ÜÇ BOYUTLU ORGANOTİPİK TÜMÖR MODELLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ, KARAKTERİZASYONU VE İLAÇ YANITLARININ ARAŞTIRILMASI

Sibel ÇINAR ASA

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÜÇ BOYUTLU ORGANOTİPİK TÜMÖR MODELLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ, KARAKTERİZASYONU VE İLAÇ YANITLARININ ARAŞTIRILMASI

Sibel ÇINAR ASA
0000-0002-3064-6449

Prof. Dr. Ferda ARI
(Danışman)

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2024
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

ÜÇ BOYUTLU ORGANOTİPİK TÜMÖR MODELLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ, KARAKTERİZASYONU VE İLAÇ YANITLARININ ARAŞTIRILMASI

Sibel ÇINAR ASA

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ferda ARI

Akciğer kanseri, küresel mortalite oranlarında üst sıralarda yer alarak yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Bu bağlamda, üç boyutlu (3B) hücre kültürü yöntemleri, kanser biyolojisine yönelik *in vitro* ve klinik çalışmalar arasındaki ilaç yanıtı farklılıklarını ortadan kaldırabilmesi ve kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından önemlidir.

Bu çalışmanın amacı, akciğer kanseri için yeni 3B organotipik tümör modelleri geliştirmek, tümör oluşumu ve inhibisyon mekanizmalarını incelemek ve ilaç yanıtlarını değerlendirmektir. A549 ve H1299 akciğer kanseri hücreleri kullanılarak 3B tümör modelleri oluşturulmuş ve karakterize edilmiştir. Öncelikle Niklozamid'in çeşitli kemoterapötikler (Setuksimab, Holoxan, Pemetrexed, Cisplatin, Doksorubisin, Caelyx, 5-Flurourasil, Paklitaksel, Dosetaksel, Gemsitabin), Klorokin ve Resveratrol ile kombinasyonları 2B hücre kültüründe incelenmiştir. Kombinasyonlar arasında etkili bulunan Niklozamid ve Dosetaksel kombinasyonunun canlılık üzerine etkileri SRB ve ATP testleri, hücre ölüm modu (üçlü floresan boyama ve Z-VAD-FMK inhibitör analizleri), hücre göçü (yara iyileşmesi), koloni oluşturma yeteneği (koloni oluşturma analizi), western blot analizleri ve immünositokimya analizleri (hematoksilen-eozin ve Ki-67 boyamaları) ve ko-kültür çalışmaları kapsamında tümör mikroçevresinin etkileri değerlendirilmiştir. Niklozamid-Dosetaksel kombinasyonunun hücre canlılığı üzerinde monoterapötik etkilere göre daha güçlü bir etki gösterdiği ve tümör yapısında belirgin bozulmaya yol açtığı gözlemlenmiştir. Mikroskobik ve inhibitör analizleri, apoptotik hücre ölümü varlığını ortaya koymuş; Western blot analizleri ise apoptoz ile ilişkili proteinlerden DR-4, kaspaz-8, k-PARP'ta artış ve Bcl-2'de azalma göstermiştir. Ayrıca, kombinasyonun hücre göçünü azalttığı ve koloni oluşturma kapasitesini engellediği tespit edilmiştir. İmmünositokimya analizleriyle tümör zonları belirlenmiş kombinasyonun etkisi ile tümör inhibisyonunun gerçekleştiği tayin edilmiştir. Ko-kültür çalışmaları canlılığın tümör mikroçevresi etkisiyle arttığını göstermiştir.

Bu bulgular, akciğer kanserinde kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yönelik daha fazla araştırmanın gerekliliğini ortaya koymaktadır. Gelecek araştırmalar, ek ilaç kombinasyonları, farklı hücre tipleri ve 3B tümör modelleri ile *in vitro*'dan *in vivo*'ya geçişteki potansiyelini artırmayı hedeflemektedir.

Anahtar Kelimeler: Akciğer Kanseri, 3B Hücre kültürü, Niklozamid, Dosetaksel
2024, xxii + 133 sayfa.

ABSTRACT

PhD Thesis

DEVELOPMENT OF THREE-DIMENSIONAL ORGANOTYPIC TUMOR MODELS, CHARACTERIZATION, AND INVESTIGATION OF DRUG RESPONSE

Sibel ÇINAR ASA

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

Supervisor: Prof. Dr. Ferda ARI

Lung cancer is a leading cause of global mortality, necessitating new therapeutic approaches. Three-dimensional (3D) cell culture methods are significant for bridging the gap between in vitro and clinical studies, mitigating drug response differences, and developing personalized treatment strategies.

This study aims to develop new 3D organotypic tumor models for lung cancer, investigate tumor formation and inhibition mechanisms, and evaluate drug responses. Using A549 and H1299 lung cancer cells, a new 3D tumor model was created and characterized. Combinations of Niclosamide with various chemotherapeutics (Cetuximab, Ifosfamide, Pemetrexed, Cisplatin, Doxorubicin, Caelyx, 5-Fluorouracil, Paclitaxel, Docetaxel, Gemcitabine), Chloroquine, and Resveratrol were examined in 2D cell culture. The effects of the Niclosamide-Docetaxel combination on cell viability were assessed using SRB and ATP assays, cell death mode (triple fluorescent staining and Z-VAD-FMK inhibitor analyses), cell migration (wound healing), colony-forming ability (colony-forming assay), western blot, and immunohistochemistry analyses. Tumor microenvironment effects were evaluated in co-culture studies.

The Niclosamide-Docetaxel combination showed a stronger effect on cell viability compared to monotherapy, significantly disrupting tumor architecture. Microscopic and inhibitor analyses revealed apoptotic cell death; Western blot analyses showed increases in DR-4, caspase-8, cleaved PARP, and a decrease in Bcl-2. Additionally, the combination reduced cell migration and inhibited colony formation. Immunocytochemistry identified tumor zones and confirmed tumor inhibition. Co-culture studies showed increased viability influenced by the tumor microenvironment.

These findings highlight the need for further research to develop personalized treatment strategies in lung cancer. Future studies will focus on additional drug combinations, different cell types, and 3D tumor models to enhance the transition from *in vitro* to *in vivo.*

Keywords: Lung Cancer, 3D Cell Culture, Niclosamide, Docetaxel

2024, xxii+ 133 pages.

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarımda danışmanlığımı yapan, doktora sürecinin düzenli işleyişi için büyük özveri gösteren, her zaman anlayışla ve sabırla arkamda durup ilerlemem için her daim desteğini benden esirgemeyen, fikirleri ve bilimsel yaklaşımı ile bana ilham kaynağı olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Ferda ARI'ya sonsuz teşekkürler.

Tez komitemde yer alan Doç. Dr. Egemen DERE ve Dr. Öğr. Üyesi Elif UZ YILDIRIM'a bana ayırdıkları zamanları, destekleri ve tezimle ilgili çok değerli önerileri için teşekkür ederim. Tez çalışmam boyunca bilgi, deneyim ve önerilerini benimle paylaşarak bana yol göstermiş olan tüm Bursa Uludağ Moleküler Kanser Araştırma Laboratuvarı (BUMKAL) aileme teşekkür ederim.

Doktora eğitimimde maddi desteğini aldığım YÖK 100/2000 Moleküler Farmakoloji ve İlaç Araştırmaları Öncelikli Alan Doktora Burs Programına ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (Tübitak) 2211-C 'Biyoteknolojik İlaç Teknolojileri' Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programına teşekkür ederim.

Tez çalışmamda kullandığım Dosetaksel kemoterapötik ilacın bağışı için GENSENTA şirketine ve özellikle AR-GE Sağlık Politikaları Kurumsal İlişkiler Direktörü sayın Dr. Bilgen DÖLEK'e teşekkür ederim.

Tezimin tamamlanabilmesi için proje desteği sağlayan "123954'' nolu ARDEB 1002B projesi için Tübitak ve FDK-2022-1043 nolu Lisans Üstü Proje (LTP) desteği sağlayan Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine ayrı ayrı teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyip hiçbir fedakarlıktan kaçınmayarak her zaman yanımda olup tüm zor zamanlarımda devam etmem için beni cesaretlendiren, düştüğümde beni kaldıran, yorulduğumda enerjileriyle beni güçlendiren canım annem Gülhen ÇINAR, ablalarım Şenan ve Nalan ÇINAR'a sonsuz teşekkürler.

Yıllar sonra bir kez daha başlamak istediğimde ben senin her zaman arkandayım diyerek doktora serüvenime yeniden başlamama vesile olan ve bu altı yıllık serüvenin en zorlu dönemlerinde beni cesaretlendirerek güç veren, birlikte nice dağları aştığımız sevgili eşim Murat ASA'ya sonsuz teşekkürler. Bu tezi, ailem, eşim, kızlarım Merve ve Defne Su'ya ithaf ediyorum.

Sibel ÇINAR ASA
06/ 08/2024

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET……viii
ABSTRACT……ix
TEŞEKKÜR……x
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ……xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ……xvii
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI……3
2.1 Kanser……3
2.2 Akciğer Kanseri……4
2.2.1 Akciğer Kanserinin Histopatolojik Sınıflandırılması……5
2.3 Akciğer Kanserinde Moleküler Sinyal Yolakları……9
2.3.1. EGFR (Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü) Sinyal Yolağı……9
2.3.2 KRAS (Kirsten Ras Sarkoma Viral Onkogen) Sinyal Yolağı……11
2.3.3 PI3K/AKT/mTOR Sinyal Yolağı……12
2.3.4 ALK (Anaplastik Lenfoma Kinaz) Sinyal Yolağı……13
2.3.5 ROS1 (Proto-Onkogene Tirozin-Protein Kinaz) Sinyal Yolağı……14
2.3.6 BRAF (B Raf Protoonkogen Treonin Kinaz) Sinyal Yolağı……15
2.3.7 MET Sinyal Yolağı……16
2.3.8 RET (Transfeksiyon Sırasında Yeniden Düzenlenmiş) Sinyal Yolağı……18
2.3.9 TP53 (Tümör Protein 53) Sinyal Yolağı……19
2.3.10 WNT (Wingless-İlişkili Entegrasyon Yeri Proteini) Sinyal Yolağı……21
2.4 Kanser Araştırmalarında Gelişmiş Hücre Kültürü……24
2.5 Üç Boyutlu (3B) Hücre Kültürü Sistemleri……25
2.5.1 Asılı Damla (Hanging Drop)……26
2.5.2 Ultra- Düşük Yapışma 'ULA' Plakalar……27
2.5.3 Manyetik Levitasyon……28
2.5.4 Mikroakışkan Çip Teknolojileri……29
2.5.5 Sferoidler……29
2.5.6 Organoidler……30
2.5.7 Üç Boyutlu (3B) Biyobasım……32
2.5.8 Ko-kültür sistemleri……33
2.6 2B ve 3B Hücre Kültüründe Avantajlar ve Dezavantajlar……34
2.7 Matrigel……36
3. MATERYAL ve YÖNTEM……37
3.1 Materyal……37
3.1.1 Kimyasal Maddeler……37
3.1.3 Cihazlar……39
3.1.4 Kitler……40
3.2 Yöntem……40
3.2.1 Hücre Kültürü……40
3.2.2 Asılı Damla "Hanging Drop" Tekniği ile Hücre Agregatı Oluşturulması……43
3.2.3 Hücre Agregatlarının Matrigele Gömülmesi……43
3.2.4 Üç Boyutlu Organotipik Akciğer Tümör Modellerinin Karakterizasyonu……44
3.2.5 Üç Boyutlu Organotipik Akciğer Tümör Modellerininin Histolojik Analizi……45
3.2.6 Kullanılan Kemoterapötik ve Diğer Ajanların Hazırlanması……48
3.2.7 Sülforodamin B (SRB) Hücre Canlılık Yöntemi……48

3.2.8 Adenozin Trifosfat (ATP) Hücre Canlılık Yöntemi……49
3.2.9 Koloni Oluşturma Analizi……...50
3.2.10 Yara İyileşmesi 'Wound Healing' Analizi……51
3.2.11 Phalloidin Boyaması ile Aktin Filametlerin Belirlenmesi……51
3.2.12 Üçlü Floresan Boyama……..52
3.2.13 Apoptotik Hücre Ölümünün Pan Kaspaz İnhibitörü ile Doğrulanması……52
3.2.14 Western Blot Analizi……53
3.2.15 Üç Boyutlu Organotipik Akciğer Tümör Modellerinde Ko-kültür Çalışmaları…56
3.2.16 İstatiksel Analizler……57
4 BULGULAR……58
4.1 Akciğer Kanser ve Sağlıklı Hücrelerinin Kültüre Edilmesi……58
4.2 Üç Boyutlu Akciğer Organotipik Tümör Modellerinin Oluşturulması……..59
4.2.1 Asılı Damla Tekniği Kullanılarak Hücre Agregatlarının Oluşturulması……59
4.2.2 Asılı Damla Tekniği Kullanılarak Hücre Agregatlarının Oluşturulmasında Hücre Sayısının Optimizasyonu……59
4.2.3 Asılı Damla Tekniği Kullanılarak Hücre Agregatlarının Oluşturulma Süresinin Optimizasyonu……60
4.2.4 Matrigele Gömme...……60
4.2.5. Sağlıklı Akciğer Epitel Hücrelerinde 3B Organotipik Model Oluşmaması Bulguları……..62
4.3 İlaç Araştırmaları Bulguları……...63
4.3.1 Etkili İlaç Kombinasyonunun Belirlenmesi……63
4.3.2 Niklozamidin A549 ve H1299 Akciğer Kanser Hücreleri Üzerinde Etkili Dozun ve Süresinin Belirlenmesi……71
4.3.3 Dosetakselin A549 ve H1299 Akciğer Kanser Hücreleri Üzerinde Etkili Dozun ve Süresinin Belirlenmesi……74
4.3.4 Niklozamid, Dosetaksel ve İkili Kombinasyonunun Sağlıklı Akciğer Epitelyal (Beas-2B) Hücrelerinde Canlılığa Etkisinin Belirlenmesi……...77
4.4 Niklozamid ve Dosetaksel Kombinasyon Tedavisinin A549 ve H1299 Akciğer Kanser Hücreleri Üzerinde Sebep Olduğu Hücre Ölümü Modunun Belirlenmesi……..78
4.5 Niklozamid ve Dosetaksel Kombinasyon Tedavisinin A549 ve H1299 Akciğer Kanser Hücreleri Üzerinde Sebep Olduğu Hücre Ölümü Modunun Doğrulanması…...81
4.6 Niklozamid ve Dosetaksel Kombinasyon Tedavisinin A549 ve H1299 Akciğer Kanser Hücreleri Üzerindeki Morfolojik Değişikliklerin Floresan Mikroskopi İle Belirlenmesi……82
4.7 Niklozamid ve Dosetaksel Kombinasyon Tedavisinin A549 ve H1299 3B Organotipik Tümör Modellerinde Hücre Canlılığına Etkisinin ATP Analizi ile Belirlenmesi…….85
4.8 Niklozamid ve Dosetaksel Kombinasyon Tedavisinin A549 ve H1299 3B Organotipik Tümör Modellerinde Tümör Morfolojisine Etkisinin Mikroskopik Olarak İncelenmesi.87
4.9 Niklozamid ve Dosetaksel Kombinasyon Tedavisinin A549 ve H1299 Hücre Soylarında Hücre Göçüne (Migrasyon) Etkisinin Belirlenmesi……..89
4.10 Niklozamid ve Dosetaksel Kombinasyon Tedavisinin A549 ve H1299 Hücre Soylarında Koloni Oluşturma Yeteneğine Etkisinin Belirlenmesi……..90
4.11 Niklozamid ve Dosetaksel Kombinasyon Tedavisinin A549 ve H1299 3B Organotipik Tümör Modellerinde Sebep Olduğu Hücre Ölümü Modunun Üçlü Floresan Boyama ile Belirlenmesi……..92

4.12 Niklozamid ve Dosetaksel Kombinasyon Tedavisinin A549 ve H1299 3B Organotipik Tümör Modellerinde Hücre Ölüm Markırlarının Western Blot Analizi İle Belirlenmesi…….94
4.13 Niklozamid, Dosetaksel ve İkili Kombinasyon Tedavisinin A549 ve H1299 3B Organotipik Tümör Modellerinde Sferoid Yapısına Etkisinin Hematoksilen ve Eozin Boyaması ile Belirlenmesi……...96
4.14 Niklozamid ve Dosetaksel Kombinasyon Tedavisinin A549 ve H1299 3B Organotipik Tümör Modellerinde Sferoid Yapısına Etkisinin Ki-67 İmmünositokimya İle Belirlenmesi…….97
4.15 3B Organotipik Tümör Modellerinde Ko-Kültür Oluşturulması…….99
5. TARTIŞMA VE SONUÇ……..105
KAYNAKLAR……..113
EK-1 BSA Standard Eğri Grafiği……...131
EK-2 Gensenta Şirketi Teşekkür Mektubu……132
ÖZGEÇMİŞ……...133

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	**Açıklama**
A	Alfa
B	Beta
µM	Mikromolar
nM	nanomolar
nm	nanometre
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
µg	Mikrogram
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
w/v	Ağırlık/Hacim
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
cm2	Santimetrekare
mm	Milimetre
dk	Dakika
sn	Saniye
V	Volt
Abs	Absorbans
W	Watt
Sa	Saat
pH	Hidrojenin Gücü
g	Yerçekimi
gr	Gram

Kısaltmalar	**Açıklama**
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ADC	Adenokarsinoma
ALK	Anaplastik Lenfoma Kinaz
AKT	Protein Kinaz B
AMP	Adenozin Monofosfat
Aneksin-V-FITC	Aneksin 5-Floresein İzotiyosinat
ASK	Adenoskuamöz Karsinom
ATP	Adenozin Trifosfat
Atg3	Otofaji İlişkili Gen 3
A549	Akciğer Adenokarsinom Hücre Hattı
BCA	Bikinkoninik Asit Analizi
Bcl-2	B Hücre Lenfoma-2 Proteini
BRAF	B Raf Protoonkogen Treonin Kinaz
BSA	Bovin Serum Albumin
CAF	Kanser İlişkili Fibroblast
CaMKII	Kalsiyum Kalmodulin Bağımlı Kinaz Iı
CCDC6	Sarmal Koil Domain İçeren Protein 6
CD56	Diferansiyasyon Kümesi 56 Yüzey Proteini

c-MYC	Myc Protoonkogeni
CO2	Karbondioksit
Cu^{+2}	Bakır (II)
CTC	Dolaşan Tümör Hücreleri
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagles Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DR-4	Ölüm Reseptörü-4
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DTX	Dosetaksel
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ECM	Ekstrasellüler Matriks
ERB	Eritroblastik Lösemi Viral Onkogen Homoloğu
ERK	Ekstrasellüler Sinyal Düzenleyici Kinaz
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm Tümörü
FBS	Fötal Bovin Serumu
FHIT	Hassas Histidin Üçlüsü Geni
GAPDH	Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz
Grb2	Büyüme Faktörü Reseptörü Bağlı Protein 2
GPCR	G Proteini Bağlı Reseptör
GTPaz	Guanozin 3 Posfataz
HeLa	Henrietta Lacks Servikal Hücre Hattı
HER2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
HER7	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 7
HRP	Horse Radish Peroksidaz
H1299	Akciğer Kanseri Hücre Hattı
H202	Hidrojen Peroksit
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Kurumu
JAK-STAT	Janus Kinaz-Sinyal Transdüktörü Ve Transkripsiyon Aktivatörü
JNK	Janus Kinaz Ailesi
KHAK	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
KKH	Kanser Kök Hücre
Ki-67	Hücre Proliferasyon Markırı
KRAS	Kirsten Ras Sarkoma Viral Onkogen
KRAS G12C	Kras G12C Mutasyonu
LDS	Lityum Dodesil Sülfat
LGR5	Lösin Açısından Zengin Tekrarlar İçeren Gprotein Bağlı Reseptör 5
LRP 5\6	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Reseptörüne İlişkin Protein 5/6
MAPK	Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz
MEK	Mitojen Aktive Edici Protein Kinaz
MDM2	Mouse Double Minute 2 Proteini
Mg^{+2}	Magnezyum (II)
MRC-5	Akciğer Fibroblast Hücre Hattı
MRP1	Çoklu İlaç Direnci İle İlişkili Protein 1
mTOR	Mammalian Target Of Rapamycin

mTORC1	Mtor C1 Protein Kinaz
mTORC2	Mtor C2 Protein Kinaz
NİK	Niklozamid
PARP	Poli ADP-Riboz Polimeraz
PCP	Planar Hücre Polaritesi
PDO	Hasta Kaynaklı Organoid
PI	Propidyum İyodür
PI3K	Fosfotidilinositol-3-Kinaz
PIP2	Fosfotidil İnositol 4,5-Bifosfat
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-Trisfosfat
PKC	Protein Kinaz C
PMSF	Fenilmetil Sülfonil Florür
PS	Fosfatidil Serin
Rac1	Ras İlişkili Küçük GTPaz 1
RAF	MAPK Yolağı Proteini
RAS	MAPK Yolağı Proteini
RB1	Retinoblastoma 1 Proteini
RET	Transfeksiyon Sırasında Yeniden Düzenlenmiş Protoonkogen
RIPA	Radio İmmünopresipitasyon Analiz
RIPK1	Reseptör İlişkili Serin Treonin Kinaz
RLU	Relatif Işık Ünitesi
Rho A	Ras Homoloji Ailesi
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
ROS1	Ros1 Tirozin Kinaz
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PCP	Planar Hücre Polaritesi
P40	P63ün İzoformu
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
Shc	Src Homoloğu Adaptör Protein
S6K	Ribozomal Protein S6 Kinaz
TBST	Tween-20 İçeren Tamponlanmış Tris
TCA	Trikloro Asetik Asit
TCF-LEF	T-Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor
TCER	Tümör Hücresi Ekstraksiyon Reaktifi
TDC	Test İlaç Konsantrasyonu
TKI	Tirozin Kinaz İnhibitörü
TAM	Tümörle İlişkili Makrofaj
TKR	Tirozin Kinaz Reseptörü
TP53	Tümör Protein 53
TTF-1	Tiroid Transkripsiyon Faktör-1
ULA	Ultra Düşük Yapışma
WNT	Wingless-İlişkili Entegrasyon Yeri Proteini
Z-VAD-FMK	Benziloksikarbonil(Cbz)-L-Val-Ala-Asp(Ome)-Fluorometilketon
2B	İki Boyutlu
3B	Üç Boyutlu
4EBP1	4E Bağlanma Proteini 1
5-FU	5-Fluoro Urasil

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 2.1	Kanserin temel özellikleri	3
Şekil 2.2	Kadın ve Erkeklerde 2023 GLOBOCAN tahmin edilen yeni kanser vakaları ve ölüm oranları	4
Şekil 2.3	KHDAK alt tipleri	7
Şekil 2.4	KHDAK'da EGFR sinyal yolağı	10
Şekil 2.5	KHDAK'da KRAS sinyal yolağı	12
Şekil 2.6	KHDAK'da PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı	13
Şekil 2.7	KHDAK'da ALK sinyal yolağı	14
Şekil 2.8	KHDAK'da ROS1 sinyal yolağı	15
Şekil 2.9	KHDAK'da BRAF sinyal yolağı	16
Şekil 2.10	KHDAK'da MET sinyal yolağı	18
Şekil 2.11	KHDAK'da RET sinyal yolağ	19
Şekil 2.12	KHDAK'da p53 sinyal yolağı	21
Şekil 2.13	KHDAK'da WNT sinyal yolağı. A) Kanonik yol B) Kanonik olmayan yollar	23
Şekil 2.14	2B ve 3B hücre kültüründeki farklılıklar	35
Şekil 3.1	Hanging drop tekniği ile multiselüler sferoid oluşturulması	43
Şekil 3.2	Üç Boyutlu Organotipik Tümör Modellerinin oluşturulma basamakları	44
Şekil 3.3	Semi-dry western blot transfer sistemi	55
Şekil 3.4	3B Organotipik tümör modelleri ve MRC-5 sağlıklı akciğer fibroblast hücreleri ile oluşturulan ko-kültür ortamı	57
Şekil 4.1	Tez çalışmasında kullanılan akciğer epitel karsinoma (A549, H1299), sağlıklı akciğer bronşiyal epitelyal (Beas-2B) ve sağlıklı akciğer fibroblast (MRC-5) hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri (100X)	58
Şekil 4.2	A549 ve H1299 hücrelerinin asılı damla tekniği ile hazırlanmış farklı sayılardaki ekimlerle 3 günde oluşmuş hücre agregatlarının ışık mikroskopisi görüntüleri (40X)	59
Şekil 4.3	A549 ve H1299 akciğer karsinom hücrelerinde asılı damla tekniği kullanılarak oluşturulan agregatlarda inkübasyon süresinin (3-20 gün) agregat büyüklüğüne etkisi. Büyütme 100x	60
Şekil 4.4	A549 ve H1299 akciğer organotipik tümör modellerinin Matrigelde gömülü kalma süresinin sfer morfolojisi üzerindeki etkisinin ışık mikroskopu görüntüleri (2, 4 ve 7 gün) (100x)	61
Şekil 4.5	Üç boyutlu akciğer organotipik tümör modeli oluşturulma basamakları	62
Şekil 4.6	Sağlıklı Akciğer Epitel Hücresi BEAS-2B'nin asılı damla (3 gün) (A) ve Matrigel Görüntüsü (4 gün) (B) (40X)	62
Şekil 4.7	A549 ve H1299 akciğer kanser hücrelerinde Niklozamid (Nik) (0,625-1µM) ve Setuksimab (100µM)	63

	kombinasyonunun uygulanmasının (48Sa) hücre canlılığına etkisinin SRB canlılık analizi ile tayini	
Şekil 4.8	A549 ve H1299 akciğer kanser hücrelerinde Niklozamid (Nik) (0,625-1µM) ve Pemetrexed (25µM) kombinasyonunun uygulanmasının (48Sa) hücre canlılığına etkisinin SRB canlılık analizi ile tayini	64
Şekil 4.9	A549 ve H1299 akciğer kanser hücrelerinde Niklozamid (Nik) (0,625-1µM) ve Doksorubisin (0,92 µM) kombinasyonunun uygulanmasının (48Sa) hücre canlılığına etkisinin SRB canlılık analizi ile tayini	65
Şekil 4.10	A549 ve H1299 akciğer kanser hücrelerinde Niklozamid (Nik) (0,625-1µM) ve Caelyx (0,92µM) kombinasyonunun uygulanmasının (48Sa) hücre canlılığına etkisinin SRB canlılık analizi ile tayini	65
Şekil 4.11	A549 ve H1299 akciğer kanser hücrelerinde Niklozamid (Nik) (0,625-1µM) ve Holoxan (100µM) kombinasyonunun uygulanmasının (48Sa) hücre canlılığına etkisinin SRB canlılık analizi ile tayini	66
Şekil 4.12	A549 ve H1299 akciğer kanser hücrelerinde Niklozamid (Nik) (0,625-1µM) ve Cisplatin (12,66µM) kombinasyonunun uygulanmasının (48Sa) hücre canlılığına etkisinin SRB canlılık analizi ile tayini	67
Şekil 4.13	A549 ve H1299 akciğer kanser hücrelerinde Niklozamid (Nik) (0,625-1µM) ve Gemsitabin (95µM) kombinasyonunun uygulanmasının (48Sa) hücre canlılığına etkisinin SRB canlılık analizi ile tayini	68
Şekil 4.14	A549 ve H1299 akciğer kanser hücrelerinde Niklozamid (Nik) (0,625-1µM) ve 5-FU (172,97µM) kombinasyonunun uygulanmasının (48 saat) hücre canlılığına etkisinin SRB canlılık analizi ile tayini	68
Şekil 4.15	A549 ve H1299 akciğer kanser hücrelerinde Niklozamid (Nik) (0,625-1µM) ve Paklitaksel (15,93µM) kombinasyonunun uygulanmasının (48Sa) hücre canlılığına etkisinin SRB canlılık analizi ile tayini	69
Şekil 4.16	A549 ve H1299 akciğer kanser hücrelerinde Niklozamid (Nik) (0,625-1µM) ve Dosetaksel (14µM) kombinasyonunun uygulanmasının (48Sa) hücre canlılığına etkisinin SRB canlılık analizi ile tayin	70
Şekil 4.17	A549 ve H1299 akciğer kanser hücrelerinde Niklozamid (Nik) (0,625-1µM) ve Klorokin (2,5µM) kombinasyonunun uygulanmasının (48Sa) hücre canlılığına etkisinin SRB canlılık analizi ile tayini	70
Şekil 4.18	A549 ve H1299 akciğer kanser hücrelerinde Niklozamid (Nik) (0,625-1 µM) ve Resveratrol (50 µM) kombinasyonunun uygulanmasının (48 saat) hücre canlılığına etkisinin SRB canlılık analizi ile tayini	71

Şekil 4.19	A549 ve H1299 hücrelerinin Niklozamid (0-20µM) ile 24, 48 ve 72 saat muamelesi ile SRB hücre canlılık analizi sonuçları	72
Şekil 4.20	A549 hücrelerinin Niklozamidle (0-5µM) 72 Sa muamelesi ardından SRB ile boyanması görüntüleri (40X)	73
Şekil 4.21	H1299 hücrelerinin Niklozamidle (0-5µM) 72 Sa muamelesi ardından SRB ile boyanması görüntüleri (40X)	73
Şekil 4.22	A549 ve H1299 hücrelerinin Dosetaksel ile 72 saat muamelesi ile SRB hücre canlılık analizi sonuçları	74
Şekil 4.23	A549 ve H1299 hücrelerinin Niklozamid (Nik), (0,625µM) ve Dosetaksel (Dtx) (0-28µM) ile 72 saat muamelesi ile SRB hücre canlılık analizi sonuçları	76
Şekil 4.24	A549 hücrelerinin Niklozamid (0,625µM) ve Dosetaksel (Dtx)(0-14µM) ikili kombinasyonu ile 72Sa muamelesi sonucu SRB ile boyaması mikroskop görüntüleri (100X)	77
Şekil 4.25	H1299 hücrelerinin Niklozamid (0,625µM) ve Dosetaksel (Dtx), (0-14µM) ikili kombinasyonu ile 72Sa muamelesi sonucu SRB ile boyaması mikroskop görüntüleri (100X)	77
Şekil 4.26	Niklozamid (0-5µM), Dosetaksel (0-28µM) ve ikili kombinasyonunun sağlıklı akciğer epitel hücrelerinde (Beas-2B) 24, 48 ve 72Sa SRB hücre canlılık analizi	78
Şekil 4.27	A549 akciğer kanseri hücrelerinin Niklozamid (0,625µM), Dosetaksel (0,44 ve 1,76µM) ve ikili kombinasyonları ile 48Sa tedavi sonrasında Hoechst 33342 (mavi), Annexin-V-FITC (yeşil) ve PI (kırmızı) üçlü floresan boyaması görüntüleri. Büyütme 200X	79
Şekil 4.28	H1299 akciğer kanseri hücrelerinin Niklozamid (0,625µM), Dosetaksel (0,44 ve 1,76µM) ve ikili kombinasyonları ile 48Sa tedavi sonrasında Hoechst 33342 (mavi), Annexin-V-FITC (yeşil) ve PI (kırmızı) üçlü floresan boyaması görüntüleri. Büyütme 200X	80
Şekil 4.29	Niklozamid (Nik) ve Dosetaksel (Dtx) kombinasyon tedavisinin A549 ve H1299 akciğer kanser hücreleri üzerinde sebep olduğu hücre ölümü modunun Z-VAD-FMK (20µM) inhibitör uygulaması ile doğrulanması	82
Şekil 4.30	A549 Akciğer kanser hücrelerinin Niklozamid (0,625µM), Dosetaksel (0,44µM) ve ikili kombinasyonu ile 24 saat tedavisinin ardından hücre morfolojilerinin Phalloidin-I-Fluor 488 ve Hoechst 33342 ile floresan olarak belirlenmesi	84
Şekil 4.31	H1299 Akciğer kanser hücrelerinin Niklozamid (0,625µM), Dosetaksel (0,44µM) ve ikili kombinasyonu ile 24 saat tedavisinin ardından hücre morfolojilerinin Phalloidin-I-Fluor- 488 ve Hoechst 33342 ile floresan olarak belirlenmesi	85
Şekil 4.32	A549 3B organotipik tümör modelinde Dosetaksel (Dtx), Niklozamid (Nik) ve ikili kombinasyonlarıyla 72 Sa	86

	tedavisinin ardından hücre canlılığının ATP canlılık analizi ile tayini	
Şekil 4.33	H1299 3B organotipik tümör modelinde Dosetaksel (Dtx), Niklozamid (Nik) ve ikili kombinasyonlarıyla 72Sa tedavisinin ardından hücre canlılığının ATP canlılık analizi ile tayini	87
Şekil 4.34	A549 3B Organotipik Tümör modellerinin Niklozamid (0,625µM), Dosetaksel (14µM) ve ikili kombinasyonu ile 72 Sa tedavisi ardından tümör modellerinin ışık mikroskopisi görüntüleri (40X)	88
Şekil 4.35	H1299 3B Organotipik Tümör modellerinin Niklozamid (0,625µM), Dosetaksel (14µM) ve ikili kombinasyonu ile 72 Sa tedavisi ardından tümör modellerinin ışık mikroskopisi görüntüleri (40X)	88
Şekil 4.36	A549 akciğer kanser hücrelerinde Niklozamid (0,625µM), Dtx (0,44 ve 14µM) ve ikili kombinasyonlarının (Komb) hücrelerin göç (migrasyon) yetenekleri üzerindeki etkisi. Büyütme 40X	89
Şekil 4.37	H1299 akciğer kanser hücrelerinde Niklozamid (0,625µM), Dtx (0,44 ve 14µM) ve ikili kombinasyonlarının (Komb) hücrelerin göç (migrasyon) yetenekleri üzerindeki etkisi. Büyütme 40X	90
Şekil 4.38	A549 akciğer kanser hücrelerinde Niklozamid (0,625µM), Dosetaksel (0,44µM) ve ikili kombinasyonlarının hücrelerin koloni oluşturma yetenekleri üzerindeki etkisi. Büyütme 40X	91
Şekil 4.39	H1299 akciğer kanser hücrelerinde Niklozamid (0,625µM), Dosetaksel (0,44µM) ve ikili kombinasyonlarının hücrelerin koloni oluşturma yetenekleri üzerindeki etkisi. Büyütme 40X	92
Şekil 4.40	A549 3B organotipik akciğer tümör modelinde Niklozamid (0,625µM), Dosetaksel (14µM) ve ikili kombinasyonunun 48 Sa tedavisi sonrasında faz ve floresan mikroskopu görüntüleri. Hoechst 33342 (mavi), Annexin-V-FITC (yeşil) ve PI (kırmızı). Büyütme 200X	93
Şekil 4.41	H1299 3B organotipik akciğer tümör modelinde Niklozamid (0,625µM), Dosetaksel (14µM) ve ikili kombinasyonunun 48Sa tedavisi sonrasında faz ve floresan mikroskopu görüntüleri. Hoechst 33342 (mavi), Annexin-V-FITC (yeşil) ve PI (kırmızı). Büyütme 200X	94
Şekil 4.42	A549 ve H1299 3B Organotipik tümör modellerinde Niklozamid (0,625µM), Dosetaksel (14µM) ve ikili kombinasyonunun apoptotik sinyal yolağı proteinlerinin ekspresyonu üzerindeki etkisinin western blot analizi sonuçları	95
Şekil 4.43	A549 akciğer organotipik tümör modellerinin 72 Sa Niklozamid, Dosetaksel (DTX) ve kombinasyon tedavileri	96

	ardından hematoksilen ve eozin boyamaları mikroskop görüntüleri(100X)	
Şekil 4.44	H1299 akciğer organotipik tümör modellerinin 72 Sa Niklozamid, Dosetaksel (DTX) ve kombinasyon tedavileri ardından hematoksilen ve eozin boyamaları görüntüleri(100X)	97
Şekil 4.45	A549 Akciğer Organotipik Tümör modellerinin 72 Sa Niklozamid, Dosetaksel (DTX) ve Kombinasyon tedavileri ardından Ki-67 Boyaması Görüntüleri	98
Şekil 4.46	H1299 Akciğer Organotipik Tümör modellerinin 72 Sa Niklozamid, Dosetaksel (DTX) ve Kombinasyon tedavileri ardından Ki-67 Boyaması Görüntüleri	99
Şekil 4.47	A549 3B tümör modelleri ve MRC-5 hücreleriyle oluşturulan ko-kültür ortamında 72 Sa Niklozamid (0,625µM), Dosetaksel (14µM) ve ikili kombinasyon tedavisi sonucundaki faz konstrast mikroskobu görüntüleri	100
Şekil 4.48	H1299 3B tümör modelleri ve MRC-5 hücreleriyle oluşturulan kokültür ortamında 72 Sa Niklozamid (0,625µM), Dosetaksel (14µM) ve ikili kombinasyon tedavisi sonucundaki faz konstrast mikroskobu görüntüleri	101
Şekil 4.49	3B organotipik tümör modelleri ile MRC-5 ko-kültür ortamında 72 saat ilaç tedavileri ardından A549 (A) ve H1299 (B) organotipik tümör modellerinde hücre canlılık analizi sonuçları	102
Şekil 4.50	MRC-5 hücrelerinin 2B kültürde Dosetaksel (0-28µM), Niklozamid (0-10µM) ve Dosetakselin farklı dozlarının (0-28µM) Niklozamidin 0,625µM dozu ile kombinasyonunun 72 Sa tedavisi sonrasında hücre canlılığına etkisi	103
Şekil 4.51	3B A549 ve H1299 organotipik tümör modellerinin MRC-5 sağlıklı fibroblast hücreleriyle kokültür ortamında Nik, Dtx ve ikili kombinasyonu (Komb) ile 72 Sa tedavisi sonrasındaki protein ekspresyon seviyelerinin western blot analizi sonuçları	104
Şekil 5.1	3B organotipik tümör modellerinde Niklozamid Dosetaksel ikili kombinasyonu sonucu western blot analizleri ile elde edilmiş sonuçların olası sinyal mekanizmasının gösterilmesi	108

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1 Tez çalışmasında kullanılan hücre soyları ve besiyerlerinin içerikleri 41
Çizelge 4.1 Akciğer Kanser hücrelerinde Niklozamid ile 72 saat tedavi sonrası IC_{50} Değerleri 74

1. GİRİŞ

Kanser, dünya genelinde ve ülkemizde kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci en yaygın ölüm nedeni olup, halk sağlığı açısından ciddi bir tehdit teşkil etmektedir. Her geçen gün artan yeni kemoterapötik ilaç geliştirme çalışmaları bulunsa da laboratuvar ortamında elde edilen preklinik veriler çoğu zaman klinik sonuçlarla örtüşmeyebilmektedir. Preklinik ve klinik aşamalar arasındaki bu uyumsuzluklar, kanser araştırmaları alanında önemli bir zorluk oluşturmaktadır. Laboratuvarda kullanılan hücre kültürleri ve hayvan modelleri, hastalığın karmaşıklığını tam olarak yansıtamamakta ve bu durum preklinik bulguların klinik etkinlikle uyumsuz olmasına yol açabilmektedir. Bu nedenle, kanser araştırmalarında preklinik ve klinik aşamalar arasındaki uyumu artırmak amacıyla daha ileri düzeyde modelleme tekniklerinin ve veri analiz yöntemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir.

Üç boyutlu (3B) hücre kültürü çalışmaları, bu bağlamda araştırmacılara 2B kültür çalışmalarına kıyasla daha gerçekçi ve kapsamlı veriler sunma olanakları sağlamaktadır. Geliştirilen çeşitli 3B modeller, kanser etiyolojisi, moleküler temeli, konak-tümör etkileşimi, mikroçevrenin rolü ve tümör metastazındaki heterojenlik gibi konularda yeni ve derinlemesine bilgiler kazandırmaktadır. Bu modeller, aynı zamanda yeni kanser belirteçlerinin tanımlanması, hedefe yönelik tedavi stratejilerinin geliştirilmesi ve ilaç geliştirme süreçlerinde önemli bir rol oynamaktadır. 3B kültür modelleri, insan dokusu ve organlarının morfolojik, fonksiyonel ve mikroçevresel özelliklerini taklit ederek ilaç sektöründe kritik biyoteknolojik araçlar olarak kullanılmaktadır. Ayrıca ilaçların tanımlanması, taranması ve geliştirilmesi gibi birçok uygulama alanında etkin bir platform sunmaktadır.

Akciğer kanseri araştırmalarında 3B hücre kültürü çalışmaları, kanser biyolojisi ve tedavisine ilişkin derinlemesine anlayış sağlamak amacıyla önemli bir araç olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemler, 2B kültür sistemlerinin sınırlamalarını aşarak, kanser hücrelerinin daha doğal bir mikro-çevrede büyümesini ve davranışlarını daha gerçekçi bir şekilde yansıtmasını sağlamaktadır. 3B hücre kültürleri, kanser hücrelerinin tümör içindeki kompleks etkileşimlerini ve hücre-matriks ilişkilerini taklit ederek, tümör gelişimi ve yayılmasının moleküler mekanizmalarının daha etkili bir şekilde

araştırılmasına olanak tanımaktadır. Ayrıca, bu modeller, ilaçların tümör içindeki penetrasyonunu ve etkinliğini değerlendirmek için kullanılarak, daha hassas ve hedefe yönelik tedavi stratejilerinin geliştirilmesine olanak tanıyan bir platform sunmaktadır.

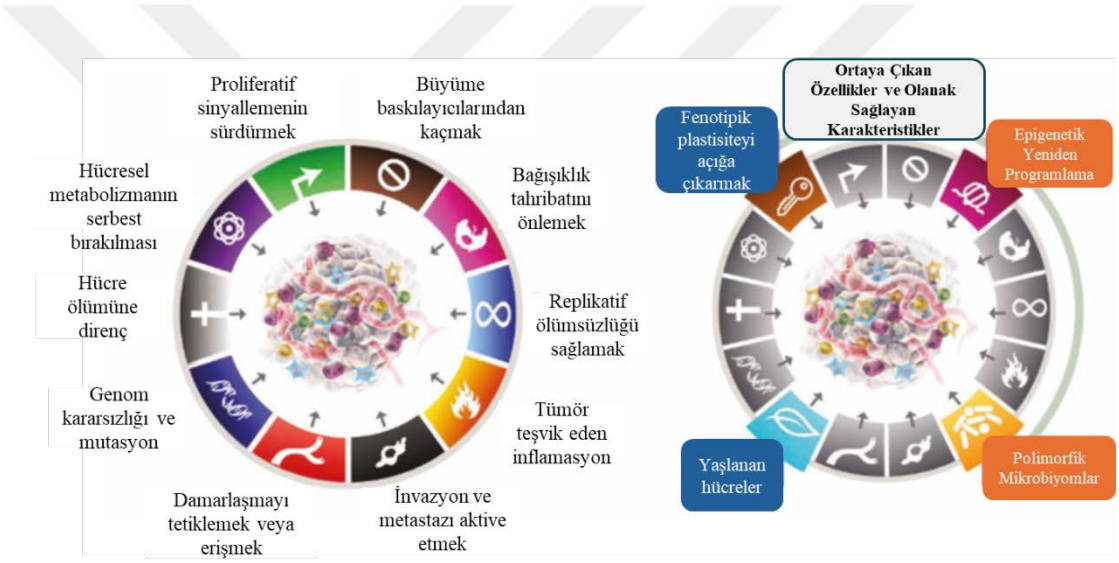
Bu doktora tez çalışmasında, A549 ve H1299 hücre hatları kullanılarak 3B akciğer organotipik tümör modelleri geliştirilmiştir. Bu sayede, tümör mikroçevresinin daha gerçekçi bir şekilde taklit edilerek *in vivo* koşullara daha yakın bir ortam sağlanmıştır. Çalışmada ayrıca, ilaç yeniden konumlandırma stratejisi uygulanmış ve bu modellerde mevcut ilaçların yeni kombinasyonlarla birlikte kullanılmasıyla antikanser etkinlikleri değerlendirilmiştir. Bu bağlamda incelenen ilaç kombinasyonlarının antikanser mekanizmaları moleküler düzeyde detaylandırılmış ve potansiyel terapötik etkileri ortaya konmuştur.

Bu tez çalışması hücrelerin bir aradayken oluşturdukları dokusal mimariyi taklit edebilecek ve akciğer kanserinde klinikte kullanılan kemoterapötik ilaçlara cevabın hastaya verilmeden önce tespit edilebilmesini kolaylaştıracak üç boyutlu organotipik tümör modellerinin geliştirilmesini, karakterizasyonunu ve ilaç yanıtlarının mekanizmalarını araştırmak amacıyla yapılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1 Kanser

Kanser, vücut hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde büyümesi ve yayılmasıyla karakterize edilmiş bir hastalık grubudur. Sağlıklı hücrelerin büyüme sinyallerine verdiği yanıtların değişmesi, mutasyon yükünün artması, epigenetik programlamanın değişmesi, hücrenin kontrol mekanizmalarını kaybetmesi ve sürekli çoğalması ile kanser hücrelerinin karakteristik özellikleri gelişir. Bu özellikler, Hanahan (2022) tarafından belirlenen kanserin temel özellikleridir ve kanser araştırmalarının önemli odak noktalarını oluşturur (Şekil 2.1).

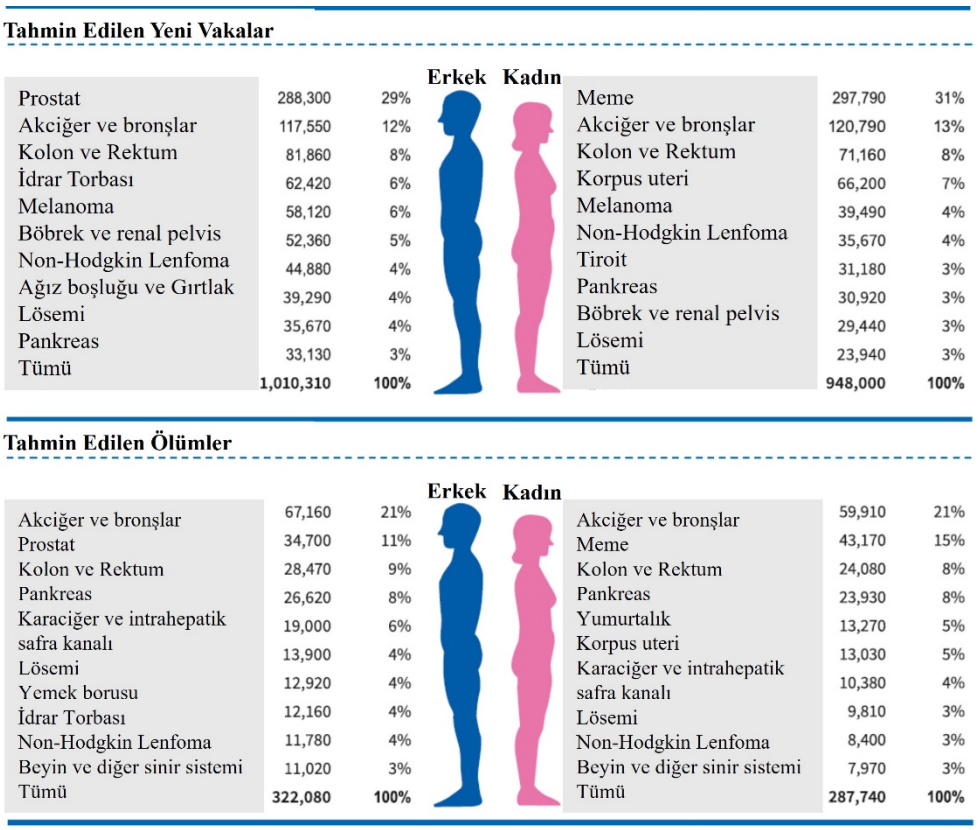


Şekil 2. 1 Kanserin temel özellikleri (Hanahan, 2022)

Güncel kanser istatistiklerine bakıldığında, kanserin hala büyük bir sağlık sorunu olduğu görülmektedir (Siegel vd., 2023). Her yıl milyonlarca insan kanser teşhisi almakta ve binlercesi bu hastalık nedeniyle yaşamını yitirmektedir. Özellikle yaşlanan nüfus, çevresel faktörlerin etkisi ve yaşam tarzı değişiklikleri gibi sebeplerle kanser vakalarında artışlar yaşanmaktadır. Bu nedenle kanser araştırmaları, hastalığın önlenmesi, erken teşhisi ve daha etkili tedavilerin geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

Kanser, dünya genelinde ölüm nedenleri arasında önde gelenlerden biri olmaya devam etmektedir. Dünya sağlık örgütüne bağlı Global Kanser Gözlemevi ‘Global Cancer Observatory’ tarafından 2022 yılında 185 ülke ve 36 kanser tipini kapsayan çalışmada 20

milyon yeni kanser vakasının olacağı ve bunların 9.7 milyonunun ölümle sonuçlanacağı bildirilmiştir. Yine bu çalışmaya göre 2050'de tahminen 2022'deki bu 20 milyon vakadan yüzde 77 artışla 35 milyon yeni kanser vakası öngörülmektedir (DSÖ haberler, 2024). Bu hızla artan küresel kanser yükü sosyoekonomik gelişmeyle beraber tütün-alkol kullanımı, hava kirliliği ve obezite ile ilişkilendirilmektedir. Bu kanser tiplerinden en dikkat çekici olanları akciğer, prostat, göğüs ve kolorektal kanserlerdir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Kadın ve Erkeklerde 2023 GLOBOCAN tahmin edilen yeni kanser vakaları ve ölüm oranları (Siegel vd., 2023)

2.2 Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, hücrelerin geçirdiği belirli mutasyonlar sonucunda kontrolsüz çoğalarak akciğer dokusu içinde tümör oluşturmasıdır. Uluslararası kanser araştırma kurumu olan IARC (International Agency for Research on Cancer)'nin 2010 yılında hazırladığı rapora göre akciğer kanseri dünya çapında insidansı en yüksek ve en çok ölüme neden olan kanser tipidir. Başlıca risk faktörleri arasında sigara, pasif içicilik, hava kirliliği, ailesel yatkınlık ve mesleki maruziyet (örneğin; Asbest) yer almaktadır (Alberg vd., 2013).

2.2.1 Akciğer Kanserinin Histopatolojik Sınıflandırılması

DSÖ 2021 yılında akciğer kanserinin klasifikasyonunu güncellemiştir (Nicholson vd., 2022). Ayrıca 2023 yılında 5 yeni terim sınıflandırılmaya eklenmiştir (Singh vd., 2023). Buna göre histolojik olarak 80 tip akciğer kanseri olmakla beraber özellikle iki ana grupta incelenmektedir;

1. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK) (%15-20)
2. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) (%80-85)

2.2.1.1. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK)

Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK), akciğer kanserlerinin yaklaşık %15'ini oluşturan, oldukça agresif bir tümör tipidir. KHAK, özellikle tütün kullanımına bağlı olarak ortaya çıkar ve erken metastaz potansiyeli ile karakterizedir. KHAK, nöroendokrin (nöral ve endokrin özelliklerin entegrasyonu) özellikler gösteren bir kanser türüdür. Bu kanser tipi, histopatolojik olarak küçük, yuvarlak veya oval hücrelerin yoğun olarak yer aldığı, nükleer kayıpların belirgin olduğu bir özellik göstermekte, yüksek mitotik indeks ve belirgin bir nükleolusa sahip olduğu bilinmektedir (Gazdar vd., 2017).

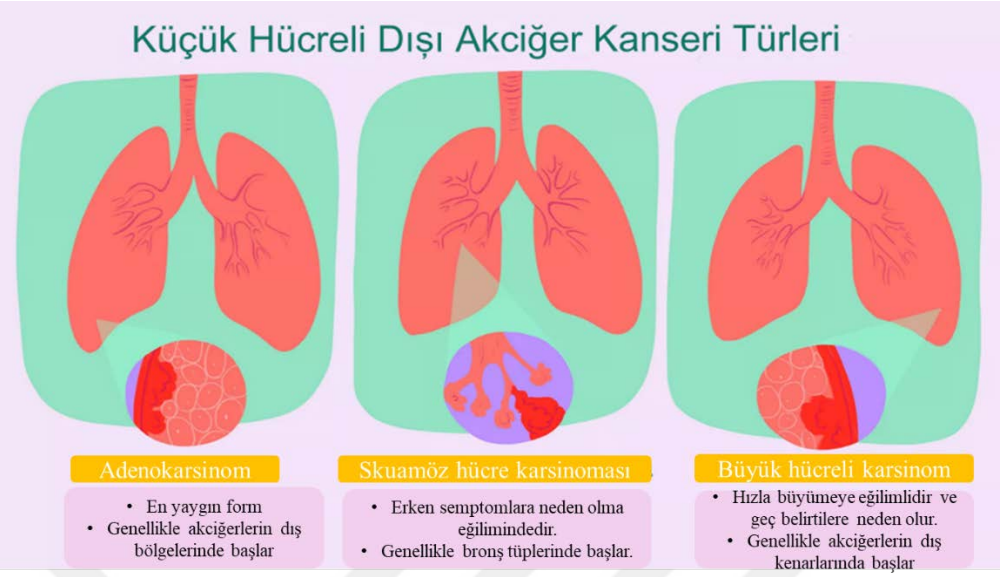
Bu hücreler, elektron mikroskopisi altında nörosekretuar granüller içerir ve nöroendokrin belirteçler olan sinaptofizin, kromogranin A ve CD56 gibi proteinlerin ekspresyonunu gösterir (Lantuejoul vd., 2020; Schwendenwein vd., 2021). Olası başlatıcı moleküler olaylar, TP53 ve RB1'in inaktivasyonu ve Notch sinyalizasyonu da dahil olmak üzere birkaç sinyal yolağının bozulmasını içerir (Offin vd., 2019). Neredeyse tüm KHAK tümörlerinde, tümör baskılayıcı gen FHIT'i içeren kromozom 3p'nin kısa kolunda bir delesyon vardır (Basumallik ve Agarwal, 2023; Kok vd., 1997). KHAK hastalarının çoğunda başlangıçta non-spesifik olarak öksürük, dispne, göğüs ağrısı, hemoptizi ve kilo kaybı gibi semptomlar görülmektedir (Ruano-Raviña vd., 2020). Ayrıca, KHAK hastalarının %60-70'i tanı konduğunda yayılmış hastalığa sahiptir. Ekstratorasik metastazlar sıklıkla lenf düğümleri, beyin, karaciğer, kemik ve adrenal bezlerde görülür (Ko vd., 2021; Riihimäki vd., 2014). KHAK tanısı genellikle bronkoskopi veya ince iğne aspirasyon biyopsisi ile konur. Histopatolojik inceleme, küçük, yoğun, yuvarlak hücrelerin varlığı ve immünohistokimyasal boyama ile nöroendokrin belirteçlerin tespiti

ile doğrulanır. Evreleme, sınırlı evre (hastalık tek bir hemitoraksta sınırlıdır) ve yaygın evre (hastalık karşı hemitoraks, plevra veya uzaktaki organlara metastaz yapmıştır) olarak hastalığın yayılım derecesine göre sınıflandırılır (Kalemkerian, 2011).

KHAK tedavisinde kemoterapi ana tedavi yöntemidir. Sınırlı evre hastalıkta genellikle kemoterapi ile kombine radyoterapi uygulanır. Yaygın evre hastalıkta ise sistemik kemoterapi temel tedavi yöntemidir. Genellikle platin bazlı ajanlar (Cisplatin veya karboplatin) ve etoposid kombinasyonu kullanılır (Ishii vd., 2021; Stinchcombe ve Gore, 2010). KHAK'nin prognozu genellikle kötüdür; sınırlı evre hastalığı olan hastalarda medyan sağkalım süresi yaklaşık 15-20 ay iken, yaygın evre hastalığı olanlarda bu süre 8-13 ay arasında değişir (Blackhall vd., 2023). Sonuç olarak, küçük hücreli akciğer kanseri yüksek malignite potansiyeli ve erken metastaz eğilimi ile tanınan bir hastalıktır. Tedaviye genellikle iyi yanıt vermesine rağmen, hızlı progresyon ve yüksek rekürrens oranları nedeniyle uzun dönem sağkalım oranları düşüktür.

2.2.1.2. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK)

Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK), tüm akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %85'ini oluşturan heterojen bir grup malign neoplazmları içerir. KHDAK, genellikle daha yavaş ilerleyen ve KHAK'a kıyasla daha iyi bir prognoza sahip olan bir kanser türüdür. Bu kanser tipi, histopatolojik özelliklerine göre üç ana alt tipe ayrılır: adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 KHDAK alt tipleri. (Early-Stage Lung Cancer: Symptoms, Treatment, and More (verywellhealth.com)

Adenokarsinom: Akciğer kanserlerinin en yaygın alt tipi olup, KHDAK'nin %40'lık kısmını oluşturur ve genellikle periferik akciğer dokusundan kaynaklanır. Adenokarsinom, mukus üreten glandüler hücrelerden gelişir, sigara içen ve içmeyen her iki grupta da görülür. En sık rastlanan alt tiptir. TTF-1 ve Napsin A gibi immünohistokimyasal belirteçlerle tanınır (Bhimji ve Wallen, 2023).

Skuamöz Hücreli Karsinom: Genellikle bronşların merkezi bölgelerinde bulunan bu alt tip, sigara kullanımı ile güçlü bir ilişkisi vardır (Hashimoto vd., 2024). Skuamöz hücreli karsinomlar, keratinizasyon ve intersellüler köprüleşme ile karakterizedir ve p40, p63 gibi belirteçler ile immünohistokimyasal olarak tanımlanabilir (Travis vd., 2015).

Büyük Hücreli Karsinom: Diferansiye olmamış, nöroendokrin özellikler göstermeyen tümörleri içerir. Akciğerin her yerinde olabilmekle beraber en çok akciğerin dış kenar bölgelerinde görülür. Diğer KHDAK'larla karşılaştırıldığında çok hızlı büyüyüp yayılma özelliğine sahiptir. KHDAKların %10-15 ini bu tip oluşturur. Bu alt tip, histolojik olarak büyük hücreler ve bol sitoplazma ile karakterize edilir. İmmünohistokimyasal olarak TTF-1 ve p40 gibi belirteçlerin negatif olması beklenir (Walia vd., 2017).

Diğer Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri

Adenoskuamöz Karsinom

Adeno skuamöz karsinom (ASK), KHDAK grubuna dahil olan nadir ve karma bir kanser türüdür (Li ve Lu, 2018). Spesifik hasta ve hastalık özellikleri nedeniyle tedavisi zor bir kanser türüdür. Bu özellikler arasında ileri yaşta teşhis konulması, hastalığın ileri evrede olması ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve kalp hastalığı gibi komorbiditelerin daha yüksek insidansı yer alır (Socinski vd., 2018). Bu tümör hem adenokarsinom hem de skuamoz hücreli karsinom bileşenlerine sahiptir, yani hem bez (glandüler) yapılar oluşturan hücreler hem de yassı epitel hücreleri içerir. ASK, tüm akciğer karsinomlarının %0,4-4'ünü oluşturan nispeten nadir bir akciğer karsinomu alt tipidir. Klinik olarak, ASK'lar genellikle agresif bir seyir izler ve daha kötü bir prognoza sahiptir. Tedavi yaklaşımları, tümörün bileşenlerine göre değişiklik gösterebilir ve sıklıkla cerrahi müdahale, kemoterapi ve radyoterapi gibi multimodal tedavi stratejileri gerektirir.

Sarkomatoid Karsinom

Sarkomatoid karsinom, KHDAK'lerin nadir ve agresif bir alt tipidir. Bu tümörler, epitelyal ve mezenkimal özellikler sergileyen hücrelerden oluşur ve histolojik olarak yüksek derecede farklılaşmamış, anaplastik hücreler içerir. Sarkomatoid karsinom, akciğer kanserlerinin yaklaşık %0,3-1,3'ünü oluşturur ve genellikle ileri evrede teşhis edilir (Kefeli, 2008; Pelosi vd., 2010). Bu tümörler hızlı büyüme eğilimindedir ve çevre dokulara, kan damarlarına ve lenf düğümlerine hızla yayılabilir. Klinik olarak, sarkomatoid karsinom hastalarının prognozu genellikle kötü olup, tedaviye yanıt verme oranları düşüktür. Tedavi seçenekleri sınırlıdır ve cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi gibi multimodal yaklaşımlar gerektirir.

KHDAK, küresel olarak en yaygın kanser türlerinden biridir ve akciğer kanserinden ölümlerin büyük çoğunluğundan sorumludur. Başlıca risk faktörleri arasında sigara kullanımı, diyet ve besin takviyeleri, alkol kullanımı çevresel ve mesleki maruziyetler (örneğin, asbest, radon gazı), hava kirliliği ve genetik yatkınlık yer almaktadır (Darby vd., 2005; Molina vd., 2008). KHDAK'li hastalar genellikle ilerlemiş evrelerde semptomatik hale gelir. Semptomlar arasında kalıcı öksürük, hemoptizi, nefes darlığı, göğüs ağrısı ve kilo kaybı bulunur. Tanı süreci, klinik değerlendirme, görüntüleme

yöntemleri (radyografi, bilgisayarlı tomografi) ve histopatolojik inceleme (biyopsi) ile gerçekleştirilir. İmmünohistokimyasal ve moleküler analizler, kesin tanı ve alt tip belirleme için kritik öneme sahiptir (Detterbeck vd., 2017; Goldstraw vd., 2011).

KHDAK tedavisi, kanserin evresine, hastanın genel sağlık durumuna ve tümörün moleküler özelliklerine bağlı olarak değişir. Cerrahi rezeksiyon, erken evre hastalıkta tercih edilen tedavi yöntemidir. İlerlemiş evrelerde kemoterapi, radyoterapi ve hedefe yönelik tedaviler (örneğin, Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) mutasyonu taşıyan hastalarda tirozin kinaz inhibitörleri (TKI)) kullanılır. İmmünoterapi, özellikle PD-L1 ekspresyonu yüksek olan hastalarda umut verici sonuçlar göstermektedir. KHDAK'nin prognozu, tümörün evresine ve tedaviye yanıtına bağlı olarak değişkenlik gösterir. Erken evrelerde beş yıllık sağkalım oranı %60'a kadar çıkabilirken, metastatik hastalıklarda bu oran %5-10 arasında kalmaktadır (Zappa ve Mousa, 2016).

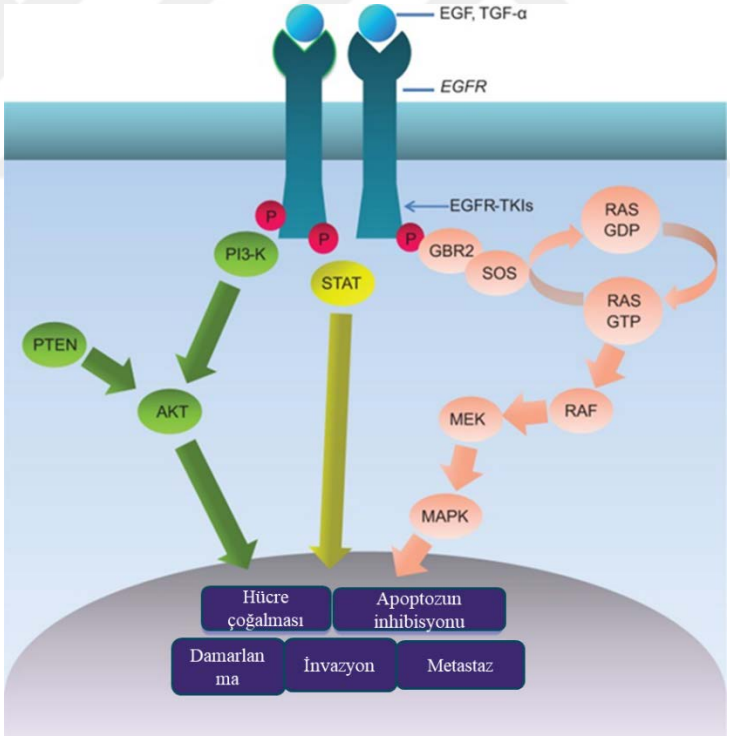
2.3 Akciğer Kanserinde Moleküler Sinyal Yolakları

Akciğer kanseri, genetik ve epigenetik değişikliklerin birikimi sonucu hücre büyüme ve farklılaşma süreçlerinin kontrolsüz hale gelmesiyle ortaya çıkar. Bu süreçte birçok moleküler sinyal yolağı aktif olarak rol oynar. Bu yolaklar, hücre proliferasyonu, apoptoz, anjiyogenez ve metastaz gibi kanserle ilişkili süreçleri düzenler. Aşağıda bazı moleküler sinyal yolakları ve akciğer kanserinde nasıl bir öneme sahip oldukları açıklanmıştır.

2.3.1. EGFR (Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü) Sinyal Yolağı

EGFR sinyal yolağı, akciğer kanserinin, özellikle de KHDAK moleküler patogenezinde önemli bir rol oynar. EGFR, hücre membranında bulunan ve hücre büyümesi ile farklılaşmasını düzenleyen bir tirozin kinaz reseptörüdür (TKR) (Herbst ve Bunn, 2003). EGFR mutasyonları, özellikle adenokarsinom türü KHDAK'da yaygındır (Fang ve Wang, 2014). EGFR'de görülen mutasyonlar, reseptörün sürekli aktif hale gelmesine yol açarak aşağı sinyal yollarının kontrolsüz bir şekilde çalışmasına neden olabilir. Bu durum, hücrelerin aşırı ve düzensiz bir şekilde çoğalarak tümör oluşumuna ve yayılmasına neden olur. En yaygın EGFR mutasyonları arasında ekzon 19 delesyonları ve ekzon 21 L858R nokta mutasyonu bulunur. Bu mutasyonlar, EGFR TKI gibi hedefe yönelik tedavilerle inhibe edilebilir (Passaro vd., 2021) EGFR inhibitörleri (örneğin, erlotinib, gefitinib) bu

yolakta etkilidir ve hedefe yönelik tedavi seçenekleri arasında yer alır. Bu sinyal yolağının başlıca adımları EGFR'a epidermal büyüme faktörünün bağlanması, dimerizasyon [EGFRın kendisiyle veya başka bir ERB ailesi üyesi reseptörle (HER2, HER3 vb.) homodimer veya heterodimer oluşturması], intrinsik tirozin kinaz aktivasyonunun gerçekleşerek reseptörün sitoplazmik domaindeki tirosin kinaz otofosforilasyonu ile çeşitli adaptör ve efektör proteinlerin (Grb2, Shc gibi) bağlanması sonucu diğer önemli sinyal yolaklarının aktivasyonu ile sonuçlanır (Şekil 2.4). Bu yolaklardan RAS-RAF-MEK-ERK hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında önemli bir rol oynarken, PI3K (fosfatidilinositol-3-kinaz)-AKT (protein kinaz B)-mTOR (mammalian target of rapamycin) hücre büyümesi, hayatta kalma ve metabolik süreçlerde kritik fonksiyonlara sahiptir. JAK-STAT yolağı hücre döngüsü ilerlemesi ve apoptoz regulasyonunda önemli rol oynar. Böylece hücresel yanıt hücre proliferasyonu, farklılaşma, migrasyon, invazyon, hayatta kalma veya apoptoz olarak görülür (Rah vd., 2022).



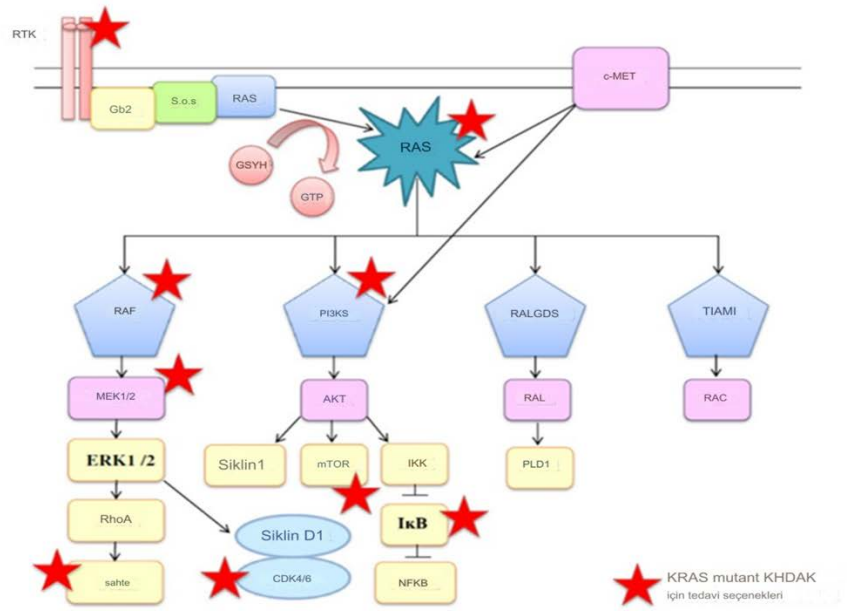
Şekil 2. 4 KHDAK'da EGFR sinyal yolağı (Fang ve Wang, 2014).

EGFR mutasyonları taşıyan hastalar, TKI ile tedavi edilebilir. Bu ilaçlar arasında erlotinib, gefitinib, afatinib ve osimertinib bulunmaktadır. Bu ajanlar, EGFR'nin tirozin

kinaz aktivitesini engelleyerek hücre proliferasyonunu ve tümör büyümesini durdurur (Araki vd., 2023; Ono ve Kuwano, 2006).

2.3.2 KRAS (Kirsten Ras Sarkoma Viral Onkogen) Sinyal Yolağı

KRAS yolu, özellikle KHDAK türlerinde önemli bir rol oynar. KRAS geni, hücre büyüme ve proliferasyon süreçlerini düzenleyen bir GTPaz proteinini kodlar. Bu protein, hücre yüzeyindeki reseptörlerden gelen sinyalleri hücre içi mesajlara çevirerek çeşitli hücresel süreçleri başlatır (Şekil 2.5). KRAS mutasyonları, KHDAK'ların yaklaşık %25'inde bulunur ve bu mutasyonlar hücre proliferasyonunu ve hayatta kalmayı destekler. KRAS yolağındaki bu mutasyonlar, özellikle KRAS geninde meydana gelen mutasyonlar, kanser hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde büyümesine ve çoğalmasına neden olabilir. Bu mutasyonlar, genellikle hücrelerin normal büyüme sinyallerine bağımlı olmadan sürekli olarak bölünmelerine yol açar. KRAS mutasyonları akciğer kanserinde tedavi zorluklarını da beraberinde getirir çünkü bu mutasyonlar çeşitli tedavilere karşı direnç mekanizmalarını geliştirir (O'Sullivan vd., 2023). Ancak, son yıllarda KRAS mutasyonlarına spesifik olarak hedeflenmiş tedaviler üzerinde çalışmalar ilerlemiş ve bazı yeni tedavi yöntemleri geliştirilmiştir (Lu vd., 2023). Örneğin, KRAS G12C inhibitörleri, bu mutasyonun bulunduğu hastalarda umut vaat eden sonuçlar göstermiştir (Goody vd., 2019; Ostrem vd., 2013). KRAS mutasyonlarına yönelik doğrudan hedefli tedaviler geliştirilmekte olup, son yıllarda KRAS G12C inhibitörleri (örneğin, sotorasib) klinik uygulamada kullanılmaya başlanmıştır (Hong vd., 2020).

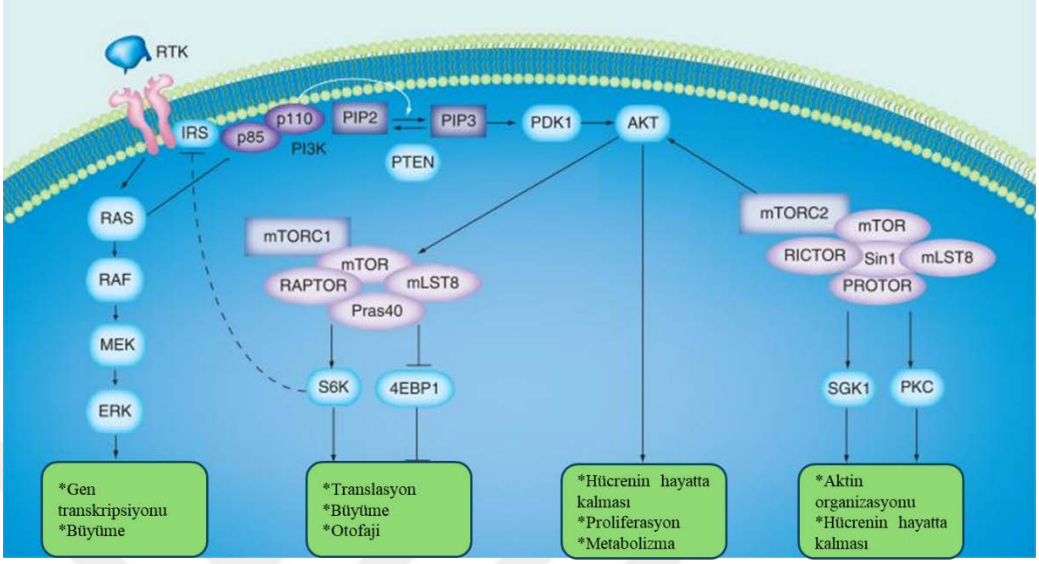


Şekil 2. 5 KHDAK'da KRAS sinyal yolağı (Román vd., 2018)

2.3.3 PI3K/AKT/mTOR Sinyal Yolağı

PI3K, AKT ve mTOR yolakları, hücre büyümesi, proliferasyonu, metabolizma ve hayatta kalmasını düzenleyen önemli bir hücresel sinyalizasyon yolağıdır (Şekil 2.6). Bu yolaktaki mutasyonlar ve aşırı aktivasyonlar, akciğer kanserinde sıkça görülür. Bu yolağın üyelerinden PI3K hücre yüzeyindeki reseptörlerin (örneğin, büyüme faktörü reseptörleri) aktive edilmesi ile aktive olan bir lipid kinazdır. PI3K, fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat'ı (PIP2) fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfat'a (PIP3) dönüştürerek membranda çeşitli proteinleri, özellikle AKT'yi, bağlanabilir hale getirir (Sanaei vd., 2022) . Diğer bir bileşeni olan AKT, PIP3'e bağlanarak membran tarafından aktif hale getirilen bir serin/treonin kinazdır. AKT'nin aktive edilmesi, hücre içindeki çeşitli hedef proteinleri fosforile etmesini sağlar ve bu da hücresel büyüme, proliferasyon, glikoz metabolizması ve apoptozis gibi süreçleri düzenler (Manning ve Cantley, 2007). mTOR ise, hücresel metabolizma, protein sentezi ve büyüme süreçlerini düzenleyen bir serin/treonin kinazdır. mTOR, mTORC1 ve mTORC2 olarak bilinen iki ana kompleks içinde bulunur. mTORC1, ribozomal protein S6 kinaz (S6K) ve ökaryotik translasyon başlangıç faktörü 4E-bağlanma proteini 1 (4E-BP1) gibi hedefleri fosforile ederek protein sentezini teşvik ederken, mTORC2 ise AKT'nin tam aktivasyonunda rol oynar (Panwar vd., 2023). Bu hücresel sinyalleşmede meydana gelen mutasyonlar, aşırı aktivasyon veya baskılanma,

hücre döngüsünün kontrolsüz bir şekilde ilerlemesine neden olarak kanser gelişimini tetikleyebilir.



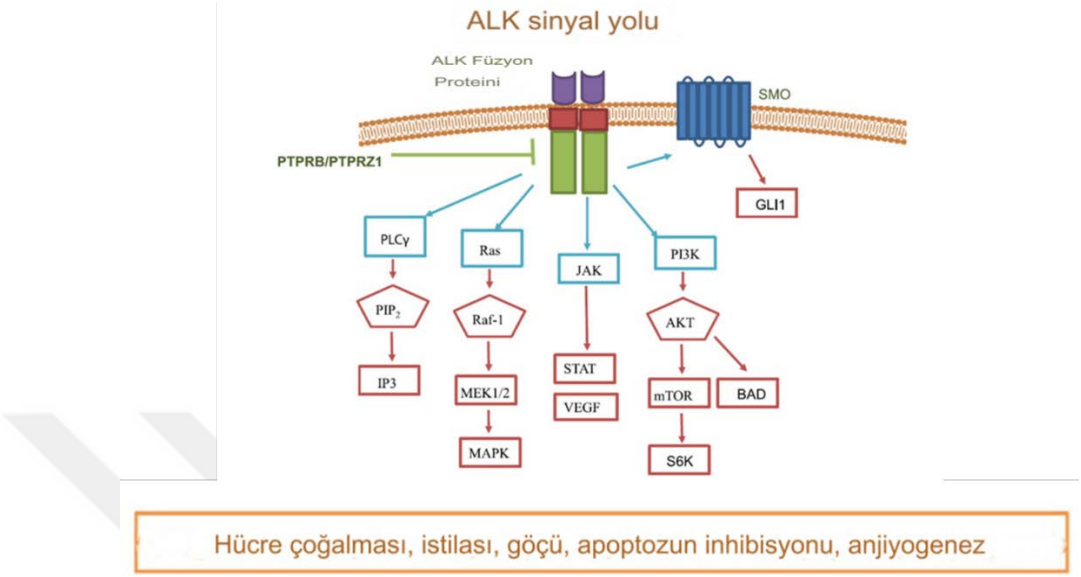
Şekil 2. 6 KHDAK'da PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı (Cheng vd., 2014).

Özellikle akciğer kanseri gibi kanser türlerinde, bu yolakta çeşitli genetik değişiklikler ve aşırı aktivasyon gözlemlenmiştir (Sanaei vd., 2022). PI3K/AKT/mTOR inhibitörleri, akciğer kanseri tedavisinde araştırılan potansiyel ajanlardır (Papadimitrakopoulou, 2012). PI3K İnhibitörlerinden Alpelesib ve İdelalisib gibi ilaçlar, kanser tedavisinde PI3K'nin aktivitesini engeller (Brown, 2019; M. Yu vd., 2023). AKT İnhibitörleri (Örneğin MK-2206) AKT'nin aktivitesini inhibe eden ilaçlar, kanser hücrelerinin kontrolsüz proliferasyonunu önlemeyi amaçlar (Hirai vd., 2010). mTOR inhibitörlerinden Temsirolimus ve Everolimus, mTORC1'in aktivitelerini baskılayarak farklı kanser tiplerinde tümör hücrelerinin büyümesini engeller (Witzig vd., 2015; Yuan vd., 2009).

2.3.4 ALK (Anaplastik Lenfoma Kinaz) Sinyal Yolağı

ALK yolağı, akciğer kanserinde önemli bir rol oynayan moleküler sinyal yolaklarından biridir. ALK, hücre büyümesi, istilası, göçü ve farklılaşmasında rol oynayan bir reseptör tirozin kinazdır (Şekil 2.7). Bu gen, önemli bir onkogen olarak kabul edilir ve genellikle genetik mutasyonlar sonucu kanser gelişiminde etkili olabilir (Hallberg ve Palmer, 2016; Lei vd., 2022). EML4-ALK füzyon genleri, KHDAK'ların yaklaşık %5'inde bulunur ve bu durum hücre proliferasyonunu artırır (Lei vd., 2022). ALK inhibitörleri (örneğin,

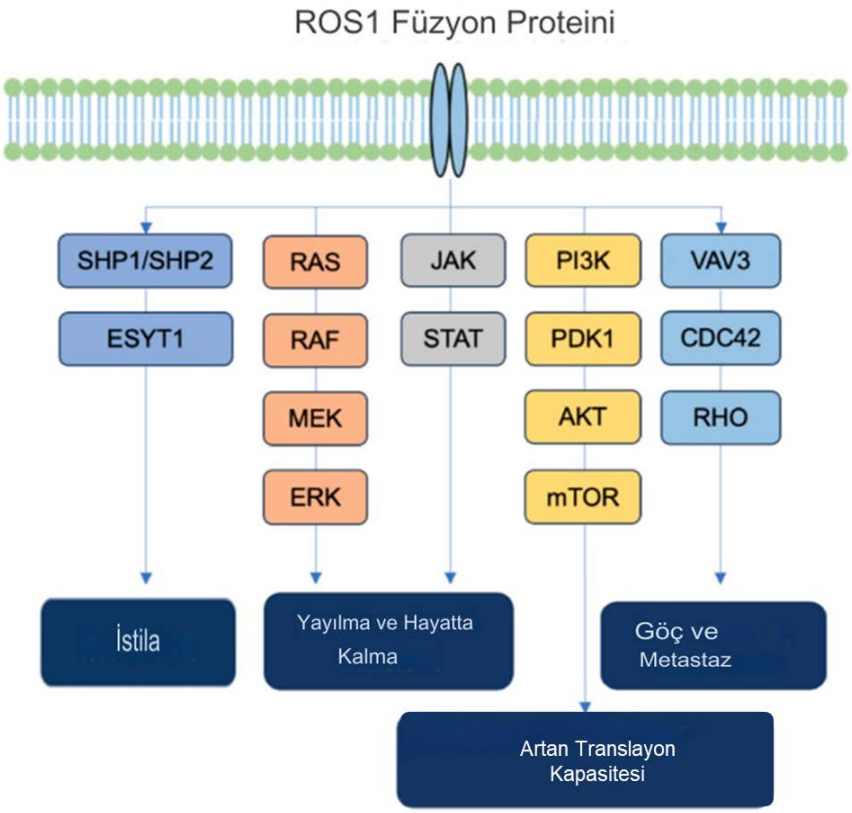
Crizotinib, Alectinib) bu tür kanserlerde etkili tedavi seçenekleri arasındadır (Peters vd., 2017).



Şekil 2. 7 KHDAK'da ALK sinyal yolağı (Della Corte vd., 2018)

2.3.5 ROS1 (Proto-Onkogene Tirozin-Protein Kinaz) Sinyal Yolağı

ROS1 yolağı, bir TKR'ye ait olan ve çeşitli kanser türlerinde, özellikle de akciğer adenokarsinomlarında önemli rol oynayan moleküler sinyal yoludur (Davies ve Doebele, 2013). ROS1, tipik olarak hücre büyümesi, istila, göç, metastaz, hücre farklılaşması ve hücresel hayatta kalma gibi kritik hücresel süreçleri düzenler (Şekil 2.8). Akciğer kanserinde ROS1 geninde meydana gelen translokasyonlar veya füzyonlar, çoğunlukla ROS1'in konstitutif (sürekli) aktif hale gelmesine neden olur. Bu, ras-raf-MEK-ERK ve PI3K-AKT-mTOR gibi aşağı akış (downstream) sinyal yolaklarının aktivasyonuna yol açar (Yang vd., 2023a). Bunun sonucunda proliferasyon, diferansiyasyon ve hücresel hayatta kalma gibi hücre içi süreçlerde anormal kontrolsüzlük ortaya çıkar ve bu da kanserojeneze katkıda bulunur.



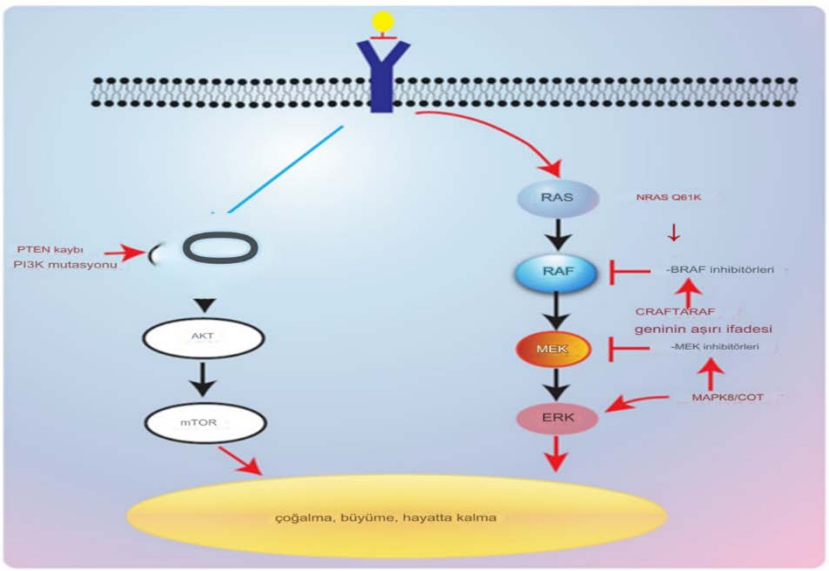
Şekil 2. 8 KHDAK'da ROS1 sinyal yolağı (Yang vd., 2023a)

ROS1 füzyonlarının tanımlanması, akciğer kanseri tedavisi açısından önemli bir biyomarkerdır (Drilon vd., 2021). ROS1 inhibitörleri, örneğin Crizotinib, bu tür füzyon proteinlerine sahip tümörlerde etkili bir tedavi yaklaşımı sunmaktadır. Hastalarda ROS1 füzyonlarının tespiti, uygun hedefe yönelik tedavi seçeneklerinin belirlenmesinde büyük önem taşır. ROS1 gen füzyonları, KHDAK'da nadir de olsa görülür. ROS1 inhibitörleri (örneğin, Crizotinib) ROS1 pozitif akciğer kanserlerinin tedavisinde kullanılır (Bergethon vd., 2012).

2.3.6 BRAF (B Raf Protoonkogen Treonin Kinaz) Sinyal Yolağı

BRAF, bir serin/treonin kinaz olup, RAS-RAF-MEK-ERK (MAPK) sinyal yolunda yer alır. Bu yolak, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve hayatta kalması gibi temel hücresel işlevlerin düzenlenmesinde rol oynar (Şekil 2.9). BRAF, özellikle RAS proteinleri tarafından aktive edildikten sonra, MEK (MAP/ERK Kinaz) ve ardından ERK (Ekstraselüler Sinyal Regüle Edici Kinaz) proteinlerini fosforile ederek hücre içi sinyal

iletimini sürdürür. BRAF V600E mutasyonu (valin amino asidi glutamik asit ile yer değiştirir), KHDAK'ların %1-2'sinde bulunur. Bu mutasyon, BRAF kinazını eksternal bir sinyale gerek duymaksızın konstitutif olarak aktif hale getirir, bu da hücresel proliferasyonun sürekli aktif kalarak tümörigenik süreçlere katkıda bulunmasına yol açar (Śmiech vd., 2020). En yaygın kullanılan inhibitörler arasında Vemurafenib ve Dabrafenib bulunmaktadır. Bu inhibitörler, BRAF kinaz aktivitesini spesifik olarak engelleyerek tümör hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını durdurur (Proietti vd., 2020). Bu tedavilere ek olarak, BRAF inhibitörlerinin etkisini artırmak ve sağlanan direnç mekanizmalarını aşmak amacıyla, MEK inhibitörleri (örneğin, Trametinib) gibi diğer hedefe yönelik tedavi ajanlarıyla kombinasyon terapileri de araştırılmaktadır (Sforza vd., 2022).

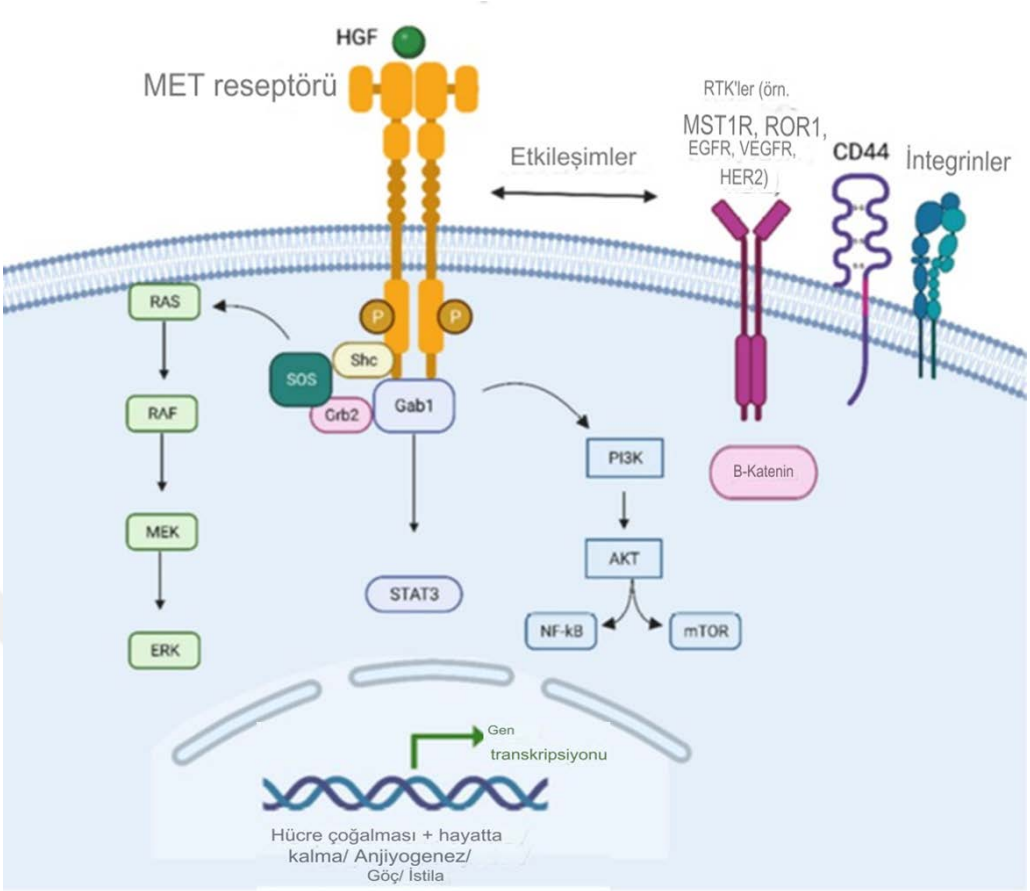


Şekil 2. 9 KHDAK'da BRAF sinyal yolağı (Yan vd., 2022)

2.3.7 MET Sinyal Yolağı

KHDAK'da kritik bir öneme sahip sinyal yolaklarından biri de MET 'hepatosit büyüme faktörü reseptörü' sinyal yolağıdır. MET bir tirozin kinaz olup, ekson 14 atlama (skipping) mutasyonları ve MET amplifikasyonlarıyla akciğer kanserlerinde görülür ve hücre büyümesini artırır (Bylicki vd., 2020). MET proto-onkogen, 7. kromozomun uzun kolunda (7q31) lokalize edilmiş olup, hepatosit büyüme faktörüne 'HGF' bağlanan bir TKR'dir. MET reseptörünün bağlanmasıyla oluşan sinyal yolağının aktivasyonu, hücre

proliferasyonu, hayatta kalma, göç ve invazyon gibi bir dizi biyolojik sürecin kontrolünde önemli rol oynar (Luraghi vd., 2012; Sacco ve Clague, 2015) (Şekil 2.10). MET/HGF yolağındaki disfonksiyonlar, kanser hücrelerinin onkojenik dönüşümüne, metastaza ve terapötik direnç gelişimine katkıda bulunabilir. MET genindeki mutasyonlar, MET amplifikasyonu veya HGF'nin aşırı ekspresyonu gibi çeşitli mekanizmalar, MET sinyal yolağının aberrant aktivasyonuna yol açabilir. Özellikle MET ekson 14 atlama mutasyonları, KHDAK'da belirlenen önemli bir biyomarker olup, belirli MET TKI ile hedeflenebilir. MET ekson 14 mutasyonları, MET proteininin ubiquitinasyon ve proteazomal yıkımdan kaçmasına neden olarak, artan MET sinyali ile sonuçlanır (Awad vd., 2016; Reungwetwattana vd., 2017). Klinikte MET yolağının inhibisyonu, bu yolağın aktivasyonuna sahip olan KHDAK hastaları için umut verici bir tedavi stratejisi olarak kabul edilmektedir. Özellikle, MET inhibitörleri (Capmatinib, Tepotinib gibi) ve MET/HGF'yi hedefleyen monoklonal antikorlar (Onartuzumab) dahil olmak üzere çeşitli ajanların geliştirilmesi ve klinik çalışmalarda değerlendirilmesi, MET yolağı aracılı kanser biyolojisinin anlamada ve yeni tedavi yaklaşımlarının oluşturulmasında değerli bilgilere ulaşılmasını sağlamıştır (Spagnolo vd., 2023). Capmatinib ve Tepotinib gibi MET TKI'ları, MET ekson 14 değişikliğine sahip KHDAK hastalarında objektif yanıt oranları ve progresyonsuz sağkalım sürelerinde anlamlı iyileşmeler sağlamıştır (Michaels ve Bestvina, 2022; Paik vd., 2020; Wolf vd., 2020).

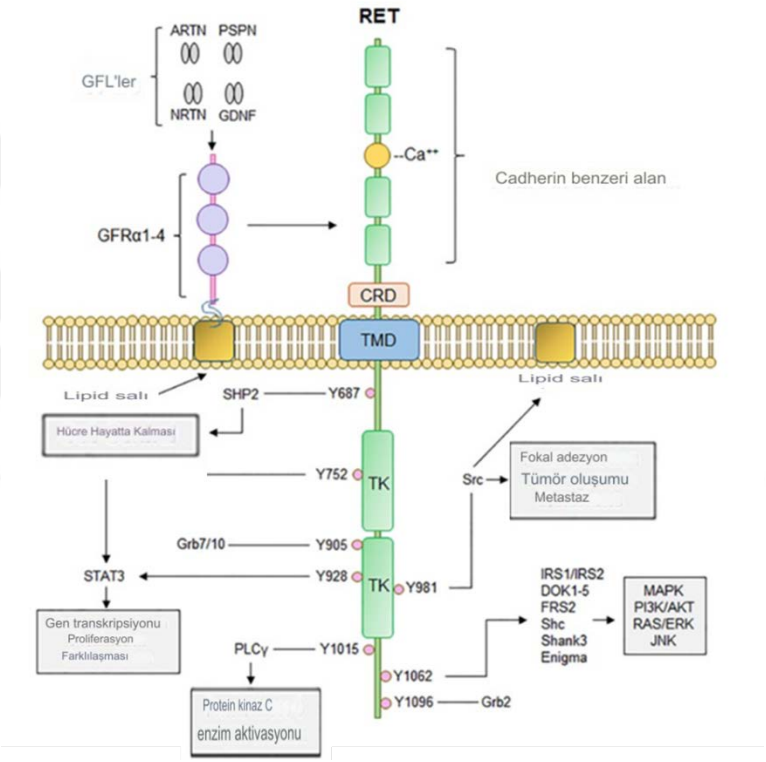


Şekil 2. 10 KHDAK'da MET sinyal yolağı (Spitaleri vd., 2023)

2.3.8 RET (Transfeksiyon Sırasında Yeniden Düzenlenmiş) Sinyal Yolağı

RET proto-onkogenin aktivasyonu, son yıllarda KHDAK'in belirli alt tiplerinde önemli bir biyolojik yolağın parçası olarak tanımlanmıştır (Li vd., 2023). RET, temas dışı (non-receptor) TKR'dir ve normalde nöronal gelişim, hücre büyümesi ve farklılaşma gibi süreçlerde kritik roller oynar. RET geninde oluşan mutasyonlar, füzyonlar ve yeniden düzenlenmeler, bu kinaz reseptörün sürekli aktif hale gelmesine ve sonuç olarak onkojenik sinyal yolağının aşırı aktive olmasına yol açabilir (Mahato ve Sidorova, 2020). Bu durum, hücre proliferasyonu, metastaz ve genel olarak kanser patogenezi için elverişli bir ortam yaratır (Andrini vd., 2022; Stinchcombe, 2020) (Şekil 2.11). KHDAK'da RET füzyonları, genellikle KIF5B "Kinesin Family Member 5B" ve CCDC6 "Coiled-Coil Domain Containing 6" gibi farklı iyon taşıyıcı veya yapısal genlerle birleşerek oluşur. Bu füzyon onkojenlerin tanımlanması, hastalara yönelik hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesine olanak tanımaktadır (Shen vd., 2022). RET kinaz inhibitörleri (örn.

Selperkatinib, Pralsetinib) ile tedavi, RET pozitif KHDAK hastalarında umut verici klinik sonuçlar sağlamıştır. RET sinyal yolağı ayrıca, Ras-MAPK, PI3K-Akt ve JAK-STAT gibi hücre içi aşağı akım (downstream) sinyal yolağını aktive ederek, tumör hücrelerinin hayatta kalmasını ve proliferasyonunu destekler (Nguyen ve Geirnaert, 2023). Aktif RET kinaz, downstream yolakları (Ras-MAPK, PI3K-Akt, JAK-STAT) aktive ederek hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve anti-apoptotik süreçleri teşvik eder (Belli vd., 2020; Regua vd., 2022).



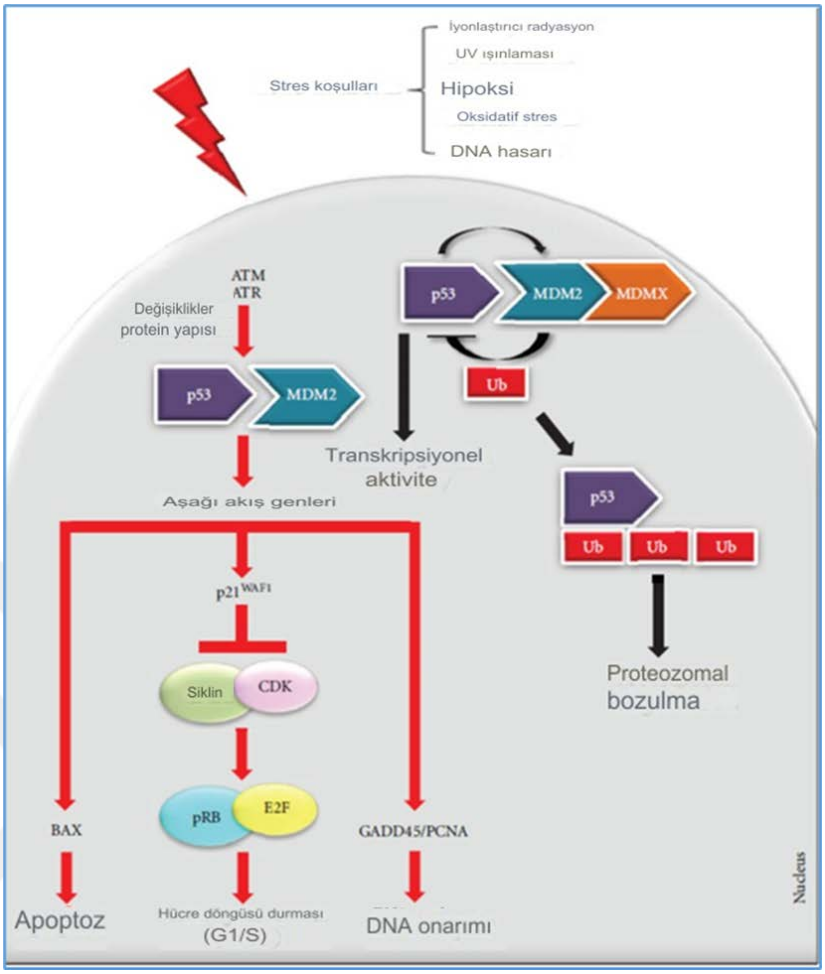
Şekil 2. 11 KHDAK'da RET sinyal yolağı (Regua vd., 2022)

2.3.9 TP53 (Tümör Protein 53) Sinyal Yolağı

KHDAK'da p53 tümör baskılayıcı genin mutasyonları, bu kanserin gelişimi ve progresyonunda kritik bir rol oynamaktadır. p53, hücresel streslere yanıt olarak genomun bütünlüğünü koruyan bir transkripsiyon faktörüdür (Pflaum vd., 2014). Normal hücrelerde, p53 proteini düşük seviyelerde bulunur ve stres sinyalleri tarafından aktif hale getirilir. Bu sinyaller, DNA hasarı, hipoksi, veya onkogenik sinyaller gibi çeşitli faktörlerden kaynaklanabilir. p53'ün aktivasyonu, hücrenin siklusunu durdurmasına,

DNA hasarını onarmasına ve hatta apoptoz yolunu aktive ederek hasarlı hücrelerin elimine edilmesine neden olur (Ozaki ve Nakagawara, 2011) (Şekil 2.12). Bu süreçler, hücredeki genetik stabilitenin korunmasında önemli rol oynar. Ancak KHDAK'da, p53 geninde sıkça görülen mutasyonlar bu biyolojik fonksiyonları bozarak tümör gelişimine katkıda bulunur (Mogi ve Kuwano, 2011). Spesifik olarak, p53 genindeki mutasyonlar, proteinin transkripsiyonel aktivitesini kaybetmesine ve DNA bağlama kabiliyetinin azalmasına neden olur, bu da hücresel streslere yanıt verememesi ile sonuçlanır. Mutant p53 proteini, dominant negatif etki gösterebilir, yani yabanıl tip p53 proteini fonksiyonlarını da engelleyebilir. Ayrıca, bazı mutant p53 proteinleri onkogenik özellikler kazanarak tümör progresyonunu daha da artırabilir. p53 mutasyonları, KHDAK'daki diğer genetik ve epigenetik değişikliklerle birlikte hücre proliferasyonunu, anjiyogenezi, metastatik yetenekleri ve kemoterapiye direnç gelişimini hızlandırır (Mogi ve Kuwano, 2011; Rivlin vd., 2011). Sonuç olarak, p53'ün moleküler yolağındaki bozulmalar, KHDAK'ın patogenezinde merkezi bir öneme sahiptir ve p53 yolağını hedef alan terapötik stratejiler, bu kanser türünün tedavisinde potansiyel bir umut kaynağı olarak değerlendirilmektedir. Geçmişte yapılan çalışmalar, p53 yolağını yeniden aktive etmeye yönelik çeşitli stratejileri önermiştir. Bunlar arasında, mutant p53 proteininin yeniden düzenlenmesi (Wang vd., 2023) (Yu vd., 2014), MDM2 inhibitörleri kullanarak p53'ün yıkımının engellenmesi (Hai vd., 2015; He vd., 2021) ve p53 yolağının diğer bileşenlerini (Bi vd., 2024; Hasan vd., 2023) hedef alan tedavi yöntemleri bulunmaktadır. Özellikle MDM2 inhibitörleri, p53 proteininin stabilitesini artırarak onun tümör baskılayıcı aktivitelerini geri kazandırmayı amaçlayan umut verici ajanlar olarak öne çıkmıştır (Yao vd., 2024). Ayrıca, mutant p53'ün onkogenik fonksiyonlarını baskılayan küçük moleküller de preklinik çalışmalarda test edilmektedir (Yu vd., 2014).

Bütün bu gelişmelere rağmen, p53 yolağının karmaşıklığı ve KHDAK'daki heterojenlik, p53-hedefli terapilerin etkinliğini optimize etmek için daha fazla araştırma gerektiğini göstermektedir.



Şekil 2. 12 KHDAK'da p53 sinyal yolağı (Bellini vd., 2012)

2.3.10 WNT (Wingless-İlişkili Entegrasyon Yeri Proteini) Sinyal Yolağı

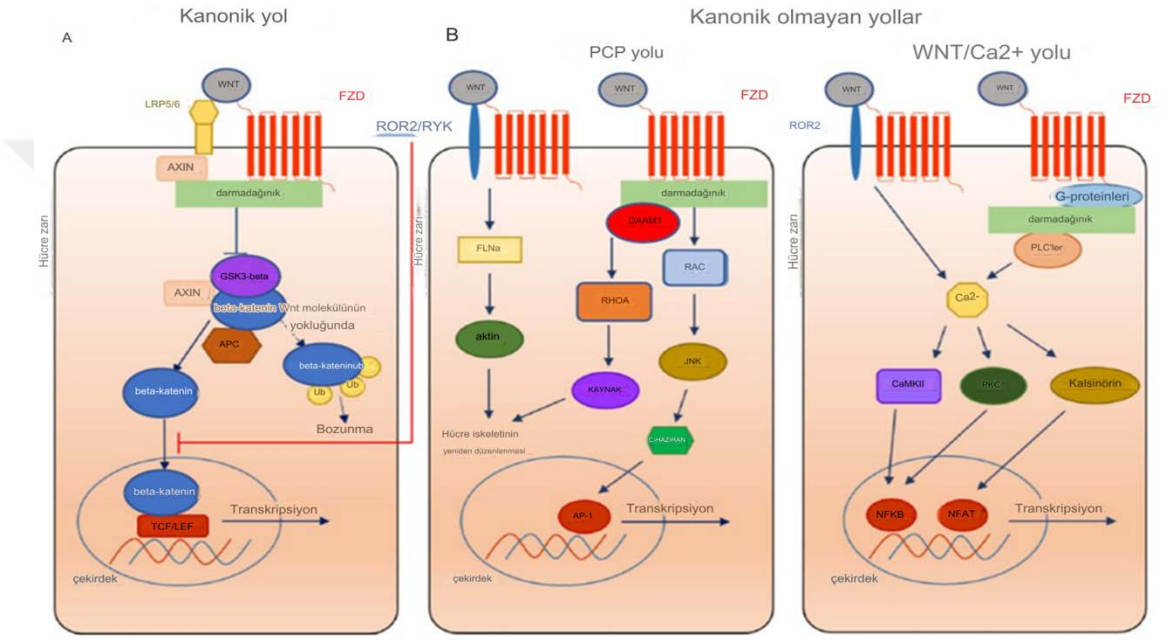
KHDAK'ın patogenezinde yer alan moleküler mekanizmalardan biri de hücresel proliferasyon, diferansiyasyon ve apoptozis gibi temel biyolojik süreçler üzerinde önemli etkileri olan Wnt sinyal yolağıdır. Bu yolağın anormal aktivasyonu, tümör hücrelerinin proliferasyonunu ve hayatta kalmasını desteklerken, apoptozu inhibe eder (Huang vd., 2008; Shapiro vd., 2013; X. Shen vd., 2023; Stewart, 2014; Xue vd., 2023). Bu yolak, kanonik (β-katenin bağımlı) ve kanonik olmayan (β-katenin bağımlı olmayan) dallar olmak üzere iki ana kola ayrılır. Kanonik WNT sinyalinde, WNT proteinlerinin Frizzled reseptörleri ile LRP5/6 ko-reseptörlerine bağlanmasıyla başlar. Bu bağlanma, hücrenin yüzeyinde özel bir sinyal kompleksinin oluşumuna neden olur. Bu kompleks, β-kateninin yıkılmasını engelleyen Disheveled adlı bir proteini aktive eder. Disheveled'in aktive olması, β-katenin yıkım kompleksinin (APC, Axin ve GSK-3β gibi bileşenlerden oluşan)

ayrılmasına ve β-kateninin sitoplazmada birikmesine neden olur. Bu süreç, β-kateninin nükleusa girmesine izin verir, burada T-cell factor/lymphoid enhancer factor (TCF/LEF) transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girerek hedef genlerin ekspresyonunu düzenler (Ackers ve Malgor, 2018; Qin vd., 2024) (Şekil 2.13). KHDAK'da Wnt/β-katenin yolunun anormal aktivasyonu, tümör hücrelerinin proliferasyon, invazyon ve metastaz yeteneklerini arttırır (Xue vd., 2023). Çeşitli araştırmalar, β-katenin seviyelerinde artış, Wnt ligandı ekspresyonunda yükselme ve negatif düzenleyici proteinlerde (örn. DKK1, SFRP) azalma gibi değişikliklerin KHDAK ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Li vd., 2020; Shi vd., 2009; Song vd., 2019). Kanonik olmayan WNT sinyal yolağında ise β-katenin bağımsız işlemlerle karakterize edilir ve PCP 'planar hücre polaritesi' ve WNT/Ca^{2+} sinyal yolları olarak iki ana şekilde sınıflandırılır (Rapp vd., 2017). Bu yollar hücresel hareket, yönlendirilmiş hücre göçü ve hücre polaritesi gibi süreçlerde rol oynar. PCP yolağında Wnt ligandlarının Frizzled ve diğer PCP bileşenlerine bağlanması ile aktive olur. Bu yol, hücre içi aktin iskeletini yeniden düzenleyen RhoA, Rac1 ve JNK gibi küçük GTPazları ve kinazları içerir. Bir diğer nonkanonik yolak olan WNT/Ca^{+2} yolağı ise WNT ligandlarının Frizzled reseptörleri ve G protein-bağlı reseptörlerle (GPCR) etkileşime girmesiyle tetiklenir. Bu etkileşim, intraselüler kalsiyum seviyelerinin artmasına neden olur, bu da protein kinaz C (PKC), kalsinörin ve kalsiyum kalmodulin bağımlı kinaz II (CaMKII) gibi efektör proteinlerin aktivasyonunu sağlar. Bu yol, hücre polarite, morfogenez ve apoptoz gibi çeşitli hücresel süreçlerin düzenlenmesine katkıda bulunur.

Bu bulgular, WNT sinyal yolağının KHDAK'in moleküler patogenezinde merkezi bir rol oynadığını ve bu yolun hedeflenmesinin potansiyel terapötik stratejilere kapı açabileceğini ortaya koymaktadır. Bu yolağın modülasyonu üzerine yapılan preklinik ve klinik araştırmalar, WNT/β-katenin yolağının çeşitli bileşenlerine yönelik küçük moleküller (Xue vd., 2023), monoklonal antikorlar (Park ve Kim, 2023) ve peptid inhibitörleri (Kim vd., 2007) gibi terapötik ajanların etkinliğini test etmektedir. Bu çalışmalar, KHDAK hücrelerinde WNT yolağına özgü inhibitörlerin uygulanabilirliğini ve bu tedavi yaklaşımlarının tümör hücrelerinde büyüme ve yayılmayı nasıl engellediğini değerlendirmektedir. Özellikle, tankyrase inhibitörleri (Casás-Selves vd., 2012; Huang vd., 2009) ve β-katenin/TCF etkileşimini bozmayı hedefleyen küçük moleküller (Catrow vd., 2015; Yan vd., 2017), preklinik modellerde umut verici sonuçlar göstermiştir. Bu

ajanların, KHDAK'in direnç mekanizmalarını aşmada ve mevcut terapilerle kombine edildiğinde tedavi etkinliğini artırmada potansiyel rolleri araştırılmaktadır.

WNT sinyal yolağı, KHDAK'da önemli bir onkogenik yol olarak ortaya çıkmaktadır. WNT sinyal yolağı, hücre büyümesi, farklılaşması, hücre göçü ve hücre kaderi belirlenmesinde kritik rol oynayan bir sinyal iletim yoludur. Bu yolak, WNT proteinlerinin hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanmasıyla başlar ve bir dizi hücre içi olayın tetiklenmesine neden olur (Şekil 2.13).



Şekil 2. 13 KHDAK'da WNTsinyal yolağı. A) Kanonik yol B) Kanonik olmayan yollar (Rapp vd., 2017)

WNT/β-katenin sinyal yolağının anormal aktivasyonu, akciğer kanserinin gelişiminde ve ilerlemesinde önemli bir rol oynar. Bu yolağın aşırı aktivasyonu, hücre proliferasyonunu teşvik ederken, hücre döngüsü kontrol noktalarını atlayarak ve apoptozu engelleyerek tümör gelişimine katkıda bulunur (Mo vd., 2019). WNT sinyal yolağının bileşenlerindeki mutasyonlar veya ekspresyon değişiklikleri, akciğer kanserinde sıkça gözlemlenir. Özellikle, β-katenin stabilitesini artıran mutasyonlar, kanser hücrelerinin kontrolsüz büyümesine yol açar (Liu vd., 2022; Shang vd., 2017). WNT yolağını düzenleyen genlerin metilasyonu veya histon modifikasyonları, bu yolağın aşırı aktivasyonuna neden olabilir (Liu vd., 2017; Ramazi vd., 2023). WNT sinyal yolağını hedef alan terapötik stratejiler arasında WNT ligand İnhibitörleri (WNT ligandlarının Frizzled ve LRP5/6

reseptörlerine bağlanmasını engelleyerek sinyal yolağını inhibe eder)(Chang vd., 2015), β-katenin İnhibitörleri (β-kateninin hücre çekirdeğine girişini veya aktivitesini engeller)(Yan vd., 2017), GSK-3β Aktivasyonu (GSK-3β'nın aktivitesini artırarak β-kateninin yıkımını teşvik eder) (Shang vd., 2017), sinyal yolağının negatif düzenleyicilerinin aktivasyonu Dickkopf (DKK) ve Secreted Frizzled Related Proteins (sFRPs) gibi negatif düzenleyicilerin etkilerini artırarak WNT sinyalini baskılayan terapiler)(Song vd., 2019) gelmektedir. Preklinik ve klinik deneyler, WNT sinyal yolağını hedefleyen bu tür ajanların etkinliği ve güvenliği üzerinde yoğunlaşmıştır. Örneğin, tankyrase inhibitörleri β-katenin stabilizasyonunu azaltmakta ve tümör hücrelerinin büyümesini durdurmada etkili olabilmektedir.

2.4 Kanser Araştırmalarında Gelişmiş Hücre Kültürü

Hücre kültürü, canlı insan veya hayvan hücrelerinin kontrollü laboratuvar koşullarında büyütülmesi ve incelenmesi yöntemidir. Bu teknik, biyolojik araştırmaların temelini oluşturarak hücresel süreçlerin, genetik ifadelerin ve hastalık mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına olanak sağlamıştır. Hücre kültürünün temelleri, 19. yüzyılın sonlarında Wilhelm Roux tarafından kurbağa embriyosunun aseptik koşullarda bir tuz çözeltisi içinde muhafaza edilmesiyle atılmıştır. Ancak, modern hücre kültürü tekniklerinin temelleri, 20. yüzyılın başlarında Ross G. Harrison'ın çalışmalarıyla atılmıştır. Harrison, sinir hücrelerinin dış ortamda büyütülebileceğini göstererek, doku kültürü alanının öncüsü olmuştur(Harrison, 1906). İlerleyen yıllarda, Alexis Carrel'in aseptik tekniklerle geliştirdiği sürekli hücre hatları, hücre kültürü yöntemlerinin daha geniş ölçekte uygulanmasına olanak tanımıştır. 1950'lerde, George Gey tarafından Henrietta Lacks'tan izole edilen bir serviks kanseri hücre hattı (HeLa) türetilmesi, insan hücrelerinin sürekli kültürünü mümkün kılmıştır. Bu gelişme, hücre biyolojisi ve kanser araştırmalarında yeni ufuklar açmıştır. HeLa hücre hatlarının geliştirilmesiyle başlayan bu önemli gelişme başta kanser araştırmaları olmak üzere, aşı, ilaç geliştirme, genetik tanı ve mutasyonlar, diğer farklı hastalıkların moleküler biyolojisi gibi birçok *in vitro* çalışmayı beraberinde getirip moleküler biyolojide bir çığır açmıştır (Significant Research Advances Enabled by HeLa Cells - Office of Science Policy, t.y.). Hücre kültürü teknikleri onlarca yıl boyunca kanser hücrelerinin genomik ve proteomik analizlerinin yapılmasına olanak tanımıştır. DNA sekanslama, RNA ekspresyon profillemesi ve protein analizleri, kanser hücrelerindeki

genetik değişikliklerin ve işlevsel proteinlerin belirlenmesine yardımcı olmuştur (Milner ve Lennerz, 2024). Bu bilgiler, kanserin moleküler mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasını sağlar ve yeni terapötik hedeflerin keşfedilmesine katkıda bulunur. Ancak ilerleyen zaman ve teknolojilerle beraber 2B hücre kültürü yavaş yavaş yerini 3B hücre kültürü modellerine bırakmıştır. 3B hücre kültüründe doğal *in vivo* ortamı, şekli, doku sertliğini, stres faktörlerini, gradyanları ve hücresel arası etkileşimleri daha doğru bir şekilde simüle ederek, *in vitro* hücre kültürleri ile *in vivo* çalışmalar arasındaki farkın azalması hedeflenmektedir. Ayrıca, bu modellerin kullanılmasıyla beraber hayvan deneyleriyle ilişkili maliyetler ve etik kaygıları da azalmıştır (Bédard vd., 2020). 3B hücre kültürlerinde üçüncü boyutun eklenmesi, diğer hücrelerle etkileşimde bulunan hücre yüzeyi reseptörlerinin uzamsal organizasyonunu etkiler ve 2B hücre kültürlerine kıyasla hücrelere fiziksel kısıtlamalar getirir. Bu gibi bir ortam oluşturulmasıyla 3B hücre kültüründe gerçek kendine özgü sito-mimariyi, *in vivo* hücresel yapıyı, gen ekspresyonunu, metabolizmayı, proliferasyonu, oksijenlenmeyi, besin emilimini, atık uzaklaştırılması ve ilaç alımını taklit ederken, hücre-ekstrasellüler matriks (ECM) bağlantılarını ve hücreler ve mikroçevre ile iletişimini koruyarak moleküler süreçleri ve hücresel fenotipleri etkiler (Wanigasekara vd., 2023). 3B hücre kültürü sferoid ve organoid modelleri, kanser hücrelerinin doğal ortamlarına daha yakın koşullarda büyümesini sağlar ve daha gerçekçi tümör modelleri oluşturur (Roman vd., 2023).

2.5 Üç Boyutlu (3B) Hücre Kültürü Sistemleri

Günümüzde çok çeşitli 3B hücre kültürü sistemleri geliştirilmiştir. 3B kültür sistemleri, hücrelerin doğal ortamlarına daha yakın koşullarda büyümesini sağlar. Gelişmiş hücre kültürü teknikleri, genetik ve epigenetik profillerinin kapsamlı bir şekilde analiz edilmesine olanak tanır. Kanser araştırmalarında 3B modeller, hücresel heterojeniteyi ve tümör mikroçevresinin etkilerini daha gerçekçi bir şekilde yansıtarak çeşitli omik veri setlerinin doğruluğunu artırır. Bu veriler, yeni biyobelirteçlerin ve terapötik hedeflerin keşfine katkı sağlar (Langhans, 2018). Aşağıda kanser araştırmalarında kullanılan 3B hücre kültürü sistemleri verilmiştir(Biju vd., 2023).

2.5.1 Asılı Damla (Hanging Drop)

Asılı damla (Hanging Drop) tekniği ilk olarak 19. yüzyılın sonlarında Alman mikrobiyolog Robert Koch tarafından tanımlanmıştır (Blevins ve Bronze, 2010). Teknik, başlangıçta bakteri hareketliliği ve davranışlarını kontrol altındaki bir ortamda gözlemlemek amacıyla geliştirilse de daha sonra hayvan hücre kültüründe sıklıkla kullanılmıştır. Hanging drop tekniği, bir cam kapağa küçük bir sıvı kültür damlası yerleştirerek başlar, bu cam kapak daha sonra bir oyuk lam üzerine (çukur lam) ters çevrilir. Bu düzenek, kapağın alt kısmında kapatılmış bir damla ortam yaratır. Damla, lamın ortasındaki çukurda askıda kalarak buharlaşma ve kurumayı önlerken hücreler veya mikroorganizmalar için doğal bir ortam sağlar. Daha sonra Hanging drop tekniği, kanser araştırmalarında kullanılmak üzere modifiye edilerek genel bir teknik olarak kullanılmaya başlanmıştır (Foty, 2011). Bu teknik, kanser hücrelerinin üç boyutta kültüre edilmesine olanak sağlar ve böylece geleneksel iki boyutlu kültürlere kıyasla *in vivo* tümör ortamını daha yakından taklit eder. Asılı damla tekniğinde, belirli bir miktar hücre süspansiyonu damlaları kültür kabının düz yüzeyine yerleştirilir. Tüm hücre süspansiyonu damlaları belirlenen konumlarına eklendikten sonra, damlaların yüzeyi ters çevrilir. Hücre süspansiyonunun yüzey gerilimi, damlanın eklenmiş yüzeyden asılı kalmasını sağlar ve yer çekimi hücreleri damlanın en uç noktasına sürükler. Damlanın dibinde, hücreler birleşerek hücre agregatı oluştururlar. Oluşan yapılar üniformdur ve boyutları hücre ekim yoğunluğu değiştirilerek ayarlanabilir. Bir doku içindeki hücreler, yakın komşularıyla ve ECM bileşenleriyle sıkı bağlantılar kuran sıkı bir doku kitlesi içinde yer alır. Bu nedenle, 3B bir doku içindeki hücrelerin maruz kaldığı kimyasal ortam ve fiziksel kuvvetler, monolayer kültürde yetiştirilen hücrelere göre temel olarak farklıdır. Bu durumun hücresel morfoloji ve sinyalizasyon üzerinde belirgin etkiler yarattığı gösterilmiştir. Asılı damla tekniği hücreler arası etkileşimi içerse de destekleyici bir iskele olmayan bir yöntem olduğundan, asılı damlalar hücre-matriks etkileşimini içermezler. Günümüzde hanging drop tekniği, modern hücre kültürü sistemlerinin bir parçası olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle kanser araştırmalarında, ilaç keşfinde ve hücresel doku mühendisliği çalışmalarında kullanılan 3B hücre kültürü modellerinin oluşturulmasında önemli bir araç haline gelmiştir (Lovitt vd., 2014).

2.5.2 Ultra- Düşük Yapışma ‘ULA’ Plakalar

ULA plakalar, tümör hücrelerinin *in vivo* tümör mikroçevresini yakın şekilde taklit eden bir şekilde büyümesini sağladıkları için kanser araştırmalarında önemli bir ilerlemeyi temsil eder. ULA yöntemi, hücrelerin tutunmasını teşvik etmek yerine, hücrelerden kaçınan bir yüzey kullanılarak hücrelerin plaka yüzeylerine yapışmaması prensibine dayanır ve böylece hücreleri kümeleşmeye teşvik eder. ULA plakalar, hücre morfolojisi ve mikro çevre açısından *in vivo* tümörlere daha çok benzeyen tümör sferoidlerinin oluşumuna olanak tanır. 3B mimari, hücreler arası etkileşimlerin daha fizyolojik olarak uygun bir bağlamda incelenmesini sağlar. ULA plakaları, plastik veya cam gibi çeşitli malzemelerden yapılır ve hücrelerin tutunmasını ve yayılmasını önlemek için özel olarak işlenmiş bir yüzeye sahiptir. ULA yöntemi basit ve kolaydır, çünkü sadece özel bir tür plaka gerektirir. Bu yöntem, birçok kanser araştırmasında tümör yapısını taklit etmek amaçlı kullanılmıştır (Amaral vd., 2017; Audoin vd., 2022; Cirigliano vd., 2017; Mosaad vd., 2018). Yöntem oluşturulan sferoidler yapılar açısından *in vivo* ortamı taklit etmeyi amaçlasa da, oluşan sferoidlerin merkezine yeterli oksijen ve besin tedariki sağlanamaması, hücre kültürünün daldırılmış bir ortamda olması nedeniyle nekrotik merkezlere yol açmaktadır. ULA plakalarında yetiştirilen tümör sferoidleri, ilaç taraması için daha doğru bir model sunar. Katı tümörlerde bulunan gradientlere benzer gradientlerin varlığı nedeniyle, sferoidler proliferasyon, durgunluk ve nekroz bölgelerini barındırır; bu nedenle ilaç tepkileri bu bölgeler arasında farklılık gösterir. Bu karmaşıklık, etkili tedavi ajanlarının belirlenmesi için kritik öneme sahiptir (Lee ve Kim, 2021). ULA plakalar, çoğu zaman tümör nüksü ve kemoterapi direnci ile ilişkilendirilen kanser kök hücrelerinin (KKH büyümesini destekler. Sferoidler içindeki KKHlerin incelenmesi, bu dirençli hücre popülasyonlarını hedef alan stratejilerin geliştirilmesine yardımcı olur (Phi vd., 2018).

2.5.3 Manyetik Levitasyon

Kanser araştırmalarında kullanılan *in vitro* modellerin biyolojik gerçekçiliğini artırmak amacıyla geliştirilen bir diğer 3B hücre kültürü sistemi manyetik levitasyondur. İlk defa 2010 yılında geliştirilen bu teknikte hücreler öncelikle biyouyumlu manyetik demir oksit (MIO) nanopartiküller ile etiketlenir. Daha sonra, hücrelere manyetik alan uygulanarak hücrelerin belirli bir yükseklikte askıda kalması sağlanır. Bu süreç, hücrelerin manyetik kuvvetlerin etkisi altında organize olmasına ve doğal 3B yapılar oluşturmasına olanak sağlar (Souza vd., 2010). Bu teknoloji şu anda N3D Biosciences tarafından geliştirilmekte ve Greiner Bio-One Ltd. tarafından ticarileştirilmektedir. Manyetik levitasyon ile oluşturulan 3B hücre kültürleri, kanser hücrelerinin morfolojik ve fenotipik özelliklerini daha iyi korumasını sağlar. Bu durum, tümör büyümesi, metastaz ve ilaç direnci gibi kritik biyolojik süreçlerin daha doğru şekilde incelenmesine olanak tanır. Ayrıca bu teknikle, kimyasal gradientler ve oksijen dağılımı gibi mikroçevresel faktörlerin modellendiği mikroçevre simülasyonlarını da geliştirebilir. Böylece, tümör mikroçevresinin dinamik yapısını daha gerçekçi bir şekilde taklit etmek mümkün olur. Manyetik levitasyonla elde edilen 3B sistemler, hücre proliferasyonu, invazyonu ve apoptoz gibi biyolojik süreçlerin yanı sıra gen ekspresyon profilerinin de *in vivo* koşullara daha yakın değerlere sahip olmasını sağlamaktadır. Bu, özellikle tümör mikroçevresinin karmaşık yapısının modellenmesinde büyük önem taşır. Böylelikle, sadece kanser hücrelerinin değil, tümörle ilişkili fibroblastlar, immün hücreler ve diğer stromal elemanların davranışlarını da incelemek mümkündür. Manyetik levitasyon tekniği hızlı ve nazik hücre toplanmasını kolaylaştırma avantajına sahiptir ve manyetik alan oluşturulması için gerekli mıknatıslar ve MIO dışında yapay bir substrat, özel medya veya ekipman gerektirmez. Teknik belirli bir hücre türüyle sınırlı değildir, heterojen hücre popülasyonlarının ve stromal elemanların bir arada kültüre edilmesi açısından da avantajlıdır. Birçok farklı hücre tipinin sferoidler halinde bir araya getirilmesiyle birlikte ko-kültürler gerçekleştirilebilir (Jaganathan vd., 2014; Noel vd., 2017).

2.5.4 Mikroakışkan Çip Teknolojileri

Mikroakışkan Çip platformlarının prensibi, küçük hacimlerde ve alanlarda (mikro seviyesinde) bir kanallar ağı içinde sıvıların manipülasyonuna dayanmaktadır. Mikrofluidik cihazlar, kanser hücreleri, örneğin dolaşan tümör hücreleri (CTC'ler) (Tellez-Gabriel vd., 2019) gibi hücrelerin kandan ayrılması için kullanılmış olsa da, son yirmi yılda 3B kanser hücre kültürleri için de kullanılmaya başlanmıştır (Jeon vd., 2015; Miller vd., 2018; Schuster vd., 2020; Toh vd., 2018). Mikroakışkan çipler, tümör mikroçevresinin dinamik ve kompleks yapısını taklit eder. Mikroakışkan kanallar kullanılarak, hücreler üzerinde kontrollü bir mikro-çevre yaratılır ki bu, tümör mikroçevresinin mekanik ve kimyasal özelliklerini taklit etmede önemlidir. Bu teknoloji, ilaca karşı hücresel yanıtların daha doğru bir şekilde değerlendirilmesini sağlar. 3B mikroakışkan platformlar çeşitli şekillerde olabilir, cam, polistiren, polikaprolakton gibi farklı malzemelerden yapılabilir ve *in vivo* tümör mikroçevresini daha iyi benzetmek için çeşitli tiplerde iskeleler içerebilir (Berthier vd., 2012; Ko vd., 2019; Schuster vd., 2020). Bu çeşitlilik, geniş yelpazedeki kanser tiplerini ve onların çeşitli mekanizmalarını incelemek için olanak sağlar.

2.5.5 Sferoidler

Sferoid kültürlerde, hücreler süspansiyonda büyütülür ve bir araya gelerek küresel yapılar oluştururlar. Bu teknik, tümörlerin 3B mimarisini yakından taklit eder ve araştırmacılara daha fizyolojik olarak uygun bir ortamda hücre-hücre etkileşimlerini, ilaç tepkilerini ve kanser biyolojisinin diğer yönlerini incelemelerini sağlar. Bunun yanında sferoid kültürler *in vivo* ortamı taklit etmek amacıyla bir destek iskele üzerinde de büyütülebilir. İskele temelli kültürde, hücreler dokularda bulunan ekstraselüler matrikse benzeyen bir destek veya matriks üzerinde yetiştirilir. Bu, hücrelere mekanik destek sağlayarak karmaşık 3B yapılar oluşturmalarını sağlar. İskele temelli kültür, hücre göçü, invazyon ve çevredeki mikroçevre ile etkileşimleri incelemek için kullanılabilir (Abuwatfa vd., 2024). Kanser araştırmalarında sferoid çalışmaları, son yıllarda hem temel bilim hem de uygulamalı araştırmalar açısından büyük önem kazanmıştır (Audoin vd., 2022; El Harane vd., 2023; Ko vd., 2019; Zanoni vd., 2016). Sferoidler, hücrelerin doğal ortamlarında gerçekleşen hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerini daha iyi taklit eder ve bu nedenle daha

fizyolojik bir mikroçevre sağlar. Bu modellerin kanser araştırmalarında kullanımı, özellikle tümörün heterojen yapısını, hipoksik bölgelerini ve kimyasal gradientlerini incelemek için değerlidir. Sferoidler farklı yöntemlerle oluşturulabilir. Bunlar arasında, hücrelerin düşük yapışkanlı plaklar üzerine ekilmesi, asılı damla kültürü yöntemleri ve mikroakışkan cihazlar kullanılarak hücrelerin mikroçipler içinde birleştirilmesi sayılabilir (Amaral vd., 2017; Teng, 2015; Togo vd., 2021; Vadivelu vd., 2017). Kanser araştırmalarında sferoid kullanımının yaygınlaştığı alanlardan biri de ilaç taramalarıdır (Tung vd., 2011). 3B sferoidler, aday ilaçların etkinliğini ve toksisitesini değerlendirmek için geleneksel 2B hücre kültürlerine kıyasla daha güvenilir sonuçlar verir. Ayrıca, bu modeller, kanser hücrelerinin ilaçlara karşı kazanmış oldukları direnci ve potansiyel tedavi kombinasyonlarına tepkilerini incelemek için de kullanılır (Nayak vd., 2023).

2.5.6 Organoidler

Organoidler, kök veya progenitör hücrelerden türetilen ve dokuya özgü özellikler gösteren mini-organ yapılarıdır. Organların yapısını ve işlevini yakından taklit eden bu karmaşık 3B yapılar, kişiselleştirilmiş kanser modellerini incelemek ve daha fizyolojik bağlamda ilaç yanıtlarını test etmek için araştırmacılara imkân sunar. Bu yapıların kendiliğinden organizasyonu, hücrelerin doğal ortamlarındaki davranışlarını daha iyi yansıtmaktadır. Organoidler, organ dokularındaki belirli hücre tiplerine farklılaşabilen kendini yenileyen kök hücre popülasyonları içerir (Bartfeld ve Clevers, 2017). Geleneksel 2B hücre kültürüyle karşılaştırıldığında, organoidler daha zengin hücre kompozisyonuna ve fizyolojik olarak daha yakın işlevselliğe sahiptir, bu nedenle biyolojik fonksiyon araştırması, yapay organ geliştirme, hastalık modelleme ve ilaç taramasında yaygın kullanım alanı bulmaktadır (Lancaster ve Knoblich, 2014). Organoid kültürü, kanser araştırmalarında ve ilaç geliştirmeyi daha etkili hale getirmeye yönelik yüksek teknolojileri kullanır. Organoid modelleri, hastadan elde edilen tümör dokusundan türetilerek, bireysel hastalara özgü tümör modelleri oluşturulmasına imkân tanır ve kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine katkı sağlar (Clevers, 2016; Drost ve Clevers, 2018). Organoid modeller, çeşitli kanser türlerinin biyolojik süreçlerini incelemek, genetik mutasyonların fonksiyonel etkilerini araştırmak ve ilaç taramaları yapmak için kullanılmaktadır. İlk organoid model 2009 yılında Sato ve ark. tarafından bağırsak epitelinde bulunan kök hücreler kullanılarak üretilmiştir. Bu LGR5+ kök

hücreler farklılaşarak tek bir bağırsak kriptinden kript-villus benzeri epitel alanlar oluşturmuş kendi kendini organize eden yapılar meydana gelmiş ve bu yapılara da gut organoid adını vermişlerdir (Sato vd., 2009). Organoidler hücre hattı kaynaklı sferoidlere bir alternatif olarak, hasta kaynaklı biyopsiler gibi birincil dokulardan elde edilen hücreleri kullanır. Bu tür 3B yapılar Hasta Kaynaklı Organoidler (Patient Derived Organoids) (PDO'lar) olarak bilinir. Meme (Chen vd., 2021), akciğer (Hu vd., 2021) pankreas (Lai vd., 2020), yumurtalık (Kopper vd., 2019), prostat (Servant vd., 2021) ve karaciğer kanseri (Broutier vd., 2017) gibi birçok kanser türlerinden PDO'lar başarıyla üretilmiştir. Hastalardan alınan tümör örnekleri, katı cerrahi rezeksiyon materyali, punch veya ince iğne aspirasyon veya biyolojik sıvı biyopsisi şeklinde olabilir (Dekkers vd., 2021; Vlachogiannis vd., 2018; Zhang vd., 2014). Birincil biyopsilerden organoidler üretme süreci genellikle tümörün küçük bir kısmının eksize edilmesini, daha küçük parçalara kesilmesini ve ardından kültür için mekanik ve/veya enzimatik olarak parçalanmasını içerir. Organoid üretimi için kullanılan kültür koşulları, tümör tipine bağlı olarak kullanılan medyanın ve yöntemin seçimini içerir. Bu koşullar genellikle belirli büyüme faktörlerinin ve hücre dışı matriks bileşenlerinin kullanılmasını içerir ve bu da uygun hücresel organizasyon ve işlevin korunması için önemlidir. Organoidler, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerini içeren kompleks mikroçevreyi yansıtarak tümörlerin *in vivo* ortamlarını daha doğru bir şekilde simüle eder. Primer kanser dokusundan türetildiklerinde, hastaya özgü genetik profilini koruyarak kişiselleştirilmiş tedaviler için önem teşkil ederler. Ayrıca farmakolojide ilaç tarama çalışmaları için uygun platformlar sunar. Bu sayede, çeşitli ilaçların etkinliği ve toksisitesi, hasta özelinde test edilebilir ve en uygun tedavi stratejileri belirlenebilir. Organoid modellerin geliştirilmesinde, kök hücrelerin uygun biyomalzemeler ile çevrelenmesi ve uygun büyüme faktörleri ile beslenmesi önemlidir. Organoidler, sıklıkla Matrigel gibi jel matrikslerde kültüre edilir ve bu ortamlarda proliferasyon, farklılaşma ve organizasyon süreçleri takip edilir. Bağışıklık sistemi hücreleriyle birlikte kültüre edilen organoidler, immünoterapi ajanlarının etkinliğini test etmek ve bağışıklık hücreleri ile tümör hücreleri arasındaki etkileşimleri incelemek için kullanılabilir. Bunlarla beraber organoid üretimi ve kültürü karmaşık süreçler içerdiği için, sonuçların tutarlılığı ve standardizasyonu büyük bir zorluk teşkil eder (Yang vd., 2023b).

2.5.7 Üç Boyutlu (3B) Biyobasım

3B biyobasımın ortaya çıkışı, çeşitli biyomedikal araştırma alanlarını devrim niteliğinde dönüştürmüş olup, kanser araştırmaları bu alanlar arasında en umut verici olanlardan biridir. 3B biyobasım kavramı, dokuların doğal mimarisini yeniden oluşturan daha doğru fizyolojik modeller oluşturma ihtiyacından doğmuştur. Kökleri, 2000'lerin başlarında biyomalzemelerin katman katman biriktirme potansiyelinin araştırıldığı 3B baskı teknolojilerindeki gelişmelere dayanır (Savini ve Savini, 2015). Bu teknik, çeşitli biyoyazıcı türleri (enjeksiyon, lazer destekli, mikroekstrüzyon gibi) ve biyomürekkeplerin (hidrojeller, doğal ve sentetik polimerler) kullanımını içerir. Biyobasım sürecinde, hücrelerin spesifik bir doku mimarisine göre düzenlenmesi ve biyomatriks unsurları ile birlikte entegre edilmesi sağlanır. Canlı hücrelerin bu iskelelere entegrasyonu ile beraber doku mühendisliği ve rejeneratif tıptaki erken başarılar, bu tekniklerin kanser araştırmalarına uygulanması için çerçeve sağlamıştır (Bishop vd., 2017; Tripathi vd., 2023). Tümör modellerinin 3B basım ile üretilmesi kanser araştırmalarında birçok avantaj getirmiştir. Örneğin 3B basım tümör modelleri, gerçek tümörlerin heterojenliğini, mikroçevresini ve mekansal mimarisini daha doğru bir şekilde temsil eder. Bu, araştırmacıların kanserin ilerlemesini, invazyonunu ve çevredeki stromal hücrelerle etkileşimini daha gerçekçi bir ortamda incelemelerine olanak tanır. Bir diğer avantaj yıllardır potansiyel ilaç taramaları büyük ölçüde 2B hücre kültürlerine dayanırken ve bu kültürler *in vivo* ortamı yeterince taklit edemezken 3B biyobasım modeller, kemoterapi ilaçları, hedefe yönelik tedaviler ve yeni bileşikler için daha güvenilir bir platform sağlamıştır, bu da klinik deneylerdeki başarısızlık oranlarını potansiyel olarak azaltır. Bir diğer avantajı hastadan türetilmiş hücrelerin, bireyselleştirilmiş tümör modelleri oluşturmak için biyobaskı ile üretilebilir olmasıdır. Bu, bir hastanın kanserinin spesifik genetik ve fenotipik özelliklerini araştırmaya olanak tanır ve kişiselleştirilmiş ilaç testleri ve özel tedavi stratejileri için potansiyel sunar. Metastaz, kanserle ilişkili ölümlerin önde gelen nedenidir. 3B biyobasım, metastatik mikroçevreyi kopyalayarak kanser yayılımında ve yabancı dokularla etkileşimde yer alan hücresel mekanizmaların incelenmesini kolaylaştırır. Bunlar gibi avantajlara rağmen 3B biyo basım birtakım zorluklar da içerir. Örneğin kritik sorunlardan biri, farklı laboratuvarlar arasında standardizasyon eksikliğidir. Biyobasım tekniklerinde, materyallerde ve hücre

kaynaklarında meydana gelen değişkenlik, tutarsız sonuçlara yol açabilir. Ayrıca biyomürekkep olarak kullanılan malzemelerin biyouyumluluğu ve mekanik özellikleri önemlidir. Her malzemenin hücre davranışı üzerindeki etkisi dikkatle incelenmelidir; çünkü kimi malzemeler hücrelerin orijinal özelliklerini korumasını zorlaştırabilir. Biyobasım sürecinin ardından hücrelerin hayatta kalması ve doğru fonksiyon göstermesi kritik önem taşır. Bunu sağlamak için optimum basım koşullarının ve besleyici ortamların belirlenmesi gereklidir (Tripathi vd., 2023). Tüm bu zorluklara rağmen 3B biyobasım kanser araştırmalarında oynadığı rol, hızla gelişen bir alan olarak büyük potansiyele sahiptir. Ayrıca, biyobasım tümör modellerinin klinik uygulamalara geçişi, kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımının etkisini artırarak hasta sonuçlarını iyileştirebilir.

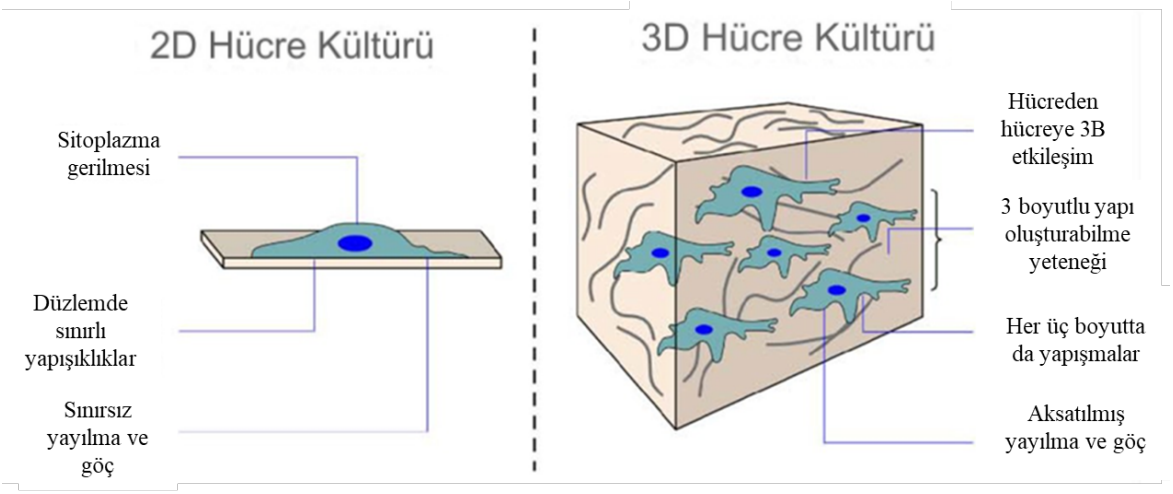
2.5.8 Ko-kültür sistemleri

Kanser araştırmalarında 3B hücre kültürü, tümör mikroçevresinin daha doğru bir şekilde taklit edilmesi ve hücre-hücre etkileşimlerinin incelenmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Ko-kültür çalışmaları, iki veya daha fazla farklı hücre tipinin aynı ortamda birlikte kültüre edilmesi yöntemidir. Bu sistemler, hücre-hücre etkileşimlerini, hücre sinyalini ve mikroçevredeki değişiklikleri daha detaylı incelemek için kullanılır (Liu vd., 2022). Ko-kültür sistemleri, kanser hücrelerinin bağışıklık hücreleri, fibroblastlar ve endotelyal hücreler gibi farklı hücre türleri ile etkileşimlerini incelemek için kullanılır. Bu sistemler, tümör mikroçevresinin kompleks yapısını ve hücre-hücre etkileşimlerinin rolünü anlamakta kritik öneme sahiptir. Ko-kültür yaklaşımları, tümör invazyonu, metastaz ve immün yanıt mekanizmalarının aydınlatılmasında önemli bilgiler sağlar. Ko-kültür sistemleri, in vitro koşullarda daha gerçekçi ve kompleks hücre davranışlarının gözlemlenmesine olanak tanır (Vis vd., 2020). Kanser araştırmalarında ko-kültür çalışmaları, özellikle tümör mikroçevresindeki karmaşık etkileşimleri modellemek için kullanılır. Ko-kültür çalışmalarının sağladığı faydalar arasında hücre-hücre sinyalizasyonunun incelenmesine olanak sağlaması, tümör gelişiminde mikroçevre etkilerinin analizi ve farklı hücre tiplerinin birlikte kullanıldığında verdikleri ilaç yanıtlarının karşılaştırılmasına olanak sağlaması gelebilir. Ko-kültür sistemleri doğrudan kokültür (iki veya daha fazla hücre aynı ortamda kültüre edilir ve birbirleriyle fiziksel teması ve doğrudan etkileşimi sağlanır)(Abu-Absi vd., 2004), transwell kokültür (hücreler geçirgen bir membran ile farklı bölmelerde tutulur, fiziksel temas engellenerek

salgılanan faktörlerin etkileri gözlemlenir) (Chung vd., 2018) ve 3B ko-kültür modellemesi (Hidrojeller, matrigel benzeri ECM bileşenleri, mikrodesenli yüzeyler veya biyobaskılama teknikleri kullanılarak, hücreler daha kompleks 3B yapılar içinde kültüre edilir)(Otsuka vd., 2013) olarak 3 ana grupta oluşturulabilir. Kanser araştırmalarında kullanılan kokültür sistemlerinde genellikle üç hücre tipi dikkat çeker. Tümör hücreleri ve fibroblastların (CAF'ler) ko-kültürü, fibroblastların tümör büyümesi üzerindeki etkilerini anlamak için kullanılır. Bu tür çalışmalar, mikroçevredeki stromal hücrelerin salgıladıkları sinyal molekülleri aracılığıyla tümör hücrelerinin proliferasyonunu ve metastazını nasıl teşvik ettiğini incelemekte önemli veriler sunar (Horie vd., 2015) . Bir diğer ko-kültür sistemi tümör hücreleri ile lenfositler, makrofajlar veya dendritik hücreler gibi bağışıklık hücrelerinin ko-kültür sistemidir. Bağışıklık sisteminin kanser üzerindeki etkilerini araştırmak için kullanılır. Örneğin, tümörle ilişkili makrofajların (TAM) tümör büyümesini destekleyen veya inhibe eden rolleri ko-kültür modelleri kullanılarak incelenir (Raffo-Romero vd., 2024). Üçüncü tip ko-kültür sistemi tümör hücrelerinin endotelyal hücreleri ile kokültürüdür. Tümör anjiyogenezinin (yeni kan damarı oluşumu) incelenmesi için kritik öneme sahiptir. Bu çalışmalar, tümör hücrelerinin salgıladığı anjiyojenik faktörlerin endotelyal hücreleri üzerindeki etkilerini ve neovaskülarizasyon sürecini anlamaya yardımcı olur (Oh vd., 2020). Ko-kültür modelleri, geleneksel tek hücre tipi kültürlerine kıyasla daha kompleks ve fizyolojik olarak ilgili veriler sağlar, böylece kanser biyolojisine dair daha kesin ve uygulamaya yönelik iç görüler elde edilmesini sağlar (Klemm ve Joyce, 2015).

2.6 2B ve 3B Hücre Kültüründe Avantajlar ve Dezavantajlar

İki boyutlu ve üç boyutlu hücre kültür sistemlerinin her birinin kendine has avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. İki sistem arasında çeşitli farklılıklar vardır (Şekil 2. 14) Çalışmanın amacına bağlı olarak, her iki sistem de farklı araştırma soruları için uygun olabilir. Örneğin, hızlı ve düşük maliyetli taramalar yapmak için 2B kültürler uygun olabilirken, tümör mikroçevresinin daha doğru bir şekilde modellenmesi ve ilaç etkinliğinin daha doğru değerlendirilmesi için 3B kültürler tercih edilebilir. Bu nedenle, her iki kültür sistemini kullanarak bütüncül ve kapsamlı sonuçlar elde etmek genellikle en iyi yaklaşımdır.



Şekil 2. 14 2B ve 3B hücre kültüründeki farklılıklar (Ustyugov vd., 2018).

Öncelikle 2B kültürlerin laboratuvarda yetiştirilmesi ve bakımı daha kolay olup, genellikle daha düşük maliyetlidir. 3B kültürlerin genellikle daha yüksek maliyetleri vardır; özel malzemeler ve ekipman gerekebilir. 2B sistemler genellikle çok tekrarlanabilir ve standardize edilebilir, bu da sonuçların tutarlılığını artırır. 3B kültürlerin kurulumu, bakımı ve analizi daha karmaşık olabilir ve daha fazla teknik bilgi gerektirir. 2B sistemlerde hücreleri mikroskop altında gözlemlemek daha kolaydır, bu da hücre morfolojisi ve hücre-hücre etkileşimlerinin gözlemlenmesini sağlar. 3B kültürlerin mikroskop altında gözlemlenmesi ve analiz edilmesi daha zor olabilir. Örneğin, hücreler farklı derinliklerde bulunduklarından detaylı analiz için ileri düzey görüntüleme tekniklerine ihtiyaç duyulabilir (Graf ve Boppart, 2010). 2B kültürlerde hücrelerin genetik ve proteomik analizi daha kolaydır, çünkü daha homojen hücre popülasyonları elde edilir. 3B kültürlerdeki deneylerin tekrarlanabilirliği genellikle daha düşüktür. Heterojen yapı ve değişkenler deneyler arasında farklı sonuçlar alınmasına neden olabilir. 2B kültürlerde hücreler üç boyutlu dokulardaki doğal ortamlarından farklı olarak düz bir yüzeyde büyürler, bu da fizyolojik süreçler ve hücre davranışları üzerinde farklılıklar yaratabilir. Hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimleri sınırlıdır, bu da hücrelerin gerçek dokular içindeki davranışlarını tam olarak yansıtmaz. 3B kültürler, hücre-matriks etkileşimleri ve hücre-hücre etkileşimlerinin daha doğru bir modeli olup, hücreler doğal ortamlarına daha yakın büyürler. Tümör hücrelerinin neovaskülarizasyon veya hipoksi gibi kompleks mikroçevresel faktörlere karşı tepkilerini 2B sistemlerde incelemek zordur. 3B kültürler, hipoksi gibi mikroçevresel koşulları modellemekte daha üstündür, bu da

tümör mikroçevresini daha iyi taklit eder. 2B sistemlerdeki ilaç testlerinde hücreler genellikle tek bir düzlemde büyüdüğü için, bu ortamlar vücuttaki kompleks hücre etkileşimlerini tam olarak yansıtmaz; oysaki 3B sistemlerde ilaçların difüzyon gradientleri üzerindeki etkilerini daha gerçekçi şekilde yansıttığı için, tedavi yanıtlarını ve ilaç etkinliğini değerlendirmek daha doğrudur. Tümör hücreleri 3B kültürlerde daha doğal morfolojik özellikler sergiler, bu da invazyon, göç ve metastaz gibi süreçleri daha doğru modellemeyi sağlar (Nishiguchi vd., 2018).

2.7 Matrigel

Kanser araştırmalarında üç boyutlu kültür ortamı oluşturmak ve hücrelere *in vivo* koşullardaki ortamını taklit edebilmek için çeşitli biyomalzemeler kullanılmaktadır. Bunlardan Matrigel, 1980'lerin başında Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) tümöründen elde edilen temel zar materyalleri üzerine yapılan çalışmalar sonucunda keşfedilmiştir (Kleinman vd., 1986) . Matrigel, hücre kültürü çalışmalarında yaygın olarak 3B hücre modelleri oluşturmak için kullanılır. Bu modeller, hücrelerin *in vivo* mikroçevrelerini taklit etme kapasitesine sahiptir, böylece daha gerçekçi biyolojik tepkiler ve etkileşimler incelenebilir. Matrigel, fare EHS tümörlerinden türetilen kompleks bir ECM bileşiğidir. Yapısında laminin, kollajen IV, nidogen/enaktin ve heparan sülfat proteoglikan gibi çeşitli ESM proteinlerini içerir. Bu zengin içerik, hücre yapışması, göçü, farklılaşması ve proliferasyonunu destekleyen biyolojik aktiviteleri sağlamaktadır (Passaniti vd., 2022). Matrigel genellikle sıvı formda elde edilmekte ve soğutulmuş koşullarda (+4°C) saklanmaktadır. Fiziksel olarak katı hale gelmesi ise 37°C'ye ısıtıldığında gerçekleşir. Bu nedenle, çalışılan hücrelerin üzerinde ortam sıcaklığına getirilen Matrigel, biyolojik ortamda hücresel davranışları destekleyen bir yapıya bürünür. Matrigel'in yüksek biyolojik aktivitesi, özellikle saflaştırılmamış haliyle kullanıldığında çeşitli büyüme faktörlerini de içermesinden kaynaklanır (Kleinman vd., 2003). Matrigel, biyomedikal araştırmalarda hücrelerin gerçek biyolojik ortamlara daha yakın koşullarda çalışılmasını mümkün kılarak, özellikle 3B hücre kültürü modelleri ve doku mühendisliği alanlarında önemli bir araç olmuştur.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Kimyasal Maddeler

- Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640), Gibco/ABD
-Fetal Sığır serumu (FBS), Gibco/ABD
-Penisilin-Streptomisin (10.000U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin), Gibco/ABD
-Fosfat tuz tamponu (PBS), Thermo Scientific/ABD
-0,05% Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin-EDTA), Gibco/ABD
-Dimetil sülfoksit (DMSO), Gibco/ABD
-Tripan mavisi (%0,5), Gibco/ABD
-Matrigel, Corning/ABD
-Niklozamid, Sigma/Almanya
-Dosetaksel, GENSENTA/Türkiye
-Paklitaksel, NOVARTİS/İsviçre
-Cisplatin, KOÇAK FARMA/ Türkiye
-Doksorubisin, KOÇAK FARMA7 Türkiye
-5-Fluoro Urasil (5-FU), KOÇAK FARMA/Türkiye
-Gemsitabin, KOÇAK FARMA/ Türkiye
-Pemetrexed, KOÇAK FARMA/ Türkiye
-Caelyx, Baxter/ABD
-Setuksimab, MERCK/Almanya
-Holoxan (Ifosfamid),
-Klorokin, Sigma/Almanya
-Resveratrol, Chem Cruz /Hollanda
-Triton X-100, Sigma/ABD
-Phalloidin I-Fluor-488 Reagent, Abcam/UK
-Hoechst 33342, Thermo Scientific/ABD
-Propidium İyodür, Cell Signaling Technology/ABD
-%37 Formaldehit, Sigma/ABD
-Kollojenaz Tip II, Sigma/ABD
- Sodiıum citrate (powder), Sigma/ABD

- LDS Sample Buffer (Nu-PAGE, 4X), Thermo Scientific/ABD
-Sample Reducing Agent (Nu-PAGE ,10X), Thermo Scientific/ABD
- Protein standardı (MagicMark XP), Thermo Scientific/ABD
-DR-4 poliklonal antikor, CST/ABD
-Caspase-8, poliklonal antikor, CST/ABD
-Bcl-2, poliklonal antikor, CST/ABD
-k-PARP, poliklonal antikor, CST/ABD
-GAPDH, poliklonal antikor, CST/ABD
-RIPK1, poliklonal antikor, CST/ABD
-ATG3, poliklonal antikor, CST/ABD
-MRP-1, poliklonal antikor, CST/ABD
-c-MYC, poliklonal antikor, CST/ABD
-Fibronektin, poliklonal antikor, CST/ABD
-E-kaderin, poliklonal antikor, CST/ABD
-Vimentin, poliklonal antikor, CST/ABD
-Ki-67, poliklonal antikor, CST/ABD
-Hematoksilen, Sigma/ Almanya
-Eozin, Sigma/ Almanya
- Sulforhodamine B (SRB), Santa Cruz Biotechnology/ABD
- RIPA lysis buffer (1X) Santa Cruz Biotechnology/ABD
- Tween-20, AMRESCO/ ABD
- Z-Vad-FMK, pan-kaspaz inhibitörü, Enzo, ABD

3.1.2 Sarf Malzemeler

-25cm2 ve 75cm2'lik flask, Thermo Scientific/ABD
-6 kuyulu plate, Thermo Scientific/ABD
-96 kuyulu flat plate, Thermo Scientific/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 (0,22 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

- 96 kuyulu beyaz plaka, Corning, ABD

- iBlot™ Gel Transfer Stacks, Thermo Fisher Scientific, ABD

- NuPAGE™ Novex™ 4-12% Bis-Tris Protein Jel, Thermo Fisher Scientific, ABD

- Poly-L-Lizin kaplı lam, Thermo Scientific/ABD

3.1.3 Cihazlar

-Mikro plaka spektrofotometre, Biotek/ABD

-CO_2 inkübatörü, Panasonic/ABD

-Mikroplate inkübatör ve çalkalayıcı, Heidolph/Almanya

-Buharlı sterilizatör (Otoklav), Nüve/Türkiye

-Class II Laminar Akım, Haier/Çin

-Multipipet sistemi, Hamburg/Almanya

-İnvert floresan mikroskop, Olympus/Japonya

-EVOS M5000 hücre görüntüleme sistemi, İnvitrogen/ABD

-Soğutuculu Santrifüj, Beckman Culture/ABD

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

-Luminometre (FL×800 Mikroplate) Biotek, ABD

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

- Hassas terazi, Shimadzu AUW220D, Japonya

- Görüntüleme cihazı (Fusion FX-7), Vilber Lourmat, Fransa

- Western Blot Dikey Elektroforez Sistemi, ABD

- Iblot Transfer Cihazı, Thermo Scientific, ABD

- Rotary Mikrotom, Leica, ABD

- Lam Kurutucu, Zenon, Türkiye

3.1.4 Kitler

-Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, ABD

-Adenosine 5'-triphosphate (ATP) bioluminescent somatic cell assay kit, FLASC, Sigma, Almanya

-Andy Fluor 488 Anneksin V Kiti, ABP Biosciences, ABD

- Ultra vision detection system Large Volume Anti-polyvalent, Thermo Fisher Scientific, ABD

3.2 Yöntem

3.2.1 Hücre Kültürü

Hücre kültürü çok hücreli bir organizmadan alınan hücrelerin in vitro ortamda büyütülmesidir. Bu hücreler bir bağışçı organizmadan elde edilen (primer hücreler) veya ölümsüzleştirilmiş (immortal) hücre soyları olabilir. Kültür koşulları hücre tipine göre değişmekle beraber genel olarak hücrelerin organizma içinde yaşadığı ortam mimik edilmeye çalışılır. Bu ortam amino asitler, karbohidratlar, vitaminler, mineraller gibi esansiyel besinleri, büyüme faktörlerini, hücre çeşidine göre hormonları, gazları (CO_2 vb.) içeren pH, osmotik basınç ve sıcaklığın (37 ^{0}C) sabit tutulduğu bir büyüme ortamı olarak ifade edilebilir. Çoğu hücre bağlanmaya bağımlı olup (adeziv) yapışkan tek tabaka halinde kültüre edilirken, diğer bazı hücreler kültür ortamında yüzerek (süspanse) büyütülebilirler (Martin, 2014). Bu kültürler, hücrelerin bazı temel özelliklerini ve işlevlerini incelemek için kullanışlıdır. Ancak, gerçek yaşam koşullarını daha iyi taklit edebilen 3 boyutlu hücre kültürlerine geçiş, araştırmacılara daha fazla bilgi ve daha gerçekçi sonuçlar sağlar (Pampaloni vd., 2007).

3.2.1.1 Tez Çalışmasında Kullanılan Hücreler

Tez çalışmasında ikisi kanser ikisi sağlıklı olmak üzere 4 akciğer hücre soyu kullanıldı. A549 insan alveolar bazal epitelyal adenokarsinom ve H1299 insan KHDAK hücre soyları ve sağlıklı Beas-2B insan bronşiyal epitelyal ve MRC-5 insan akciğer fibroblast hücre soyları kullanıldı.

3.2.1.2 Hücre Soylarının Besiyerlerinin Hazırlanması

Çizelge 3.1 Tez çalışmasında kullanılan hücre soyları ve besiyerlerinin içerikleri.

Hücre Soyu	Büyüme Besiyeri
A549	%10 FBS (Fetal Bovine Serum), %1 Penisilin-Streptomisin, RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute)
H1299	%10 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin, RPMI-1640
Beas-2B	%10 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin, %1 Esansiyel olmayan aminoasit, RPMI-1640
MRC-5	%10 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin, DMEM (Dulbecco's Minimum Esssential Medium)

3.2.1.3 Hücre Soylarının Stoktan Çıkarılması

Hücre soyları -86 ^{0}C'de bulunan stoklardan alındı ve 37^{0}C'de su banyosunda hızlı bir şekilde çözdürüldü. Her bir hücre soyu 5mL besiyerine eklenerek 1000 rpm'de 5 dakika santrifuj edilerek hücrelerin çökmesi sağlandı. Süpernatan kısmı uzaklaştırılarak üzerine 1mL taze besiyeri eklendi ve iyice karıştırıldı. Hücreler 75 cm^2'lik hücre kültürü flasklarına ekilerek homojen bir şekilde dağılmaları sağlandı. Hücreler daha sonra 37 ^{0}C ve %5'lik CO_2 ortamında inkübe edildi (Ozturk vd., 2021).

3.2.1.4 Hücre Soyların Pasajlanması ve Stoklanması

Hücrelerin Pasajlanması: Hücre soyları %85-90 yoğunluğa (konfluent) ulaştıktan sonra kullanmış oldukları besiyeri aspire edildi. Hücreler 1X fosfat tuz tamponu (PBS) ile tüm yüzeyi kaplayacak şekilde yıkandı ve PBS aspire edildi. Ardından %0,5 Tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek 37^{0}C ve %5'lik CO_2 ortamında 2 dakika inkübe edildi. Mikroskop altında hücrelerin yüzeyden kalktıkları gözlendikten sonra FBS içeren besiyeri eklenerek enzim aktivitesi durduruldu. Hücreler 15mL'lik falkon tüplere toplanarak 1000rpm'de 5 dakika santrifuj edildi. Süpernatant kısmı uzaklaştırılarak, kalan pelet kısmı büyüme

mediumu ile süspanse edildi ve hücreler 1:3 olacak şekilde 10mL besiyeri içinde yeni flasklara ekildi ve 37^0C ve %5'lik CO_2 ortamında inkübasyona bırakıldı.

Hücrelerin stoklanması: Hücre soyları %85-90 yoğunluğa (konfluent) ulaştıktan sonra kullanmış oldukları besiyeri aspire edildi. Hücreler 1X PBS ile tüm yüzeyi kaplayacak şekilde yıkandı ve PBS aspire edildi. Ardından %0,5 Tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek 37^0C ve %5'lik CO_2 ortamında 2 dakika inkübe edildi. Mikroskop altında hücrelerin yüzeyden kalktıkları gözlemlendikten sonra FBS içeren besiyeri eklenerek enzim aktivitesi durduruldu. Hücreler 15mL'lik falkon tüplere toplanarak 1000 rpm'de 5 dakika santrifuj edildi. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Hücre peleti freezing medium (%5 DMSO, %20 FBS ve RPMI-1640) ile süspanse edilerek, hücre süspansiyonu 1,5mL'lik karyoviallere aktarıldı. Daha sonra viallerin bir kısmı -86 ^{0}C'de, bir kısmı da sıvı azot tanklarında (-196 ^{0}C) daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere saklandı.

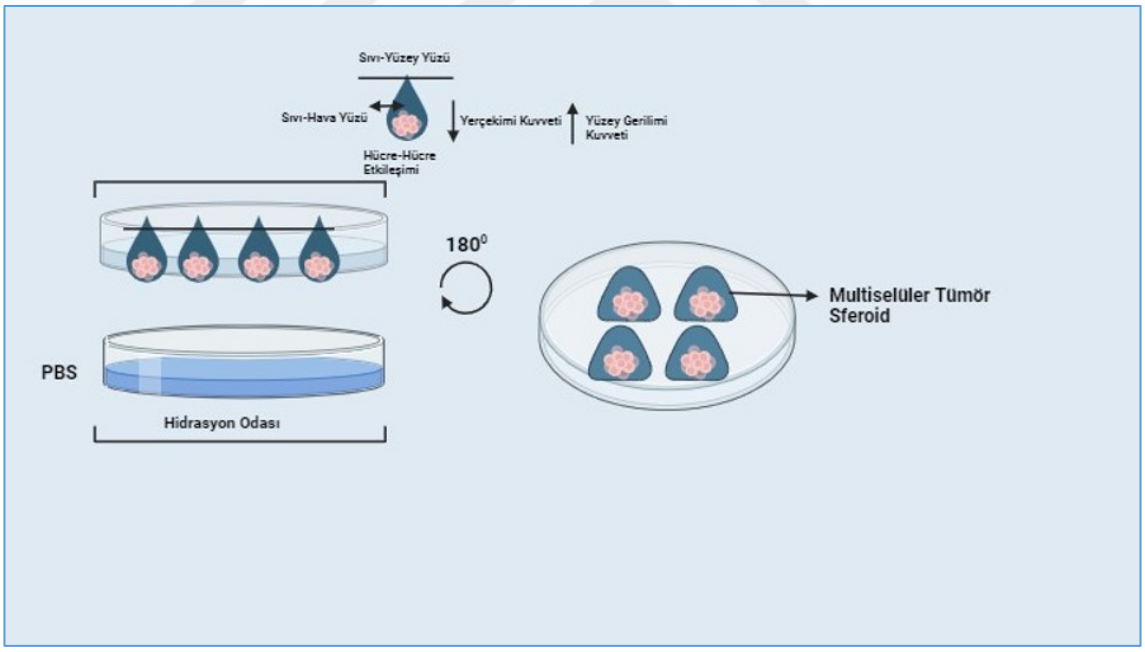
3.2.1.5 Tripan Mavisi Dışlama (Trypan Blue Exclusion) Testi ile Hücrelerin Sayılması

Tripan mavisi dışlama testi, belirli bir hücre popülasyonunda canlı (boyanmamış) ve ölü (mavi) hücrelerin doğrudan tanımlanmasına ve sayılmasına olanak sağlar. Canlı hücreler, hücre zarı bütünlüğünü koruduğu için boyanmazlar ve sayılabilirler. Öte yandan, ölü hücreler, hücre zarının hasar görmesi nedeniyle tripan mavi boyasını alır ve mavi olarak görünürler. Bu şekilde, hücrelerin canlılık durumu kolayca belirlenebilir ve sayıları belirlenebilir (Strober, 2015). Hücrelerin her bir çalışma öncesi sayılarını belirleyebilmek amacıyla hücrelerin içinde bulunduğu besiyeri aspire edilerek ortamdan uzaklaştırıldı. Hücreler 1X PBS ile yıkandıktan sonra %0,5 Tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek 37^0C ve %5'lik CO_2 ortamında 2 dakika inkübe edildi. Mikroskop altında hücrelerin yüzeyden kalktıkları gözlemlendikten sonra FBS içeren besiyeri eklenerek enzim aktivitesi durduruldu. Hücreler 15mL'lik falkon tüplere toplanarak 1000rpm'de 5 dakika santrifuj edildi. Süpernatan kısmı uzaklaştırıldı. Hücreler taze besiyeri ile süspanse edildi ve 1:1 oranında %0,4'lük tripan mavisi boyası ile karıştırıldı. Hücre-boya süspansiyonu Hemositometriye aktarıldı. Mikroskopta 5 ayrı alanda hücreler sayıldı ve bu sayı sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1 mL de bulunan canlı hücre sayısı hesapladı.

3.2.2 Asılı Damla "Hanging Drop" Tekniği ile Hücre Agregatı Oluşturulması

Hanging drop tekniği hücrelerde agregat oluşturularak üç boyutlu yapılar elde edilmesine olanak sağlamış bir hücre kültürü tekniğidir (Foty, 2011).

Öncelikle A549, H1299 akciğer kanseri hücre soyları ve Beas-2B sağlıklı akciğer bronşiyal epitelyal hücre soyu Çizelge 3.1'de belirtilen besiyeri, 37^0C ve %5'lik CO_2 ortamında çoğaltıldı. Hücreler sayıldıktan sonra Şekil 3.1'de görüldüğü gibi 60mmlik hücre kültürü kaplarının kapağına damla başına 500 hücre gelecek şekilde 20µL olarak bırakıldı. Hücre kültürü kabına 10mL 1X PBS ilave edildi, kapaklar hızlı ve dikkatli bir şekilde çevrilerek hücre kültürü kabı kapatıldı. Bu şekilde hücrelerin içinde bulunduğu damlaların kurumasını önlemek için bir hidrasyon odası oluşturuldu. Hücre-hücre interaksiyonu, yüzey gerilimi ve yer çekimi kuvvetine bağlı olarak hücrelerin agregat oluşturması sağlandı. Hücreler bu şekilde 3 gün 37^0C ve %5'lik CO_2 ortamda inkübe edildi (Liu vd., 2013).

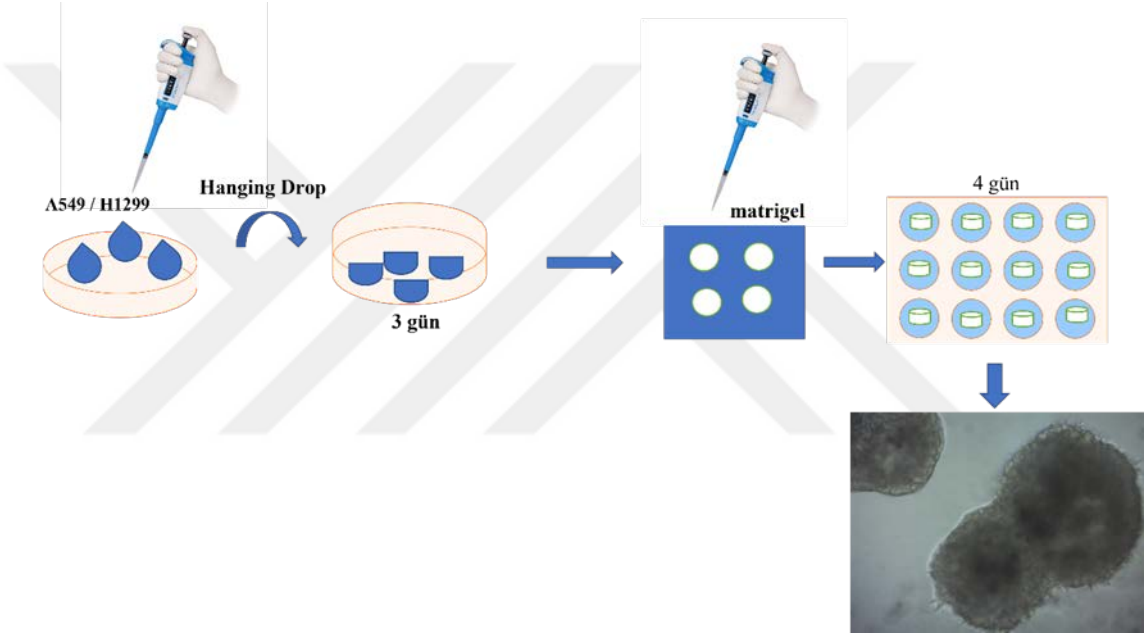


Şekil 3.1 Hanging drop tekniği ile multiselüler sferoid oluşturulması. BioRender.com kullanılarak oluşturulmuştur

3.2.3 Hücre Agregatlarının Matrigele Gömülmesi

Hücre agregatları 3.2.2 bölümünde anlatıldığı gibi hanging drop tekniği ile oluşturuldu. Daha sonra hücre agregatları steril parafilm üzerine açılmış oyuklara mikropipet

yardımıyla çekilerek bırakıldı. Matrigel +4^{0}C'de 6 saat boyunca çözüldü ve çalışma koşulları süresince buz bulunan ortamda bekletildi. Çözünmüş olan matrigelden 20µL alınarak hücre agregatları üzerine bırakıldı. Kuyularda al-ver yapılarak agregatların matriks içine gömülmesi sağlandı. Oluşturulan üç boyutlu yapılar 40 dakika 37^{0}Cde inkübe edilerek matriksin katılaşması sağlandı. Üç boyutlu tümör modelleri büyüme besiyeri içeren 24 kuyucuklu plakalara aktarıldı. 3B tümör modelleri 4 gün boyunca büyüme ortamında büyütüldü. 3B tümör modellerinin oluşturulmasının aşamaları Şekil 3.2'de verilmiştir. Bu sürenin sonunda ileri aşamalar için ilaç çalışmalarına geçildi.



Şekil 3.2 Üç Boyutlu Organotipik Tümör Modellerinin oluşturulma basamakları

3.2.4 Üç Boyutlu Organotipik Akciğer Tümör Modellerinin Karakterizasyonu

Hanging drop metodu ile oluşturulan hücre agregatlarında hücre sayısının oluşan tümör modelinin büyüklüğüne etkisini görebilmek amacıyla A549 ve H1299 akciğer karsinoma hücreleri 5-5000 hücre/ µL olacak şekilde 60mm'lik hücre kültür kaplarının kapaklarına 20µL miktarında bırakıldı. Dikkatlice ters çevrilerek hücrelerin yerçekimine ve hücre-hücre interaksiyonuna bağlı olarak agregat oluşturması sağlandı. Petrilerin alt kısmına PBS eklendi ve damlaların inkübe süresince kuruması önlendi. Hücreler bu şekilde 3 gün 37 ^{0}C ve %5'lik CO_2 ortamında asılı şekilde inkübe edildi. İnkübasyon süresinin ardından ışık mikroskopisi ile oluşan hücre agregatlarının büyüklükleri incelendi.

Daha sonra hücrelerin hanging dropta kalma sürelerinin oluşturulan agregatların morfolojik yapılarına etkisini belirlemek amacıyla 3-20 gün arasında 37^0C ve %5'lik CO_2 ortamında inkübe edildi. İnkübasyon sürelerinin ardından ışık mikroskopisi ile oluşan hücre agregatlarının morfolojik yapıları incelendi.

Oluşturulan 3B tümör modellerinin matrigelde kalma süresinin tümör oluşumuna etkisi yapıların farklı zamanlardaki (2, 4, 7 ve 14 gün) morfolojileri ışık mikroskopisi ile incelenerek değerlendirildi. Bu süreçlerde besiyerleri her 3-4 günde bir taze besiyeri ile değiştirildi ve görüntüleri alındı.

3.2.5 Üç Boyutlu Organotipik Akciğer Tümör Modellerininin Histolojik Analizi

3B organotipik tümör modellerinin yapılarının histolojik olarak belirlenmesi için öncelikle A549 ve H1299 3B organotipik tümör modellerinde doku takibi gerçekleştirildi. Bu amaçla oluşturulan 3B tümör modelleri mermerşahi kumaş içine aktarıldı ve kumaşla birlikte doku kasetinin içine kapatıldı. Kapatma işleminin ardından örneklerin içinde olduğu kasetler %10'luk formalin solüsyonu içinde 2 gün oda sıcaklığında bekletildi. Bu işlemin ardından dehidrasyon (suyu giderme) prosedürüne geçildi. Bu aşamada %70'lik etil alkolden başlanarak (70, 80, 90, 100-1, 100-2) her bir kavanozda 1 saat süre ile kasetleriyle birlikte bekletildi. Böylece 3B tümör modellerindeki su uzaklaştırıldı. Daha sonra ksilol içinde bekletilerek alkolden arınması sağlandı. Tümör modellerinin saydamlaşmasıyla birlikte parafin emdirme işlemine geçildi. İnkübatör (57 ^{0}C) içinde kavanozlarda boncuk parafin eritilip sıvı hale getirildi. Kasetler önce parafin 1 kavanozunda 1 saat, sonra parafin 2 kavanozunda 1 saat süre ile inkübe edildi. Ardından kalıplar içinde parafine gömme gerçekleştirildi. Oda sıcaklığındaki inkübasyonun ardından 1 gece +4^0C de bekletilerek parafinin tamamen sertleşmesi sağlandı. Ertesi gün rotary (döner) mikrotom, (LEICA, RM2125 RTS) kullanılarak 4µM kalınlığında ardışık kesitler alındı ve jelatin içeren su banyosuna bırakıldı. Her bir kesit bir lama denk gelecek şekilde 45 derecelik açıyla lama aktarıldı. Ardından lamlar taşıyıcı sepete alınarak 57^0C etüvde bir gece bekletildi. Ertesi gün örneklere Hematoksilen ve Eozin boyamaları yapıldı.

3.2.5.1 Hematoksilen ve Eozin Boyaması

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 boyar (Bancroft & Gamble, 2007; Demir, 2001) 3.2.5 bölümünde histolojik analiz için hazırlanmış 3B organotipik tümör modellerinin kesitleri, lam tutucu içinde birbirine değmeyecek şekilde yerleştirilmiş lamlar aşağıdaki sıralamada ve sürelerde cam şaleler içine yerleştirilerek boyama solüsyonları ve alkol solüsyonlarından geçirildi.

1. Ksilol 1: 7 dk
2. Ksilol 2: 7 dk
3. Lam tutucu ile açıkta bırakılıp ksilolün uçması sağlandı: 1 dk
4. Absolüt etil alkol (%100): 3 dk
5. %96'lık etil alkol: 3 dk
6. %80'lik etil alkol: 3 dk
7. %70'lik etil alkol: 3 dk
8. Lam tutucu ile beraber alınıp boş bir cam şaleye yerleştirilip akar çeşme suyunda tutuldu: 2 dk
9. Hematoksilen :12 dk
10. Lam tutucu ile beraber alınıp boş bir cam şaleye yerleştirilip akar çeşme suyunda tutuldu: 2 dk
11. Asit alkole (100 ml %70'lik alkole 1 mL derişik hidroklorik asit damlatılarak elde edildi) batırıp çıkarıldı.
12. Amonyakta (1%) distile su ile10 sn bekletildi.
13. Eozin içine aktarıldı: 4 dk
14. Lam tutucu ile çeşme suyu içeren cam şaleye aktarıldı bikaç defa çalkalandı, su
15. %70'lik etil alkol: batırılıp çıkarıldı
16. %80'lik etil alkol: batırılıp çıkarıldı
17. %90'lık etil alkol: batırılıp çıkarıldı
18. Absolüt etil alkol (%100): batırılıp çıkarıldı.
19. Lam tutucu içinde kurumaya bırakıldı.

20. Lam tutucudan dikkatlice tek tek çıkartılıp lam kurutma aletine doku kısımları yukarı gelmesine dikkat edilerek dizildi (40^0C de 10 dk).

21. Lamlar kuruduktan sonra tekrar ayrı bir cam şale içinde bulunan ksilole batırıldı ve yapıştırıcı bir madde olan Entellandan lam boyunca uzunlamasına bırakıldı ve kurumaya izin vermeden hemen lamelle üstü kapatılıp bistüri sapı ile kontrollü olarak desteklenerek hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi. Bir peçete yardımıyla dışarı taşanlar silindi.

Bu çalışmanın sonrasında A549 ve H1299 hücreleriyle oluşturulan 3B tümör modellerinde Hematoksilen ve Eozin boyaması sonucu hücre çekirdek ve sitoplazması ve hücrelerin dağılımı tayin edildi.

3.2.5.2 Ki-67 Boyaması

3B organotipik tümör modellerinden 4µm kalınlığında kesitler alındı ardından poly-L-lizin kaplı lamlar (P8920, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Amerika) üzerine kesitler geçirildi. Parafine gömülü kesitler H&E boyamasında olduğu gibi önce deparafinize edilip ardından rehidre edildi. Takip edilen aşamalar kısaca aşağıdaki gibidir;

- 1. Ksilol 1: 7 dk
- 2. Ksilol 2: 7 dk
- 3. Lam tutucu ile açıkta bırakılıp ksilolün uçması sağlandı: 1 dk
- 4. Absolüt etil alkol (%100): 3 dk
- 5. %96'lık etil alkol: 3 dk
- 6. %80'lik etil alkol: 3 dk
- 7. %70'lik etil alkol: 3 dk
- Distile su ile kısa bir yıkama yapıldı.

Daha sonra antijenin ortaya çıkarılması (antijen retrieval) aşamasına geçildi. Bu aşamada sodium sitrat (10 mM, %0,05 Tween 20, pH 6) kullanılarak mikrodalga fırında 600W ta 2 kez 5'er dk işleme tabi tutuldu. Bu aşamanın ardından barrier pen kullanılarak hidrofobik bir bariyer oluşturuldu. Endojen peroksidaz aktivitesini durdurmak için %3'lük H_2O_2 ile 5 dakika inkübe edildi. 1xPBS ile 2 kez yıkandıktan sonra Ultra V Block (Thermo Fisher, ABD) ile 5 dk inkübe edildi. Tekrar 1 kez yıkamanın ardından Ki-67

(CST, ABD) birincil antikor (antikor diluent içinde 1:250 oranında hazırlanmış) eklenerek gece boyunca +4 ^{0}C'de hidrasyon odası içinde inkübe edildi. Ertesi gün 4 kez 1xPBS ile yıkandıktan sonra Biotinylated Goat Anti-Poly valent (Thermofisher, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)) eklenerek 30 dk inkübe edildi. Tekrar 4 kez yıkandı ve streptavidin peroksidaz (ThermoFisher, ABD) eklenerek 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Tekrar 4 kez 1xPBS ile yıkandı ve peroksidaz uyumlu kromojen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), (ThermoFisher, ABD) ile renk oluşuncaya kadar inkübe edildi. Ardından hematoksilen ile yukarıda anlatıldığı aşamalardan geçirilerek counter boyama yapıldı. Örnekler entellan ile kaplanarak lamel ile kapatıldı. Euromax ışık mikroskobunda görüntüleri incelenerek fotoğraflandı. Farklı bölgelerden çekilen fotoğraflarla QuPath açık erişim yazılımı kullanılarak Ki-67 pozitif hücreler sayıldı ve hematoksilenle boyanmış total hücre sayısına bölünüp yüzde değeri hesaplanarak Ki-67 pozitif hücre indexi hesaplandı ve herbir tedavi için grafiklendirildi.

3.2.6 Kullanılan Kemoterapötik ve Diğer Ajanların Hazırlanması

Kombinasyon belirleme çalışmaları için Setuksimab, Holoxan, Pemetrexed, Cisplatin, Doksorubisin, Caelyx, 5-Flurourasil, Paklitaksel, Dosetaksel, Gemsitabin kemoterapötik ajanlar 100 test ilaç konsantrasyonu (TDC) dozundaki moleküler değerleri hesaplanarak uygulandı. TDC bir ilacın biyolojik sistemde belirlenen bir miktarda bulunmasını ifade eder ve ilaç araştırma ve geliştirme süreçlerinde, ilaç farmakokinetik ve farmakodinamik çalışmalarında, klinik araştırmalarda ve terapi etkinliği değerlendirmelerinde kullanılır. Klorokin (2,5µM) ve Resveratrol (50µM) dozlarında literatür bilgisi dahilinde kullanıldı (Liu vd., 2018; Whyte vd., 2007). Bu amaçla öncelikle tek doz kemoterapötik ilaç ve niklozamid kombinasyonları Akciğer hücre soyları (A549 ve H1299) üzerinde 2B hücre kültüründe denendi ve ileri aşama çalışmalar etkili bulunan Niklozamid ve Dosetaksel ikili ilaç kombinasyonu ile yapıldı. Niklozamid DMSO (20mM), Klorokin (50 mM) dH2O ve Resveratrol (50 mM) DMSO da çözünerek ana stoklar hainde -20°C'de saklandı.

3.2.7 Sülforodamin B (SRB) Hücre Canlılık Yöntemi

Öncelikle A549 (metastatik olmayan) ve H1299 (metastatik) akciğer kanseri hücre soyları soyları %10 FBS, 100IU/mL penisilin-100 µg/mLstreptomisin içeren RPMI-1640

besiyeri içerisinde 37^0C ve %5'lik CO_2 ortamında T-75 hücre kültürü kaplarında kültüre edildi. Tripan mavisi metodu ile sayıldıktan sonra 96 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına kuyu başına $5x10^3$ hücre gelecek şekilde ekildi. Hücreler 24 saat 37^0C ve %5'lik CO_2 ortamında tutunma ve ortam adaptasyonuna bırakıldı. Ertesi gün Niklozamidin değişen konsantrasyonlarında (0-20µM) ilaç uygulandı ve 24, 48 ve 72 saat Niklozamide maaruz bırakıldı. Ardından akciğer kanserinde klinik aşamada kullanılan farklı kemoterapötik ajanların (Setuksimab, Holoxan, Pemetrexed, Cisplatin, Doksorubisin, Caelyx, 5-Flurourasil, Gemsitabin ve Dosetaksel) (100 TDC) ve ikili kombinasyonları her iki akciğer soyunun kültür ortamına eklendi ve hücreler 72 saat boyunca tedaviye maruz bırakıldı. Tedavi sonrasındaki hücre canlılığı SRB hücre canlılık analizi ile tayin edildi(Orellana ve Kasinski, 2016).

Tedavi sonrasında hücreler, %50 (w/v) soğuk Trikloroasetik asit (TCA) ile fikse edildi ve %1 asetik asit içinde %0,4 (w/v) SRB boyası ile boyandı. Bağlanmamış boyalar %1'lik asetik asit ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Proteinlere bağlanan SRB boyası ise 10 mM Tris-baz kullanarak çıkarıldı ve optik yoğunluk (absorbans, Abs) 564 nm'de ELISA "microplate" okuyucusunda (Bio-Tek, ABD) ölçüldü. Tedavi uygulanmış ve kontrol hücrelerinden elde edilen absorbans değerlerine göre örneklerin % canlılığı aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$Canlılık\ (\%) = [100 \times (Örnek\ Abs) \div (Kontrol\ Abs)]$$

Bu aşamada alınan sonuçlarla ileri aşamalarda kullanılacak Niklozamid konsantrasyonu, süresi ve ikili kombinasyonda etkili bulunan kemoterapötik ajan tayin edildi.

3.2.8 Adenozin Trifosfat (ATP) Hücre Canlılık Yöntemi

SRB hücre canlılığı analizi ile iki boyutlu hücre kültüründe seçilen ikili ilaç kombinasyonunun farklı dozlarının A549 ve H1299 3B akciğer organotipik tümör modellerinde hücre canlılığına etkisi SRB den daha hassas bir metot olan ATP canlılık analizi ile tayin edildi. ATP canlılık metodunun prensibi hücre kültüründe büyütülen canlı hücrelerdeki intraselüler ATP içeriğinin ölçülmesi esasına dayanır. Mg^{+2} ve ATP'nin bulunduğu koşullarda Lüsiferin, Lüsiferaz enzimiyle Oksilüsiferine katalize olarak lüminesans bir ışık sinyali açığa çıkmasına sebep olur (Andreotti vd., 1995). ATP seviyesi ölçümü lüminesans teknolojisine dayandığı için diğer canlılık yöntemlerinden çok daha hassastır ve düşük hücre sayılarında bile (20 hücreye kadar) canlı hücre sayısı ile

yöntemde okunan RLU 'Relatif Işık Ünitesi' değerleri arasında mükemmel bir korelasyon bulunmaktadır (Petty vd., 1995). Öncelikle 3B tümör modelleri Niklozamid'in 2B de inhibitör dozu olarak ölçülen 0,625 µM ve Dosetaksel' in farklı dozlarının (0-28 µM) ikili kombinasyonlarına 72 saat maruz bırakıldı. 3B tümör modellerinde kemoterapötik tedavi sonrasındaki hücre canlılığını belirlemek amacıyla tedavi sonrasında 3B tümör modellerinden hücreleri ayırma işlemi gerçekleştirildi. 3B tümör modellerinin bulunduğu besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı ve matrigel kollajenaz (1mg/mL) ile 30 dk 37^0C'de inkübe edilerek hücrelerin yapıdan ayrılması sağlandı. Ardından hücreler insülin iğnesinden geçirilerek tek hücre haline dönüştürüldü. Hücre süspansiyonu 500 rpmde santrifüj edilerek matrigel matriks komponentleri ortamdan uzaklaştırıldı. Hücreler 1xPBS ile tekrar süspanse edilerek üzerine Tümör Hücresi Ekstraksiyon Reaktifi (TCER),1x solüsyonu eklendi ve 37^0C'de 20dk inkübe edilerek hücrelerin lizis olması sağlandı. Hücrelerin lizisi mikroskop altında onaylandıktan sonra hücre lizatı beyaz lüminesans 96 kuyucuklu plakalara alındı ve dilüsyon tampon çözeltisi ile karıştırılmış Lüsiferin-Lüsiferaz eşit oranda eklendi. Tedavi görmüş ve kontrol hücrelerindeki ATP içeriği aşağıda gösterilen lüsiferin-lüsiferaz biolüminesans reaksiyonu yardımıyla ölçme zamanı 1 saniye olacak şekilde lüminometre (Bio-Tek, USA) kullanılarak ölçüldü. Sonuçlar RLU olarak alındı.

$$\boldsymbol{ATP + Lüsiferin + O2} \xrightarrow{\boldsymbol{Lüsiferaz}} \boldsymbol{AMP + 2Pi + CO2 + Foton(RLU)}$$

Böylece tedavi uygulanmış ve kontrol hücrelerinden elde edilen RLU değerlerine göre örneklerin % canlılığı hesaplandı. Hücre canlılığı aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\boldsymbol{Canlılık}\ (\%) = [\mathbf{100} \times (\boldsymbol{Örnek\ RLU}) \div (\boldsymbol{Kontrol\ RLU})]$$

3.2.9 Koloni Oluşturma Analizi

Koloni oluşumu analizi veya klonojenik assay, tek bir hücrenin koloni haline gelme kabiliyetine dayanan bir *in vitro* analiz yöntemidir. Bu yöntem en az 50 hücreden oluşan hücre kolonilerinin temel olarak popülasyondaki her hücreyi "sınırsız" bir bölünmeye girme kabiliyeti açısından test eder (Franken vd., 2006). Niklozamid, Dosetaksel ve ikili kombinasyonlarının akciğer kanser hücrelerindeki koloni oluşturma potansiyeline etkisini görmek amacıyla akciğer kanser hücreleri kuyu başına $3x10^3$ olacak şekilde 6

kuyulu hücre kültür kaplarına ekildi. 24 saat 37ºC, %5'lik CO_2 ortamında inkübasyon sonunda Niklozamid, Dosetaksel ve ikili kombinasyonları 72 saat uygulandı. İnkübasyon sürecinin ardından ilaçlar kuyulardan çekilerek serum içeren büyüme besiyeri içerisinde 6 gün inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda 1 kere soğuk PBS (1x) ile yıkanan kuyular, buz soğukluğundaki %100 metanol ile 10 dk fikse edildi. Fiksasyonun ardından %0,05'lik kristal viyole ile boyanıp 15dk oda sıcaklığında bekletildi, fazla boyanın uzaklaştırılmasını takiben Euromex ışık mikroskobu ile görüntülendi.

3.2.10 Yara İyileşmesi 'Wound Healing' Analizi

Hücrelerin mikro çevreyle ve birbirleriyle etkileşimi ve migrasyon yetenekleri hücrelerin ilaç cevabında önemli bir yer tutar (Cukierman vd., 2002; Yamada vd., 2022) . Bu sebeple Niklozamid, Dosetaksel ve ikili kombinasyon tedavisinin hücrelerin göç etmesi üzerindeki etkisini ölçebilmek için A549 ve H1299 hücreleri 6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına kuyu başına $15x10^4$ hücre olmak üzere ekildi. Hücrelerin homojen bir şekilde kuyuya yayılması sağlandı. Hücre yoğunluğu %80'lere ulaştığında 1000µL'lik pipet ucuyla kültürlerde yaralar oluşturuldu. 1X PBS tamponu ile yıkandıktan sonra 0.saatte ilk görüntüleme alınıp Niklozamid (0,625 µM) ve Dosetaksel (0,44 µm ve 14 µM) ve ikili kombinasyonları ilgili kuyulara eklendi. 12 saat ara ile 48 saat boyunca görüntüleme alındı. İlaç içermeyen kontrol kuyularındaki yaralar kapanana kadar çalışmaya devam edildi.

3.2.11 Phalloidin Boyaması ile Aktin Filametlerin Belirlenmesi

A549 ve H1299 akciğer kanser hücreleri 8 kuyucuklu chamber slidelara (Ibidi, Germany) kuyu başına $5x10^3$ hücre olacak şekilde ekildi. Ertesi gün hücreler Niklozamid (0,625µM), Dosetaksel (0,44µM) ve ikili kombinasyonu ile 48 saat muamele edildi. Bu inkübasyon sürecinin ardından kuyulardan medium aspire edilerek 1xPBS ile yıkandı. Hücreler %4'lük paraformaldehit (1xPBS içinde) içerisinde oda sıcaklığında 15 dk sabitlendi. Fiksatif ortamdan uzaklaştırıldı ve hücreler %0,1 Triton-X-100 (PBS içinde) içeren ve hücrelerin geçirgenliğini arttıran yıkama solüsyonu ile yıkandı. Ardından imalatçı firmanın talimatlarına göre Phalloidin 488 boyası %1 BSA içeren 1xPBS solüsyonunda hazırlandı ve hücrelerin üzerine bırakıldı. Oda sıcaklığında 40 dk inkübasyonun ardından hücre çekirdeklerini tayin edebilmek için Hoechst 33342

(3µg/mL) nükleik asit boyası eklendi ve 10 dk daha inkübe edildi. Ardından hücrelerin çekirdek ve aktin mikrofilament görüntüleri EVOS M5000, Invitrogen hücre görüntüleme sistemi ile görüntülendi.

3.2.12 Üçlü Floresan Boyama

Floresan boyalar DNA'ya bağlanabilen boyalar olup hücre çekirdeğinin ve kromatindeki değişikliklerin görüntülenebilmesi için kullanılırlar. Hoechst 33342 (mavi) bu boyalardan olup canlı/ölü (apoptotik/nekrotik) bütün hücrelerin çekirdeklerini boyar. PI (kırmızı) ise yine bir DNA boyasıdır ancak sadece membranı hasar görmüş hücrelerde içeri girerek boyama gerçekleştirir. Annexin-V bir hücre populasyonunda apoptoz geçiren hücrelerin tayini için kullanılır. Apoptozun erken evrelerinde bir membran fosfolipidi olan fosfotidilserinler (PS) plazma zarının iç kısmından dış kısmına transloke olarak hücre membranının asimetrisini kaybetmesine sebep olurlar. Dış membrana transloke olan PS, Annexin V proteinine affinitesi vardır. Kalsiyum bağımlı fosfotidil bağlayıcı bir protein olan Annexin-V apoptotik hücrelerin belirlenmesinde kullanılır. FITC floresan molekülü ile işaretlenmiş Annexin-V fosfotidil serinlere bağlanarak apoptoza uğramış hücreleri görünür hale getirir ve floresan mikroskobu incelenmesine olanak sağlar. A549 ve H1299 3B tümör modelleri öncelikle 48 Sa boyunca Niklozamid (0,625µM), Dosetaksel (14µM) ve ikili kombinasyonlarına maruz bırakıldı. Tedavi sürecinin ardından 3B tümör modelleri Annexin tampon çözeltisi içinde bulunan 3µg/mL Hoechst 33342, 1µg/mL PI ve Annexin-V-FITC boyalarından oluşan çalışma çözeltisi ile 30 dk süre ile 37^0C ve %5'lik CO_2 ortamında inkübe edildi. 3B yapılarındaki hücrelerin çekirdek morfolojileri ve membran bütünlüğü EVOS M5000 Invitrogen floresan mikroskobu ile değerlendirildi.

3.2.13 Apoptotik Hücre Ölümünün Pan Kaspaz İnhibitörü ile Doğrulanması

Pan-kaspaz inhibitörü Benziloksikarbonil (Cbz)-l-Val-Ala-Asp (OMe)-fluorometilketon (Z-VAD-FMK), hücrelerde programlanmış hücre ölümü (apoptoz) sırasında kaspaz enzimlerinin aktivasyonunu engelleyen bir bileşiktir. A549 ve H1299 akciğer kanser hücreleri Z-VAD-FMK (20µM) içeren ve içermeyen şekilde 96 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına kuyu başına $5x10^3$ hücre olacak şekilde ekildi. Ertesi gün Niklozamid (0,625µM), Dosetaksel (0,44µM) ve ikili kombinasyonu eklendi. 48 Sa inkübasyonun

ardından tedavi sonrası kaspaz inhibitörü ile ön tedavi görmüş ve görmemiş hücrelerdeki canlılık SRB canlılık analizi ile tayin edildi.

3.2.14 Western Blot Analizi

Western blot tekniği hücrelerin lizatlarından elde edilen protein karışımında, hedef proteinin varlığını göstermek ve molekül ağırlığını belirlemek amacıyla kullanılan özel bir protein-protein hibridizasyon tekniğidir. İmmünoblotlama olarak da bilinen bu tekniğin uygulanabilmesi için hedef proteini tanıyarak ona bağlanabilen bir antikor ortamda bulunmalıdır. Böylece uygulanan muamele sonucunda tedavi ve kontrol gruplarındaki hedef proteinin ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar tespit edilir. 3B tümör modelleri Niklozamid, Dosetaksel ve ikili kombinasyonları ile 72 Sa tedavi edildi. 3B tümör modelleri içinde bulundukları besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı ve kollajenaz (1mg/ml) ile 40 dk 37^0C'de inkübe edilerek hücrelerin yapıdan ayrılması sağlandı. Ardından hücreler insülin iğnesinden geçirilerek tek hücre haline dönüştürüldü. Hücre süspansiyonu 1000xg de santrifüj edilerek matrigel kalıntıları ortamdan uzaklaştırıldı. Hücreler Radio İmmünopresipitasyon Analiz (RIPA) lizis tampon çözeltisi ile lizise uğratılarak proteinlerin açığa çıkması sağlandı. Ardından total protein miktarı Bikinkoninik Asit Analizi (BCA) yöntemi ile tayin edildi. Her bir örnek için eşit miktarda protein (30µg), %10'luk SDS-poliakrilamid jellere (NuPAGE™ Novex™ Bis-Tris Protein Gels, Novex) yüklendi ve 1 Sa süre ile elektroforeze tabi tutuldu. Ardından proteinler semi dry trasfer ile nitrosellüloz membranlara (iBlot® Transfer Stack, nitrocellulose, Novex) IBlot transfer cihazı kullanılarak transfer edildi. Membranlar %0,1 Tween-20 içeren TBS ile çözünmüş (TBS-T) %5'lik yağsız süt tozu ile spesifik olmayan bağlanmayı önlemek amacıyla 1 saat bloklandı. Membranlar birincil apoptotik (kırılmış Poli ADP-riboz polimeraz-1 (k- PARP-1), kaspaz8, B Hücre Lenfoma-2 Proteini (Bcl-2), Ölüm Reseptörü-4 (Dr-4)) nekrotik (Reseptör İlişkili Serin treonin Kinaz (RIPK1)), otofajik (Otofaji İlişkili gen 3(Atg3)), Çoklu İlaç Direnci ile İlişkili Protein 1 (MRP1), Myc Protoonkogeni (c-MYC), Fibronektin, E-kaderin ve Vimentin antikorları ile +4 ^{0}C'de gece boyunca sallanarak inkübe edildi. Daha sonra 3 kez Tween-20 İçeren Tamponlanmış Tris (TBS-T) tampon çözeltisi ile yıkandı ve Horse Radish Peroksidaz (HRP) bağlı ikincil antikor ile 1 saat inkübe edildi, ardından yine 3 kez TBS-T tampon çözeltisi ile yıkanıp kemilüminesans yöntem kullanılarak çıkan sinyal Fusion FX-7

(Vilber Lourmat, Torcy, Fransa) cihazı kullanılarak görüntülendi. Yükleme kontrolü olarak Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) kullanıldı. Kontrol ve tedavi görmüş gruplardaki protein ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar bant yoğunluğunun Image J programı ile ölçülmesiyle hesaplandı.

3.2.14.1 Hücre Lizatından Total Protein Eldesi

Hücrelerde uygulanan tedavi sürecinin ardından hücreler %0,5'lik Trypsin-EDTA çözeltisi ile bulundukları hücre kültürü kaplarından kaldırılarak santrifuj edildi ve toplandı. Ardından elde edilen hücre peletlerine total protein ekstraksiyonunu gerçekleştirmek için 75µL soğuk RIPA lizis tamponu karışımı eklendi. RIPA lizis tamponu karışımının her 1mL sinde 15µL proteaz inhibitörü, 10µL 100mM sodyum ortovanadat ve 10µL 200 mM Fenilmetil Sülfonil Florür (PMSF) bulunmaktadır. Hücre pelletlerine RIPA lizis tampon karışımı eklendikten sonra $+4^0$Cde 30 dk inkübe edildi ve her 10 dk bir al-ver işlemiyle hücrelerin iyice parçalanması sağlandı. Bu işlemin ardından hücre solüsyonları 1,5mL'lik ependorf tüplerine alınarak $+4^0$C'de 10000xg'de 20 dk santrifuj edildi. Süpernatanlar yeni 0,5mL'lik tüplere aktarıldı ve total protein konsantrasyonları ölçüldü. Sonraki çalışmalar için proteinler -20^0C'de saklandı.

3.2.14.2 Bikinkoninik Asit (BCA) ile Protein Konsantrasyonu Ölçülmesi

Hücre lizatlarından elde edilen total protein konsantrasyonları Pierce™ BCA protein assay kiti kullanılarak ölçüldü. Bu analizin temeli proteinin alkali ortamda Cu^{+2} 'nin Cu^{+1}'e indirgenmesi ile BCA tarafından yüksek hassasiyetle renk değiştirmesine dayanmaktadır. Bu tepkime sonucunda yoğun mor renkli tepkime ürünü, iki BCA molekülünün bir bakır iyonu ile şelasyonundan kaynaklanır. BCA/bakır kompleksi suda çözünür ve protein konsantrasyonu arttıkça 562nm'de güçlü bir lineer absorpsiyon sergiler. Kit içerisinde bulunan BCA tampon çözeltisi ve Cu^{+2} solusyonu 50:1 oranında karıştırıldı. 10µL örneğe 190µL bakır tampon solüsyonu eklendi ve 37^0C'de 20 dk inkübe edildi. Örneklerle aynı pleyte sığır serum albüminin (BSA) logaritmik seyreltmeleri 2mg/ml konsantrasyonundan başlayarak eklendi. İnkübasyon süresinin ardından 564nm dalga boyunda örnekler ve standartların absorbans değerleri Biotek mikroplaka okuyucu kullanılarak ölçüldü. Standard absorbansları ve konsantrasyon değerleriyle protein

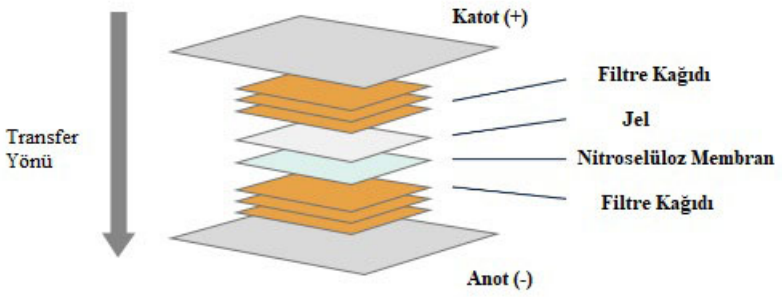
standart eğri grafiği oluşturuldu (EK-1). Bu grafikle elde edilen $y= mxln(x) +b$ denklemi kullanılarak her bir örneğin konsantrasyon değerleri hesaplandı.

3.2.14.3 Proteinlerin Jele Yüklenmesi ve SDS-PAGE

Elektroforez işlemi için %10'luk Bis-Tris poliakrilamid jel dik elektroforez tankına (Invitrogen) üretici firmanın talimatlarına göre yerleştirildi. SDS Running tampon çözeltisi (20X) soğuk distile su ile 1X konsantrasyonuna düşürülerek tanka eklendi. Antioksidan (1mL) tankın içine bırakıldı. Protein ladder (3µL) jele yüklendi ve konsantrasyonları belirlenen örnekler, kuyu başına 30µg total protein gelecek şekilde, 10x reducing agent ve 4x Lityum Dodesil sülfat (LDS) sample buffer ile karıştırıldı ve 95^0C'de 7 dk inkübe edilerek denatüre edildi. Ardından kuyulara yüklendi ve 200Volt'da 50 dk boyunca proteinlerin jelde yürütülmesi sağlandı.

3.2.14.4 Proteinlerin Transferi

Yürütme işleminin ardından jel elektroforez tankından çıkartılıp Şekil 3.3'de gösterildiği gibi I-Blot semi-dry transfer sistemine yerleştirildi. Proteinler 7 dk elektrik alana maruz bırakılarak nitroselüloz membrana transferleri gerçekleştirildi. Membran 1x TBST'ye alınarak 5dk x 3kez yıkandı.



Şekil 3.3 Semi-dry western blot transfer sistemi.

3.2.14.5 Bloklama

Spesifik olmayan bağlanmaları önlemek amacıyla TBS-T içerisinde %5'lik yağsız süt çözeltisi hazırlandı. Membran bu çözeltiyle 60 dk oda sıcaklığında çalkalanarak inkübe edildi. Bloklamanın ardından membran 5'er dk'lık sürelerde 3 kez TBS-T ile yıkandı.

3.2.14.6 Primer ve Sekonder Antikor Uygulaması

Her bir primer antikor 1:1000 oranında üretici firmanın talimatlarına göre TBS-T içerisinde hazırlanmış ya %5'lik yağsız süt tozu yada %5'lik BSA içerisinde hazırlandı. Kullanılan primer k- PARP-1, kaspaz 8, Bcl-2, Dr4, RIPK1, Atg3, MRP1, c-MYC, Fibronektin, E-kaderin ve Vimentin içermektedir. Membranlar ilgili primer antikorlar ile $+4^0$C'de gece boyunca sallanarak inkübe edildi. Daha sonra 3 kez TBS-T tampon çözeltisi ile yıkandı ve HRP bağlı sekonder antikor ile 1 Sa inkübe edildi, ardından yine 3 kez TBS-T tampon çözeltisi ile yıkandı.

3.2.14.7 Görüntüleme

Membranlar, Lumiglo reagent A ve Peroxidaz reagent B (20x)'nin distile su ile 1x konsantrasyona seyreltildikten sonra 3 dk inkübe edildi. Kemilüminesans ışıma Fusion FX-7 cihazı ile görüntülendi. İlgili antikorlarla detekte edilen protein bantlarının kantifikasyonu daha sonra Image J programı kullanılarak yapıldı. Normalizasyonlarda house-keeping protein olarak GAPDH kullanıldı.

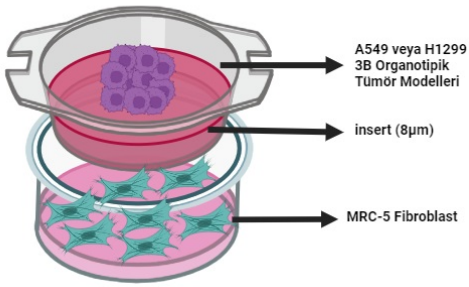
3.2.14.8 Primer ve Sekonder Antikorların Membrandan Uzaklaştırılması 'Stripping'

Birincil ve ikincil antikorları membrandan uzaklaştırmak (Stripping) için üretici firmanın (Cell Signaling, ABD) Western blot yeniden işaretleme (reprobing) protokolü kullanıldı. Stripping solüsyonu hazırlamak için; 100mL ultrasaf su içerisine 0,76gr Tris bazı, 2 gr SDS ve 700µl ß-merkaptoetanol eklendi (1X, pH:6,8). Membran 4 kez 5 dk TBS-T ile yıkandıktan sonra stripping solüsyonu eklenerek 150-300rpm, 37^0C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda 2 kez 5 dk TBS-T ile yıkama yapıldı ve membranda sinyal olup olmadığını kontrol etmek amacıyla görüntüleme yapıldı. Görüntüleme sonunda membranlarda sinyal yoksa 3 kez 5 dk TBS-T ile yıkama yapılarak bloklama aşamasına geçildi.

3.2.15 Üç Boyutlu Organotipik Akciğer Tümör Modellerinde Ko-kültür Çalışmaları.

Ko-kültür çalışmaları hücre populasyonları arasındaki doğal ve sentetik etkileşimleri incelemek amacıyla kullanılır. 3B tümör modellerinin ilaç yanıtlarına cevabını

değerlendirmek ve *in vivo* koşullardaki tümör mikro çevresini, hücreler arasındaki etkileşimi taklit etmek amacıyla oluşturulan 3B organotipik tümör modelleri insan sağlıklı akciğer fibroblast hücreleri MRC-5 ile aynı ortamda büyütüldü (Şekil 3.4). Bu amaçla öncelikle 3B tümör modelleri oluşturuldu ve aynı süreçte insan fibroblast hücreleri 12 kuyucuklu hücre kültürü kaplarında $25x10^3$ hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. İnsan fibroblast hücreleri, 100 IU/mL penisilin-100 µg/mL streptomisin, FBS (%10) içeren Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) büyüme besiyerinde çoğaltıldı. İki sistemde hazır olduğunda bir araya getirildi ve eş zamanlı olarak Niklozamid, Dosetaksel ve ikili kombinasyonlarıyla 72 Sa boyunca 37^0C ve %5'lik CO2 ortamında tedavi uygulandı. İnkübasyon süresinin ardından 3B tümör modelleri ortamdan ayrıştırıldı. Ko-kültür ortamındaki Niklozamid, Dosetaksel ve ikili kombinasyonlarının tümör inhibisyonuna etkisi öncelikle morfolojik olarak faz kontrast mikroskopu ile incelendi. Ardından ko-kültür sisteminin 3B tümör modellerinde hücre canlılığı üzerindeki etkisi ATP analizi ile tespit edildi. Ko-kültür ortamının 3B tümör modellerindeki ilaç yanıtı ayrıca western blot yöntemi ile apoptotik (PARP-1, caspase, DR-4, Bcl-2), nekrotik (RIPK1), otofajik (Atg3), c-Myc, MRP-1 ve hücre adhezyon (Fibronektin, E-kaderin ve Vimentin) proteinlerindeki ekspresyon seviyeleri incelendi.



Şekil 3.4 3B Organotipik tümör modelleri ve MRC-5 sağlıklı akciğer fibroblast hücreleri ile oluşturulan ko-kültür ortamı. BioRender programı kullanılarak çizilmiştir.

3.2.16 İstatiksel Analizler

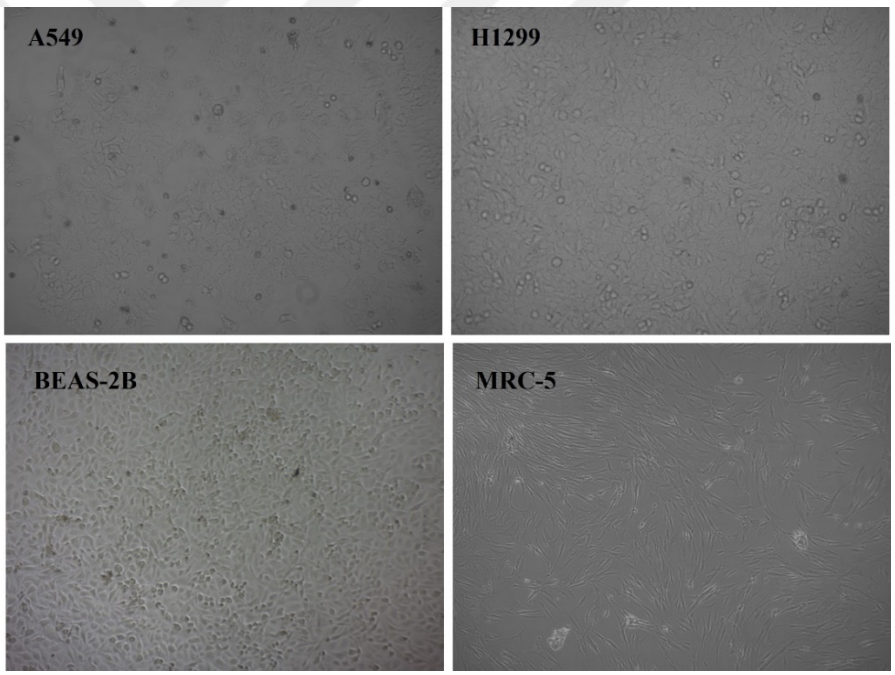
Tez çalışmasında yapılan sayısal analizlerin sonuçları GraphPad Prism 9.3.0 programı kullanılarak ANOVA testi ile değerlendirildi. Analizler en az 3 tekrarlı yapıldı ve analizlerin sonuçları ortalama ve standart sapma değerleri kullanılarak hesaplandı. Çoklu

karşılaştırma analizlerinde Tukey's testi kullanıldı. İstatistiksel olarak anlamlı veriler $p<0,05$ değerine göre belirlendi.

4 BULGULAR

4.1 Akciğer Kanser ve Sağlıklı Hücrelerinin Kültüre Edilmesi

Akciğer karsinoma (A549 ve H1299), sağlıklı akciğer epitel (Beas-2B) ve fibroblast (MRC-5) hücre soyları Çizelge 3.1'de verilen besiyerleri içerisinde 37^0C ve %5'lik CO_2 ortamında %80 konfluensiye ulaşıncaya kadar büyütüldü. Üç boyutlu akciğer organotipik tümör modellerinin oluşturulması için akciğer kanser hücre soyları kullanıldı. Hücrelerin 3B tümör modelleri oluşturulmadan önceki morfolojik görüntüleri Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1 Tez çalışmasında kullanılan akciğer epitel karsinoma (A549, H1299), sağlıklı akciğer bronşiyal epitelyal (Beas-2B) ve sağlıklı akciğer fibroblast (MRC-5) hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüleri (100X).

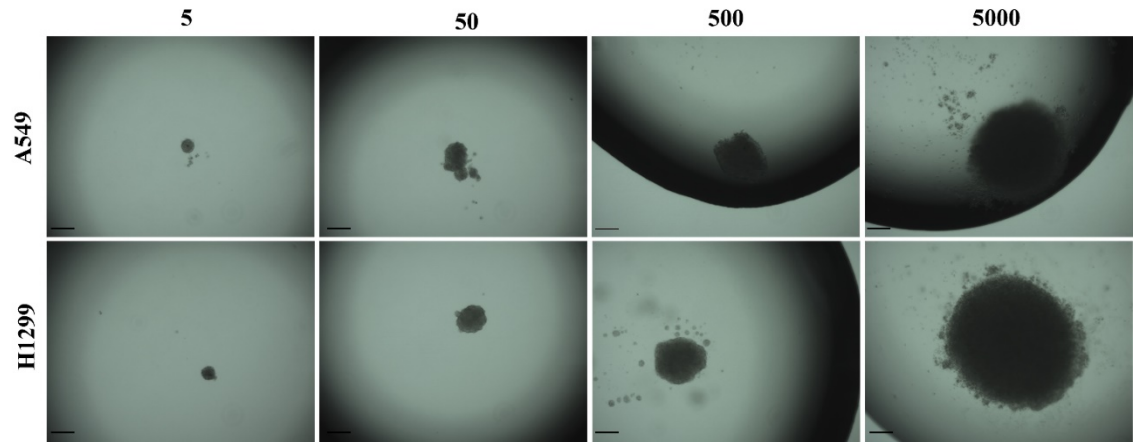
4.2 Üç Boyutlu Akciğer Organotipik Tümör Modellerinin Oluşturulması

4.2.1 Asılı Damla Tekniği Kullanılarak Hücre Agregatlarının Oluşturulması

A549, H1299 ve BEAS-2B hücreleri 500 hücre/µL olacak şekilde 6cm^2'lik petri kapağına 20µL bırakıldı ve dikkatlice ters çevrilerek hücrelerin yerçekimine ve hücre-hücre interaksiyonlarına bağlı olarak agregat oluşturması sağlandı. Petrilerin alt kısmına PBS eklendi ve damlaların inkübasyon süresince kuruması önlendi.

4.2.2 Asılı Damla Tekniği Kullanılarak Hücre Agregatlarının Oluşturulmasında Hücre Sayısının Optimizasyonu

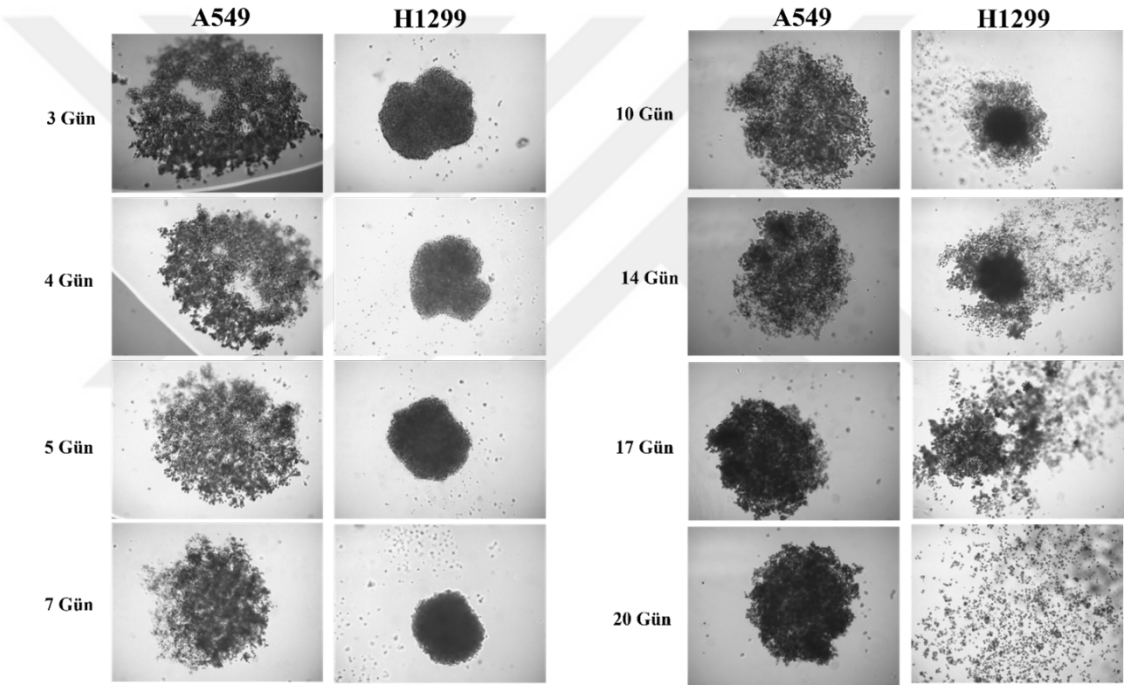
Hücre sayısının agregat oluşumundaki etkisini belirlemek amacıyla A549 ve H1299 hücreleri asılı damla tekniği kullanılarak 5, 50, 500, 5000 hücre/µL sayılarında ekildi. Üç günlük inkübasyon sonucunda hücre sayısına bağlı olarak agregat büyüklüğünün arttığı gözlemlendi. Oluşan sfer çaplarının hücre sayısı arttıkça arttığı ancak yüksek sayılarda her hücre soyundan oluşturulan sferlerde yapılardan ayrılmalar gerçekleştiği gözlemlendi (Şekil 4.2). İleri aşamalarda kullanılmak üzere üç boyutlu akciğer organotipik tümör modelleri için başlangıç hücre sayısı 500 hücre/µL hücre sayısı olarak belirlendi.



Şekil 4.2 A549 ve H1299 hücrelerinin asılı damla tekniği ile hazırlanmış farklı sayılardaki ekimlerle 3 günde oluşmuş hücre agregatlarının ışık mikroskopisi görüntüleri (40X). Skala bar 10mm.

4.2.3 Asılı Damla Tekniği Kullanılarak Hücre Agregatlarının Oluşturulma Süresinin Optimizasyonu

Yukarıda anlatıldığı şekilde oluşturulan agregatlar 3-20 gün süresince asılı şekilde inkübe edildi ve bekleme süresinin agregat oluşumu üzerindeki etkisi belirlendi. Buna göre inkübasyon süresince A549 hücrelerinin daha dağınık bir sfer yapısı oluştururken, H1299 hücrelerinin daha sıkı bir sfer yapısı oluşturdukları ve bu yapıların kültürde kaldıkları süre arttıkça özellikle H1299 hücrelerinin oluşturdukları tümör sferlerinin inkübasyon süresine bağlı olarak bozuldukları gözlemlendi (Şekil 4.3). Bu sonucu takiben sonraki aşamalarda asılı damladaki inkübasyon süresi 3 gün olarak belirlendi.

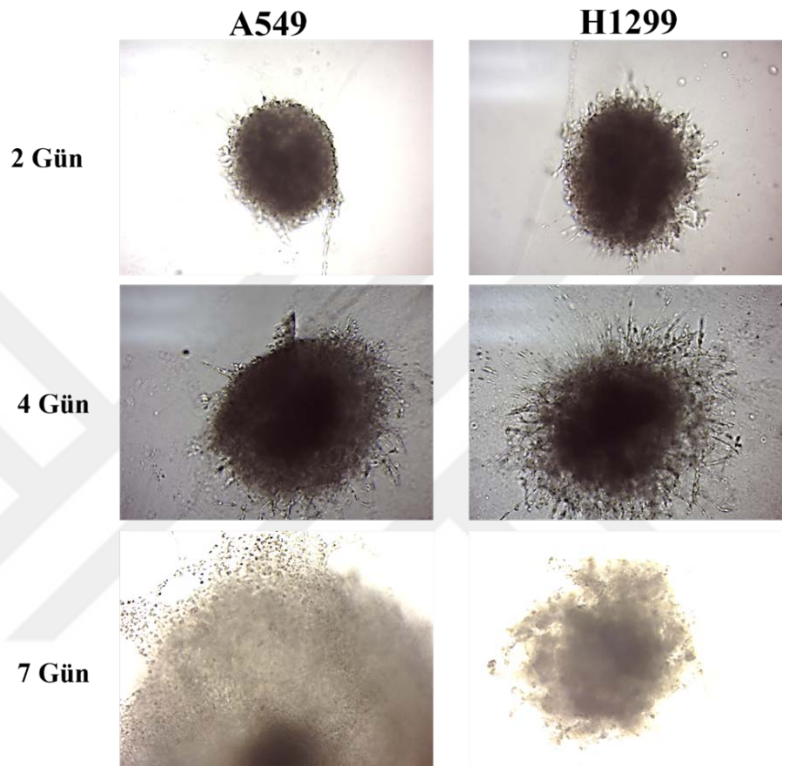


Şekil 4.3 A549 ve H1299 akciğer karsinom hücrelerinde asılı damla tekniği kullanılarak oluşturulan agregatlarda inkübasyon süresinin (3-20 gün) agregat büyüklüğüne etkisi. Büyütme 100x

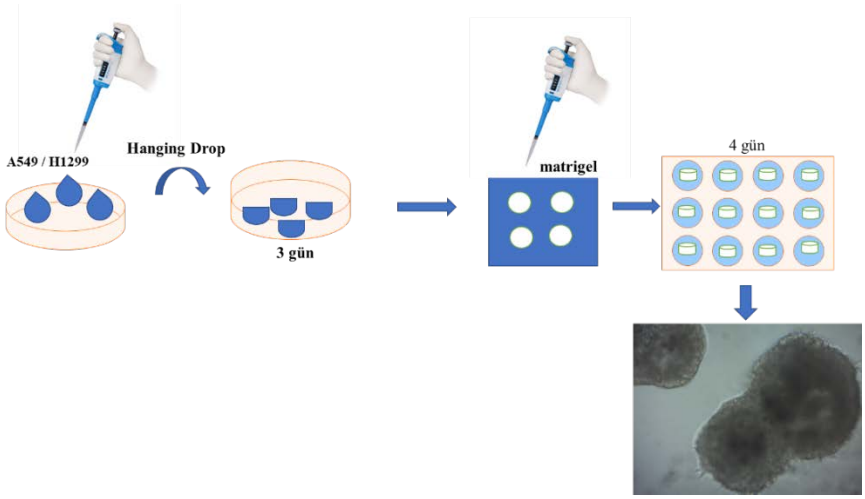
4.2.4 Matrigele Gömme

İnkübasyon sürecinin ardından hücre agregatları kapaklar ters çevrildikten sonra pipetle alınıp steril parafilm yüzeyler üzerinde oluşturulmuş oyuklara bırakıldı. Üzerlerine 20 µL matrigel koyularak agregatların matrigele gömülmesi sağlandı. Oluşan yapılar 40 dk 37^0C'de bekletilerek matrigelin katılaşması gerçekleştirildi. Oluşturulan 3 boyutlu organotipik tümör modelleri besiyerine transfer edildi ve 2, 4 ve 7 gün boyunca

büyümeleri ışık mikroskobu ile gözlemlendi. Oluşan tümör modellerinde matrigel içinde kaldığı süre boyunca tümörlerin büyüdüğü gözlemlendi (Şekil 4.4). İleri tekniklerde kullanılmak üzere matrigelde kalma süresi 4 gün olarak belirlendi. Üç boyutlu akciğer organotipik tümör modellerin oluşturulma şeması Şekil 4.5'de verilmiştir.



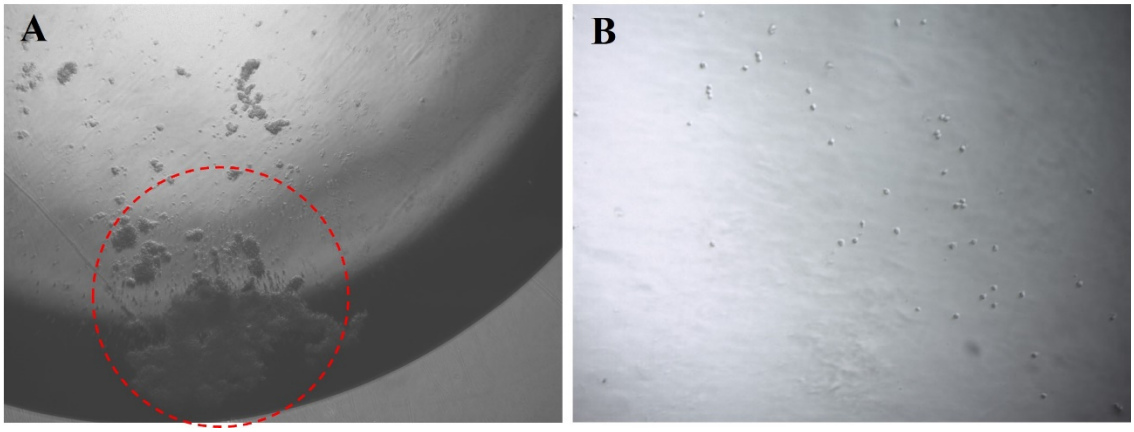
Şekil 4.4 A549 ve H1299 akciğer organotipik tümör modellerinin Matrigelde gömülü kalma süresinin sfer morfolojisi üzerindeki etkisinin ışık mikroskopu görüntüleri (2, 4 ve 7 gün) (100x)



Şekil 4.5 Üç boyutlu akciğer organotipik tümör modeli oluşturulma basamakları

4.2.5. Sağlıklı Akciğer Epitel Hücrelerinde 3B Organotipik Model Oluşmaması Bulguları

Çalışmanın bu kısmında Sağlıklı Akciğer Epitel hücresi Beas-2B ile 3B yapılara oluşturulması için organotipik tümör modellerinin oluşturulması sürecine tabi tutuldu (3 gün asılı damla + 4 gün matrigel gömme). Beas-2B hücreleri asılı damlada agregat oluşturmasına rağmen matrigele gömme aşamasından sonra hücrelerin tek tek dağılarak 3B modeli oluşturmadığı görüldü (Şekil 4.6).

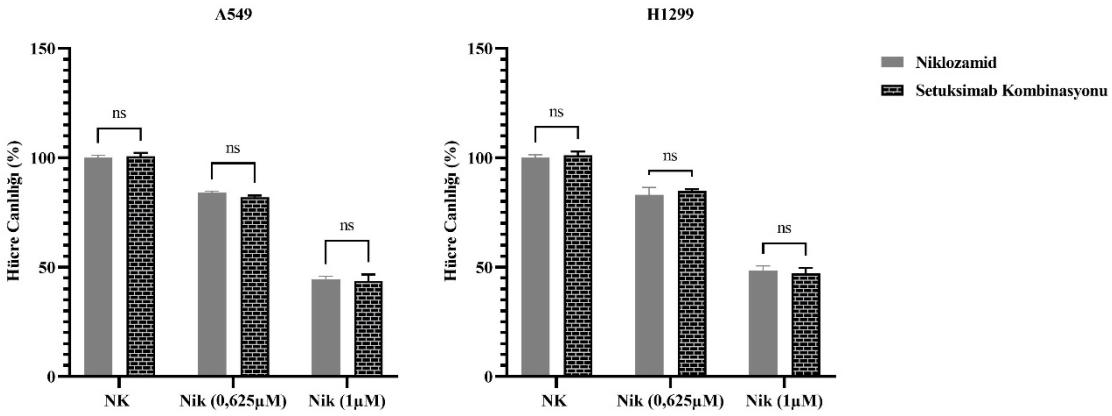


Şekil 4.6 Sağlıklı Akciğer Epitel Hücresi BEAS-2B'nin asılı damla (3 gün) **(A)** ve Matrigel Görüntüsü (4 gün) **(B)** (40X). Asılı damladaki hücre agregatı kırmızı kesikli çember ile gösterilmiştir

4.3 İlaç Araştırmaları Bulguları

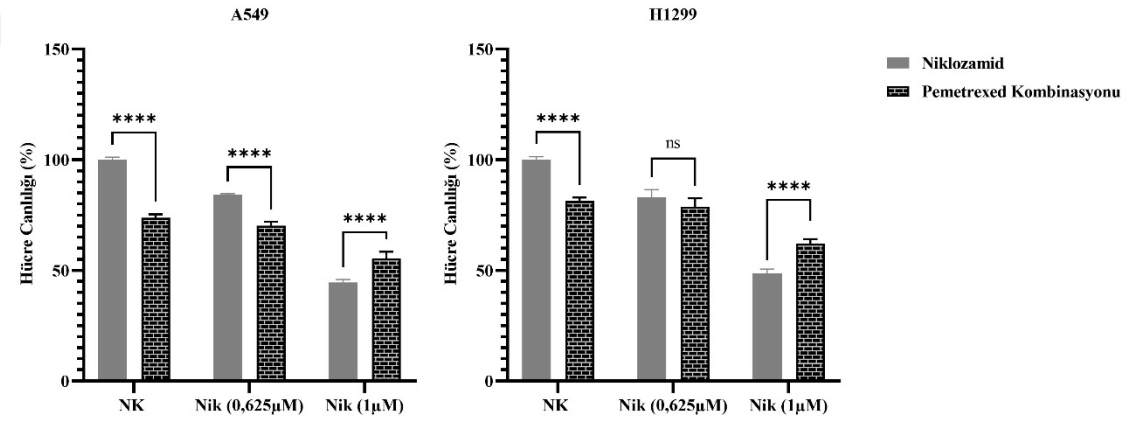
4.3.1 Etkili İlaç Kombinasyonunun Belirlenmesi

Kanser araştırmalarında özellikle klinikte iki farklı ajan kullanılarak geliştirilen tedavi rejimlerinden esinlenerek bu tez çalışmasında akciğer kanseri tedavisinde klinikte kullanılan farklı kemoterapötik ajanlar ile Niklozamidin iki farklı dozunu kullanarak A549 ve H1299 akciğer kanser hücreleri üzerinde çeşitli ikili kombinasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Bu ajanların bir araya getirilmesi, kanser hücrelerinin büyümesini durdurma ve ölüme sebep olma potansiyellerini artırarak daha etkili bir tedavi kombinasyonu oluşturulması hedeflenmiştir. Kemoterapötik ajanların 100TDC'ye denk gelen dozları ile niklozamidin her hücre soyunda da nontoksik olan dozu 0,625µM ve 1µM dozu SRB hücre canlılık analizleri sonucunda seçildi. Buna göre Setuksimab ve Niklozamid ile yapılan 48 Sa'lık tedavilerde Setuksimab (A549;%100,6 ve H1299;%101,1) tek başına kontrole (%100) kıyasla bir farklılık göstermezken, Niklozamidin düşük dozu (A549;%84, H1299;%83) ile kombinasyonunda (A549;%82, H1299;%84,7) ve Niklozamidin yüksek dozu (A549;%44,5, H1299;%48,6) ile kombinasyonunda (A549;%43,7, H1299;%47,1) her iki hücre soyunda da istatiksel olarak anlamlı bir değişikliğe sebep olmadığı görüldü (Şekil 4.7).



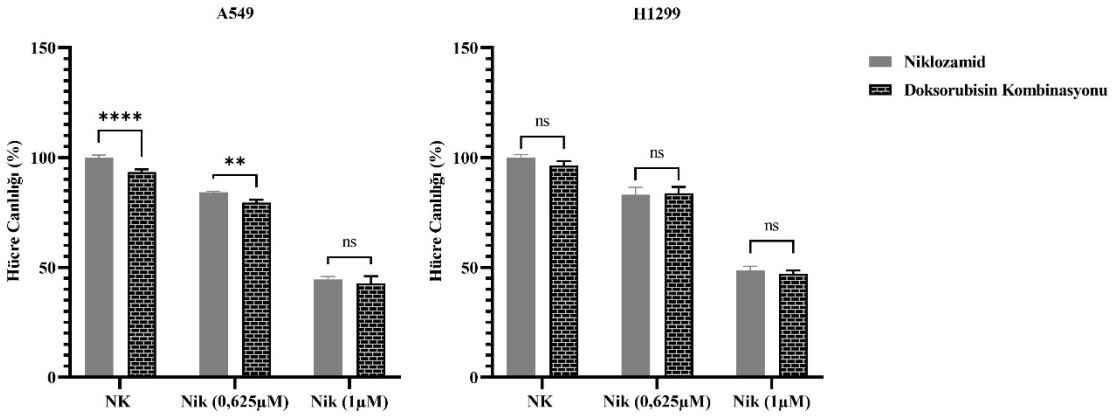
Şekil 4.7 A549 ve H1299 akciğer kanser hücrelerinde Niklozamid (Nik) (0,625-1µM) ve Setuksimab (100µM) kombinasyonunun uygulanmasının (48Sa) hücre canlılığına etkisinin SRB canlılık analizi ile tayini. Aynı zaman periyodu içinde tedavi uygulanmamış, Negatif Kontrol (NK) ve Setuksimab, Niklozamid (0,625µM) ve Setuksimabla kombinasyonu ve Niklozamid (1µM) ve Setuksimab kombinasyonu karşılaştırılmıştır. ns istatistiksel olarak anlamlılık olmadığını ifade etmektedir

Bir diğer kemoterapötik ajan Pemetrexed ile yapılan çalışmada A549 hücrelerinde Pemetrexed tedavisinde kontrole (%100) kıyasla canlılığın %73,7'ye düştüğü, Niklozamidin düşük dozu ile yapılan kombinasyonda canlılığın %70,1'e düştüğü ancak bu değerin Pemetrexedin kendi başına olan etkisinden farklı olmadığı görüldü. H1299 hücrelerinde Niklozamidin düşük dozu (%83) ve kombinasyon tedavisi (%78,9) arasında istatiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi. Her iki hücre soyunda da Niklozamid (1µM) dozunda yapılan kombinasyonda Pemetrexedin tek başına tedavisine göre hücre canlılığında artış olduğu görüldü (A549;%44,5- %55,3, H1299;%48,6-%62) (($p<0,0001$) (Şekil 4.8).



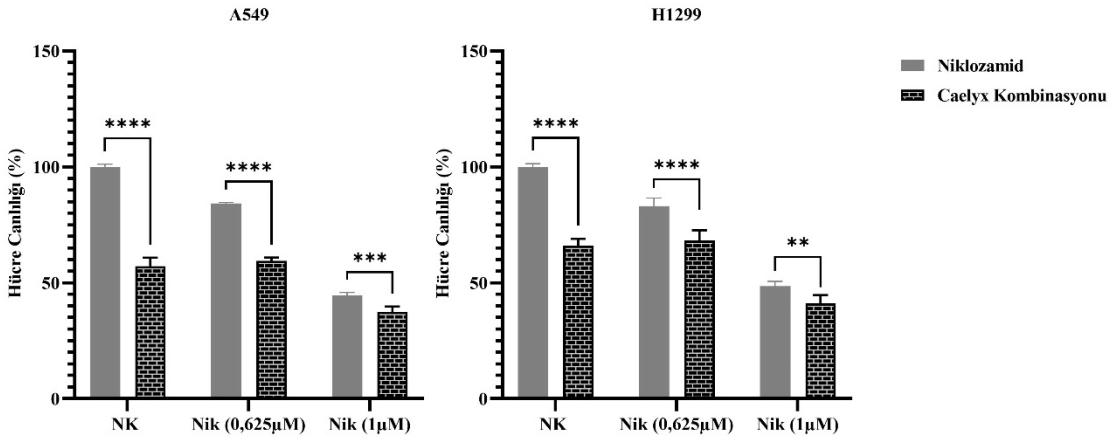
Şekil 4.8 A549 ve H1299 akciğer kanser hücrelerinde Niklozamid (Nik) (0,625-1µM) ve Pemetrexed (25µM) kombinasyonunun uygulanmasının (48Sa) hücre canlılığına etkisinin SRB canlılık analizi ile tayini. Aynı zaman periyodu içinde tedavi uygulanmamış (NK) ve Pemetrexed, Niklozamid (0,625µM) ve Pemetrexed'le kombinasyonu ve Niklozamid (1µM) ve Pemetrexed kombinasyonu karşılaştırılmıştır. ns istatistiksel olarak anlamlılık olmadığını, (****:$p<0,00001$) istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir

Bir diğer kemoterapötik ajan Doksorubisin ile yapılan kombinasyonda Niklozamidin 0,625µM dozu ile yapılan kombinasyonunda A549 hücrelerinde Niklozamidin tek başına hücre canlılığını %84'e düşürdüğü kombinasyonla beraber canlılığın %79,5'e düştüğü görülürken H1299 hücrelerinde kombinasyonun (%83,7) niklozamidin tek başına (%83) etkisinden farklı bir etki göstermediği görüldü. Her iki hücre soyunda da Niklozamid (1µM) dozunda yapılan kombinasyonda Doksorubisin tek başına tedavisine göre hücre canlılığında anlamlı bir düşüşe sebep olmadığı görüldü (A549;%44,5-%42,8, H1299;%48,6-%47,1) (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 A549 ve H1299 akciğer kanser hücrelerinde Niklozamid (Nik) (0,625-1µM) ve Doksorubisin (0,92 µM) kombinasyonunun uygulanmasının (48Sa) hücre canlılığına etkisinin SRB canlılık analizi ile tayini. Aynı zaman periyodu içinde tedavi uygulanmamış (NK) ve Doksorubisin, Niklozamid (0,625µM) ve Doksorubisinle kombinasyonu ve Niklozamid (1µM) ve doksorubisin kombinasyonu karşılaştırılmıştır. ns istatistiksel olarak anlamlılık olmadığını, (****:p<0,00001, **:p<0,05) istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir

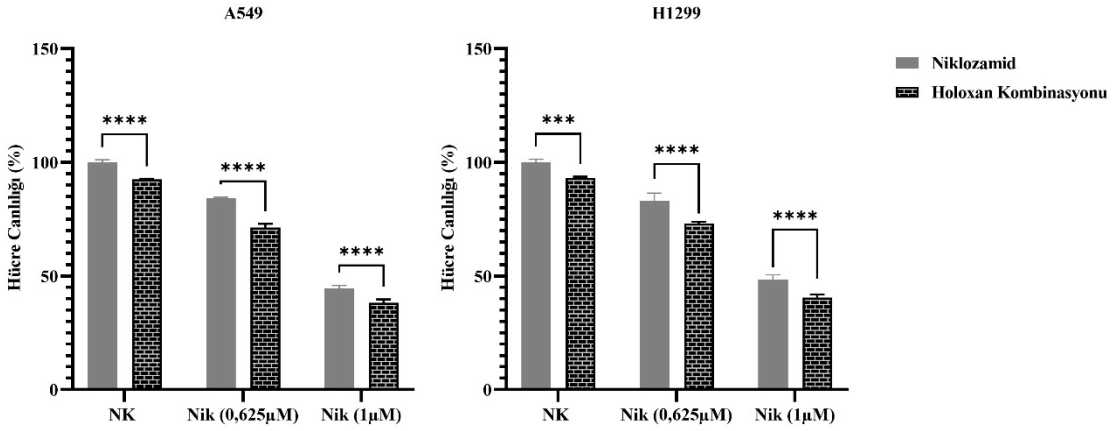
Doksorubisinin lipozomal bir formu olan Caelyx ile yapılan çalışmada Caelyx kontrole kıyasla hücre canlılığını A549 hücrelerinde %57,1'e, H1299 hücrelerinde %66'ya düşürdü. Niklozamidin düşük dozu ile yapılan kombinasyonda A549 hücrelerinde %59,4, H1299 hücrelerinde %68,1'e düşürdü. Niklozamidin (0,625µM) tek başına etkisiyle kıyaslandığında istatiksel olarak anlamlı düşüşler görülmesine rağmen Caleyxin tek başına etkisinden farklı bir değişim gözlenmedi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 A549 ve H1299 akciğer kanser hücrelerinde Niklozamid (Nik) (0,625-1µM) ve Caelyx (0,92µM) kombinasyonunun uygulanmasının (48Sa) hücre canlılığına

etkisinin SRB canlılık analizi ile tayini. Aynı zaman periyodu içinde tedavi uygulanmamış (NK) ve Caelyx, Niklozamid (0,625µM) ve Caelyxle kombinasyonu ve Niklozamid (1µM) ve Caelyx kombinasyonu karşılaştırılmıştır. (****:p<0,00001, ***:p<0,0001, **:p<0,05) istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir

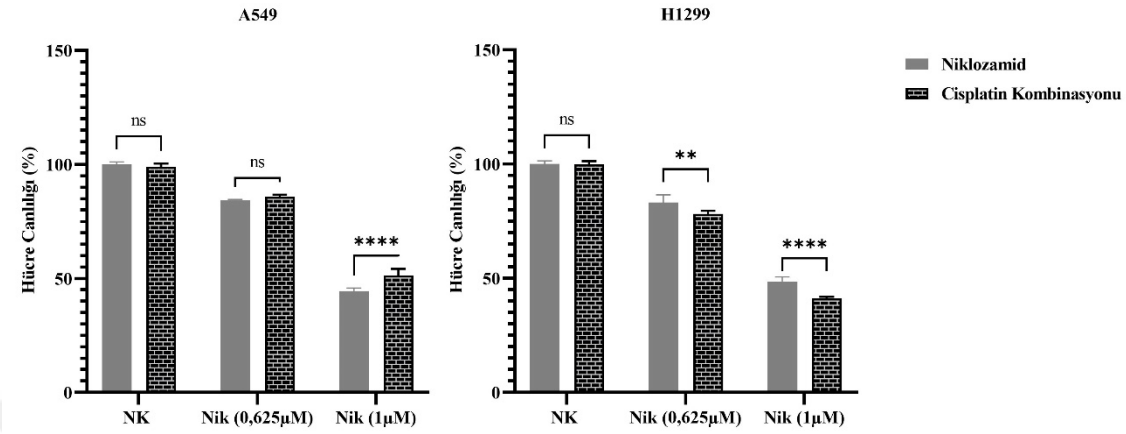
Holoxan ile yapılan çalışmada A549 hücrelerinde Holoxanın canlılığı kontrole kıyasla %92'ye düşürdüğ bu oranın H1299 hücrelerinde ise %93,1 olduğu görüldü. Niklozamidin 0,625µM dozu ile yapılan kombinasyonda A549 hücrelerinde %71,2'ye, H1299 hücrelerinde ise %73'e düşürdü (Şekil 4.11). Niklozamidin 1µM dozunda tek başına tedavisinde A549 hücrelerinde canlılık %44,5, H1299 hücrelerinde %48,6 iken Niklozamidin 1µM dozuyla yapılan kombinasyonda canlılık A549 hücrelerinde %38,2'ye, H1299 hücrelerinde %40,4'e düştü (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 A549 ve H1299 akciğer kanser hücrelerinde Niklozamid (Nik) (0,625-1µM) ve Holoxan (100µM) kombinasyonunun uygulanmasının (48Sa) hücre canlılığına etkisinin SRB canlılık analizi ile tayini. Aynı zaman periyodu içinde tedavi uygulanmamış (NK) ve Holoxan, Niklozamid (0,625µM) ve Holoxanla kombinasyonu ve Niklozamid (1µM) ve Holoxan kombinasyonu karşılaştırılmıştır. (****:p<0,00001, ***:p<0,0001) istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir

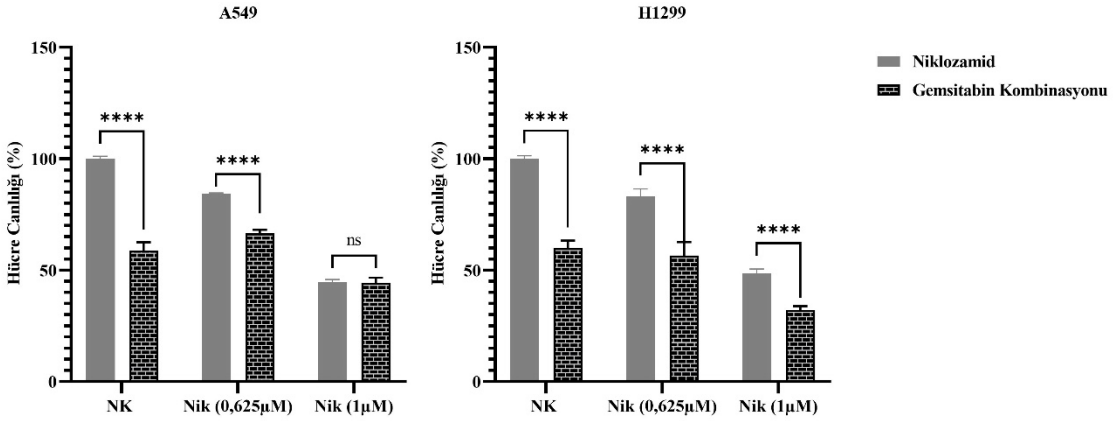
Cisplatin ile yapılan çalışmada A549 hücrelerinde Niklozamidin 0,625µM dozu ile yapılan kombinasyonda hücre canlılığında Niklozamidin tek başına etkisine kıyasla bir düşüş gözlenmezken (%84,2-%85,8), H1299 hücrelerinde hücre canlılığında düşüş gözlendi (%83,1-%78,1). Artan Niklozamid konsantrasyonu ile beraber A549 hücrelerinde Niklozamidin o dozdaki tek başına tedavisi ile karşılaştırıldığında hücre canlılığında artış görüldü (%44,5-%51,4). Oysaki H1299 hücrelerinde kombinasyon

tedavisi ile beraber Niklozamidin o dozdaki tek başına tedavisi ile karşılaştırıldığında hücre canlılığında düşüşe sebep olduğu görüldü (%48,6-%41,2) (Şekil 4.12).



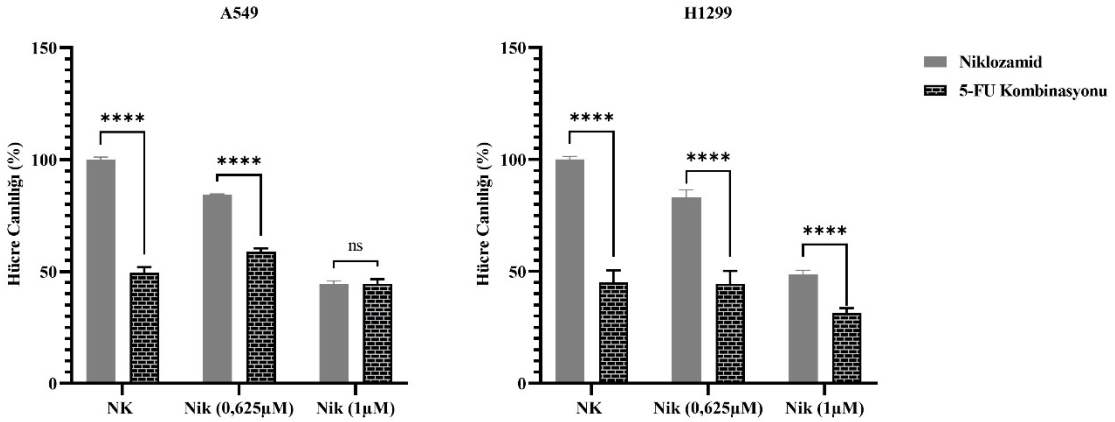
Şekil 4.12 A549 ve H1299 akciğer kanser hücrelerinde Niklozamid (Nik) (0,625-1µM) ve Cisplatin (12,66µM) kombinasyonunun uygulanmasının (48Sa) hücre canlılığına etkisinin SRB canlılık analizi ile tayini. Aynı zaman periyodu içinde tedavi uygulanmamış (NK) ve Cisplatin, Niklozamid (0,625 µM) ve Cisplatinle kombinasyonu ve Niklozamid (1µM) ve Cisplatin kombinasyonu karşılaştırılmıştır. ns istatistiksel olarak anlamlılık olmadığını, (****:p<0,00001, **:p<0,05) istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir

Niklozamidin Gemsitabin ile yapılan çalışmada A549 hücrelerinde Niklozamidin 0,625µM dozu ile yapılan kombinasyonda düşüş görülürken (%84,2-%66,5) Niklozamidin dozu arttığında kombinasyonun canlılık değişimine bir etkisi olmadığı görüldü (%44,6-%44,3). H1299 hücrelerinde ise kombinasyon tedavisi düşük doz Niklozamid kombinasyonunda hücre canlılığını %56,5'e düşürürken artan Niklozamid konsantrasyonu ile beraber canlılık %32,2'ye düştü. Ancak düşük doz kombinasyon tedavisinde bu düşüşün ilacın tek başına etkisinden (%60) farklı olmadığı görüldü (Şekil 4.13).



Şekil 4.13 A549 ve H1299 akciğer kanser hücrelerinde Niklozamid (Nik) (0,625-1µM) ve Gemsitabin (95µM) kombinasyonunun uygulanmasının (48Sa) hücre canlılığına etkisinin SRB canlılık analizi ile tayini. Aynı zaman periyodu içinde tedavi uygulanmamış (NK) ve Gemsitabin, Niklozamid (0,625µM) ve Gemsitabinle kombinasyonu ve Niklozamid (1µM) ve Gemsitabin kombinasyonu karşılaştırılmıştır. ns istatistiksel olarak anlamlılık olmadığını, (****:p<0,00001) istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir

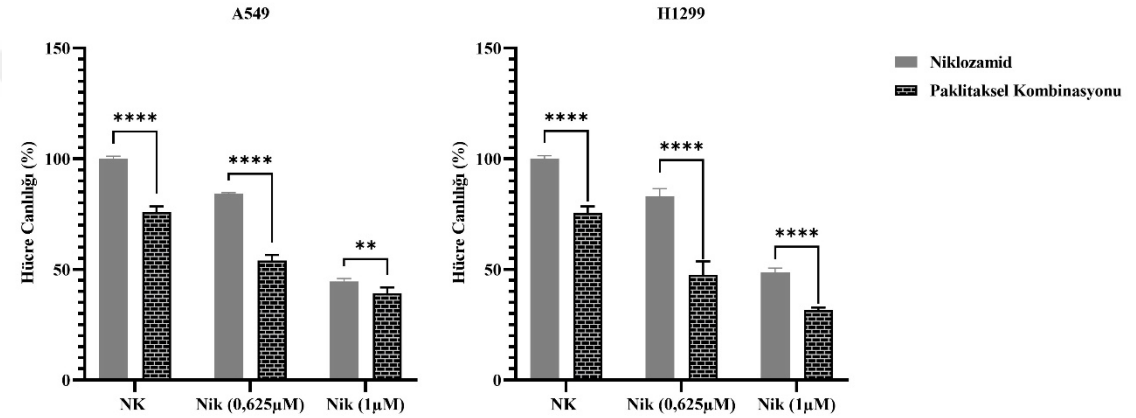
Niklozamidin 5-Floro urasil (5-FU) ile yapılan kombinasyonunda A549 hücrelerinde niklozamidin 0,625µM dozu ile yapılan kombinasyonda düşüş görülürken (%84,2-%58,8) Niklozamidin dozu arttığında kombinasyonun canlılık değişimine bir etkisi olmadığı görüldü (%44,6-%43,6). H1299 hücrelerinde ise kombinasyon tedavisi Niklozamidin düşük dozunda canlılığın %83'den %44,5'e düştüğü görüldü ancak ancak bu etkinin 5-FU'nun tek başına olan etkisinden (%45,1) farklı olmadığı görüldü (Şekil 4.14).



Şekil 4.14 A549 ve H1299 akciğer kanser hücrelerinde Niklozamid (Nik) (0,625-1µM) ve 5-FU (172,97µM) kombinasyonunun uygulanmasının (48 saat) hücre canlılığına

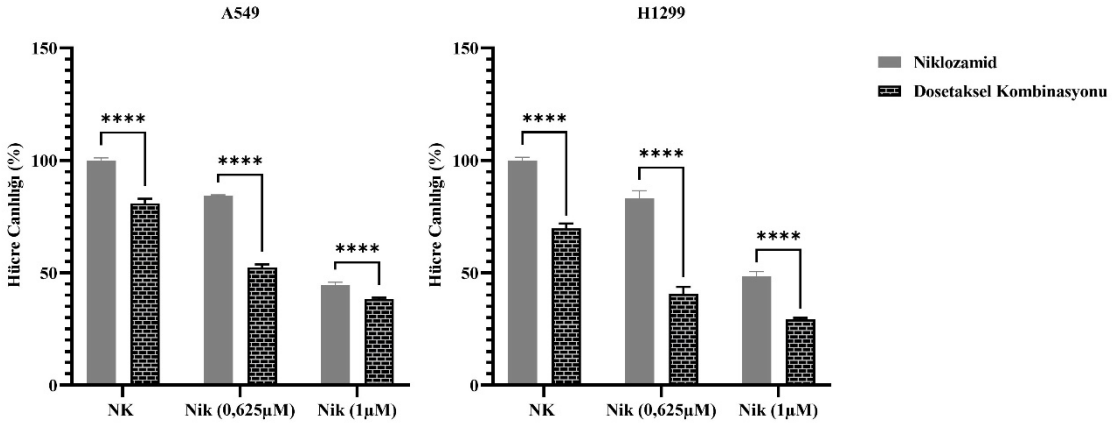
etkisinin SRB canlılık analizi ile tayini. Aynı zaman periyodu içinde tedavi uygulanmamış (NK) ve 5-FU, niklozamid (0,625 µM) ve 5-FU ile kombinasyonu ve Niklozamid (1 µM) ve 5-FU kombinasyonu karşılaştırılmıştır. ns istatistiksel olarak anlamlılık olmadığını, (****:p<0,00001) istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir

Niklozamid'in Paklitaksel ile yapılan kombinasyonunda hem A549 hem de H1299 hücrelerinde Niklozamidin her iki dozu ile yapılan kombinasyonda canlılıkta anlamlı düşüşler olduğu görüldü. A549 hücrelerinde Niklozamidin düşük doz kombinasyonunda canlılık %84,2'den %53,9'a düşerken, H1299 hücrelerinde aynı doz kombinasyonunda hücre canlılığı %80,5'den %46,9 a düştü (Şekil 4.15).



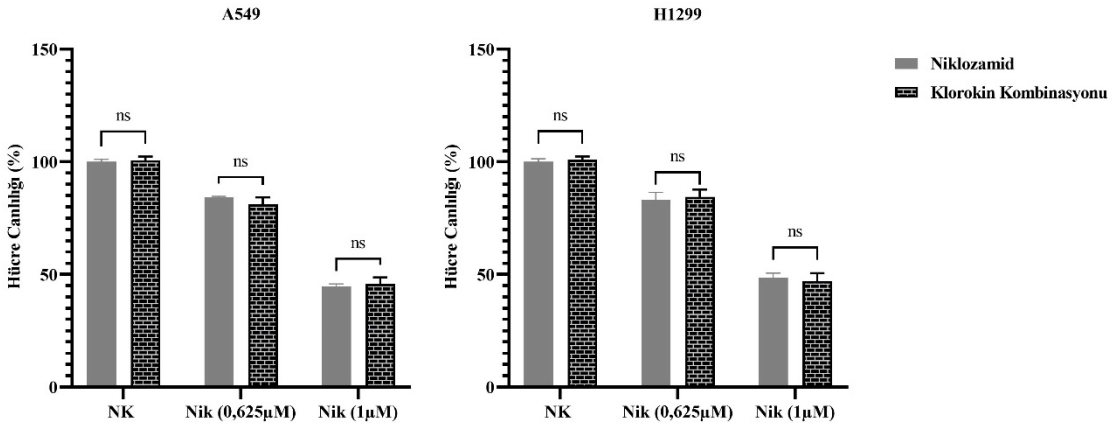
Şekil 4.15 A549 ve H1299 akciğer kanser hücrelerinde Niklozamid (Nik) (0,625-1µM) ve Paklitaksel (15,93µM) kombinasyonunun uygulanmasının (48Sa) hücre canlılığına etkisinin SRB canlılık analizi ile tayini. Aynı zaman periyodu içinde tedavi uygulanmamış (NK) ve Paklitaksel, Niklozamid (0,625µM) ve Paklitaksel ile kombinasyonu ve Niklozamid (1µM) ve Paklitaksel kombinasyonu karşılaştırılmıştır. (****:p<0,00001 ve **:*p*<0,05) istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir

Niklozamidin düşük dozunun Dosetaksel ile yapılan kombinasyonunda A549 hücrelerinde hücre canlılığının %84,6'dan %54,1'e düştüğü, H1299 hücrelerinde ise %83'den %40,6'ya düşdüğü görüldü. Artan Niklozamid konsantrasyonu ile beraber A549 da canlılık %44,6'dan %38,3'e, H1299 da ise %48,6'dan %29'a düştüğü görüldü (Şekil 4.16).



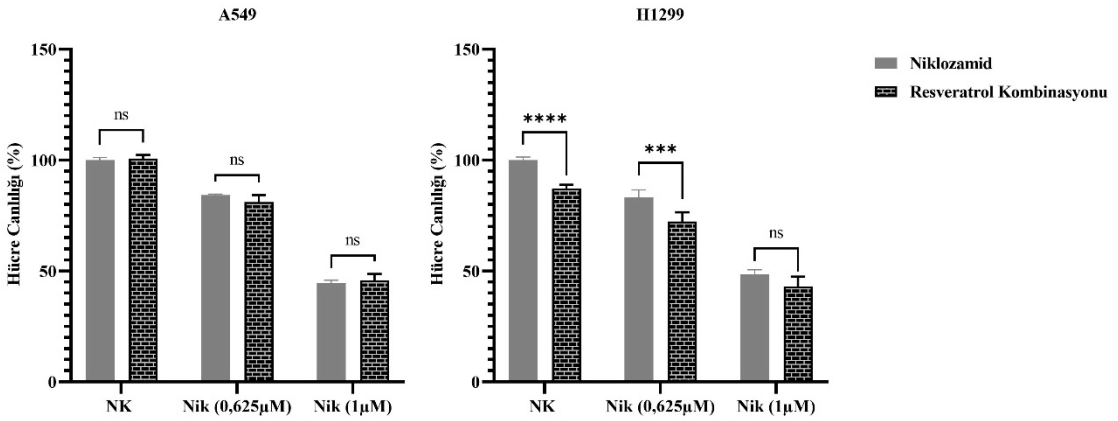
Şekil 4.16 A549 ve H1299 akciğer kanser hücrelerinde Niklozamid (Nik) (0,625-1µM) ve Dosetaksel (14µM) kombinasyonunun uygulanmasının (48Sa) hücre canlılığına etkisinin SRB canlılık analizi ile tayini. Aynı zaman periyodu içinde tedavi uygulanmamış (NK) ve Dosetaksel, Niklozamid (0,625µM) ve Dosetaksel ile kombinasyonu ve Niklozamid (1µM) ve Dosetaksel kombinasyonu karşılaştırılmıştır. (****:p<0,00001) istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir

Niklozamidin Klorokin ile yapılan kombinasyonunda A549 hücre soyunda Niklozamidin düşük (%84,2-%81,1) ve yüksek (%44,6-%45,7) doz kombinasyonlarında hücre canlılığında istatiksel olarak anlamlı düşüşler olmadığı görüldü. Aynı şekilde H1299 hücrelerinde Niklozamidin düşük (%83-%79,9) ve yüksek (%48,6-%46,9) kombinasyonlarında da benzer etki görüldü (Şekil 4.17).



Şekil 4.17 A549 ve H1299 akciğer kanser hücrelerinde Niklozamid (Nik) (0,625-1µM) ve Klorokin (2,5µM) kombinasyonunun uygulanmasının (48Sa) hücre canlılığına etkisinin SRB canlılık analizi ile tayini. Aynı zaman periyodu içinde tedavi uygulanmamış (NK) ve Klorokin, Niklozamid (0,625µM) ve Klorokin ile kombinasyonu ve Niklozamid (1µM) ve Klorokin kombinasyonu karşılaştırılmıştır. ns istatistiksel olarak anlamlılık olmadığını ifade etmektedir

Niklozamid'in Resveratrol ile yapılan çalışmasında A549 hücre soyunda Niklozamidin düşük (%84,4-%82,9) ve yüksek (%44,6-%45,1) doz kombinasyonlarında hücre canlılığında istatiksel olarak anlamlı düşüşler gözlenmezken, H1299 hücre soyunda Niklozamidin düşük dozunda hücre canlılığı %83,1'den %72,4'e düştüğü görüldü. Niklozamidin yüksek dozuyla yapılan kombinasyonda canlılığın istatistiksel olarak anlamlı bir düşüşe sebep olmadığı görüldü (%48,6-%43) (Şekil 4.18).



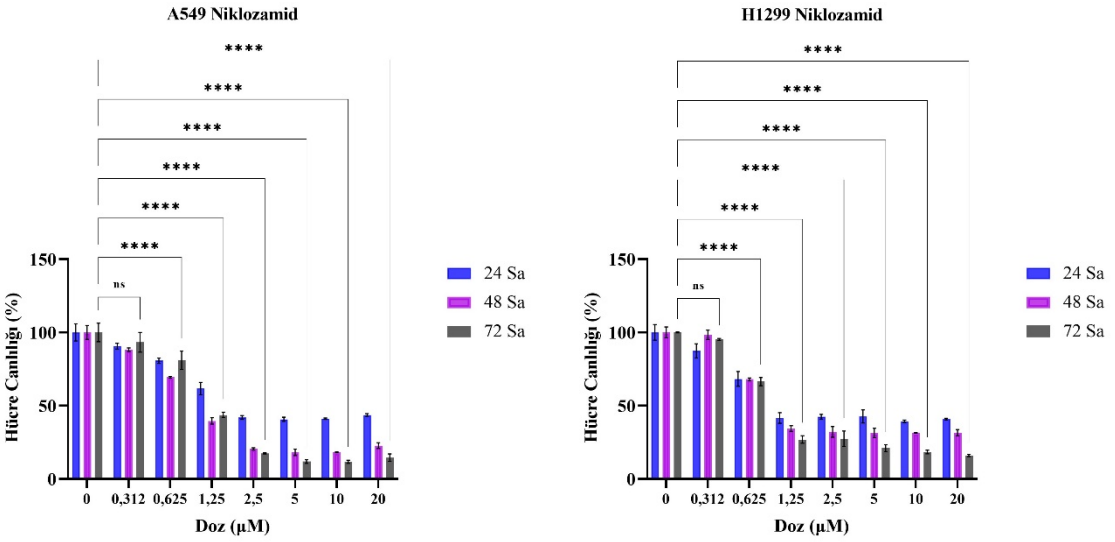
Şekil 4.18 A549 ve H1299 akciğer kanser hücrelerinde Niklozamid (Nik) (0,625-1 µM) ve Resveratrol (50 µM) kombinasyonunun uygulanmasının (48 saat) hücre canlılığına etkisinin SRB canlılık analizi ile tayini. Aynı zaman periyodu içinde tedavi uygulanmamış (NK) ve Resveratrol, Niklozamid (0,625 µM) ve resveratrol ile kombinasyonu ve Niklozamid (1 µM) ve Resveratrol kombinasyonu karşılaştırılmıştır. ns istatistiksel olarak anlamlılık olmadığını, (****:p<0,00001 ve ***:*p*<0,0001) istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir.

Yapılan bu kombinasyon çalışmalarında alınan sonuçlarla beraber üç boyutlu organotipik tümör modellerinde kombinasyon çalışmasının ileri analizlerinde Niklozamid ile beraber kullanılmak üzere Dosetaksel seçilmiştir.

4.3.2 Niklozamidin A549 ve H1299 Akciğer Kanser Hücreleri Üzerinde Etkili Dozun ve Süresinin Belirlenmesi

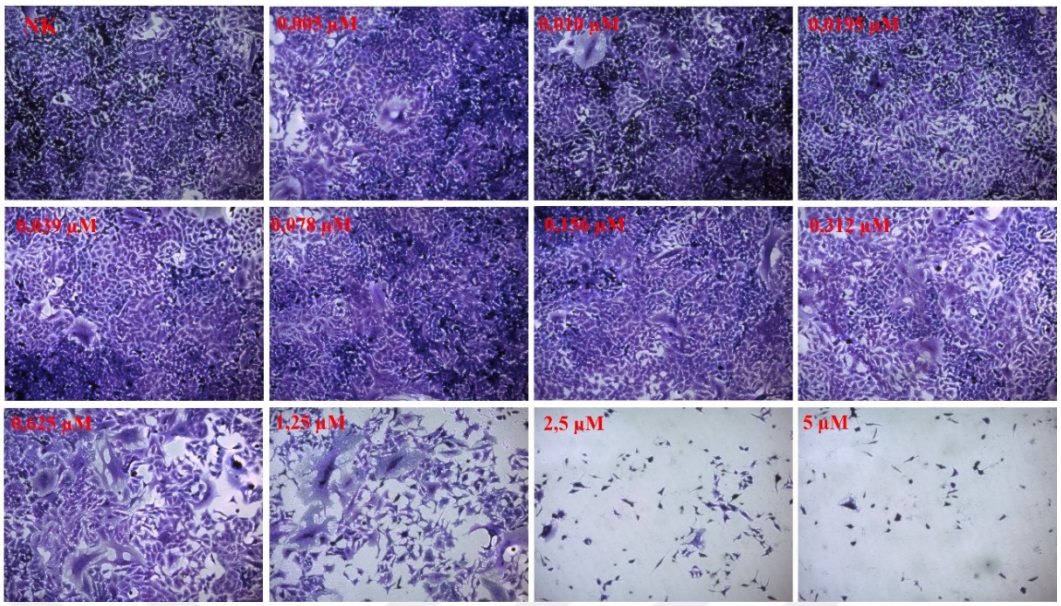
A549 ve H1299 akciğer kanseri hücreleri Niklozamidin farklı dozlarına (0-20µM) maruz bırakıldı. Ardından hücrelerin Niklozamidle 24, 48 ve 72 saat tedavisinin hücre canlılığına etkisi SRB canlılık analizi ile araştırıldı. Buna göre her iki hücre soyunda da ilacın artan dozuyla hücre canlılığında etkili düşüşler olduğu ölçüldü (Şekil 4.19).

Bununla beraber aynı dozlarda muamele süresi arttıkça 1,25µM ve sonraki dozlarda canlılıkta önemli düşüşler olduğu tespit edildi. 72 saatteki IC_{50} değerleri A549 hücre soyunda 1,051µM, H1299 hücre soyunda 0,884µM olarak hesaplandı (Çizelge 4.1). Her iki akciğer kanser hücresi soyunda da toksik olmayan ancak inhibitor etkisi gösteren dozun 0,625µM ve tedavi süresinin 72 Sa olduğu tespit edildi. Niklozamidin 0,625µM dozunun 72 Sa tedavisinde A549 hücrelerinde hücre canlılığı kontrol grubuyla kıyaslandığında %81,1, H1299 hücrelerinde %66,4 olarak ölçülmüştür.

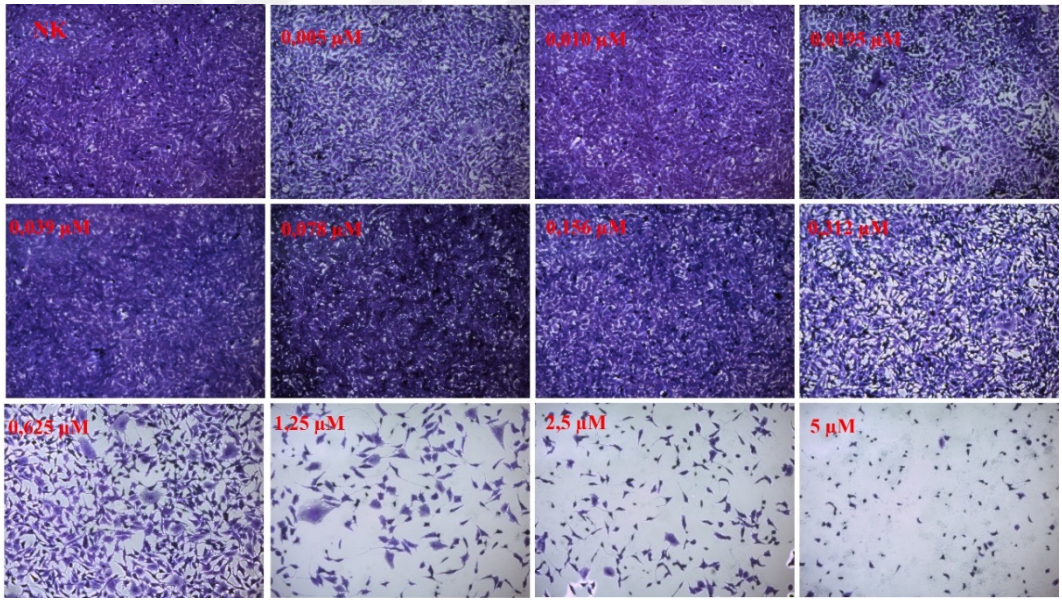


Şekil 4.19 A549 ve H1299 hücrelerinin Niklozamid (0-20µM) ile 24, 48 ve 72 saat muamelesi ile SRB hücre canlılık analizi sonuçları. Veriler ortalama ± SD (n = 3) olarak sunulmuştur. SD, standart sapma. ns istatistiksel olarak anlamlılık olmadığını ****p<0,00001 istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir. Şekilde A549 ve H1299 hücrelerinin 72 Sa'lik canlılık sonucunun istatiksel değerlendirilmesi verilmiştir.

72Sa Niklozamid (0-5µM) uygulaması sonrası SRB ile boyanmış A549 ve H1299 hücrelerinin mikroskop görüntüleri sırasıyla Şekil 4.20 ve Şekil 4.21'te gösterilmiştir. İnkübasyon süreleri sonunda, hücre yoğunluğunun tedavi görmemiş kontrol hücrelerine kıyasla artan Niklozamid konsantrasyonuna bağlı olarak önemli oranda azaldığı görüldü.



Şekil 4.20 A549 hücrelerinin Niklozamidle (0-5µM) 72 Sa muamelesi ardından SRB ile boyanması görüntüleri (40X).



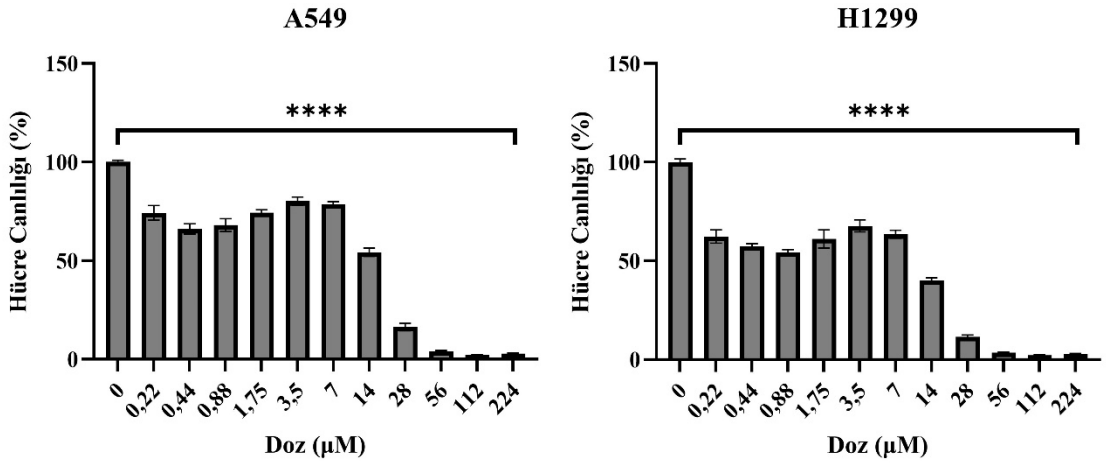
Şekil 4.21 H1299 hücrelerinin Niklozamidle (0-5µM) 72 Sa muamelesi ardından SRB ile boyanması görüntüleri (40X).

Çizelge 4.1 Akciğer Kanser hücrelerinde Niklozamid ile 72 saat tedavi sonrası IC_{50} Değerleri.

Hücre	Süresi (Sa)	IC_{50} (µM)
A549	72	1,051
H1299	72	0,884

4.3.3 Dosetakselin A549 ve H1299 Akciğer Kanser Hücreleri Üzerinde Etkili Dozun ve Süresinin Belirlenmesi

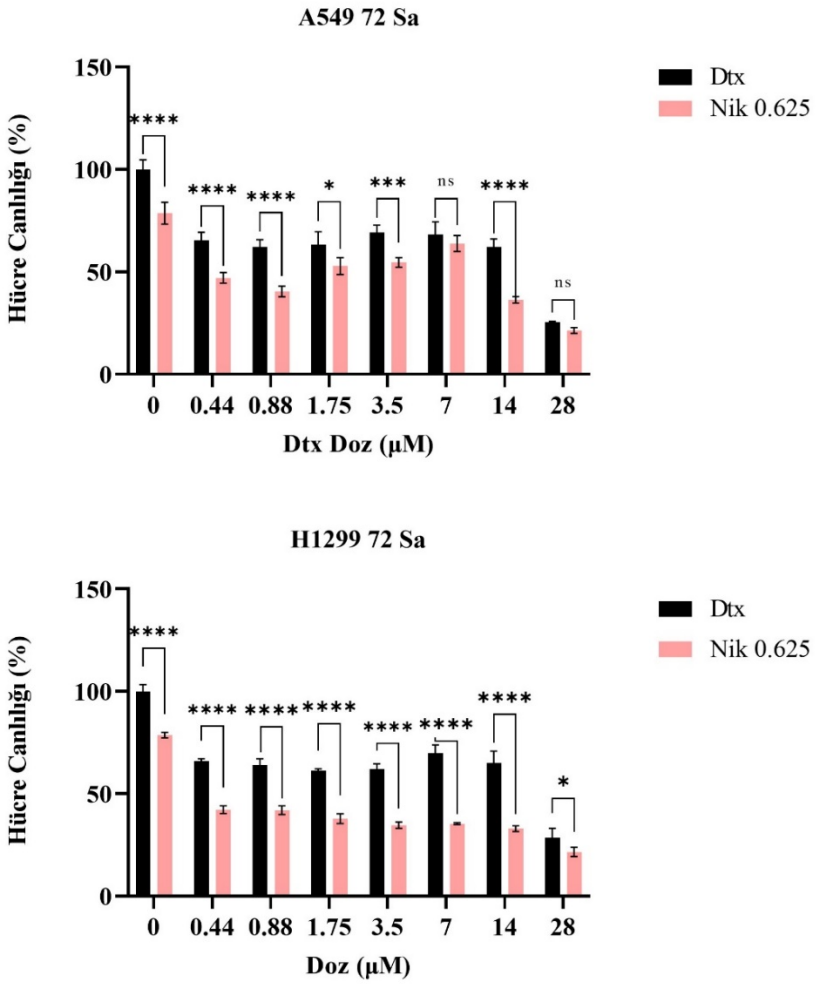
Dosetakselin 100 TDC (14µM) dozunu da kapsayan bir doz aralığında (0-224µM) A549 ve H1299 hücrelerine 72 Sa boyunca tedavi uygulandı. Her iki hücre soyunda da Dosetakselin 0,22-7µM dozları arasında canlılığı anlamlı bir şekilde düşürdüğü ancak ilacın bu dozlar arasında sitostatik bir etki gösterdiği görüldü. A549 hücrelerinde 00,22-7µM dozları arasında hücre canlılığı %73-76 değerleri arasında değişirken, H1299 hücrelerinde canlılığın %61-67 değerleri arasında statik bir şekilde ilerlediği görüldü. 14µM dozundan itibaren A549 hücrelerinde hücre canlılığı %54,3'e, H1299 hücrelerinde %40,1'e keskin bir şekilde düştüğü görüldü (Şekil 4.22).



Şekil 4.22 A549 ve H1299 hücrelerinin Dosetaksel ile 72 saat muamelesi ile SRB hücre canlılık analizi sonuçları. Veriler ortalama ± SD (n = 3) olarak sunulmuştur. SD, standart sapma. (****:p<0,00001) istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir.

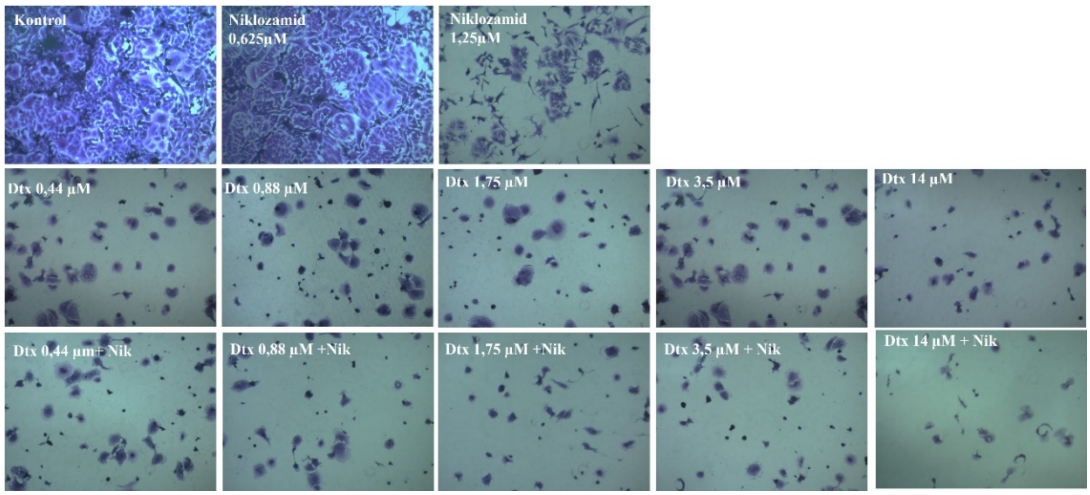
Niklozamid (0,625µM) ve Dosetakselin (0-28µM) ikili kombinasyonu her iki hücre soyunda da 72 Sa boyunca uygulandı. Ardından SRB analizi ile hücre canlılığı ölçüldü.

Niklozamid ile kombinasyon tedavisinin Dosetakselin kendi başına aynı dozlarda gösterdiği canlılıkla karşılaştırıldığında istatiksel olarak kombinasyon tedavisinde anlamlı farklılıklar olduğu görüldü. A549 hücre soyunda sadece Niklozamid ile tedavi sonrasında hücre canlılığı %78,6, sadece Dosetaksel (0,44µM) tedavisi sonrası) %65,3 iken, kombinasyon tedavisi ile hücre canlılığının %47,1'e düştüğü görüldü. En etkili düşüşün %62,1'den %36,3 ile Niklozamidin 0,625 µM dozu ile Dosetakselin 14µM dozundaki kombinasyon tedavisinde gerçekleştiği görüldü. H1299 hücre soyunda sadece Niklozamid ile tedavi sonrasında hücre canlılığı %78,6, sadece Dosetaksel (0,44µM) tedavisi sonrası %65,8 iken, kombinasyon tedavisi ile hücre canlılığının %42,2'ye düştüğü görüldü. H1299 hücrelerinde de en etkili kombinasyonun %65,1'den %32,9'a düştüğü Niklozamidin 0,625 µM dozu ile Dosetakselin 14µM dozunda gerçekleştiği görüldü. Alınan bu sonuçlarla beraber ileri 2B hücre kültürü çalışmalarında Dosetaksel'in istatiksel olarak anlamlılık veren en düşük dozu 0,44µM ve Niklozamidin 0,625µM dozları ile devam edildi.

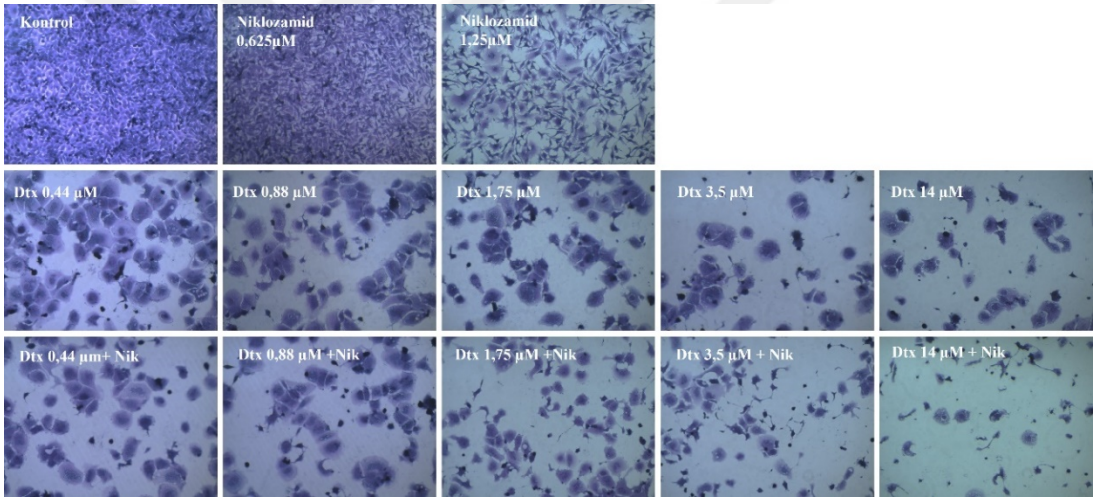


Şekil 4.23 A549 ve H1299 hücrelerinin Niklozamid (Nik), (0,625µM) ve Dosetaksel (Dtx) (0-28µM) ile 72 saat muamelesi ile SRB hücre canlılık analizi sonuçları. Veriler ortalama ± SD (n = 3) olarak sunulmuştur. SD, standart sapma. ns istatistiksel olarak anlamlılık olmadığını,****p<0,00001, ***p<0,001, *p<0,05 istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir

Kombinasyon çalışmasının SRB boyaması görüntüleri A549 hücreleri için Şekil 4.24 H1299 hücreleri için Şekil 4.25'de verilmiştir. Hücreler morfolojik olarak incelendiğinde Dosetaksel uygulanan hücreler düşük dozlarda yuvarlak sitoiskeleti düz ve yayılmış bir görüntü sergilerken artan dozlarda hem sayıda azalmalar hem de hücrelerde toparlanarak küçülmeler görüldü. Bu durum kombinasyon uygulanmış hücrelerde de görüldü. Niklozamid tek başına uygulanmış hücrelerde her iki hücre soyunda da fibroblastik (iki kutuplu uçlardan daralmış ve uzun) bir görünüm almış olmaları dikkat çekicidir. Ancak kombinasyon tedavisinde bu değişim gözlenmemiştir.



Şekil 4.24 A549 hücrelerinin Niklozamid (0,625µM) ve Dosetaksel (Dtx)(0-14µM) ikili kombinasyonu ile 72Sa muamelesi sonucu SRB ile boyaması mikroskop görüntüleri (100X).

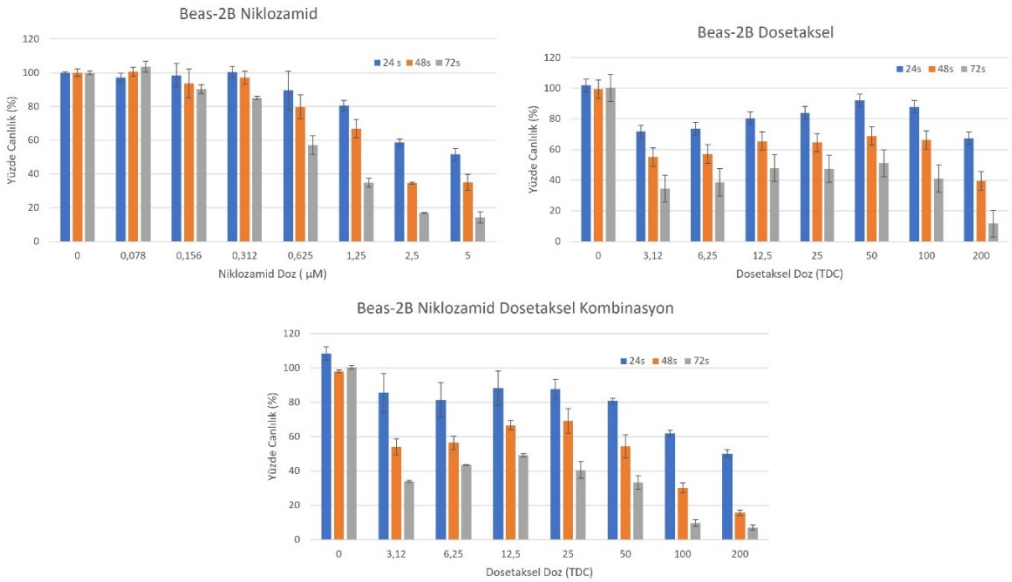


Şekil 4.25 H1299 hücrelerinin Niklozamid (0,625µM) ve Dosetaksel (Dtx), (0-14µM) ikili kombinasyonu ile 72Sa muamelesi sonucu SRB ile boyaması mikroskop görüntüleri (100X).

4.3.4 Niklozamid, Dosetaksel ve İkili Kombinasyonunun Sağlıklı Akciğer Epitelyal (Beas-2B) Hücrelerinde Canlılığa Etkisinin Belirlenmesi

Kombinasyon tedavisinin sağlıklı akciğer hücrelerinde etkisini belirlemek amacıyla Beas-2B akciğer epitelyal hücreleri Niklozamid, Dosetaksel ve ikili kombinasyonu ile 24, 48 ve 72Sa süre ile tedavi edildi. Niklozamidin ilk 24 Sa içinde 1,25 µM dozuna kadar hücre canlılığında önemli bir değişikliğe sebep olmadığı görüldü (%80-100). Artan dozlarda hücre canlılığını %55 civarına düşürdüğü gözlendi. Aynı şekilde Dosetaksel

(%70-95) ve kombinasyon (%60-80) tedavilerinde de 24 saat uygulamada önemli değişiklere sebep vermezken, doza ve maruziyet süresine bağlı olarak sağlıklı hücrelerde hücre canlılığında düşüşler görüldü (Şekil 4.26).

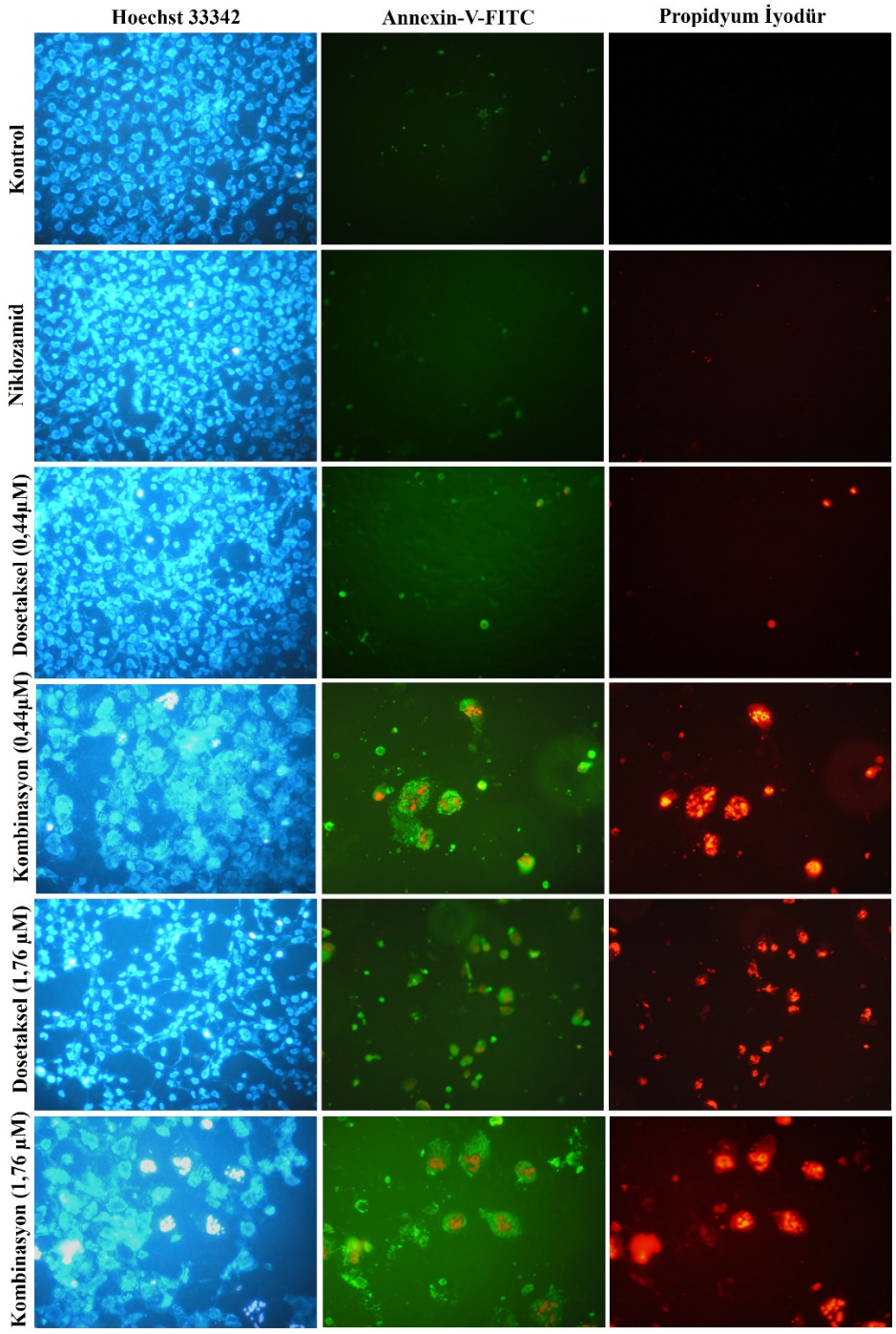


Şekil 4.26 Niklozamid (0-5µM), Dosetaksel (0-28µM) ve ikili kombinasyonunun sağlıklı akciğer epitel hücrelerinde (Beas-2B) 24, 48 ve 72Sa SRB hücre canlılık analizi.

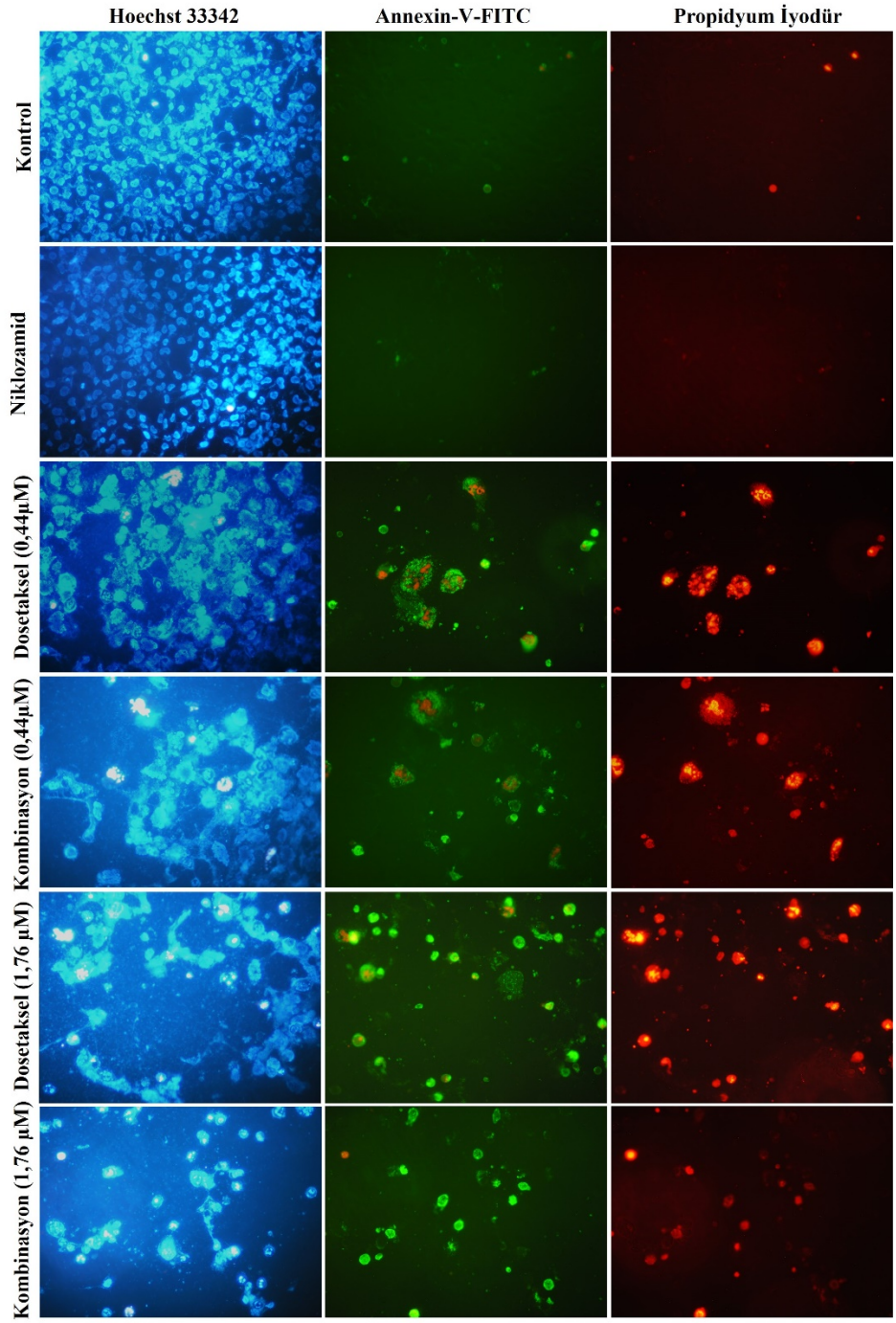
4.4 Niklozamid ve Dosetaksel Kombinasyon Tedavisinin A549 ve H1299 Akciğer Kanser Hücreleri Üzerinde Sebep Olduğu Hücre Ölümü Modunun Belirlenmesi

A549 ve H1299 hücreleri Niklozamid (0,625 µM), Dosetakselin iki dozu (0,44 ve 1,76 µM) ve ikili kombinasyonları ile 48 saat tedavi edildi. Ardından hücreler Hoechst 33342, Annexin-V-FITC ve PI floresan boyaları ile boyandı. A549 hücrelerinde Niklozamid (0,625µM) ile tedavi edilmiş hücrelerde az miktarda Annexin-V pozitif hücreler görülürken PI-pozitif hücrelere rastlanmadı. Ancak Dosetaksel (0,44µM) ve kombinasyon tedavisinde Annexin-V pozitif (yeşil) hücrelerde artış görülürken PI-pozitif (kırmızı) hücreler de olduğu görüldü. Ayrıca bu durumun Dosetaksel konsantrasyonu arttıkça (1,76µM) belirgin bir şekilde fazlalaştığı tespit edildi. Aynı hücrelerde Dosetaksel ve kombinasyonlarında apoptotik bleblerin oluştuğu ve bir hücrede birden çok çekirdek olduğu gözlemlendi (Şekil 4.27). H1299 hücrelerinde de Niklozamid tedavisi sonucu apoptoz ve nekroz belirteçleri gözlenmezken, Dosetaksel (0,44µM) ve kombinasyon tedavisiyle beraber 48Sa süre içinde hem apoptotik (Annexin-V pozitif)

hem de nekrotik (PI pozitif) markırlar yoğun bir şekilde görüldü. Aynı şekilde Dosetaksel dozu (1,76µM) arttıkça markırlar daha belirgin bir şekilde arttığı gözlemlendi (Şekil 4.28).



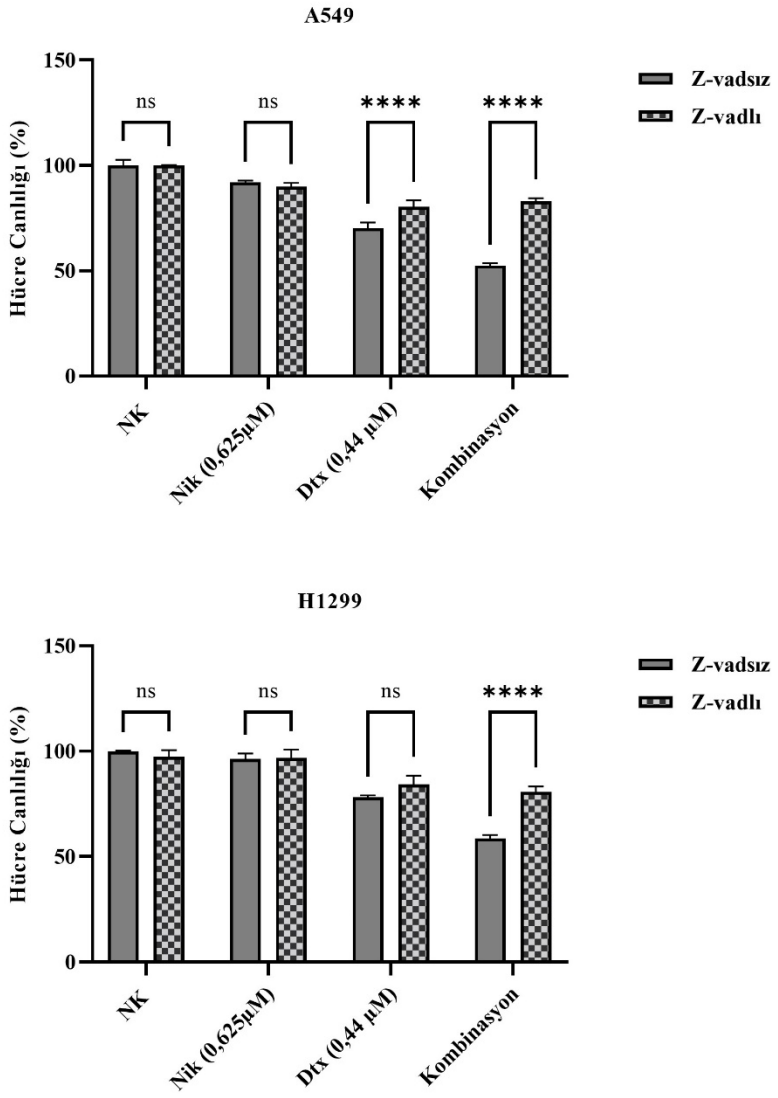
Şekil 4.27 A549 akciğer kanseri hücrelerinin Niklozamid (0,625µM), Dosetaksel (0,44 ve 1,76µM) ve ikili kombinasyonları ile 48Sa tedavi sonrasında Hoechst 33342 (mavi), Annexin-V-FITC (yeşil) ve PI (kırmızı) üçlü floresan boyaması görüntüleri. Büyütme 200X.



Şekil 4.28 H1299 akciğer kanseri hücrelerinin Niklozamid (0,625µM), Dosetaksel (0,44 ve 1,76µM) ve ikili kombinasyonları ile 48Sa tedavi sonrasında Hoechst 33342 (mavi), Annexin-V-FITC (yeşil) ve PI (kırmızı) üçlü floresan boyaması görüntüleri. Büyütme 200X.

4.5 Niklozamid ve Dosetaksel Kombinasyon Tedavisinin A549 ve H1299 Akciğer Kanser Hücreleri Üzerinde Sebep Olduğu Hücre Ölümü Modunun Doğrulanması

Z-VAD-FMK, *in vitro* çalışmalarda apoptotik ölümün doğrulanması amacıyla kullanılır. A549 ve H1299 akciğer kanser hücrelerinde Niklozamid, Dosetaksel ve ikili kombinasyon tedavisinin hücreleri apoptoza götürdüğünü doğrulamak amacıyla hücreler 24 saat Z-VAD-FMK (20µM) pankaspaz inhibitörü ile ön muamele edildi. Ardından Niklozamid (0,625µM), Dosetaksel (0,44µM) ve ikili kombinasyonuna 48Sa boyunca maruz bırakıldı. İnkübasyon süresinin ardından SRB canlılık analizi ile hücre canlılığı ölçüldü. Alınan sonuçlara göre Z-VAD-FMK inhibitörü ile ön muamelenin her iki hücre soyunda da ikili kombinasyon tedavisinde canlılığı geri getirdiği ölçüldü. Her iki hücre soyunda da Niklozamidin tek başına tedavisinde inhibitör ön muamelesinde hücre canlılığında anlamlı bir farklılık görülmezken, A549 hücrelerinde tek başına Dosetaksel (%70,2'den %80,2'ye) ve kombinasyon (%52,7'den %83,1'e) tedavilerinde inhibitörsüz tedavilere göre anlamlı artışlar olduğu görüldü (Şekil 4.29). H1299 hücrelerinde inhibitörsüz ve inhibitörlü tedavilerde sadece kombinasyon tedavisinde canlılıkta anlamlı bir artış (%58,7'den %80,9'a) olduğu görüldü. Bu alınan sonuçla beraber Niklozamid-Dosetaksel kombinasyon tedavisinin akciğer kanser hücrelerini apoptoz ölüm yolu ile öldürdüğü doğrulanmıştır.



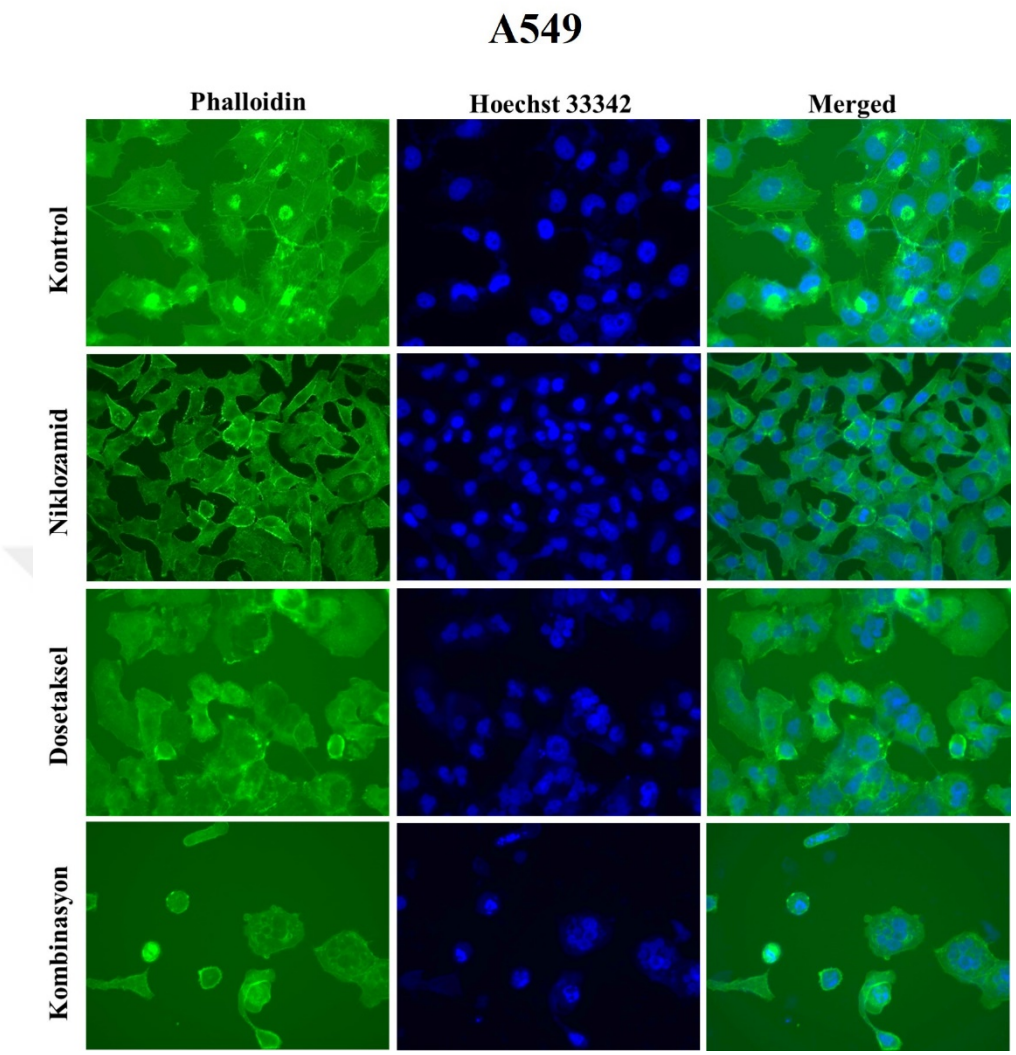
Şekil 4.29 Niklozamid (Nik) ve Dosetaksel (Dtx) kombinasyon tedavisinin A549 ve H1299 akciğer kanser hücreleri üzerinde sebep olduğu hücre ölümü modunun Z-VAD-FMK (20µM) inhibitör uygulaması ile doğrulanması. ns istatistiksel olarak anlamlılık olmadığını, ****(P<0.0001) istatiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir. Data ortalama±SD (n=3) olarak sunulmuştur. SD; standard sapma.

4.6 Niklozamid ve Dosetaksel Kombinasyon Tedavisinin A549 ve H1299 Akciğer Kanser Hücreleri Üzerindeki Morfolojik Değişikliklerin Floresan Mikroskopi İle Belirlenmesi

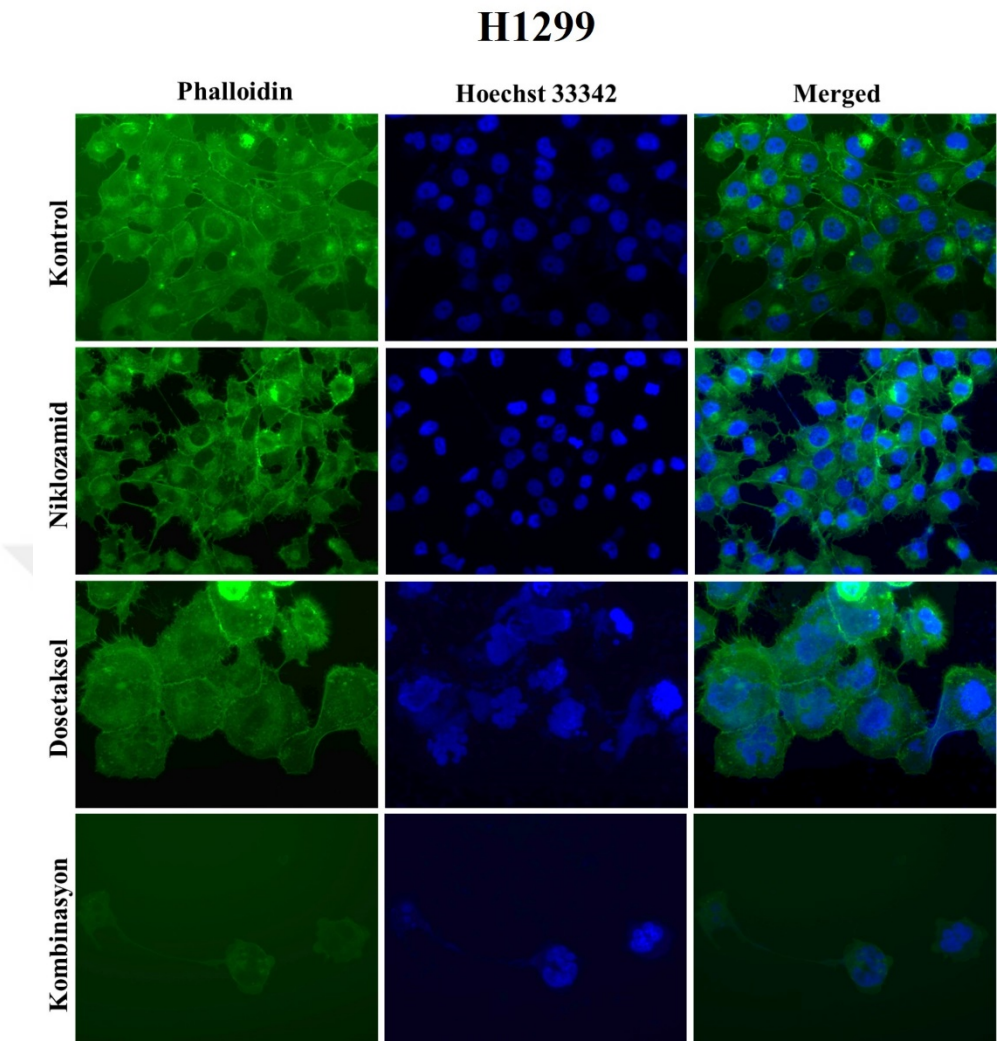
Dosetaksel tübülin monomerlerinin mikrotübüllerden ayrılarak yeniden şekillendirilememesi için mikrotübül stabilize edici olarak görev yapan bir kemoterapötik ajandır (Ramaswamy ve Puhalla, 2006). Dosetaksel, Niklozamid ve ikili kombinasyon tedavisi uygulanmış akciğer kanseri hücrelerinde sitoiskeletin organizasyonunu

inceleyebilmek için 24 saat tedavi görmüş hücreler Hoechst 33342 ve F-aktin spesifik Phalloidin-I-Fluor floresan boyası ile boyandı. Tedavi görmemiş A549 kontrol hücrelerinde F-aktin stres lifleri sitoiskelet yapısında düzgün, uzun lifler içeren hücreler yüzeye yayılmış bir şekilde gözlenirken, Dosetaksel ve ikili kombinasyon tedavisi almış hücrelerde mikrotübül dönüşümünün inhibisyonuna bağlı olarak deforme olmuş mikrotübüller gözlemlendi. Dosetaksel tedavisini müteakip hücrelerin büyüyerek (hipertropi) hücre çevresinde düzensiz kısmen tahrip olmuş F-aktin lifleri oluşturduğu görüldü. Ayrıca bu hücrelerde nükleik asitleri floresan olarak Hoechst 33342 ile işaretlendi. Alınan sonuçlarda özellikle kombinasyon tedavisi görmüş hücrelerde kromatin kondensasyonu, nükleer fragmantasyon ve multinükleus oluşumu görüldü. Bu sonuçlar kombinasyon tedavisiyle hücrelerin hücre bölünmesinde tutuklu kalarak apoptoza geçtiğini göstermektedir. Niklozamid tedavisinin tek başına mikrotübül ve çekirdek morfolojisinde bir değişikliğe sebep olmadığı görüldü (Şekil 4.30).

Niklozamid, Dosetaksel ve ikili kombinasyon tedavisi görmüş H1299 hücrelerinde de aynı şekilde tedavi görmemiş ve Niklozamidle tedavi görmüş hücrelerde düzgün belirgin bir sitoiskelet yapısı görülürken, Dosetaksel ve kombinasyon tedavisi almış hücrelerde F-aktin filamentlerinde bozulmalar, düzensiz yapılar ve hücre hipertropisi görüldü. Ayrıca bu hücrelerde de hücre çekirdeğinde DNA fragmantasyonu ve multinükleer yapılanmalar görüldü (Şekil 4.31).



Şekil 4.30 A549 Akciğer kanser hücrelerinin Niklozamid (0,625µM), Dosetaksel (0,44µM) ve ikili kombinasyonu ile 24 saat tedavisinin ardından hücre morfolojilerinin Phalloidin-I-Fluor 488 ve Hoechst 33342 ile floresan olarak belirlenmesi. Büyütme 200X

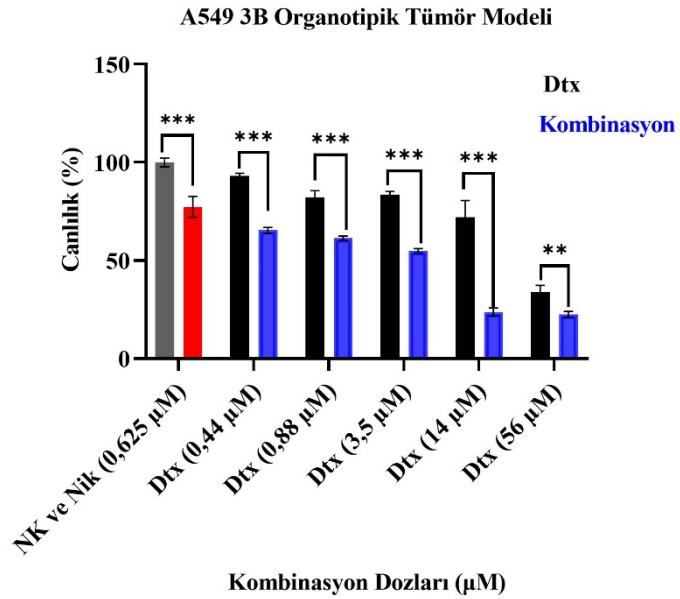


Şekil 4.31 H1299 Akciğer kanser hücrelerinin Niklozamid (0,625µM), Dosetaksel (0,44µM) ve ikili kombinasyonu ile 24 saat tedavisinin ardından hücre morfolojilerinin Phalloidin-I-Fluor- 488 ve Hoechst 33342 ile floresan olarak belirlenmesi. Büyütme 200X

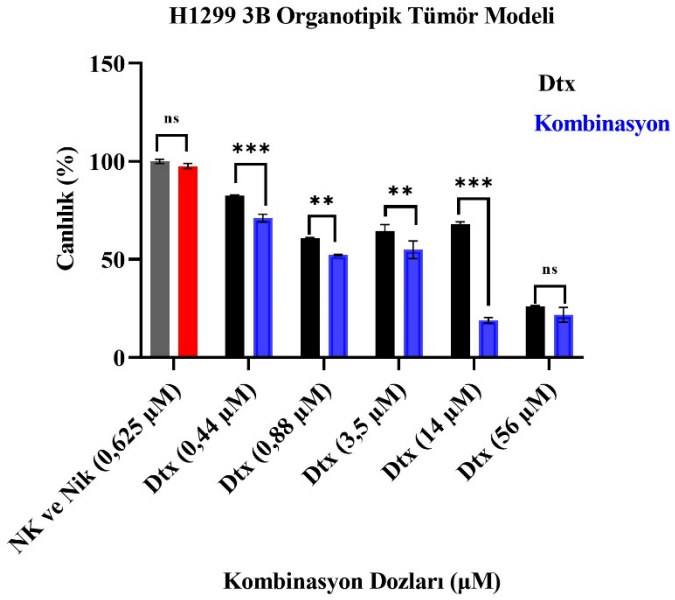
4.7 Niklozamid ve Dosetaksel Kombinasyon Tedavisinin A549 ve H1299 3B Organotipik Tümör Modellerinde Hücre Canlılığına Etkisinin ATP Analizi ile Belirlenmesi

Dosetaksel, Niklozamid ve ikili kombinasyonlarının oluşan tümör modellerinde canlılığa etkisini belirlemek amacıyla 72 saat ilgili ajanlarla tedavinin ardından ATP canlılık analizi gerçekleştirildi. Niklozamidin (0,625µM) tek başına A549 tümör modelinde %77,4, H1299 tümör modelinde %97,6 canlılık düşüşüne sebep olduğu ölçüldü. Bu doz 2B hücre kültürü sonuçlarımızda toksik olmayan doz olarak belirlenmişti. Dosetaksel 0,44µM dozunda A549 tümör modelinde hücre canlılığını %93,1'e düşürürken bu

dozdaki kombinasyonda %65,4'e düşürdüğü görüldü. A549 tümör modelinde en etkili düşüşün Dosetaksel tek başına %72,1'den aynı dozdaki kombinasyon tedavisinde %23,7 olduğu görüldü. H1299 tümör modelinde Dosetaksel tek başına 0,44µM dozunda hücre canlılığını %82,6'ya düşürürken bu dozdaki kombinasyon tedavisinde canlılığın %71,1'e düştüğü görüldü. H1299 tümör modelinde de en etkili kombinasyon dozunun Niklozamidin 0,625µM ve Dosetakselin 14µM dozları olduğu ve canlılığın %67,9'dan %19,1 düşürdüğü görüldü. (Şekil 4.32 ve Şekil 4.33).



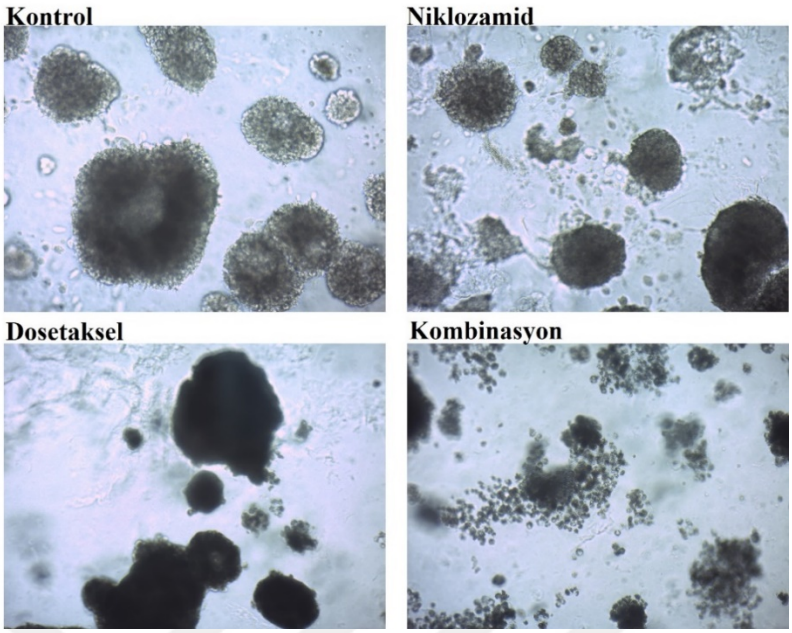
Şekil 4.32 A549 3B organotipik tümör modelinde Dosetaksel (Dtx), Niklozamid (Nik) ve ikili kombinasyonlarıyla 72 Sa tedavisinin ardından hücre canlılığının ATP canlılık analizi ile tayini. Aynı zaman periyodu (72 saat) içinde belirlenen Dosetaksel dozu (0-56µM) ile Niklozamidin 0,625µM dozunun kombinasyonunun canlılık üzerindeki etkisi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (** $p<0,01$ ve *** $p<0,001$) ifade etmektedir. Veriler ortalama ± SD (n = 3) olarak sunulmuştur. SD, standart sapma. NK tedavi görmemiş negatif kontrol, ns istatiksel olarak anlamlılık bulunmayan değerleri belirtmektedir.



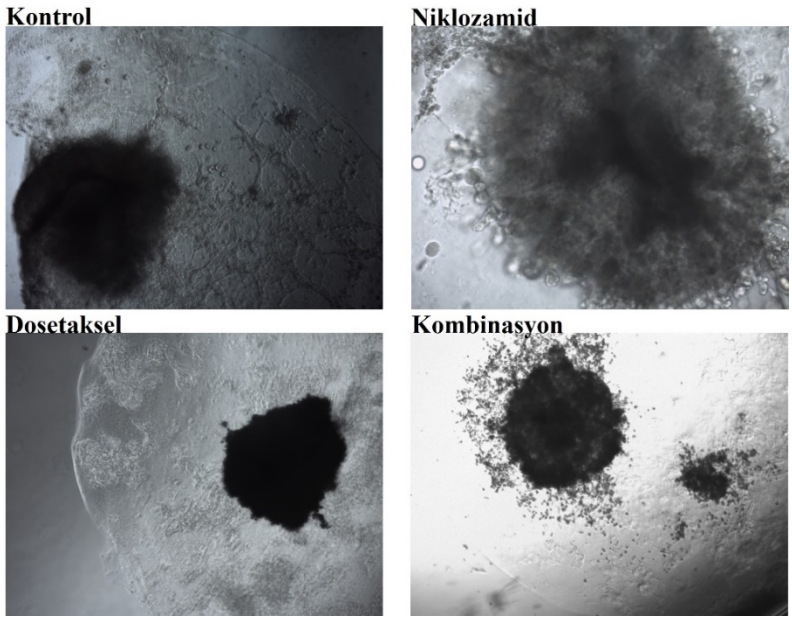
Şekil 4.33 H1299 3B organotipik tümör modelinde Dosetaksel (Dtx), Niklozamid (Nik) ve ikili kombinasyonlarıyla 72Sa tedavisinin ardından hücre canlılığının ATP canlılık analizi ile tayini. Aynı zaman periyodu (72 Sa) içinde belirlenen Dosetaksel dozu (0-56µM) ile Niklozamidin 0,625µM dozunun kombinasyonunun canlılık üzerindeki etkisi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (** $p<0,01$ ve *** $p<0,001$) ifade etmektedir. Veriler ortalama ± SD (n = 3) olarak sunulmuştur. SD, standart sapma. NK tedavi görmemiş negatif kontrol, ns istatiksel olarak anlamlılık bulunmayan değerleri belirtmektedir.

4.8 Niklozamid ve Dosetaksel Kombinasyon Tedavisinin A549 ve H1299 3B Organotipik Tümör Modellerinde Tümör Morfolojisine Etkisinin Mikroskopik Olarak İncelenmesi

A549 ve H1299 kanser hücre soylarıyla 3B organotipik tümör modelleri oluşturuldu. Modeller Niklozamid (0,625µM), Dosetaksel (14µM) ve ikili kombinasyon tedavisine 72 Sa maaruz bırakıldı. Tedavi süresinin sonunda 3B tümör modellerindeki yapısal değişiklikler ışık mikroskopisi ile incelendi. Her iki modelde de Niklozamidin tek başına tedavisi tümör morfolojisinde belirgin bir değişikliğe sebep olmazken, kombinasyon tedavisi sonrasında yapıların tamamen parçalanarak dağıldığı görüldü. Tek başına Dosetaksel tedavisinde yapının bozulmadan kaldığı gözlemlendi (Şekil 4.34 ve Şekil 4.35).



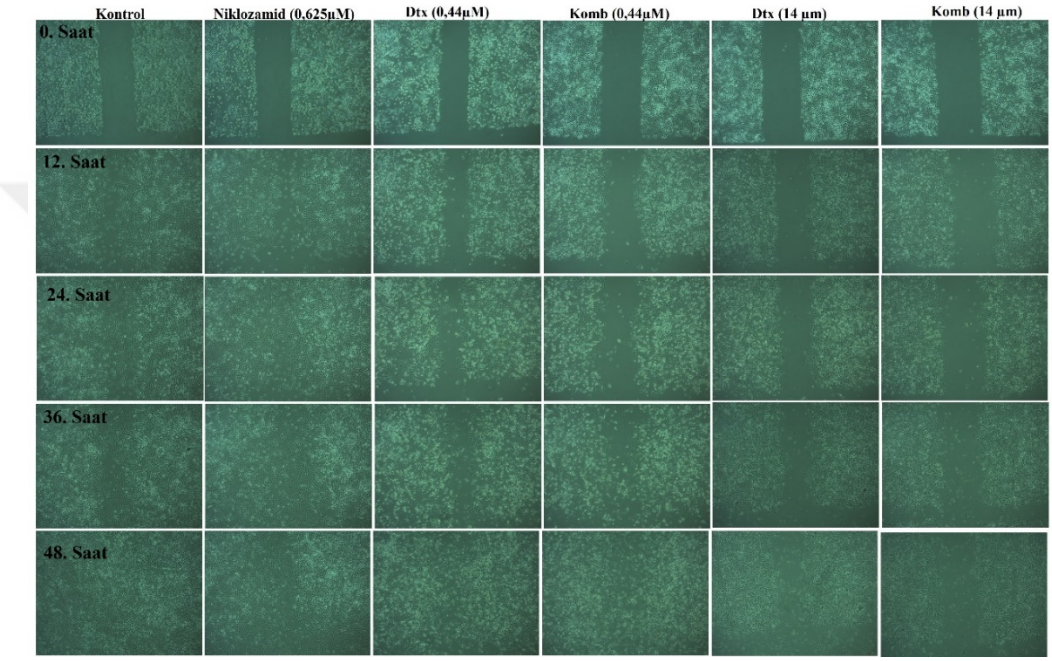
Şekil 4.34 A549 3B Organotipik Tümör modellerinin Niklozamid (0,625µM), Dosetaksel (14µM) ve ikili kombinasyonu ile 72 Sa tedavisi ardından tümör modellerinin ışık mikroskopisi görüntüleri (40X).



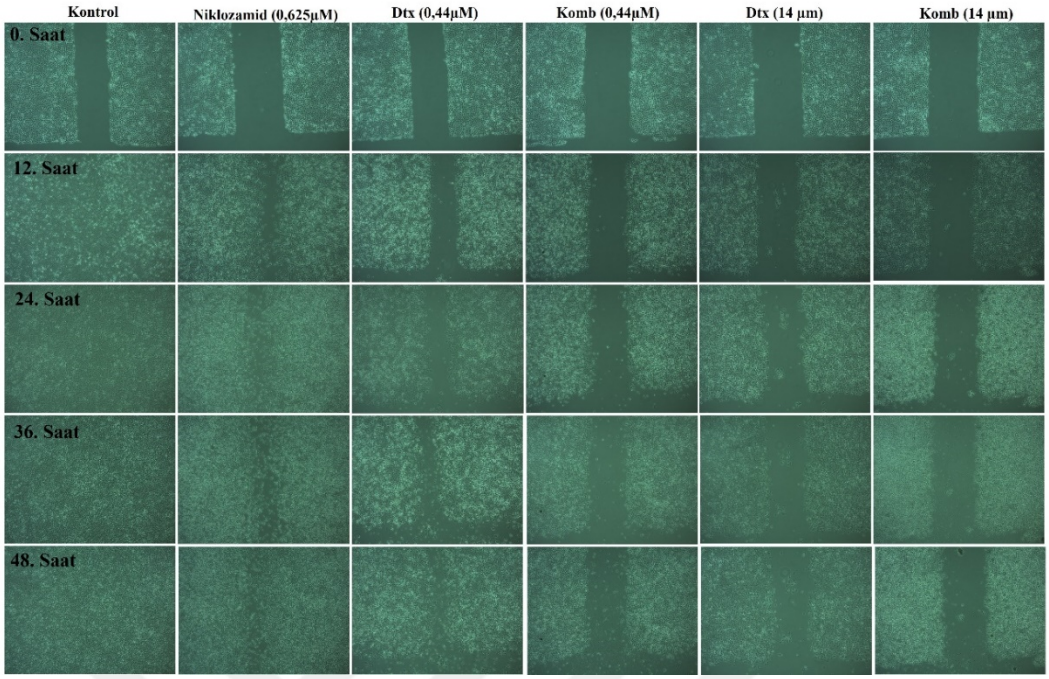
Şekil 4.35 H1299 3B Organotipik Tümör modellerinin Niklozamid (0,625µM), Dosetaksel (14µM) ve ikili kombinasyonu ile 72 Sa tedavisi ardından tümör modellerinin ışık mikroskopisi görüntüleri (40X).

4.9 Niklozamid ve Dosetaksel Kombinasyon Tedavisinin A549 ve H1299 Hücre Soylarında Hücre Göçüne (Migrasyon) Etkisinin Belirlenmesi

Bu analiz sonucunda her iki hücre soyunda da Niklozamidin (0,625µM) migrasyona (hücre göçü) bir etkisi olmazken Dosetaksel (0,44µM ve 14 µM) ve ikili kombinasyonlarda belirgin olarak yaraların kapanmadığı gözlemlendi. Artan Dosetaksel dozuyla beraber etkinin daha da etkili olduğu görüldü (Şekil 4.36 ve Şekil 4.37).



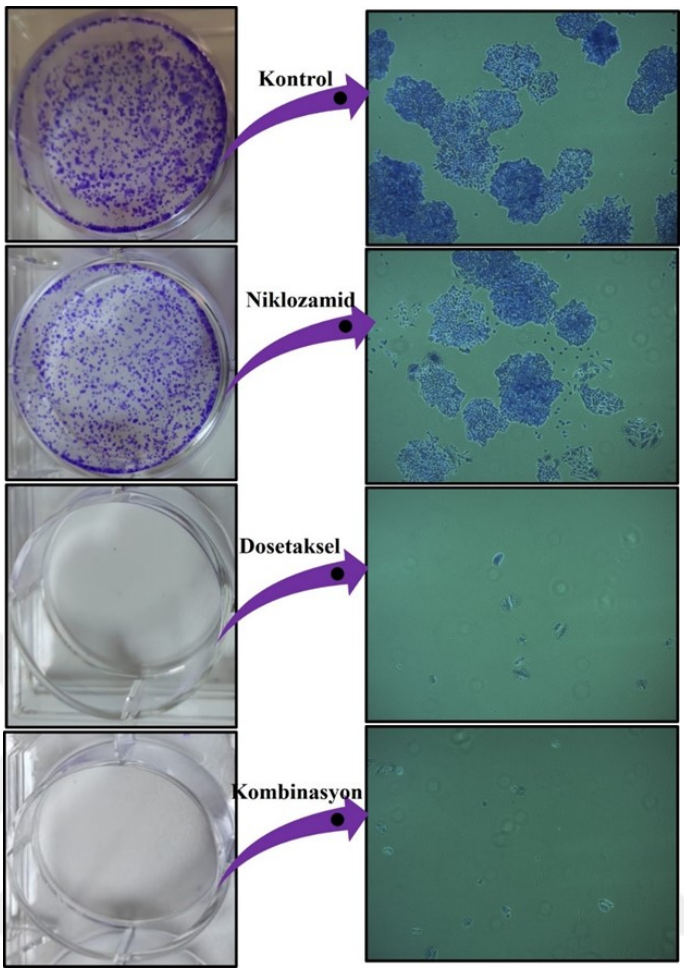
Şekil 4.36 A549 akciğer kanser hücrelerinde Niklozamid (0,625µM), Dtx (0,44 ve 14µM) ve ikili kombinasyonlarının (Komb) hücrelerin göç (migrasyon) yetenekleri üzerindeki etkisi. Büyütme 40X.



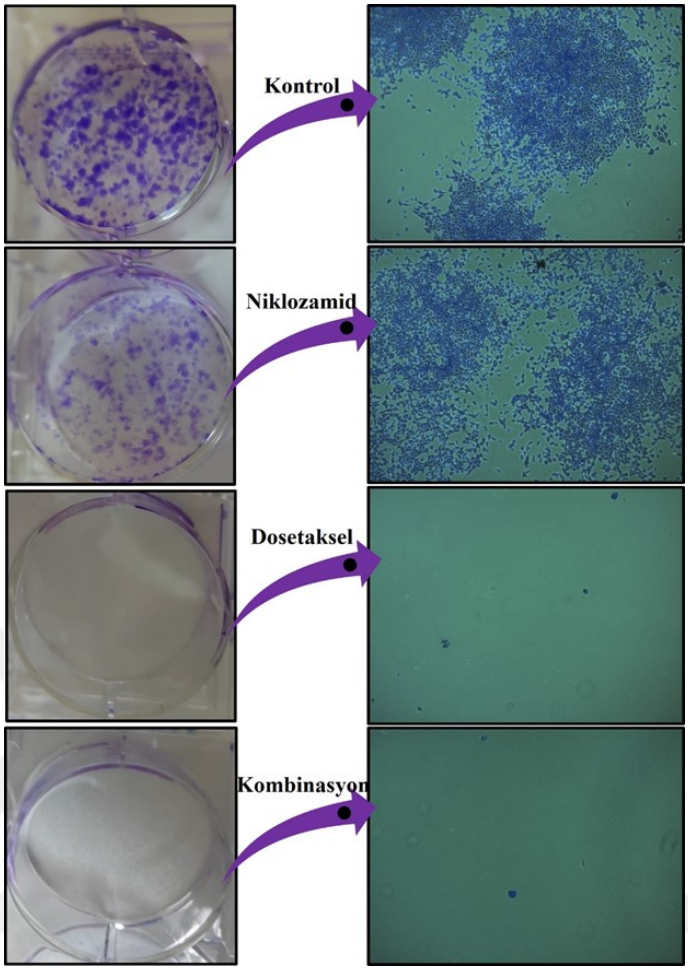
Şekil 4.37 H1299 akciğer kanser hücrelerinde Niklozamid (0,625µM), Dtx (0,44 ve 14µM) ve ikili kombinasyonlarının (Komb) hücrelerin göç (migrasyon) yetenekleri üzerindeki etkisi. Büyütme 40X.

4.10 Niklozamid ve Dosetaksel Kombinasyon Tedavisinin A549 ve H1299 Hücre Soylarında Koloni Oluşturma Yeteneğine Etkisinin Belirlenmesi

Her iki akciğer hücre soyunda da kontrol ve Niklozamid tedavisi görmüş hücrelerde koloniler oluşurken Dosetakselin tek başına ve Niklozamid ile kombinasyonu ile tedavi görmüş hücrelerde kolonilerin oluşmadığı gözlemlendi (Şekil 4.38 ve Şekil 4.39).



Şekil 4.38 A549 akciğer kanser hücrelerinde Niklozamid (0,625µM), Dosetaksel (0,44µM) ve ikili kombinasyonlarının hücrelerin koloni oluşturma yetenekleri üzerindeki etkisi. Büyütme 40X.

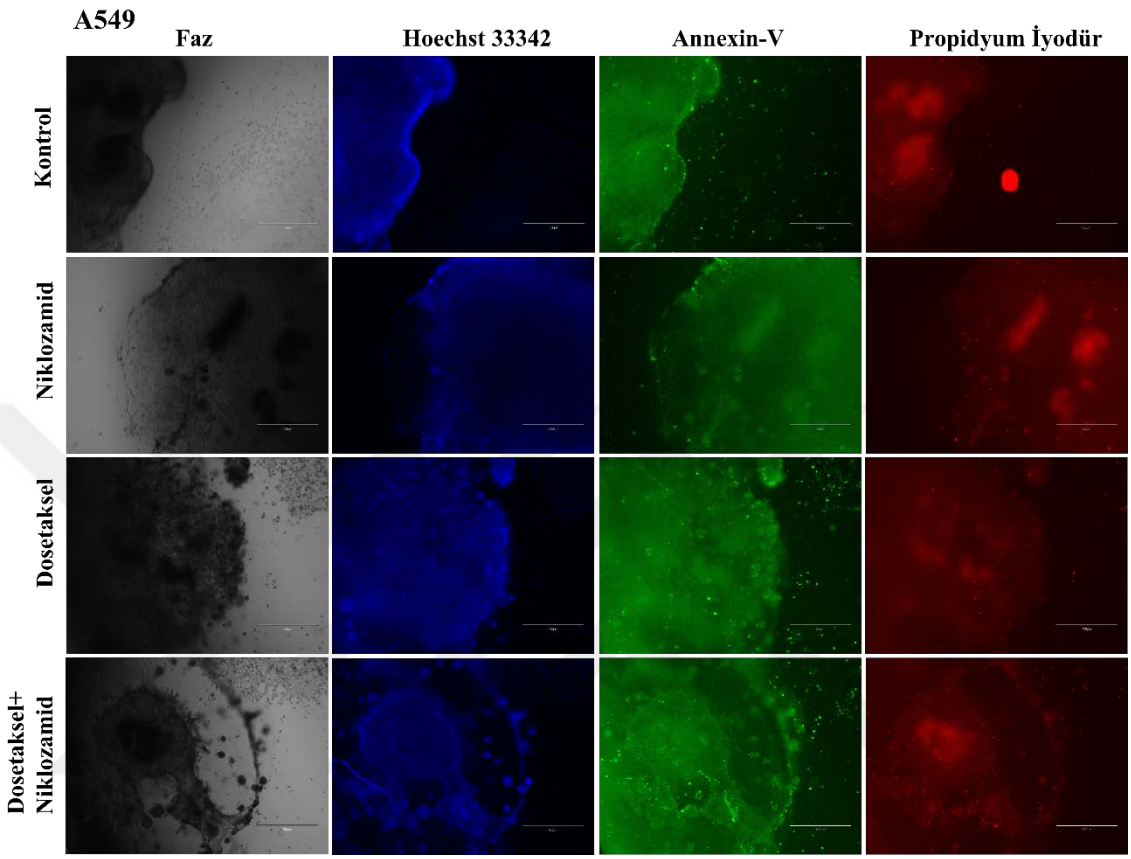


Şekil 4.39 H1299 akciğer kanser hücrelerinde Niklozamid (0,625µM), Dosetaksel (0,44µM) ve ikili kombinasyonlarının hücrelerin koloni oluşturma yetenekleri üzerindeki etkisi. Büyütme 40X.

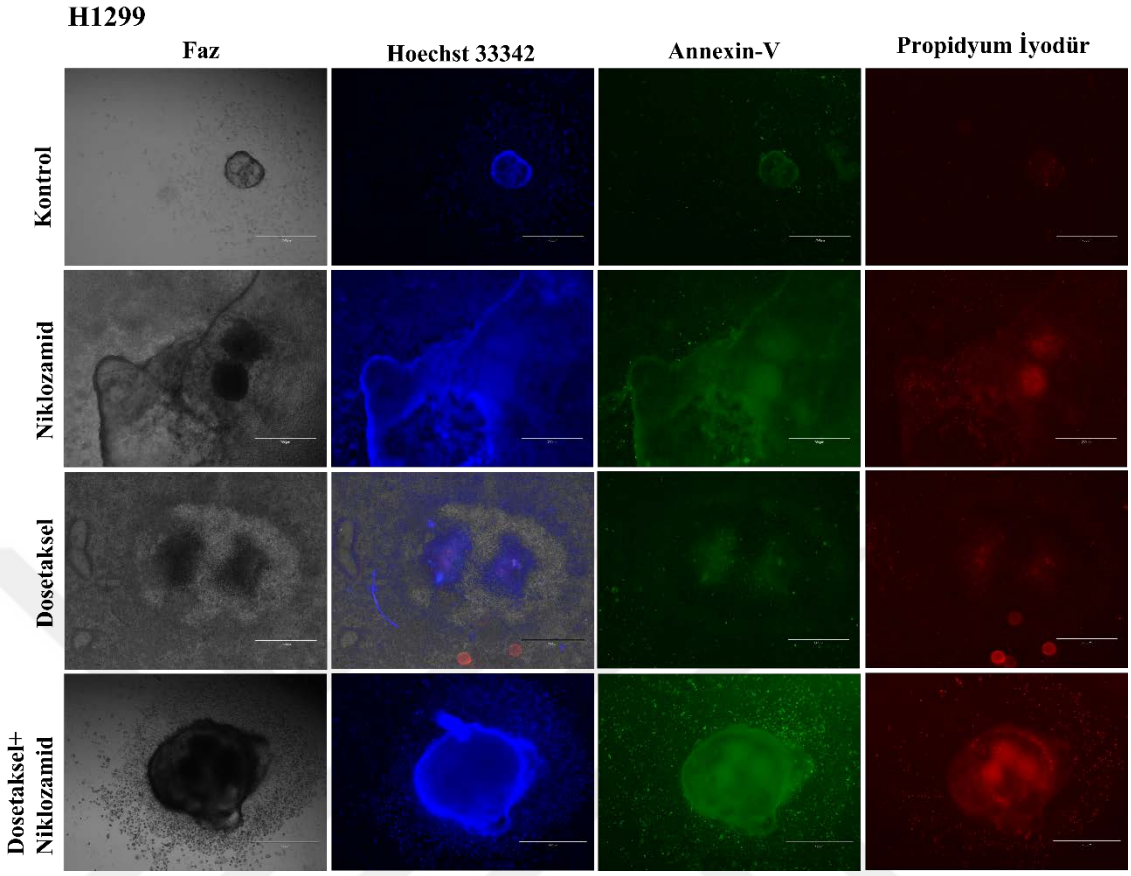
4.11 Niklozamid ve Dosetaksel Kombinasyon Tedavisinin A549 ve H1299 3B Organotipik Tümör Modellerinde Sebep Olduğu Hücre Ölümü Modunun Üçlü Floresan Boyama ile Belirlenmesi

3B organotipik tümör modellerinin 48 saat ilaç tedavilerinin ardından her iki modelde de kontrol ve Niklozamid tedavisi tek başına Annexin-V boyaması miktarı çok az görülürken, Dosetakselin tek başına 3B modeli dağıtarak Anexin-V pozitif sonuç verdiği ve akabinde Niklozamid-Dosetaksel kombinasyonunda yüksek miktarda Annexin-V ve Propidyum iyodür boyamalarında artış olduğu gözlemlendi. Tümör modellerinin merkezlerinde görülen PI pozitif bölgeler herbir modelde korlarda nekrotik zonların oluştuğunu göstermektedir. İkili kombinasyonun etkin bir şekilde tümör yapısını dağıttığı

ve proliferatif zonda bulunan hücrelerin etrafa saçılarak apoptotik yolak aracılı öldükleri görülmüştür (Şekil 4.40 ve Şekil 4.41).



Şekil 4.40 A549 3B organotipik akciğer tümör modelinde Niklozamid (0,625µM), Dosetaksel (14µM) ve ikili kombinasyonunun 48 Sa tedavisi sonrasında faz ve floresan mikroskopu görüntüleri. Hoechst 33342 (mavi), Annexin-V-FITC (yeşil) ve PI (kırmızı). Büyütme 200X.

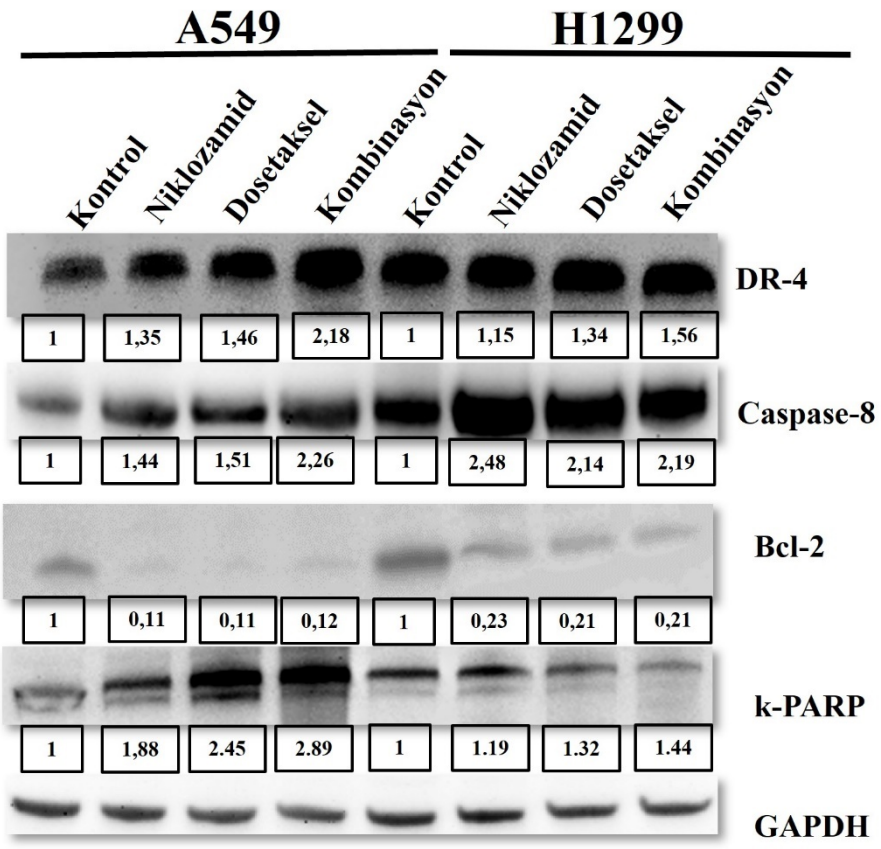


Şekil 4.41 H1299 3B organotipik akciğer tümör modelinde Niklozamid (0,625µM), Dosetaksel (14µM) ve ikili kombinasyonunun 48Sa tedavisi sonrasında faz ve floresan mikroskopu görüntüleri. Hoechst 33342 (mavi), Annexin-V-FITC (yeşil) ve PI (kırmızı). Büyütme 200X.

4.12 Niklozamid ve Dosetaksel Kombinasyon Tedavisinin A549 ve H1299 3B Organotipik Tümör Modellerinde Hücre Ölüm Markırlarının Western Blot Analizi İle Belirlenmesi

Western blot analizi sonuçlarına göre, her iki akciğer hücre soyuyla gerçekleştirilen 3B organotipik tümör modellerinde, Niklozamid, Dosetaksel ve ikili kombinasyonu (Niklozamid 0,625µM ve Dosetaksel 14µM) ile 72 Sa'lık tedavinin ardından apoptotik ölüm yolağı protein markırlarının ekspresyon seviyelerinde artışlar gözlemlendi. Özellikle, kırılmış-PARP ifadesinde A549 modelinde Niklozamid ve Dosetaksel'in tek başına uygulanmasında artış gözlemlenirken, ikili kombinasyon tedavisinde daha belirgin bir artış saptandı. H1299 modelinde ise total PARP ifadesinde tedaviye bağlı bir düşüş gözlendi, ayrıca kırılmış-PARP ifadesinde Dosetaksel tek başına ve kombinasyon tedavisinde artış kaydedildi.

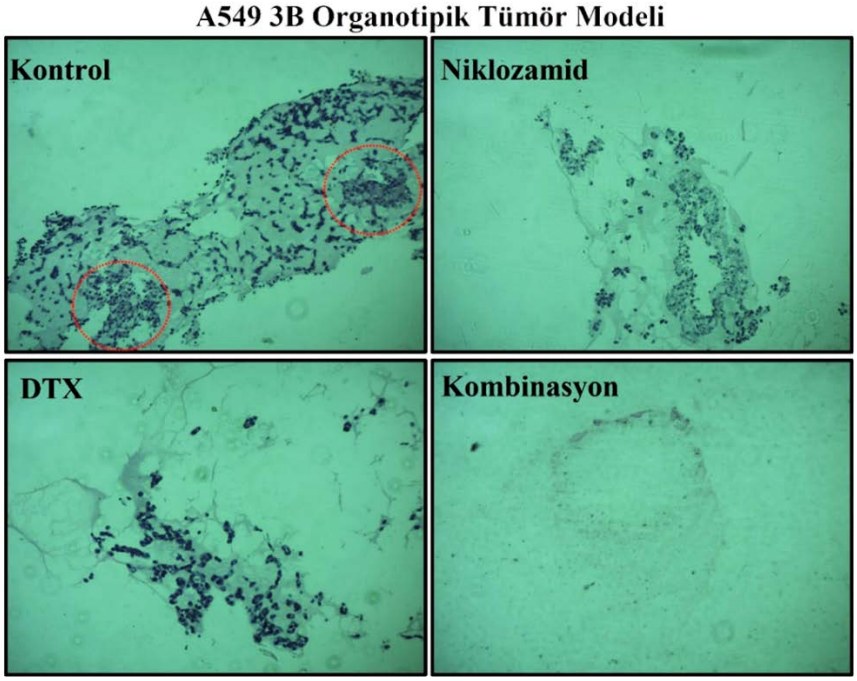
Ayrıca, ölüm reseptörlerinden DR-4'ün ekspresyon seviyelerinde A549 modelinde tedaviye bağlı bir artış saptanırken, H1299 modelinde belirgin bir farklılık gözlenmedi. Bcl-2 protein ekspresyon seviyelerinin her iki modelde de tedavi ile azaldığı gözlendi. Başlangıç kaspazlarından kaspaz-8'in her iki modelde de artışa sebep olduğu belirlendi (Şekil 4.42). Alınan bu sonuçlara dayanarak 3B organotipik tümör modellerinde Niklozamid-Dosetaksel kombinasyon tedavisine bağlı olarak hücrelerde DR-4 ekspresyonu artarak kaspaz-8 aracılı dışsal apoptozun tetiklendiği görüldü. Bu durumu takiben özellikle A549 organotipik tümör modellerinde kırılmış PARP seviyelerinde artışlar olduğu tespit edildi. Yine içsel apoptoz belirteçlerinden Bcl-2 ekspresyonunda kontrole kıyasla hem Niklozamid hem Dosetaksel hem de kombinasyon tedavilerinde her iki hücre soyunda da düşüşler olduğu görüldü. Western blot sonuçları ile oluşturulmuş olası sinyal mekanizmasının Şekil 4.43'de verilmiştir.



Şekil 4.42 A549 ve H1299 3B Organotipik tümör modellerinde Niklozamid (0,625µM), Dosetaksel (14µM) ve ikili kombinasyonunun apoptotik sinyal yolağı proteinlerinin ekspresyonu üzerindeki etkisinin western blot analizi sonuçları.

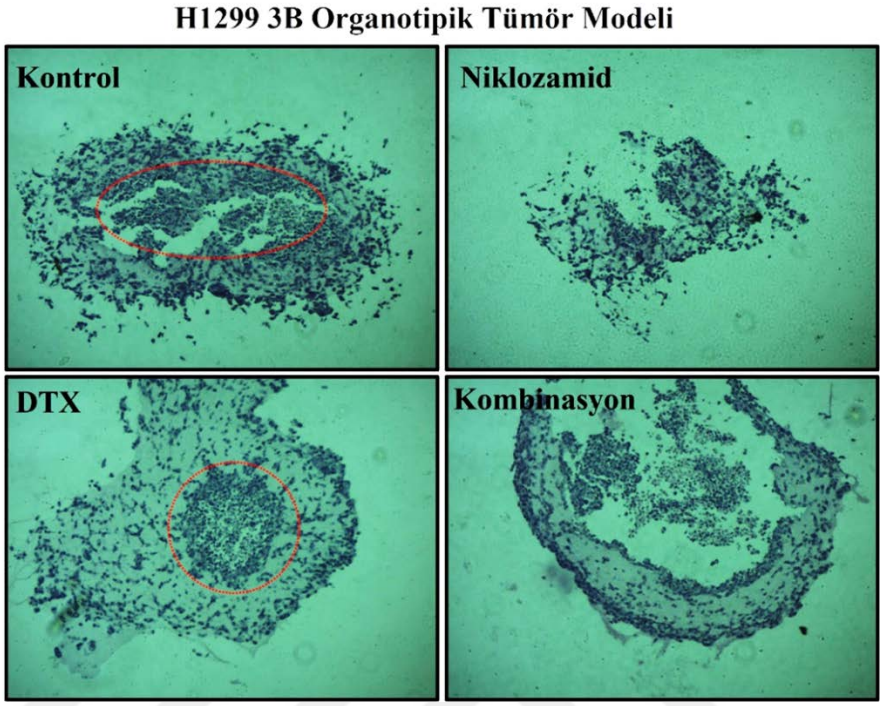
4.13 Niklozamid, Dosetaksel ve İkili Kombinasyon Tedavisinin A549 ve H1299 3B Organotipik Tümör Modellerinde Sferoid Yapısına Etkisinin Hematoksilen ve Eozin Boyaması ile Belirlenmesi

Tümör modellerinde oluşan alanların yerlerini belirlemek ve ilaç tedavisinin ardından bu bölgelerdeki morfolojik değişiklikleri değerlendirebilmek için hematoksilen ve eozin histolojik boyaması gerçekleştirildi. A549 ve H1299 organotipik tümör modelleri 72 saat Dosetaksel, Niklozamid ve ikili kombinasyonu tedavisi ardından doku takibine alındı ve ardından örneklerden 4µm'lik kesitler alınarak hematoksilen ve eozin boyamaları gerçekleştirildi. Bu boyamaların ardından her iki tümör modelinde tedavi görmemiş modellerde kuramsal olarak ifade edilen kor bölgedeki nekrotik (kırmızı noktalı daire ile gösterilmiş) ve proliferatif (kenarlara yakın bölgeler) zonlar gözlemlendi (Şekil 4.43 ve Şekil 4.44). İlaçlarla tedaviler sonucunda özellikle A549 tümör modellerde yapısal bozulmalar tespit edildi. Özellikle A549 tümör modelinde kombinasyon tedavisi sonrasında modelin intakt yapısının tamamen bozulduğu görüldü (Şekil 4.43). H1299 tümör modelinde tedavi sonrası yapısal bozulmalar gözlemlendi; ancak A549 tümör modeli ile karşılaştırıldığında, üç boyutlu yapısal bütünlüğün daha fazla korunduğu tespit edildi (Şekil 4.44).



Şekil 4. 43 A549 akciğer organotipik tümör modellerinin 72 Sa Niklozamid, Dosetaksel (DTX) ve kombinasyon tedavileri ardından hematoksilen ve eozin boyamaları mikroskop

görüntüleri(100X). Kırmızı noktalı dairelerle işaretlenmiş alanlar tümör modellerindeki nekrotik merkezleri göstermektedir

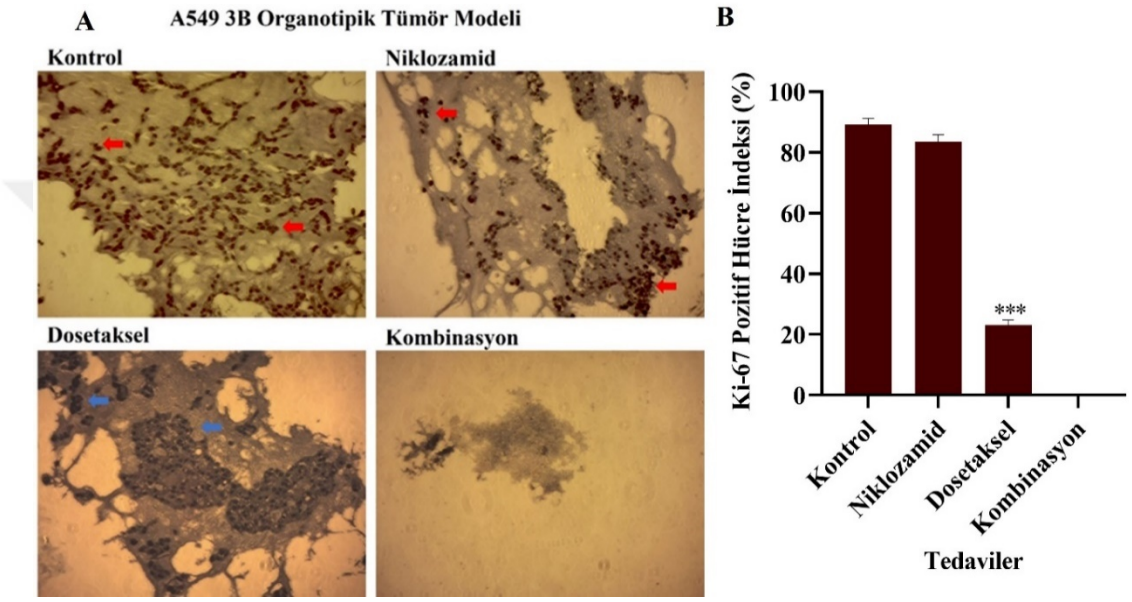


Şekil 4. 44 H1299 akciğer organotipik tümör modellerinin 72 Sa Niklozamid, Dosetaksel (DTX) ve kombinasyon tedavileri ardından hematoksilen ve eozin boyamaları görüntüleri(100X). Kırmızı noktalı daire ve ovallerle işaretlenmiş alanlar tümör modellerindeki nekrotik merkezleri göstermektedir

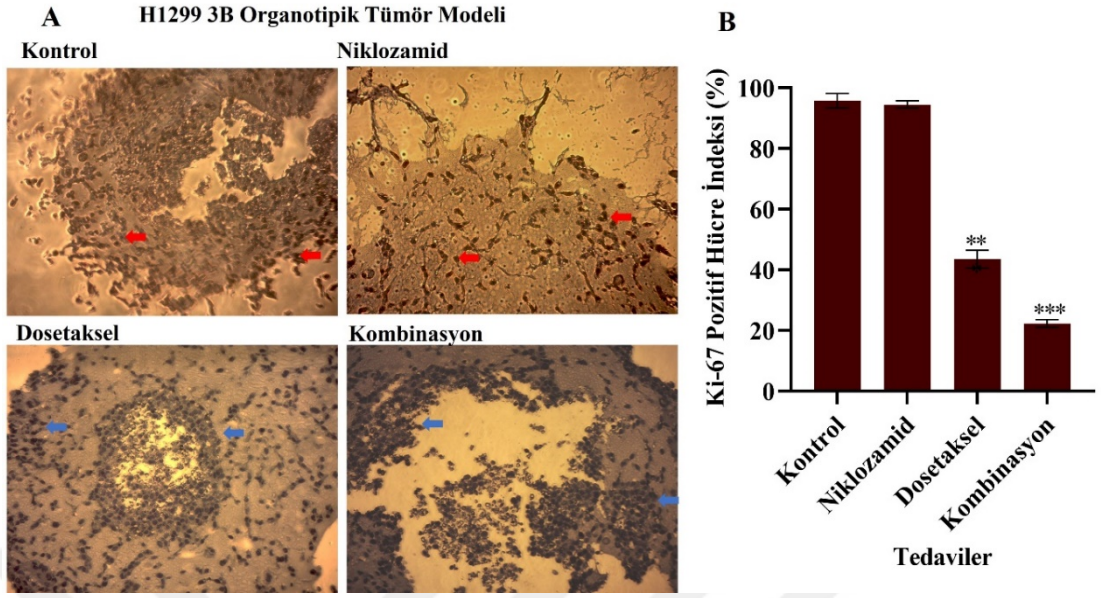
4.14 Niklozamid ve Dosetaksel Kombinasyon Tedavisinin A549 ve H1299 3B Organotipik Tümör Modellerinde Sferoid Yapısına Etkisinin Ki-67 İmmünositokimya İle Belirlenmesi

Daha sonra oluşturulan organotipik tümör modellerinde zonlarda ilaç tedavisi sonrasında daha önce H&E boyaması ile tespit edilen zonlarda canlılık durumunu tespit edebilmek için Ki-67 immünositokimya boyaması gerçekleştirildi. 3B tümör modelleri 72 Sa'lık Niklozamid, Dosetaksel ve kombinasyonu ile inkübe edildi ve ardından modeller doku takibi, kesit alma, deparafinizasyon ve immütositokimya aşamalarından geçirildi. A549 tümör modelinde tedavi görmemiş ve sadece Niklozamid ile tedavi görmüş gruplarda Ki-67 (proliferatif belirteç) pozitif sonuç verirken, sadece Dosetakselle tedavi görmüş veya kombinasyon tedavisi almış modellerde Ki-67 boyaması saptanamadı (Şekil 4.45). Daha önce de H&E boyamasında olduğu gibi kombinasyon gruplarında tamamen dağılmalar gözlemlendi. Aynı şekilde H1299 tümör modellerinde Ki-67 pozitif hücreler tedavi

görmemiş negatif kontrol ve sadece Niklozamid tedavisi almış gruplarda özellikle kenar bölgelerde pozitif sonuçlar verdi. H1299 tümör modellerinde nekrotik korda Ki-67 boyaması gözlenmedi. Dosetaksel ve kombinasyon tedavisi almış gruplar da proliferatif bölgelerde de Ki-67 boyaması gözlenmedi. Dolayısıyla hem dosetaksel hem de kombinasyon tedavisinin bu modellerde etkili bir şekilde hücre proliferasyonunu inhibe ettiği görüldü (Şekil 4.46).



Şekil 4. 45 A549 Akciğer Organotipik Tümör modellerinin 72 Sa Niklozamid, Dosetaksel (DTX) ve Kombinasyon tedavileri ardından Ki-67 Boyaması Görüntüleri (20X) **(A).** Kırmızı oklar Ki-67 pozitif hücreleri (kahverengi) gösterirken mavi oklar Ki-67 negatif hücrelerden örnekler göstermektedir. A549 3B organotipik tümör modellerinde Ki-67 pozitif hücre indeksi grafiği **(B)**

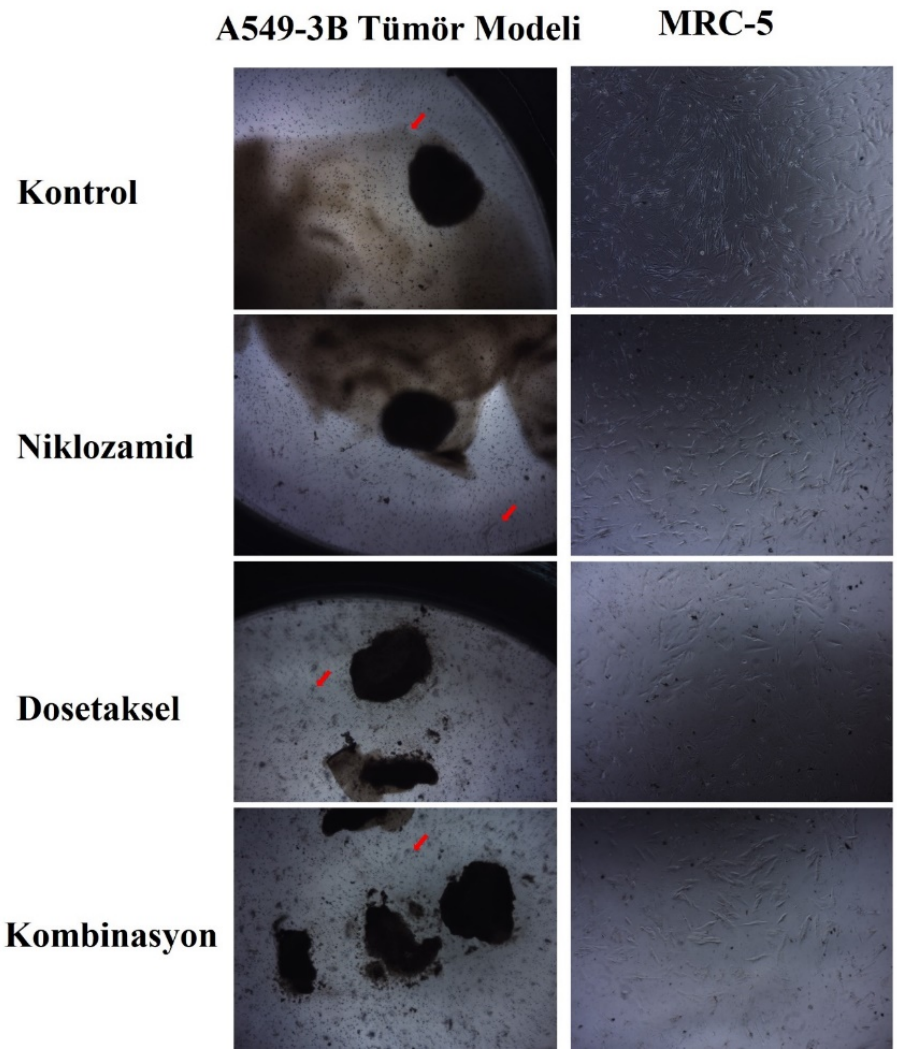


Şekil 4.46 H1299 Akciğer Organotipik Tümör modellerinin 72 Sa Niklozamid, Dosetaksel (DTX) ve Kombinasyon tedavileri ardından Ki-67 Boyaması Görüntüleri(20X) **(A**). Kırmızı oklar Ki-67 pozitif hücreleri (kahverengi) gösterirken mavi oklar K-67 negatif hücrelerden örnekler göstermektedir. H1299 3B organotipik tümör modellerinde Ki-67 pozitif hücre indeksi grafiği **(B).**

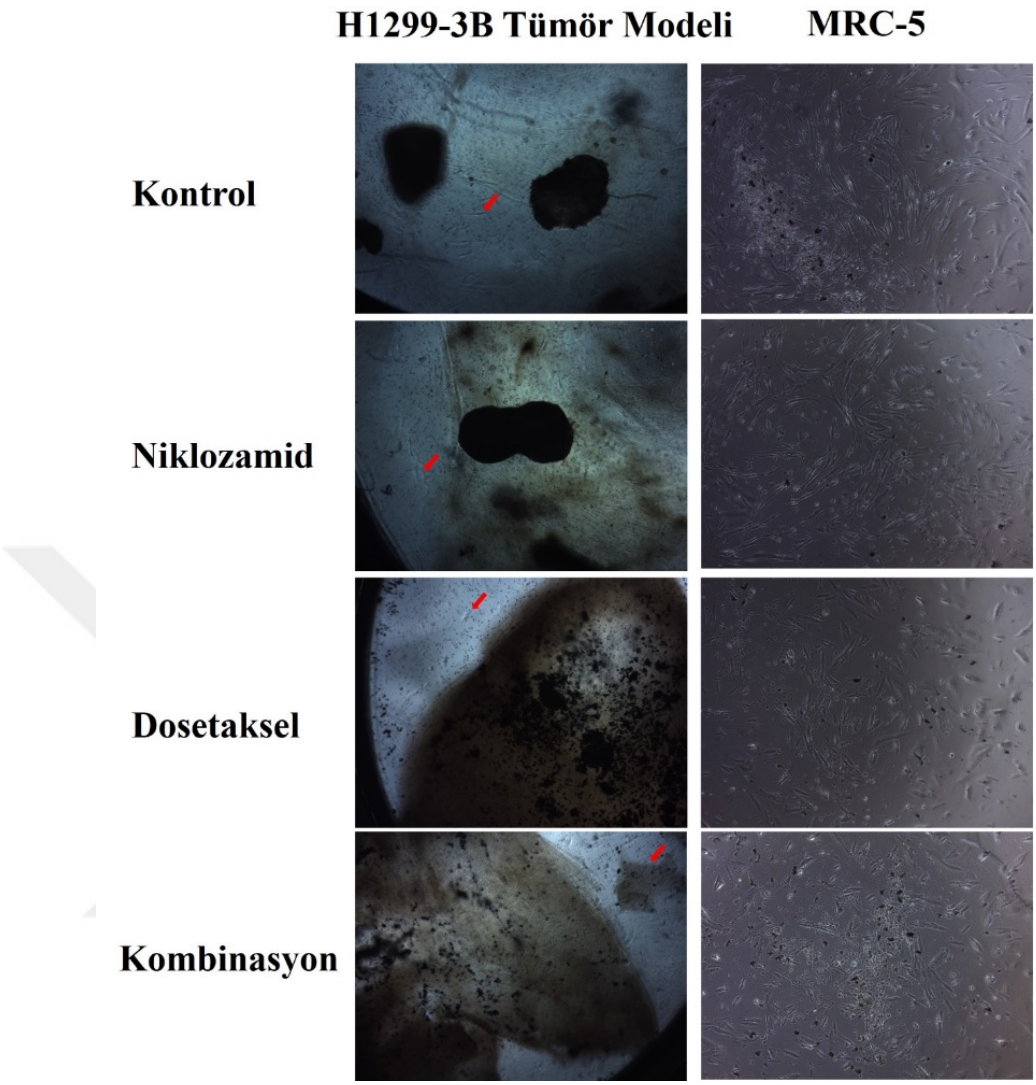
4.15 3B Organotipik Tümör Modellerinde Ko-Kültür Oluşturulması

3B organotipik tümör modellerinin ilaç yanıtlarını değerlendirmek ve *in vivo* koşullardaki tümör mikro çevresini, hücreler arasındaki etkileşimi taklit etmek amacıyla 3B organotipik tümör modelleri (üç boyutlu sıvı ortamda yüzen yapılar) ve insan sağlıklı akciğer fibroblast hücreleri MRC-5 (hücre kültür kaplarında adherent hücreler) ile Şekil 3.4'de gösterildiği gibi bir ko-kültür ortamı oluşturuldu. 3B tümör modellerinde bulunan hücreler MRC-5 sağlıklı fibroblast hücreleriyle sadece sıvı ortam aracılığı ile etkileşebildi. Ko-kültür ortamında Niklozamid, Dosetaksel ve ikili kombinasyonuna 72 saat maruz bırakılan 3B tümör modelleri ve alt kısımda adherent olarak bulunan MRC-5 hücrelerinin faz kontrast mikroskopi görüntüleri Şekil 4.47 ve Şekil 4.48'da gösterilmiştir. Hem A549 hem de H1299 tümör modellerinde ilaç tedavisine bağlı olarak yapısal bozulmalar Dosetaksel ve kombinasyon gruplarında gözlemlendi. Tümör modellerindeki hücrelerin tedavi sonrasında ölerek etrafa dağıldığı gözlemlendi. Bununla beraber ko-kültür ortamında bulunan MRC-5 hücrelerinde tedavi sonrasında morfolojik değişiklikler olduğu görüldü. Kontrol ve sadece Niklozamid ile tedavi edilmiş ko-kültür ortamında MRC-5 hücreleri fibroblast morfolojilerini (iki kutuplu uçlardan daralmış ve

uzun) korurken Dosetaksel ve kombinasyon tedavisi sonrasında MRC-5 hücrelerinin bu morfolojilerini kaybedip epitelyal benzeri (çokgen şekilli ve daha düzenli) bir morfolojiye sahip oldukları gözlemlendi. Ayrıca tedavi görmüş yada görmemiş her iki tümör modeliyle ko-kültür ortamında bulunmuş MRC-5 hücrelerinde büyüme ortamına bırakılmış atık/hücresel ürünler olduğu gözlemlendi.



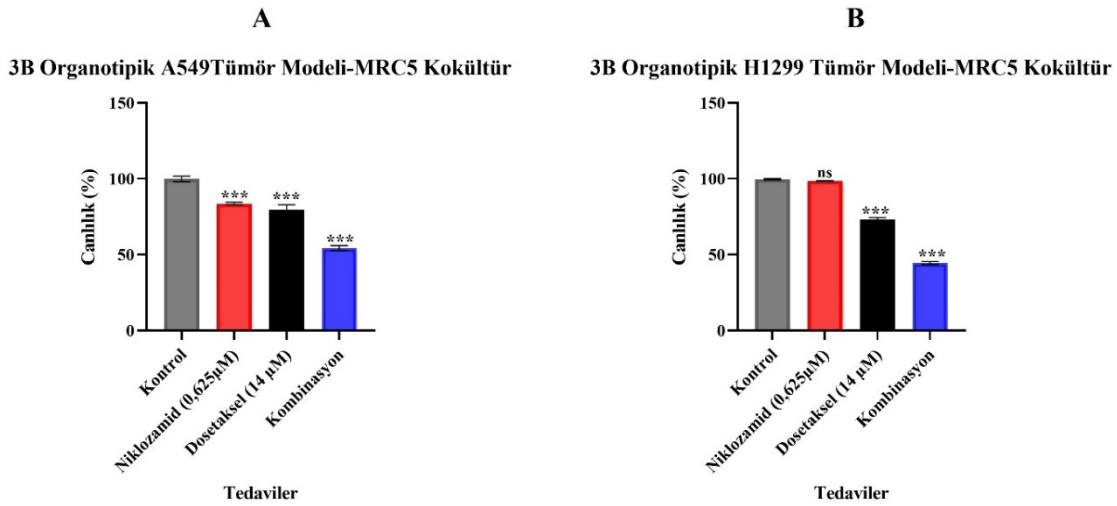
Şekil 4.47 A549 3B tümör modelleri ve MRC-5 hücreleriyle oluşturulan ko-kültür ortamında 72 Sa Niklozamid (0,625µM), Dosetaksel (14µM) ve ikili kombinasyon tedavisi sonucundaki faz konstrast mikroskobu görüntüleri. Kırmızı oklar alt alandaki MRC-5 hücrelerini göstermektedir. Büyütme 40X.



Şekil 4.48 H1299 3B tümör modelleri ve MRC-5 hücreleriyle oluşturulan kokültür ortamında 72 Sa Niklozamid (0,625µM), Dosetaksel (14µM) ve ikili kombinasyon tedavisi sonucundaki faz konstrast mikroskobu görüntüleri. Kırmızı oklar alt alandaki MRC-5 hücrelerini göstermektedir. Büyütme 40X.

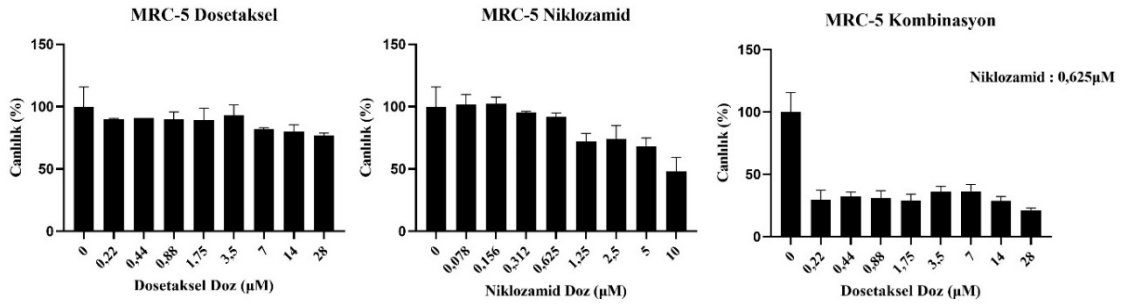
Tedavi süresinin ardından 3B modeller ve MRC-5 hücreleri ko-kültür ortamından ayrıştırıldı. 3B tümör modellerde ATP hücre canlılık analizi gerçekleştirildi. Buna göre A549 tümör modellerinde hücre canlılığının Niklozamid ile tedavi sonrasında %83,6, Dosetaksel ile %79,3 ve kombinasyon tedavisi sonrasında ise %54,2 olduğu görüldü (Şekil 4.49). Bu değerler MRC-5 hücreleri ile kokültürsüz ortamda Niklozamid ile %77,4, Dosetaksel ile %72,1 ve ve kombinasyon tedavisi ile %23,7 olarak ölçülmüştü (Şekil 4.32). H1299 tümör modellerinde hücre canlılığının Niklozamid ile tedavi sonrasında %98,5, Dosetaksel ile %73,2 ve kombinasyon tedavisi sonrasında ise %44,5 olduğu

görüldü (Şekil 4.50). Bu değerler MRC-5 hücreleri ile kokültürsüz ortamda Niklozamid ile %97,6, Dosetaksel ile %67,9 ve ve kombinasyon tedavisi ile %19,1 olarak ölçülmüştü (Şekil 4.33)



Şekil 4.49 3B organotipik tümör modelleri ile MRC-5 ko-kültür ortamında 72 saat ilaç tedavileri ardından A549 (A) ve H1299 (B) organotipik tümör modellerinde hücre canlılık analizi sonuçları. Veriler ortalama ± SD (n=3), SD, standart sapma olarak sunulmuştur. *** $p<0,001$ kontrole göre istatistiksel olarak farklılık gösteren değerleri ifade etmektedir. ns istatiksel olarak farklılık bulunmayan değerleri belirtmektedir

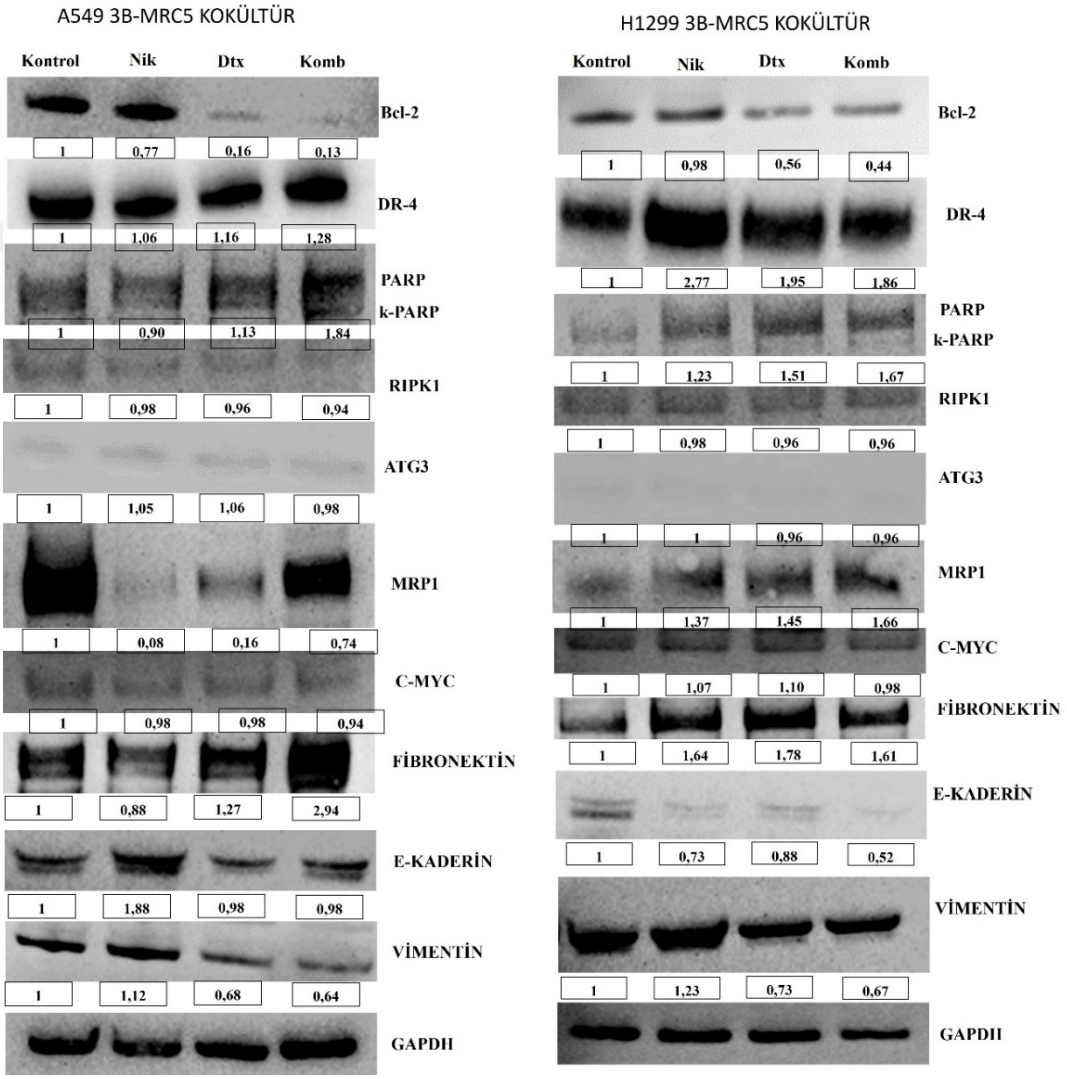
MRC-5 hücrelerinin 2B kültürde Dosetakselin (0-28µM) ve Niklozamidin (0-10µM) farklı dozları ve Dosetakselin farklı dozları ile Niklozamidin 0,625µM dozu ile yapılan kombinasyon 72 Sa tedavilerinde her iki ajanın tek başlarına tedavilerinin hücre canlılığında düşüşlere sebep olmadığı görüldü. Buna göre MRC-5 hücrelerinde Dosetakselin 3B tümör modellerinde kullanılan dozu tek başına (14µM) hücre canlılığını %80,1'e düşürürken, Niklozamidin (0,625µM) tek başına hücre canlılığını %91,7'ye düşürdüğü görüldü. Kombinasyon tedavisinin ise hücre canlılığının %26,8'e düşürdüğü görüldü (Şekil 4.50).



Şekil 4.50 MRC-5 hücrelerinin 2B kültürde Dosetaksel (0-28µM), Niklozamid (0-10µM) ve Dosetakselin farklı dozlarının (0-28µM) Niklozamidin 0,625µM dozu ile kombinasyonunun 72 Sa tedavisi sonrasında hücre canlılığına etkisi.

MRC-5 sağlıklı fibroblast hücreleri ile ko-kültür ortamının 3B tümör modellerinin protein ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisini belirleyebilmek için kokültür ortamındaki 72 Sa'lık Niklozamid Dosetaksel ve ikili kombinasyon tedavisinin ardından metod kısmında anlatıldığı şekilde 3B modeller ortamdan ayrıştırılarak total proteinler elde edildi. Ardından western blot yöntemi ile çeşitli yolaklara ait protein ekspresyonları tespit edildi (Şekil 4.51). Buna göre apoptotik yolağa ait Bcl-2 ekspresyonunun her iki tümör modelinde de Dosetaksel ve ikili kombinasyonuyla beraber azalma olduğu görüldü. Tedavi görmemiş kontrol modelinde Niklozamid ile tedavi edilmiş modelde ekspresyonun eşit oranda olduğu görüldü. DR-4 ekspresyonu A549 modelinde bir değişiklik göstermezken H1299 modelinde tedaviyle birlikte artışların olduğu görüldü. Yine apoptotik belirteçlerden PARP ve kırılmış PARP'ın özellikle A549 modelinde ikili kombinasyon tedavisinde artış gösterdiği, H1299 modelinde de her bir tedaviyle kontrole göre artışlar olduğu görüldü. Nekroptoz yolağına ait RIPK1 ve otofaji yolağına ait ATG3 seviyelerinde her iki modelde de tedavilerle beraber önemli bir değişiklik olmadığı görüldü. Çoklu ilaç direnci markırlarından MRP1 A549 modelinde sadece Niklozamid ve Dosetaksel tedavisiyle düşüşler görülürken kombinasyon tedavisinde ekspresyonun arttığı görüldü. H1299 modelinde kontrole oranla bütün tedavilerde MRP1 ekspresyonunun arttığı gözlemlendi. Adhezyon proteinlerinden Fibronektinin A549 modelinde özellikle kombinasyon tedavisinde arttığı, H1299 modelinde her bir tedaviyle beraber kontrole göre artış gösterdiği gözlemlendi. E-kaderin ekspresyonu A549 modelinde Niklozamid tedavisi ile artış gösterirken Dosetaksel ve ikili kombinasyonda kontrolle aynı oranda kaldığı, H1299 modelinde ise her bir tedaviyle beraber

ekspresyonun seviyesinde düşüşe sebep olduğu gözlemlendi. Vimentinin her iki modelde de Dosetaksel ve ikili kombinasyon tedavisiyle beraber kontrolle karşılaştırıldığında azaldığı gözlemlendi. Niklozamid tedavisinin vimentin ifadesinde bir değişikliğe neden olmadığı görüldü. Wnt sinyal yolağı proteinlerinden kaskadın en altında bulunan c-MYC proteininin ekspresyon seviyesinde tedavilerle birlikte her iki modelde de bir değişiklik olmadığı gözlemlendi.



Şekil 4.51 3B A549 ve H1299 organotipik tümör modellerinin MRC-5 sağlıklı fibroblast hücreleriyle kokültür ortamında Nik, Dtx ve ikili kombinasyonu (Komb) ile 72 Sa tedavisi sonrasındaki protein ekspresyon seviyelerinin western blot analizi sonuçları. Bantların densitometri analizi Image J programı kullanılarak yapılmıştır. Normalizasyonda GAPDH (House keeping) ekspresyonu kullanılmıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanserin ülkemizde ve dünyada artış göstermesiyle birlikte kanserin tedavisi için yapılan çalışmalarda da artış olmuştur. Birçok yeni kemoterapötik ilaç keşfi için günümüzde binlerce laboratuvar çalışmalarını sürdürse de çoğu zaman preklinik çalışmalar klinikte maalesef ki karşılığını bulamamaktadır. Bu durum çoğunlukla preklinik çalışmalarda etkin görülen aday moleküllerin *in vivo* koşullarda aynı etkinliği gösterememesinden kaynaklanmaktadır (Feng vd., 2021). Bu sebeple preklinik çalışmalarla klinik kullanım arasında ara bir basamak olabilecek ve *in vivo* çalışmalarla hayvan israfını ortadan kaldıracak üç boyutlu hücre kültürü modellerine ihtiyaç vardır. Bu tez çalışmasında akciğer kanserinde yeni bir 3B organotipik tümör modeli geliştirilmiş, ilaç yeniden konumlandırılması stratejisi kullanılarak FDA onayı almış Niklozamid ve klinikte akciğer kanseri tedavisinde kullanılan Dosetaksel ile kombinasyon çalışmaları yapılarak ilaç yanıtları moleküler düzeyde değerlendirilmiştir.

İlaç keşiflerinde onlarca yıldır 2B hücre kültürüne dayalı analizler kullanılmaktadır. Ancak dokuya özgü mimarinin kaybedilmesi, mekanik ve biyokimyasal farklılıklar, hücre heterojenliği, besin gradyanı ve hücre-hücre, hücre ekstrasellüler matris etkileşimlerinin iki boyutlu hücre kültüründe görülmemesi sebebiyle özellikle kanser gibi kompleks hastalıklarda zayıf modeller olduklarını göstermiştir (Fang ve Eglen, 2017; Huang ve Gao, 2018). Örneğin; HCT-116 kolon kanseri hücrelerinin iki boyutlu hücre kültürü ve üç boyutlu hücre kültüründe Melfalan, 5-Florourasil, oksaliplatin ve irinotekan3 gibi anti-kanser ilaçlarla tedavisinin sonuçları karşılaştırıldığında bu hücrelerin üç boyutlu kültürde ilaçlara karşı direnç (kemorezistans) gösterdiği görülmüştür, benzer sonuçlar *in vivo* da da alınmıştır (Karlsson vd., 2012). Bu ve benzeri çalışmalarla görülmüştür ki iki boyutlu hücre kültürü tümör mikro çevresini replike edememektedir (Kunz-Schughart vd., 2004). Üç boyutlu hücre kültürleri *in vivo* koşulları daha iyi replike etmesi sebebiyle ilaç araştırmalarında ilaç keşif süreci ve sonrası için büyük potansiyele sahiptir (Brajša vd., 2016).

Tez çalışmamızda A549 ve H1299 akciğer kanser hücre soylarını kullanarak tümör mekanizmasını daha iyi anlayabilmek için asılı damla ve matrigele gömme kombine teknikleri kullanılarak üç boyutlu tümör modelleri oluşturuldu. Literatürde asılı damla

tekniği birçok çalışmada sfer oluşumu için kullanılsa da tez çalışmamızda ilk defa sferler oluşturulduktan sonra yapılar matrigel içine gömülerek 3B morfoloji korunmuş ve tümörün *in vivo* daki ortamı *in vitro* da taklit edilmiştir. Karakterizasyonu gerçekleştirilen A549 ve H1299 3B organotipik modellerinde antihelmintik bir ajan olan Niklozamid ve klinikte akciğer kanserinde sıklıkla kullanılan Dosetaksel ve ikili kombinasyonunun öncelikle oluşturulan 3B tümör modellerindeki hücre canlılığına etkisi araştırıldı. Niklozamid ve Dosetaksel kombinasyonunun ilk defa akciğer kanserindeki ilaç yanıtının araştırılması bu tez çalışmasının bir diğer özgünlüğünü oluşturmaktadır. Niklozamid antihelmintik adı verilen bir ilaç ailesine ait olan insan tenyası enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan ve bu etkisi ile FDA 'Food and Drug Admistration' onayı almış bir ilaçtır (Pearson ve Hewlett, 1985). Niklozamid temas halinde tenyaları öldürerek çalışır. Bu etkisini de mitokondride oksidatif fosforilasyonu inhibe ederek gösterir. Bu sayede enerjisiz kalan parazitler dejenere olarak ölürler (Weinbach ve Garbus, 1969). Bununla beraber son yıllarda yapılan çalışmalarda Niklozamidin potansiyel bir anti-kanser ilaç olma özelliği ön plana çıkmıştır (Pan vd., 2012). Niklozamidin anti-kanser özelliğinin birçok hücre içi sinyal yolağında STAT3'ü fosforile etmesi ve böylece nükleer translokasyonunu inhibe etmesi ile gerçekleştiği bildirilmiştir (Ren vd., 2010). Wnt/ β-Katenin, mTORC1, NF-κB ve Notch sinyal yolaklarının inhibisyonunda da rol oynayan önemli bir ajandır (Fonseca vd., 2012; Huang vd., 2009; Pan vd., 2012; Suliman vd., 2016). Ayrıca kanser hücrelerinde mitokondriyi hedefleyerek hücre siklusu tutuklanmasına, büyüme inhibisyonuna ve apoptoza sebep olduğu çeşitli çalışmalarla bildirilmiştir. KHDAK ve baş-boyun kanseri hücrelerinde erlotinible sinerjistik bir etki gösterip EGFR ve STAT3 inhibisyonunu gerçekleştirerek apoptoza sebep olduğu gösterilmiştir (Li, vd., 2013a; Li, vd., 2013b). Ayrıca KHDAK hücre soyları ve fare modellerinde yapılan başka bir çalışmada Niklozamidin PD-1/PD-L1 immün kontrol noktası blokajının etkinliğini artırdığı, hem konsantrasyona hem de zamana bağlı olarak PD-L1 ifadesini azalttığı ve bu durumun PD-L1'in promotörüne p-STAT3 bağlanmasının engellenmesiyle ilişkilendirdiği ifade edilmiştir (Luo vd., 2019). Ayrıca pankreas kanserinde Niklozamidin Gemsitabin ile kombinasyonu ile yapılan bir çalışmada, kombinasyon tedavisinin hücre proliferasyonunu Wnt/β-katenin/c-Myc sinyal yolakları aracılığıyla β-katenin ubiquitinasyonunu indükleyerek inhibe ettiği ifade edilmiştir (Kang vd., 2023). Ancak tez çalışmamızda Niklozamidin Gemsitabin ile yapılan

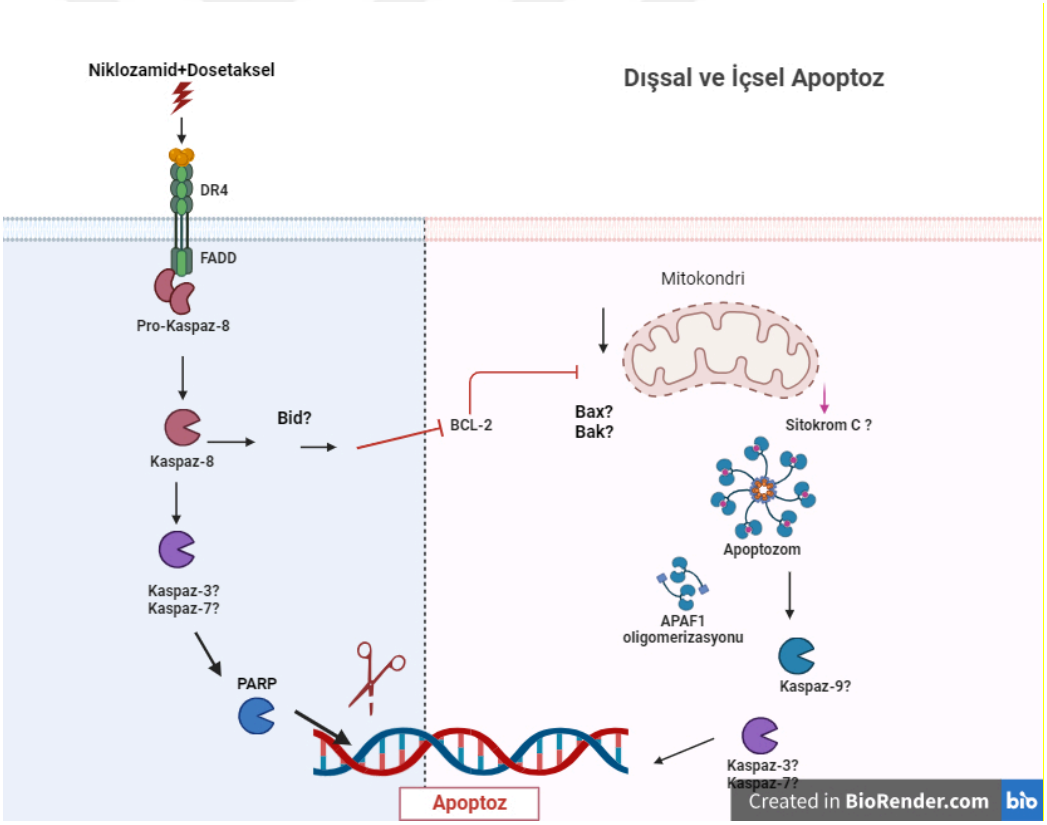
kombinasyonunda Gemsitabinin kendi başına etkisinden farklı bir etkinin olduğunu görmedik (Şekil 4.13). Bu durumun farklı kanser tiplerinden kaynaklı bir durum olabileceğini düşünmekteyiz.

Dosetaksel, klinikte sıklıkla kullanılan taksan sınıfına ait bir kemoterapötik ajandır ve akciğer kanseri gibi birçok solid tümörün tedavisinde kullanılır (Davies vd., 2003). KHDAK tedavisinde de önemli bir rol oynamaktadır. Dosetaksel, akciğer kanseri tedavisinde genellikle platin bazlı kemoterapi rejimlerinin bir parçası olarak kullanılır. Platin bazlı rejimler genellikle platinyum bileşiği (örneğin, Cisplatin veya karboplatin) ile birlikte Dosetaksel veya başka bir taksan türevi içerir. Bu kombinasyonlar, genellikle ileri evre KHDAK tedavisinde kullanılır (Schiller vd., 2002). Birçok klinik çalışma da, Dosetaksel kombinasyonlarının KHDAK'ın ilk tedavisinde veya ikinci satır tedavi olarak etkili olduğunu göstermiştir. Örneğin, birçok çalışma, Dosetaksel ve platin bazlı rejimlerin, KHDAK'ın yanıt oranını artırdığını ve hastaların sağkalım süresini uzattığını göstermiştir. Dosetaksel, KHDAK'ın tedavisinde yaygın olarak kullanılan diğer kemoterapötik ajanlarla da kombine edilebilir. Örneğin, platin bazlı rejimlerin yanı sıra, Dosetaksel genellikle diğer ajanlarla da (örneğin, gemsitabin veya vinorelbin gibi) bir araya getirilir (Fossella vd., 2000). Aromatik bir bitki olan *Mentha longifolia L.* özütü ve Dosetaksel ile yapılan bir kombinasyon çalışmasında kombinasyonun Dosetakselin etkinliğini arttırarak kolon kanserinde ilaç direncinin ortadan kaldırıldığı ifade edilmiştir (Ahmedli vd., 2024).

Tez çalışmamızda Dosetaksel Niklozamid ile kombine tedavisi ilk defa çalışılmıştır. Bu anlamda alınan sonuçlar literatürde bir ilk teşkil etmektedir. Ayrıca alınan sonuçlarda 2B ve 3B kültürlerde Niklozamid ve Dosetaksel kombinasyonunun ilaç yanıtı karşılaştırıldığında 2B kültürlerde aynı dozda (Niklozamidin 0,625 µM ve Dosetakselin 0,44 µM) daha etkili olduğu ve ilaç yanıtının yapının karmaşıklığı arttıkça daha da düştüğü görülmektedir (Şekil 4.23, Şekil 4.32 ve Şekil 4.33). Niklozamid ve Dosetaksel ikili kombinasyonu ile yapılan benzer bir çalışma olmamakla birlikte sferoidler gibi üç boyutlu hücre kültürlerinde ilaç etkileşiminin iki boyutlu hücre kültürüne göre çok daha zor olup ilaç dozu ve etkinliğinin canlılığı önemli ölçüde değiştirdiğini göstermektedir (Bromma vd., 2023).

Niklozamid ve Dosetaksel kombinasyonun hem 2B kültürde hem de 3B organotipik tümör modellerinde hücreleri apoptozis ölüm yolağını kullanarak öldürdüğü üçlü floresan boyamalar ile tayin edilmiştir. Yapılan farklı çalışmalarda da akciğer kanser hücrelerinde ayrı ayrı Dosetaksele (Zhang vd., 2010) ve Niklozamide (Akgun vd., 2019) bağlı apoptoz indüklendiği gösterilmiştir. Yine farklı bir çalışmada Cisplatine dirençli A549 akciğer kanser hücrelerinde (A549/DDP) Niklozamidin apoptoz üzerindeki etkisi, Annexin V-FITC/Propidyum iyodür testi ile araştırılmış (Zuo vd., 2018) ve tez çalışmamızda bulduğumuz şekilde bu ajanların hücreleri çeşitli kanser tiplerinde apoptoz aracılı ölüme götürdüğü görülmüştür.

Tez çalışmamızda Niklozamid Dosetaksel kombinasyonunun akciğer 3B tümör modellerindeki olası moleküler mekanizması western blot bulgularımız ile oluşturulmuş Şekil 5.1 ile ifade edilmiştir.



Şekil 5. 1 3B organotipik tümör modellerinde Niklozamid Dosetaksel ikili kombinasyonu sonucu western blot analizleri ile elde edilmiş sonuçların olası sinyal mekanizmasının gösterilmesi. Şekil BioRender.com kullanılarak çizilmiştir

Çalışmamızda her iki model de gerçekleştirilen western blot analizlerinde Bcl-2 ekspresyonunun Dosetaksel ve kombinasyon tedavisinde düşüşü hücre ölümlerinin apoptozla gerçekleştiğini göstermektedir. KHDAK'da Bcl-2 ekspresyonunun önemli bir prognostik belirteç olduğunu bilinmektedir. Bcl-2, hücre apoptozunu inhibe eden bir protein olup, kanser hücrelerinin apoptozu önleyerek tümörlerin büyümesini ve yayılmasını teşvik edebilir. Bu bağlamda, yüksek düzeyde Bcl-2 ekspresyonu, farklı kanser tiplerinde de tedavi direnci ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Ogura vd., 2016). Dosetaksel gibi taksan türevleri, mitotik aracılı apoptozu indükleyerek hücre ölümünü teşvik ederken, aynı zamanda Bcl-2 ekspresyonunu da düşürebilir.

Çalışmamızda özellikle A549 3B tümör modelinde kombinasyon tedavisindeki kırılmış PARP, kaspaz-8 ve DR-4 ekspresyonundaki artışlar ve Bcl-2 ekspresyonundaki azalma yine hücre ölümünün apoptozla gerçekleştiğini göstermektedir. PARP kırılması ve DR-4 ekspresyonu, hücrelerde apoptozun (programlı hücre ölümü) düzenlenmesinde kritik bir rol oynar. Kırılmış PARP, DNA hasarı ve hücre stresi gibi olaylara yanıt olarak ortaya çıkar ve apoptotik yolları başlatır. Özellikle, PARP kırılması, hücrelerin onarım kapasitesinin aşılması durumunda apoptotik sinyal yolaklarını aktive eder, böylece hücrenin kontrollü bir şekilde ölmesini sağlar (Ichite vd., 2009). Öte yandan, DR-4 ekspresyonu, apoptozun başlatılmasında etkilidir çünkü bu reseptör, ölüm sinyallerini algılar ve apoptotik sinyal yolaklarını tetikler. DR-4, özellikle dışsal sinyal molekülleri (örneğin, TNF-alfa) tarafından aktive edilir ve bu, hücrenin apoptozu başlatmasına neden olabilir (Hasan vd., 2023).

Tez çalışmamızın sonraki aşamasında Niklozamid Dosetaksel ve ikili kombinasyonuna maruz bırakılan 3B tümör modelleri ardından doku takibi yapılarak hematoksilen ve eozin boyası ile boyanmıştır. Alınan sonuçlar göstermiştir ki her iki tümör modelinde de birçok çalışmada da gösterilen merkezdeki nekrotik kor zonu oluşmakta (Gebhard vd., 2016; Oh vd., 2022) ve yapının kenarlarına doğru daha aktif olan proliferatif bölgelerdeki hücreler tedavi sonrası ölerek dağılmaktadır.

Tedavi görmüş ve görmemiş 3B tümör modellerinde proliferatif (canlı) hücrelerin varlığını tayin etmek için Ki-67 immünositokimya boyaması gerçekleştirildi. Kontrol ve Niklozamid tedavisi almış tümör modellerinde Ki-67 ekspresyonu her iki modelde de

tayin edilirken, Dosetaksel tek başına tedavisinde oldukça azaldığı ve ikili kombinasyon tedavisi görmüş modellerde Ki-67 ekpresyonunun olmadığı görüldü. Bu da özellikle ikili kombinasyonun tümör modellerinde etkili olduğunu bir kez daha göstermektedir. Yüksek bir Ki-67 oranı, kanser hücrelerinin hızlı bölünmesi ve yayılmasıyla ilişkilendirilir ve daha agresif bir kanser türünü gösterir (Nicholson vd., 2022). Birçok KHDAK çalışmasında Ki-67 ekspresyonu hücre proliferasyonunu tayin etmek için kullanılmıştır (Peng vd., 2022).

Çalışmamızın bir sonraki aşamasında 3B tümör modelleri sağlıklı akciğer fibroblast hücreleri MRC-5'ler ile ko-kültüre edildi. Akciğer 3B tümör modellerinin tek başına kombinasyon tedavisinin, oluşturduğumuz ko-kültürlerde aynı dozlardaki kombinasyon tedavisinden daha etkili olduğu tespit edildi (Şekil 4.32 ve Şekil 4.49). Kokültür ortamında uygulanan tedaviye karşı hücre canlılığındaki bu artış ko-kültür ortamında diğer hücreler ile etkileşimin (cross-talk) kanser hücrelerinin ilaca verdiği yanıtı değiştirebileceğini ve hücreleri ilaç tedavisine karşı daha dirençli yapabileceğini göstermektedir. Dolayısıyla ilaçların klinik kullanımlarda neden *in vitro* da etkili olduğu kadar etkili olmadığını gösterebilmektedir. Başka bir çalışmada A549 ve Colo699 akciğer karsinoma hücre soyları SV-80 fibroblast hücreleri ile ko-kültüre edilerek sferoid 3B hücre kültürleri oluşturulmuş ve tümör-stroma etkileşimi araştırılmıştır. Bizim elde ettiğimiz bulgulara benzer bir şekilde A549 hücrelerinin SV-80 fibroblastlarıyla ko-kültüründe hücre canlılığının arttığını ifade etmişlerdir (Amann vd., 2014).

Ko-kültür ortamında Niklozamid, Dosetaksel ve ikili kombinasyonuna maruz kalan 3B tümör modellerinden total proteinler elde edilerek ölüm yolaklarına ait proteinlerin ve hücre adhezyon proteinlerinin ekspresyon seviyelerine bakıldı. Kokültür ortamında ilaç tedavisi almış tümör modellerinde apoptotik yolağın aktif olduğu tespit edildi. Ancak apoptotik yolak her nekadar aktif olsa da canlılıkta artış olması sonucu ko-kültür ortamında sağlıklı MRC-5 akciğer fibroblast hücrelerinin olmasının ilaç etkisini azaltıyor olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim benzer çalışmalar da da ko-kültür ortamının kanser hücrelerini desteklediği gösterilmiştir (Orimo ve Weinberg, 2006).

Çalışmamızda Vimentin seviyeleri her iki modelde de Dosetaksel ve kombinasyon tedavisi ardından düşüş göstermiştir. Vimentin kanser metastazında aktif rol alan bir proteindir. Yapılan bir çalışmada Vimentin enjeksiyonu veya Vimentin cDNA transfeksiyonu sonrasında, epitelyal hücreler hızla mezenkimal morfolojiye geçerek desmozomal bağlantı kayıpları göstermişler ve böylece hücre hareketliliğinde ve odak adhezyon dinamiğinde önemli bir artış göstermişlerdir (Mendez vd., 2010) . Vimentin, bir ara filaman proteinidir ve hücre iskeletinin bir bileşenidir. Normalde, vimentin hücrelerin yapısal bütünlüğünü sağlar ve hücrelerin şekil değiştirmesine ve hareket etmesine yardımcı olur. Dosetaksel ve kombinasyon tedavisindeki Vimentin ekspresyonundaki düşüş hücrelerin yapısal bütünlüğünün bozulduğunu ve her iki hücre soyunda tedavi sonrası Falloidin boyamasında da gördüğümüz hücre iskeletinin tamamen bozulmasını açıklamaktadır (Şekil 4.30 ve Şekil 4.31). Birçok kanser türünde vimentin ekspresyonu artar ve bu, invaziv özellikler ve metastazın gelişiminde rol oynayabilir (Pandita vd., 2021). Vimentin ayrıca hücre ölümü süreci olan apoptozu da etkileyebilir. Bazı çalışmalar, yüksek düzeyde vimentin ekspresyonunun apoptozun inhibe edilmesiyle ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu durumda, vimentin, hücrelerin apoptozu başlatma yeteneğini azaltabilir ve kanser hücrelerinin hayatta kalmasına katkıda bulunabilir. Dolayısıyla tez çalışmamızda 3B tümör modellerinde kombinasyon tedavisi sonrasındaki düşük Vimentin ekspresyonu apoptozun indüklendiğini ifade etmektedir.

Her iki tümör modelin de de tedavilerle birlikte fibronektin seviyelerinde artış gözlendi. Fibronektin, ekstraselüler matriksin (ECM) önemli bir bileşeni olan bir glikoprotein türüdür. Bazı çalışmalar da fibronektin ekspresyonunun apoptozu teşvik edebileceğini göstermektedir. Özellikle, fibronektin parçalarının, hücrelerde programlı hücre ölümü sinyal yollarını aktive edebileceği ve hücre ölümünü tetikleyebileceği öne sürülmüştür (Dai vd., 2005). Bu bağlamda, 3B tümör modellerinde uygulanan kombinasyon tedavisinin yol açtığı apoptotik hücre ölüm sürecinde, fibronektin ekspresyonunun yüksek olması önemli bir belirteç olabilir.

Çalışmamızın sonuçları, kanser tedavisi için geliştirilen yeni kombinasyonların etkinliğini belirlemede ve kanser biyolojisi hakkında derinlemesine anlayış sağlamada önemli bir adım olarak değerlendirilebilir. 2B hücre kültürü modellerinin, özellikle kanser

gibi karmaşık hastalıklarda, tümör mikro-çevresini tam olarak taklit edemediği ve ilaçların klinik etkinliğini doğru bir şekilde öngöremediği gösterilmiştir. Bu nedenle, 3B hücre kültürü modellerinin geliştirilmesi ve kullanılması, ilaç keşfi ve kanser tedavisi alanlarında önemli bir adımdır. Özellikle, 3B tümör modelleri, ilaçların etkisini daha doğru bir şekilde değerlendirebilir ve ilaç keşif sürecini hızlandırabilir. Sonuçlarımız Niklozamid ve Dosetaksel kombinasyonunun hücre ölümünü apoptoz yoluyla tetiklediğini ve kanser hücrelerinde önceden belirlenen hedeflere doğrudan etki ettiğini göstermektedir. Bu tez bu çalışması ile elde ettiğimiz bulgular, Niklozamid ve Dosetaksel kombinasyonunun akciğer kanserindeki ilaç yanıtını değerlendirmek için 3B tümör modellerinin kullanılmasının önemini vurgulamaktadır. Bu modeller, kanser araştırmalarında daha doğru ve güvenilir sonuçlar elde etmek için güçlü bir araç olabilir. Ayrıca, hücrelerde ölüm mekanizmalarını anlamak ve kontrol etmek, kanser tedavisinde yeni stratejiler geliştirmek için önemli bir adımdır. Bu nedenle, ilerleyen çalışmalarda 3B tümör modellerinin kullanımının genişletilmesi ve farklı başka mekanizmaların incelenmesi planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

Abu-Absi, S. F., Hansen, L. K., & Hu, W. S. (2004). Three-dimensional co-culture of hepatocytes and stellate cells. Cytotechnology, 45(3), 125.

Abuwatfa, W. H., Pitt, W. G., & Husseini, G. A. (2024). Scaffold-based 3D cell culture models in cancer research. Journal of Biomedical Science, 31(1).

Ackers, I., & Malgor, R. (2018). Interrelationship of canonical and non-canonical Wnt signalling pathways in chronic metabolic diseases. Diabetes & Vascular Disease Research, 15(1), 3.

Ahmedli, D., Gümüş, Z., Yetkin, R., Kabak, G., & Siliğ, Y. (2024). The Effect of Combined Treatment with Mentha longifolia L. and Docetaxel on Drug Resistance in Colon Cancer. MAS JAPS, 9(2), 459-465.

Akgun, O., Erkisa, M., & Ari, F. (2019). Effective and new potent drug combination: Histone deacetylase and Wnt/β-catenin pathway inhibitors in lung carcinoma cells. Journal of Cellular Biochemistry, 120(9), 15467-15482.

Alberg, A. J., Brock, M. V., Ford, J. G., Samet, J. M., & Spivack, S. D. (2013). Epidemiology of Lung Cancer: Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. Chest, 143(5 Suppl), e1S.

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).

Amaral, R. L. F., Miranda, M., Marcato, P. D., & Swiech, K. (2017). Comparative analysis of 3D bladder tumor spheroids obtained by forced floating and hanging drop methods for drug screening. Frontiers in Physiology, 8(AUG), 284532.

Andreotti, P. E., Hartmann, D. M., Linder, D., Harel, G., Gleiberman, I., Caruso, P. A., Ricks, S. H., Cree, I. A., Kurbacher, C. M., Untch, M., Sartori, C., & Bruckner, H. W. (1995). Chemosensitivity Testing of Human Tumors Using a Microplate Adenosine Triphosphate Luminescence Assay: Clinical Correlation for Cisplatin Resistance of Ovarian Carcinoma. Cancer Research, 55(22), 5276-5282.

Andrini, E., Mosca, M., Galvani, L., Sperandi, F., Ricciuti, B., Metro, G., & Lamberti, G. (2022). Non-small-cell lung cancer: how to manage RET-positive disease. Drugs in Context, 11.

Araki, T., Kanda, S., Horinouchi, H., & Ohe, Y. (2023). Current treatment strategies for EGFR-mutated non-small cell lung cancer: from first line to beyond osimertinib resistance. Japanese Journal of Clinical Oncology, 53(7), 547.

Audoin, M., Søgaard, M. T., & Jauffred, L. (2022). Tumor spheroids accelerate persistently invading cancer cells. Scientific Reports 12:1, 12(1), 1-11.

Awad, M. M., Oxnard, G. R., Jackman, D. M., Savukoski, D. O., Hall, D., Shivdasani, P., Heng, J. C., Dahlberg, S. E., Jänne, P. A., Verma, S., Christensen, J., Hammerman, P. S., & Sholl, L. M. (2016). MET Exon 14 Mutations in Non-Small-Cell Lung Cancer Are Associated With Advanced Age and Stage-Dependent MET Genomic Amplification and c-Met Overexpression. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 34(7), 721-730.

Bancroft, J. D., & Gamble, M. (2007). Theory and Practice of Histological Techniques, Sixth Edition. Elsevier.

Bartfeld, S., & Clevers, H. (2017). Stem cell-derived organoids and their application for medical research and patient treatment. Journal of molecular medicine (Berlin, Germany), 95(7), 729-738.

Basumallik, N., & Agarwal, M. (2023). Small Cell Lung Cancer. StatPearls. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482458/

Bédard, P., Gauvin, S., Ferland, K., Caneparo, C., Pellerin, È., Chabaud, S., & Bolduc, S. (2020). Innovative Human Three-Dimensional Tissue-Engineered Models as an Alternative to Animal Testing. Bioengineering (Basel, Switzerland), 7(3), 1-40.

Belli, C., Anand, S., Gainor, J. F., Penault-Llorca, F., Subbiah, V., Drilon, A., Andre, F., & Curigliano, G. (2020). Progresses toward precision medicine in RET-altered solid tumors. Clinical Cancer Research, 26(23), 6102-6111.

Bellini, M. F., Cadamuro, A. C. T., Succi, M., Proença, M. A., & Silva, A. E. (2012). Alterations of the TP53 gene in gastric and esophageal carcinogenesis. Journal of biomedicine & biotechnology, 2012;2012:891961.

Bergethon, K., Shaw, A. T., Ou, S. H. I., Katayama, R., Lovly, C. M., McDonald, N. T., Massion, P. P., Siwak-Tapp, C., Gonzalez, A., Fang, R., Mark, E. J., Batten, J. M., Chen, H., Wilner, K. D., Kwak, E. L., Clark, J. W., Carbone, D. P., Ji, H., Engelman, J. A., … Iafrate, A. J. (2012). ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. Journal of Clinical Oncology, 30(8), 863-870.

Berthier, E., Young, E. W. K., & Beebe, D. (2012). Engineers are from PDMS-land, Biologists are from Polystyrenia. Lab on a Chip, 12(7), 1224-1237.

Bhimji, S. S., & Wallen, J. M. (2023). Lung Adenocarcinoma. StatPearls. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519578/

Bi, Y. Y., Chen, Q., Yang, M. Y., Xing, L., & Jiang, H. L. (2024). Nanoparticles targeting mutant p53 overcome chemoresistance and tumor recurrence in non-small cell lung cancer. Nature Communications 2024 15:1, 15(1), 1-18.

Biju, T. S., Priya, V. V., & Francis, A. P. (2023). Role of three-dimensional cell culture in therapeutics and diagnostics: an updated review. Drug delivery and translational research, 13(9), 2239-2253.

Bishop, E. S., Mostafa, S., Pakvasa, M., Luu, H. H., Lee, M. J., Wolf, J. M., Ameer, G. A., He, T. C., & Reid, R. R. (2017). 3-D bioprinting technologies in tissue engineering and regenerative medicine: Current and future trends. Genes & Diseases, 4(4), 185.

Blackhall, F., Girard, N., Livartowski, A., McDonald, L., Roset, M., Lara, N., & Juarez García, A. (2023). Original research: Treatment patterns and outcomes among patients with small-cell lung cancer (SCLC) in Europe: a retrospective cohort study. BMJ Open, 13(2), 52556.

Blevins, S. M., & Bronze, M. S. (2010). Robert Koch and the 'golden age' of bacteriology. International Journal of Infectious Diseases, 14(9), e744-e751.

Brajša, K., Trzun, M., Zlatar, I., & Jelić, D. (2016). Three-dimensional cell cultures as a new tool in drug discovery. Periodicum Biologorum, 118(1), 59-65.

Bromma, K., Beckham, W., & Chithrani, D. B. (2023). Utilizing two-dimensional monolayer and three-dimensional spheroids to enhance radiotherapeutic potential by combining gold nanoparticles and docetaxel. Cancer Nanotechnology, 14(1), 1-26.

Broutier, L., Mastrogiovanni, G., Verstegen, M. M. A., 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.

Brown, J. R. (2019). PI3K Inhibitors: Present and Future. Cancer journal (Sudbury, Mass.), 25(6), 394.

Bylicki, O., Paleiron, N., Assié, J. B., & Chouaïd, C. (2020). Targeting the MET-Signaling Pathway in Non-Small–Cell Lung Cancer: Evidence to Date. OncoTargets and therapy, 13, 5691.

Casás-Selves, M., Kim, J., Zhang, Z., Helfrich, B. A., Gao, D., Porter, C. C., Scarborough, H. A., Bunn, P. A., Chan, D. C., Tan, A. C., & DeGregori, J. (2012). Tankyrase and the canonical Wnt pathway protect lung cancer cells from EGFR inhibition. Cancer Research, 72(16), 4154-4164.

Catrow, J. L., Zhang, Y., Zhang, M., & Ji, H. (2015). Discovery of Selective Small-Molecule Inhibitors for the β-Catenin/T-Cell Factor Protein-Protein Interaction through the Optimization of the Acyl Hydrazone Moiety. Journal of medicinal chemistry, 58(11), 4678-4692.

Chang, T. H., Hsieh, F. L., Zebisch, M., Harlos, K., Elegheert, J., & Jones, E. Y. (2015). Structure and functional properties of norrin mimic wnt for signalling with Frizzled4, Lrp5/6, and proteoglycan. eLife, 4, 1-27.

Chen, P., Zhang, X., Ding, R., Yang, L., Lyu, X., Zeng, J., Lei, J. H., Wang, L., Bi, J., Shao, N., Shu, D., Wu, B., Wu, J., Yang, Z., Wang, H., Wang, B., Xiong, K., Lu, Y., Fu, S., … Deng, C. (2021). Patient-Derived Organoids Can Guide Personalized-Therapies for Patients with Advanced Breast Cancer. Advanced science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany), 8(22).

Cheng, H., Shcherba, M., Pendurti, G., Liang, Y., Piperdi, B., & Perez-Soler, R. (2014). Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway: potential for lung cancer treatment. Lung cancer management, 3(1), 67.

Chung, H. H., Mireles, M., Kwarta, B. J., & Gaborski, T. R. (2018). Use of Porous membranes in tissue barrier and co-culture models. Lab on a chip, 18(12), 1671. https://doi.org/10.1039/C7LC01248A

Cirigliano, S. M., Díaz Bessone, M. I., Berardi, D. E., Flumian, C., Bal de Kier Joffé, E. D., Perea, S. E., Farina, H. G., Todaro, L. B., & Urtreger, A. J. (2017). The synthetic peptide CIGB-300 modulates CK2-dependent signaling pathways affecting the survival and chemoresistance of non-small cell lung cancer cell lines. Cancer Cell International, 17(1), 1-16.

Clevers, H. (2016). Modeling Development and Disease with Organoids. Cell, 165(7), 1586-1597.

Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D. R., & Yamada, K. M. (2001). Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. Science, 294(5547), 1708-1712.

Cukierman, E., Pankov, R., & Yamada, K. M. (2002). Cell interactions with three-dimensional matrices. Current Opinion in Cell Biology, 14(5), 633-640.

Dai, R., Iwama, A., Wang, S., & Kapila, Y. L. (2005). Disease-associated fibronectin matrix fragments trigger anoikis of human primary ligament cells: p53 and c-myc are suppressed. Apoptosis, 10(3), 503-512.

Darby, S., Hill, D., Auvinen, A., Barros-Dios, J. M., Baysson, H., Bochicchio, F., Deo, H., Falk, R., Forastiere, F., Hakama, M., Heid, I., Kreienbrock, L., Kreuzer, M., Lagarde, F., Mäkeläinen, I., Muirhead, C., Oberaigner, W., Pershagen, G., Ruano-

Ravina, A., … Doll, R. (2005). Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. BMJ (Clinical research ed.), 330(7485), 223-226.
Davies, A. M., Lara, P. N., Mack, P. C., & Gandara, D. R. (2003). Docetaxel in non-small cell lung cancer: a review. Expert opinion on pharmacotherapy, 4(4), 553-565.
Davies, K. D., & Doebele, R. C. (2013). Molecular Pathways - ROS1 Fusion Proteins in Cancer. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 19(15), 4040.
Dekkers, J. F., van Vliet, E. J., Sachs, N., Rosenbluth, J. M., Kopper, O., Rebel, H. G., Wehrens, E. J., Piani, C., Visvader, J. E., Verissimo, C. S., Boj, S. F., Brugge, J. S., Clevers, H., & Rios, A. C. (2021). Long-term culture, genetic manipulation and xenotransplantation of human normal and breast cancer organoids. Nature Protocols, 16(4), 1936-1965.
Della Corte, C. M., Viscardi, G., Di Liello, R., Fasano, M., Martinelli, E., Troiani, T., Ciardiello, F., & Morgillo, F. (2018). Role and targeting of anaplastic lymphoma kinase in cancer. Molecular Cancer, 17(1), 1-9.
Demir, R. (2001). Histolojik Boyama Teknikleri. Palme Yayıncılık
Detterbeck, F. C., Boffa, D. J., Kim, A. W., & Tanoue, L. T. (2017). The Eighth Edition Lung Cancer Stage Classification. Chest, 151(1), 193-203.
Drilon, A., Jenkins, C., Iyer, S., Schoenfeld, A., Keddy, C., & Davare, M. A. (2021). ROS1-dependent cancers — biology, diagnostics and therapeutics. Nature reviews. Clinical oncology, 18(1), 35.
Drost, J., & Clevers, H. (2018). Organoids in cancer research. Nature Reviews Cancer, 18(7), 407-418.
El Harane, S., Zidi, B., El Harane, N., Krause, K. H., Matthes, T., & Preynat-Seauve, O. (2023). Cancer Spheroids and Organoids as Novel Tools for Research and Therapy: State of the Art and Challenges to Guide Precision Medicine. Cells, 12(7), 1001.
Fang, S., & Wang, Z. (2014). EGFR mutations as a prognostic and predictive marker in non-small-cell lung cancer. Drug Design, Development and Therapy, 8, 1595.
Fang, Y., & Eglen, R. M. (2017). Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. SLAS Discovery, 22(5), 456-472.
Feng, F., Shen, B., Mou, X., Li, Y., & Li, H. (2021). Large-scale pharmacogenomic studies and drug response prediction for personalized cancer medicine. Journal of Genetics and Genomics, 48(7), 540-551.
Fonseca, B. D., Diering, G. H., Bidinosti, M. A., Dalal, K., Alain, T., Balgi, A. D., Forestieri, R., Nodwell, M., Rajadurai, C. V., Gunaratnam, C., Tee, A. R., Duong, F., Andersen, R. J., Orlowski, J., Numata, M., Sonenberg, N., & Roberge, M. (2012). Structure-activity analysis of niclosamide reveals potential role for cytoplasmic pH in control of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling. The Journal of biological chemistry, 287(21), 17530-17545.
Fossella, F. V., DeVore, R., Kerr, R. N., Crawford, J., Natale, R. R., Dunphy, F., Kalman, L., Miller, V., Lee, J. S., Moore, M., Gandara, D., Karp, D., Vokes, E., Kris, M., Kim, Y., Gamza, F., & Hammershaimb, L. (2000). Randomized phase III trial of docetaxel versus vinorelbine or ifosfamide in patients with advanced non-small-cell lung cancer previously treated with platinum-containing chemotherapy regimens. The TAX 320 Non-Small Cell Lung Cancer Study Group. Journal of clinical

oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 18(12), 2354-2362.
Foty, R. (2011). A Simple Hanging Drop Cell Culture Protocol for Generation of 3D Spheroids. Journal of Visualized Experiments : JoVE, 51(51).
Franken, N. A. P., Rodermond, H. M., Stap, J., Haveman, J., & van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. Nature Protocols 2006 1:5, 1(5), 2315-2319.
Gazdar, A. F., Bunn, P. A., & Minna, J. D. (2017). Small-cell lung cancer: what we know, what we need to know and the path forward. Nature reviews. Cancer, 17(12), 725-737.
Gebhard, C., Gabriel, C., & Walter, I. (2016). Morphological and Immunohistochemical Characterization of Canine Osteosarcoma Spheroid Cell Cultures. Anatomia, Histologia, Embryologia, 45(3), 219.
Goldstraw, P., Ball, D., Jett, J. R., Le Chevalier, T., Lim, E., Nicholson, A. G., & Shepherd, F. A. (2011). Non-small-cell lung cancer. Lancet (London, England), 378(9804), 1727-1740.
Goody, R. S., Müller, M. P., & Rauh, D. (2019). Mutant-Specific Targeting of Ras G12C Activity by Covalently Reacting Small Molecules. Cell Chemical Biology, 26(10), 1338-1348.
Graf, B. W., & Boppart, S. A. (2010). Imaging and Analysis of Three-Dimensional Cell Culture Models. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 591, 211.
Hai, J., Sakashita, S., Allo, G., Ludkovski, O., Ng, C., Shepherd, F. A., & Tsao, M. S. (2015). Inhibiting MDM2-p53 interaction suppresses tumor growth in patient-derived non-small cell lung cancer xenograft models. Journal of Thoracic Oncology, 10(8), 1172-1180.
Hallberg, B., & Palmer, R. H. (2016). The role of the ALK receptor in cancer biology. Annals of Oncology, 27, iii4-iii15.
Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. Cancer Discovery, 12(1), 31-46.
Harrison, R. G. (1906). Observations on the living developing nerve fiber, Experimental Biology and Medicine, 4(1), 140-143.
Hasan, G. M., Hassan, M. I., Sohal, S. S., Shamsi, A., & Alam, M. (2023). Therapeutic Targeting of Regulated Signaling Pathways of Non-Small Cell Lung Carcinoma. ACS Omega, 8(30), 26685.
Hashimoto, A., Kawasaki, Y., Tominaga, A., Kakutani, T., Kodama, K., Nogi, S., Tsuno, H., Ogihara, H., Nunokawa, T., Ikenaka, T., Watai, K., Saito, I., & Matsui, T. (2024). Squamous Cell Lung Cancer. JCR: Journal of Clinical Rheumatology, 26(5), e137-e137.
He, S., Ma, J., Fang, Y., Liu, Y., Wu, S., Dong, G., Wang, W., & Sheng, C. (2021). Homo-PROTAC mediated suicide of MDM2 to treat non-small cell lung cancer. Acta pharmaceutica Sinica. B, 11(6), 1617-1628.
Herbst, R. S., & Bunn, P. A. (2003). Targeting the Epidermal Growth Factor Receptor in Non-Small Cell Lung Cancer. Clinical Cancer Research, 9, 5813-5824.
Hirai, H., Sootome, H., Nakatsuru, Y., Miyama, K., Taguchi, S., Tsujioka, K., Ueno, Y., Hatch, H., Majumder, P. K., Pan, B. S., & Kotani, H. (2010). MK-2206, an allosteric Akt inhibitor, enhances antitumor efficacy by standard chemotherapeutic agents or molecular targeted drugs in vitro and in vivo. Molecular cancer therapeutics, 9(7), 1956-1967.

Hong, D. S., Fakih, M. G., Strickler, J. H., Desai, J., Durm, G. A., Shapiro, G. I., Falchook, G. S., Price, T. J., Sacher, A., Denlinger, C. S., Bang, Y.-J., Dy, G. K., Krauss, J. C., Kuboki, Y., Kuo, J. C., Coveler, A. L., Park, K., Kim, T. W., Barlesi, F., … Li, B. T. (2020). KRASG12C Inhibition with Sotorasib in Advanced Solid Tumors. The New England journal of medicine, 383(13), 1207-1217.

Horie, M., Saito, A., Yamaguchi, Y., Ohshima, M., & Nagase, T. (2015). Three-dimensional Co-culture Model for Tumor-stromal Interaction. Journal of Visualized Experiments : JoVE, 96.

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), 1-14.

Huang, B. W., & Gao, J. Q. (2018). Application of 3D cultured multicellular spheroid tumor models in tumor-targeted drug delivery system research. Içinde Journal of Controlled Release (C. 270, ss. 246-259). Elsevier B.V.

Huang, C. L., Liu, D., Ishikawa, S., Nakashima, T., Nakashima, N., Yokomise, H., Kadota, K., & Ueno, M. (2008). Wnt1 overexpression promotes tumour progression in non-small cell lung cancer. European Journal of Cancer, 44(17), 2680-2688.

Huang, S. M. A., Mishina, Y. M., Liu, S., Cheung, A., Stegmeier, F., Michaud, G. A., Charlat, O., Wiellette, E., Zhang, Y., Wiessner, S., Hild, M., Shi, X., Wilson, C. J., Mickanin, C., Myer, V., Fazal, A., Tomlinson, R., Serluca, F., Shao, W., … Cong, F. (2009). Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. Nature, 461(7264), 614-620.

Ichite, N., Chougule, M. B., Jackson, T., Fulzele, S. V., Safe, S., & Singh, M. (2009). Enhancement of Docetaxel Anti-cancer Activity by A Novel Diindolylmethane (DIM) Compound in Human Non-Small Cell Lung Cancer. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 15(2), 543.

Ishii, H., Azuma, K., Kawahara, A., Matsuo, N., Tokito, T., & Hoshino, T. (2021). Atezolizumab plus carboplatin and etoposide in small cell lung cancer patients previously treated with platinum-based chemotherapy. Investigational new drugs, 39(1), 269-271.

Jaganathan, H., Gage, J., Leonard, F., Srinivasan, S., Souza, G. R., Dave, B., & Godin, B. (2014). Three-dimensional in vitro co-culture model of breast tumor using magnetic levitation. Scientific reports, 4.

Jeon, J. S., Bersini, S., Gilardi, M., Dubini, G., Charest, J. L., Moretti, M., & Kamm, R. D. (2015). Human 3D vascularized organotypic microfluidic assays to study breast cancer cell extravasation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 112(1), 214-219.

Kalemkerian, G. P. (2011). Staging and imaging of small cell lung cancer. Cancer Imaging, 11(1), 253.

Kang, H. W., Kim, J. H., Lee, D. E., Lee, Y. S., Kim, M. J., Kim, H. S., Fang, S. S., Lee, B. E., Lee, K. J., Yoo, J., Kim, H. J., & Park, J. S. (2023). Combination therapy of niclosamide with gemcitabine inhibited cell proliferation and apoptosis via Wnt/β-catenin/c-Myc signaling pathway by inducing β-catenin ubiquitination in pancreatic cancer. Cancer biology & therapy, 24(1).

Karlsson, H., Fryknäs, M., Larsson, R., & Nygren, P. (2012). Loss of cancer drug activity in colon cancer HCT-116 cells during spheroid formation in a new 3-D spheroid cell culture system. Experimental Cell Research, 318(13), 1577-1585.

Kefeli, M. Y. L. A. O. U. O. K. B. (2008). Sarcomatoid carcinomas of the lung: Report of three cases - Turkish Journal of Pathology. 064-068.

Kim, J., You, L., Xu, Z., Kuchenbecker, K., Raz, D., He, B., & Jablons, D. (2007). Wnt inhibitory factor inhibits lung cancer cell growth. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery, 133(3), 733-737.

Kleinman, H. K., McGarvey, M. L., Hassell, J. R., Star, V. L., Cannon, F. B., Laurie, G. W., & Martin, G. R. (1986). Basement Membrane Complexes with Biological Activity. Biochemistry, 25(2), 312-318.

Kleinman, H. K., Philp, D., & Hoffman, M. P. (2003). Role of the extracellular matrix in morphogenesis. Current Opinion in Biotechnology, 14(5), 526-532.

Klemm, F., & Joyce, J. A. (2015). Microenvironmental regulation of therapeutic response in cancer. Trends in cell biology, 25(4), 198.

Ko, J., Ahn, J., Kim, S., Lee, Y., Lee, J., Park, D., & Jeon, N. L. (2019). Tumor spheroid-on-a-chip: a standardized microfluidic culture platform for investigating tumor angiogenesis. Lab on a Chip, 19(17), 2822-2833.

Ko, J., Winslow, M. M., & Sage, J. (2021). Mechanisms of small cell lung cancer metastasis. EMBO Molecular Medicine, 13(1).

Kok, K., Naylor, S. L., & Buys, C. H. C. M. (1997). Deletions of the short arm of chromosome 3 in solid tumors and the search for suppressor genes. Advances in cancer research, 71, 27-92.

Kopper, O., de Witte, C. J., Lõhmussaar, K., Valle-Inclan, J. E., Hami, N., Kester, L., Balgobind, A. V., Korving, J., Proost, N., Begthel, H., van Wijk, L. M., Revilla, S. A., Theeuwsen, R., van de Ven, M., van Roosmalen, M. J., Ponsioen, B., Ho, V. W. H., Neel, B. G., Bosse, T., … Clevers, H. (2019). An organoid platform for ovarian cancer captures intra- and interpatient heterogeneity. Nature medicine, 25(5), 838-849.

Kunz-Schughart, L. A., Freyer, J. P., Hofstaedter, F., & Ebner, R. (2004). The use of 3-D cultures for high-throughput screening: The multicellular spheroid model. Journal of Biomolecular Screening 9(4), 273-285.

Lai, B. F. L., Lu, R. X. Z., Hu, Y., Davenport Huyer, L., Dou, W., Wang, E. Y., Radulovich, N., Tsao, M. S., Sun, Y., & Radisic, M. (2020). Recapitulating pancreatic tumor microenvironment through synergistic use of patient organoids and organ-on-a-chip vasculature. Advanced functional materials, 30(48).

Lancaster, M. A., & Knoblich, J. A. (2014). Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. Science, 345(6194).

Langhans, S. A. (2018). Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. Frontiers in Pharmacology, 9, 334617.

Lantuejoul, S., Fernandez-Cuesta, L., Damiola, F., Girard, N., & McLeer, A. (2020). New molecular classification of large cell neuroendocrine carcinoma and small cell lung carcinoma with potential therapeutic impacts. Translational Lung Cancer Research, 9(5), 2233.

Lee, K. H., & Kim, T. H. (2021). Recent Advances in Multicellular Tumor Spheroid Generation for Drug Screening. Biosensors 11, 445.

Lei, Y., Lei, Y., Shi, X., & Wang, J. (2022). EML4-ALK fusion gene in non-small cell lung cancer. Oncology Letters, 24(2).
Li, C., & Lu, H. (2018). Adenosquamous carcinoma of the lung. OncoTargets and therapy, 11, 4829.
Li, J., Gao, Y., & Yue, W. (2020). The Clinical Diagnostic and Prognostic Value of Dickkopf-1 in Cancer. Cancer Management and Research, 12, 4253.
Li, R., Hu, Z., Sun, S. Y., Chen, Z. G., Owonikoko, T. K., Sica, G. L., Ramalingam, S. S., Curran, W. J., Khuri, F. R., & Deng, X. (2013a). Niclosamide overcomes acquired resistance to erlotinib through suppression of STAT3 in non-small cell lung cancer. Molecular Cancer Therapeutics, 12(10), 2200-2212.
Li, R., You, S., Hu, Z., Chen, Z. G., Sica, G. L., Khuri, F. R., Curran, W. J., Shin, D. M., & Deng, X. (2013b). Inhibition of STAT3 by Niclosamide Synergizes with Erlotinib against Head and Neck Cancer. PLoS ONE, 8(9), 74670.
Li, T., Yang, W. Y., Liu, T. T., Li, Y., Liu, L., Zheng, X., Zhao, L., Zhang, F., & Hu, Y. (2023). Advances in the Diagnosis and Treatment of a Driving Target: RET Rearrangements in non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC) Especially in China. Technology in Cancer Research & Treatment, 22.
Liu, F. F., Peng, C., Escher, B. I., Fantino, E., Giles, C., Were, S., Duffy, L., & Ng, J. C. (2013). Hanging drop: An in vitro air toxic exposure model using human lung cells in 2D and 3D structures. Journal of Hazardous Materials, 261, 701-710.
Liu, J., Xiao, Q., Xiao, J., Niu, C., Li, Y., Zhang, X., Zhou, Z., Shu, G., & Yin, G. (2022). Wnt/β-catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. Signal Transduction and Targeted Therapy, 7(1), 1-23.
Liu, L., Han, C., Yu, H., Zhu, W., Cui, H., Zheng, L., Zhang, C., & Yue, L. (2018). Chloroquine inhibits cell growth in human A549 lung cancer cells by blocking autophagy and inducing mitochondrial-mediated apoptosis. Oncology reports, 39(6), 2807-2816.
Liu, R., Meng, X., Yu, X., Wang, G., Dong, Z., Zhou, Z., Qi, M., Yu, X., Ji, T., & Wang, F. (2022). From 2D to 3D Co-Culture Systems: A Review of Co-Culture Models to Study the Neural Cells Interaction. International Journal of Molecular Sciences, 23(21).
Liu, S., Chen, X., Chen, R., Wang, J., Zhu, G., Jiang, J., Wang, H., Duan, S., & Huang, J. (2017). Diagnostic role of Wnt pathway gene promoter methylation in non small cell lung cancer. Oncotarget, 8(22), 36354.
Lovitt, C. J., Shelper, T. B., & Avery, V. M. (2014). Advanced Cell Culture Techniques for Cancer Drug Discovery. Biology, 3(2), 345.
Lu, X., Jin, J., Wu, Y., Liu, X., Liang, X., Lin, J., Sun, Q., Qin, J., Zhang, W., & Luan, X. (2023). Progress in RAS-targeted therapeutic strategies: From small molecule inhibitors to proteolysis targeting chimeras. Medicinal research reviews, 44(2), 812-832.
Luo, F., Luo, M., Rong, Q. X., Zhang, H., Chen, Z., Wang, F., Zhao, H. Y., & Fu, L. W. (2019). Niclosamide, an antihelmintic drug, enhances efficacy of PD-1/PD-L1 immune checkpoint blockade in non-small cell lung cancer. Journal for immunotherapy of cancer, 7(1).
Luraghi, P., Schelter, F., Krüger, A., & Boccaccio, C. (2012). The MET Oncogene as a Therapeutical Target in Cancer Invasive Growth. Frontiers in Pharmacology, 3.

Mahato, A. K., & Sidorova, Y. A. (2020). RET Receptor Tyrosine Kinase: Role in Neurodegeneration, Obesity, and Cancer. International Journal of Molecular Sciences, 21(19), 1-21.

Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. Cell, 129(7), 1261.

Martin, B. M. (2014). Tissue Culture Techniques. Google Kitaplar. Birkhauser Boston.

Martin, B., Paesmans, M., Mascaux, C., Berghmans, T., Lothaire, P., Meert, A. P., Lafitte, J. J., & Sculier, J. P. (2004). Ki-67 expression and patients survival in lung cancer: systematic review of the literature with meta-analysis. British journal of cancer, 91(12), 2018-2025.

Mendez, M. G., Kojima, S., & Goldman, R. D. (2010). Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 24(6), 1838-1851.

Michaels, E., & Bestvina, C. M. (2022). Meeting an un-MET need: Targeting MET in non-small cell lung cancer. Frontiers in Oncology, 12.

Miller, C. P., Tsuchida, C., Zheng, Y., Himmelfarb, J., & Akilesh, S. (2018). A 3D Human Renal Cell Carcinoma-on-a-Chip for the Study of Tumor Angiogenesis. Neoplasia, 20(6), 610-620.

Milner, D. A., & Lennerz, J. K. (2024). Technology and Future of Multi-Cancer Early Detection. Life 2024, Vol. 14, Page 833, 14(7), 833.

Mo, Y., Wang, Y., Zhang, L., Yang, L., Zhou, M., Li, X., Li, Y., Li, G., Zeng, Z., Xiong, W., Xiong, F., & Guo, C. (2019). The role of Wnt signaling pathway in tumor metabolic reprogramming. Journal of Cancer, 10(16), 3789.

Mogi, A., & Kuwano, H. (2011). TP53 Mutations in Nonsmall Cell Lung Cancer. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2011.

Molina, J. R., Yang, P., Cassivi, S. D., Schild, S. E., & Adjei, A. A. (2008). Non–Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship. Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic, 83(5), 584.

Mosaad, E. O., Chambers, K. F., Futrega, K., Clements, J. A., & Doran, M. R. (2018). The Microwell-mesh: A high-throughput 3D prostate cancer spheroid and drug-testing platform. Scientific Reports 8(1), 1-12.

Nayak, P., Bentivoglio, V., Varani, M., & Signore, A. (2023). Three-Dimensional In Vitro Tumor Spheroid Models for Evaluation of Anticancer Therapy: Recent Updates. Cancers, 15(19).

Nguyen, V. Q., & Geirnaert, M. (2023). An overview of the role of selpercatinib and pralsetinib in RET-fusion-positive non-small cell lung cancer (NSCLC). Journal of oncology pharmacy practice : official publication of the International Society of Oncology Pharmacy Practitioners, 29(2), 450-456.

Nicholson, A. G., Tsao, M. S., Beasley, M. B., Borczuk, A. C., Brambilla, E., Cooper, W. A., Dacic, S., Jain, D., Kerr, K. M., Lantuejoul, S., Noguchi, M., Papotti, M., Rekhtman, N., Scagliotti, G., van Schil, P., Sholl, L., Yatabe, Y., Yoshida, A., & Travis, W. D. (2022). The 2021 WHO Classification of Lung Tumors: Impact of Advances Since 2015. Journal of Thoracic Oncology, 17(3), 362-387.

Nishiguchi, A., Matsusaki, M., Kano, M. R., Nishihara, H., Okano, D., Asano, Y., Shimoda, H., Kishimoto, S., Iwai, S., & Akashi, M. (2018). In vitro 3D

blood/lymph-vascularized human stromal tissues for preclinical assays of cancer metastasis. Biomaterials, 179, 144-155.
Noel, P., Muñoz, R., Rogers, G. W., Neilson, A., Von Hoff, D. D., & Han, H. (2017). Preparation and Metabolic Assay of 3-dimensional Spheroid Co-cultures of Pancreatic Cancer Cells and Fibroblasts. Journal of Visualized Experiments : JoVE, 126.
Offin, M., Chan, J. M., Tenet, M., Rizvi, H. A., Shen, R., Riely, G. J., Rekhtman, N., Daneshbod, Y., Quintanal-Villalonga, A., Penson, A., Hellmann, M. D., Arcila, M. E., Ladanyi, M., Pe'er, D., Kris, M. G., Rudin, C. M., & Yu, H. A. (2019). Concurrent RB1 and TP53 Alterations Define a Subset of EGFR-Mutant Lung Cancers at risk for Histologic Transformation and Inferior Clinical Outcomes. Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer, 14(10), 1784-1793.
Ogura, T., Tanaka, Y., Tamaki, H., & Harada, M. (2016). Docetaxel induces Bcl-2- and pro-apoptotic caspase-independent death of human prostate cancer DU145 cells. International Journal of Oncology, 48(6), 2330.
Oh, J. M., Gangadaran, P., Rajendran, R. L., Hong, C. M., Lee, J., & Ahn, B. C. (2022). Different Expression of Thyroid-Specific Proteins in Thyroid Cancer Cells between 2-Dimensional (2D) and 3-Dimensional (3D) Culture Environment. Cells, 11(22).
Oh, Y. S., Choi, M. H., Shin, J. I., Maza, P. A. M. A., & Kwak, J. Y. (2020). Co-Culturing of Endothelial and Cancer Cells in a Nanofibrous Scaffold-Based Two-Layer System. International Journal of Molecular Sciences, 21(11), 1-23.
Ono, M., & Kuwano, M. (2006). Molecular mechanisms of epidermal growth factor receptor (EGFR) activation and response to gefitinib and other EGFR-targeting drugs. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 12(24), 7242-7251.
Orellana, E., & Kasinski, A. (2016). Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation. Bio-Protocol, 5;6(21):e1984.
Orimo, A., & Weinberg, R. A. (2006). Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. Cell cycle (Georgetown, Tex.), 5(15), 1597-1601.
Ostrem, J. M., Peters, U., Sos, M. L., Wells, J. A., & Shokat, K. M. (2013). K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. Nature, 503(7477), 548-551.
O'Sullivan, É., Keogh, A., Henderson, B., Finn, S. P., Gray, S. G., & Gately, K. (2023). Treatment Strategies for KRAS-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer. Cancers, 15(6).
Otsuka, H., Sasaki, K., Okimura, S., Nagamura, M., & Nakasone, Y. (2013). Micropatterned co-culture of hepatocyte spheroids layered on non-parenchymal cells to understand heterotypic cellular interactions. Science and Technology of Advanced Materials, 14(6), 65003-65013.
Ozaki, T., & Nakagawara, A. (2011). Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. Cancers, 3(1), 994.
Ozturk, S., Erkisa, M., Oran, S., Ulukaya, E., Celikler, S., & Ari, F. (2021). Lichens exerts an anti-proliferative effect on human breast and lung cancer cells through induction of apoptosis. Drug and Chemical Toxicology, 44(3), 259-267.
Paik, P. K., Felip, E., Veillon, R., Sakai, H., Cortot, A. B., Garassino, M. C., Mazieres, J., Viteri, S., Senellart, H., Van Meerbeeck, J., Raskin, J., Reinmuth, N., Conte, P.,

Kowalski, D., Cho, B. C., Patel, J. D., Horn, L., Griesinger, F., Han, J.-Y., … Le, X. (2020). Tepotinib in Non–Small-Cell Lung Cancer with MET Exon 14 Skipping Mutations . New England Journal of Medicine, 383(10), 931-943.

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.

Pan, J. X., Ding, K., & Wang, C. Y. (2012). Niclosamide, an old antihelminthic agent, demonstrates antitumor activity by blocking multiple signaling pathways of cancer stem cells. Chinese journal of cancer, 31(4), 178-184.

Pandita, V., Ajila, V., Babu, G. S., Hegde, S., & Asan, M. F. (2021). Vimentin and its role as a biomarker in health and disease. Gülhane Tıp Dergisi, 63(4), 232-237.

Panwar, V., Singh, A., Bhatt, M., Tonk, R. K., Azizov, S., Raza, A. S., Sengupta, S., Kumar, D., & Garg, M. (2023). Multifaceted role of mTOR (mammalian target of rapamycin) signaling pathway in human health and disease. Signal Transduction and Targeted Therapy 2023 8:1, 8(1), 1-25.

Papadimitrakopoulou, V. (2012). Development of PI3K/AKT/mTOR Pathway Inhibitors and Their Application in Personalized Therapy for Non–Small-Cell Lung Cancer. Journal of Thoracic Oncology, 7(8), 1315-1326.

Park, W. J., & Kim, M. J. (2023). A New Wave of Targeting 'Undruggable' Wnt Signaling for Cancer Therapy: Challenges and Opportunities. Cells, 12(8), 1110.

Passaniti, A., Kleinman, H. K., & Martin, G. R. (2022). Matrigel: history/background, uses, and future applications. Journal of Cell Communication and Signaling, 16(4), 621.

Passaro, A., Mok, T., Peters, S., Popat, S., Ahn, M.-J., de Marinis, F., Lilly, E., Serono, M., Smith Kline, G., & Peters, V. (2021). STATE OF THE ART: CONCISE REVIEW Recent Advances on the Role of EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors in the Management of NSCLC With Uncommon, Non Exon 20 Insertions, EGFR Mutations. Journal of Thoracic Oncology, 16, 764-773.

Pearson, R. D., & Hewlett, E. L. (1985). Niclosamide therapy for tapeworm infections. Annals of Internal Medicine, 102(4), 550-551.

Pelosi, G., Sonzogni, A., De Pas, T., Galetta, D., Veronesi, G., Spaggiari, L., Manzotti, M., Fumagalli, C., Bresaola, E., Nappi, O., Viale, G., & Rosai, J. (2010). Pulmonary sarcomatoid carcinomas: A practical overview. International Journal of Surgical Pathology, 18(2), 103-120.

Peng, J., He, Z., Yuan, Y., Xie, J., Zhou, Y., Guo, B., & Guo, J. (2022). Docetaxel suppressed cell proliferation through Smad3/HIF-1α-mediated glycolysis in prostate cancer cells. Cell Communication and Signaling, 20(1), 1-12.

Peters, S., Camidge, D. R., Shaw, A. T., Gadgeel, S., Ahn, J. S., Kim, D.-W., Ou, S.-H. I., Pérol, M., Dziadziuszko, R., Rosell, R., Zeaiter, A., Mitry, E., Golding, S., Balas, B., Noe, J., Morcos, P. N., & Mok, T. (2017). Alectinib versus Crizotinib in Untreated ALK -Positive Non–Small-Cell Lung Cancer . New England Journal of Medicine, 377(9), 829-838.

Petty, R. D., Sutherland, L. A., Hunter, E. M., & Cree, I. A. (1995). Comparison of MTT and ATP-based assays for the measurement of viable cell number. Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence, 10(1), 29-34.

Pflaum, J., Schlosser, S., & Müller, M. (2014). p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. Frontiers in Oncology, 21;4:285.

Phi, L. T. H., Sari, I. N., Yang, Y. G., Lee, S. H., Jun, N., Kim, K. S., Lee, Y. K., & Kwon, H. Y. (2018). Cancer Stem Cells (CSCs) in Drug Resistance and their Therapeutic Implications in Cancer Treatment. Stem Cells International, 28;2018:5416923.

Proietti, I., Skroza, N., Michelini, S., Mambrin, A., Balduzzi, V., Bernardini, N., Marchesiello, A., Tolino, E., Volpe, S., Maddalena, P., Fraia, M., Mangino, G., Romeo, G., & Potenza, C. (2020). BRAF Inhibitors: Molecular Targeting and Immunomodulatory Actions. Cancers, 12(7), 1-13.

Qin, K., Yu, M., Fan, J., Wang, H., Zhao, P., Zhao, G., Zeng, W., Chen, C., Wang, Y., Wang, A., Schwartz, Z., Hong, J., Song, L., Wagstaff, W., Haydon, R. C., Luu, H. H., Ho, S. H., Strelzow, J., Reid, R. R., … Shi, L. L. (2024). Canonical and noncanonical Wnt signaling: Multilayered mediators, signaling mechanisms and major signaling crosstalk. Genes & Diseases, 11(1), 103-134.

Raffo-Romero, A., Ziane-Chaouche, L., Salomé-Desnoulez, S., Hajjaji, N., Fournier, I., Salzet, M., & Duhamel, M. (2024). A co-culture system of macrophages with breast cancer tumoroids to study cell interactions and therapeutic responses. Cell Reports Methods, 4(6), 100792.

Rah, B., Rather, R. A., Bhat, G. R., Baba, A. B., Mushtaq, I., Farooq, M., Yousuf, T., Dar, S. B., Parveen, S., Hassan, R., Mohammad, F., Qassim, I., Bhat, A., Ali, S., Zargar, M. H., & Afroze, D. (2022). JAK/STAT Signaling: Molecular Targets, Therapeutic Opportunities, and Limitations of Targeted Inhibitions in Solid Malignancies. Frontiers in Pharmacology, 13.

Ramaswamy, B., & Puhalla, S. (2006). Docetaxel: a tubulin-stabilizing agent approved for the management of several solid tumors. Drugs of today, 42(4), 265-279.

Ramazi, S., Daddzadi, M., Sahafnejad, Z., & Allahverdi, A. (2023). Epigenetic regulation in lung cancer. MedComm, 4(6).

Rapp, J., Jaromi, L., Kvell, K., Miskei, G., & Pongracz, J. E. (2017). WNT signaling – lung cancer is no exception. Respiratory Research, 18(1).

Regua, A. T., Najjar, M., & Lo, H. W. (2022). RET signaling pathway and RET inhibitors in human cancer. Frontiers in oncology, 12.

Ren, X., Duan, L., He, Q., Zhang, Z., Zhou, Y., Wu, D., Pan, J., Pei, D., & Ding, K. (2010). Identification of niclosamide as a new small-molecule inhibitor of the STAT3 signaling pathway. ACS Medicinal Chemistry Letters, 1(9), 454-459.

Reungwetwattana, T., Liang, Y., Zhu, V., & Ou, S. H. I. (2017). The race to target MET exon 14 skipping alterations in non-small cell lung cancer: The Why, the How, the Who, the Unknown, and the Inevitable. Lung cancer, 103, 27-37.

Riihimäki, M., Hemminki, A., Fallah, M., Thomsen, H., Sundquist, K., Sundquist, J., & Hemminki, K. (2014). Metastatic sites and survival in lung cancer. Lung Cancer, 86(1), 78-84.

Rivlin, N., Brosh, R., Oren, M., & Rotter, V. (2011). Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. Genes & Cancer, 2(4), 466.

Román, M., Baraibar, I., López, I., Nadal, E., Rolfo, C., Vicent, S., & Gil-Bazo, I. (2018). KRAS oncogene in non-small cell lung cancer: clinical perspectives on the treatment of an old target. Molecular Cancer, 17(1), 1-14.

Roman, V., Mihaila, M., Radu, N., Marineata, S., Diaconu, C. C., & Bostan, M. (2023). Cell Culture Model Evolution and Its Impact on Improving Therapy Efficiency in Lung Cancer. Cancers, 15(20).

Ruano-Raviña, A., Provencio, M., Calvo De Juan, V., Carcereny, E., Moran, T., Rodriguez-Abreu, D., López-Castro, R., Cuadrado Albite, E., Guirado, M., Gómez González, L., Massutí, B., Ortega Granados, A. L., Blasco, A., Cobo, M., Garcia-Campelo, R., Bosch, J., Trigo, J., Juan, Ó., Aguado De La Rosa, C., … Cerezo, S. (2020). Lung cancer symptoms at diagnosis: results of a nationwide registry study. European Society for Medical Oncology Open, 5(6), e001021.

Sacco, J. J., & Clague, M. J. (2015). Dysregulation of the Met pathway in non-small cell lung cancer: implications for drug targeting and resistance. Translational Lung Cancer Research, 4(3), 242.

Sanaei, M. J., Razi, S., Pourbagheri-Sigaroodi, A., & Bashash, D. (2022). The PI3K/Akt/mTOR pathway in lung cancer; oncogenic alterations, therapeutic opportunities, challenges, and a glance at the application of nanoparticles. Translational Oncology, 18, 101364.

Sato, T., Vries, R. G., Snippert, H. J., Van De Wetering, M., Barker, N., Stange, D. E., Van Es, J. H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P. J., & Clevers, H. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. Nature, 459(7244), 262-265.

Savini, A., & Savini, G. G. (2015). A short history of 3D printing, a technological revolution just started. Proceedings of the 2015 ICOHTEC/IEEE International History of High-Technologies and their Socio-Cultural Contexts Conference, The 4th IEEE Region 8 Conference on the History of Electrotechnologies.

Schiller, J. H., Harrington, D., Belani, C. P., Langer, C., Sandler, A., Krook, J., Zhu, J., & Johnson, D. H. (2002). Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. The New England journal of medicine, 346(2), 92-98.

Schuster, B., Junkin, M., Kashaf, S. S., Romero-Calvo, I., Kirby, K., Matthews, J., Weber, C. R., Rzhetsky, A., White, K. P., & Tay, S. (2020). Automated microfluidic platform for dynamic and combinatorial drug screening of tumor organoids. Nature Communications, 11(1), 1-12.

Schwendenwein, A., Megyesfalvi, Z., Barany, N., Valko, Z., Bugyik, E., Lang, C., Ferencz, B., Paku, S., Lantos, A., Fillinger, J., Rezeli, M., Marko-Varga, G., Bogos, K., Galffy, G., Renyi-Vamos, F., Hoda, M. A., Klepetko, W., Hoetzenecker, K., Laszlo, V., & Dome, B. (2021). Molecular profiles of small cell lung cancer subtypes: therapeutic implications. Molecular Therapy Oncolytics, 20, 470.

Servant, R., Garioni, M., Vlajnic, T., Blind, M., Pueschel, H., Müller, D. C., Zellweger, T., Templeton, A. J., Garofoli, A., Maletti, S., Piscuoglio, S., Rubin, M. A., Seifert, H., Rentsch, C. A., Bubendorf, L., & Le Magnen, C. (2021). Prostate cancer patient-derived organoids: detailed outcome from a prospective cohort of 81 clinical specimens. The Journal of Pathology, 254(5), 543.

Sforza, V., Palumbo, G., Cascetta, P., Carillio, G., Manzo, A., Montanino, A., Sandomenico, C., Costanzo, R., Esposito, G., Laudato, F., Damiano, S., Forte, C. A., Frosini, G., Farese, S., Piccirillo, M. C., Pascarella, G., Normanno, N., & Morabito, A. (2022). BRAF Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. Cancers, 14(19).

Shang, S., Hua, F., & Hu, Z. W. (2017). The regulation of β-catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities. Oncotarget, 8(20), 33972.

Shang, S., Hua, F., Hu, Z.-W., Shang, S., Hua, F., & Hu, Z.-W. (2017). The regulation of β-catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities. Oncotarget, 8(20), 33972-33989. https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.15687

Shapiro, M., Akiri, G., Chin, C., Wisnivesky, J. P., Beasley, M. B., Weiser, T. S., Swanson, S. J., & Aaronson, S. A. (2013). Wnt Pathway Activation Predicts Increased Risk of Tumor Recurrence in Patients with Stage I Non-Small Cell Lung Cancer. Annals of surgery, 257(3), 548.

Shen, X., Gao, C., Li, H., Liu, C., Wang, L., Li, Y., Liu, R., Sun, C., & Zhuang, J. (2023). Natural compounds: Wnt pathway inhibitors with therapeutic potential in lung cancer. Frontiers in Pharmacology, 14.

Shen, Z., Qiu, B., Li, L., Yang, B., & Li, G. (2022). Targeted therapy of RET fusion-positive non-small cell lung cancer. Frontiers in Oncology, 12.

Shi, L. S., Huang, G., Yu, B., & Wen, X. Q. (2009). Clinical significance and prognostic value of serum Dickkopf-1 concentrations in patients with lung cancer. Clinical chemistry, 55(9), 1656-1664.

Siegel, R. L., Miller, K. D., Sandeep, N., Mbbs, W., Ahmedin, |, Dvm, J., & Siegel, R. L. (2023). Cancer statistics, 2023. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 73(1), 17-48.

Singh, G., Singh, A., & Dave, R. (2023). An Update on WHO Classification of Thoracic Tumours 2021- Newly Described Entities and Terminologies. Journal Of Clinical And Diagnostic Research, 17(6):EE01-EE05.

Śmiech, M., Leszczyński, P., Kono, H., Wardell, C., & Taniguchi, H. (2020). Emerging BRAF Mutations in Cancer Progression and Their Possible Effects on Transcriptional Networks. Genes, 11(11), 1-14.

Socinski, M. A., Obasaju, C., Gandara, D., Hirsch, F. R., Bonomi, P., Bunn, P. A., Kim, E. S., Langer, C. J., Natale, R. B., Novello, S., Paz-Ares, L., Pérol, M., Reck, M., Ramalingam, S. S., Reynolds, C. H., Spigel, D. R., Wakelee, H., & Thatcher, N. (2018). Current and Emergent Therapy Options for Advanced Squamous Cell Lung Cancer. Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer, 13(2), 165-183.

Song, Z., Wang, H., & Zhang, S. (2019). Negative regulators of Wnt signaling in non-small cell lung cancer: Theoretical basis and therapeutic potency. Biomedicine & Pharmacotherapy, 118, 109336.

Souza, G. R., Molina, J. R., Raphael, R. M., Ozawa, M. G., Stark, D. J., Levin, C. S., Bronk, L. F., Ananta, J. S., Mandelin, J., Georgescu, M. M., Bankson, J. A., Gelovani, J. G., Killian, T. C., Arap, W., & Pasqualini, R. (2010). Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. Nature nanotechnology, 5(4), 291-296.

Spagnolo, C. C., Ciappina, G., Giovannetti, E., Squeri, A., Granata, B., Lazzari, C., Pretelli, G., Pasello, G., & Santarpia, M. (2023). Targeting MET in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): A New Old Story? International Journal of Molecular Sciences, 24(12).

Spitaleri, G., Trillo Aliaga, P., Attili, I., Del Signore, E., Corvaja, C., Corti, C., Uliano, J., Passaro, A., & de Marinis, F. (2023). MET in Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC): Cross 'a Long and Winding Road' Looking for a Target. Cancers, 15(19), 4779.

Stewart, D. J. (2014). Wnt signaling pathway in non-small cell lung cancer. Journal of the National Cancer Institute, 106(1).

Stinchcombe, T. E. (2020). Current management of RET rearranged non-small cell lung cancer. Therapeutic Advances in Medical Oncology, 12, 1-11.
Stinchcombe, T. E., & Gore, E. M. (2010). Limited-stage small cell lung cancer: current chemoradiotherapy treatment paradigms. The oncologist, 15(2), 187-195.
Strober, W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. Current protocols in immunology, 111(1), A3.B.1.
Suliman, M. A., Zhang, Z., Na, H., Ribeiro, A. L. L., Zhang, Y., Niang, B., Hamid, A. S., Zhang, H., Xu, L., & Zuo, Y. (2016). Niclosamide inhibits colon cancer progression through downregulation of the Notch pathway and upregulation of the tumor suppressor miR-200 family. International journal of molecular medicine, 38(3), 776-784.
Tellez-Gabriel, M., Cochonneau, D., Cadé, M., Jubelin, C., Heymann, M. F., & Heymann, D. (2019). Circulating Tumor Cell-Derived Pre-Clinical Models for Personalized Medicine. Cancers, 11(1).
Teng, Y. (2015). Hanging Drop Aggregation Assay of Breast Cancer Cells. BIO-PROTOCOL, 5(3).
Togo, H., Yoshikawa-Terada, K., Hirose, Y., Nakagawa, H., Takeuchi, H., & Kusunoki, M. (2021). Development of a simple spheroid production method using fluoropolymers with reduced chemical and physical damage. Applied Sciences, 11(21), 10495.
Toh, Y. C., Raja, A., Yu, H., & Van Noort, D. (2018). A 3D Microfluidic Model to Recapitulate Cancer Cell Migration and Invasion. Bioengineering, 5(2), 29.
Travis, W. D., Brambilla, E., Nicholson, A. G., Yatabe, Y., Austin, J. H. M., Beasley, M. B., Chirieac, L. 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: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer, 10(9), 1243-1260.
Tripathi, S., Mandal, S. S., Bauri, S., & Maiti, P. (2023). 3D bioprinting and its innovative approach for biomedical applications. MedComm, 4(1).
Tung, Y., Hsiao, A., Allen, S., Torisawa, Y., Ho, M., & Takayama, S. (2011). High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array, Analyst, 136, 473-478.
Ustyugov, A. A., Chicheva, M. M., Lysikova, E. A., Vikhareva, E. A., Sipyagina, N. A., Malkova, A. N., Straumal, E. A., Bovina, E. V., Senatov, F. S., Salimon, A. I., Maksimkin, A. V., & Lermontov, S. A. (2018). Development of 3D Cell Culture on Ultra-High Molecular Weight Polyethylene (UHMWPE) as the Basis of Cellular Matrix. Biomedical Chemistry: Research and Methods, 1(3), e00048-e00048.
Vadivelu, R. K., Kamble, H., Shiddiky, M. J. A., & Nguyen, N. T. (2017). Microfluidic Technology for the Generation of Cell Spheroids and Their Applications. Micromachines, 8(4).
Vis, M. A. M., Ito, K., & Hofmann, S. (2020). Impact of Culture Medium on Cellular Interactions in in vitro Co-culture Systems. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 8, 911.
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.

Walia, R., Jain, D., Madan, K., Sharma, M. C., Mathur, S. R., Mohan, A., Iyer, V. K., & Kumar, L. (2017). p40 & thyroid transcription factor-1 immunohistochemistry: A useful panel to characterize non-small cell lung carcinoma-not otherwise specified (NSCLC-NOS) category. The Indian Journal of Medical Research, 146(1), 42.

Wang, H., Guo, M., Wei, H., & Chen, Y. (2023). Targeting p53 pathways: mechanisms, structures, and advances in therapy. Signal Transduction and Targeted Therapy, 8(1).

Wanigasekara, J., Carroll, L. J., Cullen, P. J., Tiwari, B., & Curtin, J. F. (2023). Three-Dimensional (3D) in vitro cell culture protocols to enhance glioblastoma research. PloS One, 8;18(2):e0276248.

Weinbach, E. C., & Garbus, J. (1969). Mechanism of action of reagents that uncouple oxidative phosphorylation. Nature, 221(5185), 1016-1018.

Whyte, L., Huang, Y. Y., Torres, K., & Mehta, R. G. (2007). Molecular Mechanisms of Resveratrol Action in Lung Cancer Cells Using Dual Protein and Microarray Analyses. Cancer Research, 67(24), 12007-12017.

Witzig, T. E., Reeder, C., Han, J. J., LaPlant, B., Stenson, M., Tun, H. W., Macon, W., Ansell, S. M., Habermann, T. M., Inwards, D. J., Micallef, I. N., Johnston, P. B., Porrata, L. F., Colgan, J. P., Markovic, S., Nowakowski, G. S., & Gupta, M. (2015). The mTORC1 inhibitor everolimus has antitumor activity in vitro and produces tumor responses in patients with relapsed T-cell lymphoma. Blood, 126(3), 328-335.

Wolf, J., Seto, T., Han, J.-Y., Reguart, N., Garon, E. B., Groen, H. J. M., Tan, D. S. W., Hida, T., de Jonge, M., Orlov, S. V., Smit, E. F., Souquet, P.-J., Vansteenkiste, J., Hochmair, M., Felip, E., Nishio, M., Thomas, M., Ohashi, K., Toyozawa, R., … Heist, R. S. (2020). Capmatinib in MET Exon 14–Mutated or MET -Amplified Non–Small-Cell Lung Cancer . New England Journal of Medicine, 383(10), 944-957.

Xue, W., Cai, L., Li, S., Hou, Y., Wang, Y. D., Yang, D., Xia, Y., & Nie, X. (2023). WNT ligands in non-small cell lung cancer: from pathogenesis to clinical practice. Discover. Oncology, 14(1), 136.

Yamada, K. M., Doyle, A. D., Lu, J., Gov, K. Y., & Yamada, K M. (2022). Cell–3D matrix interactions: recent advances and opportunities. Trends in Cell Biology, 32(10):883-895.

Yan, M., Li, G., & An, J. (2017). Discovery of small molecule inhibitors of the Wnt/β-catenin signaling pathway by targeting β-catenin/Tcf4 interactions. Experimental Biology and Medicine, 242(11), 1185.

Yan, N., Guo, S., Zhang, H., Zhang, Z., Shen, S., & Li, X. (2022). BRAF-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer: Current Treatment Status and Future Perspective. Frontiers in Oncology, 31;12:863043.

Yang, S., Hu, H., Kung, H., Zou, R., Dai, Y., Hu, Y., Wang, T., Lv, T., Yu, J., & Li, F. (2023). Organoids: The current status and biomedical applications. MedComm, 17;4(3):e274.

Yang, X., Tang, Z., Li, J., Jiang, J., & Liu, Y. (2023). Progress of non-small-cell lung cancer with ROS1 rearrangement. Frontiers in molecular biosciences, 10:1238093.

Yao, Y., Zhang, Q., Li, Z., & Zhang, H. (2024). MDM2: current research status and prospects of tumor treatment. Cancer Cell International 2024 24:1, 24(1), 1-13.

Yu, M., Chen, J., Xu, Z., Yang, B., He, Q., Luo, P., Yan, H., & Yang, X. (2023). Development and safety of PI3K inhibitors in cancer. Archives of Toxicology, 97(3), 635.

Yu, X., Narayanan, S., Vazquez, A., & Carpizo, D. R. (2014). Small molecule compounds targeting the p53 pathway: are we finally making progress? Apoptosis, 19(7), 1055.

Yuan, R., Kay, A., Berg, W. J., & Lebwohl, D. (2009). Targeting tumorigenesis: Development and use of mTOR inhibitors in cancer therapy. Journal of Hematology and Oncology, 2(1), 1-12.

Zanoni, M., Piccinini, F., Arienti, C., Zamagni, A., Santi, S., Polico, R., Bevilacqua, A., & Tesei, A. (2016). 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. Scientific Reports, 6(1), 1-11.

Zappa, C., & Mousa, S. A. (2016). Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. Translational Lung Cancer Research, 5(3), 288.

Zhang, F., Zhang, T., Qu, Y., Jiang, T., Cao, Y. X., Li, C., Fan, L., & Mei, Q. B. (2010). Replication-dependent γ-H2AX formation is involved in docetaxel-induced apoptosis in NSCLC A549 cells. Oncology reports, 24(5):1297-305.

Zhang, Z., Shiratsuchi, H., Lin, J., Chen, G., Reddy, R. M., Azizi, E., Fouladdel, S., Chang, A. C., Lin, L., Jiang, H., Waghray, M., Luker, G., Simeone, D. M., Wicha, M. S., Beer, D. G., Ramnath, N., & Nagrath, S. (2014). Expansion of CTCs from early stage lung cancer patients using a microfluidic co-culture model. Oncotarget, 5(23), 12383-12397.

Zuo, Y., Yang, D., Yu, Y., Xiang, M., Li, H., Yang, J., Li, J., Jiang, D., Zhou, H., Xu, Z., & Yu, Z. (2018). Niclosamide enhances the cytotoxic effect of cisplatin in cisplatin-resistant human lung cancer cells via suppression of lung resistance-related protein and c-myc. Molecular medicine reports, 17(3), 3497-3502.

EKLER

EK 1 BSA Protein Standard Eğri Grafiği
EK 2 GENSENTA Şirketi teşekkür mektubu

EK-1 BSA Standard Eğri Grafiği

