AKCİĞER KANSERİ DOKULARINDAN 3 BOYUTLU ORGANOİD KÜLTÜRLERİNİN OLUŞTURULMASI VE KARAKTERİZASYONU

Yaren YILDIZ

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AKCİĞER KANSERİ DOKULARINDAN 3 BOYUTLU ORGANOİD KÜLTÜRLERİNİN OLUŞTURULMASI VE KARAKTERİZASYONU

Yaren YILDIZ
0000-0002-0004-982X

Prof. Dr. Ferda ARI
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2024
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

AKCİĞER KANSERİ DOKULARINDAN 3 BOYUTLU ORGANOİD KÜLTÜRLERİNİN OLUŞTURULMASI VE KARAKTERİZASYONU

Yaren YILDIZ

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ferda ARI

Akciğer kanseri tedavisine yönelik çalışmalarda yaşanan zorlukların üstesinden gelmek için yeni stratejileri belirlemek ve klinik öncesi araştırmalarda kullanılabilecek, hastaların tümörlerini doğru bir şekilde gösterebilecek, iyi optimize edilmiş akciğer kanseri modelleri geliştirmek önemlidir. Akciğer kanseri organoidleri, hastanın kanser dokusundan büyütülen, kanserin *in vivo* karmaşık davranışını ve hücresel mimarisini taklit edebilen 3 boyutlu (3B) yapılardır. 3B organoidler hücre kültürünün birçok avantajını korurken aynı zamanda *in vivo* fizyolojik koşulları 2B kültürlerden daha iyi temsil etmektedir. Bu sebeple tümör organoidleri ile gerçekleştirilen çalışmaların klinik öncesi araştırmalara uyarlanabilmesi için saf tümör organoidlerinin güvenilir bir şekilde kurulabilmesi önemlidir. Kültüre kazandırılan 3B tümör organoidlerinin orijinal tümör doku morfolojisi ile benzerliği mikroskopik inceleme ile tespit etmek mümkün değildir. Bu nedenle türetilen organoidlerin orijinal tümör dokusu ile benzerliğini belirlemek için ek karakterizasyon analizlerine ihtiyaç vardır. Bu amaca yönelik tez çalışmasında, Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) hastalarından toplanan primer kaynaklı akciğer dokularından oluşturulan organoidlerin oluşturulması için gerekli olan primer kültür yönteminin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen 3B organoid yapılarının ilgili tümör dokularının histolojik özelliklerini koruduğunu göstermek için histokimyasal ve immunofloresan boyamalar yapılmıştır. Sonuç olarak KHDAK hastalarından toplanan primer kaynaklı akciğer dokularından oluşturulan organoidlerin orijinal ebeveyn dokuları ile benzer histomorfolojik karakteristiğe sahip olduğu ve akciğer kanseri tedavisi için gerçekleştirilecek birçok klinik öncesi araştırmada, hastaya özel ilaç denemelerinde kullanım potansiyeline sahip olduğunu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Akciğer kanseri, primer kültür, organoid, 3-boyutlu kültür
2024, xvii + 106 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

CREATION AND CHARACTERIZATION OF 3 DIMENSIONAL ORGANID CULTURES FROM LUNG CANCER TISSUES

Yaren YILDIZ

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Ferda ARI

To overcome the challenges in lung cancer treatment studies, it is important to identify new strategies and develop well-optimized lung cancer models that accurately recapitulate patients' tumors that can be used in preclinical research. Lung cancer organoids are 3 Dimensional (3D) structures grown from patient cancer tissue that can mimic the complex behavior and cellular architecture of cancer *in vivo*. 3D organoids retain many of the advantages of cell culture while also better representing *in vivo* physiological conditions than 2D cultures. For this reason, it is important to reliably establish pure tumor organoids so that studies carried out with tumor organoids can be adapted to preclinical research. It is not possible to determine the similarity of cultured 3D tumor organoids with the original tumor tissue morphology by microscopic examination. Therefore, additional characterization analyzes are needed to determine the similarity of the derived organoids to the original tumor tissue. In this thesis study aimed at this purpose, the optimization of the primary culture method required to derive organoids created from primary source lung tissues collected from NSCLC patients was carried out. Histochemical and immunofluorescent stainings were performed to show that the obtained 3D organoid structures preserved the histological characteristics of the relevant tumor tissues. As a result, it was concluded that organoids created from primary source lung tissues collected from NSCLC patients have similar histomorphological characteristics with the original parent tissues and have the potential to be used in many pre-clinical studies and patient-specific drug trials for lung cancer treatment.

Key words: Lung cancer, primary culture, organoid, 3-dimensional culture
2024, xvii + 106 pages.

TEŞEKKÜR

Vizyonu, liderliği ve mücadelesi sayesinde bugün yaşadığımız özgür bir ülkede güvenle çalışma imkanına sahip olduğumuz, yaptığı büyük devrimler ile bilimin bu topraklarda yeşermesi için demokratik, laik, sosyal bir hukuk devleti olan Türkiye Cumhuriyeti'ni kuran ulu önder Mustafa Kemal ATATÜRK'e,

Çalışmalarımda danışmanlığımı yapan lisans ve yüksek lisans sürecim boyunca bana rehberlik eden, bilimsel bir araştırmacı olarak sabırla büyümeme ve öğrenmeme vesile olan Yüksek Lisans tez çalışmamın her aşamasında ve her koşulda tecrübesi ve bilgi birikimi ile bana yol gösteren, desteğini eksik etmeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Ferda ARI'ya,

Deneylerimde beni cesaretlendiren ve istisnasız her deney sonucumda benimle aynı heyecanı ve ilgiyi gösterip, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, mesleki ve manevi açıdan iyi bir bilim insanı olabilmem için beni yetiştiren, buraya yazmakla asla sığdıramayacağım emekler harcayan değerli hocam Dr. Oğuzhan AKGÜN'e

Eğitimimin her aşamasında maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen ve hayatım boyunca hiçbir fedakârlıktan kaçınmayarak her zaman yanımda olan canım kardeşim Yağız YILDIZ'a

Sevgi, sabır ve fedakarlıkları sayesinde bugünlere gelmemde büyük emeği olan hayatımdaki karşılıksız, koşulsuz ve sınırsız destekleri için canım annem Şükran YILDIZ ve canım babam Recep YILDIZ'a

Tez çalışmama "221S423" nolu ARDEB projesi ile maddi proje desteği sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (Tübitak), teşekkürlerimi sunarım.

Yaren YILDIZ
…/10/2024

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET viii
ABSTRACT ix
TEŞEKKÜR x
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ xiii
1. GİRİŞ…… 1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI 4
2.1. Kanser…. 4
2.1.1 Karsinogenezis Süreci 5
2.1.2. Dünya'da Kanser İstatistikleri 7
2.2. Akciğer Kanseri 10
2.2.1. Akciğer Anatomisi 10
2.2.2. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi 11
2.2.3. Akciğer Kanserinin Histopatolojik Sınıflandırılması 12
2.2.3.1. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK) 13
2.2.3.2. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) 14
2.2.3.2.1. KHDAK Adenokarsinomları 15
2.2.3.2.2. Skuamöz Hücreli Karsinomlar (SCC) 17
2.2.4. KDHAK'inde Histokimyasal Belirteçler 18
2.2.4.1. Hematoksilen 20
2.2.4.2. Eozin 22
2.2.5. KHDAK'inde İmminohistokimyasal Belirteçler 23
2.2.5.1. Tiroid Transkripsiyon Faktörü-1 (TTF-1) 24
2.2.5.2. Napsin-A 25
2.2.5.3. p63(TAp63) ve p40(ΔNp63) 26
2.2.5.4. Sitokeratinler (CK) 26
2.2.5.5. Müsikarmen 27
2.3.Hücre Kültürleri 28
2.3.1. 2 Boyutlu (2B) Kültürler 29
2.3.2. 3 Boyutlu (3B) Kültürler 30
2.3.2.1. 3B Kültürlerde Kullanılan Teknikler 31
2.3.3. Akciğer Kanserinde 3 Boyutlu Primer Kültür 37
3. MATERYAL ve YÖNTEM 42
3.1.1. Kimyasal Maddeler 42
3.1.2. Sarf Malzemeler 43
3.1.3. Cihazlar 44
3.2. Yöntem... 45
3.2.1.KHDAK Hastalarının Tümör Örneklerinin Temini 45
3.2.2. Tümör Örneklerinin Histopatolojik Durumuna Göre Sınıflandırılması 46
3.2.3. Tümör Örneklerinin Enzimatik Parçalanması 46
3.2.4. Primer Kültür Besiyeri Optimizasyonu 48
3.2.5. Ex-vivo 3 Boyutlu Kültür 48
3.2.6. ATP Canlılık Analizi ile Proliferasyon Eğrilerinin Oluşturulması 50
3.2.7. Histokimyasal Boyama ile Organoid Karakterizasyonu 51
3.2.8. İmminoflorasan Boyama ile Organoid Karakterizasyonu 54

4. BULGULAR 56
4.1. KHDAK Hastalarından Tümör Örneklerinin Alınması 56
4.2. Tümör Örneklerinin Histopatolojik Durumuna Göre Sınıflandırılması 57
4.3. Tümör Örneklerinin Enzimatik Parçalanması 58
4.4. Primer Kültür Besiyeri Optimizasyonu ve e*x-vivo* 3 Boyutlu Kültür 62
4.5. 3B Kültür Sonrası Organoid Yapılarının Proliferasyon Yetenekleri 67
4.6. Organoidlerin Histokimya Boyamasıyla Morfolojik ve Histolojik Olarak Karakterize Edilmesi…… 71
4.7. Akciğer Kanseri Adenokarsinoma Organoidlerinin TTF-1 İmminoflorasan Boyama ile Karakterize Edilmesi 74
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 77
KAYNAKLAR 83

ÖZGEÇMİŞ 106

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
mM	Milimolar
mL	Mililitre
nM	Nanomolar
µM	Mikromolar
µl	Mikrolitre
µg	Mikrogram
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
w/v	Ağırlık/Hacim

Kısaltmalar	Açıklama
KHDAK	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
KHAK	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
2B	2 Boyutlu
3B	3 Boyutlu
HC	Histokimya
H&E	Hemotoksilen & Eosin
TTF-1	Troid Transkripsiyon Faktörü 1
GLOBOCAN	Global Cancer Observatory
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
SCC	Skuamöz Hücreli Karsinom
ADC	Adenokarsinom
LCC	Büyük Hücreli Karsinom
NE	Nöroendokrin
AC	Atipik Karsinoid
LCNEC	Büyük Hücreli NE Karsinom
NCAM/CD56	Nöral Hücre Yapışma Molekülü
INSM1	İnsülinoma ile ilişkili protein 1
TTF-1	Tiroid transkripsiyon faktörü-1
RB1	Retinoblastoma 1
IHC	İmmünohistokimyasal
AIS	In situ adenokarsinoma
MIA	Minimal invazif adenokarsinom
AHH	Atipik adenomatöz hiperplazi
BT	Bilgisayarlı tomografi
PTAH	Fosfotungstik Asit Hematoksilin
CK	Sitokeratin
ATCC	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
PDMS	Polidimetilsiloksan
NAC	N-Asetilsistein
GSH	Glutatyon
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotidinin

ROCK	Rho ile İlişkili Protein Kinaz
MAPK	Mitojenle Aktifleşen Protein Kinaz
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
FGFR	FGF Reseptörü
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
ALK5	Aktivin Reseptörü Benzeri Kinaz 5
EMT	Epitelyalden Mezenkimal Geçişi
BMP	Kemik Morfogenetik Protein
FBS	Fetal Sığır Serumu
TC	Tipik Karsinoid

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 1.	Kanserin 14 temel ayırt edici özelliği	5
Şekil 2.	Karsinogenez basamakları	6
Şekil 3.	Dünya genelinde kansere bağlı toplam vakaların (19,3 milyon) ve toplam ölümlerin (10 milyon) dağılımı	8
Şekil 4.	Seçilen başlıca kanser türleri için erkeklerde ve kadınlarda toplam vakaların (10,1 milyon) yüzde dağılım şemaları	8
Şekil 5.	Seçilen başlıca kanser türleri için erkeklerde ve kadınlarda toplam ölümlerinin (5,5 milyon) yüzde dağılım şemaları	9
Şekil 6.	Kanser vakalarının ve ölümlerinin bölge bazında yüzde dağılımları	10
Şekil 7.	Akciğer yapısı	11
Şekil 8.	Akciğer kanseri orijinal kanser dokularının ve bu dokulardan türetilen organoid yapılarının temsili H &E boyama görüntüleri. Ölçek çubuğu, 100 μm	19
Şekil 9.	Adenokarsinomdan ve skuamöz hücreli karsinomdan türetilmiş türetilmiş organoidlerin temsili IHC boyama görüntüleri. Ölçek çubuğu, 50 mm	24
Şekil 10.	Asılı damla yöntemi	32
Şekil 11.	Hidrojel yöntemi	32
Şekil 12.	Döner hücre kültürü yöntemi	33
Şekil 13.	Nanoliflerin ilavesi ile hücre süspansiyonu yöntemi	34
Şekil 14.	Manyetik kaldırma yöntemi	34
Şekil 15.	Manyetik akışkan sistemi yöntemi	35
Şekil 16.	Ortak kültürlere dayalı sferoid yöntemi	36
Şekil 17.	Biyobaskı yöntemi	37
Şekil 18.	KHDAK hastalarından alınan 12 biyopsi tümör örneği	56
Şekil 19.	Mekanik olarak küçük boyutlara parçalanmış olan tümör örneklerinin enzim çözeltisi yardımıyla tek hücre haline getirilmesi	59
Şekil 20.	Tripan mavisi ile boyanmış tek hücre süspansiyonu tümör örneklerinin faz kontrast mikroskobu görüntüleri	60
Şekil 21.	Enzimatik parçalama sonrasında %0.4 Tripan mavisi boyaması canlı hücre oranları. Her bir veri noktası tek bir örneğin 3 ayrı boyama sonucunun ortalamasını göstermektedir. Kesikli çizgi %90 canlılığı temsil etmektedir	61
Şekil 22.	Mekanik olarak küçük boyutlara parçalanmış olan tümör örneklerinin enzim çözeltisi yardımıyla tek hücre haline getirildikten sonra enzim çözeltisinin inhibe edilmesi	62
Şekil 23.	Tek hücre haline getirilen tümör örneklerinin Geltrex kullanılarak 3 boyutlu kültüre alınması	63
Şekil 24.	Geltrex'e ekildikten sonra ilk 10 gündeki 3 ADC hastasının (Hasta 1-3) oluşturduğu organoid görüntüleri	64
Şekil 25.	Geltrex'e ekildikten sonra ilk 10 gündeki 3 ADC hastasının (Hasta 4-6) oluşturduğu organoid görüntüleri	65
Şekil 26.	Geltrex'e ekildikten sonra ilk 10 gündeki 3 ADC hastasının	66

(Hasta 7-9) oluşturduğu organoid görüntüleri
Şekil 27. Geltrex'e ekildikten sonra ilk 10 gündeki 3 SCC hastasının (Hasta 10-12) oluşturduğu organoid görüntüleri. 67
Şekil 28. Geltrex'e ekildikten sonra ilk 10 gündeki A549 hücresinin oluşturduğu organoid görüntüleri 67
Şekil 29. 9 ADC ve 3 SCC hastasından elde edilen primer kaynaklı akciğer kanseri hücrelerinin 2 boyutlu kültürdeki morfolojik durumları 69
Şekil 30. Hücrelerin proliferasyon kapasitelerinin incelenmesi. Veriler ortalama ±SD (n=3) olarak sunulmuştur 70
Şekil 31. 9 ADC hastasından elde edilen primer kaynaklı akciğer kanseri 3B organoid yapılarının ve orijinal kanser dokularının H&E boyama görüntüleri. Ölçek çubuğu, 40X. 72
Şekil 32. 3 SCC hastasından elde edilen primer kaynaklı akciğer kanseri 3B organoid yapılarının ve orijinal kanser dokularının H&E boyama görüntüleri. Ölçek çubuğu, 40X. 73
Şekil 33. A549 hücresiyle oluşturulan 3B organoid yapısının H&E boyama görüntüsü. Ölçek çubuğu, 40X. 73
Şekil 34. 3 ADC hastasından (Hasta 1-3) elde edilen primer kaynaklı akciğer kanseri 3B organoid yapılarının TTF-1 (Yeşil) İmminoflorasan boyama görüntüleri. Çekirdekler (mavi) DAPI ile boyandı. Ölçek çubuğu, 40X. 74
Şekil 35. 3 ADC hastasından (Hasta 4-6) elde edilen primer kaynaklı akciğer kanseri 3B organoid yapılarının TTF-1 (Yeşil) İmminoflorasan boyama görüntüleri. Çekirdekler (mavi) DAPI ile boyandı. Ölçek çubuğu, 40X. 75
Şekil 36. 3 ADC hastasından (Hasta 7-9) elde edilen primer kaynaklı akciğer kanseri 3B organoid yapılarının TTF-1 (Yeşil) İmminoflorasan boyama görüntüleri. Çekirdekler (mavi) DAPI ile boyandı. Ölçek çubuğu, 40X. 75
Şekil 37. A549 hücrelerinden elde edilen 3B organoid yapılarının TTF-1 (Yeşil) İmminoflorasan boyama görüntüleri. Çekirdekler (mavi) DAPI ile boyandı. Ölçek çubuğu, 40X. 76

ÇİZELGELER DİZİNİ

		Sayfa
Çizelge 1.	KHDAK histolojik sınıflandırılması	15
Çizelge 2.	Enzim çözeltisinin hazırlanması	46
Çizelge 3.	KHDAK adenokarsinom hücreleri büyüme besiyeri bileşenleri	48
Çizelge 4.	KHDAK adenokarsinom hücreleri büyüme besiyeri bileşenlerinin kullanılan konsantrasyonları	49
Çizelge 5.	Parafine sabitleme basamakları	52
Çizelge 6.	Hematoksilen Eozin boyama basamakları	53
Çizelge 7.	IHC boyama basamakları. * Ardışık iki yıkama basamağını temsil etmektedir. # Serum tipi (Keçi serumu) kullanılan antikora göre seçilmiştir	54
Çizelge 8.	KHDAK hastalarından alınan örneklerin histopatolojik tanıları. ADC; Adenokarsinoma, SCC; Skuamöz Hücreli Karsinom	57
Çizelge 9.	Tez çalışması kapsamında toplanan tümör örneklerine ait demografik ve klinik parametreler	58

1. GİRİŞ

Akciğer kanseri, yirminci yüzyılda çok sık rastlanan bir hastalık çeşidi olmamasına rağmen bugünlerde değişen ve gelişen sosyal çevre, sigara ve alkol tüketimindeki artış akciğer kanserini ciddi bir sağlık sorunu haline getirmektedir (Greenlee vd., 2000). Akciğer tümörleri histolojik olarak incelendiğinde Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) ve Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK) olmak üzere iki ayrı kategoride sınıflandırılmaktadır. Akciğer kanserlerinin %20'sini KHAK ve %80'nini KHDAK oluşturmaktadır (Zheng, 2016). KHDAK tipleri; adeno kanser, skuamoz (yassı) hücreli kanser, büyük hücreli kanser olmak üzere üç tiptir. Hastanın tedaviye yanıt vermesi konusunda en olumlu sonuçlar aynı evrelerde bulunan bu üç KHDAK tipi arasında skuamoz hücreli kanserden alınmaktadır. Skuamoz hücreli kanseri takiben sırasıyla adeno kanser ve büyük hücreli kanser gelmektedir (Travis vd., 2015). Akciğer kanseri tedavisinde hücre tipine göre, etki/yan etki profilleri göz önünde bulundurularak kemoterapi veya kombine kemoterapi protokolleri oluşturulmaktadır (Reck vd., 2016).

2 Boyutlu (2B) hücre kültürleri ve laboratuvar hayvanları, kanser modellemesi için altın standart olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte 2B hücre kültürleri, kanser hücresi davranışını araştırmak için basitlik, düşük maliyetli ve köklü yöntemler sunsa da doğal tümör dokusunun karmaşıklığını doğru bir şekilde taklit etmekte başarısız olabilmektedir. 2B kültürlenen hücreler, xy düzleminde sınırlı yapışmaya, zorunlu apikal-bazal polariteye, sınırsız yayılmaya ve çözünür gradyanların eksikliğine sahiptir. 2B kültürleme yöntemleri ayrıca hipoksi, hücre göçü ve istila veya tümör-stroma etkileşimleri gibi çeşitli biyolojik olayları *in vitro* olarak incelemek için dikkate değer sınırlamalar göstermektedir (Sachs & Clevers, 2014). Öte yandan, hayvan modelleri, ksenogreft büyümesini kolaylaştırmak için kanser hücrelerinin veya küçük doku parçalarının nakledilebildiği benzer bir doğal *in vivo* ortam sunmaktadır (Sachs & Clevers, 2014; Siolas & Hannon, 2013; Tentler vd., 2012). Buna rağmen, hayvan sistemleri maliyetlidir ve kontrol edilebilirlik, tekrarlanabilirlik ve tasarımın esnekliği ile ilgili dikkate değer sınırlamalar sergilemektedir. Hayvan araştırmalarında 3R (Değiştirme, Azaltma ve İyileştirme) ilkesinin benimsenmesiyle, birincil araştırma için hayvan sistemlerinin kullanılması giderek daha fazla cesaret kırmaktadır (Dong vd., 2010; Siolas & Hannon, 2013; Tentler

vd., 2012). 2B hücre kültürleri ile karmaşık hayvan modelleri arasındaki boşluğu kapatmak için 3 Boyutlu (3B) platformların uygulanması son zamanlarda ilgi çekici hale gelmektedir. Alternatif olarak, 3B hücre kültürü sistemleri şu anda geliştirilme aşamasındadır ve *in vivo* tümörlerin karmaşıklığını taklit etme konusunda ümit vaat etmektedir. 3B kanser modelleri kullanılarak, hayvan deneylerine geçmeden önce bilinmeyen ilaçların bolluğu daha da daraltılabilir. Ayrıca kanseri hedeflemek için tasarlanan terapötik yaklaşımların giderek daha fazla gelişmesiyle birlikte klinik araştırmaların yürütülmesinden çok önce araştırılan yeni bileşiklerin geçerliliğinin değerlendirilmesinde kullanılabilinir. İnsan kanserleri *in vivo* olarak çoğalmakta ve spesifik doku mimarisi halinde organize olmaktadır. Bu nedenle kolon, pankreas, prostat, karaciğer, meme ve mesane kanserleri dahil olmak üzere birçok insan birincil tümör örneğinden türetilen kanser hücreleri, kanseri başarılı bir şekilde özetleyen organoidleri oluşturmak için kullanılmıştır (Boj vd., 2015; Broutier vd., 2017; Drost & Clevers, 2018; Gao vd., 2014; Sachs vd., 2018; Zhao vd., 2022). Tüm bu bilgilerin ışığında insan kanser dokularından türetilen kanser organoidleri, orijinal tümörlerin özelliklerini koruyan ve potansiyel olarak antikanser terapötiklerinin seçilmesi ve bireysel hastalar için biyobankacılık için avatar görevi görebilen alternatif *in vitro* modeller olarak önerilmiştir (Vlachogiannis vd., 2018). Akciğer kanseri için kişiselleştirilmiş modeller olarak, *in vitro* doku kültürü veya tümör sferoid kültürü bir 3B kültür sistemi kullanılarak antikanser tedavisine yanıtı tahmin etmek gibi nedenler için çalışılmaktadır (Drost & Clevers, 2018; Jenkins vd., 2018; McCauley vd., 2017; Zhang vd., 2018). Akciğer kanserine özgü büyümede ve akciğer kanseri çeşitliliğini temsil etmede bazı sınırlamalar vardır. Bu sınırlamalardan biri de hasta dokusundan türetilen 3B primer organoid modellerinin zaman içerisinde orijinal dokunun genetik ve histolojik özelliklerini kaybedebilmesidir. Bu sebeple tümör organoidlerinin klinik uygulaması, saf tümör organoidlerinin güvenilir bir şekilde kurulabilmesini gerektirir (Sachs vd., 2019).

Kültüre kazandırılan 3B tümör organoidlerinin orijinal tümör doku morfolojisi ile benzerliği mikroskopik inceleme ile tespit edilememektedir (Dijkstra vd., 2020). Bu nedenle türetilen organoidlerin orijinal tümör dokusu ile benzerliğini belirlemek için ek histokimyasal ve immunofloresan analizler gereklidir. Akciğer kanseri organoidlerinin histokimyası (HC), akciğer kanseri klinik tanısında kullanılan aynı belirteçleri

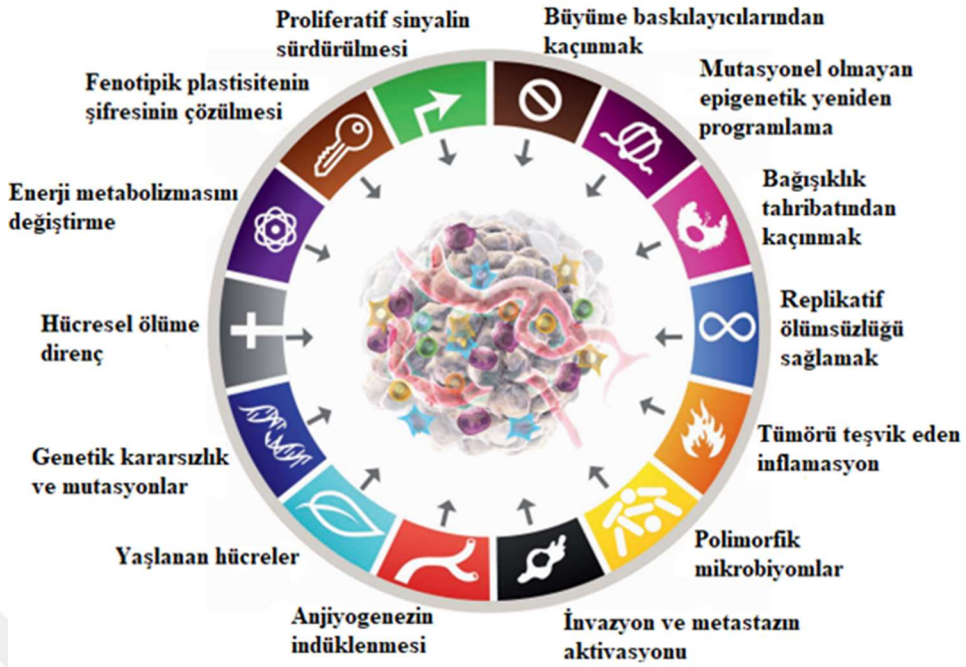
içermelidir. Özellikle Hemotoksilen & Eosin (H&E) boyaması, akciğer kanseri organoidlerinin hasta dokularıyla benzer morfolojik özelliklere sahip olduğunu karşılaştırmak için sık kullanılan bir yöntemdir (Zhang vd., 2018). Ebeveyn kanser dokularına benzer şekilde, adenokarsinom kanserine sahip hastalardan türetilen akciğer kanseri organoidleri, asiner veya büyük glandüler modeller üretmektedir. Nükleer membran düzensizliğine sahip hiperkromatik çekirdekler ve yüksek nükleer sitoplazmik oranlara sahip tümör hücreler görülmektedir. Ancak tespit edilen bu bulguları desteklemek için yapıların daha farklı belirteçler ile immün boyamasının yapılması gerekmektedir (Kim vd., 2019). Buna ek olarak, organoidlerin adenokarsinom kökenini doğrulayan akciğer tümörü belirteci Troid Transkripsiyon Faktörü 1 (TTF-1)'in pulmoner olmayan, tiroid dışı tümörlerden primer akciğer adenokarsinomunu tanımlamadaki rolüde iyi belgelenmiştir (Travis vd., 2011). H&E ve immün boyanması, özellikle tümör hücrelerinin sitolojik özelliklerinin sabit kaldığını ve klinik belirteçlerin seri geçişle tutarlı bir şekilde korunduğunu göstermede oldukça önem arz etmektedir (Werner vd., 2021).

Bu tez çalışmasında, KHDAK hastalarından toplanan primer kaynaklı akciğer dokularından oluşturulan organoidlerin türetilebilmesi için gerekli olan primer kültür yönteminin optimizasyonunun tamamlanması amaçlanmıştır. Elde edilen primer kaynaklı akciğer dokularından oluşturulan organoidlerin ilgili ebeveyn dokularının histolojik özelliklerini koruduğunu ve hastaya özel ilaç denemelerinde kullanım potansiyeline sahip olduğunu göstermek hedeflenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kanser

Canlı yaşamının devam edebilmesi için yaşlanıp görevlerini yerine getiremeyen hücrelerin yerlerine genç hücrelerin geçmesi gerekmektedir. Bu denge hücrelerin bölünerek çoğalmasını uyaran ve bazen de hücrelerin maling çoğalmasına engel olan genlerin kontrolü altındadır (Meirson vd., 2020). Hücre bölünmesini ve bu bölünme sürecindeki dengeyi düzenleyen mekanizmalarda meydana gelen hatalar sonucu her yıl binlerce insan kansere yakalanmaktadır. Kanser; hücre bölünmesinin doğal sürecindeki patofizyolojik olaylarla genotipik ve fenotipik değişikliklerin meydana geldiği çok basamaklı hücresel düzeyde gelişen genetik bir hastalıktır. Bu süreç temelde primer bölgeden farklı vücut dokularına göç edebilme yeteneğine sahip anormal hücrelerin gelişimi, kontrolsüz çoğalma (proliferasyon) ve hücre ölümünden kaçış ile karakterize edilmektedir (Matthews vd., 2022). Kanserin ayırt edici özellikleri, kanser fenotiplerinin ve genotiplerinin uçsuz bucaksız karmaşıklığını anlaşılır kılmada oldukça önemlidir. Bu ayırt edici özellikler, insan hücrelerinin neoplastik büyüme durumuna geçtiklerinde kötü huylu tümör oluşturma yeteneği kazanırken edindikleri özelliklerdir. Birden fazla tümör tipini ve artan sayıda alt tipi kapsayan patogenez çeşitliliğini normal hücrelerden ayıran özellikler şimdilik 14 temel parametre ile sınırlandırılmaktadır (Hanahan, 2022). Bu özellikler proliferatif sinyali sürdürmek, büyüme baskılayıcı sinyallerden kaçınmak, hücre ölümüne direnmek, replikatif ölümsüzlüğü sağlamak, anjiyogenezi indüklemek, invazyonu ve metastazı aktive etmek, hücresel metabolizmayı yeniden programlamak, bağışıklık tahribatından kaçınmak, genom istikrarsızlığı, tümörü teşvik eden inflamasyon, fenotipik plastisite, mutasyonel olmayan epigenetik yeniden programlama, polimorfik mikrobiyomlar ve yaşlanmış hücreler için edinilmiş yetenekleri içermektedir (Şekil 1). Bu farklılıkların hepsi tümör oluşumu sırasında kazanılan yeni yeteneklerdir. Bu yeni yetenekler hücrelere ve dokulara bağlı bir antikanser savunma mekanizmasının başarılı bir şekilde engellenmesini sağlamaktadır (Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2000, 2011).

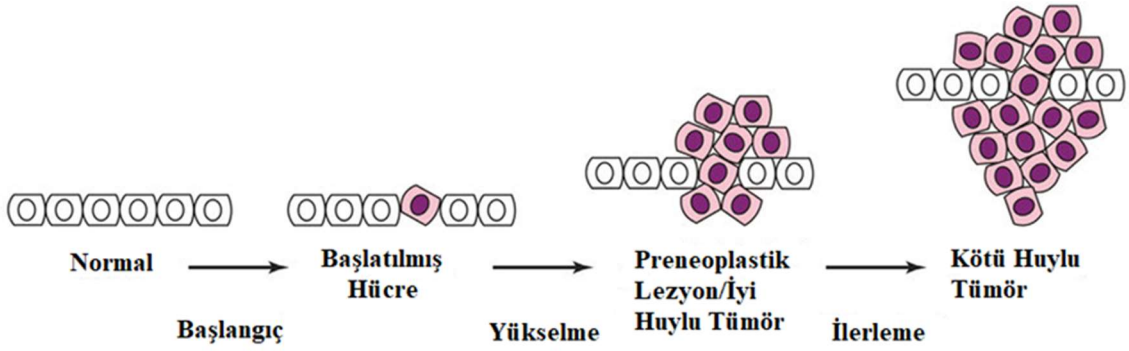


Şekil 1. Kanserin 14 temel ayırt edici özelliği (Hanahan, 2022).

Vücuttaki neredeyse her doku malignite üretebildiği için "kanser" terimi bu hastalığın 100'den fazla türünü kapsamaktadır. Her kanser türünün kendine has özellikleri olmasına rağmen farklı tümör tiplerinin temel oluşum süreçlerinin benzer olduğu görülmektedir (Nguyen vd., 2022).

2.1.1 Karsinogenezis Süreci

Karsinogenezis, neoplazi gelişimini ifade etmek için kullanılan genel bir terimdir (Pitot & Dragan, 1991). Karsinogenezis, organizmanın yaşam süresinin yarısından fazlasını kaplayabilen son derece karmaşık bir süreç ile gerçekleşmektedir. Normal hücrelerin tamamen kötü huylu tümör hücrelerine dönüşümünde birden fazla hücresel genin ve mekanizmanın rol oynadığı öngörülmektedir (Weinstein vd., 1984). Tümör oluşma aşamasında genetik değişiklik sebebiyle anormal tek bir hücrenin bölünerek çoğalması sonucu ortaya çıkan tümör hücre topluluğunda çeşitli mutasyonlar süre gelir. Böylece hücre topluluğu içinde hızla çoğalan yeni hücreler bu topluluk içinde normal hücrelerden farklı ve baskın özellikler kazanmış olur. Bu süreç sırasında gerek çoğalma hızının artması gerekse invazyon ve metastaz gibi birçok özellik açısından daha avantajlı olan yeni hücreler oluştuğu için buna klonal seçilim de denilmektedir (Şekil 2) (Yokota, 2000).



Şekil 2. Karsinogenez basamakları (Kotecha vd., 2016).

Protoonkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, farklı karsinojen maddelerin etkisine uğrama sonucu DNA ve hücre elemanlarında oluşan hasar ile bir dizi mutasyonel olaylar meydana gelir. Mutasyonların zamanla birikimi çok evreli karsinogenezi oluşturur (Devi, 2004). Hücrelere kimyasal, fiziksel, biyolojik ve/veya genetik zararlardan herhangi birinin veya bunların bir kombinasyonunun etkisinden kaynaklanabilir (Loeb & Harris, 2008). Temelde karsinogenez 3 basamak üzerinden değerlendirilir:

- ***Başlangıç basamağı:*** Neoplastik gelişimin doğal tarihinde ilk kez meydana gelen başlama aşaması, başlatılan hücrede kalıcı ve geri döndürülemez bir değişikliği yansıtmaktadır (Boutwell, 1964). Başlatılan hücrelerin sonraki maling değişim aşamalarına geçmediği görülmektedir. Dolayısıyla kanserin gelişimindeki ilk aşama (başlangıç), sıklıkla kendiliğinden oluşan, deney hayvanlarında ve insanlarda kolaylıkla tetiklenebilen son derece yaygın bir olaydır (Pitot & Dragan, 1991).

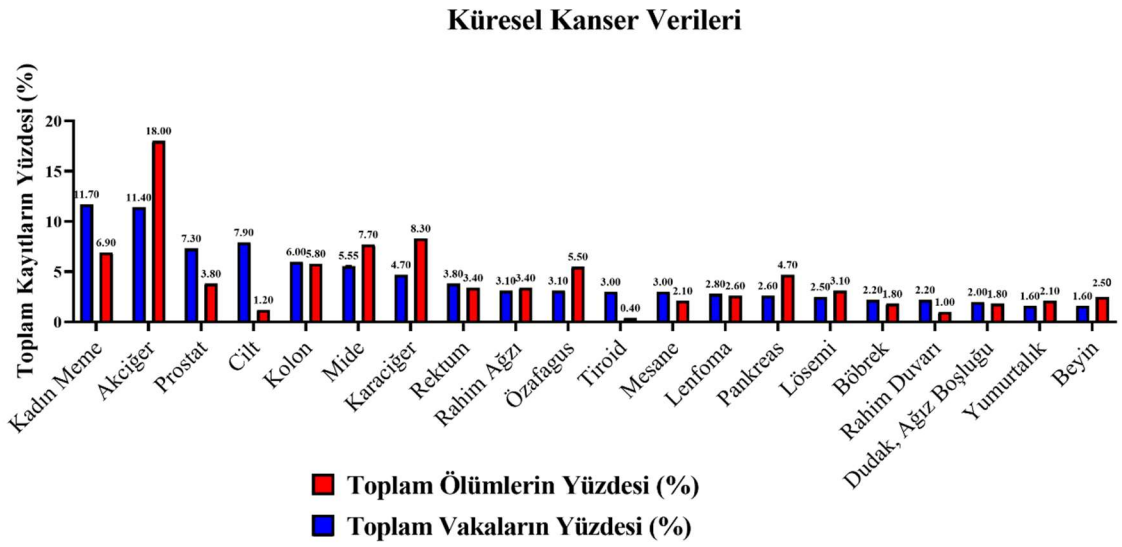
- ***İlerleme basamağı:*** İlerleme aşaması, promotör-reseptör etkileşimleri yoluyla aracılık edilen genomun ifadesindeki değişiklikleri içermektedir. Bu aşamadaki moleküler çalışmalar öncelikle genom ifadesinin hücresel sinyallerden çevreye aktarılmasına yönelik yöntemlerle ilgilidir. Başlangıç mutasyonunun ifadesi aynı zamanda spesifik gen ifadesinin kalıplarını geçici olarak değiştirebilen sitokinler ve bazı lipit metabolitleri gibi faktörlere de bağlı olmaktadır. Bu durum hücresel özerkliği

kısıtlayan ve dolayısıyla doku bakımı ve gelişimini koordine eden hücreler arası iletişim süreçlerinin ayrılmasına neden olabilir (Pitot, 1993).

- ***Malign değişim basamağı:*** İstila, metastatik büyüme, anaplazi ve büyüme hızı gibi bu bağımsız özelliklerin giderek daha yüksek malignite derecelerine ilerleyeceği şekilde gelişen basamaktır. Bugün bu bağımsız özelliklerin, ilerleme sırasında hücrelerde sürekli gelişen karyotipik değişikliklerden kaynaklandığı anlaşılabilmektedir. İlerlemenin geri dönüşü olmayan son aşaması, karyotipik istikrarsızlık ve malign büyüme ile karakterize edilir (Pitot, 1989). Normal hücreler çoklu hücre bölünmeleri üzerine genomlarının yapısını ve karyotipini düzenlerken, kötü huylu hücre bunu yapamaz ve aşırı koşullar altında genom yapısını sürekli olarak değiştirir (Devi, 2004). Bu tür sürekli genom değişikliği yalnızca artan büyüme hızının, istilacılığın, metastatik yeteneğin ve kötü huylu neoplazmaların anaplazisinin değil, aynı zamanda kötü huylu neoplazmalarda gelişen çoğu ilaç direncinin de temelini oluşturur (Goodenow vd., 1985; Mundy, 1987). Karsinojenez, sonuçta bir hücreyi kontrolsüz hücresel bölünmeye girecek şekilde yeniden programlayan ve dönüştüren farklı moleküler değişikliklerin ilerlemesi ile karakterize edilen çok adımlı bir süreçtir (Loeb & Harris, 2008).

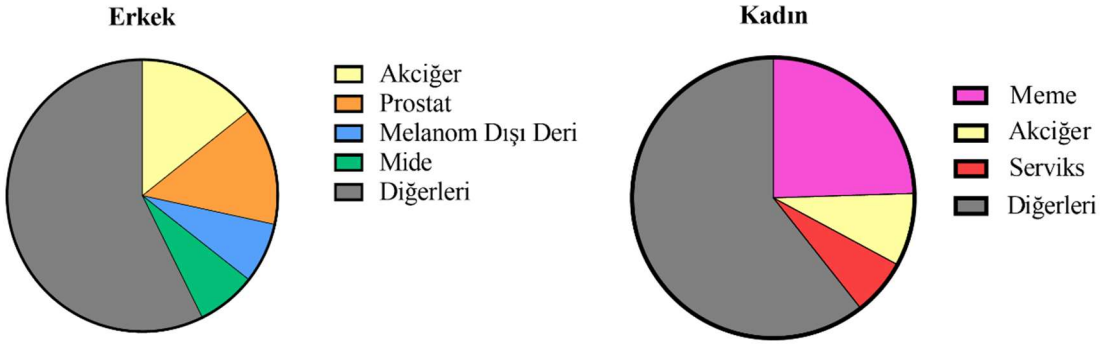
2.1.2. Dünya'da Kanser İstatistikleri

Kanser kaynaklı ölümler, kardiyovasküler hastalıklardan sonra tüm dünya ki ölümlerin ikinci önde gelen nedenidir (Glovaci vd., 2019; Ma vd., 2020). Dünyadaki her ülke en az bir kanser türünün insidansı ile yükümlüdür. GLOBOCAN ("Global Cancer Observatory") 2020'de 185 ülkeyi kapsayan bölgesel ve cinsiyete dayalı veriler ile kansere bağlı tahmini 19,3 milyon vaka ve 10 milyon ölüm rapor etmiştir. Bu vakalar arasında, dünya çapında yaygın olarak en sık teşhis edilen kanserler meme (2,26 milyon vaka, %11,7), akciğer (2,21 milyon, %11,4) ve prostat kanserleridir (1,41 milyon, %7,3). Kansere bağlı meydana gelen ölümlerde akciğer (1,79 milyon ölüm, %18), karaciğer (830.000, %8,3), mide (769.000, %7,7) ve meme kanserleri (680.000, %6,9) ilk sıralarda yer almaktadır (Şekil 3) (Sabarwal vd., 2018).



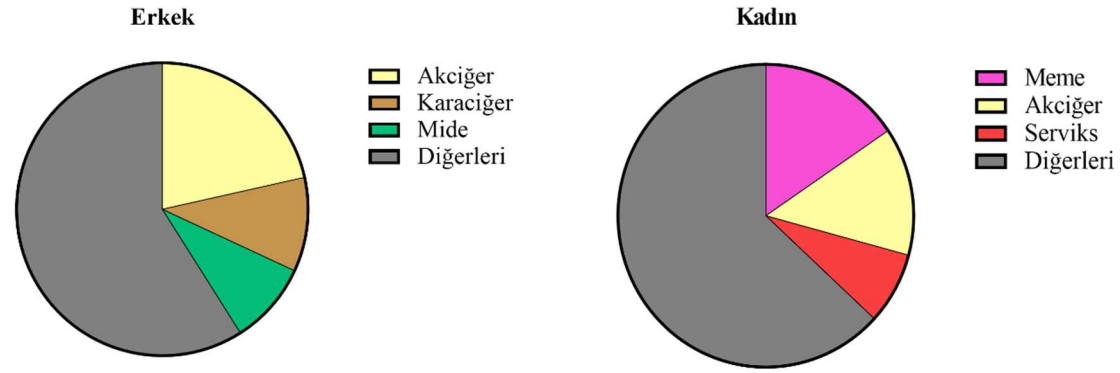
Şekil 3. Dünya genelinde kansere bağlı toplam vakaların (19,3 milyon) ve toplam ölümlerin (10 milyon) dağılımı (Sabarwal vd., 2018).

Cinsiyete göre ayrıştırılmış kanser insidans ve ölüm verilerinde erkeklerde en sık saptanan kanserler akciğer (%14,3), prostat (%14,1), melanom dışı deri (%7,2) ve mide (%7,1) kanserleri olurken, kadınlarda en sık tanı konulan kanserler meme (%24,5), akciğer (%8,4) ve serviks (%6,5) kanserleri olmaktadır (Şekil 4) (Ferlay vd., 2021).



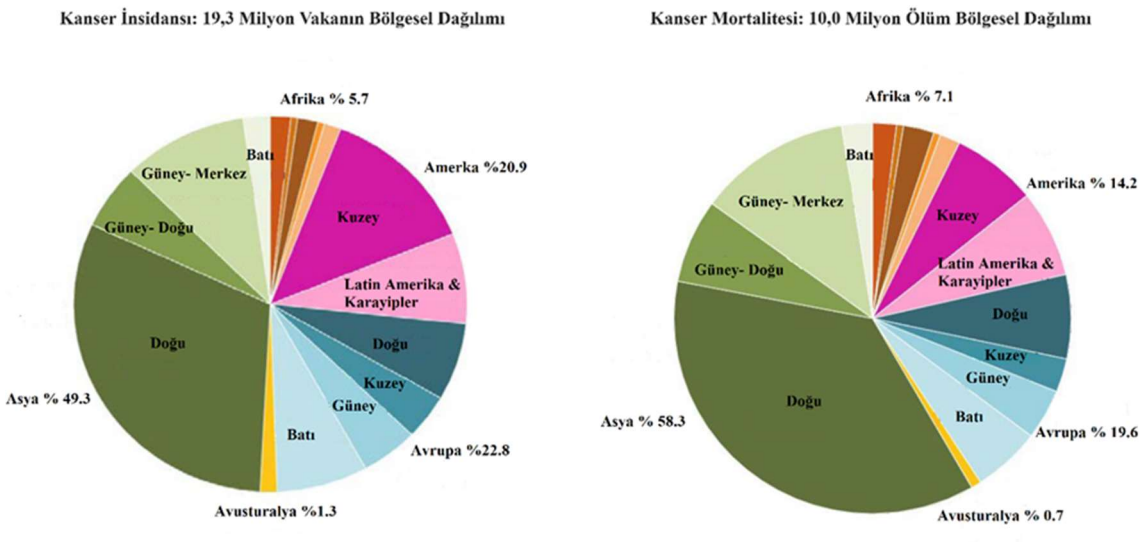
Şekil 4. Seçilen başlıca kanser türleri için erkeklerde ve kadınlarda toplam vakaların (10,1 milyon) yüzde dağılım şemaları (Sabarwal vd., 2018).

Mortalite açısından, erkeklerde en fazla ölüm akciğer (%21,5), karaciğer (%10,4), mide (%9,1) nedeniyle meydana gelirken kadınlarda ise en fazla ölüm meme (%15,5), akciğer (%13,7) ve serviks (%7,7) kanserleri nedeniyle meydana gelmektedir (Şekil 5) (Ferlay vd., 2021).



Şekil 5. Seçilen başlıca kanser türleri için erkeklerde ve kadınlarda toplam ölümlerinin (5,5 milyon) yüzde dağılım şemaları (Sabarwal vd., 2018).

Bölge bazında istatistiklere sahip GLOBOCAN verileri, en fazla vakayı 6,0 milyon (%31,1'i) ve 3,6 milyon ölüm (%36,3) ile Doğu Asya'nın bildirdiğini göstermektedir. Kuzey Amerika 2,6 milyon vaka (%13,3) bildirirken kanser ölümlerinde %7'lik bir paya sahip olmaktadır. Güney-Orta Asya 1,95 milyon vaka (%10) ve 1,3 milyon ölüm (%12,6) bildirmiştir. Avrupa, 1,9 milyon (%20) ölümle birlikte 4,4 milyon vakaya sahiptir (Şekil 6) (Ferlay vd., 2021).



Şekil 6. Kanser vakalarının ve ölümlerinin bölge bazında yüzde dağılımları (Ferlay vd., 2021).

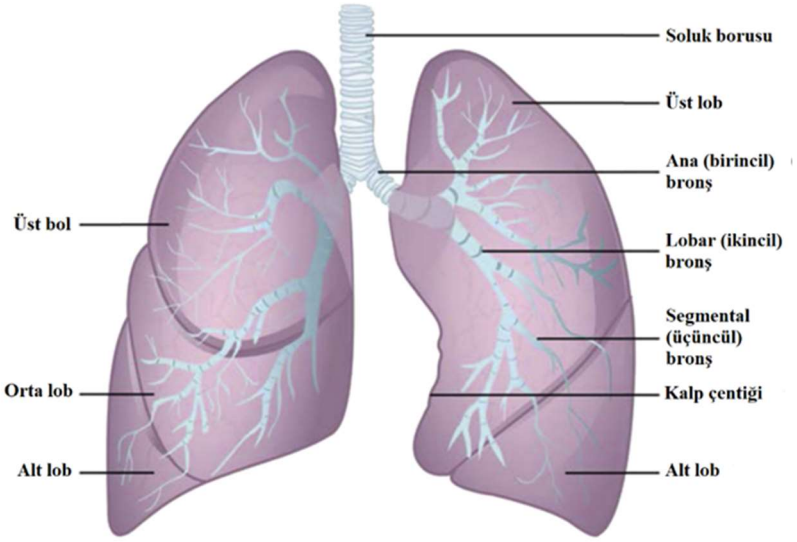
2.2. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, başta bronş mukoza hücreleri olmak üzere diğer akciğer ve akciğeri çevreleyen dokularda meydana gelen tümöral bir yapıdır (Reck vd., 2014). Tüm dünyada kanser ölümlerinin en önde gelen nedeni akciğer kanseridir (Siegel vd., 2022).

2.2.1. Akciğer Anatomisi

Kanserlerin mutajenik gelişiminin anlaşılması yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine yol açmıştır, ancak organın temel mimarisinin ve gelişiminin anlaşılması da oldukça önemlidir (Plume, 1985). Embriyonun morfogenezi sırasında karmaşık akciğer yapısı olgunlaşır ve farklı hücre tipleri ile iyi kontrollü bir şekilde organize olur. Akciğerlerin embriyonik aşamada geliştirilen karmaşık damar sistemi, kandan oksijen ve karbondioksit geçişini sürdürmek için hava ve kan arasındaki verimli gaz alışverişini kolaylaştırır (Bolte vd., 2018). Bu organda kanser gelişiminin belirlenmesi yalnızca tümöre özgü proteinlerin ekspresyonuna yol açan hücrelerin mutasyonuna bağlıdır. Burada akciğerlerin kritik mimarisi ve fizyolojisinin anlaşılması, bu hastalığın varlığının ve aşamalarının belirlenmesine yardımcı olur. Böylece, akciğerlerin yapısının anatomik farklılaşması ve bunların bitişik organlarla ilişkisi, malignitelerin köken bölgesini, yayılma şeklini, klinik görünümü ve mevcut tedavilerin sınırlamalarını aydınlatır (Plume, 1985). Akciğerler eşleştirilmiş solunum organlarıdır ve göğüs boşluğunda bulunur. Sağ ve sol akciğerler, kalbin, büyük damarların, bronşların, yemek borusunun ve diğer organların bulunduğu mediasten ile birbirinden ayrılır. Her akciğer solunum yolları ve alveollerden oluşur. Sağlıklı akciğerler yumuşak ve hafiftir. Akciğerin stroması, akciğerlerin ekspirasyon sırasında pasif olarak geri çekilmesine izin veren fibröz elastik bağ dokusundan oluşur. Akciğerlerin yüzeyleri visseral plevra ile kaplıdır ve göğüs boşluğu parietal plevra ile kaplıdır. Plevral boşluk, parietal ve visseral plevra arasında potansiyel bir boşluktur. Plevral membranlar, plevral yüzeyleri yağlayan ve akciğerlerin nefes alma sırasında göğüs duvarı üzerinde kaymasını sağlayan plevral sıvı olan seröz bir salgı üretir. Akciğerler koni şeklinde organlardır ve dar üst kısmı, klavikulanın ortasından 2,5 cm yukarıda olan tepe noktasıdır. Apeks servikal plevra ile kaplıdır. Akciğerin aynı

taraftaki diyafram üzerinde yer alan geniş alt kısmı tabandır. Sağ akciğer sol akciğerden nispeten daha büyüktür (Şekil 7) (Aung vd., 2019).



Şekil 7. Akciğer yapısı (Aung vd., 2019).

2.2.2. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi ve Etiyolojisi

Akciğer kanseri, dünyada en sık görülen kanser olması ve kansere bağlı ölüm nedenleri içerisinde birinci sırada yer alması nedeni ile çok önemli bir halk sağlığı sorunudur (Sung vd., 2021). Akciğer kanseri, 34 kanser grubu içerisinde yeni vaka ve ölüm yüzdeleri açısından ilk üç kanser grubu arasında yer almaktadır. 2020 yılında dünya genelinde akciğer kanseri nedeniyle 2,21 milyon yeni vaka ve 1,8 milyon ölüm meydana gelmiştir. Akciğer kanseri, küresel olarak erkeklerde kanser kaynaklı ölümlerin önde gelen nedenidir ve kadınlarda kanser kaynaklı ölümlerin meme kanserinden sonra ikinci en büyük nedenidir (Sung vd., 2021). Akciğer kanseri insidansı ve mortalitesi genel olarak erkeklerde kadınlara göre yaklaşık iki kat daha yüksektir, ancak erkek-kadın insidansı ve mortalite oranları dünyanın farklı bölgeleri arasında büyük farklılıklar göstermektedir. Doğu Asya, 2020'de tahmini 1,01 milyon akciğer kanseri insidansı ve 841.174 mortalite ile önde gelirken, onu Kuzey Amerika takip etmektedir. 2050 yılında akciğer kanserinin küresel yükünün her yıl 3,8 milyon yeni vakaya ve 3,2 milyon ölüme ulaşacağı öngörülmektedir (Sharma, 2022). Tütüne maruz kalma, dünya çapında akciğer kanseri için açık ara ana risk faktörüdür; ancak ülkeye göre önemli ölçüde değişebilen çevresel

maruziyetler (biyokütle yakıtları, arsenik, radon, endüstriyel kanserojenler ve hava kirliliği gibi) akciğer kanseri vakalarına ve ölüm eğilimlerine de katkıda bulunur. Ayrıca akciğer kanseri alt tiplerinin (adenokarsinom veya skuamöz hücreli karsinom gibi) belirli histopatolojik özelliklerinin kapsamı ve somatik mutasyonların sıklığı dünyanın farklı yerlerinde farklılık göstermektedir. Akciğer kanserinin ayrıca kadınlar, HIV ile yaşayanlar ve hiç sigara içmeyenler gibi belirli hasta popülasyonlarında da görülebilen belirli özellikleri vardır (Leiter vd., 2023).

2.2.3. Akciğer Kanserinin Histopatolojik Sınıflandırılması

Akciğer kanseri klinik açıdan önemli birçok alt tipi olan heterojen bir hastalıktır (Davidson vd., 2013). Akciğer kanserli popülasyonlarda beş yıllık sağkalım, evre ve histolojik tip farklılıklarına bağlı olarak %4 ila %17 arasında değişmektedir (Hirsch vd., 2017). Bunların arasında histolojik fenotip, tedaviye yanıtın ve genel klinik sonucun önemli bir belirleyicisidir. Dünya sağlık örgütü (DSÖ) 2021 sınıflandırması akciğer kanserlerinin tiplemeleri için büyük bir adım olmuştur. Bu sayede morfolojik özelliklerden ziyade biyobelirteç testine ve immünohistokimyaya dayanan bir sınıflandırma kabul görmüştür (Travis vd., 2015). Tüm primer akciğer malignitelerinin yaklaşık %85'i KHDAK yaklaşık %15'i ise KHAK'tır. KHDAK'ın üç ana alt tipini skuamöz hücreli karsinom (SCC), adenokarsinom (ADC) ve büyük hücreli karsinom (LCC) oluşturur (Miller vd., 2019). Şu anda KHAK ve KHDAK hastalarına yönelik tedavi seçenekleri farklıdır. Kemoterapi ve radyoterapi, KHAK hastaları için standart bakım tedavi seçenekleri olarak kabul edilmektedir (Rudin vd., 2015). Bu arada histolojik alt tipten bağımsız olarak KHDAK hastalarında tedavi seçeneği evre I'den IIIA'ya kadar cerrahidir (Varela & Thomas, 2014). Ancak KHDAK'ın aynı evresindeki hastaların prognozu ve nüks oranları heterojendir. Nüks ve hayatta kalma oranları genetik faktörler, tümörün boyutu ve derecesi gibi klinik faktörler, histolojik alt tip gibi birçok faktörden etkilenebilir (Skrzypski vd., 2013; Tian, 2015; Tian vd., 2015). Bu nedenle akciğer kanserinin doğru sınıflandırılması bireysel tedavi ve sistematik tedavi kararlarının ilk ve önemli adımıdır (Mangal vd., 2017; Yoda vd., 2019).

2.2.3.1. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK)

KHAK, ağırlıklı olarak mevcut veya eski sigara içenlerde ortaya çıkan yüksek dereceli bir nöroendokrin karsinomdur ve son derece kötü prognoza sahiptir (Rudin vd., 2021). KHAK ilk 1879'da Harting ve Hesse tarafından lenfosarkom olarak; 1926'da ise akciğerin küçük 'yulaf hücreli' karsinomu olarak tanımlanmıştır (Barnard, 1926). DSÖ 2015 yılında akciğer, pleura, timus ve kalp tümörleri sınıflandırması, nöroendokrin tümörlerin (NE) gruplandırılarak dört ana NE tümörü tanınmasını içermektedir. Bunlar; tipik karsinoid tümör (TC), atipik karsinoid tümör (AC), KHAK ve büyük hücreli NE karsinomlardır (LCNEC) (Travis vd., 2015). Mevcut alt sınıflandırma saf KHAK ve kombine KHAK olmak üzere iki alt tipi tanımaktadır. KHAK, saf bir KHAK histolojisi olarak gözlemlenebilir veya KHDAK histoloji özellikleriyle birleştirilebilir. Diğer sınıflandırma basamağı ise KHDAK elemanlarının karışımını ifade eder; burada ADC, SCC ve LCC görülebildiği gibi, daha düşük sıklıkta da olsa dev hücreli karsinom ve iğ hücreli karsinom da görülebilmektedir (Travis vd., 2015). Kombine KHAK, muhtemelen ezilme artefaktının artması ve daha az hücre bulunması nedeniyle, küçük biyopsi numunelerine kıyasla cerrahi numunelerde daha sık tanınmaktadır (Nicholson vd., 2002; Travis, 2012). KHAK'da en yaygın sitolojik özellik, çok az veya boş sitoplazmaya sahip, gevşek bir şekilde düzenlenmiş veya sinsityal bir düzende küçük mavi hücrelerin varlığıyla yüksek düzeyde hücresel aspiratlardır. Sıkıca birbirine yapışan tabakalarda nükleer kalıplama iyi gelişmiştir. Ek olarak, tek hücreli, çiftli, üçlü ve geniş nekrozlu küçük hücre kordonlarından oluşan bir arka plan bu antitenin karakteristik özelliğidir. Mitotik oran genellikle çok yüksektir ve kromatin bulaşması çok sık görülmektedir. Paranükleer mavi cisimler olarak da adlandırılan sitoplazmik globüllerin, KHAK tanısının ayırt edici özelliği olduğu düşünülmektedir (Mullins vd., 1994; Wang vd., 2013). KHAK, düşük moleküler ağırlıklı keratinler için pozitif boyanır. Nokta benzeri paranükleer veya yaygın sitoplazmik boyama gösterir. KHAK, nöral hücre yapışma molekülü (NCAM/CD56), kromogranin, sinaptofizin ve insülinoma ile ilişkili protein 1 (INSM1) gibi nöroendokrin farklılaşma belirteçlerinin değişken bir ifadesini gösterir ve genellikle düşük-orta dereceli nöroendokrin tümörlerden daha düşük protein seviyeleri sunmaktadır. İmmünohistokimya boyamalarında özellikle Tiroid transkripsiyon faktörü-1 (TTF-1) KHAK'da seçici olarak eksprese edilen homeodomain içeren bir transkripsiyon

faktörüdür. TTF-1, KHAK'nin %90'ına yakın bir oranda eksprese edilmektedir. (Arcaro, 2015).

2.2.3.2. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK)

KHDAK tanısında ilk adım, tümör morfolojik özelliklerinin değerlendirilmesine dayanan histolojik sınıflandırma ve ardından yardımcı immünohistokimyasal (IHC) metodolojilerdir (Kadota vd., 2015; Rekhtman vd., 2011). KHDAK tanısında ana sorun sıklıkla gözlemlenen tümör heterojenliğidir. Bu fenomen, tek bir tümörde meydana gelen çok sayıda genetik varyantı ve bunların zaman içindeki değişimini ifade etmektedir (Jamal-Hanjani vd., 2017; Zhang vd., 2014). KHDAK; adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom, adenoskuamöz hücreli karsinom, büyük hücreli karsinom ve sarkomatoid karsinomu içeren heterojen bir hastalık grubudur. Tükürük bezi tipi tümörler, sarkomatoid karsinomlar ve diğerler tipler toplam KHDAK vakalarının çok küçük bir bölümünü temsil etmektedir. En yaygın histolojik alt tipler adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinomdur. Bu alt tipler, adenokarsinomun lepidik baskın alt tipi veya skuamöz hücreli karsinomun bazaloid varyantı gibi daha spesifik alt tiplere ayrılabilmektedir (Çizelge 1) (Travis vd., 2015). Akciğer ADC ve SCC'ye yönelik tedavi sonuçları ve kemoterapötik rejimler farklı olduğundan, tedaviye başlamadan önce histopatolojik tanı önemlidir. Küçük biyopsilerde, histolojik özellikler ve IHC fenotipi, KHDAK alt tipini belirlemek için kesin olmadığında, KHDAK-NOS terimi kullanılmaktadır (Hyun vd., 2019).

Çizelge 1. KHDAK histolojik sınıflandırılması (Travis vd., 2015).

KHDAK Adenokarsinomu	Lepidik adenokarsinom
	Asiner adenokarsinom
	Papiller adenokarsinom
	Mikropapiller adenokarsinom
	Solid adenokarsinom
	İnvaziv müsinöz adenokarsinom
	Kolloid adenokarsinom

	Fetal adenokarsinom
	Enterik adenokarsinom
	Minimal invazif adenokarsinom
	Preinvaziv lezyonlar
Skuamöz Hücreli Karsinom	Keratinize edici skuamöz hücreli karsinom
	Keratinize olmayan skuamöz hücreli karsinom
	Bazaloid skuamöz hücreli karsinom
	Preinvaziv lezyon
Nöroendokrin tümörler	Küçük hücreli karsinom
	Büyük hücreli nöroendokrin karsinom
	Karsinoid tümörler
	Preinvaziv lezyon
	Büyük hücreli karsinom
	Adenoskuamöz karsinom
	Sarkomatoid karsinom

2.2.3.2.1. KHDAK Adenokarsinomları

Adenokarsinomlar, KHDAK'ların çoğunluğunu temsil eder ve tüm akciğer kanseri vakalarının %38,5'ini oluşturur (Dela Cruz vd., 2011). Adenokarsinomlar, musikarmin gibi müsin boyama ile tespit edilebilen müsin üretimini ya da napsin A veya TTF-1 gibi pnömosit marker ekspresyonunu gösterebilen, glandüler farklılaşmaya sahip malign bir epitelyal tümör olarak tanımlanır (Travis vd., 2015). Genel olarak adenokarsinomlar akciğerin periferinde bulunmaktadır (Russell vd., 2013). Adenokarsinomlar, lepidik, asiner, papiller, mikropapiller ve katı modeller dahil olmak üzere çeşitli histolojik modeller sunabilir. Lepidik patern olumlu bir prognozla ilişkilendirilirken, mikropapiller ve katı paternler daha agresif bir davranışla ilişkilidir. Katı adenokarsinomlar, skuamöz hücreli karsinomlar veya büyük hücreli akciğer karsinomları ile karıştırılabilir. TTF-1 veya napsin A'nın müsin üretimi ve IHC ekspresyonu zorlu vakalarda katı adenokarsinomların teşhisinde yardımcı olabilmektedir (Travis vd., 2013, 2015). Adenokarsinomlar in situ adenokarsinoma (AIS, preinvaziv lezyon), minimal invazif adenokarsinom (MIA), invaziv adenokarsinoma ve atipik adenomatöz hiperplazi (AHH)

olarak ayrılmaktadır (Noguchi vd., 1995). Mukus üretiminin arttığı en az beş noktanın varlığı (görüş alanında beşten fazla hücrenin sitoplazmasında müsin granüllerinin varlığı) tümörün adenokarsinom grubuna dahil olduğunu işaret eder. Bu tür gözlemlerin yokluğunda tanı, skuamöz hücreli karsinomdur (Jamal-Hanjani vd., 2017; Rekhtman & Travis, 2019).

- ***Atipik Adenomatöz Hiperplazi (AHH):*** AAH genellikle rezeke edilen akciğer kanserlerine bitişik akciğer dokusunda rastlantısal bir bulgudur. AIS kriterlerine benzeyen ancak bu kriterlerin altında kalan küçük nodüler atipik pnömosit proliferasyonundan oluşur. Örneklenen akciğer dokusunun boyutuna bağlı olarak akciğer adenokarsinomu rezeksiyon örneklerinin yüzdesi %5,7 ila %21,4 oranında görülmektedir. Çoğu AAH, genellikle çapı 5 mm'den küçük olan küçük nodüler pnömosit proliferasyonlarıdır. AAH'yi AIS'den ayırmak için kesin bir boyut ayrımı olmamasına rağmen, sıklıkla çok merkezlidirler. AAH'ler, alveol duvarlarını ve solunum bronşiyollerini kaplayan şekilde küboidal ila alçak sütun şeklinde tip II pnömositlerden ve/veya Club (eski adıyla Clara) hücrelerinden oluşur (Travis, 2020).

- ***Adenokarsinoma in Situ (AIS):*** AIS, invazyon olmaksızın saf lepidik paterne sahip atipik pnömositlerin küçük (3 cm) proliferasyonu olarak tanımlanır. Büyük çoğunluğu müsinöz değildir, ancak nadiren müsinöz olabilirler. Müsinöz olmayan tümörler tip II pnömositlerin veya Club (eski adıyla Clara) hücrelerinin çoğalmasından oluşur. Müsinöz AIS vakaları, bol miktarda apikal müsin içeren uzun kolumnar goblet hücrelerinden oluşur. Bu lezyonların tamamen rezeke edilmesi durumunda hastaların %100'ü 5 yıllık hastalıksız sağkalıma sahip oldukları rapor edilmiştir. Bilgisayarlı tomografi (BT) ile AIS, müsinöz değilse çoğunlukla saf buzlu cam nodül ve müsinöz AIS ise katı bir nodül gösterir (Rekhtman & Travis, 2019; Travis, 2020).

- ***İnvaziv adenokarsinom:*** İnvaziv adenokarsinom nadir varyantlara ek olarak müsinöz olmayan ve müsinöz tipler olmak üzere iki ana kategoriye ayrılmaktadır. İnvaziv müsinöz adenokarsinomlar, çoğu tümörde TTF-1 ekspresyonunun olmaması, sık görülen çok merkezli akciğer lezyonları ve çoğu durumda KRAS mutasyonları dahil olmak üzere, müsinöz olmayan invaziv adenokarsinomlardan çeşitli şekillerde farklılık gösterir.

İnvaziv adenokarsinom lepidik, papiller, asiner, mikropapiller ve katı adenokarsinom olmak üzere beş baskın model kullanılarak sınıflandırılmaktadır Sitolojik olarak tümör hücreleri, bol miktarda apikal müsin ve küçük bazal yönelimli çekirdekler içeren sütunlu bir şekle sahiptir. BT'de tümörler sıklıkla lokalize veya multifokal konsolidasyon gösterirler (Travis, 2020).

- ***Minimal invaziv adenokarsinom (MIA):*** MIA, küçük bir invazif büyüme alanına (0,5 cm) sahip küçük (3 cm) lepidik baskın adenokarsinomlardan oluşur. Çoğu MIA müsinöz olmasa da nadir müsinöz vakalar meydana gelebilir. Tümör tamamen rezeke edilirse 5 yıllık hastalıksız sağkalım %100'e yakındır. BT ile müsinöz olmayan tümörler, küçük bir katı bileşene (0,5 cm) sahip, buzlu cam ağırlıklı bir katı nodül olarak ortaya çıkmalıdır, ancak müsinöz MIA genellikle katı bir nodül gösterir (Travis, 2020).

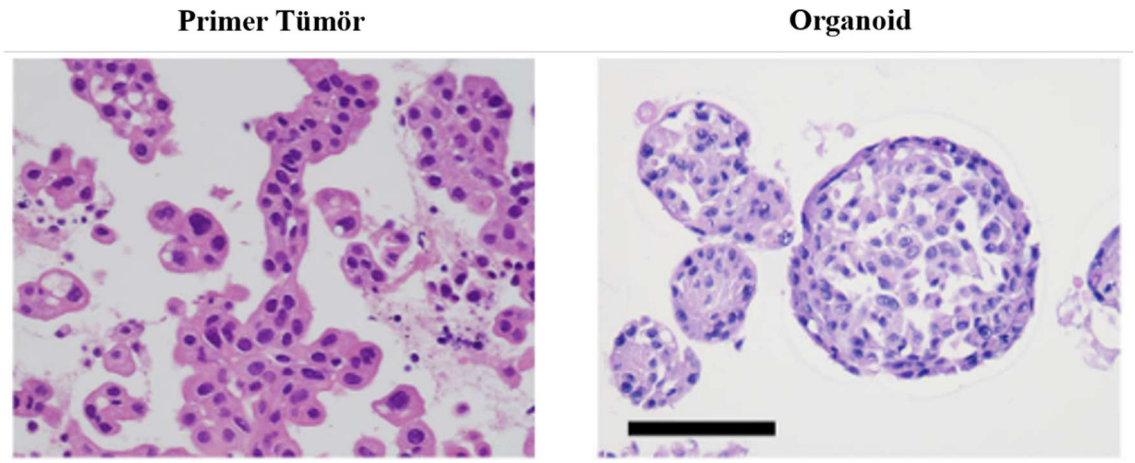
2.2.3.2.2. Skuamöz Hücreli Karsinomlar (SCC)

SCC, tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %20'sinden sorumludur (Dela Cruz vd., 2011). SCC genellikle ana veya lober bronştan köken alan merkezi bir konumda ortaya çıkmaktadır. Histolojik olarak SCC, DSÖ tarafından keratinizasyon ve/veya hücreler arası köprüler gösteren veya skuamöz hücre farklılaşmasının IHC belirteçlerini eksprese eden malign epitelyal tümör olarak tanımlanır (Travis vd., 2015). Keratinizasyon, SCC'nin ayırt edici özelliği olmasına rağmen, birçok SCC, keratinizasyonun morfolojik özelliklerini göstermeyebilir. Ayrıca, az farklılaşmış SCC, psödoglandüler görünüm gösterebilir. Bunun yanı sıra zayıf şekilde farklılaşmış adenokarsinomlar psödoskuamöz özellikler gösterebilir. Bu durumda küçük biyopsilerin veya sitolojik örneklerin yorumlanmasını zorlaştırır (Rekhtman vd., 2011; Travis vd., 2013, 2015). p40 veya p63 gibi skuamöz hücre farklılaşması belirteçlerini ve sitokeratin 5/6'yı içeren IHC testleri, zor vakalarda SCC'nin tanımlanmasında yararlı araçları temsil eder. SCC'ler, keratinize edici SCC, keratinize edici olmayan SCC ve bazaloid SCC olarak sınıflandırılır. Bu sınıflandırmadan önce bazaloid SCC, LCC varyantı olarak kategorize edilmekteydi. Ancak bazaloid SCC, IHC olarak SCC belirteçlerini göstermektedir (Inamura, 2017). Keratinize edici skuamöz karsinom, hücreler arası köprüleme, skuamöz inci oluşumu ve keratinizasyon gösterir. Keratinize olmayan skuamöz hücreli karsinomlar, keratinizasyon

veya glandüler morfolojiden yoksun katı tümör hücreleri tabakaları gösterir. Tanı ancak IHC negatif TTF-1 ile p63 gibi skuamöz belirteçlerin ekspresyonunu gösterirse yapılabilir (Travis, 2020; Yatabe vd., 2019). Bazaloid skuamöz hücreli karsinomlar çoğunlukla organoid yuvalanma, yetersiz sitoplazmalı küçük tümör hücreleri ile çoğunlukla nonkeratinizedir. Ani keratinizasyon ve hiyalin stroma bantları görülebilir (Kadota vd., 2014, 2017).

2.2.4. KDHAK'inde Histokimyasal Belirteçler

Tümör mikro ortamının, tümör hücresi çoğalması, istilası ve metastazı üzerinde sürdürülebilir etkileri vardır ve buna bağlı olarak histopatoloji görüntülerinde morfolojik değişikliklerin meydana geldiği görülmektedir (Heindl vd., 2015). H&E boyaları çeşitli doku tiplerinin ve çağdaş kanser tanısının temelini oluşturan morfolojik değişikliklerin tanınması için yıllardır kullanılmaktadır. H&E boyaları en yaygın kullanılan histolojik boyalardır. Popülaritesi karşılaştırmalı basitliğine ve çok sayıda farklı doku yapısını açıkça gösterebilme yeteneğine dayanmaktadır (Khalil vd., 2016). Kullanımı basit, otomatikleştirilmesi kolaydır ve farklı doku yapılarını net bir şekilde gösterir. Hematoksilin çeşitli yollarla hazırlanabilir ve farklı bölgelerdeki dokulara ve hücrelere yaygın bir şekilde uygulanabilir (Weigelt & Reis-Filho, 2010; Zhang vd., 2010). Boyalar, çeşitli fiksatiflerle iyi çalıştığı ve çok çeşitli sitoplazmik, nükleer ve hücre dışı matriks özellikleri sergilediği için uzun yıllardır değişmemiştir. Hematoksilin, hücre çekirdeğini mavi-siyah renkte boyayarak net intranükleer ayrıntıları gösterirken eozin, hücre sitoplazmasını ve bağ dokusu liflerinin çoğunu pembe, turuncu ve kırmızının değişen tonlarında ve yoğunluklarında boyamaktadır (Şekil 8).



Şekil 8. Akciğer kanseri orijinal kanser dokularının ve bu dokulardan türetilen organoid yapılarının temsili H &E boyama görüntüleri. Ölçek çubuğu, 100 μm (Ko vd., 2022).

İyi sabitlenmiş hücreler önemli miktarda intranükleer ayrıntı gösterir. Çekirdekler, teşhis açısından çok önemli olan, değişen hücre tipi ve kanser tipine özgü heterokromatin yoğunlaşma modellerini gösterir. Bol miktarda poliribozom mevcutsa, sitoplazma belirgin bir mavi renk tonuna sahip olmaktadır. Golgi bölgesi, çekirdeğin yanındaki bir bölgede lekelenmenin olmamasıyla geçici olarak tanımlanabilmektedir. Böylece leke, spesifik fonksiyonel etkileri olan bol miktarda yapısal bilgiyi açığa çıkarmaktadır (Fischer vd., 2008). Otomatik boyama makineleri ve ticari olarak hazırlanan hematoksilen ve eozin solüsyonları günümüz laboratuvarlarında rutin boyama için yaygın olarak kullanılmaktadır. Hematoksilen ayrıca elastik lifler, kas çizgileri ve müsinler gibi bağ dokularını göstermek için eozinsiz bir boya olarak da kullanılabilir (Heindl vd., 2015).

2.2.4.1. Hematoksilen

Hematoksilen, kökeni Meksika'nın Campeche Eyaleti olan *Hematoxylon campechianum* ağacının öz odunudur, ancak şu anda esas olarak Batı Hint Adaları'nda yetiştirilmektedir. Kütük ağacından sıcak su ile ekstrakte edilir ve daha sonra üre kullanılarak sulu çözeltiden çökeltilir. Hematoksilenin kendisi bir leke değildir ancak ana oksidasyon ürünü olan hematein, renk özelliklerinden sorumlu doğal bir boyadır. Hematein, hematoksilenden iki şekilde üretilebilir:

- ***Doğal oksidasyon veya ışığa ve havaya maruz bırakılarak olgunlaştırma:*** Bu yavaş süreç 3-4 aya kadar sürebilir ancak ortaya çıkan çözelti, lekelenme özelliğini uzun süre korur. Ehrlich ve Delafield'in hematoksilen çözeltileri doğal olarak olgunlaşmış hematoksilenlerin örnekleridir (Suvarna vd., 2019).

- ***Kimyasal oksidasyon:*** Kimyasal oksitleyici maddeler hematoksileni hızlı bir şekilde hemateine dönüştürür, böylece bu çözeltiler hazırlandıktan hemen sonra kullanıma hazır olur. Mayer hematoksileninde kullanılan sodyum iyodat ve Harris hematoksileninde kullanılan cıva oksit bu ajanlara örnektir. Bu çözeltilerin kullanım ömrü doğal olarak oksitlenen hematoksilinlere göre daha kısadır çünkü oksidasyon süreci hava ve ışıkta devam ederek hemateini renksiz bir bileşiğe dönüştürür (Suvarna vd., 2019).

Hematein, dokuya afinitesi zayıf olan anyonik bir maddedir ve mordan olmadan nükleer bir leke olarak yetersizdir. Mordandaki metal katyonu, boya mordan kompleksine net bir pozitif yük kazandırır ve onun anyonik doku bölgelerine bağlanmasını sağlar. Kullanılan mordan türü, boyanan doku bileşenlerinin türünü ve bunların nihai rengini etkiler. Hematoksilen için en kullanışlı mordanlar alüminyum, demir ve tungsten tuzlarıdır. Çoğu mordan boyama çözeltisine dahil edilir. Hematoksilen çözeltileri kullanılan mordana göre sınıflandırılır.

- ***Şap hematoksilinleri:*** Bunlar en sık kullanılan hematoksilinlerdir ve iyi nükleer boyama üretirler. Mordan alüminyumdur ve genellikle alüminyum potasyum sülfat veya

alüminyum amonyum sülfat kullanılır. Çekirdekleri kırmızı bir renge boyar ve kesit zayıf bir alkali çözeltide yıkandığında bu renk mavi-siyaha dönüşür. Ehrlich's, Mayer's, Harris's, Gill's, Cole's ve Delafield's rutin H&E boyama için en yaygın kullanılan şap hematoksilenleridir (Suvarna vd., 2019).

- ***Demir hematoksilinleri:*** Bu hematoksilen çözeltileri hem oksitleyici madde hem de mordan olarak demir tuzlarını ve genellikle ferrik klorür ve ferrik amonyum sülfatı kullanır. En yaygın demir hematoksilenleri Weigert, Heidenhain, Loyez ve Verhöeff'dir. Demir hematoksilinler, şap hematoksilinlere göre çok daha geniş bir doku yapısı aralığını gösterme kapasitesine sahiptir, ancak teknikler daha fazla zaman alıcıdır. Genellikle doğruluk için mikroskobik kontrol gerektiren bir farklılaşma aşamasını içerir (Suvarna vd., 2019).

- ***Tungsten hematoksilinleri:*** Orijinal Mallory fosfotungstik asit hematoksilin (PTAH) tekniğinin birçok çeşidi olmasına rağmen, yaygın olarak kullanılan tek bir tungsten hematoksilin vardır. Mallory (Mallry & Parker, 1939) hematoksileni %1 sulu fosfotungstik asitle birleştirilir ve mordan görevi görmektedir. Hematoksilen yerine hematein kullanılarak boyama solüsyonu hazırlamak mümkündür. Burada oksidasyon işlemi gereksizdir ve boyama solüsyonu hemen kullanılabilir, ancak etkinliği nispeten kısa ömürlüdür. Hematoksilen, potasyum permanganat çözeltisi kullanılarak kimyasal olarak oksitlenebilir ve çözelti 24 saat içinde kullanılabilir. En tatmin edici fakat zaman alıcı hazırlama yöntemi, tungsten hematoksilen çözeltisinin ışıkta ve havada doğal olarak olgunlaşmasına izin vermektir. Üretilen PTAH çözümünün olgunlaşması birkaç ayı bulabilir ancak uzun yıllar kullanılabilir durumda kalacaktır. Boyama süreleri hazırlama yöntemine, kullanılan fiksatife ve gösterilecek doku yapısına göre değişecektir. Kesit bir asit dikromat çözeltisiyle işlendikten ve Mallory ağartma işleminden sonra boyama daha kesin olmaktadır (Suvarna vd., 2019).

- ***Molibden hematoksilinleri:*** Mordan olarak molibdik asit kullanan hematoksilen çözeltileri nadirdir ve kabul gören tek teknik Thomas tekniğidir. Bu bağ dokusu lifleri için değerli ve yaygın olarak kabul edilen teknikler mevcut olmasına rağmen,

araştırmacılar kollajen ve kaba retikülinin gösterilmesine yönelik yöntemi önermektedir (Suvarna vd., 2019).

- ***Kurşun hematoksilinleri:*** Kurşun tuzları içeren hematoksilen çözeltileri, sindirim sistemi ve diğer bölgelerin endokrin hücrelerindeki granüllerin gösterilmesinde kullanılmıştır. En pratik teşhis uygulaması, bazı tümörlerdeki endokrin hücrelerin tanımlanmasıdır (Beltrami vd., 1975; Suvarna vd., 2019).

- ***Mordansız hematoksilinler:*** Mordan olmadan kullanılan taze hazırlanmış hematoksilen çözeltileri, doku kesitlerinde çeşitli mineralleri göstermek için kullanılmıştır (Mallry & Parker, 1939; Suvarna vd., 2019).

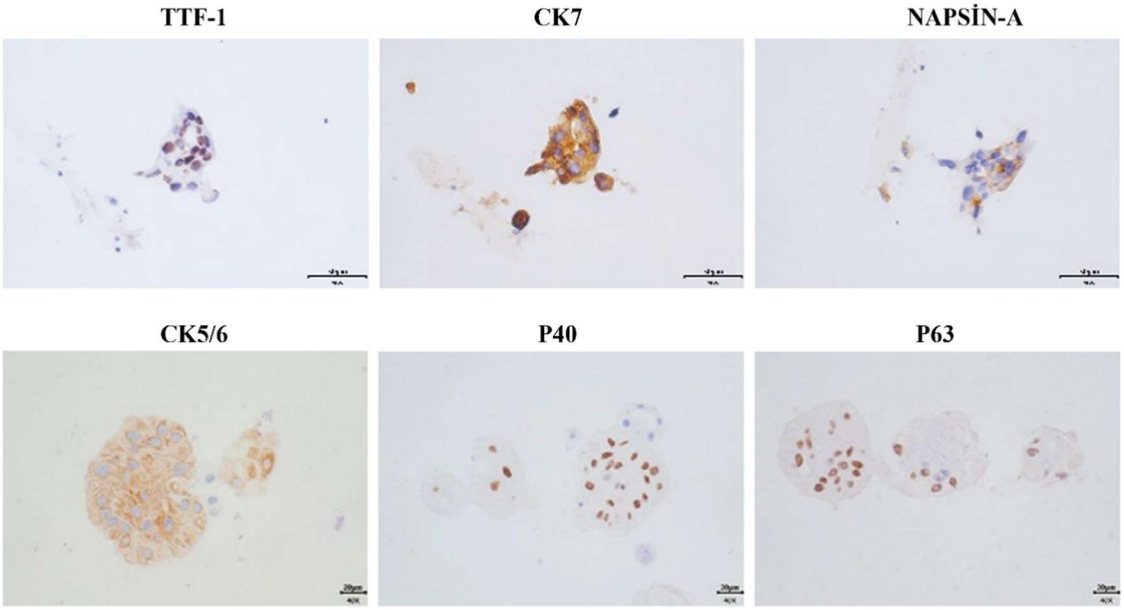
2.2.4.2. Eozin

Eozin, pozitif yükler içeren eozinofilik bileşiklerle tuzlara bağlanan floresan, ksanten boyasıdır. Dokuların genel histolojik mimarisini göstermek amacıyla hematoksilen ile birleştirmek için en uygun boyadır. Eozin, kırmızı ve pembenin farklı tonlarını boyayarak, farklı hücre türlerinin sitoplazmasını, bağ dokusu liflerini ve matrislerini ayırt etme yeteneğine sahiptir. Ticari olarak temin edilebilen çeşitli eozin türleri vardır ancak Eozin Y en yaygın kullanılanıdır ve su ile alkolde çözünür. Sitoplazmik bir leke olarak, genellikle damıtılmış su içinde %0,5 veya %1,0'lık bir çözelti halinde kullanılır ve mantarların büyümesini engellemek için bir timol kristali eklenir. Biraz asetik asit ilavesinin (0,5 ml ila 1000 ml leke) lekeyi keskinleştirdiği söylenmektedir. Eozin lekeleri genellikle musluk suyuyla yıkandıktan sonra daha belirgin hale gelirken, alkoller yoluyla yapılan dehidrasyon işlemi sırasında bir miktar daha fazla farklılık ortaya çıkabilir. Eozin boyamanın yoğunluğu ve farklılaşma derecesi bireysel ve laboratuvar zevkine bağlıdır. Alternatif kırmızı boyalar olan Floksin veya Biebrich kırmızısı eozin yerine kullanılabilir ancak dokulara daha yoğun bir kırmızı renk verir. Cıva fiksasyonu sonrası eozin boyanması yoğun olabilir ve yeterli farklılaşmanın sağlanmasında zorluk yaşanabilir. Eozinin kırmızı kan hücreleri ve eozinofil polimorf granülleri kırmızıya boyanıncaya kadar aşırı farklılaşması, bu tip hücrenin yerini ve tanımlanmasını kolaylaştırır. 10 ml %1 floksin B, 100 ml %1 eozin Y, 780 ml %95 alkol ve 4 ml buzlu asetik asidin

birleştirilmesi, kasın kollajenden açıkça farklılaştığı ve kırmızı hücrelerin parlak kırmızıya boyandığı sitoplazmik bir leke üretmektedir (Suvarna vd., 2019).

2.2.5. KHDAK'inde İmminohistokimyasal Belirteçler

Günümüzde KHDAK tanısı genellikle morfolojik değişiklikler açısından mikroskop altında değerlendirilen H&E boyalı bir doku kesiti ile başlar. Patoloğun sadece KHDAK tanısı koymak için değil, aynı zamanda ADC veya SCC olarak sınıflandırması için en iyi çabayı göstermesi gerekmektedir (Fujimoto & Wistuba, 2014; Travis vd., 2015). ADC klasik olarak glandüler patern gösteren veya sitoplazmik mukus taşıyan bir kanser olarak tanımlanırken, SCC hücreler arası köprülerin varlığı ve keratinizasyon ile karakterizedir. Bu morfolojik özellikler, özellikle ilerlemiş hastalıklarda doku mevcudiyetinin sınırlı olması nedeniyle bazen belirsizdir. Bu nedenle, küçük doku örneklerinde ve/veya kötü diferansiye KHDAK örneklerinde bu iki histolojik tip arasında ayrım yapmak için IHC analizi kullanılmalıdır. TTF-1, Müsikarmen Sitokeratin 7 ve Napsin A, ADC belirteçleri olarak kabul edilirken, p40, p63 ve Sitokeratin 5/6 SCC belirteçleri olarak kullanılır (Şekil 9). IHC ayırıcı tanının temeli haline gelmiştir. Hücresel bileşenin morfolojisinin belirsiz olması veya heterojenliği durumunda IHC, lezyonun histolojik tipinin belirlenmesine olanak sağlar. Günümüzde histolojik değerlendirmenin değeri önemli ölçüde artmış ve tanısal prosedür algoritmalarının vazgeçilmez bir unsuru haline gelmiştir (Collisson vd., 2014; Politi & Herbst, 2015).



Şekil 9. Adenokarsinomdan ve skuamöz hücreli karsinomdan türetilmiş türetilmiş organoidlerin temsili IHC boyama görüntüleri. Ölçek çubuğu, 50 mm (Wang vd., 2023).

2.2.5.1. Tiroid Transkripsiyon Faktörü-1 (TTF-1)

NK2 homeobox 1 (Nkx2.1) olarak da bilinen ve NKX2.1 geni tarafından kodlanan TTF-1, normalde yetişkin tiroid dokusunda ve yetişkin akciğerindeki Tip II pnömositlerde eksprese edilen 38 kDa'lık bir transkripsiyon faktörüdür (Guazzi vd., 1990). TFF-1 peptidi, mide yüzeyindeki mukoza hücreleri tarafından MUC5AC müsini ile birlikte üretilen müsinle de ilişkili bir moleküldür (Poulsoma vd., 1996). Esas olarak TTF-1; tiroid bezlerinin, akciğerlerin ve beyinin farklılaşmasına özgü genlerin transkripsiyonunu düzenler. Tanısal patolojide, hücre çekirdeğinde TTF-1'in IHC tespiti, tiroid veya akciğer farklılaşmasının tanımlanması için bir araçtır. Normal yetişkin akciğerlerinde, TTF-1 bazı bronşiyal epitel hücreleri, tip II pnömositleri ve kulüp hücrelerini işaretler (Zhou vd., 1996). TTF-1'in ayrıca Clara hücre proteini ve yüzey aktif madde gibi çeşitli genlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı da rapor edilmiştir (Bingle, 1997; Zhou vd., 1996). Son çalışmalar TTF-1'in akciğer kanseri için soya özgü bir protoonkogen olduğunu önermiştir. TTF-1'in prognostik önemi, KHDAK'da özellikle akciğer adenokarsinomunda yapılan çeşitli çalışmalarla araştırılmıştır (Chen vd., 2015). Önceki raporlar, TTF-1 ekspresyonunun farklı histolojik akciğer kanseri tipleri arasında farklılık gösterdiğini belirtmektedir (Di Loreto vd., 1997; Zamecnik & Kodet, 2002).

Tümörlerde TTF-1 ekspresyonu, çalışmaya ve kullanılan antikora bağlı olarak ADC ve KHAK'da sık görülürken, SCC veya LCC'de nadirdir (Anagnostou vd., 2009). İlginç bir şekilde, TTF-1 ekspresyonunun ADC'de daha iyi bir prognoz ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Anagnostou vd., 2009; Berghmans vd., 2006).

2.2.5.2. Napsin-A

Napsin A, katalitik merkez içinde proteinleri ve peptidleri parçalayarak bu moleküllerin olgun veya aktif formlarını üreten, yapısında iki aspartik asidi barındıran fonksiyonel bir aspartik proteinazıdır. 19q13.3 kromozomunda yer alan NAPSA geni tarafından kodlanmaktadır (Hirano vd., 1995; Qian vd., 2015; Tatnell vd., 1998). Napsin A esas olarak tip II pnömositlerin, intra-alveolar makrofajların, böbrek hücrelerinin (proksimal ve kıvrımlı tübüller), pankreatik asinus ve kanalların, akciğer adenokarsinomlarının ve renal hücreli karsinomların sitoplazmasında bol miktarda eksprese edilir (Ordóñez, 2012; Xu vd., 2014). Fizyolojik olarak, Napsin A, tip II pnömositlerdeki prosurfaktan protein B'nin olgunlaşmasında (Brasch vd., 2003) potansiyel olarak makrofajlar tarafından fagositozda (Ordóñez, 2012) ve böbrek hücrelerinde lizozomal protein katabolizmasında (MORI vd., 2002) rol oynar. Nafsin-A ekspresyonunun, akciğer kanserinde tanısal bir belirteç olarak kullanılan Nkx2 transkripsiyon faktörleri ailesinin bir üyesi olan TTF-1 tarafından düzenlendiği gösterilmiştir (deFelice vd., 2003). Rezekte edilmiş tümör dokuları kullanılarak yapılan çalışmalar, iyi ila orta derecede farklılaşmış adenokarsinomlarda akciğer orijinini belirlemek için napsin-A'nın TTF-1 immünoboyasına göre eşit veya daha iyi sonuç verdiğini göstermiştir (Lin vd., 1999; Schultz vd., 2008). Napsin-A'nın akciğer adenokarsinomu için duyarlılığı %58 ile %90 arasında ve özgüllüğü %90.7 ile %100 arasında değiştiği görülmektedir (Ao vd., 2014; Bishop vd., 2010; Kim vd., 2013; Mukhopadhyay & Katzenstein, 2011; Noh & Shim, 2012; Tacha vd., 2012; Terry vd., 2010).

2.2.5.3. p63(TAp63) ve p40(ΔNp63)

p63 geni, iki izoform üreten iki promoter içermektedir. İzoformlardan biri N-terminal transaktivasyon alanını (TAp63 (p63)) içerirken diğeri bu alandan yoksundur (ΔNp63 (p40)). p63 cilt, yemek borusu, bademcik, ürotelyum, ektoserviks ve vajina gibi katmanlı epitelyumun bazal ve progenitör hücrelerin çekirdeklerinde ve timus, prostat, meme ve bronşların glandüler yapılarının bazal hücrelerinde eksprese edilir. Hem TAp63 hem de ΔNp63, bazı epitelyal dokularda örtüşen dağılım gösterir. Bununla birlikte, TAp63 farklılaşmış hücrelerde daha fazla eksprese edilirken, ΔNp63 kök benzeri hücre popülasyonlarında görülür (Nobre vd., 2013). p63 çoğu laboratuvarda akciğer skuamöz hücreli karsinomu için kabul görmüş bir immünohistokimyasal belirteçtir (Bishop vd., 2012; Travis vd., 2015). Fokal veya zayıf p63 boyanması, akciğer adenokarsinomunun %30'unda görülebilir ve skuamöz farklılaşmayı destekleyecek şekilde yanlış yorumlanabilir (Nonaka, 2012; Travis vd., 2013). p63'ün yorumlanması aynı zamanda TTF-1 ekspresyonuna da bağlıdır çünkü TTF-1 yokluğunda yalnızca yaygın p63 boyamasının skuamöz hücreli karsinomu desteklediği kabul edilmektedir (Travis vd., 2015). p40 proteini ise sürekli olarak skuamöz hücreli karsinomda ifade edilen baskın izoformdur; bu nedenle skuamöz hücreli karsinom tanısı için gelişmiş özgüllük sunmaktadır (Nobre vd., 2013). Tanısal patolojide p40, SCC'nin %100'üne yakınını ve ADC'nin %3'üne kadarını etiketlediği için skuamöz hücre farklılaşması için bir belirteç olarak kullanılır (Rekhtman vd., 2011). p40'ın epidermal hücre kaderini yönlendirdiği bilinmektedir. Hücre proliferasyonunu uyarır, apoptozu bloke eder ve baskın negatif ajanlar olarak hareket ederken sınırsız tümör büyümesini destekler. Genel olarak, p40 ve TTF-1 kombinasyon halinde kullanılır (Bishop vd., 2012; Nobre vd., 2013; Nonaka, 2012).

2.2.5.4. Sitokeratinler (CK)

Sitokeratinler (CK), moleküler ağırlıkları ve izoelektrik noktaları ile ayırt edilebilen 20 polipetidden oluşan bir ailedir (Debus vd., 1984). Hem normal hem de malign olmak üzere hemen hemen tüm epitel dokuları, epitel hücresi içindeki ara filaman hücre iskeletini oluşturan CK'ları içerir. Bu insan CK ailesi, Moll ve arkadaşları tarafından 1'den

19'a kadar numaralandırılmış 19 farklı polipeptitten oluşmaktadır (Moll vd., 1982). CK'lar daha küçük ve asidik polipeptitler olan Tip 1 (CK 9-20) ve daha büyük ve bazik-nötr olan Tip 2 (CK 1-8) olmak üzere iki grupta sınıflandırılmaktadır (Sundström & Stigbrand, 1994). CK ailesi tüm epitel hücreleri tarafından eksprese edilir ve epitelyal farklılaşmanın yararlı bir belirtecini oluşturmaktadır (Debus vd., 1984; Stieber vd., 1994; Broers vd., 1988). CK'lar farklı epitellerde rastgele dağılmamıştır ve belirli epitelyal farklılaşma türleri için karakteristik görünmektelerdir. Çeşitli CK kombinasyonları epitel hücre tipi tercihli bir şekilde eksprese edilir ve anormal ekspresyonları karsinogenez ile ilişkilendirilmiştir. Normal epitel hücrelerinin malign dönüşümü sırasında CK paternleri genellikle korunur (Chu & Weiss, 2002; Omary & Ku, 1997). Karsinomlarda en çok bulunan CK'lar olan CK 5, 6, 7, 8, 18, 19 basit epitelde de bulunur (Sundström & Stigbrand, 1994). KHDAK'da önemli CK'lar esas olarak CK5, CK6, CK7, CK8, CK18 ve CK19'dur (Chu & Weiss, 2002; DePianto vd., 2010). Primer akciğer neoplazmlarında, çoğu SCC ve LCC CK5/6 için pozitiftir (Downey vd., 2008). Warth ve arkadaşları CK5/6 kullanarak doğru SCC tanısı koyma olasılığının %86,9 olduğunu bulmuşlardır (Warth vd., 2012). Modern patolojik uygulamada, CK7 ve CK20, farklı organlardan gelen metastatik ve primer tümörler arasında kaba bir ayırıcı olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Kolondaki ADC genellikle CK20+ ve CK7− iken akciğer dahil diğer birçok organdaki ADC genellikle CK7+ ve CK20−'dir. Ayrıca bazı organlardan (yani serviks ve timus) gelen SCC sıklıkla CK7+ iken akciğerden gelenler de dahil olmak üzere çoğu SCC genellikle CK7− 'dir. Çalışmalar CK7'nin akciğer ADC tanısında yaygın olarak kullanılan bir IHC belirteci olduğunu göstermektedir (Blobel vd., 1984; Chu vd., 2000; Fukai vd., 1995; Moll vd., 1989).

2.2.5.5. Müsikarmen

Müsin boyaları, IHC'nin kullanıma sunulmasından çok daha önce 1967 ve 1981 WHO akciğer kanseri sınıflandırmalarında önerilmiştir (Micke vd., 2019; Travis vd., 2013). Geleneksel olarak müsin ile histokimyasal boyama, morfolojik olarak belirsiz vakaların ADC tanısında müsin inklüzyonlarını görselleştirmede kullanılır (Travis vd., 2013, 2015). Müsin boyaları değerli belirteçlerdir ancak ADC'nin duyarlılığı ve özgüllüğü değişken olabilir (Loo vd., 2010; Nicholson vd., 2010). Müsin boyasının, zayıf

farklılaşmış ADC'nin tanısal doğruluğunu %88'e çıkardığı rapor edilmiştir. Birkaç farklı müsin lekesi bulunmaktadır (Kennedy & Burgin, 1975). Diastaz-periyodik asit Schiff, Alsiyan mavisi ve musikarmin müsin boyaları bu amaçla en yaygın kullanılan histokimyasal boyalardır. Çalışmalar ADC tanısı için musikarminin, TTF-1 ve Napsin A'ya benzer özgüllüğe ve daha yüksek duyarlılığa sahip olduğunu göstermektedir (Micke vd., 2019; Sarioglu vd., 2022). Müsikarmen, solunum epiteli de dahil olmak üzere çeşitli glandüler epitel boyunca dağılmış halde bulunan yüksek moleküler ağırlıklı glikoproteinler olan müsinlerin tespiti için kullanılan eski bir histokimyasal boyadır. Müsikarmin ADC'nin ayırıcı tanısı için beş veya daha fazla tümör hücresinin iki mikroskobik yüksek güç alanında (×400) ve sitoplazmada müsin boyaması gösterdiği tespit edildiğinde pozitif olarak kabul edilmektedir (Travis vd., 2011, 2013, 2015).

2.3.Hücre Kültürleri

Hücre kültürü günümüzde tüm dünyada yaygın olan bir uygulamadır. Bir araştırma modeli olarak doku ve organların oluşumu, fonksiyonu ve patolojisinin altında yatan mekanizmalar üzerine yapılan çalışmalar, büyük ölçüde hücre kültürü sistemleri ve hayvan modellerinin kullanılması sayesinde yönetilebilir hale gelmektedir (Yamada & Cukierman, 2007). Harrison ilk hücre kültürlerini 1907 yılında sinir liflerinin kökenine yönelik araştırmalar sırasında gerçekleştirmiştir (Harrison, 1906). O zamandan bu yana yöntem geliştirilerek vücut dışındaki hücrelerin büyümesini ve farklılaşmasını gözlemlemek için kullanılmıştır (Białkowska vd., 2020; Scudiere vd., 1988). Günümüzde deneyler, doğrudan donörün materyalinden izole edilen birincil hücreler veya hücre bankalarında saklanan yerleşik kültürler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Birincil kültürler canlı organizmalardan izole edilir ve genellikle kaynak dokuda bulunan farklı hücre tiplerinin popülasyonlarını içerir. Bu durumda doğru hücre tipinin izole edilmesi önemlidir (Lieberman & Ove, 1958). Alternatif bir seçenek ise yerleşik bir hücre hattının kullanılmasıdır. ATCC (Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu) gibi biyokaynak merkezleri, araştırmalarda rutin olarak kullanılan çeşitli kanser hücre dizilerinin karakterize edilmiş modellerini sunmaktadır (Kapałczyńska vd., 2016). Hücre kültürleri hücre biyolojisini, doku morfolojisini, hastalıkların mekanizmalarını, ilaç etkisini, protein üretimini ve doku mühendisliğinin gelişimini anlamayı mümkün kılar. Çoğu ilacın klinik öncesi

araştırmalarında, kanser araştırmalarında ve gen fonksiyonuna ilişkin çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Kanser araştırmaları alanında uygun hücre kültürü yöntemlerinin seçimi, tümör biyolojisini iyi anlamamıza ve dolayısıyla radyo ve kemoterapiyi optimize etmemize hatta yeni tedavi stratejileri bulmamıza olanak sağlamaktadır (Aggarwal vd., 2009). En sık kullanılan hücre kültürü 2 boyutlu modeldir ancak son zamanlarda 3 boyutlu kültür yöntemi de popülerlik kazanmıştır. Seçilen kültürün türüne göre hücre davranışı birçok açıdan farklılık gösterir (Pampaloni vd., 2007).

2.3.1. 2 Boyutlu (2B) Kültürler

Yapışkan 2B kültürlerde hücreler, bir kültür şişesinde veya plastik bir yüzeye tutturulmuş düz bir petri kabında tek tabaka halinde büyümektedir. 2B kültürlerin avantajları, hücre kültürünün basit ve düşük maliyetli bakımı ve fonksiyonel testlerin performansı ile ilişkilidir. Ne yazık ki, 2B kültürlerin birçok dezavantajı da vardır. İlk olarak 2B kültürlü hücreler dokuların veya tümörlerin doğal yapılarını taklit edememektedir. Bu kültür yönteminde hücre-hücre ve hücre-hücre-hücreleri hücre dışı matris (ECM) dışı çevre etkileşimleri, tümör kitlesinde olduğu gibi temsil edilemez. Bu etkileşimler hücre farklılaşmasından, çoğalmasından, canlılığından, genlerin ve proteinlerin ekspresyonundan, uyaranlara yanıttan, ilaç metabolizmasından ve diğer hücresel işlevlerden sorumludur (Baker & Chen, 2012; Bissell vd., 2003; Hickman vd., 2014; Pampaloni vd., 2007). Dokudan izole edildikten ve 2B koşullara aktarıldıktan sonra hücrelerin morfolojisi ve hücre bölünmesi modu değişir (Petersen vd., 1992; Von der mark vd., 1977). Hücrelerin değişen morfolojisi, işlevlerini, hücre içindeki yapıların organizasyonunu, salgılamayı ve hücre sinyallemesini etkileyebilir (Debnath & Brugge, 2005; Kilian vd., 2010; Mahmud vd., 2009; Nelson & Bissell, 2006). Dış çevre ile etkileşimlerdeki bozukluklar nedeniyle, yapışık bir şekilde büyüyen hücreler polaritelerini kaybederler, bu da bu hücrelerin apoptoz gibi çeşitli olaylara tepkisini değiştirir (Meyers vd., 2006; Mseka vd., 2007). 2B kültürün diğer bir dezavantajı, tek katmandaki hücrelerin oksijen, besin, metabolitler ve sinyal molekülleri gibi ortamın bileşenlerine sınırsız erişime sahip olmasıdır. *In vivo* kanser hücreleri için besinlerin, oksijenin vb. mevcudiyeti, tümör kitlesinin doğal yapısından dolayı daha değişkendir

(Pampaloni vd., 2007). Ayrıca, 2B sistemin hücrenin gen ekspresyonunu ve birleşmesini, topolojisini ve biyokimyasını değiştirdiği gözlemlenmiştir (Birgersdotter vd., 2005; Fuchs vd., 2004; Gómez-Lechón vd., 1998; Li vd., 2006). Ek olarak, yapışkan kültürler genellikle monokültürlerdir ve yalnızca bir hücre tipinin incelenmesine izin verir, bu da kanser başlatan hücreler tarafından *in vivo* olarak gerekli olan tümör mikro ortamının veya nişlerin eksikliğine neden olur (Engler vd., 2006; Fischbach vd., 2007; Gilbert vd., 2010). 2B sistemlerin birçok dezavantajı nedeniyle 3B kültür sistemleri gibi doğal tümör kütlesini daha iyi taklit edebilen alternatif modellerin bulunmasına ihtiyaç vardır.

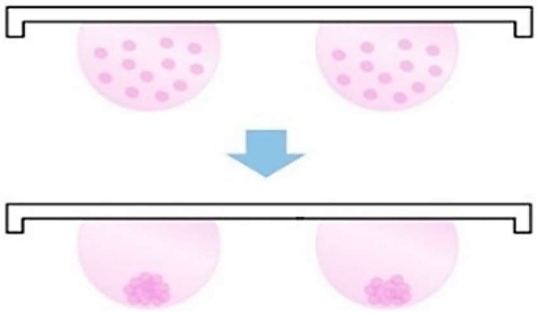
2.3.2. 3 Boyutlu (3B) Kültürler

Vücuttaki tüm hücreler, metabolizmaları ve büyümeleri için çok önemli olan 3B ortamda yaşarlar (Lee vd., 2009). 3B kavramı, hücrelerin çeşitli katmanlar oluşturduğu küresel yapıların oluşturulmasına dayanmaktadır. İlk 3B kültürlerden biri yumuşak agar çözeltisinde yapılmış ve 1970'lerde Hamburg ve Salmon tarafından gerçekleştirilmiştir (Hamburger & Salmon, 1977). O zamandan bu yana, bir tümör kitlesinde büyüyen hücreler ile 3B koşullar altında kültürlenen hücrelerde morfoloji ve davranışlar arasındaki çarpıcı benzerlikler iyi tanımlanmış ve belgelenmiştir (Mazzoleni vd., 2009; Pampaloni vd., 2007). Donör dokularından alınan hücreler, ebeveyn dokusunun mimarisini 2B modellerde mümkün olandan daha doğru bir şekilde taklit ederek 3B yapılarda kültürlenmektedir (Griffith & Swartz, 2006). Hücre proliferasyonu hücre konumuna bağlıdır ve 3B yapıların periferik kısmında daha yüksektir (Pradhan vd., 2010; Pradhan-Bhatt vd., 2013, 2014). 3B kültürlerde hücrelerin morfolojisi ve polaritesi korunur ve daha önce 2B olarak yetiştirilen hücrelere geri kazandırılabilir (Benya, 1982; Petersen vd., 1992; Yamada & Cukierman, 2007). 3B hücre kültürlerinin, 2B kültürlü hücrelerle karşılaştırıldığında artan seviyelerde dokuya özgü belirteçler sergilediği, dokuya özgü işlevleri yeniden kazandığı ve çeşitli gen ekspresyon profillerine sahip olduğu gösterilmiştir (Vantangoli vd., 2015). 3B kültürün bir diğer önemli özelliği, hücresel topoloji, gen ekspresyonu, sinyalleme ve metabolizma açısından *in vivo* büyüyen hücrelere benzerliğidir. 3B sferoidler, katı tümörlerde olduğu gibi, test edilen bazı maddelerin veya ajanların içinden geçmesi gereken geçirgenlik bariyerlerine sahip olması tümör hücrelerinin 3B kültürlerde ilaçlara 2B kültürlere göre daha az duyarlı olmasını da

açıklamaktadır. Tüm bu özellikler, kanseri başlatan hücrelerin biyolojisi, istila ve metastatik süreçlerin yanı sıra ilaç testi veya hücrelerin ışınlamaya tepkisini test etmek için kullanılabilecek 2B kültürleme ile hayvanlarla yapılan deneyler arasındaki boşluğu doldurma konusunda özel bir platform oluşturmaktadır (Berthiaume vd., 1996; Frieboes vd., 2006; Ghosh vd., 2005; Marushima, 2011; Powers vd., 2002; Semino vd., 2003). 3B kültürlerin bir dezavantajı, tek hücrelerin küresel yapılardan tek katmanların proteolitik bozunması yoluyla ayrılmasını gerektirmesidir. Bu işlem birkaç saatten birkaç güne kadar sürmektedir (Khetan & Burdick, 2010). Birçok 3B yöntemde verimlilik, kullanım ömrü, tekrarlanabilirlik ve çalışma konforu 2B sistemlere göre daha zayıf olmasına rağmen hala 3B bir forma sahip kültürler düz, yapışkan kültürlerden daha iyi bir model gibi görünmektedir (Hickman vd., 2014). Hücrelerin 3B olarak kültürlenmesinde kullanılan birçok format, teknik ve materyal mevcuttur.

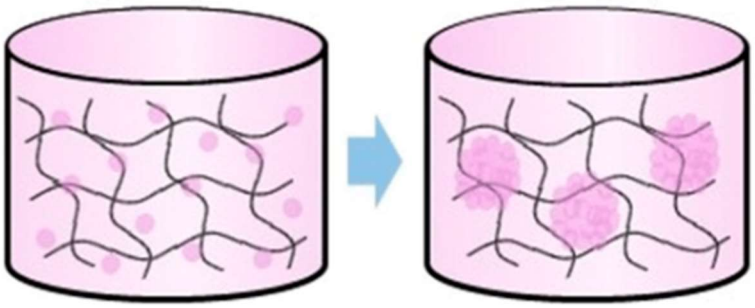
2.3.2.1. 3B Kültürlerde Kullanılan Teknikler

- ***Asılı Damla:*** İskelesiz hücre kültürleri elde etmenin bir yöntemidir (Vantangoli vd., 2015). Bu tekniğin düşük verim, küresel geometri ve yüksek kesme kuvveti ortamı dahil olmak üzere bazı sınırlamaları vardır (Napolitano vd., 2007). Ortamın değiştirilmesi ve bileşiklerin eklenmesi gibi bazı manipülasyonlar karmaşık ve zaman alıcı olabilir. Bazı hücre çizgileri bu yöntemi kullanarak kompakt küreseller oluşturmaz (Ong vd., 2010). Ancak bu yöntem özel ekipman gerektirmez ve küçük hacimlerde hücre süspansiyonu içerir. Hücre süspansiyonu, hücre süspansiyonunun yüzey gerilimi tarafından tutulan asılı bir damla haline gelmesi için ters çevrilen özel bir plakanın oyuğuna yerleştirilebilir. Hücreler birbirleriyle ve ECM ile doğrudan temas halinde kalır (Foty, 2011). Asılı damlada hücre kültürü elde etmenin en basit yolu, kültür plakasının kapağının iç kısmına hücre süspansiyonu içeren bir damla koymaktır. Tersine çevrildikten sonra, mikro yer çekimi hücreleri damlanın alt kısmında yoğunlaştırılmaktadır. Asılı damla yöntemi, birkaç hücre hattının birlikte kültürlenmesi için de kullanılabilir (Şekil 10) (Białkowska vd., 2020).



Şekil 10. Asılı damla yöntemi (Ryu vd., 2019).

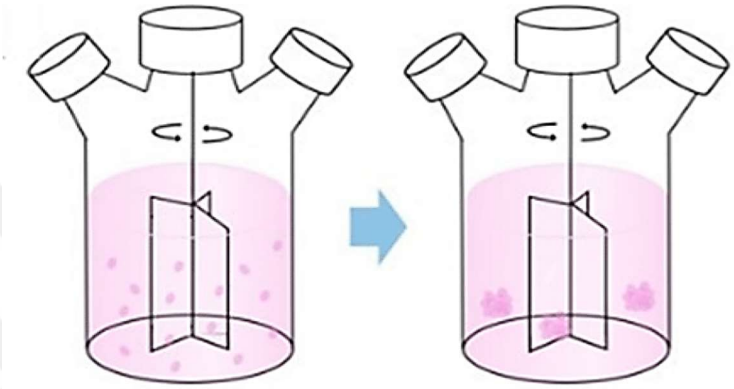
• ***Hidrojeller:*** Sfero kültüre yönelik sistemler arasında, ECM etkisine sahip olmayan, yapışkan olmayan agaroz hidrojeller vardır. Bu tür hücre kültürünün bakım kolaylığı, mikro doku boyutunu kontrol etme olanağı ve plaka başına büyük miktarda mikro doku elde etme gibi bazı avantajları vardır (Vantangoli vd., 2015). Bu teknikte hücreler, hücrelerin battığı ve 3B küresel mikro dokulara kendi kendine birleşebildiği girintilere sahip hidrojel üzerine ekilir. ECM'nin herhangi bir etkisi olmadan, homojen süspansiyondaki hücreler kendi kendine küresel yapılar oluşturabilir ve heterojen süspansiyondaki hücreler kendi kendine ayrılarak çok katmanlı yapılar oluşturabilir (Napolitano vd., 2007). Hidrojellerin en yaygın kullanılan örnekleri Geltrex, Matrigel, Myogel ve Collagen I matrisleridir (Şekil 11) (Antoni vd., 2015; Worthington vd., 2015).



Şekil 11. Hidrojel yöntemi (Ryu vd., 2019).

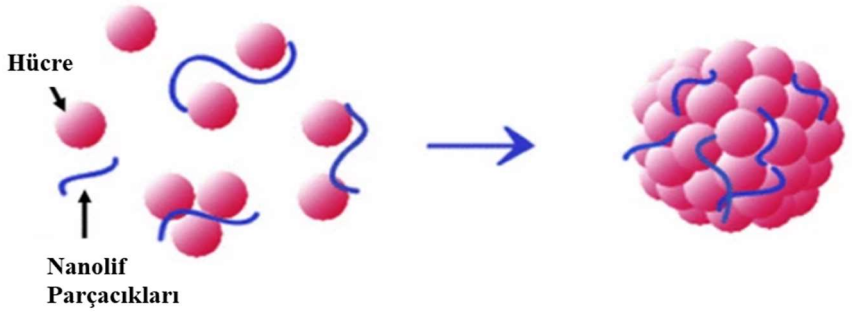
• ***Döner Hücre Kültürleri:*** Küresel elde etme yöntemlerinden biri, karıştırıcılı bir şişede hücre kültürüdür. Bu koşullarda hücreler substrata bağlanamaz ve kendi kendine toplanmaya başlar. Büyük ölçekte sfer yapısı elde etmenin en basit yöntemlerinden biridir. Bu yöntemde kültürlerin uzun ömürlülüğü, küresel boyuttaki farklılıkları ve

hücrelerin mekanik hasarları gibi bazı dezavantajları vardır. Bu yöntemin bir varyasyonu, yatay bir eksen etrafında dönen bir şişeye sahip bir sistemdir. Minimum hidrodinamik kuvvetlerle mikro yerçekimi simülasyonu hücreleri tahrip etmez; böylece bu yöntem, karıştırıcılı bir şişede olduğundan daha büyük sfer yapısı oluşmasına izin verir. Sfer yapıları arasındaki morfolojik farklılıklar da ilk yönteme göre daha küçüktür (Şekil 12) (Białkowska vd., 2020).



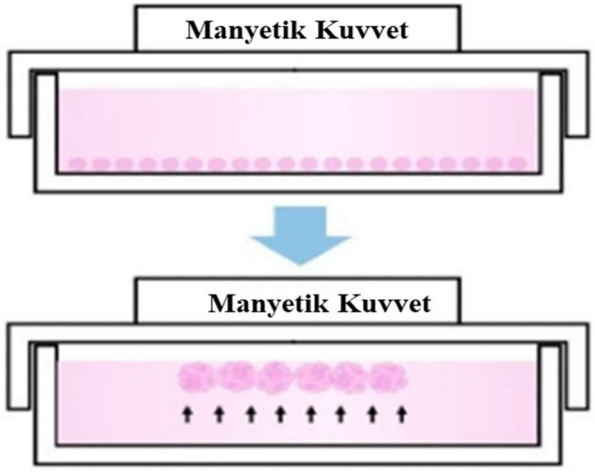
Şekil 12. Döner hücre kültürü yöntemi (Ryu vd., 2019).

- ***Nanoliflerin İlavesi ile Hücre Süspansiyonu:*** Sferoid üretmenin bu yöntemi, polimer nano elyafların yapışık hücrelerin bir süspansiyonuna eklenmesiyle gerçekleştirilir. Nanofiberler sferoid üretimini artırır ve hücre yapışmamasına bağlı hücre ölümünü azaltır. Nanofiberlere hücre bağlanması, ortamdaki serumdaki vitronektin ve fibronektinin etkisine bağlı olabilir. Bu proteinler kültür ortamına eklendiğinde nano lifler üzerinde absorbe olur ve daha sonra hücreler bu nano liflere bağlanarak küremsi yapılar oluşturur (Ryu vd., 2005; Shin vd., 2012).



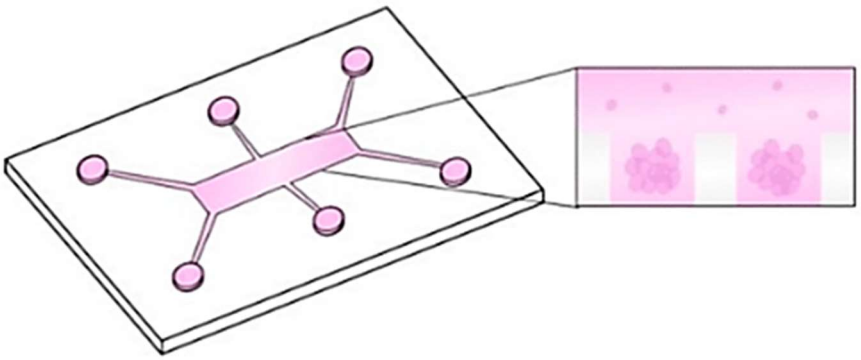
Şekil 13. Nanoliflerin ilavesi ile hücre süspansiyonu yöntemi (Shin vd., 2012).

• ***Manyetik Kaldırma Yöntemi:*** İskelesiz 3B hücre kültürleri üretme yöntemlerinden biridir. Manyetik kaldırma sayesinde hücreler 3B hücre kültürüyle birleşir ve ECM üreterek hücresel aktiviteyi korur. Bu teknikte manyetik kuvvet, yer çekimi kuvvetini yener (Türker vd., 2018). Hücreler gece boyunca paramanyetik demir oksit nanopartikülleri ile işlenir ve bu da bunların hücreler tarafından alınmasına olanak tanır. Hücre kültürü yıkanır ve daha sonra tripsin çözeltisiyle işlenir ve düşük yapışkanlı plakalara ekilir. Son olarak mıknatıs, etiketli hücrelerin manyetik kuvvetler altında yukarı çekilmesine yol açan plaka kapağının üst kısmına yerleştirilir. Küremsiler birkaç saat içinde oluşturulur (Şekil 14) (Nath & Devi, 2016).



Şekil 14. Manyetik kaldırma yöntemi (Ryu vd., 2019).

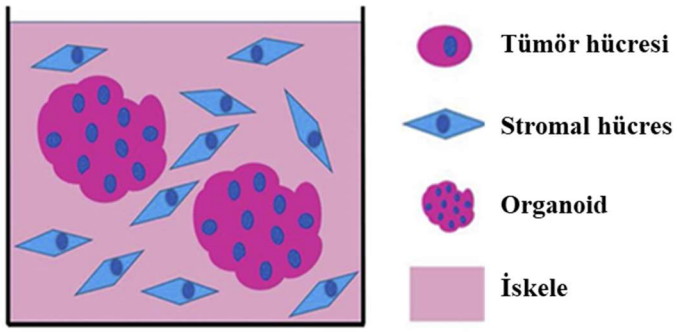
- ***Mikroakışkan Sistemler:*** Mikroakışkan akışlı cihaz, basitten daha karmaşık mikro kanal dizilerine kadar mikroakışkan kanallarla bağlanan mikro kuyulardan yapılmıştır. Mikro kanallar, silikon, cam veya polidimetilsiloksan (PDMS) gibi nötr malzemeler kullanılarak yüzey üzerinde aşındırma veya şekillendirme yoluyla hazırlanır. Hücreler, matris kaplı gözenekli membrandan yapılmış katmanların üzerinde ve endotel hücreleriyle doğrudan temas halinde kültürlenir. Ek olarak, bağışıklık hücreleri ve tümör hücreleri mikro kanallardan akar (Nath & Devi, 2016). Mikro akışkan sistemlerin çok önemli avantajları arasında kontrollü karıştırma, kimyasal konsantrasyon gradyanları, reaktiflerin daha düşük tüketimi, hücreler üzerindeki kayma gerilimi ve basıncın kontrolü ve ayrıca sabit perfüzyon yer alır. Mikro akışkan çipler, doku ortamının daha iyi yansıtılması için dinamik ortam sağlar. Sferoid boyutları homojendir. Mikro kuyucuklu bir plakada dinamik koşullarda kültürlenen kanser sferoidleri, ilaçlara karşı akışın olmadığı koşullara göre daha yüksek direnç gösterir (Şekil 15) (Glovaci vd., 2019; Nath & Devi, 2016).



Şekil 15. Manyetik akışkan sistemi yöntemi (Ryu vd., 2019).

- ***Ortak Kültürlere Dayalı Sferoidler:*** Tümör mikro ortamı heterojendir; dolayısıyla tümörün biyolojisi, kanser hücreleri ve çevreleri arasındaki karşılıklı etkileşimin sonucudur. Örneğin ECM proteinlerinden biri olan fibronektin, tümör sertliğinin düzenlenmesinde rol alır. Tümörün büyümesini ve ilaçlara karşı direncini destekler. Kanser hücreleri ile çevredeki fibroblastlar ve ayrıca bağışıklık ve endotelyal hücreler arasındaki etkileşimler, tümörün ilerlemesinin düzenlenmesiyle bağlantılıdır.

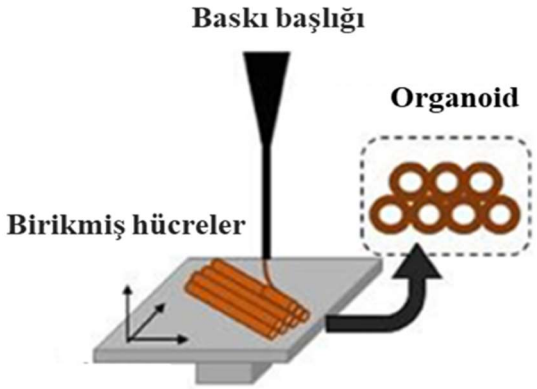
Fibroblastlar, tümörün metastazında ve ayrıca tümör gelişiminde rol oynar. Tümör vaskülarizasyonu sırasında endotel hücrelerinin göçü ve çoğalması gerçekleşir. Bu durum ECM proteinleri, fibroblastlar ve kanser hücreleri arasındaki etkileşimlere bağlıdır. Bu tür karmaşık sistemlerin tümör ortamını daha iyi taklit edebilmesi için uygun bir in vitro modelde yansıtılması gerekir (Şekil 16) (Lazzari vd., 2018).



Şekil 16. Ortak kültürlere dayalı sferoid yöntemi (Xin vd., 2019).

• ***Biyobaskı:*** Hücre katmanlarının ve destekleyici biyolojik materyallerin, doku veya organın fonksiyonlarını tam olarak taklit edecek şekilde konumlandırıldığı bir teknolojidir. Biyobaskılamanın mürekkep püskürtmeli baskı, ekstrüzyon bazlı baskı, lazer destekli baskı ve stereolitografi olmak üzere birkaç stratejisi vardır (Zhang vd., 2016). Mürekkep püskürtmeli biyobaskıda, kartuşu dolduran biyomürekkepten (hücre yüklü) yapılmış damlacıklar üretilir ve hassas bir şekilde bir iskele üzerine biriktirilir. Bir bilgisayar programı damlacıkların birikmesini kontrol eder ve 3B yapıların oluşturulmasına yol açar. Bu yöntem nispeten hızlıdır ve pahalı değildir ve hücrelerin yüksek canlılığını sağlar. Ekstrüzyon bazlı biyobaskıda biyomürekkep, pnömatik veya mekanik basınçla nozül boyunca hareket ettirilir. Bu yöntem aynı zamanda oldukça ucuz ve hızlıdır. Lazer destekli biyobaskıda, lazer stimülasyonu, enerjiyi emen ve bir biyomürekkep damlacığının substrat üzerine itilmesine yol açan yüksek basınçlı bir kabarcık oluşturan donör katmanının tepkisine yol açar. Bu yöntemin bazı dezavantajları pahalı ekipman ve kötü biyomürekkep seçimidir. Stereolitografide bir dizi programlanmış ayna, biyomürekkep deposuna katman katman foto-çapraz bağlantı desenleri yansıtılan

bir dijital maske oluşturur. Bu yöntem, yüksek çözünürlük ve yüksek hız ile karakterize edilir (Şekil 17) (Hoarau-Véchot vd., 2018; Zhang vd., 2016).



Şekil 17. Biyobaskı yöntemi (Lawko vd., 2021).

2.3.3. Akciğer Kanserinde 3 Boyutlu Primer Kültür

Kişiselleştirilmiş terapötik rejimlerin geliştirilmesinin önündeki en büyük engellerden biri, öngörücü *in vitro* modellerin sınırlı mevcudiyetidir. Bu sebeple, *in vivo* koşulları daha iyi yansıtan hücre kültürü modelleri geliştirmek ve böylece klinik deneylerin boyutunu, maliyetini ve başarısızlık oranlarını azaltma potansiyeline sahip öngörücü biyobelirteçlerin araştırılması gerekmektedir (Amann vd., 2014). Hastaların tümörlerini doğru şekilde özetleyen *in vitro* model sistemleri geliştirmek translasyonel kanser araştırmalarının her alanında çok önemlidir. Kanser hastalarından elde edilen ve yapay kültür koşullarında uyarlanıp pasajlanan geleneksel hücre dizileri en sık kullanılan *in vitro* modellerdir. Son zamanlarda kişiselleştirilmiş kanser tedavisinde, *in vivo* ve *in vitro* sistemler de dahil olmak üzere muadillerinin fenotipini ve ilaç duyarlılığını temsil etmek için birincil hastadan türetilmiş modeller geliştirilmiştir (Kita vd., 2019; Kodack vd., 2017). Klinik öncesi çalışmalarda özellikle akciğer kanseri hücrelerinin yetiştirilmesini iyileştirmek için birçok yaklaşım geliştirilmiştir. Fakat araştırmacılar en uygun birincil akciğer hücre kültürünün elde edilmesine yönelik standartlaştırılmış bir protokol için fikir birliği henüz oluşturmamıştır. Akciğer kanseri primer organoid kültürlerine özel kültür ortamı, farklı laboratuvarlarda kullanılan farklı büyüme faktörü kokteylleri ile oluşturulmaktadır. Akciğer kanseri, akciğer adenokarsinomu, akciğer skuamöz hücreli

karsinomu ve benzeri gibi farklı histolojik tiplerden oluşan karmaşık bir hastalıktır (Hirsch vd., 2017). Bu sebeple her akciğer kanseri türü için kültür ortamındaki bileşenlerin tam olarak aynı olmaması gerekirken, hiçbir akciğer kanseri primer organoid kültür çalışmasının kültür koşulları histolojik veya genetik tiplere göre ayarlanmamıştır (Banda vd., 2020; Cattaneo vd., 2020; Chen vd., 2020; Dijkstra vd., 2018, 2020; Finnberg vd., 2017; Kim vd., 2021; Li vd., 2020; Ma vd., 2021; Mazzocchi vd., 2019; Pauli vd., 2017; Sachs vd., 2019; Sándor vd., 2021; Taverna vd., 2020; Yokota, 2021). Birçok araştırmacı akciğer kanseri primer organoid kültürü elde etmek için birbirinden farklı sitokin, küçük molekül ve büyüme faktörü içeren kokteyl kültür ortamları oluşturmaktadır. Şimdiye kadar kullanılmış olan sitokinlerin, büyüme faktörlerinin ve küçük moleküllerin işlevini ve mekanizmasını anlamak akciğer kanseri primer organoid kültürü optimizasyonu için önemlidir. Aşağıda akciğer kanseri primer organoid kültürü çalışmalarında en çok kullanılan besiyeri supplementlerinin işlev ve mekanizmaları genel olarak açıklanmıştır;

- ***B27:*** B27 takviyesi, vitaminler (biyotin, E vitamini asetat, E vitamini ve A vitamini), proteinler (sığır albümini, katalaz, insan rekombinant insülini, insan transferrin ve süperoksit dismutaz) ve diğer bileşenler (kortikosteron, d-galaktoz, etanolamin HCl, glutatyon, l-karnitin HCl, linoleik asit, linolenik asit, progesteron, putresin 2HCl, sodyum selenit ve triodo-I-tironin) dahil olmak üzere çeşitli besinlerden oluşmaktadır (Wang vd., 2015). B27, serum içermeyen bir kültür takviyesidir ve fetal sığır serumunun (FBS) kullanılması kültür sisteminde kararsızlığa neden olan çok sayıda bilinmeyen bileşene sahip olduğundan organoid kültür için önerilmemektedir. B27'nin ana işlevi, hücre hayatta kalma oranını arttırmak, tümör küresinin oluşumunu teşvik etmek ve akciğer kanseri organoidlerinin kültürü sırasında küre yapışmasını önlemektir. Bu nedenle akciğer kanseri organoidlerinin kültürlendiği çalışmaların neredeyse tamamında B27 kullanılmaktadır (Gu vd., 2011).

- ***N-Asetilsistein (NAC):*** Glutatyon'un (GSH) yenilenmesine yardımcı olan sülfhidril gruplarının kaynağı olarak görev yapan antioksidan GSH'ın bir öncüsüdür (Dekhuijzen, 2004). Serbest oksijen radikallerinin temizleyicisi olarak NAC, reaktif oksijen türlerini (ROS) ve nitrojen türlerini de doğrudan ortadan kaldırabilir (Merker vd.,

2016; Zhang vd., 2011). Bu nedenle NAC, primer hücreler kültüre alındığında hücreleri oksidatif ve elektrofilik stresten korumak için akciğer kanseri organoid kültüründe yaygın olarak kullanılır.

- ***Nikotinamid:*** Niasinin amid formudur ve her ikisi de B3 vitamini ailesine aittir. Enerji metabolizmasında ve DNA hasarının onarılmasında gerekli olan koenzim nikotinamid adenin dinükleotidinin (NAD) öncüsüdür (Maiese vd., 2009). Yüksek dozda nikotinamid hücre hayatta kalmasını destekleyebilir (Shi vd., 2012; Tong vd., 2012) ve bu nedenle çeşitli hücre kültürlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Ieraci & Herrera, 2006; Lin vd., 2000). Ek olarak nikotinamid, rho ile ilişkili bir protein kinaz (ROCK) inhibitörü olarak da görev yapar, böylece kök hücrenin hayatta kalmasını destekler ve birçok organoid kültür sisteminde kullanılır (Meng vd., 2018; Sachs vd., 2018; Sato & Clevers, 2015). Ayrıca nikotinamid, kısmen kazein kinaz 1'i inhibe ederek kök hücre farklılaşmasını kolaylaştırabilir ve birçok kök hücre farklılaşma platformunda kullanılır (Buchholz vd., 2013; Griffin vd., 2017).

- ***Y-27632:*** Oldukça güçlü ve seçici bir ROCK inhibitörüdür. ROCK'nin aktivasyonu, hücre kasılması, dinamik membran taşması, nükleer parçalanma ve apoptotik hücrelerin apoptotik cisimlere parçalanması dahil olmak üzere apoptozun yürütme aşaması sırasında morfolojik olaylara dahil olan bir dizi yolla ilişkilendirilmiştir (Motomura vd., 2017; Pakzad vd., 2010). Bu nedenle Y-27632, apoptozu önlemek için organoid kültüründe yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak Y-27632'nin bu koruyucu etkisi yalnızca doku veya koloni ayrışması sırasında mevcuttur (Chen vd., 2010; Harb vd., 2008).

- ***SB202190:*** p38α ve p38β'yı seçici ve güçlü bir şekilde inhibe eden bir p38 mitojenle aktifleşen protein kinaz (MAPK) inhibitörüdür. p38-MAPK sinyallemesinin aktivasyonunun hücre ölümünü teşvik etmede gerekli olduğu kanıtlanmıştır. Bu nedenle SB202190, hücreleri çevresel stresin neden olduğu apoptozdan korumak için çeşitli organoid kültürlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Kralova vd., 2008).

- ***Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) ailesi:*** Dört FGF reseptörü (FGFR) ile etkileşime giren 22 liganddan oluşmaktadır (Ornitz & Itoh, 2015). FGF/FGFR sinyali, hücrenin hayatta kalması, çoğalması, göçü, farklılaşması, embriyonik gelişimi, organogenez, doku onarımı/rejenerasyonu ve metabolizma gibi temel hücresel süreçleri yönetir. Akciğer kanseri organoid kültüründe yalnızca FGF2, FGF4, FGF7 ve FGF10 kullanılmıştır ancak etkileri aynı değildir (Cattaneo vd., 2020; Dijkstra vd., 2020; Kim vd., 2019; Li vd., 2020; Pauli vd., 2017; Taverna vd., 2020). FGF7 ve FGF10 esas olarak organoid dallanmasını indüklemek ve distal akciğer soylarına doğru farklılaşmayı teşvik etmek için kullanılır. Bu arada FGF2 ve FGF4, akciğer kök hücrelerinin kökünü korumak ve organoidlerin hayatta kalmasını sağlamak için kullanılmaktadır (Mossahebi-Mohammadi vd., 2020).

- ***Epidermal Büyüme Faktörü (EGF):*** Birçok dokuda proliferasyonu yönlendiren büyüme faktörleri ailesine aittir. EGF'nin ortamdan çıkarılması, DNA replikasyonunun durması ve G0/G1 fazında hücre döngüsü ilerlemesinin durması nedeniyle çoğalmanın ortadan kalkmasına yol açmkatadır (Ramsay & Abud, 2017).

- ***A83-01:*** TGF-β/aktivin reseptörü benzeri kinaz 5 (ALK5) inhibitörüdür. TGF-β'nın kanonik etkisi, epitelyal, endotelyal ve hematopoietik hücre soylarının proliferasyonunu inhibe ederek kanserin ilerlemesini kısıtlamak için bir savunma mekanizması olarak bir büyüme bariyeri oluşturmaktır (Qin vd., 2013). TGF-β sinyallemesinin bir antagonisti olarak A83-01, TGF-β'nın neden olduğu büyüme inhibisyonunu önlemek için birçok organoid kültüründe yaygın olarak kullanılmaktadır (Ding vd., 2011; Fujii vd., 2015; Gao vd., 2014). Tümörler geliştikçe, sıklıkla TGF-β aracılı büyüme inhibisyonuna dirençli hale gelirken, TGF-β'nın aşırı ekspresyonu epitelyalden mezenkimal geçişi (EMT) indükler ve immünosupresyonu, ECM birikimini ve anjiyogenezi kolaylaştırır. Bu nedenle A83-01, TGF-β akış aşağı Smad2 fosforilasyonunu inhibe ederek kanserin EMT'sini inhibe etmek için de kullanılmaktadır (Tojo vd., 2005).

- ***Noggin:*** Lgr5 ve diğer köklük ile ilişkili genlerin aşağı akış Smad aracılı transkripsiyonel baskılanması yoluyla farklılaşmanın başlatılmasında gerekli olan kemik

morfogenetik proteinlerinin (BMP'ler) bir inhibitörü olarak görev yapar. BMP'ler ayrıca β-katenin aktivitesini baskılayarak kök hücrelerin kendi kendini yenilemesini de engeller (Qi vd., 2017). Bu nedenle noggin, farklılaşmamış insan embriyonik kök hücrelerinin in vitro korunmasını desteklemek için kök hücre araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Köklülüğü sürdürme etkisi nedeniyle noggin, akciğer kanseri primer organoid kültüründe de yaygın olarak kullanılmaktadır (Chaturvedi vd., 2009).

- ***WNT /R-spondinler:*** Kanonik Wnt/β-katenin yolu, kök hücrelerin korunması ve kendi kendini yenilemesinin desteklenmesi için gereklidir (Leng vd., 2020). Wnt3A, Wnt/β-katenin yolunu başlatır ve R-spondinler daha sonra yetişkin kök hücreler için bir işaretleyici olan Lgr5 homologlarına bağlanarak bu sinyali güçlendirir (Jin & Yoon, 2012). Bu nedenle organoid kültüründe Wnt3A ve R-spondinlere bağımlılık farklıdır. Çeşitli kanserler, Wnt sinyal yolunu anormal şekilde aktive edebilen mutasyonları barındırır (Sachs vd., 2018) böylece normal kök hücrelerin Wnt bağımlılığı, Wnt3A içermeyen CRC'leri seçici olarak genişletmek için kullanılabilir. Ancak bu yöntem LCO kültüründe işe yaramamaktadır çünkü Wnt3A aynı zamanda akciğer dokularında ve insan hava yolu organoidlerinde de yüksek oranda eksprese edilir ve bu da Akciğer kanseri organoid kültüründe eksojen Wnt3A seçeneğine yol açar (Cattaneo vd., 2020). Bu hem akciğer kanserinden hem de komşu akciğer dokusundan türetilmiş eşleştirilmiş organoidlerin kültürlenmesi sırasında tümör organoidlerinin seçiminde zorluklara neden olur ve saf akciğer kanseri organoidlerin oluşturulmasında zorluklara yol açar (Dijkstra vd., 2020).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1.1. Kimyasal Maddeler

-Adenosine 5'-triphosphate (ATP) bioluminescent somatic cell assay kit, Sigma/ABD
-Fetal sığır serumu (FBS), Gibco/ABD
-Penisilin-Streptomisin (10.000U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin), Gibco/ABD
-L-glutamin 100X, Gibco/ABD
-Fosfat tuz tamponu (PBS), Thermo Scientific/ABD
-Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640), Gibco/ABD
-0,05% Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA), Gibco/ABD
-Dimetil sülfoksit (DMSO), Gibco/ABD
-Tripan mavisi (%0,5), Gibco/ABD
-Triton X-100, Sigma/ABD
-DAPI, Thermo Scientific/ABD
-Tris Base, Sigma/ABD
-%37 Formaldehit, Sigma/ABD
-Glutamax 100X, Thermo Scientific/ABD
-Hepes, Thermo Scientific/ABD
-Advanced DMEM-F12, Thermo Scientific/ABD
-DMEM-F12, Thermo Scientific/ABD
-Kollojenaz Tip II, Sigma/ABD
-Dispaz Tip II, Sigma/ABD
-Y-27632, Cell Signaling Technology/ABD
-Ficoll-Paque (1.077 g/mL) , Sigma/ABD
-Geltrex, Thermo Scientific/ABD
-Nicotinamide, Sigma/ABD
-N-Acetylcysteine, Sigma/ABD
-B27 supplement, Thermo Scientific/ABD
-bFGF, Thermo Scientific/ABD
-BSA (Bovine Serum Albumin), Cell Signalling, Danvers/ABD
-Triple Select (1X), Gibco/ABD

-Formalin, Tekkim Kimya/Türkiye

-Agar, Sigma/ABD

-Paragin Gömme Kaseti, Isolab/Almanya

-Ethanol, Isolab/Almanya

-Ksilen, Isolab/Almanya

-Hemotoksilen, Sigma/ABD

-Eozin, Bio-Optica/İtalya

-Hidroklorikasit, Sigma/ABD

-Entellan, Sigma/ABD

-Sodyum Sitrat Tamponu, Isolab/Almanya

-Hidrojen Peroksit, Tekkim Kimya/Türkiye

-NaCl, Sigma/ABD

-Tween 20, Sigma/ABD

-Keçi Serumu, Cell Signalling, Danvers/ABD

-Parafin, Sigma/ABD

-TTF-1, Cell Signalling, Danvers/ABD

-Streptovadin, Sigma/ABD

-HRP, Cell Signalling, Danvers/ABD

DAB Kromojen, Thermo Scientific/ABD

3.1.2. Sarf Malzemeler

-25cm^2 ve 75cm^2'lik flask, Thermo Scientific/ABD

-6 kuyulu plate, Thermo Scientific/ABD

-96 kuyulu flat plate, Thermo Scientific/ABD

-96 kuyulu beyaz hücre kültür kabı, ThermoFisher/ABD

-5ml ve 10ml hacimlerinde enjektörler, Genject

-10µl'lik pipet uçları, Corning/ABD

-100µl'lik pipet uçları, Corning/ABD

-1000µl'lik pipet uçları, Corning/ABD

-Steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Millipore/ABD

-Steril santrifüj tüpleri (15ml), Thermo Scientific/ABD

-Steril santrifüj tüpleri (50ml), Thermo Scientific/ABD

-Thoma lamı, Bright –Line, Hausser Scientific Horsham/USA

-Kriyovial, Thermo Scientific/ABD

-2 ml'lik cam pastör pipetler, Isolab/Almanya

-10/25 ml hacimli serolojik pipet, ThermoFisher, ABD

- Petri, Nest/Çin

-22 no'lu bistüri, Medisin/Almanya

-0,5/1,5 ml eppendorf, SSIbio/ABD

-Lam, Isotherm/Almanya

-Lamel, Isotherm/Almanya

-Mikrotom Bıcakları, Leica Biosystems/ABD

3.1.3. Cihazlar

-CO_2 inkübatörü, Panasonic/ABD

-Mikroplate inkübatör ve çalkalayıcı, Heidolph/Almanya

-Buharlı sterilizatör (Otoklav), Nüve/Türkiye

-Class II Laminar Flow, Haier/Çin

-Multipipet sistemi, Hamburg/Almanya

-İnvert mikroskop, Olympus/Japonya

-Soğutuculu Santrifüj, Beckman Culture/ABD

-10µl, 100µl ve 1000µl'lik pipet seti, Axygen/ABD

- Saf su cihazı, Direct-Q 3 UV/Merck/Almanya

- Hassas terazi, SHIMADZU AUW220D/Japonya

- Aspiratör, Rocker 300/Tayvan

- Luminometre (FL×800 Mikroplate), Biotek/ABD

- Multipipet cihazı, Hamburg/Almanya

- Kuru hava sterilizatörü, Elektro-mag M 420/Türkiye

- Otomatik Pipetör, ISO fill

- Mini santrifüj, Scan Speed/ABD

- Manyetik mini-karıştırıcı, HI190M, Hanna Instruments/ABD

- -4/-20 Buzdolabı, Arçelik/Türkiye

- -86 Buzdolabı, Haier Biomedical/Çin
-Mikrotom, Reichert/ABD
-Açısal Ratatör, Thermo Scientific/ABD
-Evos Thermo Scientific/ABD

3.2. Yöntem

3.2.1.KHDAK Hastalarının Tümör Örneklerinin Temini

Bu tez çalışmasında, Bursa Uludağ Üniversitesi (BUÜ) Tıp Fakültesi Tıbbi Onkoloji Anabilim Dalına başvuran, akciğer kanseri tanısı almış KHDAK hastalarından 12 taze tümör dokusu örneği kullanılmıştır. Tez çalışması kapsamında doku örneklerinin kullanılacağı hastaların dahil edilme ve edilmeme kriterleri aşağıda belirtilmiştir.

Gönüllülerin çalışmaya dahil edilme kriterleri;
- Akciğer kanseri tanısı almış olması
- 30 yaşın üzerinde olması
- Neoadjuvan tedavi almamış olması
- Radyoterapi almamış olması
- Operasyon geçirmemiş olması

Gönüllülerin çalışmaya dahil edilmeme kriterleri;
- Benign akciğer tümörüne sahip olması
- 30 yaşın üzerinde olmaması
- Neoadjuvan tedavi almış olması
-Radyoterapi almış olması
- Operasyon geçirmiş olması
- Sigara/alkol kullanıyor olması

Bu tez çalışmasında 2213423 nolu TÜBİTAK projesinde kullanılmak üzere gelen dokulardan faydalanılmıştır. Alınan doku örnekleri 50 µg/ml Primosin içeren 1xPBS içerisinde Bursa Uludağ Moleküler Kanser Araştırma Laboratuvarına (BUMKAL)

gönderilmiştir. Tez çalışmasında kullanılan ilgili akciğer kanseri hastalarına ait materyallerin kullanılması, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 2011-KAEK-26/137 sayılı ve 2023-4/3 nolu kararı ile uygun bulunmuştur. Değerlendirilecek hastalara ait klinik özellikler, tümörlere yönelik patolojik bilgiler, tanı, tedavi ve takip bilgileri istatistiksel analizlerde kullanılmak üzere Tıbbi Onkoloji Anabilim Dalı ve Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı arşivlerinden elde edilmiştir.

3.2.2. Tümör Örneklerinin Histopatolojik Durumuna Göre Sınıflandırılması

Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Laboratuvarlarında akciğer kanseri ön tanısı/tanısı konulan vakaların histopatolojik sınıflandırmaları rutin olarak yapılmaktadır. Alınan örnekler yöntem 3.2.5'te açıklandığı gibi *ex-vivo* kültür işlemine tabi tutuldu. Kültürün 7-10. gününde biyopsi örneklerinin alındığı hastalara ait raporlar taranarak histopatolojik durumlarına göre sınıflandırma yapıldı.

3.2.3. Tümör Örneklerinin Enzimatik Parçalanması

Enzimatik parçalama işleminin tamamı laminar akım içerisinde steril koşullar altında yapıldı. Alınan tümör örnekleri içerisinde 2ml besiyeri bulunan (1x Glutamax, 10 mM Hepes ve 1x Puromisin içeren Advanced DMEM/F12) (Sachs vd., 2019) steril petri üzerine alındı. Tümör örneklerinin tamamı 22 nolu bistüri yardımıyla 1-2mm^3 boyutunda parçalara ayrıldı. Tüm parçalar ve petri içerisindeki besiyeri 15ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı. Son olarak petri içeriği de 1x PBS ile yıkanarak aynı santrifüj tüpü içerisine aktarıldı. Oda sıcaklığında 200xg hızda 5 dakika santrifüj sonrası süpernatant atılarak pellet üzerine Çizelge 2'de verilen enzim çözeltisinden 10 ml eklendi. Tip II Kollojenaz, Tip II Dispaz, Penisilin-Streptomisin ve Rock inhibitörü (Y-27632) olası kontaminasyon riskini önlemek için Çizelge 2'de belirtiği şekilde hazırlanarak alikotlandı ve -20ºC'de saklandı. Her doku örneği için belirtilen hacimler 8.5ml 1x PBS içerisine eklenerek doku parçalama solüsyonu hazırlandı. Enzim aktivitelerinin zamanla azalmasını engellemek amacıyla her tümör örneği için -20ºC'de saklanan alikotlar kullanılarak taze doku parçalama solüsyonu hazırlandı.

Çizelge 2. Enzim çözeltisinin hazırlanması (Cattaneo vd., 2020).

1 ml Kollojenaz Tip II	%0.2 (w/v) BSA (bovine serum albümin) içeren 1x PBS içerisinde 15mg/ml konsantrasyonunda çözüldü ve PES (0.22 µm) filtre ile filtre edilerek alikotlandı.	Tüm bileşenlere 8.5ml PBS eklenerek enzim çözeltisi hazır duruma getirildi.
500 µl Dispaz Tip II	ddH2O (Nuclease-Free) içerisinde 10 mg/mL konsantrasyonunda çözüldü ve PES (0.22 µm) filtre ile filtre edilerek alikotlandı.	
60 µl Penisilin-Streptomisin	100 U/mL olacak şekilde eklendi.	
10 µl Y-27632 (Rock inhibitör)	50mg/ml konsantrasyonda ticari olarak satın alındı. DMSO içerisinde 10mM konsantrasyonunda çözülerek hazırlandı.	

Santrifüj tüpleri orbital çalkalayıcıya konularak 100rpm hızda inkübatör içerisinde 37°C'de 30-60 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda tripan mavisi ile boyanarak hemositometre ile mikroskop altında tek hücre süspansiyon durumu kontrol edildi. Tek hücre süspansiyonu elde edildiği doğrulandıktan sonra enzim çözeltisine 2ml ısı ile inaktive edilmiş FBS ("heat inactivation of FBS") eklendi ve enzim aktivasyonu durduruldu. Hücre popülasyonunda bulanan kan hücreleri ileri analizlerin sonuçlarında hassasiyeti etkileme potansiyeli bulundurduğu için enzimatik parçalama işlemi sonrasında tümör hücreleri "Ficoll-Paque (1.077g/ml)" kullanılarak yoğunluk gradyanına bağlı olarak kan hücrelerinden ayrıştırıldı. Bu amaçla 15ml hacimli santrifüj tüpüne önce 3ml Ficoll solüsyonu ve üzerine Çizelge 4'te açıklanan besiyeriyle sulandırılan 4 ml hücre süspansiyonu eklendi. Ficoll ve hücre süspansiyonunu birbirleriyle karıştırmadan oda sıcaklığında 400xg hızda 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası yoğunluk farkına göre kan hücreleri ve hücre süspansiyonu ayrıldığı için santrifüj tüpünün en altında bulunan hücre pelleti dikkatlice alınarak ileri analizler için kullanıldı.

3.2.4. Primer Kültür Besiyeri Optimizasyonu

Birçok araştırmacı akciğer kanseri primer organoid kültürü elde etmek için birbirinden farklı sitokin, küçük molekül ve büyüme faktörü içeren kokteyl kültür ortamları oluşturmaktadır. Bu tez çalışmasında Çizelge 3'te belirtilen akciğer kanseri primer kültür besiyeri bileşenlerinden faydalanıldı.

Çizelge 3. KHDAK adenokarsinom hücreleri büyüme besiyeri bileşenleri (Cattaneo vd., 2020; Dijkstra vd., 2018).

Besiyeri Bileşenleri	**Stokların Hazırlanması**
Advanced DMEM/F12	-
Piromisin	50 mg/ml konsantrasyonda ticari olarak temin edildi
Hepes	1mM konsantrasyonda ticari olarak temin edildi
GlutaMax	100x konsantrasyonda ticari olarak temin edildi
Nicotinamide	1X PBS içerisinde 1M konsantrasyonda hazırlandı.
N-Acetylcysteine	1X PBS içerisinde 1M konsantrasyonda hazırlandı.
B27 supplement	50x konsantrasyonda ticari olarak temin edildi
Y-27632	DMSO içerisinde 10mM konsantrasyonda hazırlandı.
bFGF	1X PBS ile 100 µg/mL konsantrasyonda hazırlandı.
Noggin	-
R-Spondin-1	-

Bu aşamada, KHDAK hücreleri membran matriks kaplı yüzeylerde 3B kültüre edilebilmeleri için kültür şartları değiştirilerek hücrelerin optimum kültür şartları belirlendi.

3.2.5. Ex-vivo 3 Boyutlu Kültür

Organoid ex-vivo kültür Geltrex (ThermoFisher, Kat. No: A1413202) kullanılarak hanging-drop yöntemiyle 3B olarak gerçekleştirildi. Geltrex ticari olarak satın alındı ve 100 µl'lik alikotlar halinde -20ºC'de saklandı. Enzimatik parçalama öncesinde alikotlar organoid kültür aşamasına kadar 4ºC'ye alınarak sıcaklık dengesine ulaşması sağlandı.

Enzimatik parçalama sonrası KHDAK hastalarının tümör örneklerinden elde edilen tek hücre süspansiyonu tripan mavisi kullanılarak neubauer hemositometre lamında sayıldı. Sayılan ve tek hücre haline geldiği görülen süspanse hücre popülasyonundan 100 µl hücre (100 µl'de 1.5×104 hücre olacak şekilde) çözeltisi 100 µl Geltrex ile dikkatlice köpük oluşturulmadan karıştırıldı. Bu işlem Geltrex'in katılaşmaması için soğuk blok üzerinde gerçekleştirildi. Toplamda 200 µl hacimde olan Geltrex-hücre süspansiyonu karışımı 6 kuyucuklu hücre kültür kabına 20 µl olacak şekilde damlalar halinde eklendi. Kültür kabı hanging-drop yöntemi kullanılarak ters çevirildi ve 40 dakika boyunca 37°C' de inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda Geltrex'in katılaşması sağlandı ve 6 kuyucuklu hücre kültür kabı normal konuma getirildi. Tümör yapısının en iyi şekilde karakterize edilmesi için gerçekleştirilen bu işlemlerin sonunda Çizelge 4'te belirtilen akciğer primer organoid kültürü büyüme besiyeri her kuyuya 1ml olacak şekilde eklendi.

Çizelge 4. KHDAK adenokarsinom hücreleri büyüme besiyeri bileşenlerinin kullanılan konsantrasyonları (Cattaneo vd., 2020; Dijkstra vd., 2018).

Besiyeri Bileşenleri	**Son Konsantrasyonları**
Advanced DMEM/F12	-
Piromisin	50 µg/ml
Hepes	10 mM
GlutaMax	1x
Nicotinamide	5 mM
N-Acetylcysteine	1,25 mM
B27 supplement	1x
Y-27632	5 µM
bFGF	10 ng/ml
Noggin	100 ng/ml
R-Spondin-1	500 ng/ml

6 Kuyucuklu hücre kültür kabı 37°C'de %5 CO_2 içeren şartlandırılmış ortamda kültüre edildi. 9-12 günlük kültür boyunca da her 3. günün sonunda eski besiyeri yenisi ile

dikkatlice değiştirilerek hücre büyümesi kontrol edildi. Mikroskop altında yapılan incelemede organoid yapıları 300 µm boyutuna ulaşana kadar kültür devam ettirildi. Organoid yapıları 300 µm boyutuna ulaşınca (yaklaşık 10-12 günlük kültür işlemi sonunda) pasajlama işlemi gerçekleştirildi ve 3B kültür basamağı tekrar edildi. Meydana gelen organoid yapıları gün gün fotoğraflandı ve tez çalışması için gerçekleştirilecek ileri analizlerde kullanıldı.

3.2.6. ATP Canlılık Analizi ile Proliferasyon Eğrilerinin Oluşturulması

ATP yöntemi lüminesans bazlı metodolojiye bağlı olarak *in vitro* hücre canlılığı ölçümleri açısından hassas ve güvenilir bir metottur. Hücre içerisindeki en önemli enerji deposu olan ATP; biyolojik sentez, sinyal iletimi, taşıma, hareket gibi önemli süreçler için kullanılmaktadır. Hücresel ATP hücre canlılığını ölçmede en hassas uç noktadır. Bu yöntemin prensibi hücre kültüründe büyütülen hücrelerdeki intraselüler ATP içeriğinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. İntrasellüler ATP içeriğinin seviyesi yaşayan hücrelerin sayısının belirlenmesinde kullanılan bir göstergedir (Ulukaya vd., 2008). ATP yöntemi, lüsiferaz enzimi tarafından katalizlenen oksilüsiferin ile Mg+2 ve ATP'nin etkileşimi sonucunda lüminesans sinyali üreten bir sürece dayanır. Lüminesans sinyal ve ATP konsantrasyonu veya hücre sayısı arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır (Wadhawan vd., 2010). Bu bilgilerden yola çıkarak tez çalışmasında akciğer kanseri tümör dokularından elde edilen 3B primer kültür hücrelerinin proliferasyon eğrileri ATP canlılık analizi kullanılarak değerlendirildi. İlk pasaj sonrası tekrar oluşturulan 3B tümör organoidlerinin Geltrex matriks yapıları çözülerek organoid yapılarından tek hücre süspansiyonları elde edildi. Tek hücre süspansiyonları 96 kuyucuklu hücre kültür kabına kuyu başına 5000 hücre olacak şekilde 200 µl hacimde ekildi. Yalnızca kültür besiyeri içeren kuyucuklar kör negatif kontrolü olarak kullanıldı. Hücreler 9 grup ve her grup 6 tekrarlı olacak şekilde ekildikten sonra 37°C %5 CO_2 içeren şartlandırılmış atmosfer ortamında inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İlk grup kontrol olarak kullanıldı ve hücre ekiminden 3 saat sonra (Hücrelerin kültür kabının zeminine yapışması için fırsat tanındı) hücre canlılık ölçümü yapıldı. 2. grup kültür işleminin 12. saatinin sonunda, 3. grup 24. saatin sonunda olacak şekilde her grubun 12 saat arayla hücre canlılık analizi yapıldı. Hücre canlılık analizleri ATP hücre canlılık testiyle luminometrik olarak gerçekleştirildi.

İlk olarak 96 kuyulu hücre kültür kaplarındaki her kuyudan 150 µl besiyeri atıldı. ATP kitinin içerisindeki hücre lizis tamponundan 50 µl her kuyuya ilave edildi ve böylece hücre içerisindeki ATP'nin dışarı çıkması sağlandı. 20 dakikalık bekleme süresinin ardından hücre kültür süspansiyonundan 50 µl beyaz renkli 96 kuyulu hücre kültür kaplarına aktarıldı. Ardından her kuyuya 50 µl/kuyucuk lusiferin-lusiferaz enzimi içeren solüsyon ilave edildi. Elde edilen ATP miktarı lusiferin-lusiferaz bioluminesans reaksiyonu yardımıyla ölçme zamanı 1 saniye olacak şekilde luminometre (FL×800 Mikroplate Floresans Okuyucu) kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar rölatif ışık ünitesi (RLU) olarak verildi. Bu sayede 3B kültür sonrasında Hücreler 2B ortamda büyütülerek hücrelerin proliferasyon yetenekleri karakterize edildi. ATP canlılık analizi sonucu alınan absorbansların proliferasyon indeksi aşağıdaki formül kullanılarak kontrole kıyasla hesaplandı:

%Proliferasyon = (Kontrol RLU – Kör RLU) / (Farklı zaman aralıklarında ölçülen RLU Değerleri – Kör RLU) * 100

3.2.7. Histokimyasal Boyama ile Organoid Karakterizasyonu

Akciğer kanseri organoidleri kanser araştırmacıları için büyük bir atılım olmasına rağmen oluşturulan kanser organoid kültürlerinin saflığını doğrulamak için histomorfoloji ve immünohistokimya gibi deneysel süreçler önerilmektedir. Organoidlerin ana dokunun histopatolojik karakteristiklerini taşıdıklarını göstermek amacıyla immünohistokimyasal yöntemler altın standart olarak kullanılmaya devam etmektedir. Hematoksilen ve Eozin Boyaları hücre çekirdeği ve sitoplazma ayrımını sağlayan genel doku boyalarıdır. Hematoksilen hücre çekirdeğini mor-mavi renge boyarken Eozin sitoplazmayı pembe-kırmızı renge boyamaktadır (Suvarna vd., 2019). Histokimya analizleri için ilk olarak 3.2.5. yöntemde oluşturulan organoidler her kuyudan P1000 pipet ucu kullanarak Advanced DMEM-F12 içeren 15ml santrifüj tüplerinin içerisine toplandı. 200 x g'de 5 dakika boyunca 4°C'de santrifüj sonrası süpernatant atıldı. Organoidleri çevreleyen matriksi uzaklaştırmak için hücre peletine 5ml soğuk Advanced DMEM-F12 eklenerek 10 dakika boyunca 4°C'de açısal rotatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında 200xg'de 5 dakika boyunca 4°C'de santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra

fiksasyon aşamasına geçildi. Organoidlerin fiksasyonları 2 saat süre boyunca %10 nötr tamponlu formalin ile gerçekleştirildi. Formalin fiksasyonu sonrası örnekler 200xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi ve formalin içeren süpernatant uzaklaştırıldı. Hücre peleti 10ml 1X DPBS ile sulandırıldı ve 5 dakika inkübasyon sonrası 200xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edilerek formalin artıkları uzaklaştırıldı. Fiksasyona uğramış organoidleri içeren hücre peleti 50µl 1X DPBS ile yeniden süspanse edildi ve 100 µL %2 agaroz çözeltisiyle karıştırıldı. Organoid-agaroz karışımını petri üzerine damlacık şeklinde pipetlendi ve petri ters çevrilerek agarozun katılaşması (≈10 dk) beklendi. Fiksasyon sonrası organoidlerin agaroz içerisinde olması parafine gömme aşamalarında organoid yapılarının bozulmadan kalmasını sağladı. Organoidleri içeren katı agaroz takip kasetlerine yerleştirildi ve Çizelge 5'te açıklanan basamaklar takip edilerek parafine gömüldü.

Çizelge 5. Parafine sabitleme basamakları (Kim vd., 2019).

Aşama	**Uygulama**	**Süre**
Dehidrasyon	%70 etanol	1 Saat
	%80 etanol	1 Saat
	%95 etanol	1 Saat
	%100 etanol	45 Dakika
Şeffaflandırma	%50 etanol + 50% ksilen	30 Dakika
	%100 ksilen	15 Dakika
	%100 ksilen	15 Dakika
Parafinizasyon	%50 ksilen + 50% Parafin	1 Saat
	%100 Parafin	1 Saat
	%100 Parafin	1 Saat

KHDAK organoidlerini içeren parafin bloklardan mikrotom cihazı ile 4µm kalınlığında kesitler alındı. Parafin kesitler üzerinde Çizelge 6'da açıklanan basmaklar takip edilerek H&E boyamaları gerçekleştirildi.

Çizelge 6. Hematoksilen Eozin boyama basamakları (Kim vd., 2019).

Aşama	Uygulama	Süre
Deparafinizayon	%100 ksilen	5 Dakika
	%100 ksilen	5 Dakika
Rehidratasyon	%100 etanol	3 Dakika
	%100 etanol	3 Dakika
	%95 etanol	3 Dakika
	%80 etanol	1 Dakika
	H_2O	5 Dakika
Hematoksilen boyama	Hematoksilen	1 Dakika
	H_2O	3 Dakika
Farklılaştırma	% 0.5 HCL (%70 etanolde hazırlanmış)	10 Saniye
	H_2O	5 Dakika
Eozin boyama	%95 etanol	10 Saniye
	eozin	45 Saniye
Dehidratasyon	%95 etanol	10 Saniye
	%95 etanol	10 Saniye
	%100 etanol	1 Dakika
	%100 etanol	1 Dakika
Şeffaflandırma	%100 ksilen	1 Dakika
	%100 ksilen	1 Dakika

Son aşamada slaytlar ksilen ile 10-15 saniye inkübe edildi ve etüvde kurutuldu. Kurutulan slaytlar yapıştırıcı bir madde olan entellan ile kapatıldı. Kurumaya izin vermeden hemen lamelle üstü kapatılıp bistüri sapı ile kontrollü olarak desteklenerek hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Bir peçete yardımıyla dışarı taşanlar silindi. Tüm görüntüler, toplam 40X büyütme oranında bir Inverted Mikroskop kullanılarak alındı.

3.2.8. İmminoflorasan Boyama ile Organoid Karakterizasyonu

İmminoflorasan, hücrelerde ve dokuda spesifik antijenleri tespit etmek ve lokalize etmek için bir antikor ve antijen arasındaki spesifik bağlanmadan yararlanan, en yaygın olarak ışık mikroskobu ile tespit edilen ve araştırma laboratuvarlarında incelenen güçlü bir tekniktir. Sadece araştırma laboratuvarlarında değil, aynı zamanda klinik tanıda da kullanılan İmminoflorasan, günlük klinik aktivitelerinde rutin tanı yaklaşımlarından biri olmuştur (Schacht & Kern, 2015). Bu sebeple bu tez çalışmasında akciğer kanseri tümör dokularından elde edilen 3B primer kültür organoidlerinin İmminoflorasan boyamalar ile karakterizasyonu gerçekleştirildi. Yöntem 3.2.7'de verilen Çizelge 5'te ki parafine gömme ve kesit alınma basamakları aynı şekilde bu yöntem içinde tekrar edildi. Daha sonrasında parafin kesitler üzerinde Çizelge 7'de açıklanan basmaklar takip edilerek İmminoflorasan boyaması gerçekleştirildi.

Çizelge 7. İmminoflorasan boyama basamakları. * Ardışık iki yıkama basamağını temsil etmektedir. # Serum tipi (Keçi serumu) kullanılan antikora göre seçilmiştir (Kim vd., 2019).

Aşama	**Uygulama**	**Süre**
Deparafinizayon	%100 ksilen	5 Dakika
	%100 ksilen	5 Dakika
Rehidratasyon	%100 etanol	3 Dakika
	%100 etanol	3 Dakika
	%95 etanol	3 Dakika
	%80 etanol	1 Dakika
	H_2O	5 Dakika
Antijen Geri Kazanımı	Sodyum Sitrat Tamponu (pH6.0) (Önceden 95^0C'ye ısıtılmış)	10 Dakika
	H_2O	5 Dakika *
Boyama	%3 Hidrojen Peroksit	10 Dakika
	H_2O	5 Dakika *
	1xTBST (137mM NaCl, 20mM TrisBase, 0.1% Tween-20, pH 7.6)	5 Dakika *

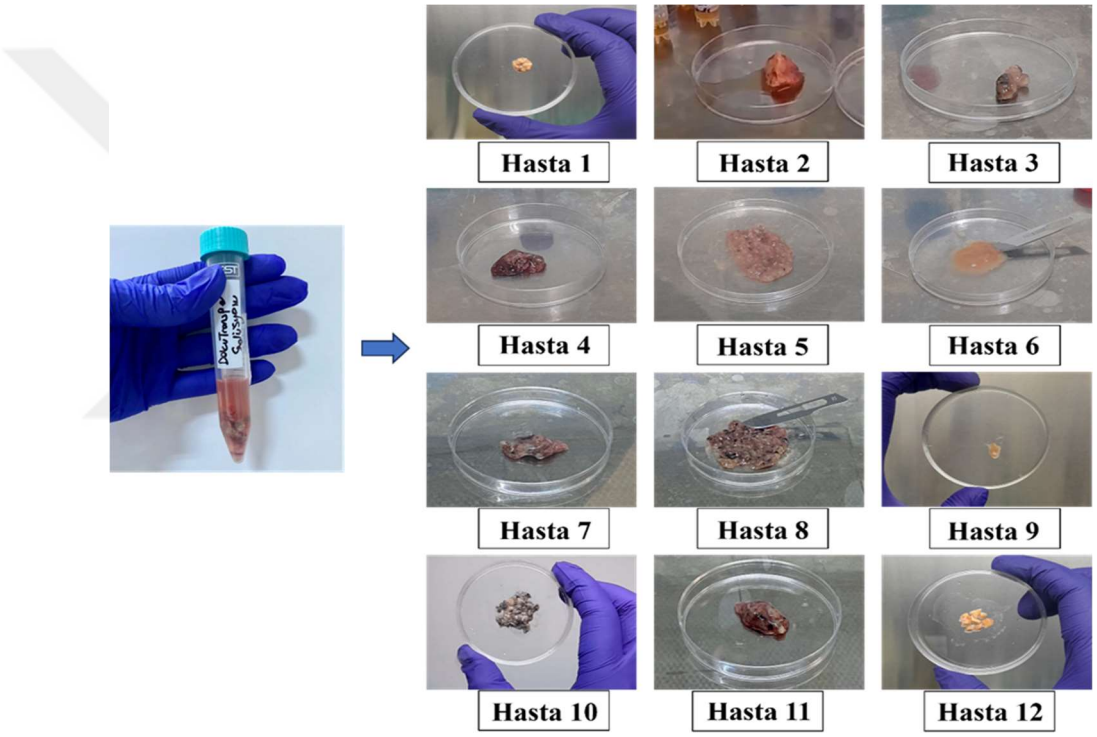
	%5 Keçi Serumu(#) İçeren 1xTBST	1 Saat
	Birincil Antikor (TTF-1)	4°C'de Gece boyunca
	1xTBST	5 Dakika *
	İkincil Antikor (Streptavidin-HRP)	30 Dakika
	1xTBST	5 Dakika *
	DAB Kromojen	10 Dakika

Organoidlerin adenokarsinom kökenini doğrulayan akciğer tümörü belirteci TTF-1'in pulmoner olmayan, tiroid dışı tümörlerden primer akciğer adenokarsinomunu tanımlamadaki rolü iyi belgelenmiştir (Travis vd., 2011). Bu sebeple Anti-TTF-1 (1/50 dilution, #12373, Cell Signaling Technology) organoidlerin fikse edildiği slaytları boyamak için kullanıldı. Çekirdekler ise 15 dakika boyunca DAPI (1:2000 dilüsyonlar; #4083, Cell Signaling Technology) ile boyandı. Son aşamada slaytlar yapıştırıcı bir madde olan entellan ile kapatıldı. Kurumaya izin vermeden hemen lamelle üstü kapatılıp bistüri sapı ile kontrollü olarak desteklenerek hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Bir peçete yardımıyla dışarı taşanlar silindi. Görüntüleme EVOS M7000 | Hücre Görüntüleme Sistemi (Invitrogen, ABD) kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. KHDAK Hastalarından Tümör Örneklerinin Alınması

Tez çalışması kapsamında Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbı Onkoloji Anabilim Dalına başvuran, akciğer kanseri tanısı almış ve tedavi geçmişi olmayan KHDAK hastalarından toplam 12 hasta örneği toplandı (Şekil 18). Alınan doku örnekleri, içerisinde 50 µg/ml Primosin ve 1xPBS bulunan doku transfer solüsyonları içinde Bursa Uludağ Moleküler Kanser Araştırma Laboratuvarına (BUMKAL) getirildi.



Şekil 18. KHDAK hastalarından alınan 12 biyopsi tümör örneği.

Tez çalışması kapsamında akciğer kanseri tanısı almış, 30 yaşın üzerinde olan, neoadjuvan tedavi almamış, radyoterapi almamış ve operasyon geçirmemiş hastaların örnekleri kullanıldı. Elde edilen hasta örnekleri 3B organoid kültürlerin oluşturulması ve ileri analizler için petri kaplar içerisine alınarak işleme tabii tutuldu.

4.2. Tümör Örneklerinin Histopatolojik Durumuna Göre Sınıflandırılması

Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Laboratuvarlarında akciğer kanseri ön tanısı/tanısı konulan vakaların histopatolojik sınıflandırmaları rutin olarak yapılmaktadır. Tez çalışması kapsamında temin edilen tümör örneklerinden 9'u ADC, 3 örnek ise SCC tanısı almıştır. KHDAK hastalarının histopatolojik sınıflandırılmasının yapılabilmesi için patoloji laboratuvarlarında hasta materyalleri belirli immünohistokimya boyaları ile boyanması ve boyamalardan alınan sonuçlara göre tanı konması gerekmektedir. Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Laboratuvarında immünohistokimya boyaması yapılarak alt tipi belirlenen ve tez çalışmasına dahil edilen 12 KHDAK hastasının histopatoloji sonuçları Çizelge 8'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre TTF-1, CK 7 ve Müsikarmen boyamalarının ADC tanısı alan hastaların hepsinde pozitif çıktığı görülmektedir. TTF-1, CK 7 ve Müsikarmen boyaları ADC tanısında oldukça önemli ve sık kullanılan boyalardır. Napsin A'nın ise 2 hasta istisna olmak üzere hemen hemen tüm ADC tanısı alan hastalarda pozitif boyandığı görülmektedir. Elde edilen sonuçlara göre SCC tanısı alan hastaların hepsinde p63, p40 ve CK 5/6 boyamalarının pozitif çıktığı görülmektedir. SCC tanısında da p63, p40 ve CK 5/6 boyaları oldukça önemli ve sık kullanılan boyalardır. KHDAK hastalarına ait patoloji raporlarında sonuçları bulunmayan boyamaların alanları Çizelge 8'de boş bırakılmıştır.

Çizelge 8. KHDAK hastalarından alınan örneklerin histopatolojik tanıları. ADC; Adenokarsinoma, SCC; Skuamöz Hücreli Karsinom

Hasta No	**Patoloji**		**TTF-1**	**Napsin A**	**p63**	**p40**	**CK 5/6**	**CK 7**	**Müsikarmen**
	Histopstoloji	**Alt Tip**							
1	KHDAK	ADC	+	+				+	
2	KHDAK	ADC	+	+	-		-	+	+
3	KHDAK	ADC	+	+				+	
4	KHDAK	ADC	+	+			+	+	
5	KHDAK	ADC	+	+	-	-	-	+	+
6	KHDAK	ADC	+	+	-			+	
7	KHDAK	ADC	+	+	-	-	-	+	+

8	KHDAK	ADC	+	-	-	-	-	+	+
9	KHDAK	ADC	+	-	-			+	+
10	KHDAK	SCC	-	-	+	+	+	-	-
11	KHDAK	SCC	-	-	+		+		-
12	KHDAK	SCC			+	+	+	-	

Demografik özellikler açısından incelendiğinde ise 10 tümör örneğinin erkek hastalara, 2 tümör örneğinin ise kadın hastalara ait olduğu görülmektedir. Ayrıca 60-69 yaş aralığı 6 hasta örneği ile frekansı en yüksek yaş grubunu oluşturmaktadır. 70-79 yaş aralığı ise 5 hasta örneği ile ikinci sırada gelmektedir. 50-59 yaş aralığı ise içerisinde sadece bir hasta örneği barındırmaktadır (Çizelge 9).

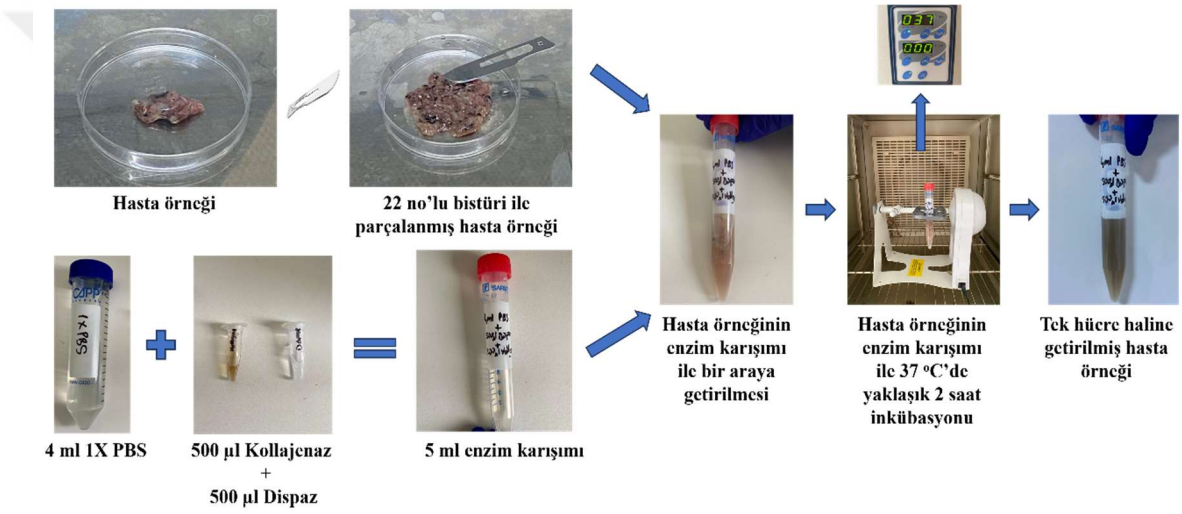
Çizelge 9. Tez çalışması kapsamında toplanan tümör örneklerine ait demografik ve klinik parametreler

		Hasta Sayısı (n)	**Yüzde (%)**
Demografik Parametreler			
Cinsiyet	Erkek	10	83,33
	Kadın	2	16,66
Yaş	50-59	1	8,33
	60-69	6	49,99
	70-79	5	41,66
Klinik Parametreler			
Histoloji	Adenokarsinoma	9	74,99
	Skuamöz	3	24,99

4.3. Tümör Örneklerinin Enzimatik Parçalanması

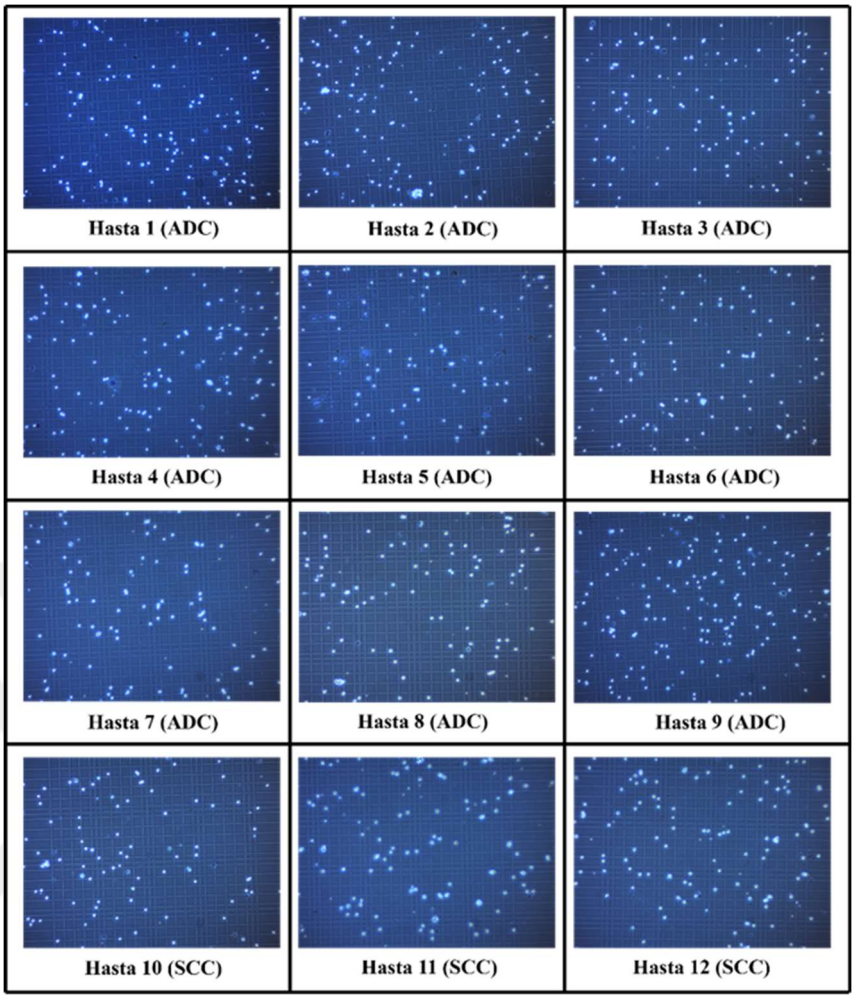
BUÜ Tıp Fakültesi Tıbbı Onkoloji Anabilim Dalına başvuran, akciğer kanseri tanısı almış KHDAK hastalarından alınan toplam 12 hasta örneği steril petri üzerine alındı. Tümör örneklerinin tamamı 22 nolu bistüri yardımıyla 1-2mm3 boyutunda parçalara ayrıldı. Tüm parçalar ve petri içerisindeki besiyeri 15ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı. Son olarak petri içeriği de 1xPBS ile yıkanarak aynı santrifüj tüpü içerisine aktarıldı. Oda

sıcaklığında 200xg hızda 5 dakika santrifüj sonrası süpernatant atıldı. 1xPBS içerisinde Tip II Kollojenaz, Tip II Dispaz, Penisilin-Streptomisin ve Y-27632 içeren bir enzim çözeltisi hazırlandı. Pellet üzerine enzim çözeltisinden 10 ml eklendi. Santrifüj tüpleri orbital çalkalayıcıya konularak 100rpm hızda inkübatör içerisinde 37°C'de 30-60 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sırasında tümör örnekleri sık sık kontrol edilerek hücrelerin ayrışma durumları göz kararı kontrol edildi. Doku süspansiyonun parçalandığının gözlendiği anda enzim inkübasyonu sonlandırıldı Enzimatik parçalama için yeterli görülen inkübasyon süresinin sonunda tümör örnekleri steril kabine alındı (Şekil 19).



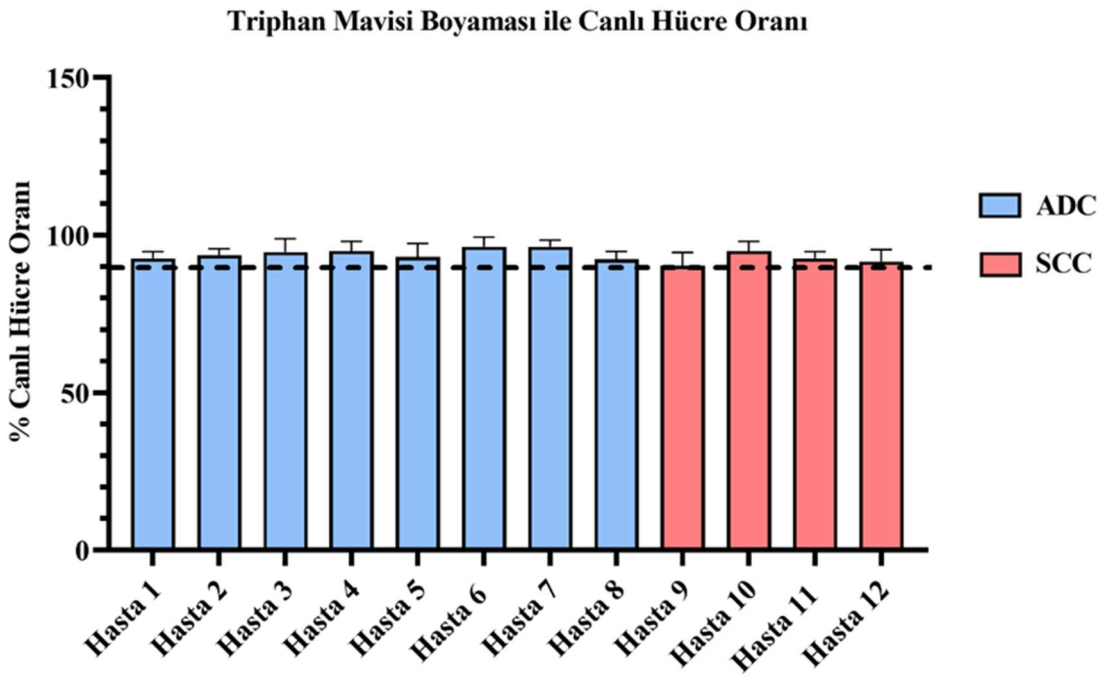
Şekil 19. Mekanik olarak küçük boyutlara parçalanmış olan tümör örneklerinin enzim çözeltisi yardımıyla tek hücre haline getirilmesi

İnkübasyon süresi sonunda enzimatik olarak tek hücre şeklinde ayrıştığı düşünülen tümör örnekleri tripan mavisi ile boyanarak hemositometre ile mikroskop altında tek hücre süspansiyon durumları kontrol edildi. 5µL tripan mavisi 5µL tek hücre süspansiyonu ile karıştırılarak hemisitometre neubauer lamına pipetlendi. Neubauer lamına pipetlenen tripan mavisi ile boyanmış tümör örnekleri faz kontrast mikroskobunda incelendi ve fotoğraflandı (Şekil 20 ve 22).



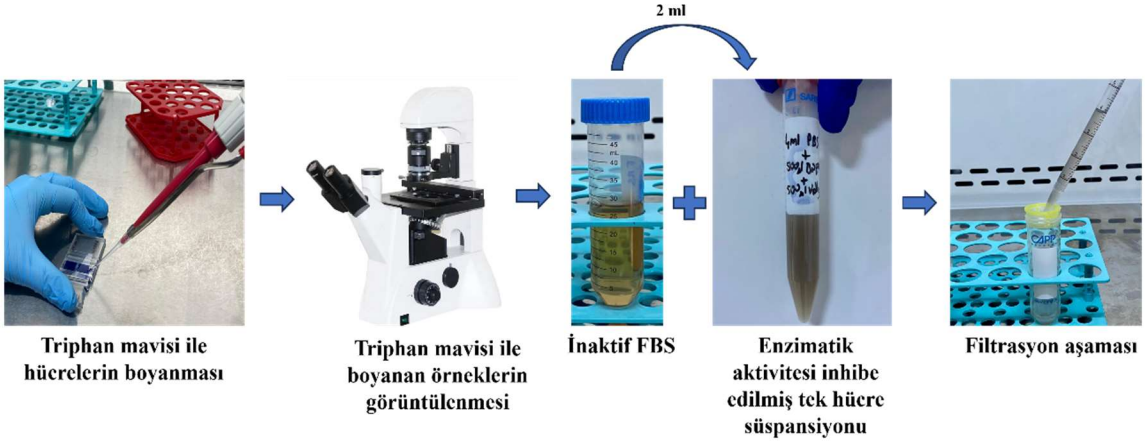
Şekil 20. Tripan mavisi ile boyanmış tek hücre süspansiyonu tümör örneklerinin faz kontrast mikroskobu görüntüleri

Tek hücre süspansiyonları %0.4 Tripan mavisi ile boyandıktan sonra hemositometre de sayıldı ve canlı hücre oranları analiz edildi. Boyayı almayan hücre sayısı/Toplam sayılan hücre sayısı*100; formülü kullanılarak canlı hücre oranı belirlendi (Şekil 21). Tripan mavisi boyaması sonuçları incelendiğinde canlı hücre popülasyonun ≥%90 olması durumu tüm hasta örneklerinde yapılan enzimatik parçalama performansı ≥%90'ın üzerinde hücre canlılığı ile sonuçlanmıştır.



Şekil 21. Enzimatik parçalama sonrasında %0.4 Tripan mavisi boyaması canlı hücre oranları. Her bir veri noktası tek bir örneğin 3 ayrı boyama sonucunun ortalamasını göstermektedir. Kesikli çizgi %90 canlılığı temsil etmektedir. ADC: Adenokarsinoma; SCC: Skuamöz Hücreli Karsinoma.

Tek hücre süspansiyonu elde edildiği doğrulandıktan sonra enzim çözeltisine 2ml ısı ile inaktive edilmiş FBS eklendi ve enzim aktivasyonu durduruldu. Tek hücre süspansiyonu haline gelmiş tümör örneklerini artık maddelerden ayrıştırmak için son olarak 70 µm çapındaki filtreler kullanılarak filtrasyon işlemi gerçekleştirildi (Şekil 22).

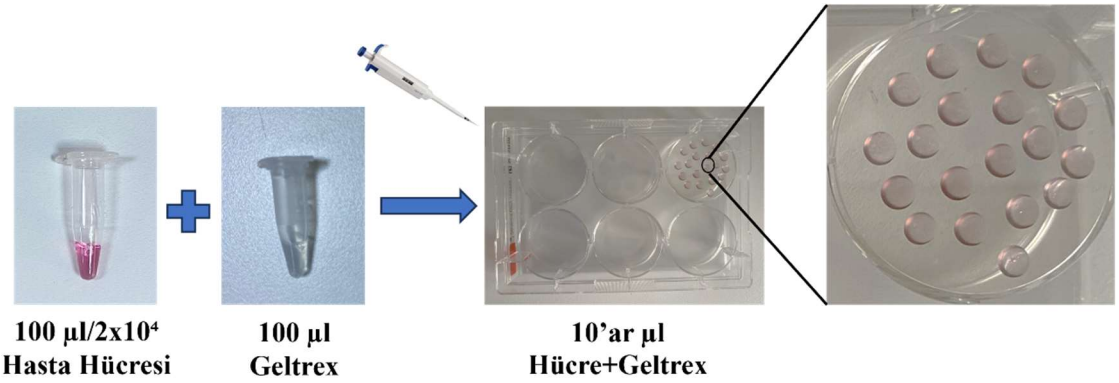


Şekil 22. Mekanik olarak küçük boyutlara parçalanmış olan tümör örneklerinin enzim çözeltisi yardımıyla tek hücre haline getirildikten sonra enzim çözeltisinin inhibe edilmesi

Filtrasyon işleminden sonra tek hücre süspansiyonu haline getirilen tümör örnekleri 3B organoid yapıları oluşturmak ve ileri analizlerde kullanılmak için *ex-vivo* kültüre alındı.

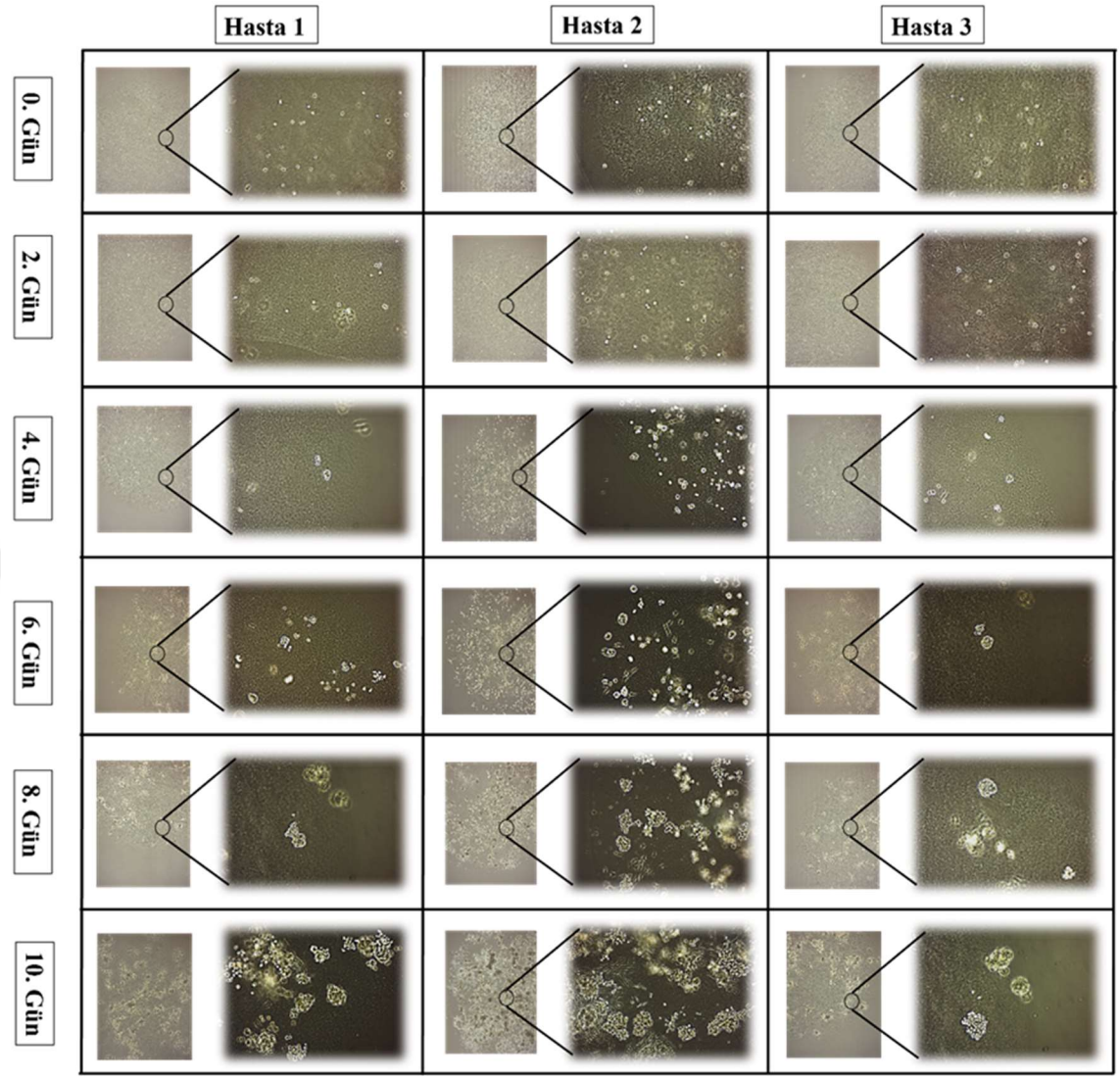
4.4. Primer Kültür Besiyeri Optimizasyonu ve e*x-vivo* 3 Boyutlu Kültür

Enzimatik parçalama sonrası elde edildiği görülen tek hücre süspansiyonu *ex-vivo* kültür aşamalarında kullanıldı. %0.4 tripan mavisi ile boyandıktan sonra hemositometre lamında sayılan tek hücre süspansiyonları 100 µl primer kültür büyüme besiyeri içerisinde $2x10^4$ hücre olacak şekilde seyreltildi. Kültür aşamaları için Çizelge 4'te belirtilen primer kültür büyüme besiyeri formülasyonu kullanılmıştır. Ticari olarak satın alınan Geltrex 100 µl'lik alikotlar halinde -20°C'de saklandı. Enzimatik parçalama öncesinde Geltrex alikotları *ex-vivo* 3B kültür aşamasına kadar +4°C'ye alınarak sıcaklık dengesine ulaşması sağlandı. Sıcaklık dengesine ulaşan Geltrex alikotu ile içerisinde $2x10^4$ hücre bulunan 100 µl tek hücre süspansiyonu dikkatlice köpük oluşturulmadan pipetaj işlemi ile karıştırıldı. 6 kuyucuklu hücre kültür kabına ~10 µl olacak şekilde Geltrex-hücre karşımı damlacık şeklinde eklendi. 6 kuyucuklu hücre kültür kabı hanging-drop yöntemi kullanılarak baş aşağı şekilde 50 dakika boyunca 37°C'de inkübatörde inkübasyona bırakılarak Geltrex'in katılaşması sağlandı. İnkübasyon süresi sonunda 6 kuyucuklu hücre kültür kabı normal konuma getirildi ve 2 ml organoid besiyeri eklenerek tekrar inkübatöre kaldırıldı. İleri deneysel analizler öncesinde yapılan *ex-vivo* kültür koşulları 3B organoid kültür şartlarında ve özel besiyeri formülasyonları kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 23).

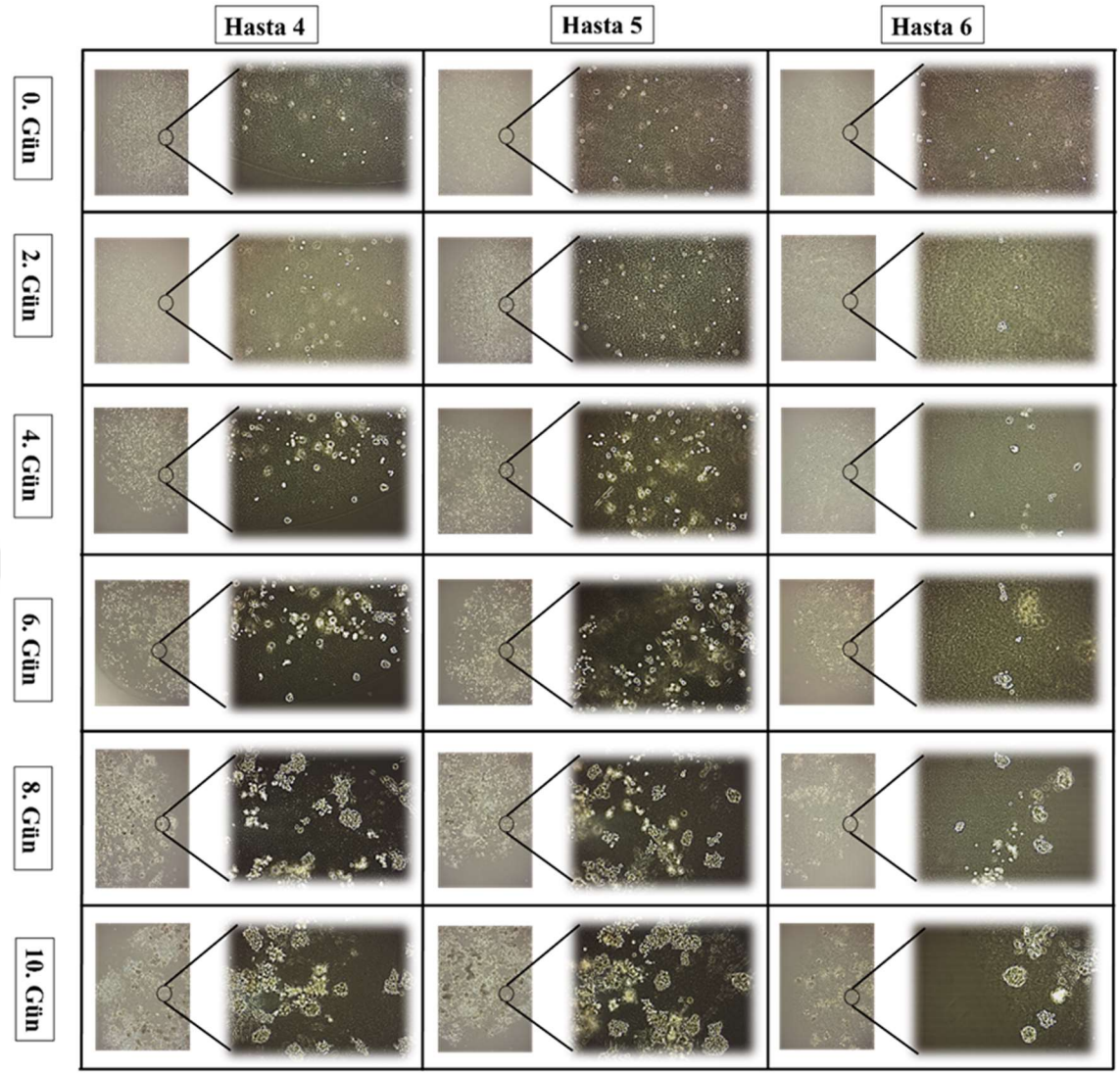


Şekil 23. Tek hücre haline getirilen tümör örneklerinin Geltrex kullanılarak 3 boyutlu kültüre alınması

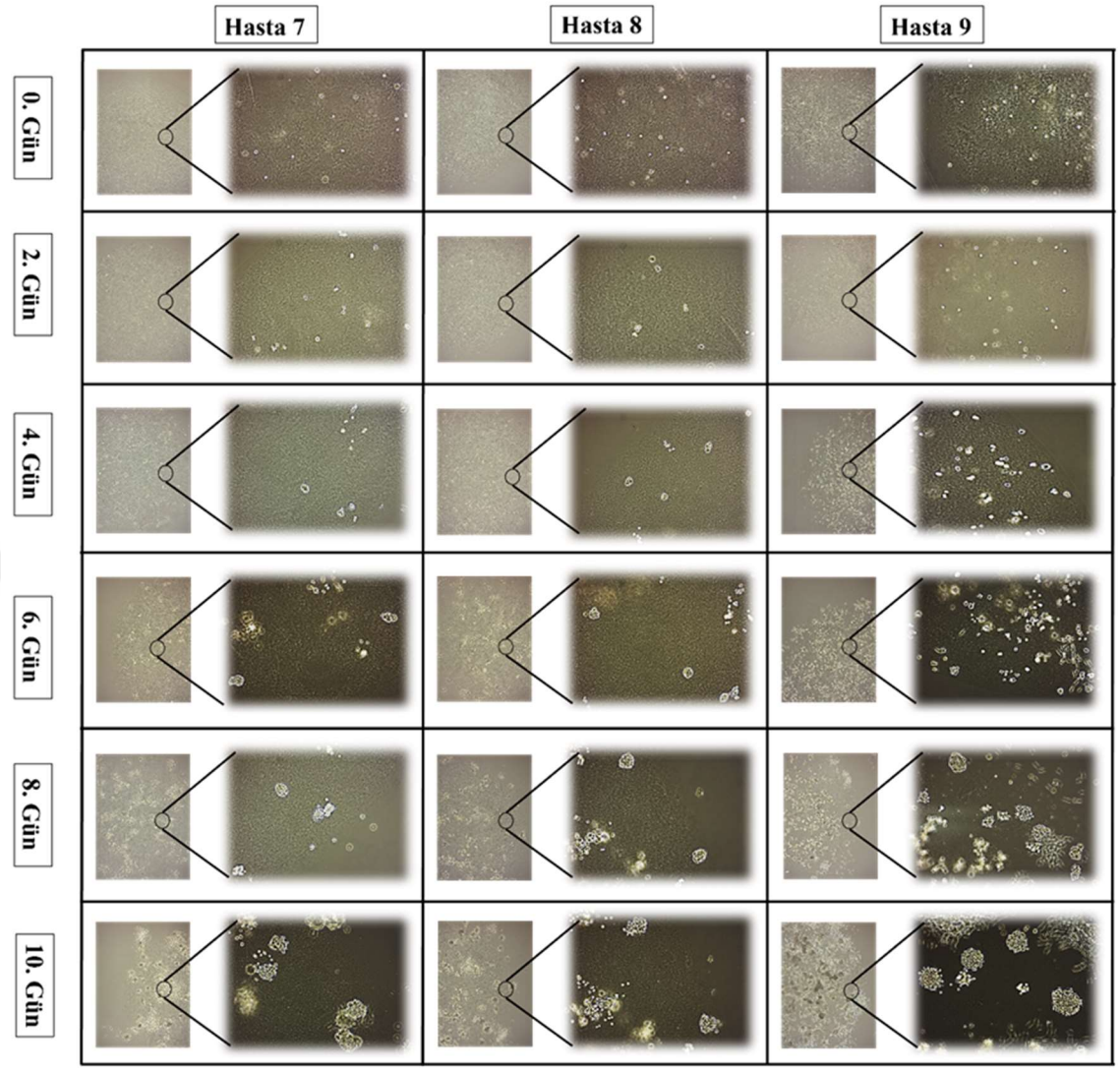
Geltrex kullanılarak oluşturulan 3B ortam içerisindeki hücreler gün gün takip edildi. Geltrex'e zarar vermekten kaçınarak dikkatli bir şekilde kuyulardaki eski besiyeri aspire edildi ve yerine taze besiyeri eklenerek 3 günde bir besiyeri değişimi yapıldı. Mikroskop altında yapılan incelemede hücre koloni yapıları ~300 µm boyutuna ulaşana kadar kültür devam ettirildi. Geltrex içerisinde ilk oluşturulan akciğer kanseri organoid modelleri köken aldığı tümör dokusunun stromal elementler açısından zengin olması ve fibroblast kirliliği nedeniyle istenilen saflıkta bir görüntü vermemektedir. Serum içeren besiyerleri fibroblastların büyümesini desteklediği için kültivasyonun ileri aşamalarında gerekli hücre popülasyonunun saflığı değişmektedir. Tüm hücre kültürü aşamalarında kullanılan besiyeri serum içermediğinden uzun süreli kültür ve pasaj işleminden sonra fibroblastların eliminasyonu sağlanabilmiştir. Bu nedenle Geltrex içerisinde tümöroid yapıları ~300 µm boyutuna ulaşınca (yaklaşık 12-15 günlük kültür işlemi sonunda) pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Tümöroid yapıları pasajlanarak Geltrex ile 3B kültür basamağı tekrar edildi. Hücrelerin pasajlanması sonrasında tümöroid yapıları ~300 µm boyutuna ulaşıncaya dek 2 günde bir fotoğraflanarak gözlemlendi. ADC ve SCC hasta tümörlerinden elde edilen ve pasaj işlemi sonrası saflaştırılmış olan akciğer kanseri hücrelerinin *ex-vivo* kültür ortamında 10 gün boyunca meydana getirdiği organoid yapıları şekil 24, 25, 26 ve 27'de verilmiştir.



Şekil 24. Geltrex'e ekildikten sonra ilk 10 gündeki 3 ADC hastasının (Hasta 1-3) oluşturduğu organoid görüntüleri.



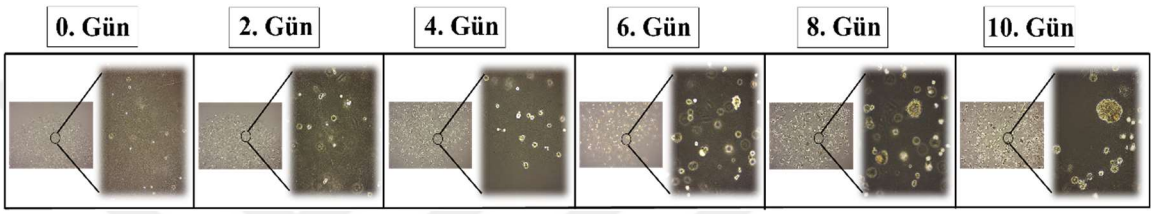
Şekil 25. Geltrex'e ekildikten sonra ilk 10 gündeki 3 ADC hastasının (Hasta 4-6) oluşturduğu organoid görüntüleri.



Şekil 26. Geltrex'e ekildikten sonra ilk 10 gündeki 3 ADC hastasının (Hasta 7-9) oluşturduğu organoid görüntüleri.

Gerçekleştirilen gözlemler sonucunda toplam yaklaşık 25-30 günlük 3B kültür işlemi sonunda kanser hücreleri dışında ortamda bulunan fibroblastların eliminasyonunun sağlandığı görüldü. Akciğer kanseri 3B kültüründe bulunan stromal elementlerin ve fibroblast kirliliğinin ortadan kaldırılması yapılan 3B kültürlerin başarılı bir şekilde tamamlandığını göstermektedir. ADC ve SCC hastalarından elde edilen kanser hücrelerinden oluşturulan 3B organoid yapıları da istenilen boyuta ulaşmış ve periyodik bir büyüme göstermiştir.

ADC ve SCC hastalarının tümör dokularından elde edilen organoid yapılarını pozitif bir kontrolle kıyaslamak açısından adenokarsinomik insan alveolar bazal epitel hücresi olduğunu bildiğimiz insan akciğer kanser hücre soyu olan A549 hücrelerini de aynı kültür koşullarından geçirerek aynı süre boyunca 3B kültür ortamında büyütüldü. 3B kültür ortamına alınan adenokarsinomik A549 hücrelerinin meydana getirdiği organid yapıları ~300 µm boyutuna ulaşıncaya dek 2 günde bir fotoğraflanarak gözlem yapıldı. Adenokarsinomik A549 hücrelerinin *in-vitro* kültür ortamında 10 gün boyunca meydana getirdiği organoid yapıları Şekil 28'de verilmiştir.

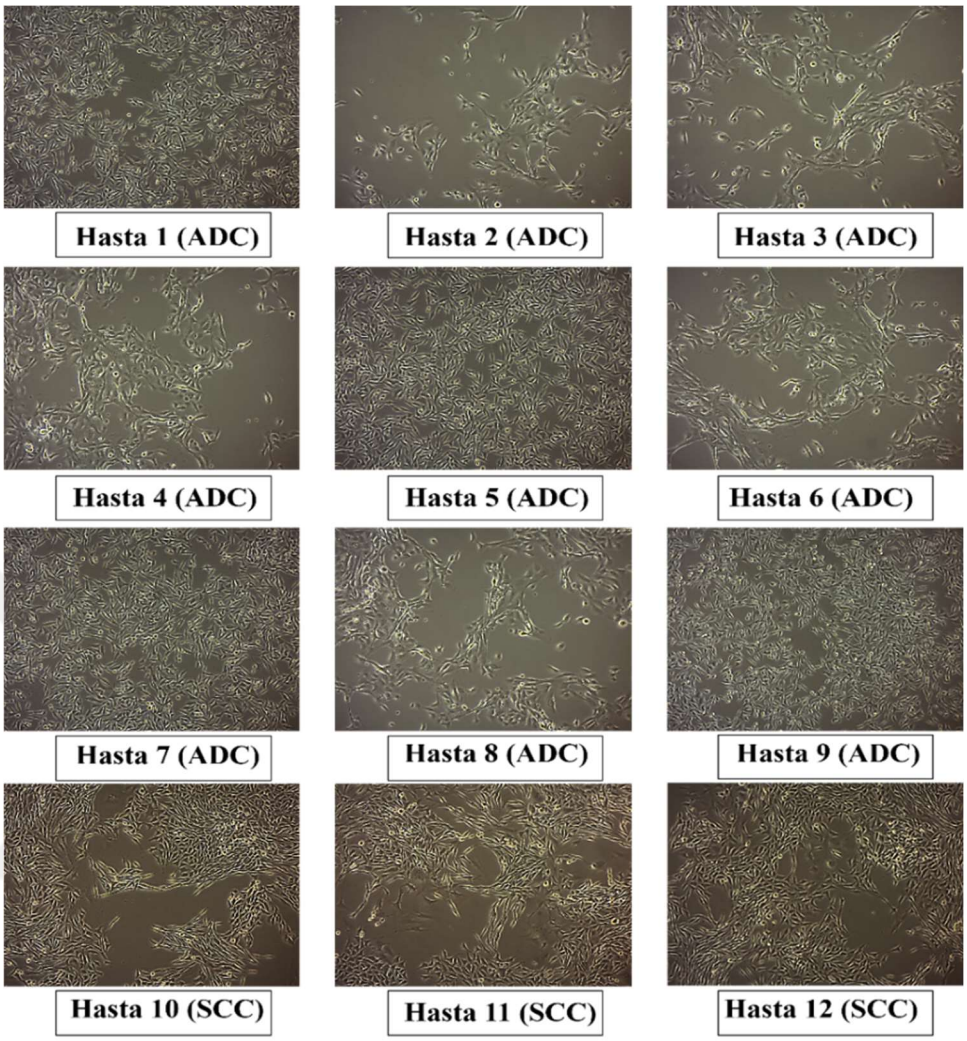


Şekil 28. Geltrex'e ekildikten sonra ilk 10 gündeki A549 hücresinin oluşturduğu organoid görüntüleri

4.5. 3B Kültür Sonrası Organoid Yapılarının Proliferasyon Yetenekleri

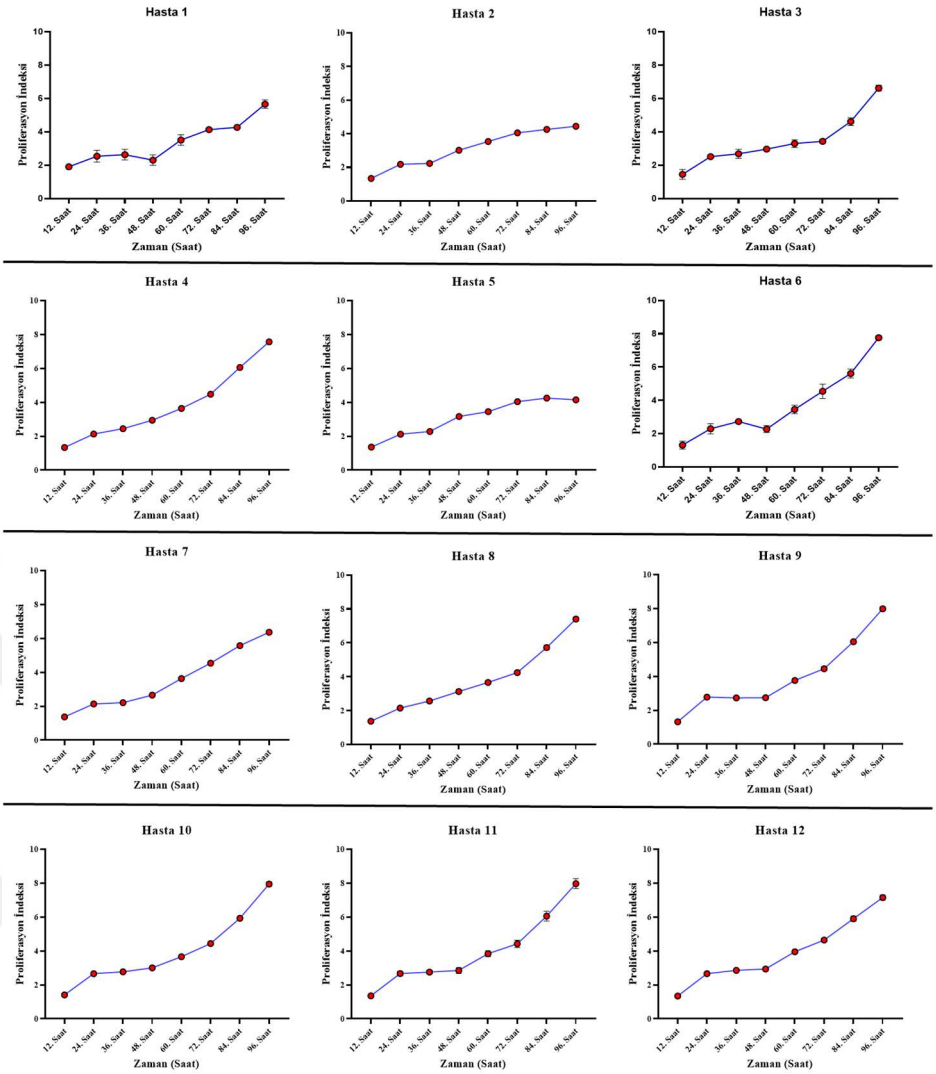
Yaklaşık 25-30 günlük 3B kültür işlemi sonunda akciğer kanseri 3B kültüründe bulunan stromal elementlerin ve fibroblast kirliliğinin ortadan kaldırılmasıyla ADC ve SCC hastalarından elde edilen ve kanser hücrelerinden oluşturulan 3B organoid yapılarının istenilen boyuta ulaşmış, periyodik bir büyüme gösterdiği kalitatif olarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeler yapılan 3B kültürlerin başarılı bir şekilde tamamlandığını göstermektedir. 3B primer organoid kültürün başarılı bir şekilde gerçekleştirilmesinin yanı sıra her bir hastaya ait elde edilen organoid yapılarının karakterize edilmesi oldukça önemlidir. Bu sebeple ilk karakterizasyon basamağı olarak her bir hastadan elde edilen organoid yapılarının proliferasyon yetenekleri nicel olarak değerlendirildi. Bu amaçla ilk pasaj sonrası oluşan Geltrex matriks yapıları çözülerek tümöroid yapılarından tek hücre süspansiyonları elde edildi. Elde edilen tek hücre süspansiyonları 96 kuyucuklu hücre kültür kabına kuyu başına 5000 hücre olacak şekilde ekildi. Yalnızca ortam içeren kuyucuklar arka plan için kör olarak kullanıldı. Hücreler 12 hasta, her hasta 9 grup ve her grup 6 tekrarlı olacak şekilde ekildikten sonra 37°C'de %5 CO_2 içeren şartlandırılmış atmosfer ortamında inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İlk

grup kontrol olarak kullanıldı ve hücre ekiminden 3 saat sonra (Hücrelerin kültür kabının zeminine yapışması için fırsat tanındı) hücre canlılık ölçümü yapıldı. 2. grup kültür işleminin 12. saatinin sonunda, 3. grup 24. saatin sonunda, 4. grup 36. saatin sonunda, 5. grup 48. saatin sonunda, 6. grup 60. Saatin sonunda, 7. grup 72. saatin sonunda, 8. grup 84. saatin sonunda ve 9. grup 96. saatin sonunda olacak şekilde her grubun 12 saat arayla hücre canlılık analizi ATP hücre canlılık testi kullanılarak luminometrik olarak gerçekleştirildi. Bu amaçla hücre canlılık analizleri (Kontrol RLU – Kör RLU) / (Farklı zaman aralıklarında ölçülen RLU Değerleri – Kör RLU) formülü kullanılarak kontrole kıyasla proliferasyon indeksi hesaplandı. ATP hücre canlılık analizi öncesinde 9 ADC ve 3 SCC hastasından elde edilen primer kaynaklı akciğer kanseri hücrelerinin 2 boyutlu kültürdeki morfolojik durumları mikroskop altında değerlendirilerek fotoğraflandı (Şekil 29).



Şekil 29. 9 ADC ve 3 SCC hastasından elde edilen primer kaynaklı akciğer kanseri hücrelerinin 2 boyutlu kültürdeki morfolojik durumları

Yapılan analizler sonucu hücrelerin 96 saatlik sonunda 2B kültür aşamasında ortalama 3-8 katlık bir proliferasyon indeksi ölçüldü. Hasta 1'den elde edilen primer kanser hücresi örneklerinde 96. saatin sonunda yaklaşık 3 katlık bir proliferasyon artışı gözlendi. Hasta 2, 3 ve 5'ten elde edilen primer kanser hücresi örneklerinde ise 96. saatin sonunda yaklaşık 4 katlık bir proliferasyon artışı gözlendi. Hasta 7 ve 12'de de 96. saatin sonunda yaklaşık 7 katlık bir proliferasyon artışı olduğu tespit edildi. Son olarak hastaların büyük çoğunluğunu kapsayan yani hasta 4, 6, 8, 9, 10 ve 11'i içinde bulunduran grupta 96. saatin sonunda ortalama 8 katlık bir proliferasyon artışı gözlenmiş oldu (Şekil 30).

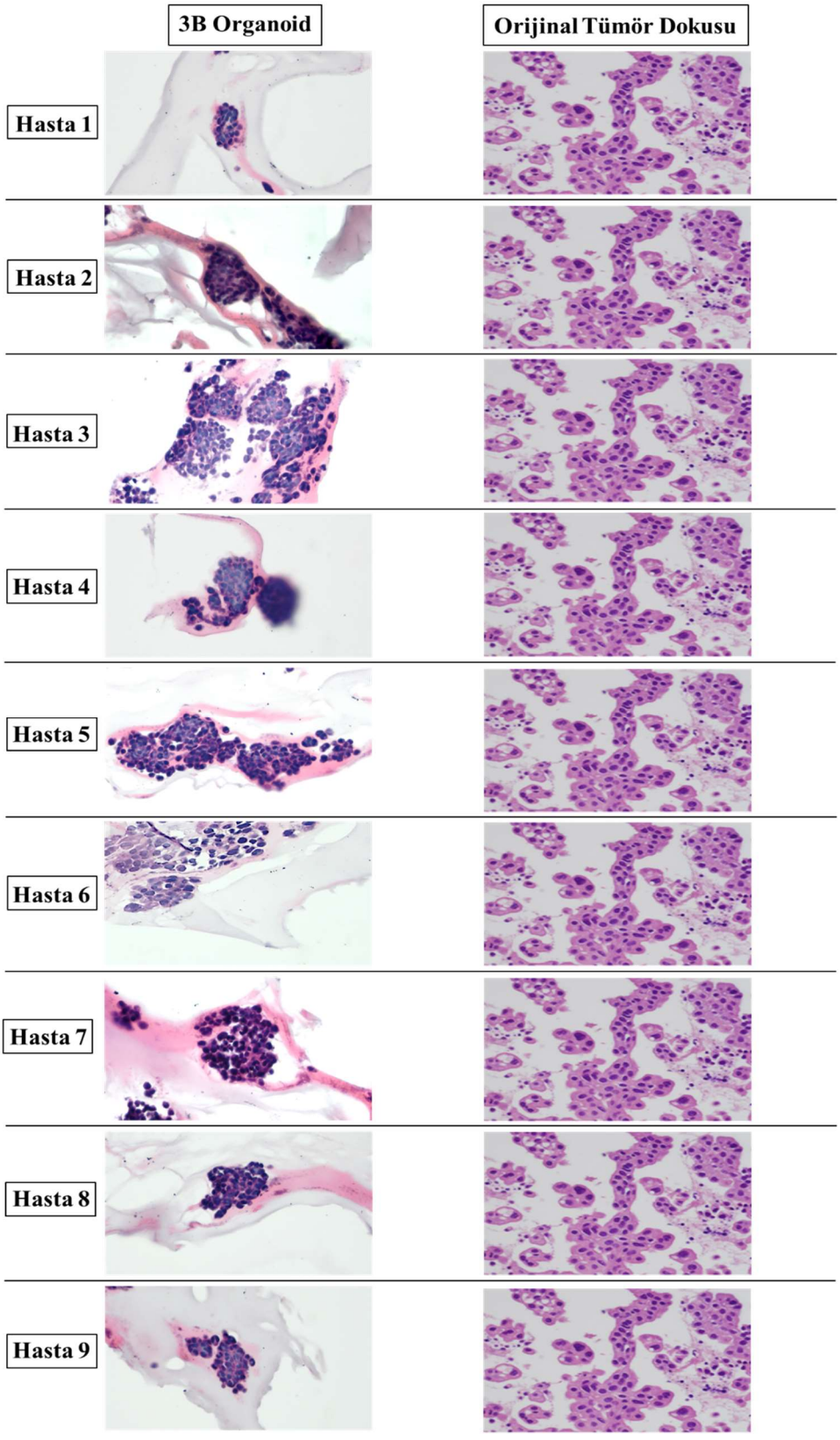


Şekil 30. Hücrelerin proliferasyon kapasitelerinin incelenmesi. Veriler ortalama ±SD (n=3) olarak sunulmuştur.

Bu sonuçlar, ADC ve SCC hastalarından elde edilen hücrelerin, kendini yenileme ve uzun vadeli büyüme potansiyeline sahip hücreler içerdiğini göstermektedir. Aynı zamanda farklı hastalardan elde edilen her primer kültür hücresinin karakteristik olarak tümör büyümesinin, kendini yenileme fonksiyonunun ve kapasitesinin farklılık göstererek kendine özgü proliferasyon periyoduna sahip olduğu belirlenmiştir. Primer kültür hücrelerinin özgün proliferasyon yeteneklerinin tespit edilmesi bundan sonra gerçekleşecek olan ileri analizlere başlamadan önce hücrelerden alınacak sonuçların güvenilirliğini garanti altına almak adına önemli bir karakterizasyon basamağıdır.

4.6. Organoidlerin Histokimya Boyamasıyla Morfolojik ve Histolojik Olarak Karakterize Edilmesi

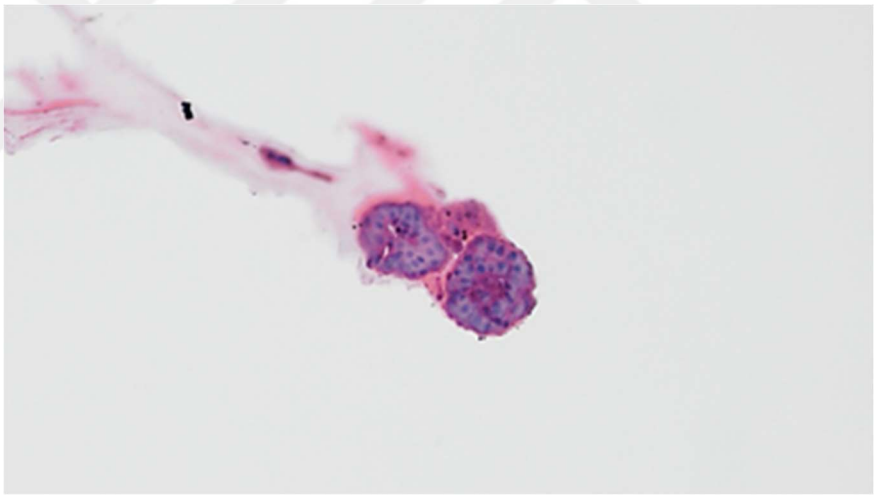
ADC ve SCC hastalarından elde edilen ve kanser hücrelerinden oluşturulan 3B organoid yapılarının proliferasyon yetenekleri incelendi ve periyodik bir büyüme gösterdikleri her bir hastaya özgü olacak şekilde karakterize edildi. Her hastaya ait 3B primer organoid kültüründeki hücrelerin proliferasyon indekslerinin belirlenmesinin yanı sıra her bir hastaya ait elde edilen organoid yapılarının morfolojik olarak da karakterize edilmesi oldukça önemlidir. Böylelikle elde edilen primer kaynaklı akciğer dokularından oluşturulan organoidlerin ilgili ebeveyn dokularının histolojik özelliklerini koruduğunu ve hastaya özel ilaç denemeleri gibi alanlarda kullanım potansiyeline sahip olduğu kanıtlanabilir. Bu sebeple her biri yaklaşık 10 gün süreyle oluşturulan 3B organoid yapıları parafin bloklara gömüldü ve 4 µm kalınlığında seri kesitler alınarak ilgili olduğu hastanın tümör dokusuyla olan benzerliği morfolojik ve histolojik olarak incelenmek üzere H&E boyasıyla boyandı. Boyama görüntüleri incelendiğinde hücre çekirdeklerinin teşhis açısından çok önemli olan ve kanser tipine özgü heterokromatin yoğunlaşma fenotipi gösterdiği teşhis edildi. Kesitler büyük, atipik görünümlü, çoğunlukla hiperkromatik eozinofilik sitoplazma proliferasyonu ve veziküler çekirdekli ve belirgin nükleollü bazı hücreleri ortaya çıkardı. Bu hücrelerin çoğunluğu hiperkromatik çekirdekler sergilerken, bazıları veziküler çekirdekler ve belirgin nükleoller sergilemektedir. Bu hücrelerin bazılarında intrasitoplazmik lümen oluşumu ve birçok tipik-atipik mitoz görüldü. Buna ek olarak ana tümör dokularına benzer şekilde, adenokarsinomdan türetilen organoidlerin asiner veya büyük glandüler desenler ürettiği görüldü. Kanserle ilişkili fibroblastlar (CAF'lar)'ın da bu 3B yapının içerisinde kanserli hücrelerin etrafında düzensiz bir şekilde dağıldığı görülmektedir. Oluşturulan 3B organoid yapıları şekilsel olarak değerlendirildiğinde ise iyi organize olmuş, tek katmanlı, kistik organoidlerden, oldukça düzensiz katı kütlelere oluşturarak çeşitlilik göstermektelerdir (Şekil 31).



Şekil 31. 9 ADC hastasından elde edilen primer kaynaklı akciğer kanseri 3B organoid yapılarının ve orijinal kanser dokularının H&E boyama görüntüleri. Ölçek çubuğu, 40X.

H&E boyama sonuçları bize 9 ADC hastasından elde edilen primer kaynaklı akciğer kanseri 3B organoid yapılarının orijinal tümör dokularına benzer morfolojik özelliklere sahip olduğu, tümörlerin sitolojik özelliklerini ve belirteçlerini koruduğunu gösterdi.

ADC hastalarının tümör dokularından elde edilen organoid yapılarını pozitif bir kontrolle kıyaslamak açısından adenokarsinomik insan alveolar bazal epitel hücresi olduğunu bildiğimiz insan akciğer kanser hücre soyu olan A549 hücrelerini de aynı kültür koşullarından geçirerek aynı süre boyunca 3B kültür ortamında büyütüldü. 3B kültür ortamına alınan adenokarsinomik A549 hücrelerinin meydana getirdiği organid yapıları ~300 µm boyutuna ulaşınca parafin bloklara gömüldü. 4 µm kalınlığında seri kesitler alındı ve H&E boyasıyla boyandı. ADC hastalarının tümör hücreleriyle oluşturulan 3B organoid yapıları A549 hücrelerinin meydana getirdiği organid yapısı ile olan benzerliği morfolojik ve histolojik olarak karşılaştırıldı (Şekil 33).



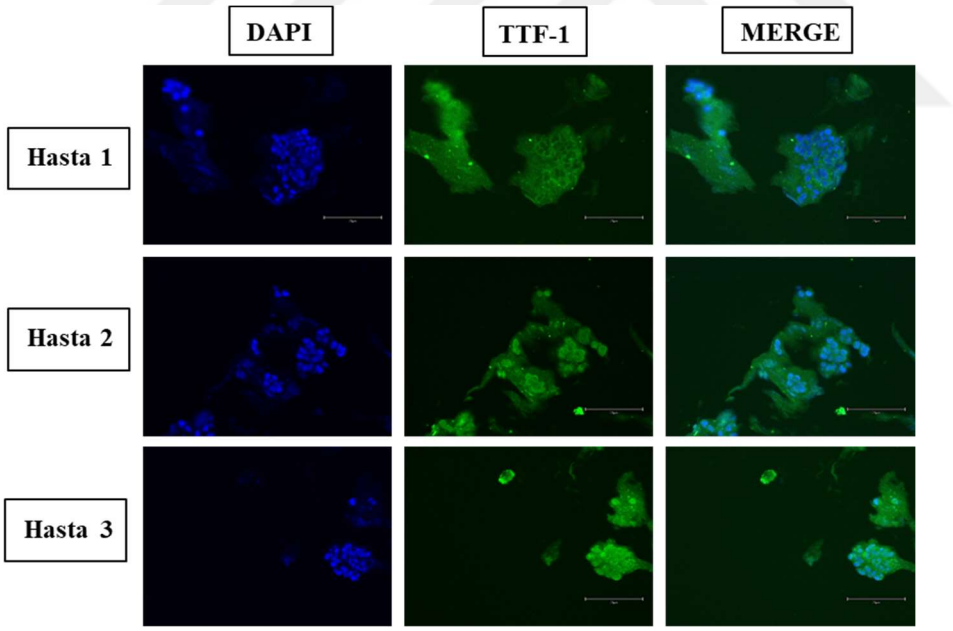
Şekil 33. A549 hücresiyle oluşturulan 3B organoid yapısının H&E boyama görüntüsü. Ölçek çubuğu, 40X.

A549 hücrelerinden oluşturulan 3B organoid yapısının H&E boyamanması sonucunda 9 ADC hastasından elde edilen primer kaynaklı akciğer kanseri 3B organoid yapılarıyla benzer olarak adenokarsinomik karakterle özdeş morfolojik özellikler olan asiner-büyük glandüler hücre yapısı ve belirgin heterokromatin nükleus tespit edildi. Böylece hasta kaynaklı hücrelerin adenokarsinoma yapısı doğrulanmış oldu. Fakat yinede tek başına

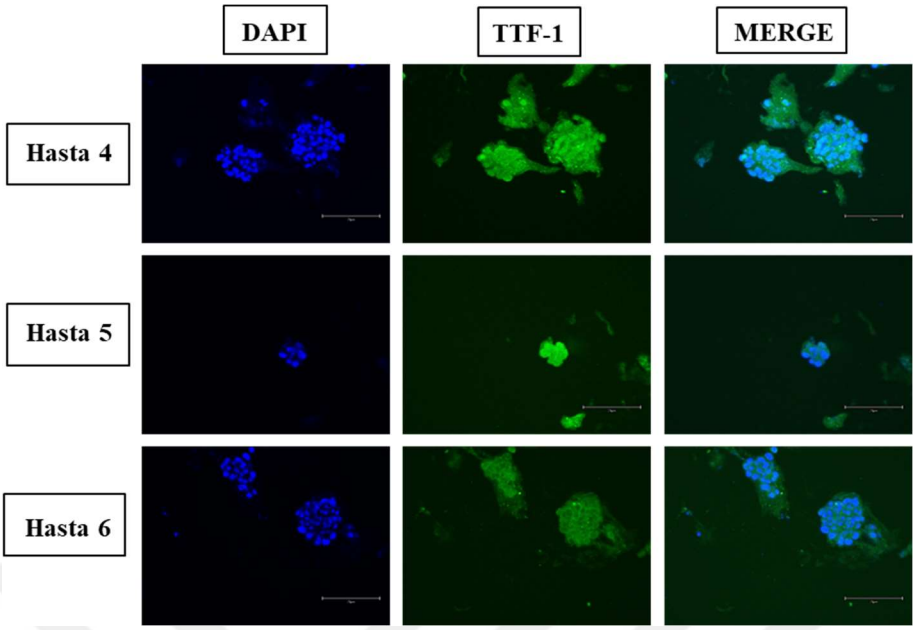
histoloji tüm primer kaynaklı akciğer kanseri 3B organoid örneklerini güvenilir bir şekilde karakterize etmek için yeterli olmayacaktır.

4.7. Akciğer Kanseri Adenokarsinoma Organoidlerinin TTF-1 İmminoflorasan Boyama ile Karakterize Edilmesi

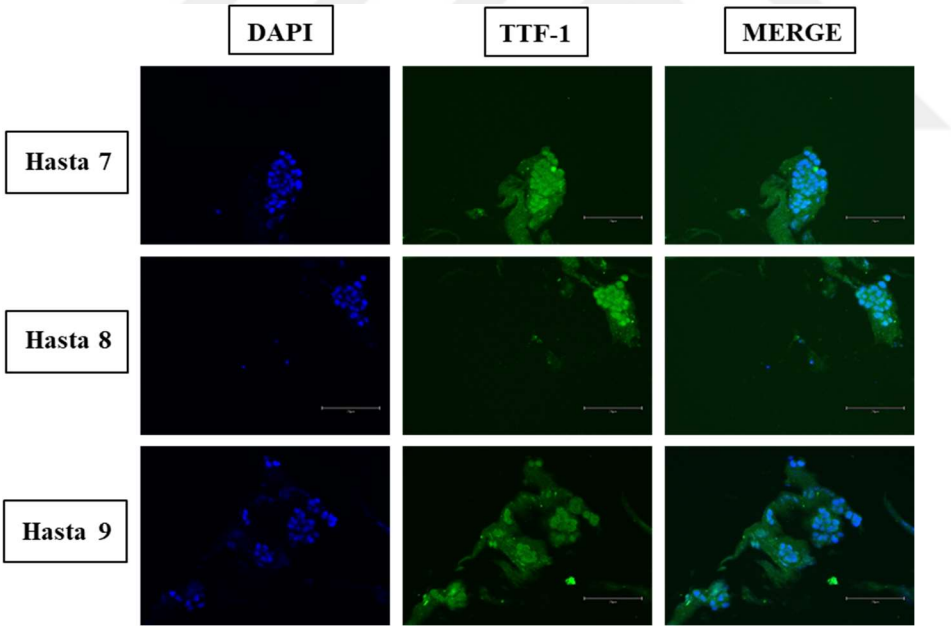
9 ADC hastasından elde edilen primer kaynaklı akciğer kanseri 3B organoid yapılarını yalnıza histomorfolojik özelliklere dayanarak karakterize etmek çok doğru bir yaklaşım olmayacağından ek olarak imminoflorasan boyamayla da bir değerlendirme yapıldı. Organoidlerin adenokarsinom kökenini doğrulayan akciğer tümörü belirteci olarak 3B organoid yapıları TTF-1 antikoru ile boyandı. Çekirdekler ise 15 dakika boyunca DAPI ile boyandı. Primer kaynaklı akciğer kanseri hücrelerinden elde edilen 3B organoid yapılarını hemen hemen hepsi güçlü pozitif TTF-1 boyaması gösterdi. 3B Organoidlerin DAPI boyası ile boyanması sonucunda histokimya boyama sonuçlarıyla benzer olarak veziküler ve belirgin nükleus morfolojisi gözlendi (Şekil 34, 35 ve 36).



Şekil 34. 3 ADC hastasından (Hasta 1-3) elde edilen primer kaynaklı akciğer kanseri 3B organoid yapılarının TTF-1 (Yeşil) İmminoflorasan boyama görüntüleri. Çekirdekler (mavi) DAPI ile boyandı. Ölçek çubuğu, 40X.



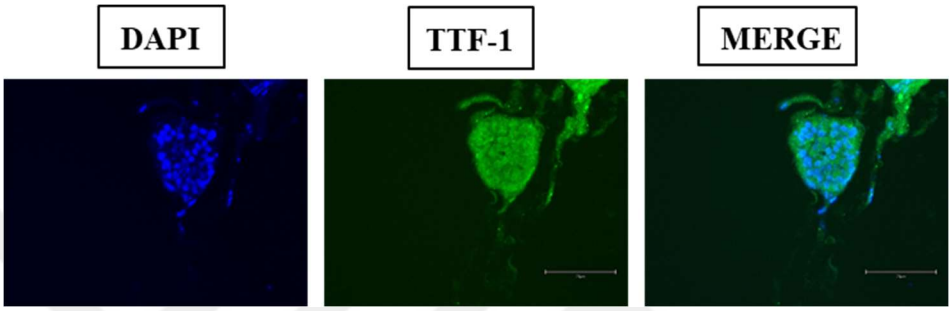
Şekil 35. 3 ADC hastasından (Hasta 4-6) elde edilen primer kaynaklı akciğer kanseri 3B organoid yapılarının TTF-1 (Yeşil) İmminoflorasan boyama görüntüleri. Çekirdekler (mavi) DAPI ile boyandı. Ölçek çubuğu, 40X.



Şekil 36. 3 ADC hastasından (Hasta 7-9) elde edilen primer kaynaklı akciğer kanseri 3B organoid yapılarının TTF-1 (Yeşil) İmminoflorasan boyama görüntüleri. Çekirdekler (mavi) DAPI ile boyandı. Ölçek çubuğu, 40X.

ADC hastalarının tümör dokularından elde edilen organoid yapılarını pozitif bir kontrolle kıyaslamak açısından adenokarsinomik insan alveolar bazal epitel hücresi olduğunu bildiğimiz insan akciğer kanser hücre soyu olan A549 hücrelerini de aynı kültür

koşullarından geçirerek aynı süre boyunca 3B kültür ortamında büyütüldü. A549 hücrelerinden elde edilen 3B organoid yapıları TTF-1 antikoru ile boyandı. Çekirdekler ise 15 dakika boyunca DAPI ile boyandı. TTF-1 antikorunun adenokarsinomik insan alveolar bazal epitel hücresi olduğunu bildiğimiz insan akciğer kanser hücre soyu olan A549 hücrelerinden elde edilen 3B organoid yapılarında da pozitif boyanması insan tümör dokusundan elde edilen ADC 3B organoid yapılarının karakterizasyonunu doğrulamaktadır (Şekil 37).



Şekil 37. A549 hücrelerinden elde edilen 3B organoid yapılarının TTF-1 (Yeşil) İmminoflorasan boyama görüntüleri. Çekirdekler (mavi) DAPI ile boyandı. Ölçek çubuğu, 40X.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Akciğer kanseri tedavisine yönelik çalışmalarda yaşanan zorlukların üstesinden gelmek için yeni stratejiler belirlemek ve klinik öncesi araştırmalarda daha güvenilir sonuçlar elde edebilmek adına iyi optimize edilmiş akciğer kanseri modelleri geliştirmek önemlidir. Bu sebeple standart hücre hatları olan 2B kültürlerin yerine hastaların tümörlerinin karmaşıklığını daha iyi yansıtabilen özelleştirilmiş hücre hatları kullanılmalıdır. (Caponigro & Sellers, 2011; Granat vd., 2019; Zhou vd., 2017). 2B tek katmanlı hücre kültürleri hem basit hem de verimli olmasının yanı sıra düşük maliyet ve zaman gerektiren, yüksek tekrarlanabilirlik potansiyeline sahiptir. Bununla birlikte, bu hücre kültürü modelinin hücreleri ECM olmadan doğal olmayan bir yüzeye yerleşmekte ve bu da *in vivo* mikroçevrenin karmaşıklığının özetlenmesini engellemektedir. Bu durum hücre kültürü çalışmalarında ECM'nin önemini vurgulamaktadır (Ho vd., 2018). Geçtiğimiz on yıllar boyunca, insan fizyolojisini *in vivo* olarak aslına uygun bir şekilde taklit eden yeni *ex vivo* model sistemler kullanılmaya başlanmıştır. Daha doğru modellere duyulan bu ihtiyaç nedeniyle, 3B kültür teknolojileri harika bir alternatif olarak günümüz araştırmalarında oldukça popülerdir. 3B kültürler, *in vivo* yapı ve işlev açısından benzedikleri orijin organa özgü birincil dokunun çoklu hücrelerinden oluşan organoid yapılarıdır (Wang vd., 2020; Xu vd., 2018). 3B yapılar, *in vivo* olarak sergilenen doku organizasyonunu tam olarak özetleme kapasitesinden yoksun olmalarına rağmen, hücre-hücre ve hücre-matris etkileşimlerini 2B kültürlerden çok daha iyi taklit ederek hücre kültürünün birçok avantajını korumaya devam etmektedirler (Bates, 2000; Zhou vd., 2017). 3B tümör organoidleri ile gerçekleştirilen çalışmaların klinik uygulamaya uyarlanabilmesi için saf tümör organoidlerinin güvenilir bir şekilde kurulabilmesi önemlidir (Sachs vd., 2019). Kültüre kazandırılan 3B tümör organoidlerinin orijinal tümör doku morfolojisi ile benzerliği mikroskopik inceleme ile tespit etmek mümkün değildir. Bu nedenle türetilen organoidlerin orijinal tümör dokusu ile benzerliğini belirlemek için ek karakterizasyon analizlerine ihtiyaç vardır (Dijkstra vd., 2020).

Bu tez çalışmasında da KHDAK hastalarından toplanan tümör dokularından oluşturulmuş organoidlerin oluşturulması için gerekli olan primer kültür yönteminin optimizasyonu ve oluşturulan organoid yapılarının, köken aldığı orijinal tümör dokusunun histolojik

özelliklerini koruduğunu göstermek amaçlanmıştır. Bu amaçla histopatolojik olarak tanısı konulan 9'u ADC ve 3'ü SCC olan toplamda 12 KHDAK hastasına ait tümör örneği toplanmıştır. Yapılan çalışmalarda tümör örneklerinin rezeksiyondan hemen sonra soğuk transfer ortamına yerleştirilmesi ve daha sonra mümkün olan en kısa sürede organoid kültürü için işlenmesi gerektiği vurgulanmaktadır. Bildirilen transfer süresi, farklı çalışmalarda 10 dakika ile 72 saat arasında değişmektedir (Pauli vd., 2017; Shi vd., 2020). Bu tez çalışmasında kullanılan tümör örneklerinin transferinden en geç 24 saat sonra bile canlı hücreler elde edilebilmiştir. Organoid kültürünün başarısı aktif kanser hücrelerinin miktarına bağlıdır. Daha fazla kanser hücresinin toplandığı ve dolayısıyla organoid oluşumunda daha yüksek başarı oranının olduğu cerrahi olarak rezeke edilen örnekler en sık kullanılan örnek kaynağıdır (Cattaneo vd., 2020; Dijkstra vd., 2020; Kim vd., 2021; Li vd., 2020; Ma vd., 2021; Sachs vd., 2019; Sándor vd., 2021; Yokota, 2021). Birçok araştırmacı organoidlerin türetilmesi için genellikle 1 cm^3'ten 4 cm^3'e kadar tümör örneklerine ihtiyaç olduğunu ve ince iğne biyopsisi ile elde edilmesinin neredeyse imkânsız olduğunu bildirmektedir (Chen vd., 2020; Kim vd., 2019; Li vd., 2020). Biyopsi örnekleri olmasına rağmen, 0.2 cm^3'ten 0,3 cm^3'e kadar tümör örnek büyüklüğü, bazı akciğer kanseri organoid çalışmalarında kullanılmıştır (Cattaneo vd., 2020; Dijkstra vd., 2018; Pauli vd., 2017; Sachs vd., 2019). Bu bağlamda Tıbbi Onkoloji Anabilim Dalından temin edilen rezekte edilmiş 1 cm^3-4 cm^3 aralığındaki akciğer kanseri tümör dokuları tez çalışmasına dahil edilmiştir.

Yapılan primer organoid kültür çalışmalarında dokuların önce bistüri, neşter veya bıçakla mümkün olduğunca ince doku parçacıklarına fiziksel olarak parçalanması gerektiği görülmektedir. Bu uygulamanın enzimler ve dokular arasındaki temas yüzeyini artırarak daha kısa sürede daha verimli ve tam sindirime yol açacağı Ma ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (Ma vd., 2022). Enzimatik sindirim, yayınlanmış çalışmalarda en yaygın kullanılan yöntem olmakla birlikte çoğunlukla mekanik işlemeyle beraber kullanılmaktadır (Hu vd., 2021). Bu nedenle özellikle uygun sindirim kokteyli önemlidir. Tümör dokularında, kanser hücreleri ECM ve hücre-hücre bağlantıları tarafından bir arada tutulur (Frantz vd., 2010; Schneeberger & Lynch, 1992). ECM'nin sindirilmesi, katı dokularda hücre ayrışması sırasında birincil amaçtır. ECM enzimleri arasında kollajenaz, nötr proteazlar (Dispas ve Termolizin) ve elastaz hyaluronidaz (HAaz) bulunur (Reichard

& Asosingh, 2019). Birçok araştırmacı primer organoid kültür çalışmalarında kollojenaz-hiyalüronidaz (Dijkstra vd., 2018; Ma vd., 2021), kollojenaz-dispase (Cattaneo vd., 2020; Dijkstra vd., 2020; Finnberg vd., 2017) veya kollojenaz-triple ekspress (Li vd., 2020) gibi sindirim enzimlerini beraber kullanarak kombine etkisinden faydalanmıştır. Kollajenaz, ECM'de en bol bulunan lifli protein olan kollajenlerde bulunan peptit bağlarını kırarak hücrelerin serbest kalmasına yardımcı olur (Cavanagh vd., 1997). Dispase ise hücre-hücre bağlantılarını etkilemeden hücreler ve ECM arasındaki ekleri parçalamak için yaygın olarak kullanılır (Rao & Zaidel-Bar, 2016). Bu nedenle, kollajenaz ve dispase kombinasyonu akciğer kanseri organoid çalışmalarında birçok araştırmacı tarafından yaygın olarak benimsenmiştir (Cattaneo vd., 2020; Chen vd., 2020; Dijkstra vd., 2020; Finnberg vd., 2017; Jung vd., 2019; Kim vd., 2019). Cattaneo ve arkadaşlarının 2020 yılında gerçekleştirmiş oldukları bir çalışmada sindirim sonrası tümörlerden ayrışmış ortalama %70 tek hücre ve %30 küme hücrelerin bir karışımını ideal olarak nitelendirmektelerdir. Toplam sindirim süresini ise cerrahi rezeksiyonlar için 45-60 dk arasında değiştiği bildirmişlerdir (Cattaneo vd., 2020). Bu bilgiler ışığında tez konusunun ilk hedefi olan primer organoid kültürü yöntemi optimizasyonunun ilk basamağı olarak elde ettiğimiz tümör dokuları 22 nolu bistüri yardımıyla 1-2mm^3 boyutunda mekanik olarak parçalandı. Mekanik parçalanmayı takiben kollajenler de bulunan peptit bağlarını ve hücre-ECM arasındaki ekleri parçalamak için 1xPBS içerisinde Tip II Kollojenaz, Tip II Dispaz, Penisilin-Streptomisin ve Y-27632 içeren bir enzim çözeltisi kullanıldı (Çizelge 2). Y-27632 burada doku ayrışması sırasında meydana gelebilecek hücresel stres kaynaklı apoptozisi inhibe etmekle görevlidir. Doku boyutuna bağlı olarak bu sindirim kokteyli ortalama 30-60 dakikalık zaman dilimlerinde tümör dokusu örneklerini tek hücre haline getirdi. Sindirim sonrası tümörlerden ayrışmış ortalama tek hücre ve küme hücrelerin oranı tripan mavisi yöntemi aracılığıyla mikroskop altında incelenerek Cattaneo ve arkadaşlarının ideal bulduğu tek hücre ve küme hücre oranında olduğu gözlendi (Cattaneo vd., 2020). Tripan mavisi boyaması sonuçları incelendiğinde tüm hasta örneklerinde yapılan enzimatik parçalama performansının ≥%90'ın üzerinde hücre canlılığı ile başarılı bir şekilde sonuçlandığı sonucuna varılmıştır.

3B kültür sistemi, ECM'nin yerini alan hidrojel türevi veya diğer bazal membran ekstraktından ve kök hücre nişini taklit eden özel kültür ortamından oluşmaktadır. ECM,

yalnızca hücrelerin büyümesi için bir iskele görevi görmekle kalmayarak aynı zamanda hücre sinyallerinin difüzyon aralığını ve erişilebilirliğini sınırlayıp doku polaritesi ve yapısı için bir modülatör görevi görmektedir (Lu vd., 2012). Bu tez çalışmasında da hücre kültürünün bakım kolaylığı, organoid boyutunu kontrol etme olanağı ve plaka başına çok miktarda organoid elde etme gibi bazı avantajları sayesinde bir hidrojel olan geltrex kullanıldı ve arzu edilen boyutta organoidler elde edildi. 3B primer kültür çalışmalarında bir diğer önemli unsur ise kullanılan büyüme besiyeri ve içeriğidir. Akciğer kanseri organoid kültürlerine özgü tüm araştırmacılar tarafından kabul edilen spesifik bir kültür ortamı formülü bulunmamaktadır ve farklı laboratuvarlarda kullanılan farklı büyüme faktörü kokteylleri bulunmaktadır (Cattaneo vd., 2020; Dijkstra vd., 2018, 2020; Finnberg vd., 2017; S. R. Kim vd., 2021; Y. F. Li vd., 2020; Pauli vd., 2017; Sachs vd., 2019; Sándor vd., 2021; T. Yokota, 2021). Akciğer kanseri 3B kültür ortamlarında bulunan sitokinlerin ve küçük moleküllerin işlevini ve mekanizmasını bilmek, akciğer kanser primer 3B organoid kültürlerinin optimizasyonu için çok önemlidir. Çizelge 4'te verilen kültür bileşenlerinin optimize edilmiş son konsantrasyon aralıkları kullanılarak 10. günün sonunda fibroblast eliminasyonu gerçekleştirilmiş başarılı akciğer kanseri primer kaynaklı 3B organoid kültürleri elde edildi.

Akciğer kanseri primer organoid çalışmalarından elde edilecek olan bulguların güvenilirliği ve geçerliliği için organoidlerin karakterize edilerek tanımlanması oldukça önemlidir. Histomorfolojinin ve tümöre özgü belirteçlerin belirlenmesi, organoidlerin ayırt edilmesi için yaygın olarak kullanılan yaklaşımlardır (Dijkstra vd., 2020; Hu vd., 2021). Hematoksilen ve eozin boyaması, oluşturulan organoidlerin ana yapısını ve hücrelerin morfolojisini ortaya çıkarmaya yardımcı olurken aynı zamanda orijinal tümör dokusuyla da olan benzerliği kıyaslamak için alternatif bir yoldur. Çoğu akciğer kanseri primer kültür organoidleri düzensiz katı yapılar olarak büyümektedir ve tümör hücreleri genellikle hücre boyutu, nükleer şekil ve polaritede hücreler arası varyasyona sahiptir (Dijkstra vd., 2020; Z. Li vd., 2020; R. Shi vd., 2020). Bu tez çalışmasında yapılan H&E boyaması sonucunda görüntüler incelendiğinde, literatürde bahsedilen histolojik karakterlerle benzer şekilde elde edilen ADC 3B organoidlerinin hücre çekirdeklerinde kanser tipine özgü heterokromatin yoğunlaşma gözlendi. Bu hücrelerin çoğunluğu hiperkromatik çekirdekler sergilerken, bazıları veziküler çekirdekler ve belirgin nükleus

morfolojisi sergilemektedir. Bu hücrelerin bazılarında intrasitoplazmik lümen oluşumu ve birçok tipik-atipik mitoz görüldü. Buna ek olarak ana tümör dokularına benzer şekilde, adenokarsinomdan türetilen organoidlerin asiner veya büyük glandüler desenler ürettiği görüldü. CAF'ların da bu 3B yapının içerisinde kanserli hücrelerin etrafında düzensiz bir şekilde dağıldığı görülmektedir. Oluşturulan 3B organoid yapıları şekilsel olarak değerlendirildiğinde ise iyi organize olmuş, tek katmanlı, kistik organoidlerden, oldukça düzensiz katı kütlelere oluşturarak çeşitlilik göstermektedir.

Akciğer kanseri organoidlerinin histolojik yapılarının immünoflorasan belirteçler ile tespiti, organoidlerin karakterize edilerek tanımlanması kolaylaştırmaktadır. TTF-1 Akciğer kanseri ADC organoidlerinin tanımlanması için en çok kullanılan belirteçtir. TTF-1 SCC hastalarında negatif boyanma göstererek ADC'lerin SCC'lerden ayırt edilmesinde patologlar tarafından sıkça kullanılmaktadır. Bu nedenle, organoid kültür çalışmalarında TTF-1 belirteci genellikle akciğer kanseri primer organoidlerin ana tümör dokuları arasındaki histolojik tiplerini yani ADC ve SCC tiplerini ayırt etmek ve tespit etmek için kullanılır (Dijkstra vd., 2020; Mazzocchi vd., 2019; R. Shi vd., 2020). Bu tez çalışmasında 9 ADC hastasından elde edilen primer kaynaklı akciğer kanseri 3B organoid yapılarını yalnıza histomorfolojik özelliklere dayanarak karakterize etmek çok doğru bir yaklaşım olmayacağından, TTF-1 belirteci kullanarak imminoflorasan boyama aracılığıyla da histolojik tipleme tespit edildi. Elde edilen mikroskobi görüntülerinin değerlendirilmesi sonucunda primer kaynaklı akciğer kanseri hücrelerinden elde edilen 3B organoid yapılarını hemen hemen hepsi güçlü pozitif TTF-1 boyaması gösterdi.

Bu tez çalışması akciğer kanseri primer kültür yöntemi optimizasyonu sonucu elde edilen 3B adenokarsinoma ve skuamöz hücreli karsinoma yapılarının proliferasyon kapasitelerinin tespit edilmesi, H&E boyamasıyla organoid yapılarının morfolojik ve histolojik olarak orijinal tümör dokusuyla benzerliğinin değerlendirilmesi ve ADC belirteci olarak kullanılan TTF-1'in imminoflorasan boyama yöntemiyle akciğer ADC hücrelerinin varlığını göstermesi bulgularını içermektedir. Yapılan analizler elde edilen her primer kültür akciğer kanseri hücresine ait proliferasyon indeksi, kendini yenileme ve uzun vadeli büyüme potansiyelini ortaya çıkarmıştır. Aynı zamanda farklı hastalardan elde edilen her primer kültür hücresinin karakteristik olarak tümör büyümesinin, kendini

yenileme fonksiyonunun ve kapasitesinin farklılık göstererek kendine özgü proliferasyon periyoduna sahip olduğu belirlenmiştir. Primer kültür hücrelerinin özgün proliferasyon yeteneklerinin tespit edilmesi bundan sonra gerçekleşecek olan ileri analizlere başlamadan önce hücrelerden alınacak sonuçların güvenilirliğini garanti altına almak adına önemli bir karakterizasyon basamağını oluşturmuştur. H&E boyamasıyla organoid yapılarının morfolojik ve histolojik olarak orijinal tümör dokusuyla benzerliğinin değerlendirilmesi sonucunda ise ebeveyn kanser dokularına benzer şekilde, adenokarsinom kanserine sahip hastalardan türetilen akciğer kanseri organoidlerinin, asiner veya büyük glandüler modeller oluşturduğu ve nükleer membran düzensizliğine sahip hiperkromatik çekirdeklere sahip olduğu görüldü. Organoidlerin adenokarsinom kökenini doğrulayan akciğer tümörü belirteci TTF-1'in ADC hastalarının hücrelerinden türetilen organoidlerin hepsinde yüksek oranda pozitif boyama verdiği florasan mikroskobi görüntüleri ile değerlendirildi. Tüm bu karakterizasyon basamakları sonucunda 3B tümör hücrelerinin sitolojik özelliklerinin sabit kaldığı ve TTF-1 adenokarsinoma belirtecinin tutarlı bir şekilde korunduğu tespit edildi.

KAYNAKLAR

Aggarwal, B. B., Danda, D., Gupta, S., & Gehlot, P. (2009). Models for prevention and treatment of cancer: Problems vs promises. *Biochemical Pharmacology*, *78*(9), 1083-1094. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.05.027

Amann, A., Zwierzina, M., Gamerith, G., Bitsche, M., Huber, J. M., Vogel, G. F., Blumer, M., Koeck, S., Pechriggl, E. J., Kelm, J. M., Hilbe, W., & Zwierzina, H. (2014). Development of an Innovative 3D Cell Culture System to Study Tumour - Stroma Interactions in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *PLoS ONE*, *9*(3), e92511. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092511

Anagnostou, V. K., Syrigos, K. N., Bepler, G., Homer, R. J., & Rimm, D. L. (2009). Thyroid Transcription Factor 1 Is an Independent Prognostic Factor for Patients With Stage I Lung Adenocarcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, *27*(2), 271-278. https://doi.org/10.1200/JCO.2008.17.0043

Antoni, D., Burckel, H., Josset, E., & Noel, G. (2015). Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough in Vivo. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(12), 5517-5527. https://doi.org/10.3390/ijms16035517

Ao, M.-H., Zhang, H., Sakowski, L., Sharma, R., Illei, P. B., Gabrielson, E., Askin, F., & Li, Q. K. (2014). The utility of a novel triple marker (combination of TTF1, napsin A, and p40) in the subclassification of non–small cell lung cancer. *Human Pathology*, *45*(5), 926-934. https://doi.org/10.1016/j.humpath.2014.01.005

Arcaro, A. (2015). Targeted therapies for small cell lung cancer: Where do we stand? *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *95*(2), 154-164. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.03.001

Aung, H. H., Sivakumar, A., Gholami, S. K., Venkateswaran, S. P., Gorain, B., & Shadab. (2019). An Overview of the Anatomy and Physiology of the Lung. Içinde *Nanotechnology-Based Targeted Drug Delivery Systems for Lung Cancer* (ss. 1-20). Elsevier. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815720-6.00001-0

Baker, B. M., & Chen, C. S. (2012). Deconstructing the third dimension – how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *Journal of Cell Science*. https://doi.org/10.1242/jcs.079509

Banda, M., McKim, K. L., Myers, M. B., Inoue, M., & Parsons, B. L. (2020). Outgrowth of erlotinib-resistant subpopulations recapitulated in patient-derived lung tumor spheroids and organoids. *PLOS ONE*, *15*(9), e0238862. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238862

Barnard, W. G. (1926). The nature of the "oat-celled sarcoma" of the mediastinum. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, *29*(3), 241-244. https://doi.org/10.1002/path.1700290304

Bates, R. (2000). Spheroids and cell survival. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *36*(2-3), 61-74. https://doi.org/10.1016/S1040-8428(00)00077-9

Beltrami, C. A., Fabris, G., Marzola, A., Nenci, I., Lanza, G. B., & Vezzadini, P. (1975). Staining of gastrin cells with lead-Haematoxylin. *The Histochemical Journal*, *7*(1), 95-99. https://doi.org/10.1007/BF01004837

Benya, P. (1982). Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*, *30*(1), 215-224. https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90027-7

Berghmans, T., Paesmans, M., Mascaux, C., Martin, B., Meert, A.-P., Haller, A., Lafitte, J.-J., & Sculier, J.-P. (2006). Thyroid transcription factor 1—a new prognostic factor in lung cancer: a meta-analysis. *Annals of Oncology*, *17*(11), 1673-1676. https://doi.org/10.1093/annonc/mdl287

Berthiaume, F., Moghe, P. V., Toner, M., & Yarmush, M. L. (1996). Effect of extracellular matrix topology on cell structure, function, and physiological responsiveness: hepatocytes cultured in a sandwich configuration. *The FASEB Journal*, *10*(13), 1471-1484. https://doi.org/10.1096/fasebj.10.13.8940293

Białkowska, K., Komorowski, P., Bryszewska, M., & Miłowska, K. (2020). Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures—Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(17), 6225. https://doi.org/10.3390/ijms21176225

Bingle, C. D. (1997). Thyroid transcription factor-1. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *29*(12), 1471-1473. https://doi.org/10.1016/S1357-2725(97)00007-1

Birgersdotter, A., Sandberg, R., & Ernberg, I. (2005). Gene expression perturbation in vitro—A growing case for three-dimensional (3D) culture systems. *Seminars in Cancer Biology*, *15*(5), 405-412. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2005.06.009

Bishop, J. A., Sharma, R., & Illei, P. B. (2010). Napsin A and thyroid transcription factor-1 expression in carcinomas of the lung, breast, pancreas, colon, kidney, thyroid, and malignant mesothelioma. *Human Pathology*, *41*(1), 20-25. https://doi.org/10.1016/j.humpath.2009.06.014

Bishop, J. A., Teruya-Feldstein, J., Westra, W. H., Pelosi, G., Travis, W. D., & Rekhtman, N. (2012). p40 (ΔNp63) is superior to p63 for the diagnosis of pulmonary squamous cell carcinoma. *Modern Pathology*, *25*(3), 405-415. https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.173

Bissell, M. J., Rizki, A., & Mian, I. S. (2003). Tissue architecture: the ultimate regulator of breast epithelial function. *Current Opinion in Cell Biology*, *15*(6), 753-762. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2003.10.016

Blobel, G. A., Moll, R., Franke, W. W., & Vogt-Moykopf, I. (1984). Cytokeratins in normal lung and lung carcinomas. *Virchows Archiv B Cell Pathology Including Molecular Pathology*, *45*(1), 407-429. https://doi.org/10.1007/BF02889883

Boj, S. F., Hwang, C.-I., Baker, L. A., Chio, I. I. C., Engle, D. D., Corbo, V., Jager, M., Ponz-Sarvise, M., Tiriac, H., Spector, M. S., Gracanin, A., Oni, T., Yu, K. H., van Boxtel, R., Huch, M., Rivera, K. D., Wilson, J. P., Feigin, M. E., Öhlund, D., … Tuveson, D. A. (2015). Organoid Models of Human and Mouse Ductal Pancreatic Cancer. *Cell*, *160*(1-2), 324-338. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.021

Bolte, C., Whitsett, J. A., Kalin, T. V., & Kalinichenko, V. V. (2018). *Transcription Factors Regulating Embryonic Development of Pulmonary Vasculature* (ss. 1-20). https://doi.org/10.1007/978-3-319-68483-3_1

Boutwell, R. K. (1964). *Some Biological Aspects of Skin Carcinogenesis** (ss. 207-250). https://doi.org/10.1159/000385978

Brasch, F., Ochs, M., Kähne, T., Guttentag, S., Schauer-Vukasinovic, V., Derrick, M., Johnen, G., Kapp, N., Müller, K.-M., Richter, J., Giller, T., Hawgood, S., & Bühling, F. (2003). Involvement of Napsin A in the C- and N-terminal Processing of Surfactant Protein B in Type-II Pneumocytes of the Human Lung. *Journal of*

Biological Chemistry, *278*(49), 49006-49014. https://doi.org/10.1074/jbc.M306844200

Broutier, L., Mastrogiovanni, G., Verstegen, M. M., Francies, H. E., Gavarró, L. M., Bradshaw, C. R., Allen, G. E., Arnes-Benito, R., Sidorova, O., Gaspersz, M. P., Georgakopoulos, N., Koo, B.-K., Dietmann, S., Davies, S. E., Praseedom, R. K., Lieshout, R., IJzermans, J. N. M., Wigmore, S. J., Saeb-Parsy, K., … Huch, M. (2017). Human primary liver cancer–derived organoid cultures for disease modeling and drug screening. *Nature Medicine*, *23*(12), 1424-1435. https://doi.org/10.1038/nm.4438

Buchholz, D. E., Pennington, B. O., Croze, R. H., Hinman, C. R., Coffey, P. J., & Clegg, D. O. (2013). Rapid and Efficient Directed Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells Into Retinal Pigmented Epithelium. *Stem Cells Translational Medicine*, *2*(5), 384-393. https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0163

Caponigro, G., & Sellers, W. R. (2011). Advances in the preclinical testing of cancer therapeutic hypotheses. *Nature Reviews Drug Discovery*, *10*(3), 179-187. https://doi.org/10.1038/nrd3385

Cattaneo, C. M., Dijkstra, K. K., Fanchi, L. F., Kelderman, S., Kaing, S., van Rooij, N., van den Brink, S., Schumacher, T. N., & Voest, E. E. (2020). Tumor organoid–T-cell coculture systems. *Nature Protocols*, *15*(1), 15-39. https://doi.org/10.1038/s41596-019-0232-9

Cavanagh, T. J., Lakey, J. R. T., Wright, M. J., Fetterhoff, T., & Wile, K. (1997). Crude collagenase loses islet-isolating efficacy regardless of storage conditions. *Transplantation Proceedings*, *29*(4), 1942-1944. https://doi.org/10.1016/S0041-1345(97)00291-1

Chaturvedi, G., Simone, P. D., Ain, R., Soares, M. J., & Wolfe, M. W. (2009). Noggin maintains pluripotency of human embryonic stem cells grown on Matrigel. *Cell Proliferation*, *42*(4), 425-433. https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2009.00616.x

Chen, G., Hou, Z., Gulbranson, D. R., & Thomson, J. A. (2010). Actin-Myosin Contractility Is Responsible for the Reduced Viability of Dissociated Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, *7*(2), 240-248. https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.06.017

Chen, J., Chu, X., Zhang, J., Nie, Q., Tang, W., Su, J., Yan, H., Zheng, H., Chen, Z., Chen, X., Song, M., Yi, X., Li, P., Guan, Y., Li, G., Deng, C., Rosell, R., Wu, Y., & Zhong, W. (2020). Genomic characteristics and drug screening among organoids derived from <scp>non-small cell</scp> lung cancer patients. *Thoracic Cancer*, *11*(8), 2279-2290. https://doi.org/10.1111/1759-7714.13542

Chen, J., Zhao, Q., Xu, S., Liu, J., Li, Y., Fan, Y., Shi, T., Wei, S., Tang, S.-C., & Liu, H. (2015). Thyroid transcription factor-1 expression is significantly associated with mutations in exon 21 of the epidermal growth factor receptor gene in Chinese patients with lung adenocarcinoma. *OncoTargets and Therapy*, 2469. https://doi.org/10.2147/OTT.S90602

Chu, P. G., & Weiss, L. M. (2002). Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology*, *40*(5), 403-439. https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.2002.01387.x

Chu, P., Wu, E., & Weiss, L. M. (2000). Cytokeratin 7 and Cytokeratin 20 Expression in Epithelial Neoplasms: A Survey of 435 Cases. *Modern Pathology*, *13*(9), 962-972. https://doi.org/10.1038/modpathol.3880175

Collisson, E. A., Campbell, J. D., Brooks, A. N., Berger, A. H., Lee, W., Chmielecki, J., Beer, D. G., Cope, L., Creighton, C. J., Danilova, L., Ding, L., Getz, G., Hammerman, P. S., Hayes, D. N., Hernandez, B., Herman, J. G., Heymach, J. V., Jurisica, I., Kucherlapati, R., … Cheney, R. (2014). Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma: The cancer genome atlas research network. *Nature*, *511*(7511), 543-550. https://doi.org/10.1038/nature13385

Davidson, M. R., Gazdar, A. F., & Clarke, B. E. (2013). The pivotal role of pathology in the management of lung cancer. Içinde *Journal of Thoracic Disease* (C. 5, Sayı SUPPL.5). Pioneer Bioscience Publishing. https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2013.08.43

Debnath, J., & Brugge, J. S. (2005). Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nature Reviews Cancer*, *5*(9), 675-688. https://doi.org/10.1038/nrc1695

Debus, E., Moll, R., Franke, W. W., Weber, K., & Osborn, M. (1984). *Immunohistochemical Distinction of Human Carcinomas by Cytokeratin Typing With Monoclonal Antibodies*.

deFelice, M., Silberschmidt, D., DiLauro, R., Xu, Y., Wert, S. E., Weaver, T. E., Bachurski, C. J., Clark, J. C., & Whitsett, J. A. (2003). TTF-1 Phosphorylation Is Required for Peripheral Lung Morphogenesis, Perinatal Survival, and Tissue-specific Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(37), 35574-35583. https://doi.org/10.1074/jbc.M304885200

Dekhuijzen, P. N. R. (2004). Antioxidant properties of N-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal*, *23*(4), 629-636. https://doi.org/10.1183/09031936.04.00016804

Dela Cruz, C. S., Tanoue, L. T., & Matthay, R. A. (2011). Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clinics in Chest Medicine*, *32*(4), 605-644. https://doi.org/10.1016/j.ccm.2011.09.001

DePianto, D., Kerns, M. L., Dlugosz, A. A., & Coulombe, P. A. (2010). Keratin 17 promotes epithelial proliferation and tumor growth by polarizing the immune response in skin. *Nature Genetics*, *42*(10), 910-914. https://doi.org/10.1038/ng.665

Devi, P. U. (2004). Basics of carcinogenesis. *Health Adm*, *17*(1), 16-24.

Di Loreto, C., Di Lauro, V., Puglisi, F., Damante, G., Fabbro, D., & Beltrami, C. A. (1997). Immunocytochemical expression of tissue specific transcription factor-1 in lung carcinoma. *Journal of Clinical Pathology*, *50*(1), 30-32. https://doi.org/10.1136/jcp.50.1.30

Dijkstra, K. K., Cattaneo, C. M., Weeber, F., Chalabi, M., van de Haar, J., Fanchi, L. F., Slagter, M., van der Velden, D. L., Kaing, S., Kelderman, S., van Rooij, N., van Leerdam, M. E., Depla, A., Smit, E. F., Hartemink, K. J., de Groot, R., Wolkers, M. C., Sachs, N., Snaebjornsson, P., … Voest, E. E. (2018). Generation of Tumor-Reactive T Cells by Co-culture of Peripheral Blood Lymphocytes and Tumor Organoids. *Cell*, *174*(6), 1586-1598.e12. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.009

Dijkstra, K. K., Monkhorst, K., Schipper, L. J., Hartemink, K. J., Smit, E. F., Kaing, S., de Groot, R., Wolkers, M. C., Clevers, H., Cuppen, E., & Voest, E. E. (2020). Challenges in Establishing Pure Lung Cancer Organoids Limit Their Utility for Personalized Medicine. *Cell Reports*, *31*(5), 107588. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107588

Ding, Z., Wu, C.-J., Chu, G. C., Xiao, Y., Ho, D., Zhang, J., Perry, S. R., Labrot, E. S., Wu, X., Lis, R., Hoshida, Y., Hiller, D., Hu, B., Jiang, S., Zheng, H., Stegh, A. H., Scott, K. L., Signoretti, S., Bardeesy, N., … DePinho, R. A. (2011). SMAD4-dependent barrier constrains prostate cancer growth and metastatic progression. *Nature*, *470*(7333), 269-273. https://doi.org/10.1038/nature09677

Dong, X., Guan, J., English, J. C., Flint, J., Yee, J., Evans, K., Murray, N., MacAulay, C., Ng, R. T., Gout, P. W., Lam, W. L., Laskin, J., Ling, V., Lam, S., & Wang, Y. (2010). Patient-Derived First Generation Xenografts of Non–Small Cell Lung Cancers: Promising Tools for Predicting Drug Responses for Personalized Chemotherapy. *Clinical Cancer Research*, *16*(5), 1442-1451. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2878

DOWNEY, P., CUMMINS, R., MORAN, M., & GULMANN, C. (2008). If it's not CK5/6 positive, TTF-1 negative it's not a squamous cell carcinoma of lung . *APMIS*, *116*(6), 526-529. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2008.00932.x

Drost, J., & Clevers, H. (2018). Organoids in cancer research. *Nature Reviews Cancer*, *18*(7), 407-418. https://doi.org/10.1038/s41568-018-0007-6

Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., & Discher, D. E. (2006). Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell*, *126*(4), 677-689. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.044

Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*, *149*(4), 778-789. https://doi.org/10.1002/ijc.33588

Finnberg, N. K., Gokare, P., Lev, A., Grivennikov, S. I., MacFarlane, A. W., Campbell, K. S., Winters, R. M., Kaputa, K., Farma, J. M., Abbas, A. E.-S., Grasso, L., Nicolaides, N. C., & El-Deiry, W. S. (2017). Application of 3D tumoroid systems to define immune and cytotoxic therapeutic responses based on tumoroid and tissue slice culture molecular signatures. *Oncotarget*, *8*(40), 66747-66757. https://doi.org/10.18632/oncotarget.19965

Fischbach, C., Chen, R., Matsumoto, T., Schmelzle, T., Brugge, J. S., Polverini, P. J., & Mooney, D. J. (2007). Engineering tumors with 3D scaffolds. *Nature Methods*, *4*(10), 855-860. https://doi.org/10.1038/nmeth1085

Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J., & Zeller, R. (2008). Hematoxylin and Eosin Staining of Tissue and Cell Sections. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2008*(5), pdb.prot4986. https://doi.org/10.1101/pdb.prot4986

Foty, R. (2011). A Simple Hanging Drop Cell Culture Protocol for Generation of 3D Spheroids. *Journal of Visualized Experiments*, *51*. https://doi.org/10.3791/2720

Frantz, C., Stewart, K. M., & Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science*, *123*(24), 4195-4200. https://doi.org/10.1242/jcs.023820

Frieboes, H. B., Zheng, X., Sun, C.-H., Tromberg, B., Gatenby, R., & Cristini, V. (2006). An Integrated Computational/Experimental Model of Tumor Invasion. *Cancer Research*, *66*(3), 1597-1604. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3166

Fuchs, E., Tumbar, T., & Guasch, G. (2004). Socializing with the Neighbors. *Cell*, *116*(6), 769-778. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00255-7

Fujii, M., Matano, M., Nanki, K., & Sato, T. (2015). Efficient genetic engineering of human intestinal organoids using electroporation. *Nature Protocols*, *10*(10), 1474-1485. https://doi.org/10.1038/nprot.2015.088

Fujimoto, J., & Wistuba, I. I. (2014). Current concepts on the molecular pathology of non-small cell lung carcinoma. *Seminars in Diagnostic Pathology*, *31*(4), 306-313. https://doi.org/10.1053/j.semdp.2014.06.008

Fukai, I., Masaoka, A., Hashimoto, T., Yamakawa, Y., Niwa, H., Kiriyama, M., & Eimoto, T. (1995). Differential diagnosis of thymic carcinoma and lung carcinoma with the use of antibodies to cytokeratins. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, *110*(6), 1670-1675. https://doi.org/10.1016/S0022-5223(95)70029-3

Gao, D., Vela, I., Sboner, A., Iaquinta, P. J., Karthaus, W. R., Gopalan, A., Dowling, C., Wanjala, J. N., Undvall, E. A., Arora, V. K., Wongvipat, J., Kossai, M., Ramazanoglu, S., Barboza, L. P., Di, W., Cao, Z., Zhang, Q. F., Sirota, I., Ran, L., … Chen, Y. (2014). Organoid Cultures Derived from Patients with Advanced Prostate Cancer. *Cell*, *159*(1), 176-187. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.08.016

Ghosh, S., Spagnoli, G. C., Martin, I., Ploegert, S., Demougin, P., Heberer, M., & Reschner, A. (2005). Three-dimensional culture of melanoma cells profoundly affects gene expression profile: A high density oligonucleotide array study. *Journal of Cellular Physiology*, *204*(2), 522-531. https://doi.org/10.1002/jcp.20320

Gilbert, P. M., Havenstrite, K. L., Magnusson, K. E. G., Sacco, A., Leonardi, N. A., Kraft, P., Nguyen, N. K., Thrun, S., Lutolf, M. P., & Blau, H. M. (2010). Substrate Elasticity Regulates Skeletal Muscle Stem Cell Self-Renewal in Culture. *Science*, *329*(5995), 1078-1081. https://doi.org/10.1126/science.1191035

Glovaci, D., Fan, W., & Wong, N. D. (2019). Epidemiology of Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease. *Current Cardiology Reports*, *21*(4), 21. https://doi.org/10.1007/s11886-019-1107-y

Gómez-Lechón, M. J., Jover, R., Donato, T., Ponsoda, X., Rodriguez, C., Stenzel, K. G., Klocke, R., Paul, D., Guillén, I., Bort, R., & Castell, J. V. (1998). Long-term expression of differentiated functions in hepatocytes cultured in three-dimensional collagen matrix. *Journal of Cellular Physiology*, *177*(4), 553-562. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199812)177:4<553::AID-JCP6>3.0.CO;2-F

Goodenow, R. S., Vogel, J. M., & Linsk, R. L. (1985). Histocompatibility Antigens on Murine Tumors. *Science*, *230*(4727), 777-783. https://doi.org/10.1126/science.2997918

Granat, L. M., Kambhampati, O., Klosek, S., Niedzwecki, B., Parsa, K., & Zhang, D. (2019). The promises and challenges of patient-derived tumor organoids in drug development and precision oncology. *Animal Models and Experimental Medicine*, *2*(3), 150-161. https://doi.org/10.1002/ame2.12077

Greenlee, R. T., Murray, T., Bolden, S., & Wingo, P. A. (2000). Cancer statistics, 2000. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *50*(1), 7-33. https://doi.org/10.3322/canjclin.50.1.7

Griffin, S. M., Pickard, M. R., Orme, R. P., Hawkins, C. P., Williams, A. C., & Fricker, R. A. (2017). Nicotinamide alone accelerates the conversion of mouse embryonic stem cells into mature neuronal populations. *PLOS ONE*, *12*(8), e0183358. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183358

Griffith, L. G., & Swartz, M. A. (2006). Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *7*(3), 211-224. https://doi.org/10.1038/nrm1858

Gu, Y., Fu, J., Wang, S., & Wang, Q. (2011). The Effect of B27 Supplement on Promoting In Vitro Propagation The Effect of B27 Supplement on Promoting In Vitro Propagation of Her2/neu-Transformed Mammary Tumorspheres of Her2/neu-Transformed Mammary Tumorspheres. Içinde *Journal of Biotech Research* (C. 3). https://scholarcommons.sc.edu/biol_facpub/60

Guazzi, S., Price, M., De Felice, M., Damante, G., Mattei, M. G., & Di Lauro, R. (1990). Thyroid nuclear factor 1 (TTF-1) contains a homeodomain and displays a novel DNA binding specificity. *The EMBO Journal*, *9*(11), 3631-3639. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07574.x

Hamburger, A. W., & Salmon, S. E. (1977). Primary Bioassay of Human Tumor Stem Cells. *Science*, *197*(4302), 461-463. https://doi.org/10.1126/science.560061

Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, *12*(1), 31-46. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, *100*(1), 57-70. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, *144*(5), 646-674. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013

Harb, N., Archer, T. K., & Sato, N. (2008). The Rho-Rock-Myosin Signaling Axis Determines Cell-Cell Integrity of Self-Renewing Pluripotent Stem Cells. *PLoS ONE*, *3*(8), e3001. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003001

Harrison, R. G. (1906). Observations on the living developing nerve fiber. *Experimental Biology and Medicine*, *4*(1), 140-143. https://doi.org/10.3181/00379727-4-98

Heindl, A., Nawaz, S., & Yuan, Y. (2015). Mapping spatial heterogeneity in the tumor microenvironment: a new era for digital pathology. *Laboratory Investigation*, *95*(4), 377-384. https://doi.org/10.1038/labinvest.2014.155

Hickman, J. A., Graeser, R., de Hoogt, R., Vidic, S., Brito, C., Gutekunst, M., van der Kuip, H., & IMI PREDECT consortium. (2014). Three-dimensional models of cancer for pharmacology and cancer cell biology: Capturing tumor complexity in vitro/ex vivo. *Biotechnology Journal*, *9*(9), 1115-1128. https://doi.org/10.1002/biot.201300492

Hirano, T., Franzén, B., Uryu, K., Okuzawa, K., Alaiya, A., Vanky, F., Rodrigues, L., Ebihara, Y., Kato, H., & Auer, G. (1995). Detection of polypeptides associated with the histopathological differentiation of primary lung carcinoma. *British Journal of Cancer*, *72*(4), 840-848. https://doi.org/10.1038/bjc.1995.422

Hirsch, F. R., Scagliotti, G. V, Mulshine, J. L., Kwon, R., Curran, W. J., Wu, Y.-L., & Paz-Ares, L. (2017). Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *The Lancet*, *389*(10066), 299-311. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30958-8

Ho, B., Pek, N., & Soh, B.-S. (2018). Disease Modeling Using 3D Organoids Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(4), 936. https://doi.org/10.3390/ijms19040936

Hoarau-Véchot, J., Rafii, A., Touboul, C., & Pasquier, J. (2018). Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer-Microenvironment Interactions? *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(1), 181. https://doi.org/10.3390/ijms19010181

Hu, Y., Sui, X., Song, F., Li, Y., Li, K., Chen, Z., Yang, F., Chen, X., Zhang, Y., Wang, X., Liu, Q., Li, C., Zou, B., Chen, X., Wang, J., & Liu, P. (2021). Lung cancer organoids analyzed on microwell arrays predict drug responses of patients within a

week. *Nature Communications*, *12*(1), 2581. https://doi.org/10.1038/s41467-021-22676-1

Hyun, S. H., Ahn, M. S., Koh, Y. W., & Lee, S. J. (2019). A Machine-Learning Approach Using PET-Based Radiomics to Predict the Histological Subtypes of Lung Cancer. *Clinical Nuclear Medicine*, *44*(12), 956-960. https://doi.org/10.1097/RLU.0000000000002810

Ieraci, A., & Herrera, D. G. (2006). Nicotinamide Protects against Ethanol-Induced Apoptotic Neurodegeneration in the Developing Mouse Brain. *PLoS Medicine*, *3*(4), e101. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030101

Inamura, K. (2017). Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification. *Frontiers in Oncology*, *7*. https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00193

Jamal-Hanjani, M., Wilson, G. A., McGranahan, N., Birkbak, N. J., Watkins, T. B. K., Veeriah, S., Shafi, S., Johnson, D. H., Mitter, R., Rosenthal, R., Salm, M., Horswell, S., Escudero, M., Matthews, N., Rowan, A., Chambers, T., Moore, D. A., Turajlic, S., Xu, H., … Swanton, C. (2017). Tracking the Evolution of Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, *376*(22), 2109-2121. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1616288

Jenkins, R. W., Aref, A. R., Lizotte, P. H., Ivanova, E., Stinson, S., Zhou, C. W., Bowden, M., Deng, J., Liu, H., Miao, D., He, M. X., Walker, W., Zhang, G., Tian, T., Cheng, C., Wei, Z., Palakurthi, S., Bittinger, M., Vitzthum, H., … Barbie, D. A. (2018). *Ex Vivo* Profiling of PD-1 Blockade Using Organotypic Tumor Spheroids. *Cancer Discovery*, *8*(2), 196-215. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0833

Jin, Y.-R., & Yoon, J. K. (2012). The R-spondin family of proteins: Emerging regulators of WNT signaling. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *44*(12), 2278-2287. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.09.006

Jung, D. J., Shin, T. H., Kim, M., Sung, C. O., Jang, S. J., & Jeong, G. S. (2019). A one-stop microfluidic-based lung cancer organoid culture platform for testing drug sensitivity. *Lab on a Chip*, *19*(17), 2854-2865. https://doi.org/10.1039/C9LC00496C

Kadota, K., Miyai, Y., Katsuki, N., Kushida, Y., Matsunaga, T., Okuda, M., Yokomise, H., Kanaji, N., Bandoh, S., & Haba, R. (2017). A Grading System Combining Tumor Budding and Nuclear Diameter Predicts Prognosis in Resected Lung Squamous Cell Carcinoma. *American Journal of Surgical Pathology*, *41*(6), 750-760. https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000826

Kadota, K., Nitadori, J., Rekhtman, N., Jones, D. R., Adusumilli, P. S., & Travis, W. D. (2015). Reevaluation and Reclassification of Resected Lung Carcinomas Originally Diagnosed as Squamous Cell Carcinoma Using Immunohistochemical Analysis. *American Journal of Surgical Pathology*, *39*(9), 1170-1180. https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000439

Kadota, K., Nitadori, J., Woo, K. M., Sima, C. S., Finley, D. J., Rusch, V. W., Adusumilli, P. S., & Travis, W. D. (2014). Comprehensive Pathological Analyses in Lung Squamous Cell Carcinoma: Single Cell Invasion, Nuclear Diameter, and Tumor Budding Are Independent Prognostic Factors for Worse Outcomes. *Journal of Thoracic Oncology*, *9*(8), 1126-1139. https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000253

Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Ibbs, M., Bliźniak, R., Łuczewski, Ł., & Lamperska, K. (2016). 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science*. https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63743

Kennedy, A., & Burgin, P. D. (1975). A comparison of different methods of detecting mucin in adenocarcinomas of the lung. *British Journal of Diseases of the Chest*, *69*, 137-143. https://doi.org/10.1016/0007-0971(75)90066-2

Khalil, A., Majlath, M., Gounant, V., Hess, A., Laissy, J. P., & Debray, M. P. (2016). Contribution of magnetic resonance imaging in lung cancer imaging. *Diagnostic and Interventional Imaging*, *97*(10), 991-1002. https://doi.org/10.1016/j.diii.2016.08.015

Khetan, S., & Burdick, J. A. (2010). Patterning network structure to spatially control cellular remodeling and stem cell fate within 3-dimensional hydrogels. *Biomaterials*, *31*(32), 8228-8234. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.07.035

Kilian, K. A., Bugarija, B., Lahn, B. T., & Mrksich, M. (2010). Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(11), 4872-4877. https://doi.org/10.1073/pnas.0903269107

Kim, M. J., Shin, H. C., Shin, K. C., & Ro, J. Y. (2013). Best immunohistochemical panel in distinguishing adenocarcinoma from squamous cell carcinoma of lung: tissue microarray assay in resected lung cancer specimens. *Annals of Diagnostic Pathology*, *17*(1), 85-90. https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2012.07.006

Kim, M., Mun, H., Sung, C. O., Cho, E. J., Jeon, H.-J., Chun, S.-M., Jung, D. J., Shin, T. H., Jeong, G. S., Kim, D. K., Choi, E. K., Jeong, S.-Y., Taylor, A. M., Jain, S., Meyerson, M., & Jang, S. J. (2019). Patient-derived lung cancer organoids as in vitro cancer models for therapeutic screening. *Nature Communications*, *10*(1), 3991. https://doi.org/10.1038/s41467-019-11867-6

Kim, S. R., Ko, J. K., Kim, K., Jeon, H.-J., & Lee, S.-E. (2021). Lignins and their close derivatives produced by biorefinery processes for the treatment of human diseases. Içinde *Biomass, Biofuels, Biochemicals* (ss. 15-32). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820294-4.00014-4

Kita, K., Fukuda, K., Takahashi, H., Tanimoto, A., Nishiyama, A., Arai, S., Takeuchi, S., Yamashita, K., Ohtsubo, K., Otani, S., Yanagimura, N., Suzuki, C., Ikeda, H., Tamura, M., Matsumoto, I., & Yano, S. (2019). Patient-derived xenograft models of non-small cell lung cancer for evaluating targeted drug sensitivity and resistance. *Cancer Science*, *110*(10), 3215-3224. https://doi.org/10.1111/cas.14171

Ko, Y. R., Kim, J. M., Kang, Y., Kim, M., & Jang, S. J. (2022). A method for culturing patient-derived lung cancer organoids from surgically resected tissues and biopsy samples. *Organoid*, *2*, e19. https://doi.org/10.51335/organoid.2022.2.e19

Kodack, D. P., Farago, A. F., Dastur, A., Held, M. A., Dardaei, L., Friboulet, L., von Flotow, F., Damon, L. J., Lee, D., Parks, M., Dicecca, R., Greenberg, M., Kattermann, K. E., Riley, A. K., Fintelmann, F. J., Rizzo, C., Piotrowska, Z., Shaw, A. T., Gainor, J. F., … Benes, C. H. (2017). Primary Patient-Derived Cancer Cells and Their Potential for Personalized Cancer Patient Care. *Cell Reports*, *21*(11), 3298-3309. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.051

Kotecha, R., Takami, A., & Espinoza, J. L. (2016). Dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: a review of the clinical evidence. *Oncotarget*, *7*(32), 52517-52529. https://doi.org/10.18632/oncotarget.9593

Kralova, J., Dvorak, M., Koc, M., & Kral, V. (2008). p38 MAPK plays an essential role in apoptosis induced by photoactivation of a novel ethylene glycol porphyrin derivative. *Oncogene*, *27*(21), 3010-3020. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210960

Lawko, N., Plaskasovitis, C., Stokes, C., Abelseth, L., Fraser, I., Sharma, R., Kirsch, R., Hasan, M., Abelseth, E., & Willerth, S. M. (2021). 3D Tissue Models as an Effective Tool for Studying Viruses and Vaccine Development. *Frontiers in Materials*, *8*. https://doi.org/10.3389/fmats.2021.631373

Lazzari, G., Nicolas, V., Matsusaki, M., Akashi, M., Couvreur, P., & Mura, S. (2018). Multicellular spheroid based on a triple co-culture: A novel 3D model to mimic pancreatic tumor complexity. *Acta Biomaterialia*, *78*, 296-307. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.08.008

Lee, J., Lilly, G. D., Doty, R. C., Podsiadlo, P., & Kotov, N. A. (2009). In vitro Toxicity Testing of Nanoparticles in 3D Cell Culture. *Small*, *5*(10), 1213-1221. https://doi.org/10.1002/smll.200801788

Leiter, A., Veluswamy, R. R., & Wisnivesky, J. P. (2023). The global burden of lung cancer: current status and future trends. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *20*(9), 624-639. https://doi.org/10.1038/s41571-023-00798-3

Leng, L., Ma, J., Lv, L., Wang, W., Gao, D., Zhu, Y., & Wu, Z. (2020). Both Wnt signaling and epidermal stem cell-derived extracellular vesicles are involved in epidermal cell growth. *Stem Cell Research & Therapy*, *11*(1), 415. https://doi.org/10.1186/s13287-020-01933-y

Li, C., Kato, M., Shiue, L., Shively, J. E., Ares, M., & Lin, R.-J. (2006). Cell Type and Culture Condition–Dependent Alternative Splicing in Human Breast Cancer Cells Revealed by Splicing-Sensitive Microarrays. *Cancer Research*, *66*(4), 1990-1999. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2593

Li, Y. F., Gao, Y., Liang, B. W., Cao, X. Q., Sun, Z. J., Yu, J. H., Liu, Z. D., & Han, Y. (2020). Patient-derived organoids of non-small cells lung cancer and their application for drug screening. *Neoplasma*, *67*(02), 430-437. https://doi.org/10.4149/neo_2020_190417N346

Li, Z., Qian, Y., Li, W., Liu, L., Yu, L., Liu, X., Wu, G., Wang, Y., Luo, W., Fang, F., Liu, Y., Song, F., Cai, Z., Chen, W., & Huang, W. (2020). Human Lung Adenocarcinoma-Derived Organoid Models for Drug Screening. *iScience*, *23*(8), 101411. https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101411

Lieberman, I., & Ove, P. (1958). Enzyme Activity Levels in Mammalian Cell Cultures. *Journal of Biological Chemistry*, *233*(3), 634-636. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64718-0

Lin, S., Na, C.-L., Akinbi, H. T., Apsley, K. S., Whitsett, J. A., & Weaver, T. E. (1999). Surfactant Protein B (SP-B) −/− Mice Are Rescued by Restoration of SP-B Expression in Alveolar Type II Cells but Not Clara Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(27), 19168-19174. https://doi.org/10.1074/jbc.274.27.19168

Lin, S.-H., Vincent, A., Shaw, T., Maynard, K. I., & Maiese, K. (2000). Prevention of Nitric Oxide-Induced Neuronal Injury Through the Modulation of Independent Pathways of Programmed Cell Death. *Journal of Cerebral Blood Flow &*

Metabolism, *20*(9), 1380-1391. https://doi.org/10.1097/00004647-200009000-00013

Loeb, L. A., & Harris, C. C. (2008). Advances in Chemical Carcinogenesis: A Historical Review and Prospective. *Cancer Research*, *68*(17), 6863-6872. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2852

Loo, P. S., Thomas, S. C., Nicolson, M. C., Fyfe, M. N., & Kerr, K. M. (2010). Subtyping of Undifferentiated Non-small Cell Carcinomas in Bronchial Biopsy Specimens. *Journal of Thoracic Oncology*, *5*(4), 442-447. https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181d40fac

Lu, P., Weaver, V. M., & Werb, Z. (2012). The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *Journal of Cell Biology*, *196*(4), 395-406. https://doi.org/10.1083/jcb.201102147

Ma, H., Zhu, Y., Zhou, R., Yu, Y., Xiao, Z., & Zhang, H. (2022). Lung cancer organoids, a promising model still with long way to go. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *171*, 103610. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2022.103610

Ma, L. Y., Chen, W. W., Gao, R. L., Liu, L. S., Zhu, M. L., Wang, Y. J., Wu, Z. S., Li, H. J., Gu, D. F., Yang, Y. J., Zheng, Z., & Hu, S. S. (2020). China cardiovascular diseases report 2018: An updated summary. Içinde *Journal of Geriatric Cardiology* (C. 17, Sayı 1, ss. 1-8). Science Press. https://doi.org/10.11909/j.issn.1671-5411.2020.01.001

Ma, X., Yang, S., Jiang, H., Wang, Y., & Xiang, Z. (2021). Transcriptomic analysis of tumor tissues and organoids reveals the crucial genes regulating the proliferation of lung adenocarcinoma. *Journal of Translational Medicine*, *19*(1), 368. https://doi.org/10.1186/s12967-021-03043-6

Mahmud, G., Campbell, C. J., Bishop, K. J. M., Komarova, Y. A., Chaga, O., Soh, S., Huda, S., Kandere-Grzybowska, K., & Grzybowski, B. A. (2009). Directing cell motions on micropatterned ratchets. *Nature Physics*, *5*(8), 606-612. https://doi.org/10.1038/nphys1306

Maiese, K., Chong, Z., Hou, J., & Shang, Y. (2009). The Vitamin Nicotinamide: Translating Nutrition into Clinical Care. *Molecules*, *14*(9), 3446-3485. https://doi.org/10.3390/molecules14093446

Mallry, F. B., & Parker, F. (1939). *FIXING AND STAINING METHODS FOR LEAD AND COPPER IN TISSUES **.

Mangal, S., Gao, W., Li, T., & Zhou, Q. T. (2017). Pulmonary delivery of nanoparticle chemotherapy for the treatment of lung cancers: Challenges and opportunities. Içinde *Acta Pharmacologica Sinica* (C. 38, Sayı 6, ss. 782-797). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/aps.2017.34

Marushima, H. (2011). Three-dimensional culture promotes reconstitution of the tumor-specific hypoxic microenvironment under TGFβ stimulation. *International Journal of Oncology*. https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1142

Matthews, H. K., Bertoli, C., & de Bruin, R. A. M. (2022). Cell cycle control in cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *23*(1), 74-88. https://doi.org/10.1038/s41580-021-00404-3

Mazzocchi, A., Devarasetty, M., Herberg, S., Petty, W. J., Marini, F., Miller, L., Kucera, G., Dukes, D. K., Ruiz, J., Skardal, A., & Soker, S. (2019). Pleural Effusion Aspirate for Use in 3D Lung Cancer Modeling and Chemotherapy Screening. *ACS*

Biomaterials Science & Engineering, *5*(4), 1937-1943. https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b01356

Mazzoleni, G., Di Lorenzo, D., & Steimberg, N. (2009). Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research? *Genes & Nutrition*, *4*(1), 13-22. https://doi.org/10.1007/s12263-008-0107-0

McCauley, K. B., Hawkins, F., Serra, M., Thomas, D. C., Jacob, A., & Kotton, D. N. (2017). Efficient Derivation of Functional Human Airway Epithelium from Pluripotent Stem Cells via Temporal Regulation of Wnt Signaling. *Cell Stem Cell*, *20*(6), 844-857.e6. https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.03.001

Meirson, T., Gil-Henn, H., & Samson, A. O. (2020). Invasion and metastasis: the elusive hallmark of cancer. *Oncogene*, *39*(9), 2024-2026. https://doi.org/10.1038/s41388-019-1110-1

Meng, Y., Ren, Z., Xu, F., Zhou, X., Song, C., Wang, V. Y.-F., Liu, W., Lu, L., Thomson, J. A., & Chen, G. (2018). Nicotinamide Promotes Cell Survival and Differentiation as Kinase Inhibitor in Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*, *11*(6), 1347-1356. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.10.023

Merker, S. R., Weitz, J., & Stange, D. E. (2016). Gastrointestinal organoids: How they gut it out. *Developmental Biology*, *420*(2), 239-250. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.08.010

Meyers, J., Craig, J., & Odde, D. J. J. (2006). Potential for Control of Signaling Pathways via Cell Size and Shape. *Current Biology*, *16*(17), 1685-1693. https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.07.056

Micke, P., Botling, J., Mattsson, J. S. M., Planck, M., Tran, L., Vidarsdottir, H., Nodin, B., Jirström, K., & Brunnström, H. (2019). Mucin staining is of limited value in addition to basic immunohistochemical analyses in the diagnostics of non-small cell lung cancer. *Scientific Reports*, *9*(1), 1319. https://doi.org/10.1038/s41598-018-37722-0

Miller, K. D., Nogueira, L., Mariotto, A. B., Rowland, J. H., Yabroff, K. R., Alfano, C. M., Jemal, A., Kramer, J. L., & Siegel, R. L. (2019). Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *69*(5), 363-385. https://doi.org/10.3322/caac.21565

Moll, R., Dhouailly, D., & Sun, T.-T. (1989). Expression of keratin 5 as a distinctive feature of epithelial and biphasic mesotheliomas. *Virchows Archiv B Cell Pathology Including Molecular Pathology*, *58*(1), 129-145. https://doi.org/10.1007/BF02890064

Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B., & Krepler, R. (1982). The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, *31*(1), 11-24. https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90400-7

MORI, K., SHIMIZU, H., KONNO, A., & IWANAGA, T. (2002). Immunohistochemical Localization of Napsin and Its Potential Role in Protein Catabolism in Renal Proximal Tubules. *Archives of Histology and Cytology*, *65*(4), 359-368. https://doi.org/10.1679/aohc.65.359

Mossahebi-Mohammadi, M., Quan, M., Zhang, J.-S., & Li, X. (2020). FGF Signaling Pathway: A Key Regulator of Stem Cell Pluripotency. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*. https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00079

Motomura, K., Okada, N., Morita, H., Hara, M., Tamari, M., Orimo, K., Matsuda, G., Imadome, K.-I., Matsuda, A., Nagamatsu, T., Fujieda, M., Sago, H., Saito, H., &

Matsumoto, K. (2017). A Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK) inhibitor, Y-27632, enhances adhesion, viability and differentiation of human term placenta-derived trophoblasts in vitro. *PLOS ONE*, *12*(5), e0177994. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177994

Mseka, T., Bamburg, J. R., & Cramer, L. P. (2007). ADF/cofilin family proteins control formation of oriented actin-filament bundles in the cell body to trigger fibroblast polarization. *Journal of Cell Science*, *120*(24), 4332-4344. https://doi.org/10.1242/jcs.017640

Mukhopadhyay, S., & Katzenstein, A.-L. A. (2011). Subclassification of Non-small Cell Lung Carcinomas Lacking Morphologic Differentiation on Biopsy Specimens. *American Journal of Surgical Pathology*, *35*(1), 15-25. https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3182036d05

Mullins, R. K., Thompson, S. K., Coogan, P. S., & Shurbaji, M. S. (1994). Paranuclear blue inclusions: An aid in the cytopathologic diagnosis of primary and metastatic pulmonary small-cell carcinoma. *Diagnostic Cytopathology*, *10*(4), 332-335. https://doi.org/10.1002/dc.2840100408

Mundy, G. R. (1987). Ectopic Hormonal Syndromes in Neoplastic Disease. *Hospital Practice*, *22*(4), 179-194. https://doi.org/10.1080/21548331.1987.11707699

Napolitano, A. P., Dean, D. M., Man, A. J., Youssef, J., Ho, D. N., Rago, A. P., Lech, M. P., & Morgan, J. R. (2007). Scaffold-free three-dimensional cell culture utilizing micromolded nonadhesive hydrogels. *BioTechniques*, *43*(4), 494-500. https://doi.org/10.2144/000112591

Nath, S., & Devi, G. R. (2016). Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacology & Therapeutics*, *163*, 94-108. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.03.013

Nelson, C. M., & Bissell, M. J. (2006). Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: Tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. Içinde *Annual Review of Cell and Developmental Biology* (C. 22, ss. 287-309). https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104315

Nguyen, B., Fong, C., Luthra, A., Smith, S. A., DiNatale, R. G., Nandakumar, S., Walch, H., Chatila, W. K., Madupuri, R., Kundra, R., Bielski, C. M., Mastrogiacomo, B., Donoghue, M. T. A., Boire, A., Chandarlapaty, S., Ganesh, K., Harding, J. J., Iacobuzio-Donahue, C. A., Razavi, P., … Schultz, N. (2022). Genomic characterization of metastatic patterns from prospective clinical sequencing of 25,000 patients. *Cell*, *185*(3), 563-575.e11. https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.01.003

Nicholson, A. G., Gonzalez, D., Shah, P., Pynegar, M. J., Deshmukh, M., Rice, A., & Popat, S. (2010). Refining the Diagnosis and EGFR Status of Non-small Cell Lung Carcinoma in Biopsy and Cytologic Material, Using a Panel of Mucin Staining, TTF-1, Cytokeratin 5/6, and P63, and EGFR Mutation Analysis. *Journal of Thoracic Oncology*, *5*(4), 436-441. https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181c6ed9b

Nicholson, S. A., Path, M. R. C., Beasley, M. B., Brambilla, E., Hasleton, P. S., Path, F. R. C., Colby, T. V, Sheppard, M. N., Falk, R., & Travis, W. D. (2002). *Small Cell Lung Carcinoma (SCLC) A Clinicopathologic Study of 100 Cases With Surgical Specimens*. https://doi.org/10.1097/01.PAS.0000022995.91977.CD

Nobre, A. R., Albergaria, A., & Schmitt, F. (2013). p40: A p63 Isoform Useful for Lung Cancer Diagnosis – A Review of the Physiological and Pathological Role of p63. *Acta Cytologica*, *57*(1), 1-8. https://doi.org/10.1159/000345245

Noguchi, M., Morikawa, A., Kawasaki, M., Matsuno, Y., Yamada, T., Hirohashi, S., Kondo, H., & Shimosato, Y. (1995). *Small Adenocarcinoma of the Lung Histologic Characteristics and Prognosis*. https://doi.org/10.1002/1097-0142(19950615)75:12<2844::AID-CNCR2820751209>3.0.CO;2

Noh, S., & Shim, H. (2012). Optimal combination of immunohistochemical markers for subclassification of non-small cell lung carcinomas: A tissue microarray study of poorly differentiated areas. *Lung Cancer*, *76*(1), 51-55. https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2011.09.008

Nonaka, D. (2012). A Study of ΔNp63 Expression in Lung Non-Small Cell Carcinomas. *American Journal of Surgical Pathology*, *36*(6), 895-899. https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3182498f2b

Omary, M. B., & Ku, N. O. (1997). Intermediate filament proteins of the liver: Emerging disease association and functions. *Hepatology*, *25*(5), 1043-1048. https://doi.org/10.1002/hep.510250537

Ong, S.-M., Zhao, Z., Arooz, T., Zhao, D., Zhang, S., Du, T., Wasser, M., van Noort, D., & Yu, H. (2010). Engineering a scaffold-free 3D tumor model for in vitro drug penetration studies. *Biomaterials*, *31*(6), 1180-1190. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.10.049

Ordóñez, N. G. (2012). Napsin A Expression in Lung and Kidney Neoplasia. *Advances in Anatomic Pathology*, *19*(1), 66-73. https://doi.org/10.1097/PAP.0b013e31823e472e

Ornitz, D. M., & Itoh, N. (2015). The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *WIREs Developmental Biology*, *4*(3), 215-266. https://doi.org/10.1002/wdev.176

Pakzad, M., Totonchi, M., Taei, A., Seifinejad, A., Hassani, S. N., & Baharvand, H. (2010). Presence of a ROCK Inhibitor in Extracellular Matrix Supports More Undifferentiated Growth of Feeder-Free Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells upon Passaging. *Stem Cell Reviews and Reports*, *6*(1), 96-107. https://doi.org/10.1007/s12015-009-9103-z

Pampaloni, F., Reynaud, E. G., & Stelzer, E. H. K. (2007). The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *8*(10), 839-845. https://doi.org/10.1038/nrm2236

Pauli, C., Hopkins, B. D., Prandi, D., Shaw, R., Fedrizzi, T., Sboner, A., Sailer, V., Augello, M., Puca, L., Rosati, R., McNary, T. J., Churakova, Y., Cheung, C., Triscott, J., Pisapia, D., Rao, R., Mosquera, J. M., Robinson, B., Faltas, B. M., … Rubin, M. A. (2017). Personalized *In Vitro* and *In Vivo* Cancer Models to Guide Precision Medicine. *Cancer Discovery*, *7*(5), 462-477. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-1154

Petersen, O. W., Rønnov-Jessen, L., Howlett, A. R., & Bissell, M. J. (1992). Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *89*(19), 9064-9068. https://doi.org/10.1073/pnas.89.19.9064

Pitot, H. C. (1989). Progression: The Terminal Stage in Carcinogenesis. *Japanese Journal of Cancer Research*, *80*(7), 599-607. https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1989.tb01683.x

Pitot, H. C. (1993). The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer*, *72*(3 S), 962-970. https://doi.org/10.1002/1097-0142(19930801)72:3+<962::AID-CNCR2820721303>3.0.CO;2-H

Pitot, H. C., & Dragan, Y. P. (1991). Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *The FASEB Journal*, *5*(9), 2280-2286. https://doi.org/10.1096/fasebj.5.9.1860619

Plume, S. K. (1985). *Lung Cancer: Considerations Related to Gross Anatomy* (ss. 27-33). https://doi.org/10.1007/978-3-642-82234-6_3

Politi, K., & Herbst, R. S. (2015). Lung Cancer in the Era of Precision Medicine. *Clinical Cancer Research*, *21*(10), 2213-2220. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2748

Poulsoma, R., Begosb, D. E., & Modlinb, I. M. (1996). Molecular Aspects of Restitution: Functions of Trefoil Peptides. Içinde *YALE JOURNAL OF BIOLOGY AND MEDICINE* (C. 69).

Powers, M. J., Janigian, D. M., Wack, K. E., Baker, C. S., Stolz, D. B., & Griffith, L. G. (2002). Functional Behavior of Primary Rat Liver Cells in a Three-Dimensional Perfused Microarray Bioreactor. *Tissue Engineering*, *8*(3), 499-513. https://doi.org/10.1089/107632702760184745

Pradhan, S., Liu, C., Zhang, C., Jia, X., Farach-Carson, M. C., & Witt, R. L. (2010). Lumen formation in three-dimensional cultures of salivary acinar cells. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*, *142*(2), 191-195. https://doi.org/10.1016/j.otohns.2009.10.039

Pradhan-Bhatt, S., Harrington, D. A., Duncan, R. L., Farach-Carson, M. C., Jia, X., & Witt, R. L. (2014). A novel in vivo model for evaluating functional restoration of a tissue-engineered salivary gland. *The Laryngoscope*, *124*(2), 456-461. https://doi.org/10.1002/lary.24297

Pradhan-Bhatt, S., Harrington, D. A., Duncan, R. L., Jia, X., Witt, R. L., & Farach-Carson, M. C. (2013). Implantable Three-Dimensional Salivary Spheroid Assemblies Demonstrate Fluid and Protein Secretory Responses to Neurotransmitters. *Tissue Engineering Part A*, *19*(13-14), 1610-1620. https://doi.org/10.1089/ten.tea.2012.0301

Qi, Z., Li, Y., Zhao, B., Xu, C., Liu, Y., Li, H., Zhang, B., Wang, X., Yang, X., Xie, W., Li, B., Han, J.-D. J., & Chen, Y.-G. (2017). BMP restricts stemness of intestinal Lgr5+ stem cells by directly suppressing their signature genes. *Nature Communications*, *8*(1), 13824. https://doi.org/10.1038/ncomms13824

Qian, H., Xu, T., Cai, X., Ji, T., & Guo, H. (2015). Prognostic value of TTF-1 expression in patients with non-small cell lung cancer: A meta-analysis. *Clinica Chimica Acta*, *451*, 208-214. https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.01.023

Qin, J., Wu, S.-P., Creighton, C. J., Dai, F., Xie, X., Cheng, C.-M., Frolov, A., Ayala, G., Lin, X., Feng, X.-H., Ittmann, M. M., Tsai, S.-J., Tsai, M.-J., & Tsai, S. Y. (2013). COUP-TFII inhibits TGF-β-induced growth barrier to promote prostate tumorigenesis. *Nature*, *493*(7431), 236-240. https://doi.org/10.1038/nature11674

Ramsay, R. G., & Abud, H. E. (2017). Exploiting induced senescence in intestinal organoids to drive enteroendocrine cell expansion. *Stem Cell Investigation*, *4*, 36-36. https://doi.org/10.21037/sci.2017.04.06

Rao, M. V., & Zaidel-Bar, R. (2016). Formin-mediated actin polymerization at cell–cell junctions stabilizes E-cadherin and maintains monolayer integrity during wound repair. *Molecular Biology of the Cell*, *27*(18), 2844-2856. https://doi.org/10.1091/mbc.e16-06-0429

Reck, M., Popat, S., Reinmuth, N., De Ruysscher, D., Kerr, K. M., & Peters, S. (2014). Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, *25*, iii27-iii39. https://doi.org/10.1093/annonc/mdu199

Reck, M., Rodríguez-Abreu, D., Robinson, A. G., Hui, R., Csőszi, T., Fülöp, A., Gottfried, M., Peled, N., Tafreshi, A., Cuffe, S., O'Brien, M., Rao, S., Hotta, K., Leiby, M. A., Lubiniecki, G. M., Shentu, Y., Rangwala, R., & Brahmer, J. R. (2016). Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, *375*(19), 1823-1833. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1606774

Reichard, A., & Asosingh, K. (2019). Best Practices for Preparing a Single Cell Suspension from Solid Tissues for Flow Cytometry. *Cytometry Part A*, *95*(2), 219-226. https://doi.org/10.1002/cyto.a.23690

Rekhtman, N., Ang, D. C., Sima, C. S., Travis, W. D., & Moreira, A. L. (2011). Immunohistochemical algorithm for differentiation of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma based on large series of whole-tissue sections with validation in small specimens. *Modern Pathology*, *24*(10), 1348-1359. https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.92

Rekhtman, N., & Travis, W. D. (2019). Large No More: The Journey of Pulmonary Large Cell Carcinoma from Common to Rare Entity. *Journal of Thoracic Oncology*, *14*(7), 1125-1127. https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.04.014

Rudin, C. M., Brambilla, E., Faivre-Finn, C., & Sage, J. (2021). Small-cell lung cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, *7*(1), 3. https://doi.org/10.1038/s41572-020-00235-0

Rudin, C. M., Ismaila, N., Hann, C. L., Malhotra, N., Movsas, B., Norris, K., Pietanza, M. C., Ramalingam, S. S., Turrisi, A. T., & Giaccone, G. (2015). Treatment of small-cell lung cancer: American society of clinical oncology endorsement of the American college of chest physicians guideline. *Journal of Clinical Oncology*, *33*(34), 4106-4111. https://doi.org/10.1200/JCO.2015.63.7918

Russell, P. A., Barnett, S. A., Walkiewicz, M., Wainer, Z., Conron, M., Wright, G. M., Gooi, J., Knight, S., Wynne, R., Liew, D., & John, T. (2013). Correlation of Mutation Status and Survival with Predominant Histologic Subtype According to the New IASLC/ATS/ERS Lung Adenocarcinoma Classification in Stage III (N2) Patients. *Journal of Thoracic Oncology*, *8*(4), 461-468. https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3182828fb8

Ryu, J. H., Kim, M. S., Lee, G. M., Choi, C. Y., & Kim, B.-S. (2005). The enhancement of recombinant protein production by polymer nanospheres in cell suspension culture. *Biomaterials*, *26*(14), 2173-2181. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.06.017

Ryu, N.-E., Lee, S.-H., & Park, H. (2019). Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells. *Cells*, *8*(12), 1620. https://doi.org/10.3390/cells8121620

Sabarwal, A., Kumar, K., & Singh, R. P. (2018). Hazardous effects of chemical pesticides on human health–Cancer and other associated disorders. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *63*, 103-114. https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.08.018

Sachs, N., & Clevers, H. (2014). Organoid cultures for the analysis of cancer phenotypes. *Current Opinion in Genetics & Development*, *24*, 68-73. https://doi.org/10.1016/j.gde.2013.11.012

Sachs, N., de Ligt, J., Kopper, O., Gogola, E., Bounova, G., Weeber, F., Balgobind, A. V., Wind, K., Gracanin, A., Begthel, H., Korving, J., van Boxtel, R., Duarte, A. A., Lelieveld, D., van Hoeck, A., Ernst, R. F., Blokzijl, F., Nijman, I. J., Hoogstraat, M., … Clevers, H. (2018). A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell*, *172*(1-2), 373-386.e10. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.010

Sachs, N., Papaspyropoulos, A., Zomer-van Ommen, D. D., Heo, I., Böttinger, L., Klay, D., Weeber, F., Huelsz-Prince, G., Iakobachvili, N., Amatngalim, G. D., de Ligt, J., van Hoeck, A., Proost, N., Viveen, M. C., Lyubimova, A., Teeven, L., Derakhshan, S., Korving, J., Begthel, H., … Clevers, H. (2019). Long-term expanding human airway organoids for disease modeling. *The EMBO Journal*, *38*(4). https://doi.org/10.15252/embj.2018100300

Sándor, G. O., Soós, A. Á., Lörincz, P., Rojkó, L., Harkó, T., Bogyó, L., Tölgyes, T., Bursics, A., Buzás, E. I., Moldvay, J., & Wiener, Z. (2021). Wnt Activity and Cell Proliferation Are Coupled to Extracellular Vesicle Release in Multiple Organoid Models. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.670825

Sarioglu, S., Sagol, O., & Aysal, A. (2022). Biomarkers in Carcinoma of Unknown Primary. Içinde *Biomarkers in Carcinoma of Unknown Primary*. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-84432-5

Sato, T., & Clevers, H. (2015). SnapShot: Growing Organoids from Stem Cells. *Cell*, *161*(7), 1700-1700.e1. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.028

Schacht, V., & Kern, J. S. (2015). Basics of Immunohistochemistry. *Journal of Investigative Dermatology*, *135*(3), 1-4. https://doi.org/10.1038/jid.2014.541

Schneeberger, E. E., & Lynch, R. D. (1992). Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, *262*(6), L647-L661. https://doi.org/10.1152/ajplung.1992.262.6.L647

Schultz, H., Kähler, D., Branscheid, D., Vollmer, E., Zabel, P., & Goldmann, T. (2008). TKTL1 is overexpressed in a large portion of non-small cell lung cancer specimens. *Diagnostic Pathology*, *3*(1), 35. https://doi.org/10.1186/1746-1596-3-35

Scudiere, D. A., Shoemaker, R. H., Paul, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D., & Boyd, M. R. (1988). Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines1. Içinde *CANCER RESEARCH* (C. 48). http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/48/17/4827/2958485/cr0480174827.pdf

Semino, C. E., Merok, J. R., Crane, G. G., Panagiotakos, G., & Zhang, S. (2003). Functional differentiation of hepatocyte-like spheroid structures from putative liver

progenitor cells in three-dimensional peptide scaffolds. *Differentiation*, *71*(4-5), 262-270. https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.2003.7104503.x

Sharma, R. (2022). Mapping of global, regional and national incidence, mortality and mortality-to-incidence ratio of lung cancer in 2020 and 2050. *International Journal of Clinical Oncology*, *27*(4), 665-675. https://doi.org/10.1007/s10147-021-02108-2

Shi, R., Radulovich, N., Ng, C., Liu, N., Notsuda, H., Cabanero, M., Martins-Filho, S. N., Raghavan, V., Li, Q., Mer, A. S., Rosen, J. C., Li, M., Wang, Y.-H., Tamblyn, L., Pham, N.-A., Haibe-Kains, B., Liu, G., Moghal, N., & Tsao, M.-S. (2020). Organoid Cultures as Preclinical Models of Non–Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*, *26*(5), 1162-1174. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-1376

Shi, Y., Zhang, L., Jiang, R., Chen, W., Zheng, W., Chen, L., Tang, L., Li, L., Li, L., Tang, W., Wang, Y., & Yu, Y. (2012). Protective effects of nicotinamide against acetaminophen-induced acute liver injury. *International Immunopharmacology*, *14*(4), 530-537. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2012.09.013

Shin, J.-Y., Park, J., Jang, H.-K., Lee, T.-J., La, W.-G., Bhang, S. H., Kwon, I. K., Kwon, O. H., & Kim, B.-S. (2012). Efficient formation of cell spheroids using polymer nanofibers. *Biotechnology Letters*, *34*(5), 795-803. https://doi.org/10.1007/s10529-011-0836-9

Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2022). Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *72*(1), 7-33. https://doi.org/10.3322/caac.21708

Siolas, D., & Hannon, G. J. (2013). Patient-Derived Tumor Xenografts: Transforming Clinical Samples into Mouse Models. *Cancer Research*, *73*(17), 5315-5319. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1069

Skrzypski, M., Dziadziuszko, R., Jassem, E., Szymanowska-Narloch, A., Gulida, G., Rzepko, R., Biernat, W., Taron, M., Jelitto-Górska, M., Marjański, T., Rzyman, W., Rosell, R., & Jassem, J. (2013). Main Histologic Types of Non–Small-Cell Lung Cancer Differ in Expression of Prognosis-related Genes. *Clinical Lung Cancer*, *14*(6), 666-673.e2. https://doi.org/10.1016/j.cllc.2013.04.010

Stieber, P., Dienemann, H., Hasholzner, U., Fabricius, P. G., Schambeck, C., Weinzierl, M., Poley, S., Samtleben, W., Hofmann, K., Meier, W., Untch, M., & Fateh-Moghadam, A. (1994). Comparison of Cyfra 21–1, Tpa and Tps in Lung Cancer, Urinary Bladder Cancer and Benign Diseases. *The International Journal of Biological Markers*, *9*(2), 82-88. https://doi.org/10.1177/172460089400900204

Sundström, B. E., & Stigbrand, T. I. (1994). Cytokeratins and Tissue Polypeptide Antigen. *The International Journal of Biological Markers*, *9*(2), 102-108. https://doi.org/10.1177/172460089400900207

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(3), 209-249. https://doi.org/10.3322/caac.21660

Suvarna, K. S., Layton, C., & Bancroft, J. D. (2019). *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques E-Book.*

Tacha, D., Yu, C., Bremer, R., Qi, W., & Haas, T. (2012). A 6-Antibody Panel for the Classification of Lung Adenocarcinoma Versus Squamous Cell Carcinoma. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, *20*(3), 201-207. https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e31823d7f0e

Tatnell, P. J., Powell, D. J., Hill, J., Smith, T. S., Tew, D. G., & Kay, J. (1998). Napsins: new human aspartic proteinases. *FEBS Letters*, *441*(1), 43-48. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01522-1

Taverna, J. A., Hung, C.-N., DeArmond, D. T., Chen, M., Lin, C.-L., Osmulski, P. A., Gaczynska, M. E., Wang, C.-M., Lucio, N. D., Chou, C.-W., Chen, C.-L., Nazarullah, A., Lampkin, S. R., Qiu, L., Bearss, D. J., Warner, S., Whatcott, C. J., Mouritsen, L., Wade, M., … Huang, T. H.-M. (2020). Single-Cell Proteomic Profiling Identifies Combined AXL and JAK1 Inhibition as a Novel Therapeutic Strategy for Lung Cancer. *Cancer Research*, *80*(7), 1551-1563. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-3183

Tentler, J. J., Tan, A. C., Weekes, C. D., Jimeno, A., Leong, S., Pitts, T. M., Arcaroli, J. J., Messersmith, W. A., & Eckhardt, S. G. (2012). Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *9*(6), 338-350. https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2012.61

Terry, J., Leung, S., Laskin, J., Leslie, K. O., Gown, A. M., & Ionescu, D. N. (2010). Optimal Immunohistochemical Markers For Distinguishing Lung Adenocarcinomas From Squamous Cell Carcinomas in Small Tumor Samples. *American Journal of Surgical Pathology*, *34*(12), 1805-1811. https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3181f7dae3

Tian, S. (2015). Identification of Subtype-Specific Prognostic Genes for Early-Stage Lung Adenocarcinoma and Squamous Cell Carcinoma Patients Using an Embedded Feature Selection Algorithm. *PLOS ONE*, *10*(7), e0134630. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134630

Tian, S., Wang, C., & An, M. W. (2015). Test on existence of histology subtype-specific prognostic signatures among early stage lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma patients using a Cox-model based filter. *Biology Direct*, *10*(1). https://doi.org/10.1186/s13062-015-0051-z

Tojo, M., Hamashima, Y., Hanyu, A., Kajimoto, T., Saitoh, M., Miyazono, K., Node, M., & Imamura, T. (2005). The ALK-5 inhibitor A-83-01 inhibits Smad signaling and epithelial-to-mesenchymal transition by transforming growth factor-β. *Cancer Science*, *96*(11), 791-800. https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2005.00103.x

Tong, D.-L., Zhang, D.-X., Xiang, F., Teng, M., Jiang, X.-P., Hou, J.-M., Zhang, Q., & Huang, Y.-S. (2012). Nicotinamide Pretreatment Protects Cardiomyocytes against Hypoxia-Induced Cell Death by Improving Mitochondrial Stress. *Pharmacology*, *90*(1-2), 11-18. https://doi.org/10.1159/000338628

Travis, W. D. (2012). Update on small cell carcinoma and its differentiation from squamous cell carcinoma and other non-small cell carcinomas. *Modern Pathology*, *25*, S18-S30. https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.150

Travis, W. D. (2020). Lung Cancer Pathology. *Clinics in Chest Medicine*, *41*(1), 67-85. https://doi.org/10.1016/j.ccm.2019.11.001

Travis, W. D., Brambilla, E., Nicholson, A. G., Yatabe, Y., Austin, J. H. M., Beasley, M. B., Chirieac, Lucian. R., Dacic, S., Duhig, E., Flieder, D. B., Geisinger, K., Hirsch, F. R., Ishikawa, Y., Kerr, K. M., Noguchi, M., Pelosi, G., Powell, C. A., Tsao, M. S., & Wistuba, I. (2015). The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors. *Journal of Thoracic Oncology*, *10*(9), 1243-1260. https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000630

Travis, W. D., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, A. G., Geisinger, K. R., Yatabe, Y., Beer, D. G., Powell, C. A., Riely, G. J., Van Schil, P. E., Garg, K., Austin, J. H. M., Asamura, H., Rusch, V. W., Hirsch, F. R., Scagliotti, G., Mitsudomi, T., Huber, R. M., Ishikawa, Y., … Yankelewitz, D. (2011). International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology*, *6*(2), 244-285. https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e318206a221

Travis, W. D., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, A. G., Geisinger, K., Yatabe, Y., Ishikawa, Y., Wistuba, I., Flieder, D. B., Franklin, W., Gazdar, A., Hasleton, P. S., Henderson, D. W., Kerr, K. M., Nakatani, Y., Petersen, I., Roggli, V., Thunnissen, E., & Tsao, M. (2013). Diagnosis of Lung Adenocarcinoma in Resected Specimens: Implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society Classification. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, *137*(5), 685-705. https://doi.org/10.5858/arpa.2012-0264-RA

Türker, E., Demirçak, N., & Arslan-Yildiz, A. (2018). Scaffold-free three-dimensional cell culturing using magnetic levitation. *Biomaterials Science*, *6*(7), 1745-1753. https://doi.org/10.1039/C8BM00122G

Ulukaya, E., Ozdikicioglu, F., Oral, A. Y., & Demirci, M. (2008). The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. *Toxicology in Vitro*, *22*(1), 232-239. https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.08.006

V Broers, J. L., S Ramaekers, F. C., Klein Rot, M., Oostendorp, T., Huysmans, A., P van Muijen, G. N., Sc Wagenaar, S., & Peter Vooijs, G. (1988). Cytokeratins in Different Types of Human Lung Cancer as Monitored by Chain-specific Monoclonal Antibodies1. Içinde *CANCER RESEARCH* (C. 48). http://aacrjournals.org/cancerres/article-pdf/48/11/3221/2431787/cr0480113221.pdf

Vantangoli, M. M., Madnick, S. J., Huse, S. M., Weston, P., & Boekelheide, K. (2015). MCF-7 Human Breast Cancer Cells Form Differentiated Microtissues in Scaffold-Free Hydrogels. *PLOS ONE*, *10*(8), e0135426. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135426

Varela, G., & Thomas, P. A. (2014). Surgical management of advanced non-small cell lung cancer. Içinde *Journal of Thoracic Disease* (C. 6, Sayı SUPPL.2). Pioneer Bioscience Publishing. https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2014.04.34

Vlachogiannis, G., Hedayat, S., Vatsiou, A., Jamin, Y., Fernández-Mateos, J., Khan, K., Lampis, A., Eason, K., Huntingford, I., Burke, R., Rata, M., Koh, D.-M., Tunariu, N., Collins, D., Hulkki-Wilson, S., Ragulan, C., Spiteri, I., Moorcraft, S. Y., Chau, I., … Valeri, N. (2018). Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers. *Science*, *359*(6378), 920-926. https://doi.org/10.1126/science.aao2774

VON DER MARK, K., GAUSS, V., VON DER MARK, H., & MÜLLER, P. (1977). Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature*, *267*(5611), 531-532. https://doi.org/10.1038/267531a0

Wadhawan, T., McEvoy, J., Prüβ, B. M., & Khan, E. (2010). Assessing tetrazolium and ATP assays for rapid in situ viability quantification of bacterial cells entrapped in

hydrogel beads. *Enzyme and Microbial Technology*, *47*(4), 166-173. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.05.003

Wang, H., Luo, X., Yao, L., Lehman, D. M., & Wang, P. (2015). Improvement of Cell Survival During Human Pluripotent Stem Cell Definitive Endoderm Differentiation. *Stem Cells and Development*, *24*(21), 2536-2546. https://doi.org/10.1089/scd.2015.0018

Wang, H.-M., Zhang, C.-Y., Peng, K.-C., Chen, Z.-X., Su, J.-W., Li, Y.-F., Li, W.-F., Gao, Q.-Y., Zhang, S.-L., Chen, Y.-Q., Zhou, Q., Xu, C., Xu, C.-R., Wang, Z., Su, J., Yan, H.-H., Zhang, X.-C., Chen, H.-J., Wu, Y.-L., & Yang, J.-J. (2023). Using patient-derived organoids to predict locally advanced or metastatic lung cancer tumor response: A real-world study. *Cell Reports Medicine*, *4*(2), 100911. https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100911

Wang, J., Li, X., & Chen, H. (2020). Organoid models in lung regeneration and cancer. *Cancer Letters*, *475*, 129-135. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.01.030

Wang, W., Hodkinson, P., McLaren, F., Mackean, M. J., Williams, L., Howie, S. E. M., Wallace, W. A. H., & Sethi, T. (2013). Histologic Assessment of Tumor-Associated CD45+ Cell Numbers Is an Independent Predictor of Prognosis in Small Cell Lung Cancer. *Chest*, *143*(1), 146-151. https://doi.org/10.1378/chest.12-0681

Warth, A., Muley, T., Herpel, E., Meister, M., Herth, F. J. F., Schirmacher, P., Weichert, W., Hoffmann, H., & Schnabel, P. A. (2012). Large-scale comparative analyses of immunomarkers for diagnostic subtyping of non-small-cell lung cancer biopsies. *Histopathology*, *61*(6), 1017-1025. https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2012.04308.x

Weigelt, B., & Reis-Filho, J. S. (2010). Molecular profiling currently offers no more than tumour morphology and basic immunohistochemistry. *Breast Cancer Research*, *12*(S4), S5. https://doi.org/10.1186/bcr2734

Weinstein, I. B., Gattoni-Celli, S., Kirschmeier, P., Lambert, M., Hsiao, W., Backer, J., & Jeffrey, A. (1984). Multistage carcinogenesis involves multiple genes and multiple mechanisms. *Journal of Cellular Physiology*, *121*(S3), 127-137. https://doi.org/10.1002/jcp.1041210416

Werner, R. S., Kirschner, M. B., & Opitz, I. (2021). Primary Lung Cancer Organoids for Personalized Medicine—Are They Ready for Clinical Use? *Cancers*, *13*(19), 4832. https://doi.org/10.3390/cancers13194832

Worthington, P., Pochan, D. J., & Langhans, S. A. (2015). Peptide Hydrogels – Versatile Matrices for 3D Cell Culture in Cancer Medicine. *Frontiers in Oncology*, *5*. https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00092

Xin, X., Yang, H., Zhang, F., & Yang, S.-T. (2019). 3D cell coculture tumor model: A promising approach for future cancer drug discovery. *Process Biochemistry*, *78*, 148-160. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.12.028

Xu, B., Abourbih, S., Sircar, K., Kassouf, W., Aprikian, A., Tanguay, S., & Brimo, F. (2014). Diagnostic and Prognostic Role of Immunohistochemical Expression of Napsin-A Aspartic Peptidase in Clear Cell and Papillary Renal Cell Carcinoma. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, *22*(3), 206-212. https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e31828ef24e

Xu, H., Lyu, X., Yi, M., Zhao, W., Song, Y., & Wu, K. (2018). Organoid technology and applications in cancer research. *Journal of Hematology & Oncology*, *11*(1), 116. https://doi.org/10.1186/s13045-018-0662-9

Yamada, K. M., & Cukierman, E. (2007). Modeling Tissue Morphogenesis and Cancer in 3D. *Cell*, *130*(4), 601-610. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.006

Yatabe, Y., Dacic, S., Borczuk, A. C., Warth, A., Russell, P. A., Lantuejoul, S., Beasley, M. B., Thunnissen, E., Pelosi, G., Rekhtman, N., Bubendorf, L., Mino-Kenudson, M., Yoshida, A., Geisinger, K. R., Noguchi, M., Chirieac, L. R., Bolting, J., Chung, J.-H., Chou, T.-Y., … Moreira, A. L. (2019). Best Practices Recommendations for Diagnostic Immunohistochemistry in Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, *14*(3), 377-407. https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.12.005

Yoda, S., Dagogo-Jack, I., & Hata, A. N. (2019). Targeting oncogenic drivers in lung cancer: Recent progress, current challenges and future opportunities. *Pharmacology & Therapeutics*, *193*, 20-30. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.08.007

Yokota, J. (2000). Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis*, *21*(3), 497-503. https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.497

Yokota, T. (2021). Vehicle localisation by altitude data matching in spatial domain and its fusion with dead reckoning. *International Journal of Mechatronics and Automation*, *8*(4), 208. https://doi.org/10.1504/IJMA.2021.120379

Zamecnik, J., & Kodet, R. (2002). Value of thyroid transcription factor-1 and surfactant apoprotein A in the differential diagnosis of pulmonary carcinomas: a study of 109 cases. *Virchows Archiv*, *440*(4), 353-361. https://doi.org/10.1007/s00428-001-0552-2

Zhang, F., Lau, S. S., & Monks, T. J. (2011). The Cytoprotective Effect of N-acetyl-L-cysteine against ROS-Induced Cytotoxicity Is Independent of Its Ability to Enhance Glutathione Synthesis. *Toxicological Sciences*, *120*(1), 87-97. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq364

Zhang, J., Fujimoto, J., Zhang, J., Wedge, D. C., Song, X., Zhang, J., Seth, S., Chow, C.-W., Cao, Y., Gumbs, C., Gold, K. A., Kalhor, N., Little, L., Mahadeshwar, H., Moran, C., Protopopov, A., Sun, H., Tang, J., Wu, X., … Futreal, P. A. (2014). Intratumor heterogeneity in localized lung adenocarcinomas delineated by multiregion sequencing. *Science*, *346*(6206), 256-259. https://doi.org/10.1126/science.1256930

Zhang, R., Chen, H. J., Wei, B., Zhang, H. Y., Pang, Z. G., Zhu, H., Zhang, Z., Fu, J., & Bu, H. (2010). Reproducibility of the Nottingham modification of the Scarff-Bloom-Richardson histological grading system and the complementary value of Ki-67 to this system. *Chinese Medical Journal*, *123*(15), 1976-1982. https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2010.15.005

Zhang, Y. S., Duchamp, M., Oklu, R., Ellisen, L. W., Langer, R., & Khademhosseini, A. (2016). Bioprinting the Cancer Microenvironment. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, *2*(10), 1710-1721. https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00246

Zhang, Z., Wang, H., Ding, Q., Xing, Y., Xu, Z., Lu, C., Luo, D., Xu, L., Xia, W., Zhou, C., & Shi, M. (2018). Establishment of patient-derived tumor spheroids for non-small cell lung cancer. *PLOS ONE*, *13*(3), e0194016. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194016

Zhao, Z., Chen, X., Dowbaj, A. M., Sljukic, A., Bratlie, K., Lin, L., Fong, E. L. S., Balachander, G. M., Chen, Z., Soragni, A., Huch, M., Zeng, Y. A., Wang, Q., & Yu, H. (2022). Organoids. *Nature Reviews Methods Primers*, *2*(1), 94. https://doi.org/10.1038/s43586-022-00174-y

Zheng, M. (2016). Classification and Pathology of Lung Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*, *25*(3), 447-468. https://doi.org/10.1016/j.soc.2016.02.003

Zhou, J., Su, J., Fu, X., Zheng, L., & Yin, Z. (2017). Microfluidic device for primary tumor spheroid isolation. *Experimental Hematology & Oncology*, *6*(1), 22. https://doi.org/10.1186/s40164-017-0084-3

Zhou, L., Lim, L., Costa, R. H., & Whitsett, J. A. (1996). Thyroid transcription factor-1, hepatocyte nuclear factor-3beta, surfactant protein B, C, and Clara cell secretory protein in developing mouse lung. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, *44*(10), 1183-1193. https://doi.org/10.1177/44.10.8813084