyonu oldukça önemlidir. Tümör gelişimi için en sık kullanılan genotoksik ajanlardan birisi de Azoksimetan (AOM)'dur (107,108). AOM/DSS kombinasyonu ise kolit ilişkili kolon kanseri geliştirmede oldukça maliyeti düşük, uygulaması kolay ve daha kısa sürede tümör geliştirmede önemlidir (109,110).

2.8.1. Dekstran Sülfat Sodyum (DSS)

DSS suda çözünür bir bileşik olup suyla karıştırdığında berrak bir görüntü olur. DSS konsantrasyonu kolit oluşturmakta oldukça önemlidir. 36-50 kDa arasında bir uygulama kolonda hasar meydana getirmek için yeterlidir. Akut kolit oluşturmak için yüksek dozda ancak kısa süreli DSS uygulanırken, kronik inflamasyon için düşük dozda ancak tekrarlı DSS uygulamaları yapılmalıdır. Ticari olarak satılan her bir DSS farklı ağırlıklarda ve etkinlikleri farklı olduğu için pilot deney yapmak oldukça avantajlıdır. DSS oda sıcaklığında stabil bir maddedir. Ancak her uygulama sırasında taze hazırlanması oldukça önemlidir. Eğer uygulama sırasında suda bulanıklık meydana gelirse bu suyun içerisinde mikroorganizma geliştiğini ifade etmektedir. Böyle durumlarda suyun hemen değiştirilmesi tavsiye edilir ve hem deney grubu hem de kontrol grubu için otoklavlı su kullanmak avantajlıdır. Su içerisine karıştırlan DSS iyice çözdürülmelidir. Eğer iyi çözdürülmezse fare su kaplarının uç kısmında tıkanıklığa sebep olur ve uygulamayı aksatabilir. Böylece yanlış ve istenilmeyen sonuçlar elde edilebilir (111).



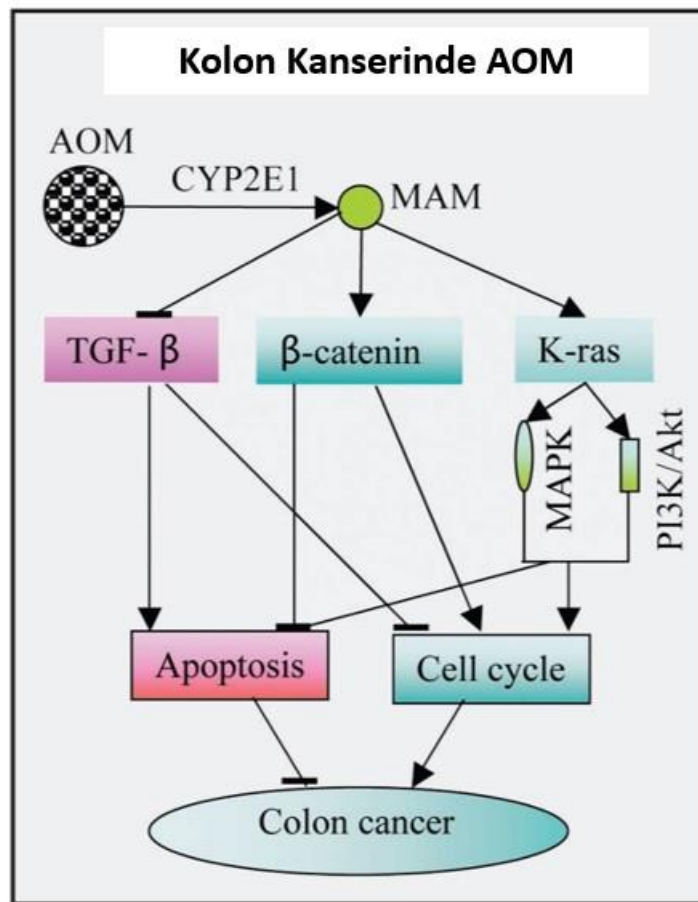
Şekil 2.8. DSS ile indüklenen kolit oluşumu. (Chassaing, B ve ark. (111)'den alınmıştır.)

DSS'nin neden olduğu histolojik değişikliklere bakıldığında ilk olarak epitel tabakanın hasarı meydana geldiği gözlenmektedir. Daha sonra goblet hücrelerinin azalması, kript yapılarının bozulması ve ülserasyon yer almaktadır. DSS epitel bariyeri bozduktan sonra nötrofillerin mukozal epitelden kript lümenine geçmesine neden olur. Bu durum inflamatuvar bağırsak hastalığına sebep olurken aynı zamanda DSS'nin antikoagülkan özelliği kanamanın daha da artmasına ve

inflamasyonun şiddetlenmesine neden olmaktadır. Akut kolit parametreleri olarak kilo kaybı, ishal ve dışkıda kanama gibi belirtiler takip edilebilir (112,113)

2.8.2. Azoksimetan (AOM)

Azoksimetan kolorektal kanser çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. AOM, kullanılan deney hayvanı DNA'sı üzerinde direkt etkiye bulunmamaktadır. İlk olarak metil azoksimetanol (MAM) formuna dönüşmekte ve daha sonra farklı yollar üzerinden (TGF β , K-ras, β -catenin gibi) kolon kanseri gelişimini indüklemektedir (114).



Şekil 2.9. Kolon Kanserinin AOM Modeli. (Chen, J ve ark. (114)'ten alınmıştır.)

AOM, kolonda anormal kript yapısı geliştirerek neoplazi, adenoma ve adenokarsinom gelişimine neden olmaktadır (115). Deney hayvanlarının AOM'a olan duyarlılıkları farklılık göstermektedir. A/J ve SWR/J oldukça duyarlı iken C57BL/6 ve Balb/c orta dereceli duyarlıdır. AKR/J ve 129/SV fare ırkları ise AOM uygulaması

karşısında herhangi bir kolon polipi geliştirmemektedir (116). AOM'un uygulama dozu ve sıklıkları da DSS uygulamasındaki gibi farklılıklar göstermektedir. Vücut ağırlığına göre 10-15 mg/kg konsantrasyonunda enjeksiyon ve 16-36 hafta arasında takip edilen deney hayvanlarının polip geliştirdiği söylenmektedir. Bu durum hayvanın ırkına, doza, sıklığa, takip süresine oldukça bağlıdır (117-120). Suzuki ve ark. tarafından 2006 yılında yapılan çalışmada ise 4 farklı fare ırkına (Balb/c, C3H/HeN, C57BL/6N ve DBA/2N) AOM/DSS kombinasyonu uygulanmıştır. AOM konsantrasyonu olarak 10mg/kg intraperitonel olarak uygulanırken, DSS %1 konsantrasyonunda 4 gün boyunca uygulanmış ve hayvanlar 18 hafta boyunca takip edilmiştir. Balb/c ve C57BL/6N farelerde kolonda tümör gelişirken diğer iki ırkta tümör gelişimi gözlenmemiştir. Ayrıca inflamatuvar değişikliklere bakıldığında C57BL/6N farelerde bu değişikliklerin en az seviyede olduğu bulunmuştur (121) C57BL/6 fare ırkı için en uygun koşullar; 0.günde intraperitonel olarak AOM (10mg/kg)'un enjeksiyonu, 7 gün ara verdikten sonra 8-14.günler arasında 7 günlük ilk periyot %2 DSS uygulaması, 14 gün normal su verildikten sonra 29.günde ikinci periyot ve 50.günde 3.periyodun uygulanması şeklinde verilmektedir. 84.günde ise sağ kalan tüm farelerin sakrifikasyonu gerçekleştirilmektedir. Böylece tüm farelerin distal kolonlarında ortalama 6-10 tümör gelişimi olduğu belirtilmiştir (122-125).

Kolit ilişkili kolorektal kanser araştırmaları için AOM/DSS uygulaması çok yaygın kullanılsa da standart bir model elde etmek çok zordur. İnflamatuvar değişikliklerin meydana gelmesi ve tümör elde etmek; AOM ve DSS'nin konsantrasyonu, tekrarlama sıklığı, takip süresi, fare ırkı gibi pek çok parametreye bağlıdır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Aoc3-/- ve Apc+/- Farelerin Temini ve Genotiplenmesi

Deney gruplarının oluşturulması kapsamında kullanılmak üzere 11. Kromozomu üzerinde yer alan 4 ekzonlu Aoc3 geninin ilk ekzonuna Neomisin kaseti insert edilerek genetiği değiştirilen 4 adet C57BL6 Aoc3-/- erkek transgenik fare Finlandiya'daki Turku Üniversitesi'nden ithal edilmiştir. Gelen farelerin H.Ü. Transgenik Hayvan Teknolojileri Laboratuvarı'na uyumu için yaklaşık 2 hafta beklendikten sonra homozigot olduklarını tespit etmek için genotiplenmeleri yapılmıştır. Apc +/- mutant fareler ise 2018 yılında Hacettepe Üniversitesi Transgenik Hayvan Teknolojileri Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde oluşturulmuş olup 18.kromozom üzerinde yer alan Apc geninin 16.ekzonunda 8 nükleotitlik delesyonu ile çerçeve kayması mutasyonuna sahiptir.

3.1.1. Fare Kuyruğundan DNA İzolasyonu

İzolasyon işlemi için ilk olarak kuyruklar bistüri yardımı ile 1.5-2 cm uzunluğunda kesilerek 1.5 ml ependorf içerisine alınmıştır. Üzerine 600 µl TNES tamponu (10mM Tris-HCl, pH: 7,5 / 400mM NaCl / 100mM EDTA / %0,6 SDS / ddH₂O) ve 35 µl Proteinaz K (10 mg/ml) eklenerek 55°C'deki su banyosunda gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün su banyosundan alınan örnekler 13.000 rpm'de 5 saniye oda sıcaklığında santrifüjlenmiştir. Daha sonra örnekler üzerine 166,7 µl 6M NaCl eklenerek 25 saniye boyunca tüpler kuvvetli bir şekilde çalkalanmıştır. Artık bulanık bir görüntüye sahip olan ependorf tüpler 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sırasında örnek sayısı kadar 700 µl %70 EtOH içeren temiz 1.5 ml ependorf hazırlanmıştır. Santrifüjlenen her bir örneğin süpernatant kısmından 700 µl pipet yardımıyla çekilmiş ve temiz 1.5 ml ependorf tüplere aktarılmıştır. Bu sırada pipet ucunun pelet kısmına temas ettirilmemesine dikkat edilmiştir. Çekilen süpernatant örneklerin üzerine tek tek 700 µl %100 EtOH eklenerek ependorflar ters düz edilmiş ve ipliksi DNA yapısı ışık altında gözlenmiştir. Gözlemlenen ipliksi DNA yapısı kapiller tüplerin (Kimble Chase 34500-99) ependorf içerisine obrik daldırılması

ve etrafında döndürülmesiyle alınmıştır. Kapiller tüplerin yardımıyla alınan DNA örnekleri %70 EtOH içerisinde bir iki kez yıkanmış ve temiz bir 1.5 ml ependorf içerine alınarak kapiller tüplerin biraz kurummasına izin verilmiştir. Daha sonra her bir kapiller üzerine 300 µl LoTE tamponu (3Mm Tris-HCl, pH:7,4 / 0.2mM EDTA / ddH₂O) eklenmiş ve LoTE eklendikten sonra kapillerden DNA'nın ayrıldığı ışık altında gözlemlenmiştir. İki örnekte 55°C'deki su banyosuna 10 dakika bırakılmış ve inkübasyon sonunda örnekler hafif vortekslenip santrifüjlenmiştir. PZR için kullanılmaya hazır fare DNA örnekleri -20 °C'ye kaldırılmıştır.

3.1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

İzolasyon sonrası Aoc3 gen bölgesinin WT sekansını çoğaltmak için uygun primer olan CS-21: 5' GCCCACAAGGAAGAAGACAC 3' ve CS-22: 5' CAAACACCAGGGACAGAACC 3' kullanılırken, Neo-R sekansını çoğaltmak için CS-23: 5' GGCTGCTGATCTCGTTCTTC 3' ve CS-24: 5' TCTGGATTCATCGACTGTGG 3' kullanılmıştır. DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Fisher, EP0705) ile PZR reaksiyonu **Tablo 3.1.** ve **Tablo 3.2.**'deki gibi kurulmuş ve **Tablo 3.3.**'de verilen PZR programında çoğaltılmıştır. Apc gen bölgesinin WT sekansını çoğaltmak için uygun olan primerler Forward: 5' CAGCAGCTTTAAGGAATCTCA 3', Reverse: 5' TCTGACCTACTATCATCATGTCG 3' kullanılırken ve mutant alleli çoğaltmak için F: 5'GTCTGCCATCCCAGGAAA 3' ve Reverse primer WT Reverse primeri ile aynı kullanıldı. Apc içinde DreamTaq DNA Polymerase kullanılmış olup **Tablo 3.4** ve **Tablo 3.5.**'teki PZR reaksiyonu kurulmuş ve yine paylaşılan PZR Programında çoğaltılmıştır.

Tablo 3.1. Aoc3 Gen Bölgesinin WT Sekansı için PZR Reaksiyonu

Bileşenler	Konsantrasyon	Miktar/Reaksiyon (µl)
Nükleazsız (RNA ve DNA) su	-	19,75
10X DreamTaq PCR Buffer	10X	2,5
CS-21 ve CS-22 Primer Mix	10µM	1
10 mM dNTPs	10mM	0,5
DreamTaq Polymerase	2000 U/ml	0,25
Kuyruk DNA'sı	-	1
Toplam		25

Tablo 3.2. Aoc3 Gen Bölgesinin Neo-R Sekansı için PZR Reaksiyonu

Bileşenler	Konsantrasyon	Miktar/Reaksiyon (µl)
Nükleazsız (RNA ve DNA) su	-	19,75
10X DreamTaq PCR Buffer	10X	2,5
CS-23 ve CS-24 Primer Mix	10µM	1
10 mM dNTPs	10mM	0,5
DreamTaq Polymerase	2000 U/ml	0,25
Kuyruk DNA'sı	-	1
Toplam		25

Tablo 3.3. Aoc3 PZR programı

Basamak	Sıcaklık	Süre
Denatürasyon	95°C	2 dk
Hibridizasyon (x39 Döngü)	95°C	45 sn
	60°C	45 sn
	72°C	1 dk
	72°C	5 dk
Uzama (Extension)	72°C	5 dk
Tutma (Hold)	4°C	∞

Tablo 3.4. Apc Gen Bölgesinin PZR Reaksiyonu

Bileşenler	Miktar/Reaksiyon (µl)
Nükleazsız (RNA ve DNA) su	17,25
10X DreamTaq PCR Buffer	2,5
Apc_G_F	0,5
Apc_G_R	1
Fmut_2	2
10 mM dNTPs	0,5
DreamTaq Polymerase	0,25
Kuyruk DNA'sı	1
Toplam	25

Tablo 3.5. Apc PZR programı

Basamak	Sıcaklık	Süre
Denatürasyon	95°C	2 dk
Hibridizasyon (x35 Döngü)	95°C	30 sn
	59°C	30 sn
	72°C	30 sn
Uzama (Extension)	72°C	5 dk
Tutma (Hold)	4°C	∞

PZR sonucunda hedef sekansımızı içeren WT gen bölgesinin beklenen boyutu 405 baz çifti iken Neo-R içeren gen bölgesinin beklenen boyutu 604 baz çiftidir. PZR cihazı olarak MyGene Series Peltier Thermal Cyclers (LongGene Scientific Instruments Co. Ltd.) cihazı kullanılmıştır.

3.1.3. Multipleks PZR

Finlandiya'dan ithal edilen 4 farenin genotiplenmesi Tablo 3.1. ve 3.2'deki gibi yapıldıktan sonra farelerin üretimi esnasında bu işlem çok kez tekrarlanacağı için Multipleks PZR'nin daha avantajlı olacağı düşünüldü. Bunun üzerine malzeme giderini ve zaman kaybını azaltmak için Multipleks PZR optimizasyonu yapıldı. **Tablo 3.4.**'deki reaksiyon kurulduktan sonra yine Tablo 3.3.'deki PZR programı kullanılmıştır.

Tablo 3.6. Multipleks PZR Reaksiyonu

Bileşenler	Konsantrasyon	Miktar/Reaksiyon (µl)
Nükleazsız (RNA ve DNA) su	-	18,75
10X DreamTaq PCR Buffer	10X	2,5
CS-21 ve CS-22 Primer Mix	10µM	1
CS-23 ve CS-24 Primer Mix	10µM	1
10 mM dNTPs	10mM	0,5
DreamTaq Polymerase	2000 U/ml	0,25
Kuyruk DNA'sı	-	1
Toplam		25

3.1.4. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel ekstraksiyonu için ilk olarak PZR ürünleri %1 konsantrasyonlu agaroz jelde yürütülmüştür ve yürütme işlemi tamamlandıktan sonra UV ışık kaynağı altında görüntülenmiştir

3.2. Aoc3-/- ve WT Farelerin Üretilmesi

İthal edilen farelerin genotipi doğrulandıktan sonra çiftleştirme işlemi için Aoc3-/- erkek farelerin yanına C57BL6 2 tane WT dişi bırakıldı. Doğan yavruların hepsi heterozigot olacağı için genotipleme yapılmadan Het x Het çiftleştirme kafesleri oluşturuldu. 10 tane çiftleştirme kafesi yapıp her biri içerisine 1 Aoc3 +/- Erkek x 2 Aoc3 +/- Dişi eklendi. Doğan fareler cinsiyetlerine göre ayrıldıktan sonra genotiplendirildi. Genotipleme sonucunda bulunan Homozigot ve WT fareler ile

Homo x Homo çiftleşmeleri için 6 tane kafes, WT x WT çiftleşmeleri için 4 tane kafes oluşturuldu. Bu arada Western Blot ve İHK boyamaları için 1 tane WT, 1 tane Het ve 1 tane Homo erkek fare sakrifiye edildi. Protein için: akciğer, kalp, karaciğer, böbrek, dalak, mide, proksimal intestine, mid. İntestine, distal intestine, proksimal kolon, distal kolon örnekleri alındı. İmmünohistokimyasal boyama için ise iç organlar ve bağırsak (GIS) diye iki kaset her üç hayvan için oluşturuldu.

3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması

Homo x Homo ve WT X WT çiftleştirmelerinden doğan farelerin genotipleri doğrulandı. İstenilen sayıda fareye ulaşıldıktan sonra planlandığı şekilde deney grupları oluşturuldu.

3.4. DSS Konsantrasyonunu Belirlemek için Yapılan Pilot Deney

Deney gruplarına uygulanacak Dekstran Sodyum Sülfat (DSS) (TdB labs, CAS Number: 9011-18-1) konsantrasyonunu belirlemek amacıyla bir pilot deney yapıldı. Bu pilot deney kapsamında 3 tanesi WT ve 3 tanesi Aoc3-/- olmak üzere 6 tane kafes oluşturuldu. Her bir kafes içerisine genotipleri aynı olan 2 fare eklenerek %2, %2,5 ve %3 olmak üzere farklı konsantrasyonlarda DSS içme suyuna karıştırılarak uygulandı. 5. Gün DSS uygulamasının ardından normal içme suyuna geri dönüldü ve 6. Günde tüm hayvanlar sakrifiye edildi. DSS uygulamasına başlandığı günden itibaren farelerin günlük vücut ağırlıkları tartımı yapıldı. Sakrifikasyon sonrasında çıkarılan kolon soğuk PBS içerisine alındı. 1xPBS içerisinde kolon longitudinal olarak açılarak temizlendi ve formol içerisinde fikse edildi. 1 gün boyunca fiksasyona maruz bırakılan 12 örnek kesit almak için formolden çıkarıldı. Kolon uzunlukları arasındaki farkı gözlemlemek için kesit almadan önce örneklerin fotoğraf çekimleri yapıldı. Daha sonra Hematoksilen & Eozin boyaması için Proksimal kolon, mid. Kolon ve distal kolon kesitleri her bir örnek için 5 parça 1 kaset olacak şekilde toplandı.

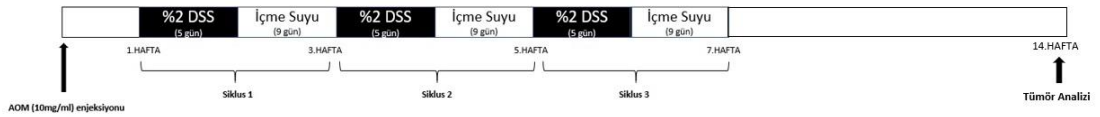
3.5. Akut Kolit Modeli Oluşturulması

Akut kolit modeli oluşturmak için yapılan pilot deney sonucunda belirlenen DSS konsantrasyonu farelere uygulandı. Deney grupları WT Normal su (n=4), WT DSS'li su (n=4), Aoc3-/- Normal su (n=4) ve Aoc3-/- DSS'li su (n=4) olmak üzere 4 kafes

şeklinde oluşturuldu. Fareler 8 gün takip edildi. İki günde bir olmak üzere vücut ağırlıkları ölçüldü ve uygulama sırasında ölen farelerin tarihi kaydedildi. 9. Günde tüm gruplar sonlandırıldı ve kolondan protein ve RNA için örnek alındı. Ayrıca kolon kesitleri Hematoksilen & Eozin boyaması için kasetlendi.

3.6. Deney Gruplarına Azoksimetan (AOM) ve DSS Uygulaması

Aoc3'ün kolit ile ilişkisini araştırmak için deney grupları oluşturuldu. Azoksimetan (Sigma, CAS Number:25843-45-2) uygulanacak deney gruplarına konsantrasyonu 10mg/ml olmak üzere vücut ağırlıklarına (100mg/kg) göre intraperitoneal olarak enjekte edildi. Enjeksiyondan 1 hafta sonra DSS uygulanması planlanan gruplara içme sularına karıştırılarak 5 gün boyunca DSS verildi. 5. Günün sonunda normal suya geçildi ve 9 gün boyunca normal su verilmeye devam etti. Böylece 14 günlük ilk siklus tamamlanmış oldu. Bu siklus 3 kez olacak şekilde tamamlandı. Üçüncü siklus bittikten sonra normal su verilerek hayvanlar 80.güne kadar takip edildi. Azoksimetan enjeksiyonundan yaklaşık 90. Güne kadar haftada bir kez hayvanların vücut ağırlıkları tartılarak not edildi (**Şekil 3.1**).



Şekil 3.1. Aom (10mg/ml) ve DSS uygulaması.

14.hafta sonunda sağ kalan hayvanlar anestezi altında sakrifiye edildi. Akciğer, kalp, karaciğer, böbrek, dalak, mide formol içerisinde fikse edilirken gastrointestinal sistem dikkatle çıkarıldı ve longitudinal olarak açılarak 1x PBS içerisinde temizlendi. Formol içerisinde alınarak bir gün fikse edildi. Bir gün sonunda fikse olan kolonların uzunluk karşılaştırmasını yapmak için çekumdan distal kolona kadar olan kısmın fotoğraf çekimi yapıldı ve ölçüldü. Daha sonra mikroskop altında polip oluşumu incelendi, not edildi ve uygun şekilde kasetlenerek takibe alındı.

3.7. Distal Kolondan RNA izolasyonu ve Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR

WT ve Aoc3^{-/-} fareler sakrifiye edildikten sonra her iki genotipteki farenin distal kolonundan taze dokular alındı ve RNeasy (AM7020, Invitrogen) içerisine konuldu. TRIzol ile RNA izolasyonunda ilk olarak RNeasy içerisindeki örnek homojenizatöre alındı ve üzerine 1000ul TRIzol (Cat No: 15596-018, Invitrogen) eklendi. Homojenize edilen dokular temiz ependorf içerisine aktarıldı. 5dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılan örneklerin üzerine 200ul kloroform eklendi ve 15 sn kuvvetlice çalkalandı. Tekrar oda sıcaklığında 2-3 dk beklendikten sonra 4 °C'de 13,000 rpm'de 15 dk santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası süpernatant temiz bir ependorfa aktarıldı. Üzerine 500ul isopropanol eklenen örnekler dikkatle çalkalandıktan sonra 10 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Inkübasyon sonrası 13,000 rpm'de 10 dk 4 °C'de santrifüj edilen örneklerde ependorfun alt kısmında beyaz pelet gözlenmelidir. Bu aşamada pelete dokunmadan süpernatant atıldı ve peleti yıkamak için %75'lik EtOH'den 1ml eklenerek vortekslenildi. 13,000 rpm'de 10dk 4 °C'de santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant atıldı. 5-10 dk oda sıcaklığında alkolün uçması için bekletilen örneklerin üzerine bu süre sonunda 100ul RNase içermeyen su eklendi ve 10dk 55°C su banyosunda inkübe edildi. İzole edilen RNA'nın konsantrasyonunu ölçmek için Nano-Drop (ND-2000) kullanıldı. Konsantrasyonları 0,2ug/ul olacak şekilde alikotlar hazırlandı ve stoklar -80°C'ye kaldırıldı. İzole edilen ve alikotlanan RNA örnekleri ile High Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti (REF: 4368814, Thermo Scientific) kullanılarak cDNA sentezi yapıldı (**Tablo 3.7 ve 3.8**). cDNA sentezi yapıldıktan sonra gerçek zamanlı kantitatif PZR reaksiyonu kuruldu. Bunun için Luminaris Color HiGreen Low ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific, LSG K0373) kiti kullanıldı. Aoc3 mutant ve WT farelerin distal kolonundan elde edilen cDNA'lar 1:20 oranında dilüe edildi. Hedef genler beta aktine (Actb) göre normalize edildi. Negatif kontrol olarak cDNA yerine distile su konuldu ve reaksiyonun doğruluğu değerlendirildi. Reaksiyon Stratagene Mx300 5 P cihazında analiz edildi ve üç tekrarlı şekilde yapıldı. Kullanılan primer sekansları **Tablo 3.9'**de, reaksiyon koşulları **Tablo 3.10'**de ve PZR programı **Tablo 3.11'**de verilmiştir.

Tablo 3.7. cDNA Sentezi Reaksiyon Bileşenleri

Bileşenler	Miktar/Reaksiyon (µl)
Nükleazsız (RNA ve DNA) su	4,2
10X RT Buffer	2
10X RT Random Primer	2
25X dNTPs Mix	0,8
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1
cDNA	10
Toplam	20

Tablo 3.8. cDNA PZR Programı

Reaksiyon Sıcaklığı	Süre
25°C	10 dk
37°C	120dk
85°C	5 dk
4°C	Bekletme

Tablo 3.9. Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR için Kullanılan Primer Sekansları

Kullanılan Primerler	Sekansları (5' – 3')
Aoc3- Forward	GTGGTCAGATCCGTGTCTACCTT
Aoc3 -Reverse	CCTGTGGCGTGGAATTTGA
Actb- Forward	AGCCATGTACGTAGCCATCC
Actb- Reverse	CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA

Tablo 3.10. Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR Reaksiyon Koşulları

Bileşenler	1X
Master Mix	10
dH2O (DNaz/RNaz içermeyen)	3
Forward Primer	1
Reverse Primer	1
cDNA	5
Toplam	20

Tablo 3.11. Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR Programı

Tekrar Sayısı	Reaksiyon Sıcaklığı ve Süre
1	50°C 2 dk
1	95°C 10dk
40	95°C 15sn
	60°C 30sn
	72°C 30sn
1	95°C 15sn
1	60°C 30sn
1	95°C 30sn
	4°C ∞

3.8. BrdU (5 Bromo 2' Deoxyuridin) Boyaması

Polip gelişimi beklenen farelerde hücre proliferasyonunu göstermek amacıyla farelere vücut ağırlıklarına göre (100mg/kg) BrdU (Cat. No: B23151, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) intraperitoneal olarak enjekte edildi. Yaklaşık 1 saat sonra fareler sakrifiye edildi. Kolondan kesitler hazırlanarak anti-BrDu antikoru (Cat. No.PA5 32256, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) ile boyandılar.

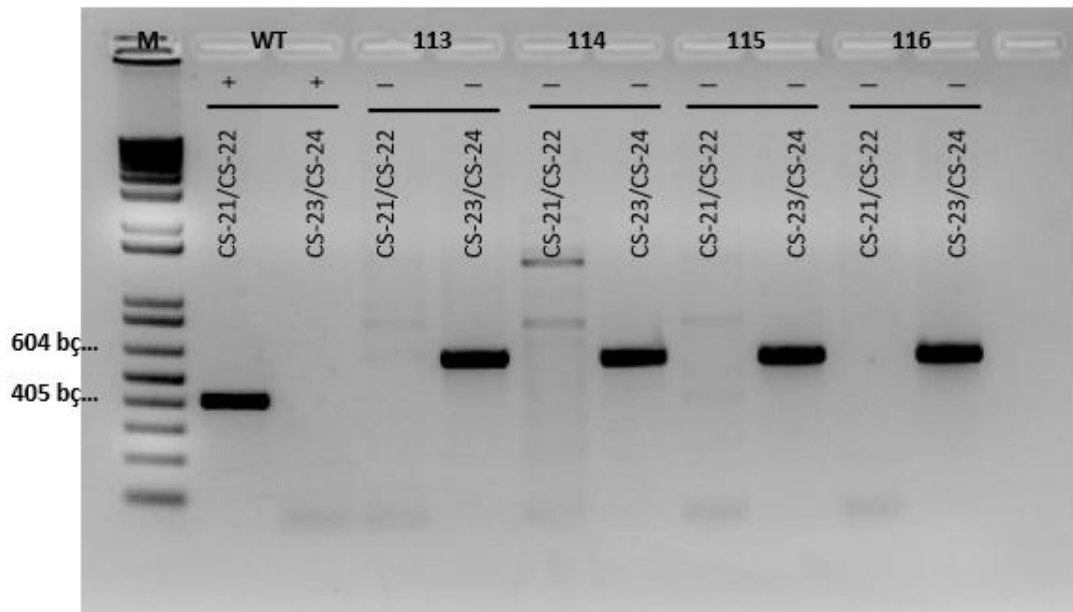
3.9. İstatistiksel Analiz

Genel istatistiksel analizler için GraphPad Prism 10.2.1 kullanılmıştır. Sağkalım eğrileri Kaplan-Meier yöntemi ile oluşturulmuş ve anlamlılığı log-rank testi ile karşılaştırılmıştır. İkili gruplar arasında yapılan karşılaştırmalarda t-test, üçlü gruplar arasında yapılan karşılaştırmalarda Anova kullanılmıştır. P <0,05 olarak bulunan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. qPCR deneyleri ise 3 tekrarlı yapılmıştır.

4. BULGULAR

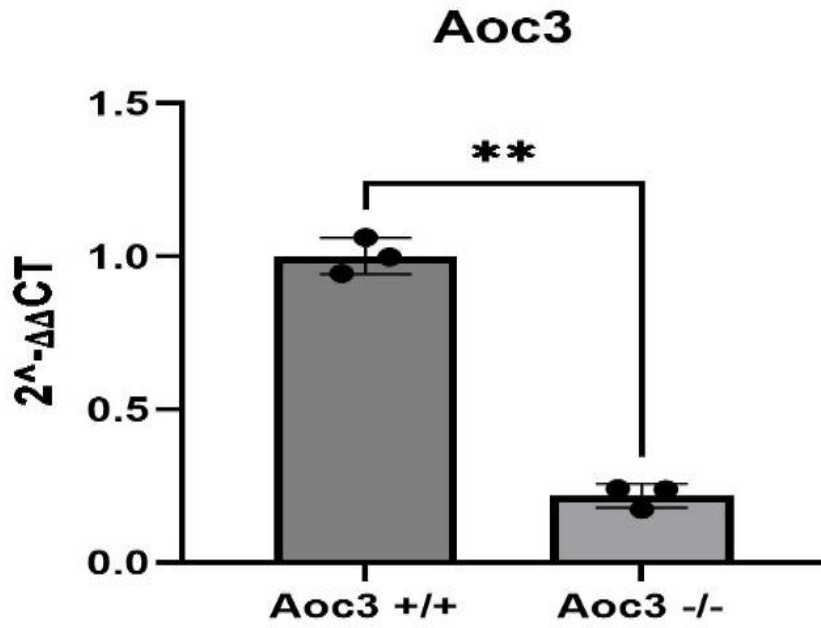
4.1. Aoc3^{-/-} Homozigot Farelerin Genotiplerinin Doğrulanması

İthal edilen transgenik hayvanların genotiplerinin doğrulanması için kulak küpeleri takılmış, kuyruk DNA izolasyonu yapılarak Tablo 3.1. ve Tablo 3.2.'deki reaksiyonlar kullanılmıştır. Agaroz jelde yürütülen örneklerin görüntüleri **Şekil 4.1.**'de verilmiştir. Aoc3 mutant farelerin genotiplemesi için PZR optimize edilmiş ve agaroz jel görüntüleri net bir şekilde alınabilmektedir.



Şekil 4.1. C57BL/6 Homozigot 4 erkek farenin genotiplerinin agaroz jeldeki görüntüsü. WT farelerin bandı 405 baz çifti iken, Aoc3^{-/-} bandı 604 baz çiftidir.

Aynı zamanda ithal edilen Aoc3 mutant ve WT farelerin distal kolonlarındaki Aoc3 ifadesi RNA izolasyonu yapılarak gerçek zamanlı PZR ile karşılaştırılmıştır (**Tablo 4.1.**). Yapılan deney sonuçlarına göre Aoc3 mutant farelerdeki Aoc3 ifadesinin WT farelere göre 5 kat daha az olduğu bulunmuştur (**Şekil 4.2.**).



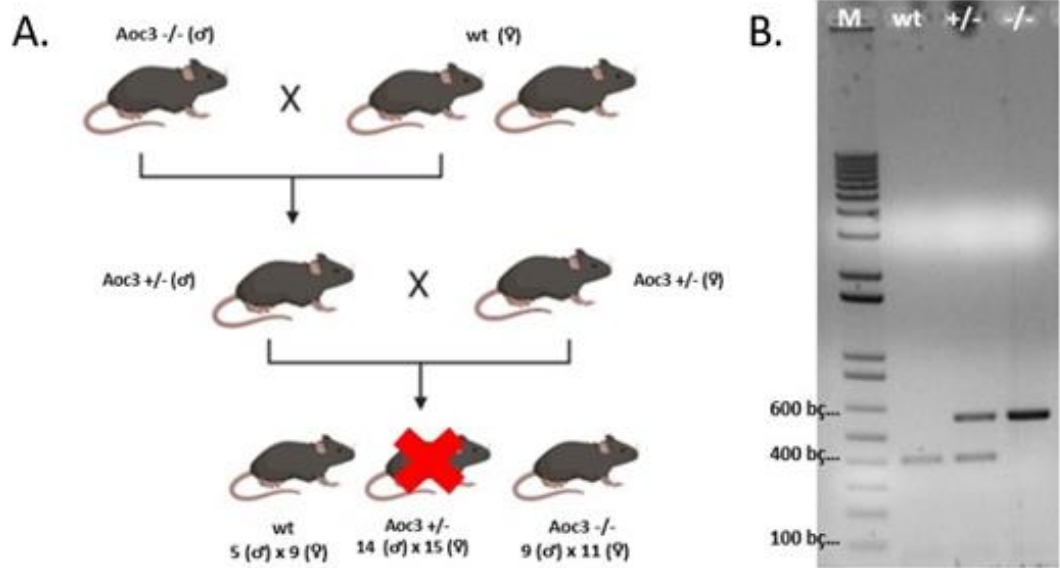
Şekil 4.2. WT ve Aoc3^{-/-} farelerin kantitatif gerçek zamanlı PZR analiz sonucu. Beta aktine göre normalize edilmiş olup deneyler 3 tekrarlı şekilde yapılmıştır. (T-test, p: 0.0048).

Tablo 4.1. Kantitatif gerçek zamanlı PZR ortalama Ct değerleri ve standart sapmaları.

Gruplar	Beta Aktin Ortalama Ct	Aoc3 Ortalama Ct
Aoc3 ^{-/-}	16,07	27,05
Aoc3 ^{+/+}	16,41	25,16

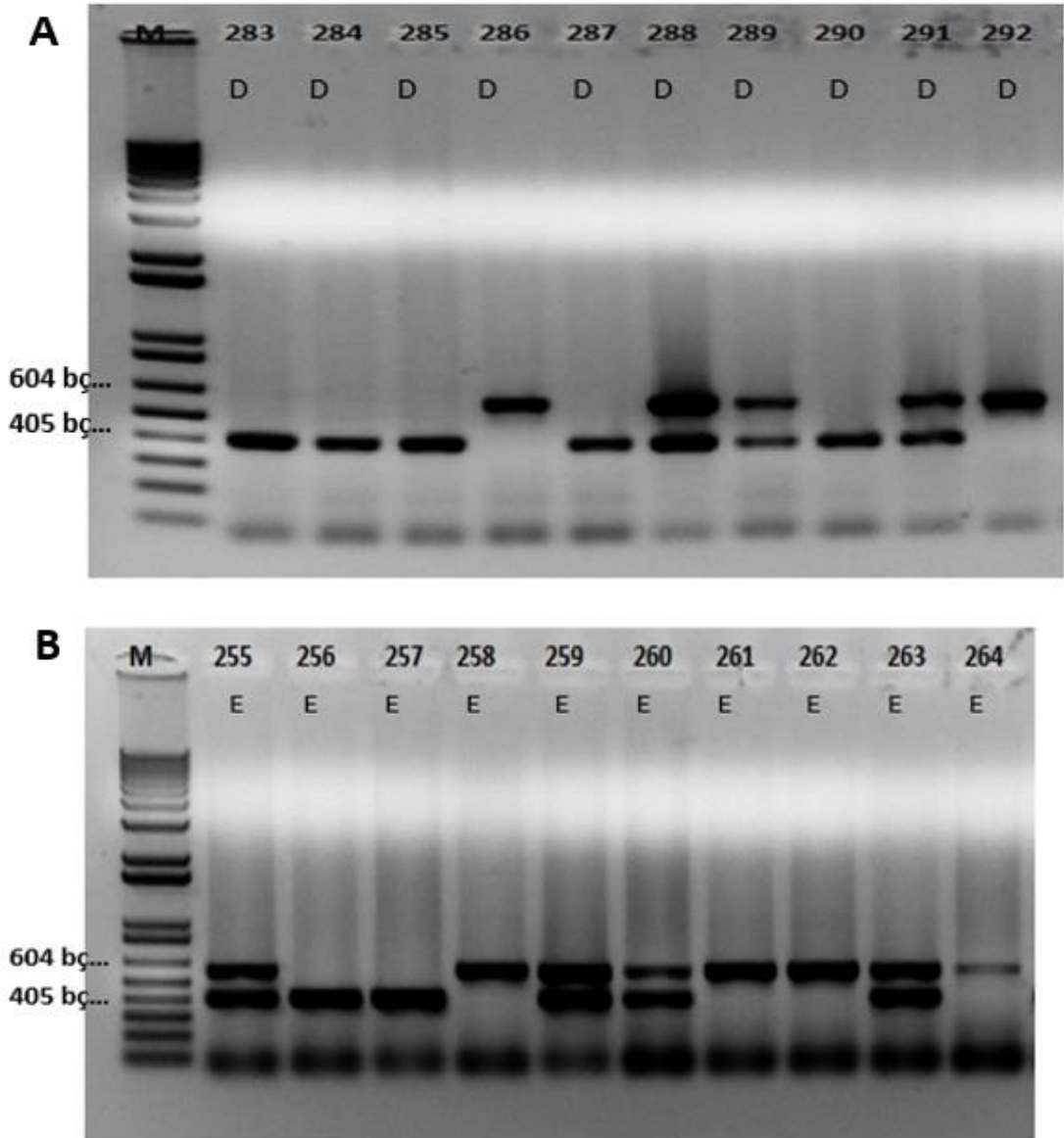
4.2. Aoc3^{-/-} ve WT Farelerin Üretilmesi

Gelen farelerin genotipi doğrulandıktan sonra çiftleştirme işlemlerine Şekil 4.3.A.'da gösterildiği gibi başlandı. Tüm çiftleştirme kafeslerine 1 erkek 2 dişi bırakıldı. Homo x WT çiftleşmesinden doğan yavruların hepsi Heterozigot olacağı için genotiplemeleri yapılmadan Het x Het kafesleri kuruldu. Het x Het çiftleşmesinden doğan farelerin 28 tanesi erkek 36 tanesi dişi olarak ayrıldı. 64 farenin genotipleme aşamasında Multipleks PZR denendi ve başarılı bir şekilde çalıştığı Şekil 4.3.B.'de gösterildi. Bu aşamada WT bandı için: 405 bç, Homozigot bandı için: 604 bç ve heterozigot genotipi için her iki bant birden gözlemlendi.



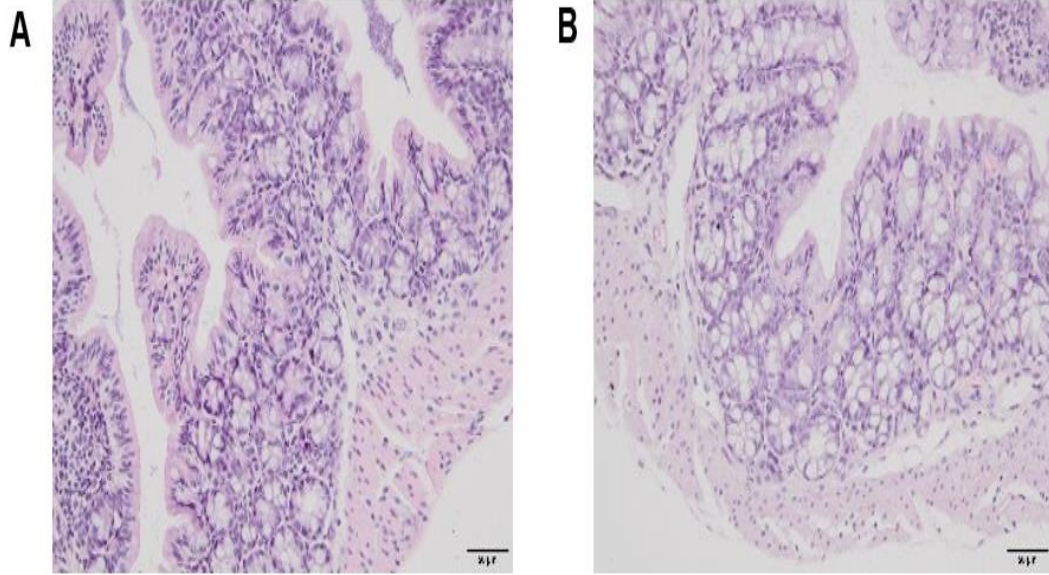
Şekil 4.3. Deney gruplarının oluşturulması. Yeterli sayıda homozigot ve yabanıl farelerin üretimi **(A)**. Yabanıl, heterozigot ve homozigot farelerin multipleks PZR ile belirlenmesi **(B)**.

Het x Het farelerden doğan 64 yavrunun **Şekil 4.4.**'de verildiği gibi genotiplenmeleri sonucunda Erkek: 5 wt, 9 Aoc3^{-/-}, Dişi: 9 wt, 11 Aoc3^{-/-} bulundu. Genotipleme sonucunda bulunan Homozigot ve WT fareler ile Homo x Homo çiftleşmeleri için 6 tane kafes, WT x WT çiftleşmeleri için 4 tane kafes oluşturuldu.



Şekil 4.4. Het x Het çiftleşmesinden doğan 36 Dişi (D), 28 Erkek (E) farenin genotipi

Aynı zamanda homozigot ve WT farelerin tüm organları ve gastrointestinal sisteminin histolojik değerlendirilmesi yapıldığında WT ve Aoc3^{-/-} arasında bir fark gözlenmedi (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. WT ve Aoc3^{-/-} farelerin proksimal kolonlarının H&E boyaması. **A.** WT C57BL6 **B.** Aoc3^{-/-}. Ölçek Çubuğu: 50 µm.

4.3. Deney Gruplarının Oluşturulması

Homo x Homo ve WT X WT çiftleştirmelerinden doğan farelerde istenilen sayıya ulaşıldıktan sonra **Tablo 4.2**'deki gibi deney grupları oluşturuldu.

Tablo 4.2. Kontrol ve Deney Grupları

Yabanıl (wt) Kontrol Grubu		Aoc3 ^{-/-} (Homozigot) Deney Grubu	
Uygulanan Kimyasal	Denek Sayısı (n)	Uygulanan Kimyasal	Denek Sayısı (n)
1. %0,9 NaCl	6	5. %0,9 NaCl	9
2. AOM (10mg/ml)	8	6. AOM (10mg/ml)	9
3. DSS	7	7. DSS	9
4. AOM (10mg/ml) + DSS	7	8. AOM (10mg/ml) + DSS	9
Toplam: 28		Toplam: 36	

4.4. DSS Konsantrasyonu Optimizasyonu

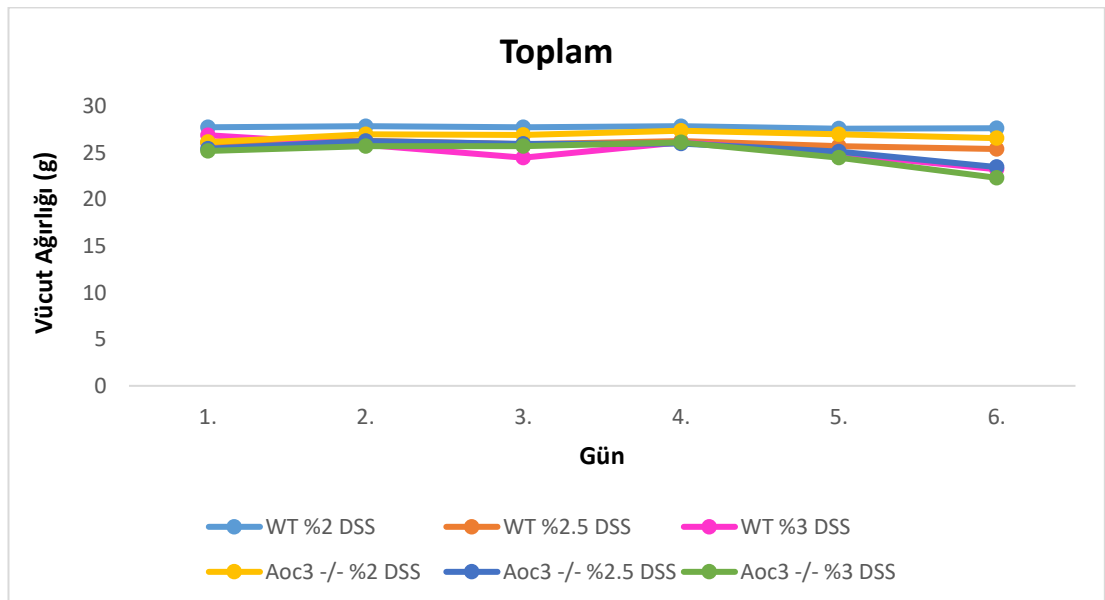
Grupların oluşturulmasının ardından DSS konsantrasyonunu belirlemek için pilot deney yapılmıştır. Pilot deney kapsamında kullanılan erkek fareler **Tablo 4.3.**'de verilmiştir.

Tablo 4.3. Pilot Deney için Deney Grupları

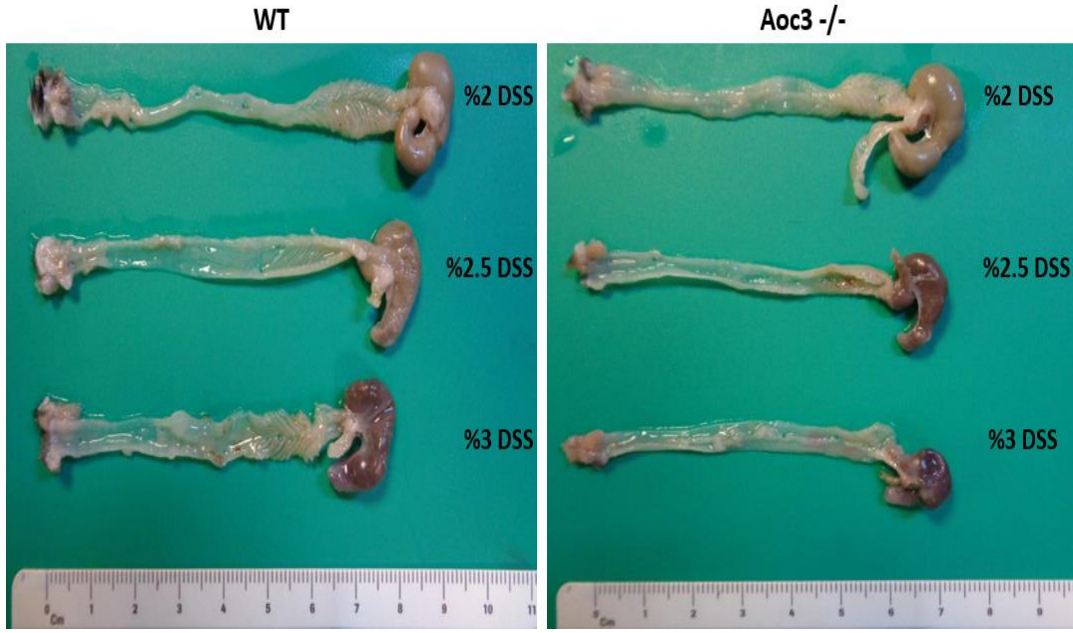
Yabanıl (wt) Kontrol Grubu		Aoc3-/- (Homozigot) Deney Grubu	
Uygulanan Kimyasal Konsantrasyonu	Denek Sayısı (n)	Uygulanan Kimyasal Konsantrasyonu	Denek Sayısı (n)
1. %2 DSS	2	4. %2 DSS	2
2. %2,5 DSS	2	5. %2,5 DSS	2
3. %3 DSS	2	6. %3 DSS	2
Toplam: 6		Toplam: 6	

6 gün boyunca fareler her gün tartılmıştır. 6.gün sonunda farelerin kilo kayıpları karşılaştırıldığında ortalama 4.günden sonra DSS uygulamasından etkilenmeye başlamış ve Aoc3 mutant farelerin WT farelere göre daha çok etkilendikleri gözlenmiştir (**Şekil 4.6.**). 6.gün sonunda kurban edilen farelerin kolon uzunlukları ölçülerek not edilmiş ve ortalamaları alınmıştır (**Tablo 4.4.**). Değerlendirmeler sonucunda konsantrasyon artışına bağlı olarak kolon uzunluklarının kıaldıkları hem WT hem de Aoc3 mutant farelerde gösterilmiştir (**Şekil 4.7.**). Total kolon uzunlukları karşılaştırıldığında %2, %2,5 ve %3 DSS uygulaması arasında anlamlı farklılık olduğu gösterilmiştir (**Şekil 4.8.**). 6 gün takip boyunca yapılan morfolojik değerlendirmelerde %3 DSS verilen WT ve Aoc3 mutant farelerde %10-15 arası kilo kaybı meydana gelmiş, gaita sulu ve kanama belirgin olarak gözlenmiştir.

Ayrıca sakrifiye edilen farelerden toplanan distal kolon örneklerinden kesitler hazırlanmıştır. Kolon örneklerinin H&E boyalı slaytları inflamasyonun şiddeti, kript hasarı ve ülserasyon olmak üzere üç parametreye dayalı olarak kolitin histolojik aktivitesi açısından değerlendirilmiştir. İnflamasyonun şiddeti 0 ila 3 (Nadiren İnflamatuvar infiltratın transmural yayılımına kadar) olarak puanlanmıştır. Kript hasarı 0 ila 5 (sağlam kriptlerden konfluent erozyona kadar) ve ülserasyon 0 ila 3 (ülser yokluğundan konfluent veya yaygın ülserasyona kadar) olarak skorlanmıştır. Değerler, daha önce açıklandığı gibi 0-11 arasında değişen bir histolojik aktivite skoru vermek üzere toplanmıştır (Tablo 4.5.) (126).



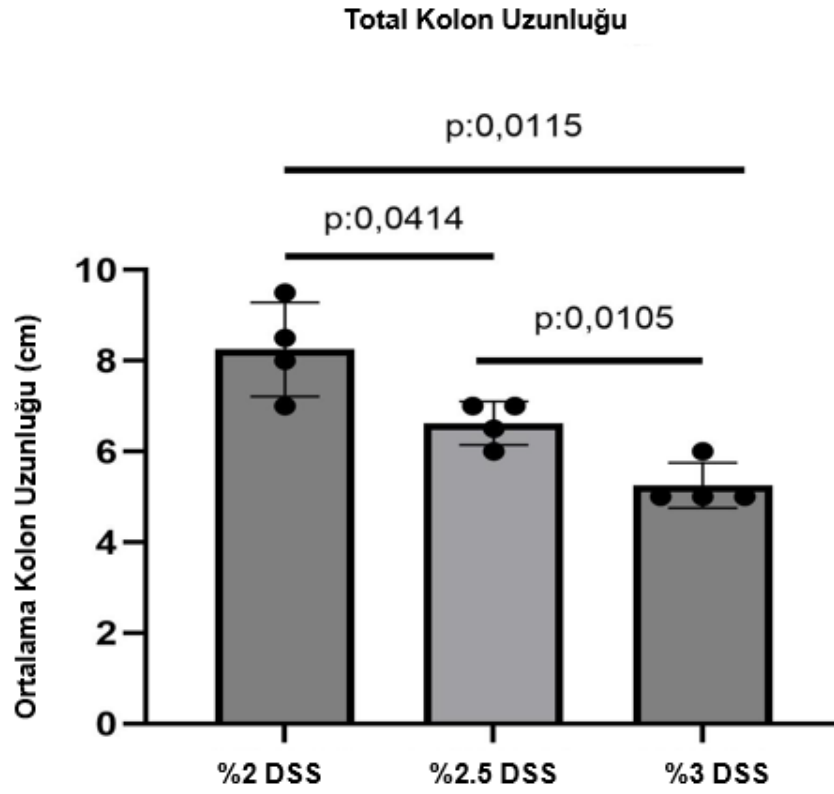
Şekil 4.6. Deney gruplarının 6.günlük vücut ağırlığı takibi. (Kaplan-Meier analizi, $P < 0,05$ olarak bulunan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıdır.)



Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlarda DSS uygulanan farelerin kolon uzunluklarının morfolojik analizi.

Tablo 4.4. Farklı konsantrasyonlarda DSS uygulanan farelerin ortalama kolon uzunlukları. Standart Sapma ve Standart Hata.

Cinsiyet	Genotip	Uygulama	Ortalama Kolon Uzunluğu (cm)	S. Sapma	S. Hata
Erkek	WT	%2 DSS	8,25	3,35	0,04
Erkek	WT	%2.5 DSS	7	0	0
Erkek	WT	%3 DSS	5,5	0,70	0,13
Erkek	Aoc3-/-	%2 DSS	8,25	1,76	0,21
Erkek	Aoc3-/-	%2.5 DSS	6,25	0,35	0,06
Erkek	Aoc3-/-	%3 DSS	5	0	0

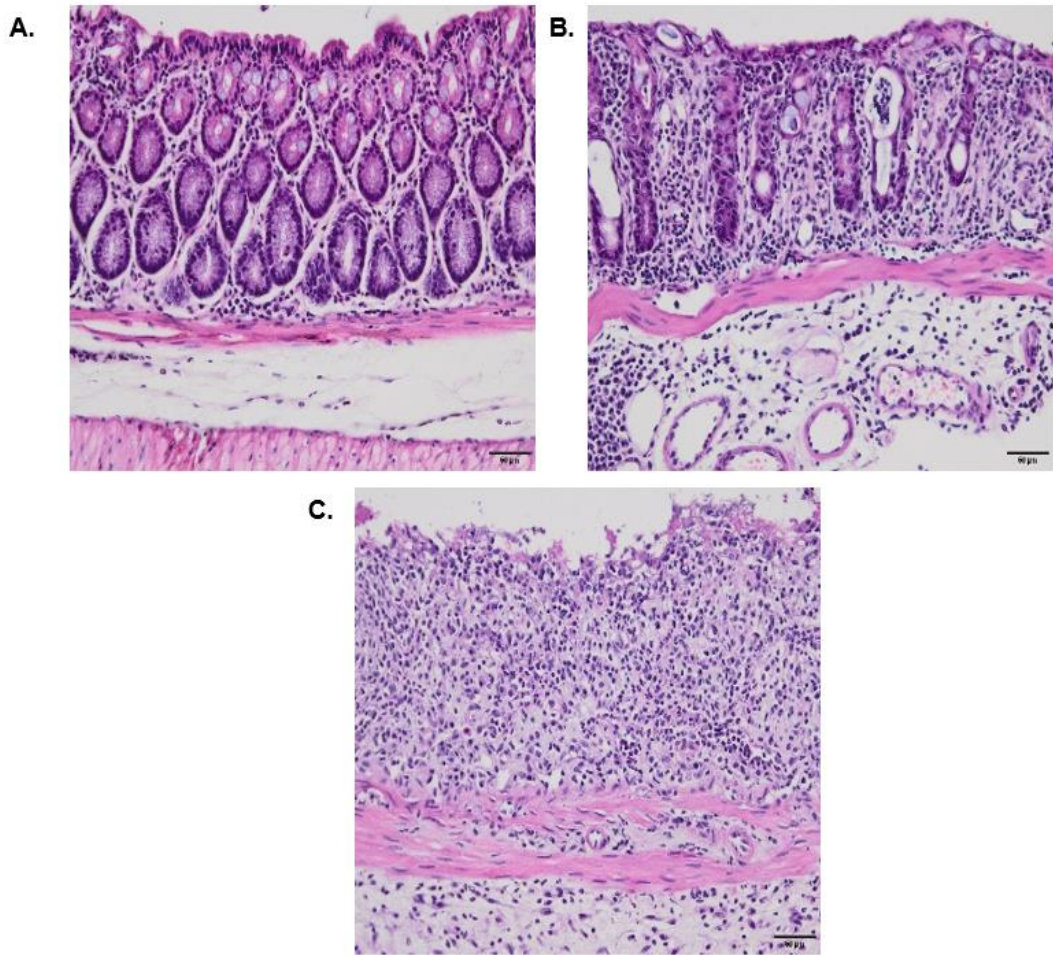


Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlarda DSS uygulanan farelerin ortalama kolon uzunluklarının karşılaştırması.

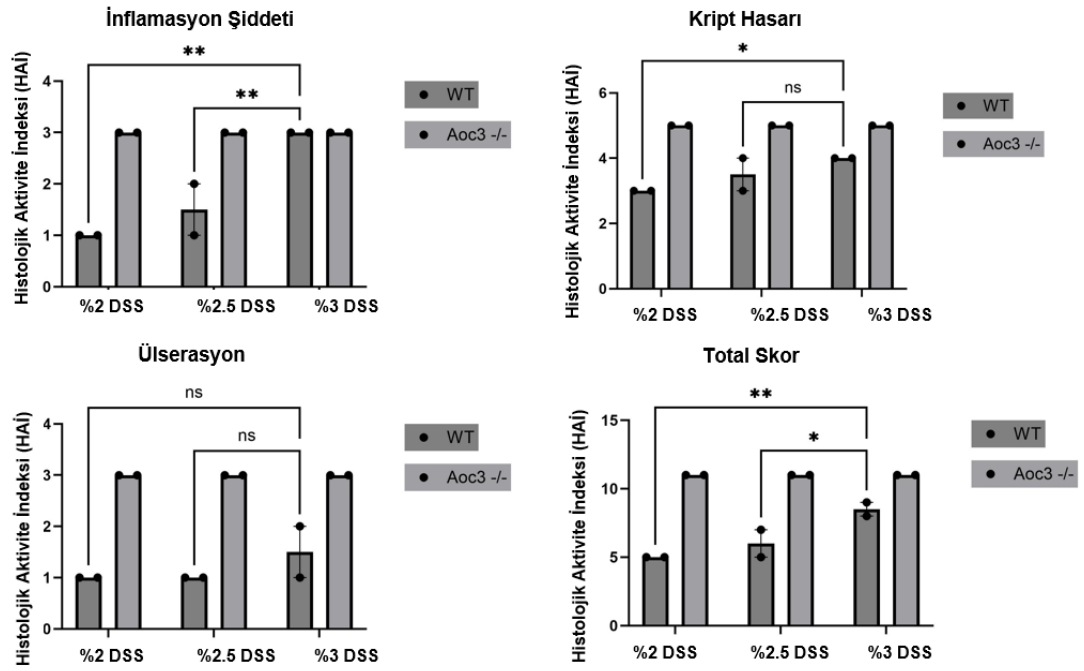
Tablo 4.5. Kolit Şiddetini Değerlendirmek Amacıyla Kullanılan Histolojik Parametreler ve Skorlar

Örnek Adı	İnflamasyon Şiddeti	Kript Hasarı	Ülserasyon	Total
WT_%2 DSS	1	3	1	5
WT_%2DSS	1	3	1	5
WT_%2,5 DSS	2	4	1	7
WT_%2,5 DSS	1	3	1	5
WT_%3 DSS	3	4	2	9
WT_%3 DSS	3	4	1	8
Aoc3-/-_%2 DSS	3	5	3	11
Aoc3-/-_%2 DSS	3	5	3	11
Aoc3-/-_%2,5 DSS	3	5	3	11
Aoc3-/-_%2,5 DSS	3	5	3	11
Aoc3-/-_%3 DSS	3	5	3	11
Aoc3-/-_%3 DSS	3	5	3	11

DSS uygulanmayan WT fare, %2.5 DSS verilen WT fare ve %2.5 DSS verilen Aoc3^{-/-} fare distal kolon örnekleri karşılaştırıldığında Aoc3 mutant farelerin inflamasyon şiddeti, kript hasarı ve ülserasyonu maksimum olup H&E kesit görüntüleri **Şekil 4.9.**'da histolojik aktivite indeksleri **Şekil 4.10.**'da verilmiştir. Bu bulgular doğrultusunda, %3 DSS'nin şiddetli kolite sebep olduğu görülmüş olup 3 siklus DSS uygulanacak olan deney gruplarımıza %2 DSS verilmesine, akut kolit oluşturma deneylerinde de %2.5 DSS kullanılmasına karar verilmiştir.



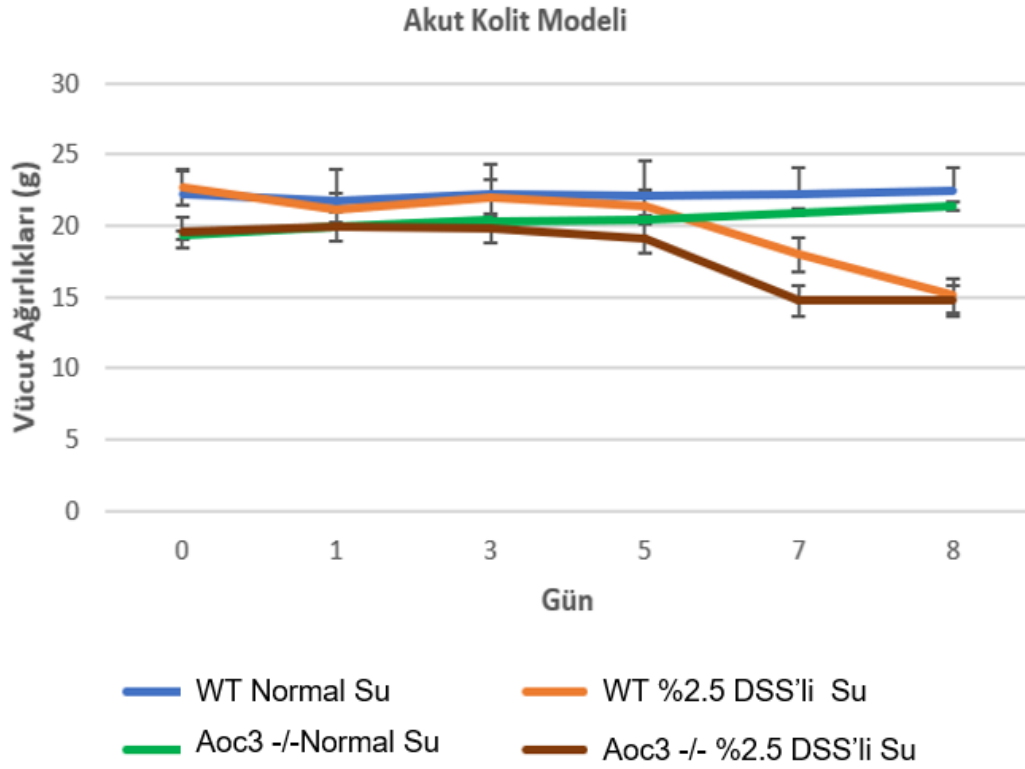
Şekil 4.9. DSS uygulanan deney gruplarının kesit görüntüleri. A. Kontrol B. %2,5 DSS uygulanan WT fare C. %2,5 DSS uygulanan Aoc3^{-/-} fare. Ölçek Çubuğu: 50 µm.



Şekil 4.10. WT ve Aoc3^{-/-} farelerin histolojik aktivite indeksleri.

4.5. Akut Kolit Modeli Oluşturulması

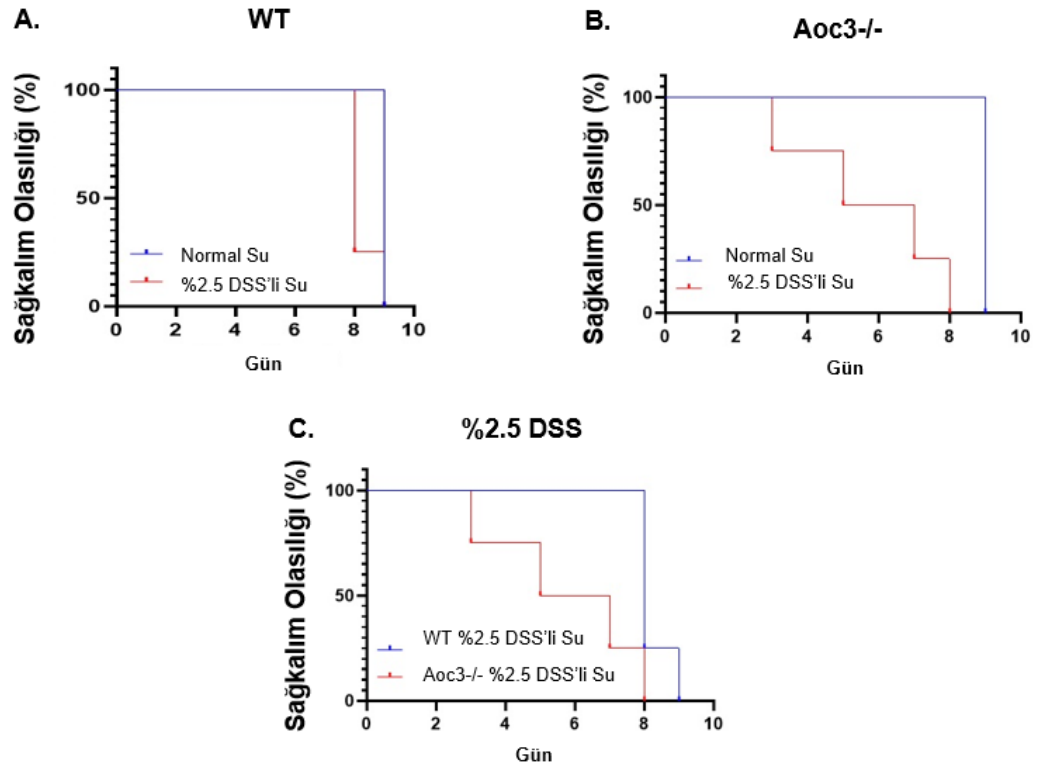
Akut kolit modeli oluşturmak ve Aoc3 ifadesinin yokluğunun kolit üzerine etkisini araştırmak için normal su verilen WT (n=4) ve Aoc3 (n=4) grubu ve %2,5 DSS verilen WT (n=4) ve Aoc3 (n=4) gruplarından oluşan 4 kafes kurulmuştur. Fareler 9 gün takip edilmiştir. Gün aşırı vücut ağırlıkları tartılmış olan farelerden ölenler olduğunda ölüm tarihi not edilmiştir. Bu takip süresinde de pilot deneyde olduğu gibi 4.günden itibaren rektal kanama gözlenmiş olup farelerin kilo kayıpları hızla artmıştır (**Şekil 4.11 ve 12.**). Sağkalım eğrileri değerlendirildiğinde Aoc3^{-/-} farelerin DSS'den daha hızlı ve daha çok etkilendiği gözlenmiştir (**Şekil 4.13.**). Sonuç olarak Aoc3 mutant farelerin kolit oluşturmaya daha yatkın olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.11. Akut Kolit oluşturmada 9 günlük vücut ağırlığı takibi.



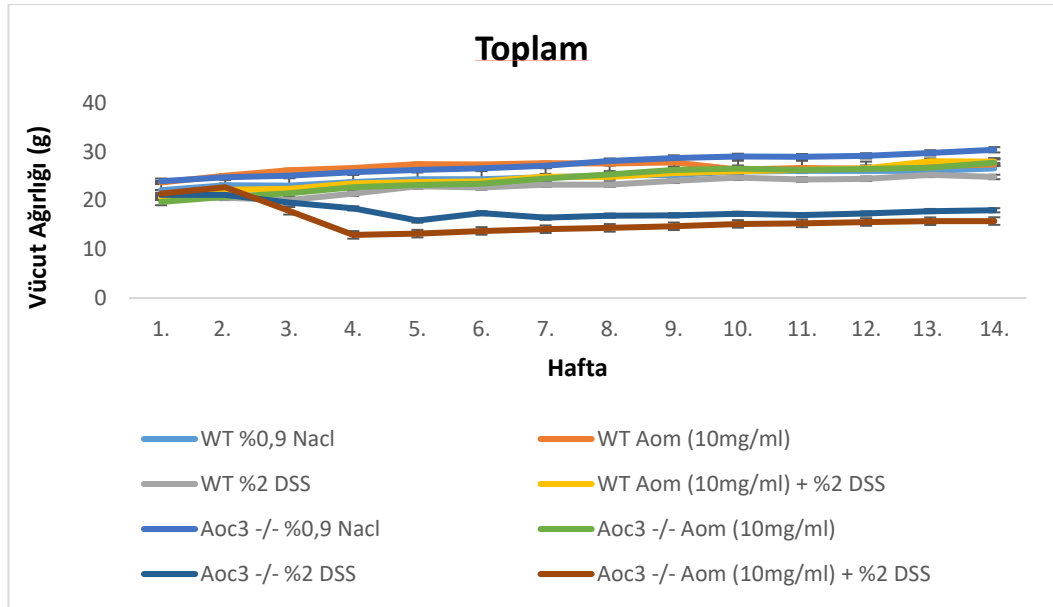
Şekil 4.12. Ortalama 4.günde başlayan rektal kanama görüntüsü.



Şekil 4.13. Akut kolit modeli Sağkalım analizi. A. Normal su ve %2,5 DSS'li su uygulanan WT farelerin sağ kalım grafiği. (Log-rank testi, p:0,0404) B. Normal su ve %2,5 DSS'li su uygulanan Aoc3-/- farelerin sağ kalım grafiği. (Log-rank testi, p:0,0067) C. %2,5 DSS'li su uygulanan WT ve Aoc3-/- farelerin sağ kalımlarının karşılaştırılması (Log-rank testi, p:0,0385).

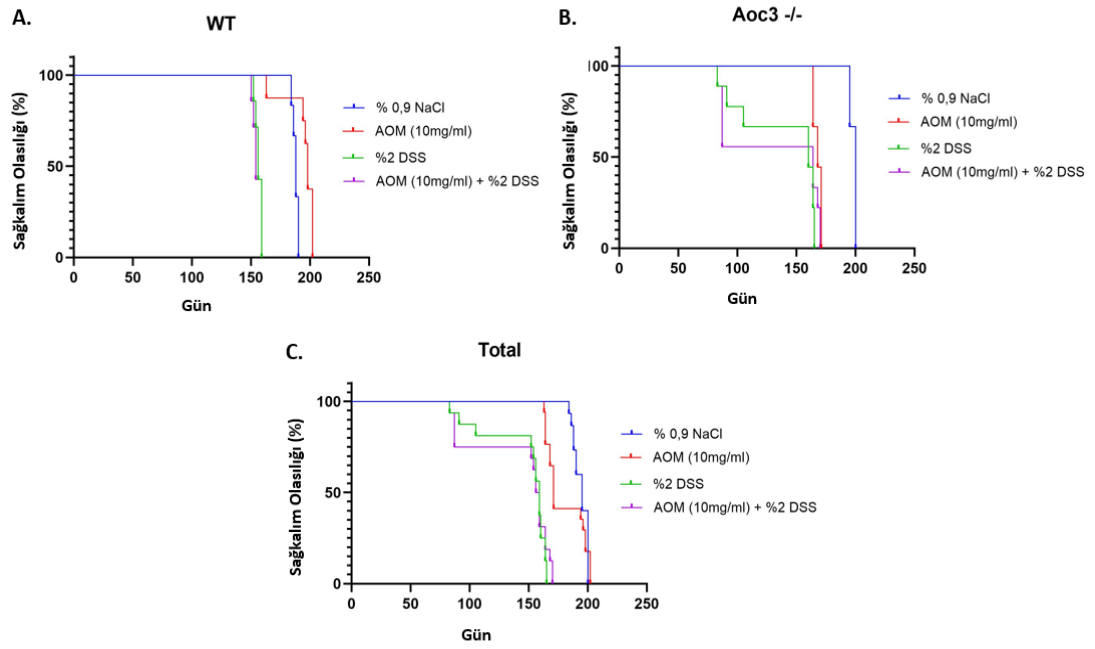
4.6. Aoc3'ün Kolit ilişkili Kolon Kanserindeki Etkisinin Araştırılması

Bu deneylerin sonucunda Aoc3 ifadesinin kolit ve neoplastik süreçteki etkisini daha detaylı araştırmak için daha önce **Tablo 4.2.**'de verilen deney grupları 14 hafta boyunca takip edildi. DSS konsantrasyonu olarak %2'ye karar verildi. Bu süreçte haftada bir tartımı yapılan farelerin vücut ağırlığı grafiği oluşturuldu (**Şekil 4.14**). Bu grafiğe göre DSS ve Aom+DSS verilen Aoc3-/- farelerin WT farelere göre daha çok etkilendiği gözlemlendi. DSS uygulamasının 3.siklusu bitince (7.hafta) tekrar normal suya geçildi ve farelerin kiloları yavaş yavaş artmaya başladı.



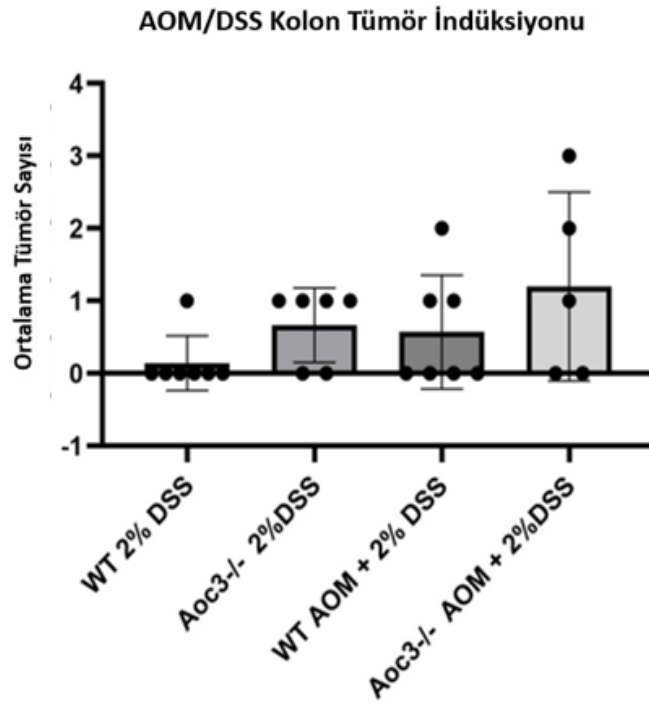
Şekil 4.14. Deney gruplarının 14 haftalık vücut ağırlığı takibi.

Aynı zamanda ölen farelerin ölüm tarihleri not edildi. 14.hafta sonunda sağ kalım analizi yapıldı ve istatistiksel olarak WT, Aoc3^{-/-} ve toplam grafikleri anlamlı bulundu (**Şekil 4.15.**). DSS ve AOM/DSS uygulanan WT fareler yaklaşık 150.günden sonra ölmeye başlarken, DSS ve AOM/DSS uygulanan Aoc3^{-/-} farelerin 75 günden sonra ölmeye başladıkları gözlemlendi.



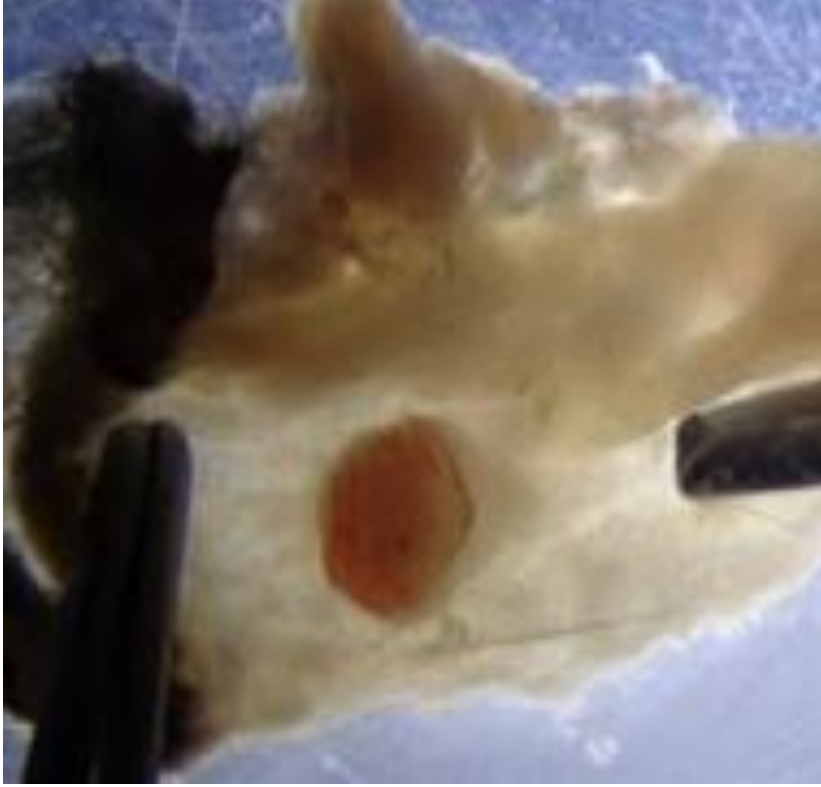
Şekil 4.15. Deney gruplarının 14 haftalık sağ kalım analizi. *P <0.05, Kaplan Meier Analizi, log-rank test. A. WT, B. Aoc3^{-/-}, C. Hem WT hem de Aoc3^{-/-} farelerin sağ kalımı. İstatistiksel olarak A, B, C anlamlıdır.

14.hafta sonunda sakrifiye edilen farelerin gastrointestinal sistemleri çıkarıldı. Örnekler formol içerisinde alınarak bir gün bekletildi. Ertesi gün fikse edilen örnekler mikroskop altında detaylı bir şekilde incelendi. Polip dağılımları ve sayıları makroskopi kağıdına not edildi. Hem Aoc3^{-/-} hem WT gruplarında yalnız %2DSS ve AOM/DSS uygulanan grupların kolon polip sayıları **Şekil 4.16.**'da verilmiştir.



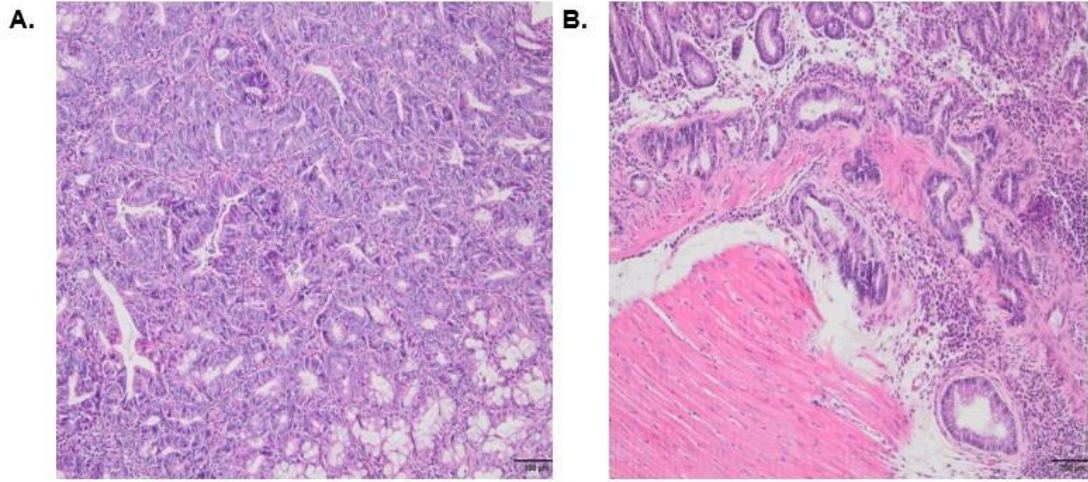
Şekil 4.16. Yalnız DSS ve AOM/DSS uygulanan farelerin kolon polip dağılımları.

Mikroskop altında incelenen örneklerin distal kolonlarında makroskopik olarak polip oluşumu gözlemlendi. AOM/DSS uygulanan hem WT hem de Aoc3^{-/-} gruplarında görülen polip örneği **Şekil 4.17.**'de verilmiştir. Daha sonra örneklerden kesitler alınarak kasetlenmiş ve takibe alınmıştır.



Şekil 4.17. Distal Kolon Makroskopik Görüntüsü.

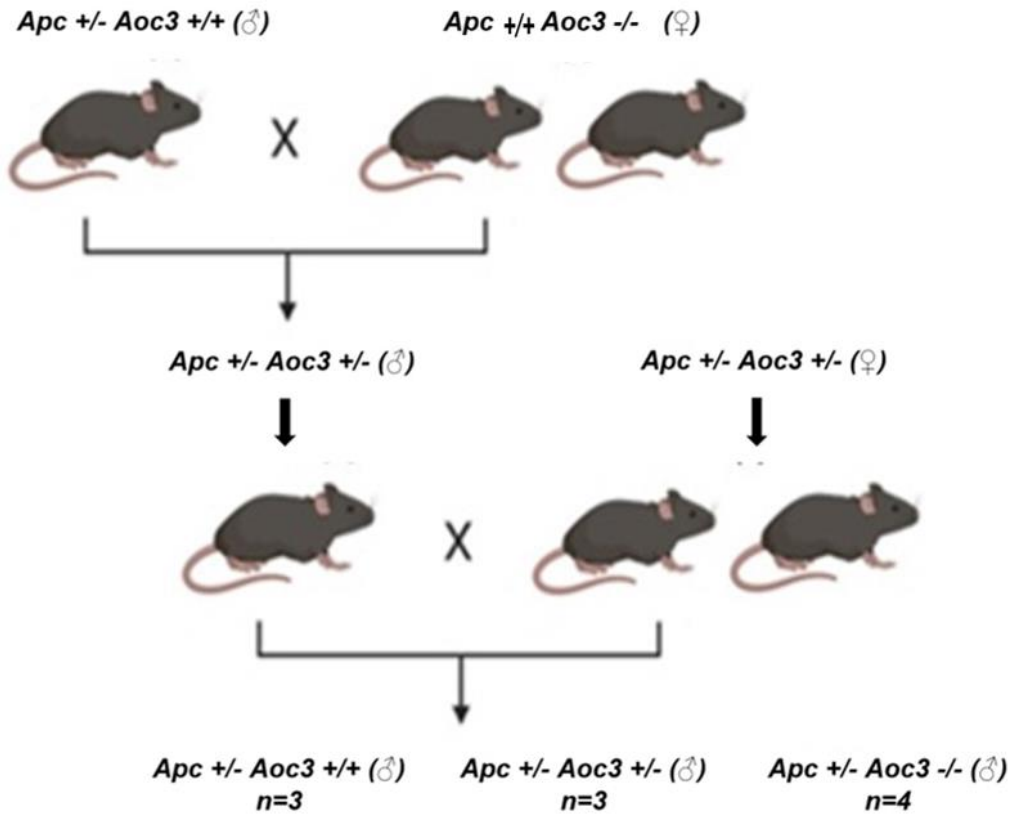
H&E boyaması yapılan kesitler histolojik olarak değerlendirilmiştir (**Şekil 4.18.**). AOM/DSS uygulanan WT farelerde yaklaşık 5 tane tümör gözlenmiş olup bunların 4 tanesi adenom 1 tanesi invaziv adenokarsinom şeklindedir. AOM/DSS uygulanan Aoc3^{-/-} farelerde ise yaklaşık 10 tane tümör gözlenmiş olup bunların 3 tanesi adenom 7 tanesi invaziv adenokarsinom şeklindedir.



Şekil 4.18. AOM/DSS uygulanan WT ve Aoc3^{-/-} fare kolonlarının H&E boyaması. A. AOM/DSS uygulanan WT fare kolon adenomasının H&E boyaması. Ölçek çubuğu: 100 μ m. B. AOM/DSS uygulanan Aoc3^{-/-} fare invaziv adenokarsinomunun H&E boyaması. Ölçek çubuğu: 100 μ m.

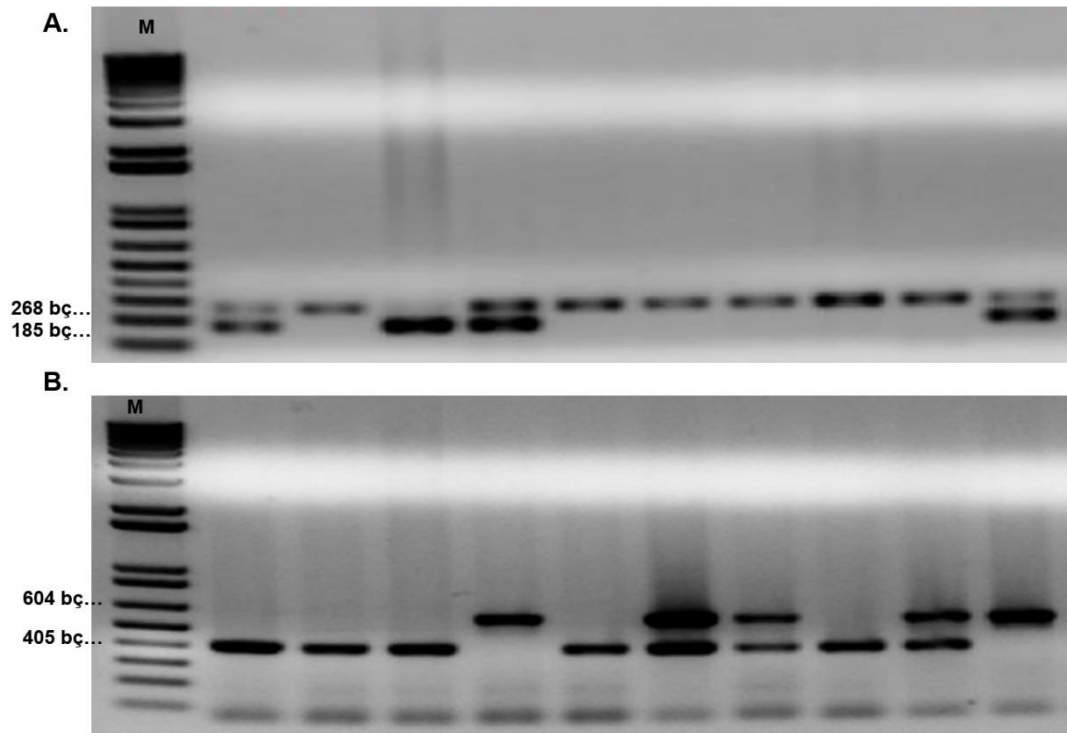
4.7. Apc +/- Arka Planında Aoc3'ün Kolon Tümörü Gelişimi Üzerine Etkisi

Deney düzeneğini oluşturmak için birçok çaprazlama ve genotipleme deneyleri yapılmıştır. Apc +/- Aoc3 +/+ x Apc +/+ Aoc3 -/- olan farelerle çaprazlanmış ve ilk olarak Apc +/- Aoc3 +/- fareler tanımlanmıştır. Daha sonra Apc +/- Aoc3 +/- erkek fareler ile Apc +/- x Aoc3 +/- dişi fareler çaprazlanmıştır. Bu kapsamda yapılan tüm çaprazlamalar **Şekil 4.19.**'de verilmiştir.



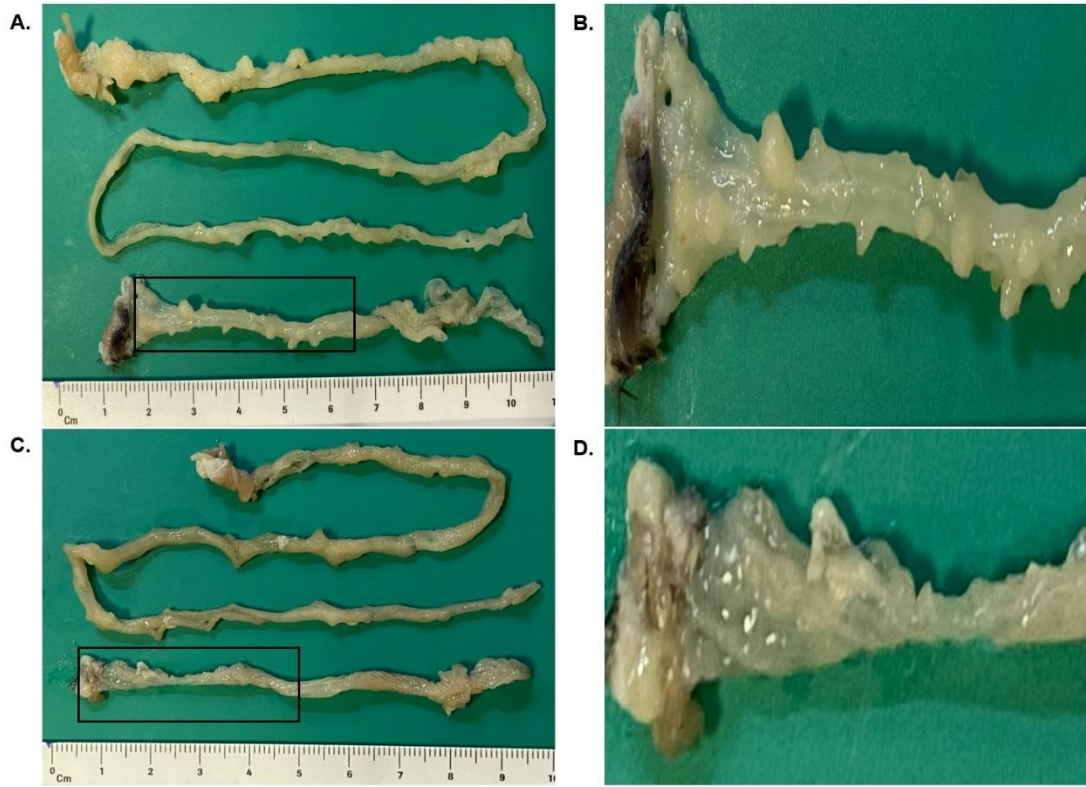
Şekil 4.19. Apc +/- arka planında Aoc3 +/+, Aoc3 +/- ve Aoc3 -/- farelerin elde edilmesi.

Elde edilen farelerin genotiplenmeleri oldukça zor olmuştur. Yaklaşık 3 haftalık olan yavruların kuyruk DNA izolasyonu yapılarak hem Apc primerleri ile multipleks PZR hem de Aoc3 primerleri ile multipleks PZR yapılmış ve aynı fare DNA'larının jel görüntüleri karşılaştırılmıştır. Ancak Aoc3 PZR jel görüntülerinde net bantlar elde etmek zor olmuştur. Bu yüzden deneyler 2-3 kere tekrar edilmiştir. Elde edilen Apc ve Aoc3 jel görüntüleri **Şekil 4.20'**da verilmiştir.



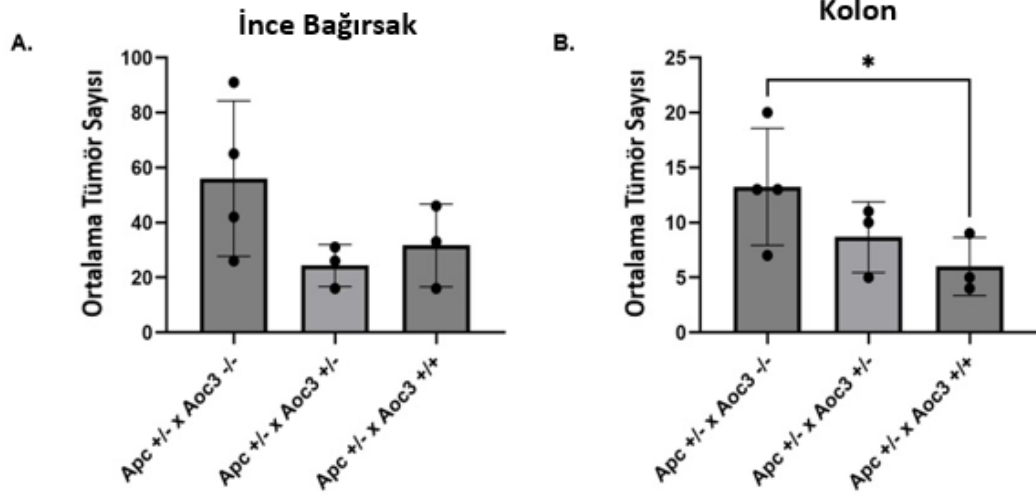
Şekil 4.20. Apc ve Aoc3 genotiplenmeleri sonucunda elde edilen jel görüntüleri.

Yaklaşık 18 hafta takip edilen gruplar takip süresi sonunda sakrifiye edilerek gastrointestinal sistemi çıkarılmıştır. Formol içerisinde bir gün fikse edilen intestinal sistemin ertesi gün kesit alınmadan önce makroskopik görüntüleri **Şekil 4.21**'de paylaşılmıştır.



Şekil 4.21. Apc +/- Aoc3-/- (A-B) ve Apc +/- Aoc3+/+ (C-D) Makroskopik Görüntüleri.

Farelerin polip dağılımları ve polip sayıları mikroskop altında incelenerek sonra makroskopi kağıdına not edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda intestinal ve kolondaki polip dağılımları **Şekil 4.22.**'de olduğu gibi bulunmuştur. **Tablo 4.6.**'da intestinal ve kolon polip dağılımları verilmiştir.

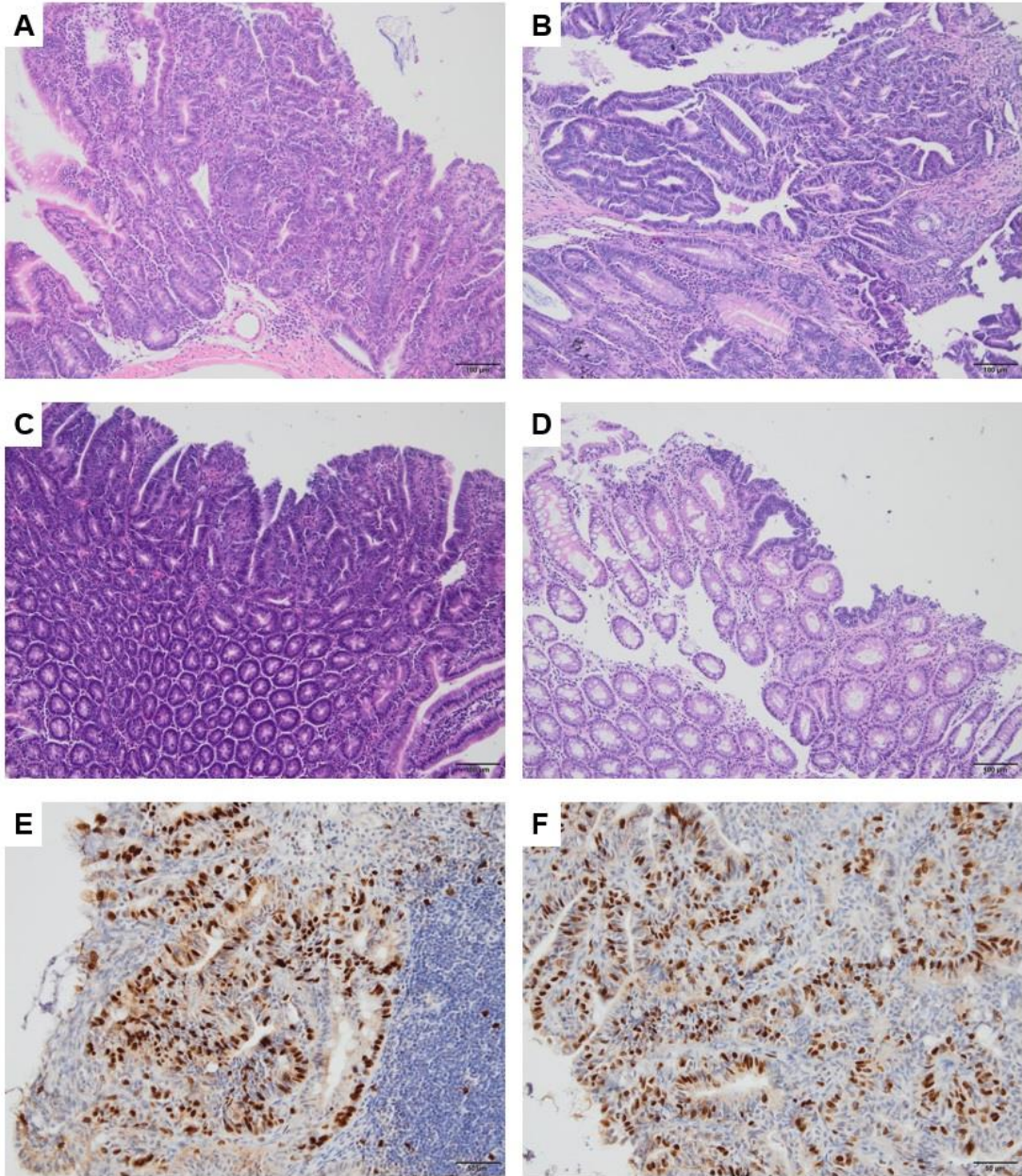


Şekil 4.22. Apc^{+/-} arka planında Aoc3^{+/+}, Aoc3^{+/-} ve Aoc3^{-/-} farelerin intestinal ve kolondaki polip dağılımları. (Kaplan-Meier analizi, *P<0,05)

İntestinal polip dağılımlarında Apc^{+/-} Aoc3^{-/-} farelerdeki polip sayısı Apc^{+/-} Aoc3^{+/+} farelere göre fazla olsa da istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır. Ancak yine iki grubun kolondaki polip sayıları karşılaştırıldığında Aoc3^{-/-} farelerin tümör sayısı fazla olup istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir.

Table 4.6. Apc +/- Aoc3 -/-, Apc +/- Aoc3 +/- and Apc +/- Aoc3 +/+ farelerde intestinal ve kolon poliplerinin ortalama sayısı. (SS: Standart Sapma, SH: Standart Hata)

Cinsiyet	Genotip	Ort. İntestinal Polip Sayısı	SS	SH
Male	Apc +/- Aoc3 -/-	56	28,3	0,51
Male	Apc +/- Aoc3 +/-	24,33	7,64	0,31
Male	Apc +/- Aoc3 +/+	31,67	15	0,48
Cinsiyet	Genotip	Ort. Kolon Polip Sayısı	SS	SH
Male	Apc +/- Aoc3 -/-	13,25	5,32	0,40
Male	Apc +/- Aoc3 +/-	8,67	3,21	0,37
Male	Apc +/- Aoc3 +/+	6	2,64	0,44



Şekil 4.23. $Apc^{+/-} Aoc3^{-/-}$ ve $Apc^{+/-} Aoc3^{+/+}$ farelerinde gastrointestinal sistemin H&E ve ince bağırsak adenomalarının BrdU boyaması. A. $Apc^{+/-} Aoc3^{-/-}$ ince bağırsak adenoması, B. $Apc^{+/-} Aoc3^{+/+}$ ince bağırsak adenoması, C. $Apc^{+/-} Aoc3^{-/-}$ kolon polibi, D. $Apc^{+/-} Aoc3^{+/+}$ kolon polibi, E. $Apc^{+/-} Aoc3^{-/-}$ ince bağırsak adenoması, F. $Apc^{+/-} Aoc3^{+/+}$ ince bağırsak Adenoması.

18 hafta boyunca takip edilen bu deney grupları histolojik olarak değerlendirildiğinde Apc +/- arka planında Aoc3-/- ve Aoc3 +/+ farelerinin tümörleri hem ince bağırsakta hem de kolonda adenomatöz morfoloji göstermiştir. Aynı zamanda Aoc3-/- ve Aoc3 +/+ farelerinde ince bağırsak adenomlarının BrdU boyaması sonucunda proliferasyon aktivitesi benzer sonuç göstermiştir (**şekil 4.23.**).

5. TARTIŞMA

Yapılan bu tez çalışması kapsamında Aoc3 ifadesinin DSS ile indüklenen kolit hastalığında, AOM/DSS ile indüklenen kolorektal kanserde ve Apc+/- mutant kanser fare modelindeki rolü araştırılmıştır. Yapılan birçok deney sonucunda Aoc3 mutant farelerin yabanıl farelere göre kolit ve kolon tümörü geliştirmeye daha yatkın olduğu gözlemlenmiştir.

Günümüze kadar Aoc3 birçok inflamatuvar hastalık ve farklı kanser türleri çerçevesinde incelenmiştir. Bu çalışmalar doğrultusunda Aoc3'ün meme, akciğer, mide kanseri gibi birçok kanser prognozunda önemli bir biyobelirteç (127-131), inflamatuvar hastalıkları için ise özellikle vasküler ve karaciğer inflamasyonlarında önemli bir terapötik hedef olduğu söylenmektedir (132-136). Aoc3'ün kolorektal kanser ile ilişkili rolü üzerine ise literatürde oldukça kısıtlı çalışma bulunmaktadır.

Bizim Aoc3 ile ilgili ilk gözlemimiz 2018 yılında Prof.Dr. Aytekin Akyol'un tez danışmanlığını yaptığı bir çalışma sırasında açığa çıkmıştır. Bu çalışma kapsamında kolorektal kanser vakalarındaki perikriptal ve subepitelyal miyofibroblastları tanımlamak için çeşitli biyobelirteçler taranmıştır. Aoc3 bu biyobelirteçlerden birisi olarak seçilmiş ve 28 tane kolorektal kanser vakasının 21 tanesinde Aoc3'ün kısmi stromal kaybı, 6 tane vakada ise tamamen kayıp olduğu bulunmuştur (83). Bunun üzerine Aoc3'ün kolit ilişkili inflamatuvar ve kolon kanser hastalıklarındaki rolünün daha detaylı araştırılması üzerine literatür taranmıştır.

Aoc3'ün inflamasyon hastalıklarındaki ifadeleri araştırıldığında özellikle kronik obstrüktif akciğer hastalıklarında, alkole bağlı olmayan steatohepatit gibi inflamatuvar karaciğer hastalıklarında ifadelerinin arttığı gözlenmiştir. Bu yüzden Aoc3 inhibisyonunun inflamasyon hastalıkları tedavisi için oldukça önemli bir role sahip olduğu görünmektedir (137,138). Bunun için birçok ilaç firması çeşitli Aoc3 inhibitörleri üretmiş ve bu inhibitörler inflamasyon ilişkili hastalıklarda denendiğinde inflamasyonu azalttığını gösteren birçok çalışma yayınlanmıştır. Jarnicki ve ark. tarafından 2016 yılında yapılan çalışmada hayvanlarda sigara dumanıyla kronik obstrüktif akciğer hastalık modeli geliştirilmiştir. PXS-4728A Semikarbazid duyarlı amin oksidaz inhibitörü ile meydana gelen havayolu inflamasyonu inhibe edilmiştir

(139). Yine Newsome ve ark. tarafından 2023 yılında yapılan çalışmada Klinik olarak Faz II aşamasında olan BI 1467335 Aoc3 inhibitörünün alkole bağlı olmayan steatohepatit hastalığına sahip kişilerde inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir (140).

Bu tez çalışmasında ise ilk olarak Aoc3 mutant farelerin genotipleri PZR yöntemiyle, WT farelere göre Aoc3 mutant farelerdeki Aoc3 mRNA seviyesindeki azalma RT-PZR ile doğrulanmış ve Aoc3 ifadesinin olmamasının intestine ve kolon üzerindeki etkisi histolojik olarak H&E boyaması ile değerlendirilmiştir. İkinci olarak DSS çok stabilize olmayan bir kimyasal olduğu için istenilen deney gruplarına uygulanmadan önce doz bağımlı bir optimizasyon deneyi yapılmıştır. Bu optimizasyon deneyinde DSS konsantrasyonları olarak %2, %2,5 ve %3'e karar verilmiştir. Aoc3^{-/-} mutant ve WT erkek farelere her bir grup için (n=2) olacak şekilde 6 tane kafes kurulmuştur. Optimizasyon deneyi için takip süresi 6 gün olarak belirlenmiş ve farelerin bu süreçte gaitaları, rektal kanamaları, kilo kayıpları ve sağ kalımları günlük takip edilmiştir. %3 DSS konsantrasyonu fareleri oldukça etkilemiştir. Kolit ilişkili kanser deneyinde DSS üç siklus şeklinde uygulanacağı için farelerin bu dozu tolere edemeyeceği düşünülmüştür. O yüzden akut kolit geliştirme kapsamında %2,5 DSS konsantrasyonuna, kolit-ilişkili kanser deneyi kapsamında ise %2DSS kullanılmasına karar verilmiştir. Daha sonra üçüncü olarak; Aoc3^{-/-} ve WT farelere DSS uygulanmış ve kolit gelişimi indüklenmiştir. Akut kolit geliştirme Aoc3 mutant farelerin inflamasyon sonucu kolit geliştirmeye daha yatkın olduğu bulunmuştur. Bu bulgu literatürdeki inflamasyon ilişkili birçok hastalıkla ilgili veriden farklıdır. Bizim çalışmamıza göre inflamatuvar bağırsak hastalıklarında tedavi olarak Aoc3'ün aktivasyonu gerekmektedir. Bununla ilgili olarak literatür tarandığında 1998 yılında Kurkijärvi ve ark. tarafından 2002 yılında yapılan çalışmada inflamatuvar karaciğer hastalıklarında artan soluble Aoc3 formu gözlenmişken, artan soluble Aoc3 ifadesinin romatoid artrit ve inflamatuvar bağırsak hastalıklarıyla bir ilişkisi olmadığı söylenmiştir (141). Benzer şekilde Koutroubakis ve ark. tarafından yapılan çalışmada da 161 inflamatuvar bağırsak hastalığına sahip hastalar (90 Ülseratif kolit, 71 Chron's hastalığı) ve 93 sağlıklı kişilerdeki soluble Aoc3 seviyesi araştırılmıştır. Soluble Aoc3 ifadelerinde istatistiksel olarak önemli bir farklılık gözlenmemiştir (142).

Sonuç olarak; Aoc3 herhangi bir hasar sonucunda intraselüler veziküllerinden çıkarak membran bağlı forma veya matriks metalloproteinazlar tarafından kesilerek soluble forma dönüşebilir. Hem adheziv hem de enzimatik fonksiyonu sonucunda oluşan formları inflamasyona katkı sağlamaktadır. Ancak Aoc3'ün Ülseratif Kolit ve Chron's hastalıklarını içeren inflamasyon ilişkili bağırsak hastalıklarındaki ifadeleri özellikle soluble formu oldukça çelişkilidir. Aoc3'ün lökosit trafiğinde rol oynadığı birçok çalışma tarafından desteklenmiş ancak hastalığın patogenizinin altında yatan mekanizmayı aydınlatmaya yönelik daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Aoc3'ün kolorektal kanserdeki rolü incelendiğinde ise yine benzer şekilde soluble ve membran bağlı formunun vakalardaki ifadesinin azaldığı yönündedir. Bu tez çalışmasında dördüncü olarak; Aoc3'ün kolit ilişkili kolon kanserindeki rolü araştırılmıştır.

Bu kapsamda literatür tarandığında, Ward ve ark. tarafından 2016 yılında yapılan çalışmada Aoc3'ün soluble ve membran bağlı formunun kolorektal kanserdeki değişimi araştırılmıştır. Kolorektal kanserli 31 hasta ve 31 kontrol grubundan oluşan bu çalışmada örneklerin serum seviyelerindeki soluble Aoc3 karşılaştırılmıştır. Membran bağlı Aoc3 seviyeleri ise immünohistokimya, RT-PZR ve Western Blot ile analiz edilmiştir. Sonuç olarak KRK gruplarındaki soluble Aoc3 seviyesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur. Membran bağlı Aoc3 seviyesi ise hem protein hem de mRNA düzeyinde değerlendirildiğinde KRK'lı hastalarda anlamlı şekilde düşük çıkmıştır. İmmünohistokimyasal boyama sonuçları da KRK vakalarında Aoc3 ifadesinin azaldığını gösterir niteliktedir (102).

Zawawi ve ark. tarafından 2023 yılında yapılan çalışma da tümör stromasında biriken kanser ilişkili fibroblastların kolorektal kanserde kötü prognozla ilişki olduğu ve kolonik fibroblast aktivasyon biyobelirteçleri olarak AOC3 ve LRRC17 gösterilmiştir. Miyofibroblastlar ve kanser ilişkili fibroblast hücre gruplarının tanımlanmasının zor olmasının sebebi; stroma içerisinde bu hücrelerin heterojenitesi ve spesifik olmayan bir ekspresyona sahip olmalarıdır. SW620 kolon kanseri hücre hattında TGF- β 1 ile fibroblast aktivasyonu yapıldığında SF kontrol gruplarına göre Aoc3 ifadesinin azaldığı gösterilmiştir (104).

Toiyama ve ark. tarafından 2009 yılında yapılan çalışmada 100 tane kolorektal kanserli hasta ve 33 normal gönüllünün serumlarındaki Aoc3 ifadesi ELİSA ile değerlendirilmiştir. İlk etapta KRK'lı hastalarda Aoc3 ifadesi kontrol grubuna göre yüksek bulunmasına rağmen, hastalığın ilerlemesiyle birlikte Aoc3 seviyesinde azaldığı gözlenmiştir (103).

Bu kapsamda yapılmış literatürde oldukça kısıtlı çalışma bulunmaktadır. Ancak olan çalışmalar kolorektal kanser ve hastalığın ilerlemesinde Aoc3 ifadesinin azaldığını göstermektedir. Ward ve ark. tarafından bu azalmanın sebebi olarak tümörlerin mikroçevresine anti tümör immün hücrelerin gelmesini engellemek amacıyla geliştirebilecekleri bir mekanizma olduğu öne sürülmüştür (102). 2018 yılında bizim tarafımızdan yapılan çalışma da literatürdeki bu bulguları desteklemektedir (83).

Bu tez çalışması kapsamında ise kolit ilişkili kolon kanseri geliştirmek için Aoc3-/- ve WT genotipindeki C57BL/6 erkek farelere AOM/DSS uygulanmıştır. Deney grupları hem WT hem Aoc3-/- genotipi için Kontrol (%0,9 NaCl, %2 DSS, AOM (10mg/ml) ve AOM/DSS şeklinde oluşturulmuştur. AOM/DSS uygulaması için; AOM (10mg/ml) intraperitoneal enjeksiyon yapılmış ve 1 hafta beklenmiştir. Daha sonra 14gün sürecek (5gün DSS'li su ve 9 gün normal su) ilk DSS siklusu başlatılmıştır. Bu siklus üç kez yapılmıştır ve daha sonra hayvanlar 14 hafta boyunca takip edilmiştir. Bu deney kapsamında DSS uygulamasında en çok dikkat edilen şey DSS'nin her siklus için taze hazırlanması olmuştur. Ayrıca fare günlük su tüketimi günlük 5ml olacak şekilde düşünülerek kafesteki fare sayısı kadar miktar hesaplanmış ve ilk 5 günlük siklusa yetecek kadar DSS hazırlanmıştır. DSS verildiği dönemlerde günlük takip yapılmış ve hayvanların susuz kalmaması veya su ile ilgili herhangi bir problem yaşamamalarına özellikle dikkat edilmiştir.

Sonuç olarak; 14 hafta boyunca takip edilen farelerde DSS verilen süreçlerde kilo kayıpları çok fazla olmuş ancak normal suya döndüklerinde vücut ağırlıklarını tekrar toplamışlardır. Süreç sonunda yalnız DSS uygulanan ve AOM/DSS uygulanan hem WT hem de Aoc3 mutant farelerin distal kolonlarında polip gelişimi gözlenmiştir. AOM/DSS uygulanan WT ve Aoc3-/- gruplarında ise makroskopik olarak da polip

gelişimi meydana gelmiştir. Histolojik olarak incelendiğinde ise AOM/DSS uygulanan WT farelerde 5 tane tümör gelişirken bunların 4 tanesi adenom 1 tanesi invaziv adenokarsinom, Aoc3 mutant farelerde 10 tane tümör gelişmiş 3'ü adenom 7 tanesi invaziv adenokarsinom formundadır. Sonuç olarak; Yalnız DSS ve AOM/DSS uygulanan Aoc3^{-/-} mutant farelerin kolon polipi geliştirmeye daha yatkın olduğu gösterilmiştir.

Kolorektal kanserde Aoc3'ün rolüne ilişkin tüm bulgular bizim verilerimizin tersi yönündedir. Bunun üzerine beşinci ve son olarak Apc mutasyonu ile Wnt aktivasyonu sağlanmış kolon kanseri fare modelinde Aoc3'ün rolü araştırılmıştır. Bunun için 2018 yılında laboratuvarımızda üretilen Apc +/- kullanılmış ve Aoc3 +/- farelerle çaprazlanarak Apc +/- arka planında Aoc3^{+/+}, Aoc3^{+/-} ve Aoc3^{-/-} farelerin genotipleri doğrulanarak gruplar oluşturulmuştur. Yaklaşık 18 hafta takip edilen bu grupların sakrifiye edildikten sonra gastrointestinal sistemleri makroskopik ve histolojik olarak değerlendirilmiştir. Yine Apc +/- Aoc3^{-/-} farelerdeki polip sayısı hem kolon hem de ince bağırsak için Apc +/- Aoc3^{+/+} fareler göre yüksek bulunmuştur.

Tüm bu bulgulardan yola çıkarak inflamatuvar bağırsak hastalıklarında ve kolorektal kanserde Aoc3 inhibisyonu yerine Aoc3 aktivasyonu tedavi yöntemi olarak kullanılabilir. Bu nedenle Aoc3 aktivasyonunun in vitro ve in vivo modellerde daha fazla çalışılması gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, Aoc3'ün inflamatuvar ve neoplastik kolon hastalıklarındaki rolü incelenmiştir. Bunun için ilk olarak C57BL/6 Aoc3^{-/-} mutant fareler Finlandiya'da yer alan Turku Üniversitesi'nden ithal edilmiş ve genotipleri doğrulanmıştır. Ayrıca çalışma kapsamında Apc^{+/-} fareler kullanılmış ve genotiplemeleri oldukça sık ve rahat bir şekilde yapılan bu Apc^{+/-} fareler 2018 yılında CRISPR/Cas9 sistemi ile laboratuvarımızda üretilmiştir. Bu tez kapsamında; Aoc3 mutant farelerin DSS ile indüklenen kolit, AOM/DSS ile indüklenen kolit ilişkili kolon kanseri ve Apc^{+/-} kolon kanseri fare modellerindeki rolü araştırılmıştır. DSS konsantrasyon optimizasyonu deneyleri sonucunda %2 DSS ile akut kolit modeli geliştirilmiştir. %2,5 DSS uygulanan Aoc3^{-/-} farelerin için kolite daha yatkın oldukları tespit edilmiştir. Kolit ilişkili kanser geliştirmek için oluşturulan gruplar analiz edildiğinde ise yalnız %2 DSS ve AOM/DSS verilen farelerin Aoc3^{-/-} farelerde WT farelere göre daha fazla polip geliştirdiği bulunmuştur. Bu durum bize aynı zamanda Aoc3^{-/-} farelerin kolonik tümörogeneye daha yatkın oldukları göstermektedir. Bu bulgular literatürde Aoc3'ün inflamatuvar bağırsak hastalıkları ve kolon kanseri üzerindeki etkilerine yönelik yapılan çalışmalardan farklılık göstermiştir. Literatürde bu hastalıklara yönelik Aoc3 inhibitörleri kullanılmasına karşın bu bulgular doğrultusunda tedavi kapsamında Aoc3 aktivasyonu sağlayarak in vitro ve in vivo çalışmalarla daha detaylı araştırmaların yapılması ve sürecin aydınlatılması gerekmektedir.

Son on yılda Aoc3'ün biyobelirteç olarak kullanımıyla ilgili çalışmalar artmaya başlamıştır. Aoc3, inflamatuvar hastalıklarında potansiyel bir terapötik ve kolon kanserinde yeni bir biyobelirteç olarak görülmektedir. İntestinal kök hücre nişinde yer alan miyofibroblastların tanımlanması burada yer alan fibroblast popülasyonunun heterojenliğinden dolayı oldukça zordur. Neoplastik kolon hastalıklarında miyofibroblastlardaki Aoc3 ifadesinin azalması onu potansiyel bir biyobelirteç haline getirmektedir. İyi bir biyobelirteç olduğuna dair birçok yayın olmasına rağmen, hastalık patogenezindeki moleküler mekanizması detaylı bir şekilde araştırılmalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. Kolligs F.T. Diagnostics and Epidemiology of Colorectal Cancer. *Viszeralmedizin* 2016;32 (3): 158–164.
2. Stintzing S. Management of colorectal cancer. *F1000Prime Rep.* 2014; 6: 108.
3. Simon K. Colorectal cancer development and advances in screening. *Clin Interv Aging.* 2016 Jul 19;11:967-76.
4. Sawicki T, Ruszkowska M, Danielewicz A, Niedźwiedzka E, Arłukowicz T, Przybyłowicz K.E. A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. *Cancers (Basel).* 2021 May; 13(9): 2025.
5. Tariq K, Ghias K. Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer Biol Med.* 2016 Mar; 13(1): 120–135.
6. Bugter JM, Fenderico N, Maurice MM. Mutations and mechanisms of WNT pathway tumour suppressors in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2021; 21:5–21.
7. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Dieste AP, Cerrada E, Rodriguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2017 Jan; 18(1): 197.
8. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, Fishel R, Lindor NM, Burgart LJ, Hamelin R. Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J. Natl. Cancer Inst.* 2004, 96, 261–268.
9. Westdorp H, Fennemann FL, Weren DAR, Bisseling TM, Ligtenberg MJL, Figdor CG, Schreiber G, Hoogerbrugge N, Wimmers F, Vries IJM. Opportunities for immunotherapy in microsatellite unstable colorectal cancer. *Focused Research Review* 2016; 65: 1249–1259.
10. Nusse R, Brown A, Papkoff J, Scambler P, Shackleford G, McMahon A, et al. A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family. *Cell.* 1991 Jan 25;64(2):231.
11. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* 2010 Jun;138(6):2059-72.
12. Alzahrani SM, Doghaither HA, Al-Ghafari AB. General insight into cancer: An overview of colorectal cancer. *Molecular and Clinical Oncology* 2021; 15:6.
13. Fodde R, Smits R, Clevers H. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2001; 11:55–67.
14. Beroud C, Soussi T. APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res* 1996; 24:121–124.
15. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87:159–170.

16. Aoki K, Taketo MM. Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. *Journal of Cell Science* 2007; 120(19):3327–3335.
17. Zeineldin M, Neufeld KL. Understanding phenotypic variation in rodent models with germline Apc mutations. *Cancer Res* 2013; 73(8):2389–2399.
18. Zeineldin M, Neufeld KL. More than two decades of Apc modeling in rodents. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1836(1):80–89.
19. Su LK, Kinzler KW, Vogelstein B, et al. Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science* 1992; 256(5057):668–670.
20. Cheung AF, Carter AM, Kostova KK, et al. Complete deletion of Apc results in severe polyposis in mice. *Oncogene* 2010; 29(12):1857–1864.
21. Hinoi T, Akyol A, Theisen BK, et al. Mouse model of colonic adenoma-carcinoma progression based on somatic Apc inactivation. *Cancer Res* 2007; 67(20):9721–9730.
22. Xue Y, Johnson R, Desmet M, et al. Generation of a transgenic mouse for colorectal cancer research with intestinal Cre expression limited to the large intestine. *Mol Cancer Res* 2010; 8(8):1095–1104.
23. Zhang L, Shay JW. Multiple Roles of APC and its Therapeutic Implications in Colorectal Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2017 Aug 1;109(8):djjw332.
24. Gok A, Isik A, Bakir S, Uzun S, Guner G, Ozcan O, Cerci B, Onbaşilar I, Akyol A. Role of Reduced Bdnf Expression in Novel Apc Mutant Allele-induced Intestinal and Colonic Tumorigenesis in Mice. *In Vivo* July 2023, 37 (4) 1562-1575.
25. Uzun S, Ozcan O, Gok A, Isik A, Bakir S, Gunel-Ozcan A, Onbasilar I, Akyol A. A new CRISPR-mediated Apc Knockout Allele leads to Pyloric Gland Adenoma-like Gastric Polyps in the Mice with C57BL/6; FVB/N Mixed Background. *Animal Models and Experimental Medicine*, 2024. Manuscript ID AMEM-2024-0107. (in the process of publication)
26. Fantini MC, Guadagni I. From inflammation to colitis-associated colorectal cancer in inflammatory bowel disease: Pathogenesis and impact of current therapies. *Digestive and Liver Disease* 2021 May; 53(5): 558-565.
27. T. Ullman, R. Odze, and F. A. Farraye, “Diagnosis and management of dysplasia in patients with ulcerative colitis and Crohn’s disease of the colon,” *Inflammatory Bowel Diseases*, vol. 15, pp. 630–638, 2009.
28. S. H. Itzkowitz and X. Yio, “Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation,” *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 287, pp. G7–17, 2004.
29. D. E. Aust, J. P. Terdiman, R. F. Willenbacher et al., “The APC/beta-catenin pathway in ulcerative colitis-related colorectal carcinomas: a mutational analysis,” *Cancer*, vol. 94, pp. 1421–1427, 2002.

30. S. H. Itzkowitz, "Molecular biology of dysplasia and cancer in inflammatory bowel disease," *Gastroenterology Clinics of North America*, vol. 35, pp. 553–571, 2006.
31. S. A. Azer, "Overview of molecular pathways in inflammatory bowel disease associated with colorectal cancer development," *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, vol. 25, pp. 271–281, 2013.
32. Luo C, Zhang H. The Role of Proinflammatory Pathways in the Pathogenesis of Colitis-Associated Colorectal Cancer. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:5126048.
33. Schmitt M, Greten FR. The inflammatory pathogenesis of colorectal cancer. *Nature Reviews Immunology* 2021: volume 21, pages653–667.
34. Mariani F, Sena P, Roncucci L. Inflammatory pathways in the early steps of colorectal cancer development. *World J Gastroenterol*. 2014 Aug 7; 20(29): 9716–9731.
35. Zhang YZ, Li YY. Inflammatory Bowel disease: Pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 2014 Jan 7; 20(1): 91–99.
36. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Dietel M, Lochs H. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2002 Jan;122(1):44-54.
37. Fakhoury M, Negrulj R, Mooranian A, Al-Salami H. Inflammatory Bowel disease: clinical aspects and treatments. *J Inflamm Res*. 2014 Jun 23;7:113-20.
38. Mills SE: *Histology for Pathologist*. 4th ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2012.
39. Gehart H, Clevers H. Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2019; volume 16, pages19–34.
40. Langner C, Magro F, Driessen A, Ensari A, Mantzaris GJ, Villanacci V, Becheanu G, Nunes PB, Cathomas G, Fries W, Jouret-Mourin A, Mescoli C, Petris G, Rubio CA, Shepherd NA, Vieth M, Eliakim R, Geboes K. The histopathological approach to inflammatory bowel disease: a practice guide. *Virchows Archiv* 2014 Feb; 464: 511-527.
41. Stramer BM, Mori R, Martin P. The inflammation-fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair. *J Invest Dermatol*. 2007; 127:1009–1017.
42. Van LS Miteva K, Tschöpe C. Crosstalk between fibroblasts and inflammatory cells. *Cardiovasc Res*. 2014; 102:258–269.
43. Robb CT, Regan KH, Dorward DA, Rossi AG. Key mechanisms governing resolution of lung inflammation. *Semin Immunopathol*. 2016; 38:425–448.
44. Huang C, Šali A, Stevens RL. Regulation and Function of Mast Cell Proteases in Inflammation. *J Clin Immunol*. 1998; 18:169–183.

45. Aggrey AA, Srivastava K, Ture S, Field DJ, Morrell CN. Platelet induction of the acute-phase response is protective in murine experimental cerebral malaria. *J Immunol.* 2013; 190:4685–4691.
46. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, Zhao L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget.* 2018 Jan 23; 9(6): 7204–7218.
47. Meran L, Baulies A, Li VS. Intestinal Stem Cell Niche: The Extracellular Matrix and Cellular Components. *Stem Cells Int.* 2017:2017:7970385.
48. M. Bjerknes, H. Cheng, The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. I. Evidence from Paneth cells in the adult mouse, *Am. J. Anat.* 1981; 160:51–63.
49. Simons BD, Clevers H. Stem cell self-renewal in intestinal crypt. *Experimental Cell Research* 2011: 317 (19) 2719-2724.
50. Louvard D, Kedinger M, Hauri HP. The Differentiating Intestinal Epithelial Cell: Establishment and Maintenance of Functions Through Interactions Between Cellular Structures. 1992; 8: 157-195.
51. Birchenough GM, Johansson ME, Gustafsson JK, Bergström JH, Hansson GC. New developments in goblet cell mucus secretion and function. *Mucosal Immunol.* 2015 Jul;8(4):712-9.
52. Zhou J, Zhang W, Liu W, Sheng J, Li M, Chen X, Dong R. Histological study of intestinal goblet cells, IgA, and CD3+ lymphocyte distribution in Huang-huai white goat. *Folia Morphol (Warsz).* 2020;79(2):303-310.
53. Kim YS, Ho SB. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep.* 2010 Oct;12(5):319-30.
54. Gribble FM, Reimann F. Enteroendocrine Cells: Chemosensors in the Intestinal Epithelium. *Annual Review of Physiology* 2016;78: 277-299.
55. Li HJ, Ray SK, Singh NK, Johnston B, Leiter AB. 29. 2011. Basic helix-loop-helix transcription factors and enteroendocrine cell differentiation. *Diabetes Obes. Metab.* 13: Suppl. 15–12.
56. Wang J, Cortina G, Wu SV, Tran R, Cho JH. 32. et al. 2006. Mutant neurogenin-3 in congenital malabsorptive diarrhea. *N. Engl. J. Med.* 355:270–80.
57. López-Díaz L, Jain RN, Keeley TM, VanDussen KL, Brunkan CS. 31. et al. 2007. Intestinal Neurogenin 3 directs differentiation of a bipotential secretory progenitor to endocrine cell rather than goblet cell fate. *Dev. Biol.* 309:298–305.
58. May CL, Kaestner KH. 30. 2010. Gut endocrine cell development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 323:70–75.

59. Hendel SK, Kellermann L, Hausmann A, Bindlev N, Jensen KB, Nielsen OH. Tuft Cells and Their Role in Intestinal Diseases. *Front Immunol*. 2022 Feb 14;13:822867.
60. Su J, Chen T, Ji X-Y, Liu C, Yadav PK, Wu R, et al. IL-25 Downregulates Th1/Th17 Immune Response in an IL-10 – Dependent Manner in Inflammatory Bowel Disease. *Inflammation Bowel Dis* (2013) 19:720–8.
61. Liu Y, Shao Z, Shangguan G, Bie Q, Zhang B. Biological Properties and the Role of IL-25 in Disease Pathogenesis. *J Immunol Res* (2018) 2018:6519465.
62. Wehkamp J, Stange EF. Paneth's disease. *J Crohns Colitis*. 2010; 4:523–531.
63. Gassler N. Paneth cells in intestinal physiology and pathophysiology. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2017 Nov 15; 8(4): 150–160.
64. Clevers H, Bevins CL. Paneth Cells: Maestros of the Small Intestinal Crypts. 2013 Feb. 75:289-311.
65. Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. 2009;9(7), 489–499.
66. Cheng H, Leblond CP. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am J Anat*. 1974; 141:537–561.
67. Bjerknes M, Cheng H. Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. *Gastroenterology*. 1999; 116:7–14.
68. Potten CS. Extreme sensitivity of some intestinal crypt cells to X and gamma irradiation. *Nature*. 1977; 269:518–521.
69. Barker N, van Es JH, Kuipers J, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene LGR5. *Nature*. 2007; 449:1003–1008.
70. Pizarro TT, Arseneau KO, Cominelli F. Lessons from genetically engineered animal models XI Novel mouse models to study pathogenic mechanisms of Crohn's disease. *Am J Physiol*. 2000;278: G665–G669.
71. Umar S. Intestinal Stem Cells. *Curr Gastroenterol Rep*. 2010 Oct; 12(5): 340–348.
72. Pinchuk IV, Mifflin RC, Saada JI, Powell DW. Intestinal Mesenchymal Cells. *Curr Gastroenterol Rep*. 2010 Oct; 12(5): 310–318.
73. Roulis M, Flavell RA. Fibroblasts and myofibroblasts of the intestinal lamina propria in physiology and disease. *Differentiation*. 2016 Sep;92(3):116-131.

74. Bamba, S., Andoh, A., Yasui, H., Araki, Y., Bamba, T., Fujiyama, Y., 2003. Matrix metalloproteinase-3 secretion from human colonic subepithelial myofibroblasts: role of interleukin-17. *J. Gastroenterol.* 38, 548–554.
75. Okuno T, Andoh A, Bamba A, Araki Y, Fujiyama Y, Fujiyama M, Bamba T. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha induce chemokine and matrix metalloproteinase gene expression in human colonic subepithelial myofibroblasts. *Scand J Gastroenterol.* 2002 Mar;37(3):317-24.
76. Kojima M, Ochiai A. Special cancer microenvironment in human colonic cancer: Concept of cancer microenvironment formed by peritoneal invasion (CMPI) and implication of subperitoneal fibroblast in cancer progression. *Pathology International*,2016: 66, 123-131.
77. Maeshima A, M., Tochigi N, Yoshida A, Asamura H, Tsuta K, Tsuda, H. Histological scoring for small lung adenocarcinomas 2 cm or less in diameter: A reliable prognostic indicator. *Journal of Thoracic Oncology*, 2002: 5, 333-339.
78. Tsujino T, Seshimo I, Yamamoto H, Ngan CY, Ezumi K, Takemasa I, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M. Stromal myofibroblasts predict disease recurrence for colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2007 Apr 1;13(7):2082-90.
79. Tothill RW, Tinker AV, George JG, Brown R, Fox SB, Lade S, Johnson DS, Trivett MK, Etemadmoghadam D, Locandro B, Traficante N, Fereday S, Hung JA, Chiew YE, Haviv I, Gertig D, DeFazio A, Bowtell DDL. Novel molecular subtypes of serous and endometrioid ovarian cancer linked to clinical outcome. *Clin Cancer Res.* 2008 Aug 15;14(16):5198-208.
80. Ootani A, Li X, Sangiorgi E, Ho Q, Ueno H, Toda S, Sugihara H, Fujimoto K, Weissman IL, Capecchi MR, Kuo CJ. Sustained in vitro intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche. *Nat Med.* 2009 Jun;15(6):701-6.
81. Farmer P, Bonnefoi H, Anderle P, Cameron D, Wirapati P, Becette V, André S, Piccart M, Campone M, Brain E, Macgrogan G, Petit T, Jassem J, Bibeau F, Blot E, Bogaerts J, Aguet M, Bergh J, Iggo R, Delorenzi M. A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Nat Med.* 2009 Jan;15(1):68-74.
82. Hsia LT, Ashley N, Ouaret D, Wang LM, Wilding J, Bodmer WF. Myofibroblasts are distinguished from activated skin fibroblasts by the expression of AOC3 and other associated markers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Apr 12;113(15):E2162-71.
83. Katipoglu K. Kolonik Subepitelyal ve Perikriptal Myofibroblastlar için İmmünohistokimyasal Belirteçlerin Tanımlanması ve Neoplastik Süreçteki İfadelerinin Araştırılması. *Uzmanlık Tezi (2019).*

84. Boyer DS, Rippmann JF, Ehrlich MS, Bakker RA, Chong V, Nguyen QD. Amine oxidase copper-containing 3 (AOC3) inhibition: a potential novel target for the management of diabetic retinopathy. *International Journal of Retina and Vitreous*. 2021;7;20.
85. Stolen CM, Marttila-Ichihara F, Koskinen K, Yegutkin GG, Turja R, Bono P, Skurnik M, Hänninen A, Jalkanen S, Salmi M. Absence of the endothelial oxidase AOC3 leads to abnormal leukocyte traffic in vivo. *Immunity*. 2005 Jan;22(1):105-15.
86. Dunkel J, Aguilar-Pimentel JA, Ollert M, Fuchs H, Gailus-Durner V, Hrabě de Angelis M, Jalkanen S, Salmi M, Veres TZ. Endothelial amine oxidase AOC3 transiently contributes to adaptive immune responses in the airways. *Eur. J. Immunol*. 2014. 44: 3232–3239.
87. Salmi, M. and Jalkanen, S., A 90-kilodalton endothelial cell molecule mediating lymphocyte binding in humans. *Science*1992.257: 1407–1409.
88. Smith, D. J., Salmi, M., Bono, P., Hellman, J., Leu, T. and Jalkanen, S., Cloning of vascular adhesion protein 1 reveals a novel multifunctional adhesion molecule. *Exp. Med*.1998.188: 17–27.
89. Pannecoeck R, Serruys D, Benmeridja L, Delanghe JR, van Geel N, Speeckaert R, Speeckaert MM: Vascular adhesion protein-1: Role in human pathology and application as a biomarker. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2015, 52:284-300.
90. Airene TT, Nymalm Y, Kidron H, Smith DJ, Pihlavisto M, Salmi M, Jalkanen S, Johnson MS, Salminen TA. Crystal structure of the human vascular adhesion protein-1: Unique structural features with functional implications. *Protein Sci*. 2005 Aug; 14(8): 1964–1974.
91. Jalkanen S, Salmi M. VAP-1 and CD73, endothelial cell surface enzymes in leukocyte extravasation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Jan;28(1):18-26.
92. Raimondi L, Pirisino, R. Ignesti, G.; Capecchi, S.; Banchelli, G.; Buffoni, F. Semicarbazide-sensitive amine oxidase activity (SSAO) of rat epididymal white adipose tissue. *Biochem Pharmacol* 1991, 41, 467-470,
93. Zorzano A, Palacín M, Marti L, García-Vicente S. Arylalkylamine vanadium salts as new anti-diabetic compounds. *J Inorg Biochem*. 2009 Apr;103(4):559-66.
94. O'Rourke AM, Wang EY, Miller A, Podar EM, Scheyhing K, Huang L, Kessler C, Gao H, Ton-Nu HT, MacDonald MT, Jones DS, Linnik MD. Anti-Inflammatory Effects of LJP 1586 [Z-3-Fluoro-2-(4-methoxybenzyl) allylamine Hydrochloride], an Amine-Based Inhibitor of Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase Activity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* February 2008, 324

- (2) 867-875.95. H.L. Xu, L. Salter-Cid, M.D. Linnik, E.Y. Wang, C. Paisansathan, D.A. Pelligrino, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 317 (2006) 19–29.
95. Lyles GA, Marshall CMS, McDonald IA, Bey P, Ralfreyman MG. Inhibition of rat aorta semicarbazide-sensitive amine oxidase by 2-phenyl-3-haloallylamines and related compounds. *Biochem Pharmacol* 1987; 36:2847–53.
96. Kirton CM, Laukkanen ML, Nieminen A, Merinen M, Stolen CM, Armour K, Smith DJ, Salmi M, Jalkanen S, Clark MR. Function-blocking antibodies to human vascular adhesion protein-1: a potential anti-inflammatory therapy. *Eur J Immunol.* 2005 Nov;35(11):3119-30.
97. Obata T. Diabetes and semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) activity: A review. *Life Sciences* 2006 June :79(5); 417-422.
98. Kinemuchi H, Sugimoto H, Obata T, Satoh N, Ueda S. Selective inhibitors of membrane-bound semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) activity in mammalian tissues. *Neurotoxicology.* 2004 Jan;25(1-2):325-35.
99. Autio A, Vainio PJ, Suilamo S, Mali A, Vainio J, Saanijoki T, Nojonen T, Ahtinen H, Luoto P, Teräs M, Jalkanen S, Roivainen A. Preclinical Evaluation of a Radioiodinated Fully Human Antibody for In Vivo Imaging of Vascular Adhesion Protein-1–Positive Vasculature in Inflammation. *J. Nucl. Med.* 54 (2013) 1315–1319.
100. Salter-Cid L, Wang E, O'Rourke AM, Miller A, Gao H, Huang L, Garcia A, Linnik MD. Anti-Inflammatory Effects of Inhibiting the Amine Oxidase Activity of Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2005: 315(2), 553–562.
101. Cui, Y. (2020). Epithelial and subepithelial players in chronic intestinal disease. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.
102. Ward ST, Weston CJ, Shepherd EL, Hejmadi R, Ismail T, Adams DH. Evaluation of serum and tissue levels of VAP-1 in colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2016 Feb 24;16:154.
103. Toiyama Y, Miki C, Inoue Y, Kawamoto A, Kusunoki M. Circulating form of human vascular adhesion protein-1 (VAP-1): Decreased serum levels in progression of colorectal cancer and predictive marker of lymphatic and hepatic metastasis. *Journal of Surgical Oncology*, 2009: 99(6): 368-372.
104. Zawawi SSA, Azram NASM, Sulong S, Zakaria AD, Lee YY, Jalil NAC, Musa Identification of AOC3 and LRRC17 as Colonic Fibroblast Activation Markers and Their Potential Roles in Colorectal Cancer Progression. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2023; 24(9): 3099–3107.

105. Miao YD, Quan WX, Dong X, Gan J, Ji CF, Wang JT, Zhang F. Prognosis-related metabolic genes in the development of colorectal cancer progress and perspective. *Gene*. 2023 Apr 30;862:147263.
106. Arnesen H, Müller MHB, Aleksandersen M, Østby GC, Carlsen H, Paulsen JE, Boysen P. Induction of colorectal carcinogenesis in the C57BL/6J and A/J mouse strains with a reduced DSS dose in the AOM/DSS model. 2021 July: 37:19.
107. Okayasu, I. Dysplasia and carcinoma development in a repeated dextran sulfate sodium-induced colitis model. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2002: 17, 1078-1083.
108. Kanneganti, M., Mino-Kenudson, M., Mizoguchi, E. Animal models of colitis-associated carcinogenesis. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011: 342637.
109. Neufert, C., Becker, C., Neurath, M. F. An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nat. Protoc.* 2, 1998-2004 (2007).
110. Tanaka, T. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci.* 94, 965-973 (2003).
111. Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, Vijay-Kumar M. Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice. *Curr. Protoc. Immunol.* 104:15.25.1-15.25.14.
112. Poritz LS, Garver KI, Green C, Fitzpatrick L, Ruggiero F, Koltun, WA. Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. *J. Surg. Res.* 2007:140:12- 19.
113. Yan Y, Kolachala V, Dalmaso G, Nguyen H, Laroui H, Sitaraman SV, Merlin D. Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. *PLoS ONE* 2009:4: e6073.
114. Chen J, Huang XF. The signal pathways in azoxymethane-induced colon cancer and preventive implications. *Cancer Biology & Therapy*, 2009:8:14, 1313-1317.
115. Stastna M, Janeckova L, Hrckulak D, Kriz V, Korinek V. Human Colorectal Cancer from the Perspective of Mouse Models. *Genes (Basel)*. 2019 Oct; 10(10): 788.
116. Rosenberg DW, Giardina C, Tanaka T. Mouse models for the study of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, Volume 30, Issue 2, February 2009, Pages 183–196.
117. Waly MI, Al-Rawahi AS, Riyami MA, Al-Kindi MA, Al-Issaei HK, Farooq SA, Al-Alawi A, Rahman MS. Amelioration of azoxymethane induced-carcinogenesis

by reducing oxidative stress in rat colon by natural extracts *Complementary and Alternative Medicine* 2014: volume 14, Article number: 60.

118. Whetstone RD, Wittel UA, Michels NM, Gulizia JM, Gold B. Colon carcinogenesis in wild type and immune compromised mice after treatment with azoxymethane, and azoxymethane with dextran sodium sulfate. *Molecular Carcinogenesis* 2016;55(7): 1187-1195.
119. Velázquez KT, Enos RT, Carson MS, Cranford TL, Bader JE, Chatzistamou I, Singh UP, Nagarkatti PS, Nagarkatti M, Davis JM, Carson JA, Murphy AE. Weight loss following diet-induced obesity does not alter colon tumorigenesis in the AOM mouse model. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2016;311(4): G699-G712.
120. Uyar A, Doğan A, Yaman T, Keleş ÖF, Yener Z, Çelik İ, Alkan EE. The Protective Role of *Urtica dioica* Seed Extract Against Azoxymethane-Induced Colon Carcinogenesis in Rats. *Nutr Cancer*. 2022;74(1):306-319.
121. Suzuki R, Kohno H, Sugie S, Nakagama H, Tanaka T. Strain differences in the susceptibility to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis*. 2006 Jan;27(1):162-9.
122. Hong Y, Chen B, Zhai X, Qian Q, Gui R, Jiang C. Integrated analysis of the gut microbiome and metabolome in a mouse model of inflammation-induced colorectal tumors. *Front Microbiol*. 2023 Jan 13;13:1082835.
123. Pan D, Huang B, Gan Y, Gao C, Liu Y, Tang Z. Phycocyanin Ameliorates Colitis-Associated Colorectal Cancer by Regulating the Gut Microbiota and the IL-17 Signaling Pathway. *Mar Drugs*. 2022 Apr 9;20(4):260.
124. Chen H, Ye C, Cai B, Zhang F, Wang X, Zhang J, Zhang Z, Guo Y, Yao Q. Berberine inhibits intestinal carcinogenesis by suppressing intestinal pro-inflammatory genes and oncogenic factors through modulating gut microbiota. *BMC Cancer* 2022: volume 22, Article number: 566.
125. Luo X, Zheng Y, Bao Y, Wang S, Li T, Leng J, Meng Potential effects of fructus aurantia ethanol extracts against colitis-associated carcinogenesis through coordination of Notch/NF-κB/IL-1 signaling pathways. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2022;152: 113278.
126. Jargaud V, Bour S, Tercé F, Collet X, Valet P, Bouloumié A, Guillemot JC, Mauriège P, Jalkanen S, Stolen C, Salmi M, Smith DJ, Carpené C. Obesity of mice lacking VAP-1/SSAO by *Aoc3* gene deletion is reproduced in mice expressing a mutated vascular adhesion protein-1 (VAP-1) devoid of amine oxidase activity. *J Physiol Biochem*. 2021 Feb;77(1):141-154.

127. Sun WY, Choi J, Cha YJ, Koo JS. Evaluation of the expression of amine oxidase proteins in breast cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 2775.
128. Lai YC, Chang SJ, Kostoro J, Kwan AL, Chai CY. Vascular adhesion protein-1 as indicator of breast cancer tumor aggressiveness and invasiveness. *Apmis* 2018, 126, 755–761.
129. Chang CY, Wu KL, Chang YY, Tsai PH, Hung JY, Chang WA, Jian SF, Huang YC, Chong IW, Tsai YM, et al. Amine oxidase, copper containing 3 exerts anti-mesenchymal transformation and enhances CD4(+) t-cell recruitment to prolong survival in lung cancer. *Oncol. Rep.* 2021, 46, 203.
130. Liu F, Hu L, Ma Y, Huang B, Xiu Z, Zhang P, Zhou K, Tang X. Increased expression of monoamine oxidase a is associated with epithelial to mesenchymal transition and clinicopathological features in non-small cell lung cancer. *Oncol. Lett.* 2018, 15, 3245–3251.
131. Chen L, Guo L, Sun Z, Yang G, Guo J, Chen K, Xiao R, Yang X, Sheng L. Monoamine oxidase a is a major mediator of mitochondrial homeostasis and glycolysis in gastric cancer progression. *Cancer Manag. Res.* 2020, 12, 8023–8035.
132. Danielli M, Thomas RC, Quinn LM and Tan BK: Vascular adhesion protein-1 (VAP-1) in vascular inflammatory diseases. *Vasa* 2022; 51: 341–350.
133. Li H, Du S, Niu P, Gu X, Wang J and Zhao Y: Vascular Adhesion Protein-1 (VAP-1)/Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase (SSAO): A Potential Therapeutic Target for Atherosclerotic Cardiovascular Diseases. *Front Pharmacol* 2021;12: 679707.
134. Iffiú-Soltész Z, Bour S, Tercé F, Collet X, Szökő E and Carpéné C: Hypercholesterolemia of obese mice with deletion of vascular adhesion protein-1 occurs without other atherosclerosis risk factor. *Vessel Plus* 2021; 5.
135. Filip A, Taleb S, Bascetin R, Jahangiri M, Bardin M, Lerognon C, Fève B, Lacolley P, Jalkanen S and Mercier N: Increased atherosclerotic plaque in AOC3 knock-out in ApoE^{-/-} mice and characterization of AOC3 in atherosclerotic human coronary arteries. *Front Cardiovasc Med* 2022; 9: 848680.
136. Weston CJ, Shepherd EL, Claridge LC, Rantakari P, Curbishley SM, Tomlinson JW, Hubscher SG, Reynolds GM, Aalto K, Anstee QM, Jalkanen S, Salmi M, Smith DJ, Day CP and Adams DH: Vascular adhesion protein-1 promotes liver inflammation and drives hepatic fibrosis. *J Clin Invest* 2015; 125: 501–520.
137. Salmi M and Jalkanen S: Vascular Adhesion Protein-1: A Cell Surface Amine Oxidase in Translation. *Antioxid Redox Signal* 2019; 30: 314–332.

138. Vakal S, Jalkanen S, Dahlström KM and Salminen TA: Human Copper-Containing Amine Oxidases in Drug Design and Development. *Molecules* 2020; 25: 1293.
139. Jarnicki AG, Schilter H, Liu G, Wheeldon K, Essilfie A-T, Foot JS, Yow TT, Jarolimek W and Hansbro PM: The inhibitor of semicarbazide-sensitive amine oxidase, PXS-4728A, ameliorates key features of chronic obstructive pulmonary disease in a mouse model. *Br J Pharmacol* 2016;173: 3161–3175.
140. Newsome PN, Sanyal AJ, Neff G, Schattenberg JM, Ratziu V, Ertle J, Link J, Mackie A, Schoelch C, Lawitz E, and BI 1467335 NASH Phase IIa trial team: A randomised Phase IIa trial of amine oxidase copper-containing 3 (AOC3) inhibitor BI 1467335 in adults with non-alcoholic steatohepatitis. *Nat Commun* 2023;14: 7151.
141. Kurkijärvi R, Adams DH, Leino R, Möttönen T, Jalkanen S and Salmi M: Circulating form of human vascular adhesion protein-1 (VAP-1): increased serum levels in inflammatory liver diseases. *J Immunol* 1998; 161: 1549–1557,
142. Koutroubakis IE, Petinaki E, Vardas E, Dimoulios P, Roussomoustakaki M, Maniatis AN and Kouroumalis EA: Circulating soluble vascular adhesion protein 1 in patients with inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14: 405–408.

8. EKLER

EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 52338575-117

HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 24.12.2020 (PERŞEMBE)
TOPLANTI SAYISI	: 2020/11
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2020/60
KARAR NUMARASI	: 2020/11- 01
ONAY BİTİŞ TARİHİ	: 24.12.2025
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Prof.Dr. Aytekin AKYOL
HAYVAN DENEYLERİNDE	: Prof. Dr. Aytekin AKYOL, Doç. Dr. İlyas
GÖREVLİ ARAŞTIRMACILAR	: ONBAŞILAR, Özge ÖZCAN (Doktora Tezi)
DİĞER YARDIMCI	:
ARAŞTIRMACILAR	:
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: 148 Adet FVB/N Fare (4-8 Hafta)

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Aytekin AKYOL'un araştırma yürütücüsü olduğu 2020/60 kayıt numaralı "Aoc3'ün İnflamatuvar ve Neoplastik Kolon Hastalıklarındaki Rolünün Araştırılması" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir. Kurul Üyeleri Prof. Dr. Aytekin AKYOL ve Doç. Dr. İlyas ONBAŞILAR çıkar çatışması nedeniyle tartışma ve oylamaya katılmamıştır.

Araştırma yürütücüsü en geç, onay bitiş tarihinden sonraki 1 ay içerisinde proje sonuç raporunu Kurulumuza teslim etmekle yükümlüdür.

Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 52338575 - 30

HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	: 27.02.2024 (SALI)
TOPLANTI SAYISI	: 2024/02
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2020/60 (ONAY TARİHİ: 24.12.2020)
KARAR NUMARASI	: 2024/02- 04
ONAY BİTİŞ TARİHİ	: 24.12.2025
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	: Prof Dr. Aytekin AKYOL
HAYVAN DENEYLERİNDE	: Prof Dr. Aytekin AKYOL, Doç. Dr. İlyas ONBAŞILAR,
GÖREVLİ ARAŞTIRMACILAR	: Özge ÖZCAN (Doktora Tezi)
DİĞER YARDIMCI	:
ARAŞTIRMACILAR	:
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: 84 Adet C57BL/6 Fare (4-8 Hafta)

Kurulumuzun 24.12.2020 tarihli toplantısında 2020/60 dosya kayıt numarasıyla onaylanmış olan Üniversitemiz Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Aytekin AKYOL'un araştırma yürütücüsü olduğu "*Aoc3'ün İnflamatuvar ve Neoplastik Kolon Hastalıklarındaki Rolünün Araştırılması*" başlıklı proje için verilen 21.02.2024 tarihli protokol revizyonu konulu dilekçe Kurulumuzun 27.02.2024 tarihli toplantısında görüşülmüş ve **uygun bulunmuştur**. Projeniz için onaylanan **Hayvan Türü ve Sayısı "84 Adet C57BL/6 Fare (4-8 Hafta)"** olarak güncellenmiş ve kayıtlarımıza eklenmiştir. Kurul üyeleri Prof. Dr. Aytekin AKYOL ve Doç. Dr. İlyas ONBAŞILAR çıkar çatışması nedeniyle tartışma ve oylamaya katılmamıştır.

Araştırma yürütücüsü en geç, onay bitiş tarihinden sonraki 1 ay içerisinde proje sonuç raporunu Kurulumuza teslim etmekle yükümlüdür.


Prof. Dr. Aytekin AKYOL
Etik Kurul Başkanı

EK-2: Turnitin Ekran Görüntüsü

Tezin Tam Başlığı: AOC3'ÜN İNFLAMATUAR VE NEOPLASTİK KOLON HASTALIKLARINDAKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Öğrencinin Adı Soyadı: Özge Özcan




Dosyanın Toplam Sayfa Sayısı: 65

 Sayfa 2 of 70 - Bütünlük Genel Bakış Gönderi Kimliği: tmlid::12984383313

5% Genel Benzerlik


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

Ön Sıradaki Kaynaklar

- 4%  İnternet kaynakları
- 2%  Yayınlar
- 1%  Gönderilen çalışmalar (Öğrenci Makaleleri)


Bütünlük Bayrakları

İnceleme için 1 Bütünlük Bayrağı

-  **Değiştirilen Karakterler**
15 sayfada 43 şüpheli karakter.
Harfler başka bir alfabeden benzer karakterlerle değiştirilmiştir.

Sistemimizin algoritması bir belgede, onu normal bir gönderiden ayırtabilecek her türlü tutarsızlığı denemesine inceler. Tuhaf bir şey fark ederseniz incelememiz için bayrak ederiz.

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

 Sayfa 2 of 70 - Bütünlük Genel Bakış Gönderi Kimliği: tmlid::12984383313

EK-3: Dijital Makbuz



Digital Receipt

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: Özge Atıcı Özcan
Assignment title: Aoc3'ün İnflamatuar ve Neoplastik Kolon Hastalıklarındaki R...
Submission title: AOC3'ÜN İNFLAMATUAR VE NEOPLASTİK KOLON HASTALIKLA...
File name: Tez_Final_Özge_Son_turnitin.pdf
File size: 2.62M
Page count: 65
Word count: 10,562
Character count: 67,971
Submission date: 16-Aug-2024 01:43PM (UTC+0300)
Submission ID: 2360244250



9. ÖZGEÇMİŞ

EĞİTİM

2018 – 2024	Doktora, Kök Hücre Bilimleri Hacettepe Üniversitesi, Ankara – Türkiye.
2016 – 2018	Yüksek Lisans, Biyoloji Gazi Üniversitesi, Ankara – Türkiye. Yüksek Şeref Öğrencisi (4,00 / 4,00).
2011 – 2015	Lisans, Biyoloji Hacettepe Üniversitesi, Ankara – Türkiye Yüksek Şeref Öğrencisi (3,71 / 4,00).

PROJELER

- 2021:** H.Ü. Bilimsel Araştırma Altyapı Projesi, Araştırmacı (12 Ay, 2021-2022)
"Hacettepe Üniversitesi Preklinik Hastalık Modelleri Altyapısının Geliştirilmesi"
- 2021:** TÜBİTAK 1001 Projesi Doktora Bursiyerliği (22 Ay, 2021-2022)
"Apc Mutant Fare Modelinde Azaltılmış Bdnf Ekspresyonunun İntestinal Tümör Gelişimi Üzerine Etkilerinin Araştırılması"
- 2016:** TÜBİTAK 1001 Projesi Yüksek Lisans Bursiyerliği (24 Ay, 2016-2018)
"CRISPR/Cas9 Sistemi ile Farede İntestinal Polipozis Oluşturulması"

ESERLER

A. Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler

- A1.** Uzun S, **Ozcan O**, Gok A, Isik A, Bakir S, Gunel-Ozcan A, Onbasiler I, Akyol A. A new CRISPR-mediated Apc Knockout Allele leads to Pyloric Gland Adenoma-like Gastric Polyps in the Mice with C57BL/6; FVB/N Mixed Background. Animal Models and Experimental Medicine,2024.

- A2.** **Ozcan O**, Akyol O, Akyol A. Amine oxidase, copper containing 3 (Aoc3) Knock-out Mice are More Prone to DSS-induced Colitis and Colonic Tumorigenesis. In Vivo. 2024.
- A3.** Gok A, Isik A, Bakir S, Uzun S, Güner G, **Ozcan O**, Cerci B, Onbasilar İ, Akyol A. Role of Reduced Bdnf Expression in Novel Apc Mutant Allele-induced Intestinal and Colonic Tumorigenesis in Mice. In Vivo. 2023
- A.4.** Uzun S, **Ozcan O**, Isik A, Saglam A, Gedikoglu G, Demiroz AS, Kuzu I, Üner A, Akyol A. Loss of CTNNB1 exon 3 in sclerosing angiomatoid nodular transformation of the spleen. Virchows Archiv. 2021
- A.5.** Akyol A, Güner G, Solak Ozseker H, Isik A, **Ozcan O**, Uzun S, Atayar E, Ozaltin F, Gedikoglu G, Sokmensuer C, and Eric Fearon. An Immunohistochemical Approach to Detect Oncogenic CTNNB1 Mutations in Primary Neoplastic Tissues. Laboratory Investigation. 2018

B. Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiler

- B1.** S. Uzun, **Ö. Atcı**, A. Işık, A. Sağlam Ayhan, G. Gedikoğlu, A. Üner, A. Akyol. Dalağın Sklerozan Anjiomatoid Nodüler Transformasyonu Olgularında CTNNB1 Ekzon 3 Delesyonunun Tanımlanması. 28. Ulusal Patoloji Kongresi 27-30 Ekim 2018 Ankara, Türkiye.
- B2.** **Ö. Atcı**, A. Akyol. Apc tümör baskılayıcı geninin C2C12 hücre hattında CRISPR/Cas9 sistemi ile hedeflenmesi. 24. Ulusal Biyoloji Kongresi 10-14 Eylül 2018 Manisa, Türkiye.

SERTİFİKALAR

2016: Hacettepe Üniversitesi, Laboratuvar Hayvanları Kullanım Sertifikası

2017: Ankara Üniversitesi, Pedagojik Formasyon Eğitimi Sertifikası