T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI

ÜÇ BOYUTLU BİYOBASKILAMA YÖNTEMİYLE AKCİĞER KANSER KÖK HÜCRELERİ KULLANILARAK IN-VITRO KO-KÜLTÜR SİSTEMİNDE AKCİĞER ÜÇ BOYUTLU TÜMÖR MİKRO-ÇEVRESİNİN OLUŞTURULMASI

SEDAT YENİAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

DR. ÖĞR. ÜYESİ SİBEL GÜNEŞ BAĞIŞ

Eskişehir, 2024

T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI

ÜÇ BOYUTLU BİYOBASKILAMA YÖNTEMİYLE AKCİĞER KANSER KÖK HÜCRELERİ KULLANILARAK IN-VITRO KO-KÜLTÜR SİSTEMİNDE AKCİĞER ÜÇ BOYUTLU TÜMÖR MİKRO-ÇEVRESİNİN OLUŞTURULMASI

SEDAT YENİAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

DR. ÖĞR. ÜYESİ SİBEL GÜNEŞ BAĞIŞ

Eskişehir, 2024

Proje No: ESOGÜ-BAP TYL-2023-2647

ÖZET

Başlık: Üç boyutlu biyobaskılama yöntemiyle akciğer kanser kök hücreleri kullanılarak in-vitro ko-kültür sisteminde akciğer üç boyutlu tümör mikro-çevresinin oluşturulması

Amaç: Doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta en çok kullanılan yöntemlerden biri olan 3 boyutlu (3B) biyobaskı teknolojisi, kök hücre çalışmaları ve ilaç araştırmalarının da içerisinde olduğu birçok fizyolojik mekanizmanın aydınlatılmasında kullanılan önemli bir tekniktir. Bu teknolojideki ilerlemelere rağmen tam anlamıyla küçük hücreli dışı akciğer (AC) kanseri (A549) modelleri gerçek AC tümör dokusunu taklit etmekte yetersiz kalmaktadır. Bu çalışmada in vivo tümör mikroçevresini morfolojik ve fonksiyonel bir 3B organoid tipte biyobaskı yöntemiyle oluşturabilmek için; AC kanser kök hücreleri, insan endotel hücreleri (EA.hy926) ve sağlıklı AC epitel hücrelerinin (BEAS-2B); tümör mikromimarisi ve hava-sıvı arayüzeyine uygun olarak 3B biyobaskılanması ve karakterizasyonu amaçlandı.

Yöntem: EA.hy926 hücreleri in-vivo mikromimari düzenine uygun olarak transwell membrana ekilerek kaplandı. BEAS-2B ve KKH hücreleri özelliklerine uygun olarak geliştirdiğimiz iki tip biyomürekkep kullanılarak 3B biyobaskılanarak hava-sıvı arayüzeyinde kültür edildi. Elde edilen AC 3B tümör mikroçevresi organoidinde canlı/ölü, SEM, histokimya ve immunofluoresan analizleri ile karakterize edildi.

Bulgular: Hem biyomürekkep 1'in (BEAS-2B hücreleri) hem de biyomürekkep 2'nin (BEAS-2B ve AKKH) hücre canlılığı, por çapı ve hücre boyutları açıcından in vivodaki mikromimarisine ve hücreye spesifik olan belirteçlerine uyumlu olduğu görüldü.

Sonuç: Geliştirilen bu biyomürekkepler, biyobaskılama tasarımı ve hava-sıvı arayüzeyi modellerinin; ileride tümör mikroçevresinde bulunan diğer hücrelerin de eklendiği ve uzun süreli kültüre olanak tanıyan biyoreaktörler kullanılarak kurgulanan çalışmalara ihtiyaç duyulduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri, tümör mikroçevresi, kanser kök hücre, üç boyutlu biyoyazıcı

ABSTRACT

Title: Establishment of three-dimensional tumor microenvironment in an in-vitro co-culture system using lung cancer stem cells through a three-dimensional bioprinting method

Objective: Three-dimensional (3D) bioprinting technology, one of the most widely used methods in tissue engineering and regenerative medicine, is an important technique used to elucidate many physiological mechanisms, including stem cell studies and drug research. Despite the advances in this technology, complete non-small cell lung cancer (A549) models are insufficient to mimic real lung tumor tissue. This study, aimed to 3D bioprint and characterize lung cancer stem cells, human endothelial cells (EA.hy926), and healthy lung epithelial cells (BEAS-2B) by the tumor microarchitecture and air-liquid interface to create a morphological and functional 3D organoid-type bioprinting method for in vivo tumor microenvironment.

Method: EA.hy926 cells were seeded and plated on a transwell membrane by the in-vivo microarchitecture scheme. BEAS-2B and CCS cells were cultured at the air-liquid interface by 3D bioprinting using two types of bioinks we developed by their properties. The resulting lung 3D tumor microenvironment organoid was characterized by live/dead, SEM, histochemistry, and immunofluorescence analysis.

Results: Both bioink 1 (BEAS-2B cells) and bioink 2 (BEAS-2B and CCS) were consistent with in vivo microarchitecture and cell-specific markers in terms of cell viability, pore diameter, and cell size.

Conclusion: These developed bioinks, bioprinting design, and air-liquid interface models need further studies using bioreactors that allow for long-term culture and the addition of other cells in the tumor microenvironment.

Keywords: Non-small cell lung cancer, tumor microenvironment, cancer stem cells, three-dimensional bioprinting.

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY SAYFASI .....
ETİK BEYAN .....
TEŞEKKÜR .....
ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
İÇİNDEKİLER ..... **iii**
TABLOLAR DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xi**
1. GİRİŞ VE AMAÇ **1**
2. GENEL BİLGİLER **2**
2.1. Kanser 2
2.1.1. Akciğer kanseri 3
2.1.1.1. Akciğer kanseri tipleri *5*
2.1.2. Akciğer kanser kök hücreleri 5
2.1.3. Mikroçevre ve akciğer tümör mikroçevresi 6
2.2. Üç Boyutlu Yapı İskelesinde Kanser Modelleri 8
2.2.1. Akciğer tümör mikroçevresinin üç boyutlu modelleme çalışmaları 11
2.3. Doku Mühendisliği Modeli 12
2.3.1. İskeleler 13
2.3.2. Hücreler 14
2.3.2.1. Kök hücreler *15*
2.3.3. Besiyeri ve kültür koşulları 17
2.4. Bir Doku Mühendisliği Modelinin Özellikleri 17
2.4.1. Biyouyumluluk 17
2.4.2. Biyobozunabilirlik 18
2.4.3. Mekanik özellikler 18
2.4.4. İskele mimarisi 18
2.5. Biyobaskı için Hidrojeller 19

2.5.1. Doğal hidrojeller 19
2.5.1.1. Kolajen *20*
2.5.1.2. Jelatin *20*
2.5.1.3. Fibrin *20*
2.5.1.4. Aljinat *21*
2.5.2. Sentetik hidrojeller 22
2.5.2.1. Poli(2-hidroksietil metakrilat) *22*
2.5.2.2. Poli(vinil alkol) *22*
2.5.2.3. Poli(etilen glikol) *23*
2.6. Üç Boyutlu Biyoyazıcı Teknolojileri ve Çeşitleri 23
2.6.1. Biyobaskı aşamaları 24
2.6.2. Çeşitli 3B biyobaskı teknolojileri 24
2.6.2.1. Ekstrüzyon tabanlı biyoyazıcılar *25*
2.6.2.2. Mürekkep püskürtme tabanlı biyoyazıcılar *26*
2.6.2.3. Lazer destekli biyoyazıcı teknolojisi *27*
2.6.2.4. Stereolitografi teknolojisi *28*
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER 30
3.1. Kullanılan Kimyasal Materyaller 30
3.2. Kullanılan Cihazlar 33
3.3. Deney Grupları 34
3.4. Hücrelerin Temini, Çözdürülmesi, İzolasyonu ve Kültüre Edilmesi 35
3.4.1. İnsan endotelyal hücrelerinin (EA.hy926) çözdürülmesi ve kültüre edilmesi 35
3.4.2. İnsan normal bronşiyal epitel hücrelerinin çözülmesi ve kültüre edilmesi 35
3.4.3. Akciğer kanseri hücrelerinin temini, çözdürülmesi ve kültürü 36
3.5. İzole Edilmiş $CD326^+$ $CD133^+$ $CD44^+$ Akciğer Kanser Kök Hücrelerin Karakterizasyonu ve Kültürü 37
3.5.1. İzole edilen $CD326^+CD133^+CD44^+$ akciğer kanser kök hücrelerinin tümörsferik kültürü 37
3.5.2. $CD326^+$CD133 $CD44^+$ akciğer kanser kök hücrelerin flow sitometri ile karakterizasyonu 38
3.5.3. $CD326^+CD133^+CD44^+$ akciğer kanser kök hücrelerinin ALP analizi 39

3.5.4. $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ akciğer kanser kök hücrelerin telomeraz aktivitesi analizi 40
3.6. Transwell Membranların İnsan Endotelyal Hücreleri ile İki Taraflı Kaplaması 40
3.7. Ön Biyobaskı Çalışması için Biyomürekkep Hazırlanması ve Karakterizasyonu 40
3.8. Üç Boyutlu (3B) Biyoyazıcı ile Hücre Yüklü Biyomürekkebin Kokültür için EA Kaplı Transwell Membranlara Basılması ve Karakterizasyonu 43
3.8.1. BEAS-2B yüklü biyomürekkebin basılması (1. grup) 43
3.8.2. BEAS (biyomürekkep 1) ve $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ akciğer kanser kök hücre yüklü biyomürekkebin (biyomürekkep 2) basılması (2. grup) 45
3.8.3. Biyomürekkep 1 'in taramalı elektron mikroskobuyla (SEM) karakterizasyonu 46
3.8.4. Canlı/ölü işaretleme ile hücre metabolik aktivite testi 47
3.8.5. Histokimyasal analiz 47
3.8.6. İmmunofloresan işaretleme 48
3.9. İstatistiksel Analiz 48
4. BULGULAR 49
4.1. Hücrelerin Temini, Çözdürülmesi, Kültürü ve Karakterizasyonu 49
4.1.1. İnsan endotelyal hücrelerinin çözülmesi ve kültürü 49
4.1.2. İnsan normal bronşiyal epitel hücrelerinin çözülmesi ve kültürü 49
4.1.3. İnsan adenokarsinomik alveoler bazal epitel hücresinin (A549) çözdürülmesi ve kültürü 50
4.1.4. $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ akciğer kanser kök hücrelerin çözdürülmesi ve kültürü 51
4.1.5. $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ akciğer kanser kök hücrelerin tümörsferik üç boyutlu kültürde çoğaltılması 51
4.1.6. $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ akciğer kanser kök hücrelerin flow sitometri ile karakterizasyonu 52
4.1.7. $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ akciğer kanser kök hücrelerin ALP analizi 53
4.1.8. $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ akciğer kanser kök hücrelerin telomeraz aktivitesi analizi 54
4.2. İnsan Endotelyal Hücrelerinin Membran Kaplaması 55

4.4. Canlı/Ölü İşaretleme ile Hücre Metabolik Aktivite Testi 56
4.5. Histokimyasal Analiz 59
4.6. İmmunofloresan İşaretleme 62
5. TARTIŞMA 65
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 69
7. KAYNAKLAR DİZİNİ 71
8. EKLER DİZİNİ ..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
EK-1 Benzerlik Raporu
9. ÖZGEÇMİŞ ..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
10. YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI ..... Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. Hücre grupları 34

Tablo 3.2. Deney grupları 34

Tablo 3.3. Üç boyutlu biyoyazıcı operasyonel parametreleri 41

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Tümörün ilerlemesi, invasyonu ve metastazı sırasında kanser hücresi plastisitesinden yararlanan patofizyolojik süreçler 8

Şekil 2.2. Doğal 3B mimarisi, geleneksel 2B hücre kültürleri ve yeni 3B hücre kültürü yaklaşımları ile epitel dokularının şematik gösterimi 10

Şekil 2.3. Doku mühendisliği üçlüsünün bileşenleri 13

Şekil 2.4. Endodermal, mezodermal ve ektodermal germ katmanları ve bunların farklılaşmış soyları 16

Şekil 2.5. Aljinatın kimyasal yapısı 21

Şekil 2.6. Biyobaskı sürecinde yer alan adımların akış şeması 24

Şekil 2.7. 3B Biyoyazıcı Çeşitleri 25

Şekil 3.1. pNPP'den, *p*-nitrofenol oluşumu 39

Şekil 3.2. Üç boyutlu ön biyobaskı 43

Şekil 3.3. BEAS-2B yüklü biyomürekkebin (1. grup) basılması 45

Şekil 3.4. Kanser kök hücre yüklü biyomürekkebin (2. grup) basılması 46

Şekil 3.5. Genel biyobaskı aşamalarından görüntüler 46

Şekil 4.1. Kültüre alındıktan sonra insan endotelyal hücrelerinin (EA.hy926) erken ve ileri pasajlardaki faz-kontrast mikroskop görüntüleri……..…….....49

Şekil 4.2. Kültüre alındıktan sonra BEAS-2B hücrelerinin erken ve ileri pasajlardaki faz-kontrast mikroskop görüntüleri 50

Şekil 4.3. Kültüre alındıktan sonra insan adenokarsinomik alveoler bazal epitel hücresinin (A549) erken ve ileri pasajlardaki faz-kontrast mikroskop görüntüleri 50

Şekil 4.4. Kültüre alındıktan sonra $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ akciğer kanser kök hücrelerin erken ve ileri pasajlardaki faz-kontrast mikroskop görüntüleri 51

Şekil 4.5. Akciğer kanser kök hücrelerin tümörsferoid tipte 3B kültür ortamında sferoid oluşumlarının faz kontrast mikroskobik görüntüleri..... 52

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam Ediyor)

Şekil 4.6. $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ akciğer kanser kök hücrelerin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonu 53

Şekil 4.7. A549 hücre hattından izole edilen akciğer kanser kök hücrelerinin (AKKH) ALP enzim aktivitesi açısından hem ebeveyni (A549) hem de sağlıklı BEAS-2B hücreleri ile karşılaştırılması 54

Şekil 4.8. A549 hücre hattından izole edilen akciğer kanser kök hücrelerinin (AKKH) telomeraz enzim aktivitesi açısından hem ebeveyni (A549) hem de sağlıklı BEAS-2B hücreleri ile karşılaştırılması 54

Şekil 4.9. İnsan endotelyal hücreleri (EA.hy926) hücrelerinin transwell membranla kaplandıktan sonra besiyerinde 24 saatlik kültür sonrası görüntüleri 55

Şekil 4.10. BEAS-2B yüklü iskelelerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) görüntüsü 56

Şekil 4.11. Üç boyutlu biyobaskılanmış ve 7 gün boyunca hava-sıvı arayüzeyinde (ALI) kokültür edilmiş akciğer tümör modelindeki EA.hy926 hücreleri kaplı transwell membranın canlı/ölü boyama testi 57

Şekil 4.12. Üç boyutlu biyobaskılanmış ve 7 gün boyunca hava-sıvı arayüzeyinde kokültür edilmiş akciğer tümör modelindeki $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ akciğer kanser kök hücre yüklü damlacık şeklindeki iskelenin canlı/ölü boyama testi 57

Şekil 4.13. Üç boyutlu biyobaskılanmış ve 7 gün boyunca hava-sıvı arayüzeyinde kokültür edilmiş akciğer tümör modelindeki BEAS-2B hücresi yüklü iskelenin canlı/ölü boyama testi 58

Şekil 4.14. Üç boyutlu biyobaskılanmış ve 7 gün boyunca hava-sıvı arayüzeyinde kokültür edilmiş akciğer tümör modelinde transwell membrana kaplanmış olan EA.hy926 hücrelerinin canlı/ölü boyama karşılaştırması 58

Şekil 4.15. Üç boyutlu biyobaskılanmış ve 7 gün boyunca hava-sıvı arayüzeyinde kokültür edilmiş akciğer tümör modelindeki $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ akciğer kanser kök hücre yüklü damlacık şeklindeki iskelenin canlı/ölü boyama karşılaştırması 59

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam Ediyor)

Şekil 4.16. Üç boyutlu biyobaskılanmış ve 7 gün boyunca hava-sıvı arayüzeyinde kokültür edilmiş akciğer tümör modelindeki BEAS-2B hücresi yüklü iskelenin canlı/ölü boyama karşılaştırması 59

Şekil 4.17. Grup 1 H&E boyama görüntüleri 60

Şekil 4.18. Grup 2 H&E boyama görüntüleri 61

Şekil 4.19. Üç boyutlu biyobaskılanmış ve 7 gün boyunca hava-sıvı arayüzeyinde kokültür edilmiş BEAS iskelesinin immunofloresan işaretleme yöntemi ile CD44 ve CD133 karakterizasyon analizi 62

Şekil 4.20. Üç boyutlu biyobaskılanmış ve 7 gün boyunca hava-sıvı arayüzeyinde kokültür edilmiş akciğer tümör modelinin (AKKH'lerin) immunofloresan işaretleme yöntemi ile CD44 ve CD133 karakterizasyon analizi 63

Şekil 4.21. Grup 1'in immunofloresan boyamada CD44 ve CD133 belirteçlerinin pozitiflik oranı karşılaştırması 64

Şekil 4.22. Grup 2'nin immunofloresan boyamada CD44 ve CD133 belirteçlerinin pozitiflik oranı karşılaştırması 64

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

2B : İki boyutlu

3B : Üç boyutlu

A549 : İnsan akciğer karsinoma epitelyal hücre hattı

AKKH : Akciğer kanser kök hücre

Au : Altın

BEAS-2B veya **Beas** : İnsan normal bronşiyal hücre hattı

BSA : Bovin serum albumin

$CaCI_2$: Kalsiyum klorür

CAD : Bilgisayar destekli tasarım

CAM : Bilgisayar destekli üretim

CD : Farklılaşma kümeleri

DAPI : 4',6-diamidino-2-fenilindol

Dk : Dakika

DSÖ : Dünya sağlık örgütü

EA.hy926 : İnsan endotelyal hücre hattı

ECM : Hücre dışı matriks

EDTA : Etilendiamin tetraasetik asit

EGF : Epidermal büyüme faktörü

FACS : Akış sitometrisi hücre sıralaması

FBS : Fetal sığır serumu

FGF : Fibroblast büyüme faktörü-1

G : Santrifüj kuvveti

GelMA : Jelatin metakrilat

H&E : Hematoksilen ve eozin

IF : Immunoflouresan

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

ITOP : Bütünleşmiş doku-organ yazıcısı

iPSC : İndüklenmiş pluripotent kök hücre

KHAK : Küçük hücreli akciğer kanseri

KHDAK : Küçük hücreli dışı akciğer kanseri

KKH : Kanser kök hücre

LAP : Lityum fenil-2,4,6-trimetilbenzoilfosfinat

LIFT : Lazer kaynaklı ileri transfer

ml veya **mL** : Mililitre

mM : Milimolar

p-D-HEMA : Poly 2-hidroksietil metakrilat

PBS : Fosfat salin tamponu

Pd : Paladyum

PDMS : Poli dimetil siloksan

PEG : Poli etilen glikol

PEGDA : Poli etilen glikol diakrilat

PVA : Poli vinil alkol

RNA : Ribonükleik asit

RPMI : Roswell park memorial institute

SCID : Şiddetli kombine immun yetmezlik

SLA : Stereolitografi

TMÇ : Tümör mikroçevresi

UV : Ultraviyole

qRT-PCR : Kantitatif real time polimeraz zincir reaksiyonu

w/v : Ağırlık/hacim

µl : Mikrolitre

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Doku mühendisliği stratejilerinde umut verici bir yaklaşım olan üç boyutlu (3B) hücre kültürü modelleri, fizyolojik mekanizmaları, hastalık patolojilerini anlamamızı büyük ölçüde etkilemesi ve ilaç geliştirmeyi önemli ölçüde artırması beklenen *in-vitro* fizyolojik modellerin tasarımı ve biyofabrikasyonu için hücreleri ve biyoaktif matris bileşenlerini kullanan biyobaskı teknolojisinin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Biyobaskı teknolojisinin en büyük gücü (i) yüksek verimli tarama için standartlaştırılmış ve tekrarlanabilir hücre modelleri sağlaması, (ii) spesifik (hastalıklı) doku modellerinin özelleştirilmesi ve (iii) katman katman karmaşık 3B yapılar oluşturmak için biyomalzemelerin birikimini mekansal ve zamansal olarak kontrol etme imkanı sunmasıdır. Çeşitli biyobaskı stratejilerinin geliştirilmesiyle birlikte, bunların rejeneratif tıp, kanser araştırmaları ve aynı zamanda ilaç keşfi, toksikoloji veya temel araştırmalarda kullanılmak üzere uygulanmasına yönelik araştırmalar giderek artmaktadır. Doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta en çok kullanılan yöntemlerden biri olan 3B biyobaskı teknolojisi bu amaçla kullanılan önemli bir tekniktir. 3B biyobaskı, yaralı veya hastalıklı doku ve organların yerini alacak doku ve organ yapılarının yapımında çeşitli uygulamalara sahip gelişmekte olan bir teknolojidir. Ancak 3B biyobaskı teknolojisindeki ilerlemelere rağmen tam anlamıyla küçük hücreli dışı akciğer kanseri tümör modelleri hücre-hücre teması, ekstrasellüler matriks-hücre etkileşimi açılarından hala gerçek akciğer tümör dokusunu taklit etmekte eksik kalmaktadır.

Bu çalışmada, şimdiye kadar yapılan akciğer tümör mikro çevresini taklit etmede yetersiz kalan laboratuvarlar arasında deney tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğu akciğer tümör hücre hatları (A549) kullanılarak bu hücrelerden izole edilen akciğer kanser kök hücrelerinin bir hidrojel karışımına enkapsüle edilerek biyomürekkep haline getirilmesi ve 3B biyobaskılanması, enkapsüle edilen sağlıklı akciğer epitel hücrelerinin 3B biyobaskılanması ve bunların insan endotel hücreleri kaplı transwell insert membran üzerinde tümör mikromimarisi ve hava-sıvı arayüzeyine uygun olarak kokültürü ve karakterizasyonu amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser kadınlarda ve erkeklerde en çok görülen ölüm nedenlerinden biridir (Global Burden of Disease Cancer Collaboration, 2017). Kanser, bedenin hemen hemen her organında veya dokusunda, anormal hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyüme, diğer bölgeleri istila etme (metastaz) veya yayılma (invazyon) potansiyeline sahip karmaşık bir grup hastalıktır (Seyfried & Shelton, 2010). Neoplazm ve kötü huylu tümör (malign) kanser için kullanılan diğer yaygın isimlerdir. Eğer bir kişide kötü huylu bir tümör varsa, bu tümör kanserdir. Diğer tümör türleri kanserli değildir. Üç ana tümör tipi vardır: iyi huylu (bening), premalign ve kötü huylu (malign) tümörler. Bening tümörler kanser değildir. Yakındaki dokuyu istila etmezler veya vücudun diğer bölgelerine yayılmazlar. Premalign tümörlerde hücreler henüz kanserli değildir, ancak potansiyel olarak kötü huylu hale gelebilirler. Malign tümörler kanserlidir. Hücreler büyüyebilir ve vücudun diğer bölgelerine yayılabilir.

Yapılan araştırmalarda, hücrede meydana gelen altı temel değişikliğin malign değişikliklere neden olabileceği öne sürülmüştür. Bu değişiklikler; büyüme sinyallerinde kendi kendine yeterlilik, büyümeyi engelleyici (büyüme karşıtı) sinyallere karşı duyarsızlık, programlanmış hücre ölümünden (apoptoz) kaçınma, sınırsız çoğalma potansiyeli, sürekli vaskülarite yeteneği (anjiyogenez) ve doku istilası ve metastazdır (Hanahan & Weinberg, 2000). Mutasyon kabiliyetinin artmasına yol açan genom istikrarsızlığı ise, altı ayırt edici özelliğin ortaya çıkmasını sağlayan temel kolaylaştırıcı neden olarak kabul edilmiştir (Hanahan & Weinberg, 2000).

Kanser, genetik mutasyonlar sonucu normal hücrelerin kontrol dışı büyüyerek tümör oluşturmasından kaynaklanır. Bu mutasyonlar genellikle DNA'da meydana gelir ve hücrelerin normal işlevlerini bozar. Kanser genellikle çevresel faktörler (örneğin, sigara içmek, radyasyona maruz kalmak) veya genetik yatkınlık gibi faktörlerin etkileşimi sonucunda ortaya çıkar. Bu mutasyonlar, hücre döngüsünün kontrolünde eksikliklere neden olarak kanser hücrelerinin kontrolsüz büyümesine ve yayılmasına yol açar (Hanahan & Weinberg, 2000).

Kanser tedavisi genellikle cerrahi müdahale, kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapi gibi yöntemleri içerir. Cerrahi müdahale tümörün çıkarılmasını amaçlarken, kemoterapi ve radyoterapi kanser hücrelerini öldürmeyi veya büyümelerini durdurmayı hedefler. İmmünoterapi ise vücudun bağışıklık sisteminin

kanserle savaşmasını teşvik ederek tedavi sağlar. Kanserin genetik temelleri ve tedavi yaklaşımları çok karmaşık bir konudur. Genetik araştırmaların kanserin nedenleri üzerindeki anlayışımızı artırmasıyla birlikte yeni tedavi yaklaşımları geliştirilmiştir. Ancak halen daha kesin bir çözüm bulunmamaktadır ve bu alandaki araştırmalar devam etmektedir (Vogelstein vd., 2013).

Kanser tedavisinin önemli bir kısmı etkili anti-tümör ilaçları geliştirmektir. Son birkaç on yılda, tümör oluşumu, ilerlemesi ve antitümör ilaç değerlendirmesi üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır, ancak bunlar çoğunlukla kanser hücrelerinin tek bir tabakada *in-vitro* olarak kültürlendiği 2 boyutlu (2B) tümör modeline dayanmaktadır (Mironov vd., 2003). Günümüzde her ne kadar kanser ilacı araştırmaları hayvan modellerinde yapılsa da hayvan modelleri insan hastalıklarını taklit etmekte yine başarısız kalmaktadır (Worp vd., 2010). Bunun dışında, çoğu hücre türü, 2B mikro ortamda kültürlendiğinde, hücre-hücre ve hücre-matris etkileşimleri (biyokimyasal sinyaller, metabolit konsantrasyon gradyanları ve mekanik kısıtlamalar) gibi kendi mikro ortamına benzer özelliklerinden ve işlevlerinden bazılarını kaybedecek veya değiştirecektir (Ozbolat vd., 2016). Tüm bu nedenler göz önüne alındığında 2B hücre kültürü yapılarla yapılan araştırmaların aksine 3 boyutlu (3B) hücre kültürüyle yapılan araştırmaların daha uygun olacağı aşikardır. Bunun için son yıllarda araştırmalarda çeşitli tür ve özelliklerde 3B Biyoyazıcı teknolojileri sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır.

2.1.1. Akciğer kanseri

Akciğer kanseri, bir tür kötü huylu tümör olarak, dünyada kanser ölümlerinin önde gelen nedenidir. Yüksek metastaz oranı ve yüksek nüks oranı riskin ana nedeni olan küçük hücreli dışı akciğer kanseri, akciğer kanserinin yaklaşık %80-85'ini oluşturmaktadır (Bareschino vd., 2011). Esas olarak hastalığın geç evresinde teşhis edildiği için en düşük 5 yıllık sağkalım oranlarından birine sahiptir. DSÖ'ye göre Akciğer kanseri dünya çapında 2020 yılında 1.8 milyon kişinin ölümüyle kanser türleri arasında en fazla mortalite oranına sahip, her yıl bildirilen milyonlarca yeni vaka ve ölümle sonuçlanan önemli bir halk sağlığı sorunudur. Türkiye'de, yılda yaklaşık 45 bin kişiye yeni akciğer kanseri tanısı konulmakta ve tüm yaş grupları için her yıl 100 binde 50 civarı kişide akciğer kanseri saptanmaktadır. (Park vd., 2012; DSÖ, 2020).

Akciğer kanseri için birincil risk faktörü, akciğer kanseri vakalarının büyük çoğunluğundan sorumlu olan tütün kullanımıdır (Jasim & Bahir, 2020). Ayrıca, hava

kirliliği ve mesleki tehlikeler gibi çevresel faktörlere maruziyet de akciğer kanseri gelişimine neden olabilmektedir. Genetik faktörler de akciğer kanserine yatkınlıkta rol oynamakta olup, birden fazla genetik yatkınlık ve direnç alelini içeren karmaşık bir kalıtım modeline işaret eden çalışmalar bulunmaktadır (Carr vd., 2015 Khan; Sherwani vd., 2021). Ayrıca, belirli genetik varyantlar akciğer kanseri gelişme riskine potansiyel katkıda bulunan faktörler olarak tanımlanmıştır. Genel bağlamda, akciğer kanserinin oluşumu genetik, çevresel ve hayat tarzı faktörlerinin bir araya gelmesinden etkilenen kapsamlı bir süreçtir. Bu çok yönlü etkilerin anlaşılabilmesi, akciğer kanseri risk yükünü azaltmaya yönelik etkili önleme ve müdahale mekanizmalarının geliştirilebilmesi için kritik önem taşımaktadır (Spinola vd., 2006; Cannon-Albright vd., 2023).

Akciğer kanserinin temel nedeni genellikle sigara içmek olsa da bazen sigara içmeyen bireylerde de görülebilir. Diğer olası risk faktörleri arasında hava kirliliği, maruz kalma toksik kimyasallar ve ailede akciğer kanseri öyküsü bulunması yer alır. Akciğer kanserinin belirtileri genellikle ileri aşamalarda ortaya çıkar ve bu belirtiler arasında, öksürük, kan tükürme, nefes darlığı, göğüs ağrısı ve kilo kaybı yer alabilir. Tanı genellikle görüntüleme testleri (örneğin bilgisayarlı tomografi) ve biyopsi ile konulur. Tedavi seçenekleri arasında cerrahi müdahale, kemoterapi, radyoterapi ve hedefe yönelik ilaç tedavileri bulunabilir. Ancak tedavi seçenekleri hastanın durumuna bağlı olarak değişebilir. Tüm bunların yanı sıra, erken tanının önemi büyüktür. Erken evre akciğer kanseri teşhisi konulduğunda daha etkili tedavi seçenekleri mevcut olabilir. Bu nedenle düzenli sağlık kontrollerine katılım önemlidir (Dela Cruz vd., 2011; Ambrosini vd., 2012).

Akciğerlerde başlayan kansere birincil akciğer kanseri denir. Vücudun başka bir yerinden akciğerlere yayılan kanser ikincil akciğer kanseri olarak bilinir. Primer akciğer kanserinin iki ana formu vardır. Bunlar kanserin büyümeye başladığı hücre tipine göre sınıflandırılır. Bunlar; küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve küçük hücreli akciğer kanseridir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri en yaygın formdur ve 100 vakadan yaklaşık 80 ila 85'ini oluşturur. Üç tipten biri olabilir: skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom veya büyük hücreli karsinom. Küçük hücreli akciğer kanseri ise genellikle küçük hücreli olmayan akciğer kanserinden daha hızlı yayılan daha az yaygın bir formdur (Meuwissen vd., 2001; Nakamura & Saji, 2013; M. Tang vd., 2021; Luo vd., 2020; Motono vd., 2017).

2.1.1.1. Akciğer kanseri tipleri

Akciğer kanseri, genellikle küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olarak iki ana türe ayrılan karmaşık bir hastalıktır (Hammerschmidt & Wirtz, 2009; O'Brien vd., 2018). KHDAK üç ana histolojik tipten oluşmaktadır: adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom (Meuwissen vd., 2001; Nakamura & Saji, 2013; Suda vd., 2014; Motono vd., 2017; Luo vd., 2020; M. Tang vd., 2021; X. Tang vd., 2022). Adenokarsinom, akciğer kanserinin en yaygın histolojik türüdür ve vakaların %25-40'ını oluşturur (Meuwissen vd., 2001; Nakamura & Saji, 2013; M. Tang vd., 2021; Luo vd., 2020; Motono vd., 2017). Öte yandan, KHAK tüm akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %15'ini temsil etmektedir (Mandal vd., 2020).

Bu tipler arasındaki ayrım sadece tanı için değil aynı zamanda tedavi kararları ve hasta sonuçlarının değerlendirilmesi için de önemlidir. Nitekim Uluslararası Akciğer Kanseri Çalışmaları Derneği, Amerikan Toraks Derneği ve Avrupa Solunum Derneği, akciğer adenokarsinomu için hasta sonuçlarını değerlendirdiği bildirilen baskın histolojik alt tiplere ilişkin yeni bir sınıflandırma geliştirmiştir (Suda vd., 2014). Böylece hasta yönetimi ve hasta prognozu için önemli veriler elde edilmiştir.

2.1.2. Akciğer kanser kök hücreleri

Akciğer kanserinde kanser kök hücrelerin varlığı 1981 yılında Carney ve arkadaşları tarafından tespit edilmiştir (Carney vd., 1981). Bu grup, akciğer adenokarsinomu hastalarından alınan tümör hücrelerinin yaklaşık %1,5'inin *in-vitro* kültürlendiğinde koloni oluşturabildiğini, dolayısıyla koloni oluşturan hücreler olarak adlandırıldığını ve çıplak farelere aşılandığında da tümörleri yeniden oluşturabildiğini bulmuştur. O zamandan bu yana, tek başına veya pluripotensi genlerinin diğer köklülükle ilişkili göstergeleriyle birlikte farklı kanser kök hücre yüzey belirteçleri kullanılarak akciğer kanserinde varsayılan veya iyi niyetli kanser kök hücrelerin varlığını doğrulayan çalışmalar yapılmıştır.

5-transmembranlı bir glikoprotein olan CD133 (prominin-1), akciğer kanserinde kanser kök hücre fraksiyonu için yerleşik bir belirteçtir. Örneğin, insan KHDAK dokularından ve akciğer kanseri hücre hatlarından elde edilen akış sitometrisi hücre sıralaması (FACS) ile zenginleştirilmiş $CD133^+$ hücreleri kendini yenileme, ilaç ve radyoterapi direnci sergilemiş ve çoklu ilaç direnci belirteci olan ABCG2 ile kök hücre

pluripotensi için bir belirteç olan oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktörü 4'ü (Oct4) birlikte ifade etmiştir (Y.-C. Chen vd., 2008). KHDAK dokularında epitelyal antijeni (ESA) birlikte eksprese eden yüksek seviyelerde $CD133^+$ tespit edilmiş, bu durum SCID fare modelinde yüksek tümörijenisiteyi, köklülükle ilişkili genlerin yüksek ekspresyonunu ve ilaçları efluks etme yeteneğini göstermiştir (Bertolini vd., 2009). Benzer şekilde, A549 kanser hücrelerinden büyütülen tümör küreleri yüksek düzeyde CD133, kendini yenileme, artan ilaç duyarsızlığı ve in vivo yüksek tümörijenisite ifade etmiş ve KKH ile ilişkili genleri, Oct 4 ve cinsiyet belirleyici bölge Y-box'ı (Sox2) ifade ederek KKH'lerin varlığına işaret etmiştir (Zhao vd., 2015). Bir çalışma, KHDAK hasta örneklerinden alınan CD133+ hücrelerinin tümör küreleri olarak büyütüldüğünde daha yüksek CD133 ekspresyonu elde ettiğini ve SCID farelerinde daha tümörijenik olduğunu göstermiştir. Bir çalışmada, KHAK hastalarından alınan $CD133^+$ sınıflandırılmış hücrelerin kemorezistans ve yüksek tümörijenisite ortaya çıkardığı ve yüksek AKT/PKB ve BCl-2 seviyelerine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Burada, CD133 ekspresyonu fare ve insan KHAK'inde kemoterapiden sonra artmıştır ve ikincisi kemoterapi alan bir hastadan alınan klinik örneklerde doğrulanmıştır. Bu da kanser kök hücrelerin kemoterapötiklere karşı içsel toleransına dair kanıt sağlamaktadır (Sarvi vd., 2014).

2.1.3. Mikroçevre ve akciğer tümör mikroçevresi

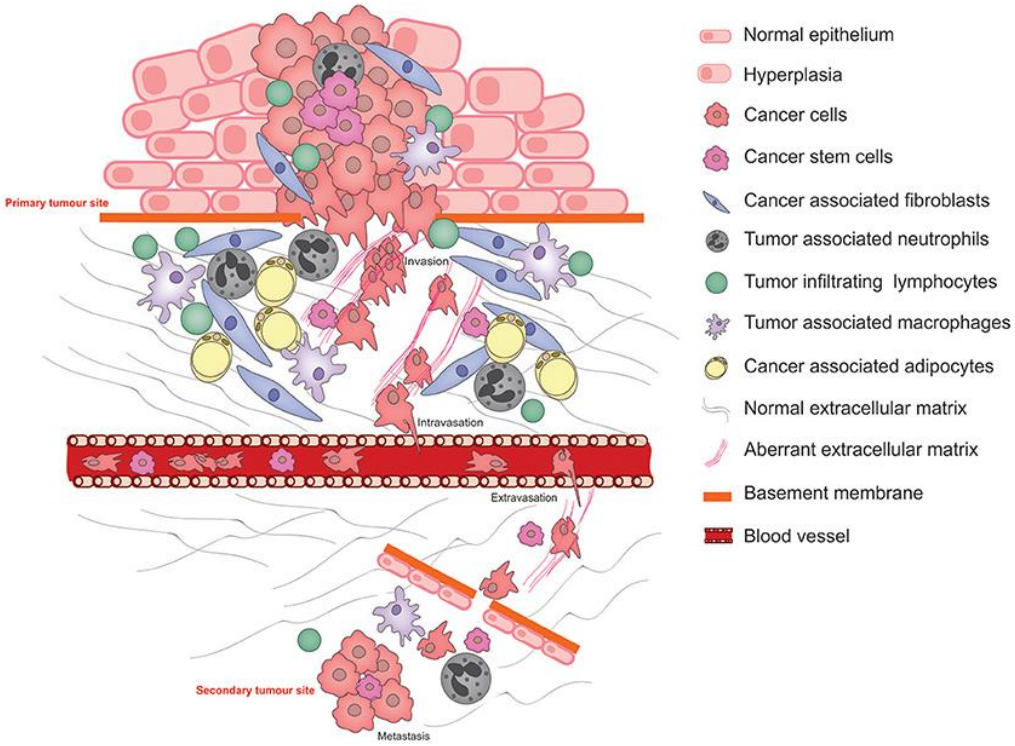
Mikroçevre, komşu hücreler, ekstraselüler matriks ve çözünebilir faktörler gibi çeşitli unsurları kapsayan, hücrelerin içinde bulunduğu spesifik niş veya çevreyi ifade eder. Kanser bağlamında, tümör mikroçevresi tümör ilerlemesi ve metastazında çok önemli bir rol oynar. Kanser büyümesini etkileyen spesifik bir niş oluşturan neoplastik olmayan hücrelerden oluşur (Hoarau-Véchot vd., 2018; J. Liu vd., 2021). Oldukça karmaşık olan tümör mikroçevresi, kanser hücreleri, bağışıklık hücreleri, stromal dokular ve ekstrasellüler matriks arasındaki etkileşimleri içerir (Taube vd., 2014; da Cunha vd., 2019) (Şekil 2.1.). Ayrıca, mikroçevre tümör hücrelerini normalleştirebilir, bu da stromal hücrelerin yeniden eğitilmesinin kanser tedavisi için etkili bir strateji olabileceğini düşündürmektedir (J. Liu vd., 2021).

Tümör mikroçevresinin (TMÇ) bileşimi ve tümör-stromal etkileşimler, tümör büyümesini ve metastazı şiddetlendiren ve kötü klinik sonuçlara yol açan başlıca faktörlerdir (Asghar vd., 2015; Mitchell vd., 2017; Langhans, 2018; Avnet vd., 2019). Aktive olmuş stromanın hastalığı tanımlayan bir faktör olduğuna dair kanıtlar giderek

artmakta ve kanser hücresinin invazyonunda/ekstravazasyonunda, migrasyonunda, anjiyogenezde, ilaç direncinde (McMillin vd., 2013; Maman & Witz, 2018), kanser kök hücre idamesinde (Batlle & Clevers, 2017) ve immünosürveyanstan kaçışta (McMillin vd., 2013; De Palma vd., 2017; Valkenburg vd., 2018) önemli bir oyuncu olduğunu vurgulamaktadır.

Tümör dokusunun immün mikro çevresi, immünoterapi ve kemoterapiye yanıt oranını yansıtmak için esastır (Pfannenstill vd., 2021). Tümör mikroçevresinin hedeflenmesinin immünoterapi için yeni bir strateji sağlayabileceği, geleneksel kanser tedavisinin direncini kırabileceği ve kişiselleştirilmiş tıbbın temelini oluşturabileceği görülmüştür (Pfannenstill vd., 2021). Ek olarak, mikro çevrenin yapısını yerleşik hücreler, ekstrasellüler matriks, sitokinler, kemokinlerin yanı sıra biyomekanik özellikler ve nutrisyon durumu belirler.

Biyomimetik doku mühendisliği olarak tümör mikro çevresini (TMÇ) *in-vitro* olarak yeniden oluşturmak, tümör hücreleri ve bir matriks veya iskele kullanmak, araştırmacıların son yıllarda çeşitli ilaçların etkinliğine ilişkin değerlendirmelerinde hata payını azaltmalarına yardımcı olmuştur.



Şekil 2.1. Tümörün ilerlemesi, invasyonu ve metastazı sırasında kanser hücresi plastisitesinden yararlanan patofizyolojik süreçler.

Özetle, mikro çevre, hücrelerin bulunduğu belirli bir niş veya çevreyi kapsar ve kanser süreci, doku rejenerasyonu ve kök hücre davranışı gibi çeşitli biyolojik süreçlerde çok önemli bir rol oynar. Mikro çevrenin anlaşılması ve hedeflenmesi, kanser tedavisi, rejeneratif tıp ve doku mühendisliğinde etkili stratejiler geliştirmek için gereklidir.

2.2. Üç Boyutlu Yapı İskelesinde Kanser Modelleri

Son zamanlarda, 2B hücre kültürleri ve laboratuvar hayvanları kanser modellemesi için altın standart olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, 2B kültürler kanser hücresi davranışını araştırmak için basitlik, düşük maliyet ve köklü yöntemler sunsa da, doğal 3B dokularda bulunan biyolojik, kimyasal ve mekanik ipuçlarını tekrarlamadıkları için doğal tümör dokusunun karmaşıklığını doğru bir şekilde taklit edemezler (Baker & Chen, 2012; Caliari & Burdick, 2016).

2B'de kültürlenen hücreler x-y düzleminde kısıtlı adezyona, zorlanmış apikal-bazal polariteye, kısıtlanmamış yayılmaya ve çözünür gradyan eksikliğine sahiptir. Sonuç olarak, gen ve protein ifadesinin, hücre çoğalmasının yanı sıra hücresel

morfoloji ve canlılığın etkilendiği ve bu nedenle KKH çalışmaları için kullanımlarını sınırladığı gösterilmiştir (Riedl vd., 2017).

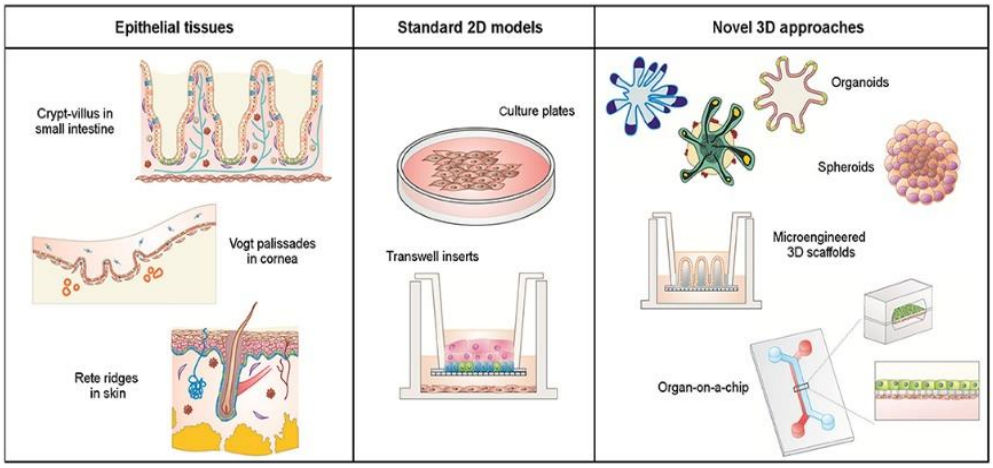
Öte yandan, hayvan modelleri, ksenograft büyümesini kolaylaştırmak için kanser hücrelerinin veya küçük doku parçalarının nakledilebileceği benzer bir doğal in vivo ortam sunar. Bununla birlikte, hayvan sistemleri maliyetlidir ve kontrol edilebilirlik, tekrarlanabilirlik ve tasarım esnekliği açısından kayda değer sınırlamalar sergiler. Ayrıca, hayvan araştırmalarında 3R (Replacement: Değiştirme, Reduction: Azaltma ve Refinement: İyileştirme) ilkesinin benimsenmesiyle, birincil araştırmalar için hayvan sistemlerinin kullanımı giderek daha da caydırıcı hale gelmektedir.

2B hücre kültürleri ile karmaşık hayvan modelleri arasındaki boşluğu doldurmak için 3B platformların uygulanması günümüzde yaygınlaşmıştır (Şekil 2.2.). Geleneksel olarak süspansiyon kültürleri, KKH'ler gibi ankrajdan bağımsız büyüme kabiliyetine sahip hücrelerdeki hücre kültürlerini izole etme ve zenginleştirme kapasiteleri nedeniyle referans yöntemler olarak hizmet etmiştir (Reynolds & Weiss, 1992; Bielecka vd., 2017).

2B kültürleme yöntemleri ayrıca hipoksi, hücre göçü ve invazyonu veya *in-vitro* tümör-stroma etkileşimleri gibi çeşitli biyolojik olayları incelemek için önemli sınırlamalar sergilemektedir (Herreros-Pomares vd., 2021). Alternatif olarak, hücre iskeleleri kullanan 3B hücre kültürü sistemleri şu anda geliştirilme aşamasındadır ve in vivo tümörlerin karmaşıklığını taklit etme konusunda umut vaat etmektedir (Zhou vd., 2016). Bu 3B modeller çözünür gradyanlar sağlar ve polarite olmaksızın her üç uzaysal boyutta da adezyonların dağılımına izin verir. Üç boyutlu adezyonun yanı sıra ilgili biyomekanik ipuçlarının ve gradyanların oluşturulmasını teşvik etme yeteneği, iskele tabanlı kanser hücresi modellerini ilaç dağıtım teknolojilerini test etmek, pluripotensi ve kendini yenilemeyi incelemek, hastalardan primer kültürler oluşturmak, tümörler ve bağışıklık sistemi arasındaki etkileşimleri analiz etmek ve kanserin gelecekteki klinik tedavisi için olası araçlar olarak öngörücü biyobelirteçleri tanımlamak için umut verici platformlar haline getirmektedir (Benien & Swami, 2014).

İn vitro organotipik modellerin temel çalışmalar, ilaç taramaları, hastalık modelleme ve kanser tahmininde yararlı olduğu sonucuna varılmıştır (Torras vd., 2018). Özellikle 3B modellerde epitel dokusu kullanılması bu bahsedilen alanlarda

(temel çalışmalar, ilaç taramaları, hastalık modelleme ve kanser tahmini) kilit faktörü oluşturur (Stange & Clevers, 2013). Şekil 2.2.'de görüldüğü üzere çeşitli 3B hücre kültürü yaklaşımları bulunmaktadır.



Şekil 2.2. Doğal 3B mimarisi, geleneksel 2B hücre kültürleri ve yeni 3B hücre kültürü yaklaşımları ile epitel dokularının şematik gösterimi (Torras vd., 2018).

3B tümör modelleri geliştirmede farklı teknikler kullanılmaktadır. Bunlardan ilki sferoid modellerdir. En eski ve en basit 3B kültür formlarını içeren bu modeller embriyonik cisimcikcikler, mikroçipler, mikroakışkanlar, kollajen jeller ve hanging-drop (asılı damlacık) gibi farklı yöntemleri barındırır (Kang vd., 2020).

Bir diğer yöntem ise biyopolimer iskele oluşturmaktır. Bu yöntemin aslı hücrelerin çok çeşitli biyofiziksel ve biyokimyasal özelliklere sahip 3B polimer yapı iskelelerinde kapsüllenmesi, 3B mikro çevrede hücresel (kök hücre) kaderi deşifre etmek için ortaya çıkmasına dayanan bir yaklaşımdır (Benoit vd., 2008). 3B yapı iskeleleri oluşturmak için kullanılan biyomalzemelerin farklı nitelikleri, modelin davranışı üzerinde bir etkiye sahip olabilir (Nyga vd., 2011).

Üçüncü bir yöntem olarak organ-on-a-chip, çip üzerinde mikroakışkan organ modellerini oluşturmak için kullanılan optik olarak şeffaf plastik, PDMS elastomer veya cam, perfüzyon için içi boş mikro iletkenleri içerecek şekilde tasarlanmıştır. Mikrokanallar, daha sonra doku ve organ ölçeklerinde yapılara dönüştürülen hücreleri yetiştirmek için kullanılır. Bu araçlar, doku ve organların yapısal ve işlevsel özelliklerini *in-vitro* olarak yeniden üretebilir. Kültür ortamı endotelyal hücre kaplı

mikrovasküler kanallar yoluyla perfüze edildiğinden, hücrelerin canlılığı kültürde uzun bir süre korunur (Y. Kang vd., 2020).

Son yöntem ise ex vivo (canlı dışı) doku dilimleridir. Ex vivo doku dilimleri, canlı organizmanın dışında kültürlenen ve muhafaza edilen doku örneklerini ifade eder ve kontrollü bir laboratuvar ortamında doku davranışının ve tepkilerinin incelenmesine olanak tanır. Bu yöntemle dokuların normal doğal mimarisi, hücre canlılığı gibi özellikler 5 güne kadar korunduğu gösterilmiştir (Vaira vd., 2010).

2.2.1. Akciğer tümör mikroçevresinin üç boyutlu modelleme çalışmaları

Son yıllarda akciğer tümör mikroçevresi tasarımı konusunda çalışmaların sayısı artmıştır. Bir çalışmada endotel hücresi (EA.hy926), bazal membran ve epitel hücre (A549) tabakasından oluşan insan hava-kan dokusu bariyeri biyobaskı teknolojisi kullanılarak modellenmiştir (Horváth vd., 2015).

Bir diğer çalışmada, 3B Petri Disshes® mikro kalıpları kullanılarak 3B büyütülen A549 sferoidlerinin yüksek verimli oluşumu gösterilmiştir. 3 boyutlu akciğer sferoidleri 3B kültürüyle başarıyla geliştirilmiş ve bu dokular, 30 günlük sürekli kültür boyunca boyutta ilerleyici bir artış göstermiştir (Gupta vd., 2017).

Başka bir çalışmada, akciğer tümör dokusunun 3B mimarisini içeren yeni *in-vitro* modeller oluşturmayı amaçlamıştır. Bunun için A549 hücreleri, Transwell™ destekleri üzerinde hava-sıvı ara yüzeyi koşullarında yüksek yoğunlukta kültüre edilmiş ve bu hücreler başarılı bir şekilde çoğalan 3B çok katmanlı mono-kültürleri oluşturmuştur. Kültürlerin kalınlığı, Lazer taramalı konfokal mikroskop görüntüleri ile 3 ila 4 katman arasında değiştiği gösterilmiştir (Movia vd., 2018).

Diğer bir çalışmada, *in-vitro* 3B tümör benzeri bir model geliştirmek amacıyla akciğer kanseri hücre dizilerini (A549 ve 95-D) kullanmışlardır. Bu model, 3B bioprinting yardımıyla ve aljinat-jelatin biyomürekkep kullanılarak oluşturulmuştur. Ardından tümör benzeri hücre yüklü hidrojel ızgara iskele modeli başarıyla basılmıştır. Bu modelde 3B biyobasım sonrasında canlı/ölü hücre tahlilinde hücrelerin canlılık oranının %90'ın üstünde olduğu gösterilmiştir. Ayrıca hücre invazyonu ve göçü analizleri yapılmış ve 3B modeldeki hücrelerin 2B kültürlenmiş hücrelerden daha fazla göç etme yeteneğine sahip olduğunu göstermişlerdir (X. Wang vd., 2018).

Başka bir çalışmada, Akciğer KKH'leri karakterize etmek amacıyla akciğer kanser hücre hatları ve farklı hidrojeller kullanılarak stereolitografik teknikle basılmış

3B yapı iskeleleri oluşturularak hücre proliferasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Tüm basılı iskelelerin kanser hücrelerinin büyümesini desteklerken, hidrojel bazlı yapı iskelelerinin, KHDAK birincil kültürlerinin 3B kültürü için en uygun biyomalzeme olduğu sonucuna varılmıştır. Bunun yanında, değerlendirmeye alınan KKH'lerle ilgili genlerin çoğunluğu, gen ekspresyon analizlerine göre, iskelelere ekilen hücrelerde ekspresyonda önemli bir artış gösterdiği bulunmuştur. Sonuçta, 3B biyobaskılanmış iskelelerin KKH'leri geliştirmek için başarıyla kullanılabileceği ele alınmıştır ve bu biyobaskılanmış iskelelerin farklı tümör çeşitlerine karşı ilaç tarama amaçlı ya da KKH'lerin daha iyi anlaşılmasına yönelik olanak sağlayan in-vitro platformlar olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (Herreros-Pomares vd., 2021).

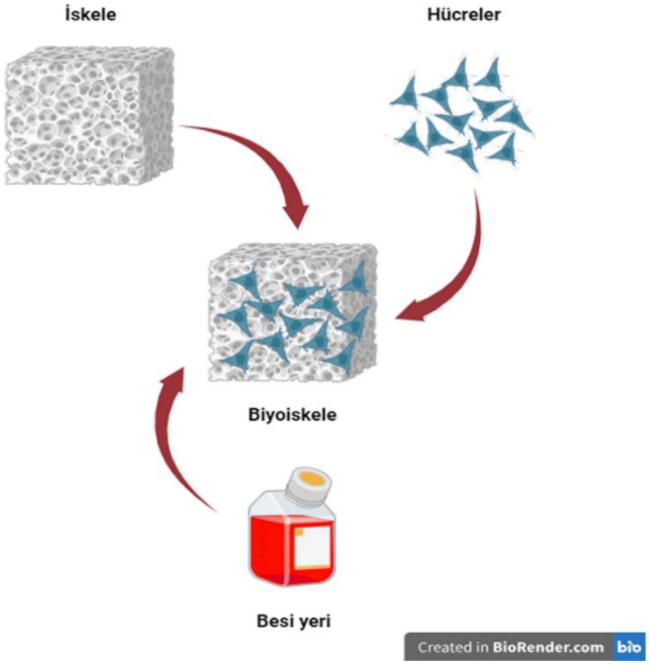
Bir başka çalışmada ise, A549 hücrelerinin daha iyi proliferasyonu için kararlı bir yapı geliştirmek ve ilaç testi için bir 3B akciğer kanseri dokusu modeli oluşturmak için ekstrüzyon tabanlı 3B biyobaskı için çok bileşenli bir biyomürekkebin geliştirilmesine odaklanmışlar ve *in vitro* 3B biyobaskılı doku yapısı için aljinat-jelatin bazlı biyomürekkep optimizasyonu ve karakterizasyonu ve ardından imalatı, değerlendirilmesi ve konsept ilaç testi kanıtı üzerine odaklanmışlardır. 3B modelde kullanılan sodyum aljinat, jelatin, DEAE (Dietilaminoetil) selüloz ve kollajen peptitten oluşan çok bileşenli, hibrit biyomürekkep sisteminin, 3B biyobaskılı yapının basılabilirlik, biyouyumluluk, hücre canlılığı ve gözeneklilik özelliklerini yüksek başarı oranında sergilediği gösterilmiştir. Böylece ilaç araştırmaları ve doku mühendisliği çalışmalarında pahalı in-vivo yöntemlerin aksine daha elverişli olacağı sonucuna varılmıştır (Geevarghese vd., 2022).

Tüm bu çalışmalar göz önüne alındığında 2B tümör modelleri yerine 3B *in-vitro* tümör modellerini kullanan çalışmalarda, hücre canlılığında artış, fizyolojik olarak uygun protein ekspresyon profilleri, daha hızlı proliferasyon, antikanser ilaçlara karşı artan kemorezistans ve gerçek tümörlerin özelliklerini (örn. nekrotik çekirdeklerin varlığı) gösterdiği sonucuna varılmıştır (Knowlton vd., 2015).

2.3. Doku Mühendisliği Modeli

Bazı dokular, büyük defektlerde sınırlı vasküler invazyon, çevre dokunun defekte çöküşü ve stabil olmayan kırıklarda onarıcı dokudaki aşırı mekanik zorlanma nedeniyle insan vücudu tarafından rejenerasyona tabi tutulamaz. Dolayısıyla, doku onarımını kolaylaştırmak için eksojen doku mühendisliği bileşenlerinin

kullanılmasına yönelik klinik bir ihtiyaç bulunmaktadır (Yannas, 2015). Doku mühendisliği yapıları, benzer hücresel ve hücre dışı ortamlar içeren ve yeni doku oluşumu sağlandıkça aynı oranda bozulan, yerine geçmesi hedeflenen dokuları mimik edecek şekilde tasarlanmıştır (Velasco vd., 2015). Bu yapılar üç boyutludur ve karmaşık in vivo ortamları, hücrelerin ve doku ECM'sinin yapısal düzenlemelerini taklit edemeyen iki boyutlu hücre kültürüne kıyasla doğal dokuların daha iyi temsil edilmesini sağlar. Doku mühendisliği yapıları, tasarlanmış doku mimiklerini üretmek için genellikle iskele malzemesi, hücreler ve ortam/kültür koşulları dahil olmak üzere üçlü bir bileşen kullanır. Bu yapılar daha sonra implantasyon veya ilaç-hastalık modellemesi gibi sistemler içinde araştırmaya yöneltilebilirler (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. Doku mühendisliği üçlüsünün bileşenleri.

2.3.1. İskeleler

Doku mühendisliğinde iskele, doku mimiğinin üretildiği malzeme matrisini ifade eder. Bir doku mühendisliği yapısının başarılı bir şekilde üretilebilmesi için, iskele malzemesinin kopyalanmak istenen doğal doku ECM'sine benzemesi gerekir (Chan & Leong, 2008). Örneğin, yağ, tendon ve bağ gibi bağ dokuları, yapısal özelliklerini sağlayan bol miktarda kolajen ve glikozaminoglikan içerir. Bu nedenle, bu dokuları taklit etmeyi amaçlayan doku mühendisliği iskeleleri üretilirken, kolajen ve GAG komplekslerinin dahil edilmesi bağ dokusu benzeri ortamlar oluşturabilir (Caliari vd., 2011). İskelelerin kendileri doku büyütme ve onarımında birden fazla rol

oynar ve vücuda enjekte edilebilir ya da nakledilebilir. Ekzojen hücrelerin ve biyolojik moleküllerin defekt bölgesine iletilebileceği bir çerçeve sağlarken, aynı zamanda komşu endojen hücrelerin tutunabileceği, göç edebileceği ve çoğalabileceği bir yapı sağlayarak yeni doku oluşumuna rehberlik ederler (Koch vd., 2009). Ayrıca, hücresiz bir iskelenin açık bir dermal yara içine yerleştirilmesinin erken kapanmayı, doku kasılmasını ve yara oluşumunu önlediği görülmüştür (Wainwright & Bury, 2011). Bu teknik kullanılarak, çevredeki hücrelerin iskeleye nüfuz etmesi için ankraj sağlanır ve yaranın kapanması deformasyon yaratmadan iyileşme gerçekleşebilir.

2.3.2. Hücreler

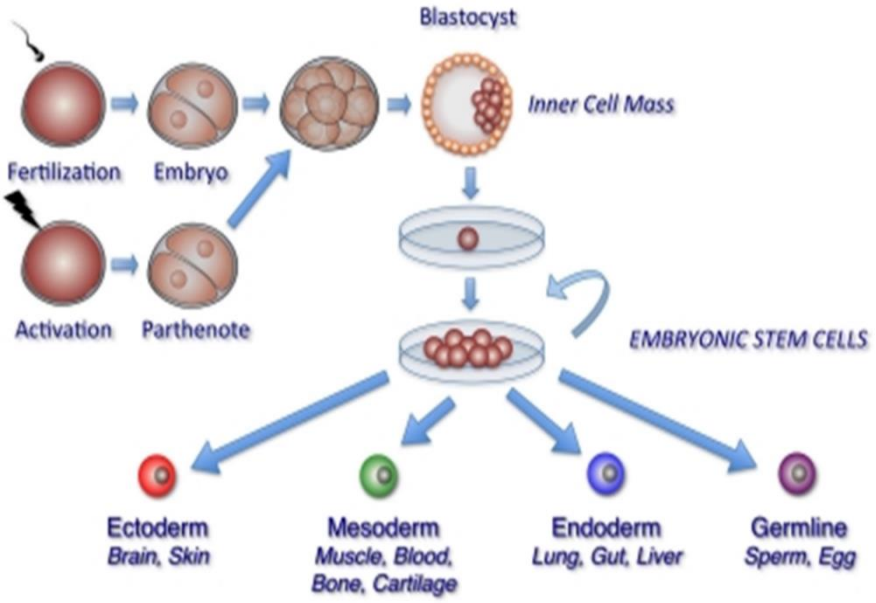
Bir doku içindeki hücresel mitotik aktivite bozulduğunda veya yetersiz olduğunda, doku sistemi içine eksojen hücrelerin eklenmesi gerekebilir. Hücreler bir doku iskelesine dahil edilmek üzere çeşitli kaynaklardan alınabilir. Ksenojenik hücre izolasyonu (farklı bir türden) veya allojenik hücre kaynakları (aynı türün farklı üyelerinden) daha düşük bir maliyetle yararlanılabilecek daha geniş bir potansiyel hücre kaynağı havuzu sağlayabilirken, bu hücrelerin kullanımı daha yüksek bir hastalık bulaşma ve nakil sonrası bağışıklık reddi riskini beraberinde getirmektedir (Boneva vd., 2001). Alternatif olarak, doku mühendisliği tedavisi gören hastadan izole edilen otolog hücreler, immün ret olasılığını büyük ölçüde azalttığından başarılı hücre nakli için daha umut verici bir yaklaşım sunmaktadır (Langer & Vacanti, 1993). Ancak otolog hücrelerin seçimi donör bölgesi morbiditesi ile ilişkilidir. Birçok vakada donör bölgesinden az sayıda hücre toplanabilmekte, bu da zaman alan kültür ve hücre proliferasyon işlemlerine ihtiyaç duyulmasına neden olmaktadır. Ayrıca, hastalıklı dokular ve yaşlı hastalar söz konusu olduğunda otolog hücre seçeneği her zaman uygun olmayabilir (Heath, 2000). Bu dezavantajlara rağmen, otolog hücreler ve dokular kullanılarak yapılan greftleme ve implantasyon, günümüzde doku onarımında en çok uygulanan yöntemdir.

Bir doku mühendisliği iskelesine entegrasyon için hücre seçiminde göz önünde bulundurulması gereken bir diğer husus da farklılaşmış veya farklılaşmamış hücrelerin seçilmesidir. Doku yapılarında birincil, farklılaşmış hücrelerin kullanılması, bir doku defektinde değiştirilecek olanlarla uyumlu hücrelerin izole edilmesini, yani bir dermal doku yapısı içinde kültür için sağlıklı bir hastanın dermisinden insan dermal fibroblastlarının çıkarılmasını içerir. Bu yöntem, herhangi bir farklılaştırma işlemine gerek olmadığı için kullanışlıdır (Hench & Jones, 2005). Buna rağmen,

farklılaştırılmış hücrelerin kullanılması donör bölgesi morbiditesi ve sınırlı bulunabilirlik ile ilişkilidir ve bu yapıdaki hücreler sınırlı bir proliferatif ve biyosentetik kapasiteye sahiptir. Ayrıca, birincil hücreler, çoklu pasajlama sonrasında, ex vivo (organizma dışı) kültürleme sırasında farklılaşma eğilimindedir ve böylece uygun fenotiplerini kaybederler (Fitzpatrick & McDevitt, 2014).

2.3.2.1. Kök hücreler

Doku mühendisliğinde belki de en umut verici hücre türleri, işlenmiş hücrelerle ilişkili sorunların üstesinden gelme potansiyelleri nedeniyle kök hücrelerdir. Uzun süreli kendini yenileme kabiliyetleri ve aksi takdirde bir kez işlendikten sonra yenilenemeyecek hücrelere farklılaşma yetenekleri onları büyük ilgi odağı haline getirmektedir. Her biri farklı farklılaşma kapasitelerine sahip üç ana kök hücre türü mevcuttur: embriyonik, yetişkin ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler (M. Chen vd., 2009). İnsan embriyolarının gelişimsel plastisitesi, onları kök hücrelerin toplanması için elverişli kaynaklar haline getirmektedir. Döllenmeyi takip eden ilk bölünmelerde embriyonik kök hücreler totipotensi (tüm hücre tiplerine yol açma yeteneği) sergiler ve bu dönemi takiben pluripotenttir (birçok hücre tipine yol açma yeteneğine sahiptir) (Atala vd., 2008). En büyük farklılaşma kapasitesine sahip olmanın cazibesine rağmen, allojenik kaynaklardan elde edilirler ve birçok etik kaygıyla ilişkilendirilirler. Buna karşılık, bir hastadan alınan otolog, multipotent yetişkin kök hücreler kemik iliği stroması, diş özü, saç folikülü ve deri altı yağ dokusu gibi çeşitli dokulardan izole edilebilir (Hodgkinson vd., 2009). Bu bölgelerden izole edilen yetişkin kök hücrelerin dölleri mezodermal, endodermal ve ektodermal fenotipik soylar boyunca değişken derecelerde farklılaşma gösterir (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. Endodermal, mezodermal ve ektodermal germ katmanları ve bunların farklılaşmış soyları (Yabut & Bernstein, 2011).

Kendini yenileme dışında, yetişkin kök hücrelerinin rolü, hasar veya apoptozun ardından farklılaşmış hücre sayılarını yenilemektir. Bununla birlikte, dokularda düşük miktarlarda bulunmaları, ekstraksiyonu takiben sıkı farklılaştırma prosedürleri gerektirmektedir. Bu nedenle, pluripotent olmayan kök hücrelerden (tipik olarak yetişkin progenitör hücrelerden) yapay olarak türetilen pluripotent kök hücreler olarak tanımlanan 'indüklenmiş pluripotent kök hücreler' (iPSC'ler) olarak adlandırılan alternatif bir kök hücre kaynağı araştırılmaktadır. İlk olarak 2006 yılında farelerde araştırılan bu teknik, 2007 yılında yetişkin insan dermal fibroblastlarına dört genin (Oct-3/4, Sox2, c- Myc ve KLF4) eklenmesini takiben gelişmiştir. İPSC'lerdeki pluripotent hücreye özgü genlerin morfolojisi, çoğalması, gen ifadesi ve epigenetik durumu, gen aktarımını takiben embriyonik kök hücrelerinkiyle eşzamanlıdır (Takahashi vd., 2007). Kök hücrelerle ilgili mevcut sorunların üstesinden gelmek için iPSC'lerin kullanımına yönelik araştırmalar şu anda doku mühendisliği alanında ön planda yer almaktadır.

2.3.3. Besiyeri ve kültür koşulları

Bir doku mühendisliği yapısının imalatı için, iskele malzemesinin dikkatli seçimine ve hücrelerin kapsüllenmesine ek olarak, besi yeri ve kültür koşulları genellikle nihai ürünün sonucunu yönlendirmek için optimize edilir. İskele malzemeleri hücresel morfoloji ve davranışın belirlenmesinde önemli bir rol oynarken, amino asitler, büyüme faktörleri, reaktifler ve hormonlar gibi ek takviyeler hücrelere genellikle doğal dokularda bulunan biyokimyasal besi yeri sağlayabilir (K. Lee vd., 2010). Mezenkimal kök hücrelerin tanımlanmış besi yerlerinde yetiştirilmesiyle çoklu hücre soylarının çoğalması ve farklılaşması sağlanabilir. Temel amino asitleri içeren temel besi yerlerinin kullanımı, çoğu doku mühendisliği uygulamasında tipik olarak standarttır ve hücrelere, hücrelerin hayatta kalması ve çoğalması için gerekli olan metabolitleri sağlar (Todd, 2014).

Doku yapıları, doğal dokuların deneyimlediği ortamları yeniden mimik etmek için modüle edilmiş bir dış ortama tabi tutulabilir. Oksijen konsantrasyonlarının ayarlanmasıyla, hedef doku ortamlarını gösteren hipoksik, normoksik ve hiperoksik koşullar taklit edilebilir. Keratinositlerin hava-sıvı arayüzünde, deri epidermisinin in vivo yayılma şekline benzer bir mekanizmayla kültüre edilmesi, oksijen modülasyonunun nasıl başarılabileceğine bir örnektir. Diğer durumlarda, mekanik yükleme uygulaması, tendon ve bağların in vivo olarak maruz kaldığı kuvvetleri tasvir eder ve böylece hücre fenotipini tenosit ve fibrosit soylarına yönlendirebilir (Benhardt & Cosgriff-Hernandez, 2009).

2.4. Bir Doku Mühendisliği Modelinin Özellikleri

Potansiyel implantın insan dokusuna başarılı bir şekilde entegrasyonunun sağlanması için tüm doku mühendisliği yapılarında birkaç temel parametrenin karşılanması gerekmektedir. Genel olarak, *in-vitro* hücrelerin çoğaltılması için yapıların, çoğaltılan doğal dokunun in vivo olarak gelişmesini sağlayacak şekilde elverişli olması gerekir.

2.4.1. Biyouyumluluk

Etkili bir hücre iskelesi kompleksinin oluşturulmasında en önemli ilkelerden biri biyouyumluluktur. Hücreler doku iskelesine sızmalı, normal işlevini üstlenmeli ve sonunda bir bağışıklık tepkisi oluşturmadan ECM'lerini salgılayarak destekleyici iskelenin yerini almalıdır (Remes & Williams, 1992). Hücre kaynağı ve iskele

malzemesi dahil olmak üzere birçok faktör bir doku yapısının biyouyumluluğunu etkileyebilir. Allojenik ve ksenojenik hücrelerin nakli üzerine immünosupresif tedavi uygulanmadığı sürece, yabancı antijenlerin transferi genellikle konakçıda inflamatuar bir yanıt ortaya çıkararak implante edilen parçanın reddine neden olur. İskele malzemesiyle ilgili olarak, doğal malzeme kaynakları, doğal dokuların kimyasal yapılarına daha iyi benzedikleri için genellikle sentetik malzemelerin kullanımına tercih edilir (Ikada, 2006).

2.4.2. Biyobozunabilirlik

Bir doku mühendisliği yapısı tasarlanırken göz önünde bulundurulması gereken bir diğer önemli husus da doku iskelesi içindeki malzemenin biyolojik olarak parçalanabilirliğidir. İskelenin tek hedefi, hücreleri kendi ECM ağlarını kurmaya teşvik etmek ve böylece sonunda mühendislik ürünü parçanın yerini almaktır (Tan & Marra, 2010). Materyalin biyolojik olarak parçalanabilirliği, implantasyon bölgesinde yeni doku oluşumunun gerçekleşme hızına paralel olarak ilerlemelidir. İskele yan ürünlerinin de normal vücut fonksiyonlarını aksatmadan vücuttan atılabilmesi gerekir (Brown vd., 2009).

2.4.3. Mekanik özellikler

Bir doku mühendisliği yapısının başarılı bir şekilde kültürlenmesinde kilit rol oynayan diğer parametreler doku eşdeğerinin mekanik özellikleridir. Hücreler, mekanotransdüksiyon yoluyla dış mekanik etkileri araştırabilir ve mekanoreseptörler yoluyla bu tür uyarımlara uygun şekilde yanıt verebilir. Sinir ağı gibi mekanik olarak statik veya uyumlu dokularda, dokular düşük sertlik sergiler. Buna karşılık, kemik veya iskelet kası gibi yüksek derecede mekanik yüke maruz kalan dokular, birkaç kat daha büyük ECM sertliği sergiler (Engler vd., 2006). Bu nedenle, hücrelerin davranışı doğal olarak dokuya özgüdür ve büyük ölçüde içinde bulundukları substratın sertliğine bağlıdır.

2.4.4. İskele mimarisi

Mekanik özellikler önemli olsa da hücre infiltrasyonu, vasküler doku oluşumu ve ardından atık ürünlerin doku yapısından uzaklaşması için yapı içinde belirli bir gözeneklilik derecesinin bulunması da zorunludur (Hollister, 2005). Az gözeneklilik, gözenek boyutu ve birbirine bağlanabilirlik içeren iskelelerde, kısıtlı alan ve hücre metabolitlerine minimum erişim nedeniyle hücre büyümesi ve istilası sınırlıdır.

Yüksek gözeneklilik, gözenek boyutu ve birbirine bağlanabilirlik sergileyen iskeleler için, yetersiz bağlanma hücre çekişini azaltır ve hücre göçünü sınırlar (Loh & Choong, 2013). Bu nedenle, ortam gözenekliliği koşullarının kritik dengesi, bir doku iskelesinin imalatı için çok önemlidir. Ayrıca, yüzey topografisi de hücre-biyomateryal etkileşimi için alternatif mekanizmalar sağlar ve hücre tepkisini düzenler. Daha pürüzlü yüzeylerde kültürlenen hücreler, güçlü aktin ağları kuran daha pürüzsüz alt tabakalardaki yaygın hücrelerin aksine, engebeli alanlarla bağlanır ve kısıtlanır (Wu & Zhang, 2015).

2.5. Biyobaskı için Hidrojeller

Hidrojeller, yüksek su içerikleri nedeniyle biyobaskı ve doku mühendisliğinde büyük ilgi çekmiştir. Hidrofilik polimer zincirlerinden oluşan ağ, kimyasal ya da fiziksel etkileşimle çapraz bağlanır. Kovalent bağlar gibi kimyasal bağlar yoluyla oluşan hidrojeller kalıcıdır ve geri döndürülemezdir. Buna karşılık, (1) hidrojen bağları, (2) iyonik güçler, (3) tek tek polimer zincirlerinin fiziksel dolanımları, (4) polimer kristalitleri ve (5) hidrofobik gibi fiziksel etkileşimler yoluyla oluşan hidrojeller belirli koşullar altında tersine çevrilebilir. Buna karşılık hidrojel, bu etkileşimlerin iki ya da daha fazlasının bir araya gelmesiyle oluşabilir (J. M. Lee vd., 2022).

2.5.1. Doğal hidrojeller

Doğal hidrojeller doku mühendisliğinde yoğun bir şekilde kullanılmaktadır çünkü genellikle ilgili hücrelerle iyi bir hücresel uyumluluğa sahip olmalarını sağlayan spesifik biyoaktif bölgeleri içermektedirler. Ayrıca genelde biyolojik yöntemlerle üretildikleri için daha belirgin bir yapıya ve tek dağılımlı bir moleküler ağırlığa sahip olma eğilimindedirler. Genellikle biyolojik olarak parçalanabilirler ve hücrenin doğal ECM'sine benzer mekanik özelliklere sahiptirler. Bununla birlikte, immünojeniklikle ilgili sorunları vardır ve sentetik benzerlerine kıyasla nispeten kararsızdırlar. Ayrıca özellikleri türler, dokular ve üretim partileri arasında farklılık gösterir. Ayrıca karmaşık bileşimleri nedeniyle, özgün niteliklerini karakterize etmek nispeten zordur (J. M. Lee vd., 2022).

2.5.1.1. Kolajen

İyi bilinen bir protein olan kolajen, doğal ECM'nin ana bileşeni ve aynı zamanda memeli dokularında en bol bulunan protein olması nedeniyle biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (C. H. Lee vd., 2001). Biyomalzeme olarak çok sayıda doğal ve sentetik polimer kullanılmasına karşın, kolajenin özellikleri büyük ölçüde vücuttaki etkilenme biçimleri bakımından sentetik polimerlerden farklıdır. Yirmiden fazla farklı kolajen türü bulunmuştur, ancak temel yapıları aynıdır, yani üç polipeptit zincirinden oluşur. Bu üç zincir birbirinin etrafına sarılarak üç iplikçikli bir halat yapısı oluşturur. İplikçikler kovalent bağlar ve hidrojen ile bir arada tutunur. Kararlı kolajen lifleri, ipliklerin kendi kendine toplanmasının bir sonucu olarak oluşturulabilir. Ayrıca, kolajen liflerin mekanik özellikleri karbodiimid ve glutaraldehit gibi kimyasal çapraz bağlayıcılar eklenerek geliştirilebilir (C. R. Lee vd., 2001; S.-N. Park vd., 2002). Kolajen doğal olarak metaloproteazlar tarafından parçalanır ve böylece parçalanma süreci tasarlanmış dokudaki hücreler tarafından bölgesel olarak kontrol edilebilir (J. M. Lee vd., 2022).

2.5.1.2. Jelatin

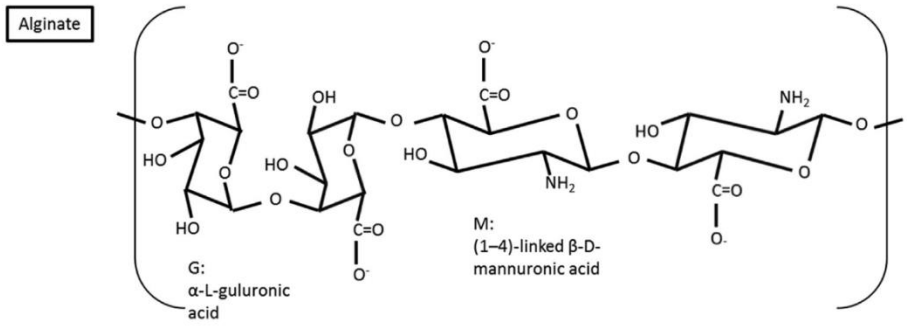
Protein bazlı bir polimer olan jelatin, kolajenin kısmi hidrolizi yoluyla elde edilir. Kimyasal ön işlem ve ardından ısıl işlem, kolajen protein yapısını düzensiz hale getirerek heliks-tokoil geçişine ve çözünür jelatine dönüşümüne neden olmaktadır. Jelatin, sıcaklık değişimi sırasında jelleşmeye uğrar. Bununla birlikte, jelatin bir metilakrilat grubunun (GelMA) eklenmesiyle fotopolimerize edilebilir hidrojele dönüştürülmektedir (J. M. Lee vd., 2022).

2.5.1.3. Fibrin

Fibrin, fibrinojenin trombin aracılı bölünmesi sonucu oluşan ve kendiliğinden birleşen, çözünmeyen bir fibrin monomeriyle ortaya çıkan bir biyopolimerdir (Ahmed vd., 2008). Doğal olarak oluşan bu malzeme enjekte edilebilir hidrojel olarak ve hücre iletim vasıtaları olarak kullanılmıştır (Dare vd., 2007). En büyük avantajı, fibrinojenin plazmadan otolog olarak elde edilebilmesidir, bu da yabancı cisim reaksiyonu riskini azaltır. Ayrıca, fibrin iyi adezyon özelliklerine sahiptir. Genel olarak fibrin, kanamayı kontrol etmek ve cerrahide dokuları yapıştırmak için tutkal olarak kullanılır. Ayrıca, deri greftlerinde ve yara iyileşme süresini azaltmak için eksojen büyüme faktörlerinin verilmesinde de kullanım alanı bulmuştur (J. M. Lee vd., 2022).

2.5.1.4. Aljinat

Doğal bir polimer malzeme olan aljinat, kahverengi deniz yosunu ve bakterilerden elde edilir. İlaç stabilizasyonu ve dağıtımı ile hücre kapsüllemesinde çok çeşitli tıbbi uygulamalar göstermiştir. α-L-guluronik asit (G) ve (14)-bağlı β-D-mannuronik asit (M) monomerlerinden oluşan doğrusal bir polisakkarit kopolimeridir (Şekil 2.5.). G ve M monomerleri dönüşümlü veya tekrar eden bloklar halinde sıralı olarak dağılır (Donati & Paoletti, 2009). Nötr pH altında aljinat bir polianyondur. Düşük toksisiteye sahiptir ve hassas koşullar altında jelleşir.



Şekil 2.5. Aljinatın kimyasal yapısı (J. M. Lee vd., 2022).

Deniz yosununun türü, konumu ve yaşı, her bir monomerin miktarını ve dağılımını belirleyen etkili faktörlerdir. Aljinat jelleri, Ba^{2+}, Ca^{2+} veya Sr^{2+} gibi iki değerlikli katyonların farklı polimer zincirleri arasında iyonik köprüler oluşturmak için G monomer bloklarıyla işbirliği içinde etkileşime girmesi sonucu oluşur. Polimer zincirinin G ve M oranını ve moleküler ağırlığını değiştirerek ve ayarlayarak, çapraz bağlanma yoğunluğu ve sonuçta ortaya çıkan mekanik özellikler kolayca değiştirilebilir. İyonik olarak çapraz bağlanmış aljinat hidrojellerin belirli bir bozunma eğilimi izlemek yerine yavaş ve kontrolsüz çözünmeye uğradığı belirtilmektedir. Kütle, kalsiyumun iyon değişimi yoluyla aşamalı olarak kaybedilir ve sonuç olarak, tek tek zincirler ayrışarak zaman içinde mekanik sertlik kaybına yol açar (J. M. Lee vd., 2022).

2.5.2. Sentetik hidrojeller

Sentetik hidrojeller, doku mühendisliğinde iskele olarak kullanılan en eski biyomateryallerden bazılarıdır. Karşılaştırmalı bir şekilde, sentetik hidrojeller rejeneratif tıp alanında yüksek oranda ayarlanabilen ve tutarlı özelliklerinin yanı sıra daha kolay büyük ölçekli üretim gibi faydalarını ortaya koymuştur (J. M. Lee vd., 2022).

2.5.2.1. Poli(2-hidroksietil metakrilat)

Poli(2-hidroksietil metakrilat) (PHEMA) hidrojeller 1960'ların sonlarından beri implant malzemesi olarak kullanılmaktadır. 2-hidroksietil metakrilatın serbest radikal çökeltme polimerizasyonu kullanılarak sentezlenir (Slaughter vd., 2009). Ortaya çıkan hidrojel biyolojik olarak inert ancak nispeten zayıftır. Ayrıca protein adsorpsiyonuna ve hücre adezyonuna karşı oldukça dirençli bir malzemedir. Bununla birlikte, PHEMA implantlarının in vivo olarak gecikmeli, dönem dönem kalsifikasyona uğradığı tespit edilmiştir (Belkas vd., 2005).

2.5.2.2. Poli(vinil alkol)

Poli(vinil alkol) poli(vinil asetat)'ın kısmi hidrolizinden hazırlanır. Kimyasal veya fiziksel yöntemlerle (örneğin monoaldehitler yoluyla) bir jel halinde çapraz bağlanabilir. PVA ayrıca kimyasal çapraz bağlamaya alternatif olarak hidrojel üretmek için fotokürlenebilir. PVA, biyolojik moleküller için bağlanma bölgeleri olarak işlev gören mevcut askıdaki alkol gruplarına sahip olma açısından PHEMA'ya benzemektedir (J. M. Lee vd., 2022). PVA, mekanik uyaranların ekilmiş hücrelere iletimini artırarak matris sentezini veya hücre yönelimini indükleyebilen elastik bir malzemedir (Schmedlen vd., 2002). PVA hidrojelleri nötrdür ve proteinlere ve hücrelere yapışmaz. PVA hidrojelleri düşük sürtünme katsayısına sahiptir ve yapısal özellikleri doğal kıkırdağa benzemektedirler. Dahası, genellikle diğer sentetik jellerin çoğundan daha güçlüdürler, bu da onları avasküler doku için başarılı kılar. Ayrıca PVA, PEG hidrojellerinkinden daha hızlı ancak PVA homopolimer hidrojellerinkinden daha yavaş bir bozunma oranına sahip biyolojik olarak parçalanabilir bir hidrojel üretmek için poli(etilen glikol) (PEG) ile kopolimerize edilebilir (J. M. Lee vd., 2022).

2.5.2.3. Poli(etilen glikol)

Poli(etilen glikol) PEG, antijenikliği, immünojenikliği, hücre yapışmasını ve protein bağlanmasını sınırlayan özelliklere sahip biyouyumlu ve hidrofilik bir malzemedir (Alcantar vd., 2000). PEG homopolimeri, etilen oksitten kondensasyon yoluyla polimerize edilebilen bir polieterdir. PEG, polimer zinciri üzerinde protein bağlama bölgelerinin bulunmaması nedeniyle adsorptif değildir. PHEMA ve PVA ile karşılaştırıldığında PEG, protein bağlanmasını azaltmada kritik bir özellik olan hidrojen bağı bağışlayan gruplara sahip değildir. PEG hidrojeller, doku mühendisliği uygulamaları için en başarılı sentetik hidrojellerden biri olarak kabul edilmiştir. PEG polimerinin uçları, fotokroslinklenebilir polietilen glikol dimetakrilat (PEGDA) oluşturmak için akrilatlar veya metakrilat ile modifiye edilebilir (Drury & Mooney, 2003). PEGDA, hücreleri iskelelere kapsüllemek için yaygın olarak kullanılmaktadır.

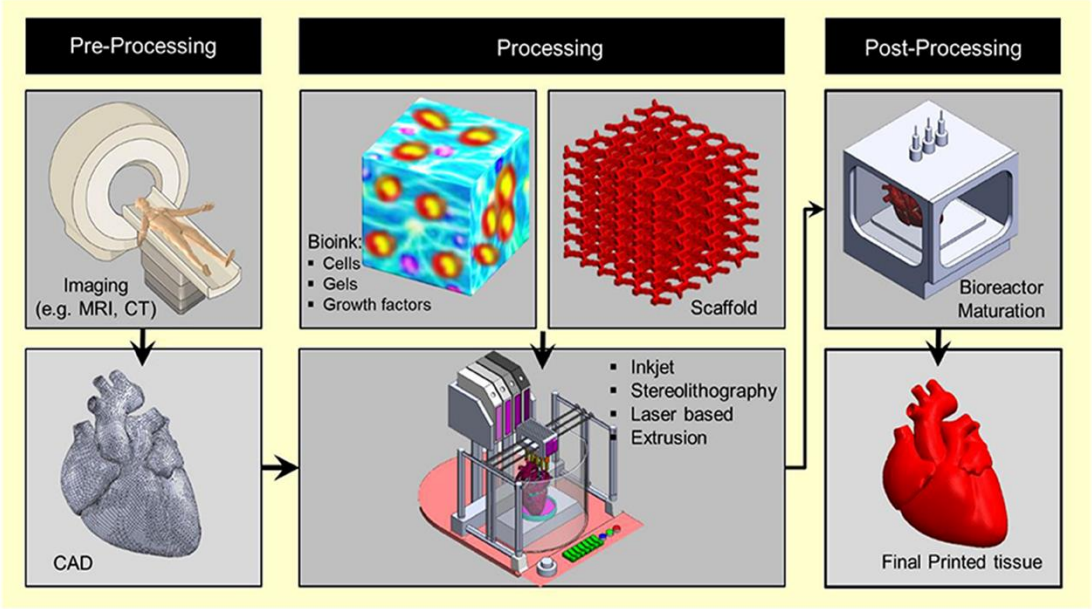
2.6. Üç Boyutlu Biyoyazıcı Teknolojileri ve Çeşitleri

3B biyoyazıcı, dijital bir modele göre canlı hücrelerden ve hidrojellerden 3B insan dokularının ve organlarının katman katman biyofabrikasyonu için kullanılan robotik bir cihaz olarak tanımlanır (Hesuani vd., 2016). 1984'te Charles Hull, 3B baskının doğuşunu simgeleyen, dijital verilerden 3D nesneleri basmak için stereolitografiyi (SLA) icat etti (Gu vd., 2020).

Biyoyazıcı ilk kez 1988'de Klebe, sitoscribing teknolojisi ile hücreleri biriktirmek için standart bir Hewlett-Packard (HP) mürekkep püskürtmeli yazıcı kullanırken gösterildi (Klebe, 1988). 1999'da, karmaşık anatomiye sahip analogları geliştirmek için canlı hücreleri biriktirmek amacıyla lazer destekli biyoyazıcı ilk kez kullanıldı (Odde vd., 1999). 2001 yılında, mesane şeklindeki bir iskelenin doğrudan basımı ve insan hücrelerinin ekimi gerçekleşmiştir (Karzyński vd., 2018). 2002'de, ilk ekstrüzyon bazlı biyobaskı teknolojisi (daha sonra "3D-Bioplotter" olarak ticarileştirilen) yayınlanmıştır (Landers vd., 2002). 2012 Yılında fare modellerinde in situ (yerinde) biyobasım denenmiştir (Skardal vd., 2012). 2016 yılında bütünleşmiş doku-organ yazıcısı (ITOP) kullanılarak kıkırdak modeli üretilmiştir (H.-W. Kang vd., 2016). 2019 yılında perfüze edilebilir bir küçültülmüş kalp üretmeyi başarmışlardır (Noor vd., 2019).

2.6.1. Biyobaskı aşamaları

Biyobaskı süreci üç ardışık ana adımı takip eder; biyobaskı öncesi, biyobaskı ve biyobaskı sonrası olgunlaşma aşamaları (Şekil 2.6.). Biyobaskı öncesi aşamada, hedef dokunun doğru 3B modelleri CAD/CAM (bilgisayar destekli tasarım/bilgisayar destekli üretim) yazılımı aracılığıyla tasarlanır ve ardından 3B biyoyazıcı için 2B katmanlara ayrılır. Ardından, hedef dokuya göre uygun malzeme ve hücre kaynakları seçilir. Biyobaskı adımında biyomürekkep, biyomürekkebin katman katman biriktirilmesi yoluyla önceden tasarlanmış 3B yapıyı basar. Son olarak, biyobaskı sonrası olgunlaşma aşamasında, basılan yapı bir biyoreaktörde olgunlaşmaya izin verir.

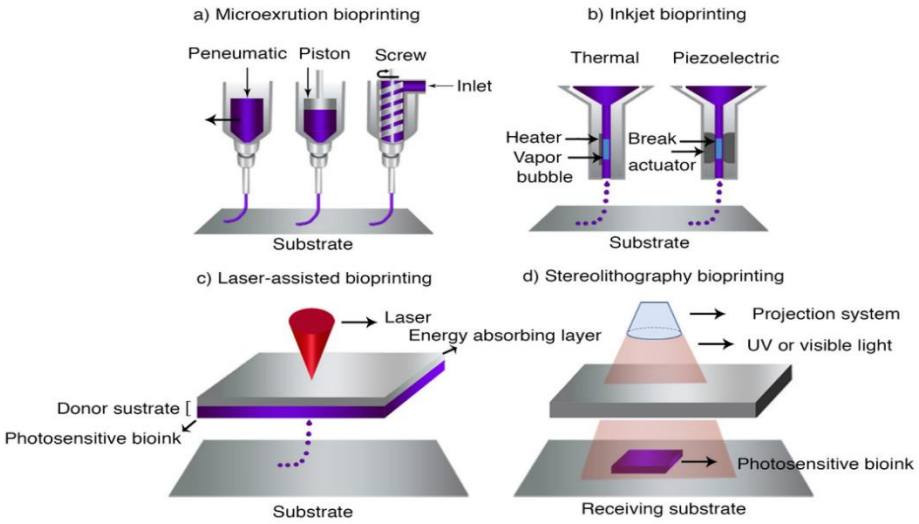


Şekil 2.6. Biyobaskı sürecinde yer alan adımların akış şeması (Ramadan & Zourob, 2021).

2.6.2. Çeşitli 3B biyobaskı teknolojileri

Ekstrüzyon, mürekkep püskürtme (inkjet), lazer destekli baskı ve stereolitografi, biyobaskı teknolojileri, çalışma koşullarına bağlı olarak 3B biyobaskı teknolojilerinde başlıca çeşitleri oluşturmaktadır. Bu teknolojilerin, hedeflenen teknoloji için en iyi baskı teknolojisini seçmek üzere dikkatle değerlendirilmesi gereken belirli doğal avantajları ve dezavantajları vardır. Bunlar arasında mürekkebin viskozitesi, baskı hızı, çözünürlük, hücre yoğunluğu ve maliyet yer almaktadır. En önemlisi, canlı hücrelerin/organ mimarilerinin fonksiyonları da mevcut biyobaskı teknolojilerinin

çeşitliliğinden etkilenmektedir (Malda vd., 2013). Şekil 2.7.'de bu baskı teknolojileri, verim (hız), gerekli viskozite aralığı, kabul edilebilir hücre canlılığı ve genel malzeme yüklemesi göz önünde bulundurularak bu yöntemlerin avantaj ve dezavantajlarıyla birlikte şematik olarak sunulmaktadır.



Şekil 2.7. 3B Biyoyazıcı Çeşitleri (Moghaddam vd., 2021).

2.6.2.1. Ekstrüzyon tabanlı biyoyazıcılar

Ekstrüzyon tabanlı biyoyazıcı, baskı süreci açısından kaynaşmış biriktirme modellemesine oldukça benzer şekilde çalışır, ancak biyomürekkebin bir nozülden dışarı itildiği hücre yüklü hidrojelleri dağıtır (Zhu vd., 2018). Küçük damlacıklar dağıtan diğer biyobaskı modlarına rağmen, ekstrüzyon tabanlı bir biyoyazıcı, biyomürekkep filamentini pnömatik veya mekanik kuvvetlerin uygulanmasıyla sürekli bir süreçte bir nozülden iter (Ozbolat & Hospodiuk, 2016). Ekstrüzyon tabanlı biyoyazıcı, 2B desenleri katman katman bir şekilde biriktirerek 3B mimarilerin üretilmesini sağlar.

Mikroekstrüzyon biyobaskının belirgin bir avantajı, fizyolojik olarak ilgili dokulara benzer yüksek hücre yoğunluğu elde etme özelliğidir. Yüksek vizkoziteli biyomürekkepler daha iyi basılabilirlik ve yapısal bütünlük sağlayabilirken, düşük vizkoziteli biyomürekkepler hücresel fonksiyonları korumak için daha faydalıdır (Hölzl vd., 2016). Kesme inceltme davranışı, nozüldeki kesme hızındaki artışa yanıt olarak biyomürekkebin viskozitesi düştüğü için nozül boyunca malzemelerin kolay ekstrüzyonuna izin verir (Ouyang vd., 2016). Mürekkep nozülden çıktıktan sonra

viskozite başlangıç değerine geri döner ve sonraki katmanlar için yeterli mekanik mukavemet sağlar. Biyomürekkebin yüksek viskozitesi, diğer biyobaskı modlarının aksine hızlı çapraz bağlama işlemine gerek kalmadan ilk yapısal bütünlüğü sağlar. Ayrıca, bünyesinde barındırdığı yüksek baskı hızı sayesinde, bu teknik anatomik olarak uygun boyutta dokuların üretilmesine izin vermektedir (Chimene vd., 2020). Genel olarak değerlendirildiğinde, ekstrüzyon tabanlı biyobaskı, yeterli bir işlem süresi içinde anatomik boyutlarda dokuların oluşturulmasına imkân tanıyan en yaygın teknik haline gelmiştir.

Ekstrüzyon tabanlı bir biyoyazıcının ana avantajlarından biri, çeşitli hücre tipleriyle yüklü çoklu biyomürekkeplerin baskısını gerçekleştiren fazladan bir şırınga ekleme yeteneğidir (Ruiz-Cantu vd., 2020). Bu, çoklu hücre tipleri ve mikro ortamlar içeren karmaşık dokuların üretimi için oldukça değerlidir. Ekstrüzyon yazıcısı çok kanallı olup her kanal kendi biyomürekkep haznesine bağlıdır. Özel yazıcı yazılımı, bir baskı kafası sistemi tarafından öngörülen zamanda çeşitli biyomürekkepleri yaymak için her kanalın valfini açmak için kullanılır. Bu tekniğin avantajı, değişim süreçleri arasında ihmal edilebilir bir açıklık boşluğunun bulunmamasıdır.

Ekstrüzyon tabanlı biyoyazıcının bir dezavantajı, baskı sırasında hücre zarı hasarı riskidir ve bu da diğer biyoyazıcı çeşitlerine kıyasla hücre canlılığını azaltır (Malda vd., 2013). Baskı sırasında hücrelere uygulanan mekanik kesme stresinin, hücresel işlevlerin yanı sıra hücresel canlılık üzerinde de zararlı bir etkisi vardır. Hücre canlılığındaki azalma daha düşük bir baskı hızı veya daha büyük nozul boyutu kullanılarak azaltılabilse de bu daha uzun bir işlem süresi veya baskı çözünürlüğünde kayıpla sonuçlanacaktır. Diğer biyobaskı teknikleriyle karşılaştırıldığında, ekstrüzyon tabanlı biyobaskının düşük baskı çözünürlüğü bu modun bir diğer önemli dezavantajını oluşturmaktadır (J. Li vd., 2016). Buna ek olarak, yüksek viskozitede biyomürekkep basıldığında nozülün tıkanması ekstrüzyon tabanlı biyoyazıcılarda karşılaşılabilecek olası bir zorluktur (Hölzl vd., 2016).

2.6.2.2. Mürekkep püskürtme tabanlı biyoyazıcılar

Düşük maliyet, hızlı işlem ve yüksek çözünürlük gibi inkjet biyobaskının üstün özellikleriyle, 3B doku benzeri yapılar üretmek için inkjet tabanlı biyobaskıya yoğun ilgi gösterilmiştir (Solis vd., 2019). Temel çalışma sürecine göre, inkjet tabanlı biyobaskı tekniği, bir nozülün arkasına dış kuvvetler uygulayarak baskı alt tabakasına

kontrollü bir hacimde ayrık damlacıklar basar (Boland vd., 2006). Ekstrüzyon tabanlı biyobaskı teknolojisi gibi, bu teknik da birden fazla nozülle donatıldığında farklı hücre türlerini aynı anda basabilmektedir (T. Xu vd., 2013). Mürekkep püskürtme tabanlı biyobaskı, yüksek çözünürlüğü nedeniyle küçük ölçekli dokuların üretiminde mükemmel olduğunu göstermiştir.

Mürekkep püskürtme tabanlı biyobaskı tekniğinin başlıca dezavantajlarından biri, yüksek viskoziteli biyomürekkeplerin basılmasındaki zorluktur (Zheng vd., 2021). Bu teknik yalnızca düşük viskoziteli biyomürekkepleri basabilir ve bu da basılı yapıyı stabilize etmek için iyonik, termal, foto ve pH çapraz bağlama stratejileri ile hemen çapraz bağlama sonrası gerektirir. Çapraz bağlama sonrası stratejiler genellikle baskıdan önce biyomürekkep bileşenlerinin aşırı kimyasal modifikasyonlarıyla veya hücreler için toksik olabilecek ve dolayısıyla hücre canlılığını etkileyebilecek koşulların kullanılmasıyla ilişkilidir (GhavamiNejad vd., 2020). Buna ek olarak, viskozite gereksinimini karşılamak için biyomürekkep yüksek hücre yoğunluğunu enkapsüle edemez çünkü yüksek hücre yoğunluğu yüklemek viskoziteyi artırır ve daha sonra nozülün tıkanmasına neden olur (Gao vd., 2015). Bu sınırlamalar, yüksek mekanik mukavemete sahip büyük ölçekli doku/organların üretiminde kullanılmasını engellemektedir. Mürekkep püskürtme tabanlı biyobaskı tekniğinin bir diğer dezavantajı, biyomürekkebin düşük viskozitesinden kaynaklanan, enkapsüle edilmiş hücrelerin şırıngaya aktarıldıktan sonra kartuşun alt konumuna yerleşmesidir (J. Ferris vd., 2013). Hücrelerin çökelmesi sadece hücrelerin heterojen dağılımına neden olmakla kalmaz, aynı zamanda kartuşun alt kısmına yerleştirilen mürekkebin viskozitesini artırır ve daha sonra nozülün tıkanmasına sebep olmaktadır.

2.6.2.3. Lazer destekli biyoyazıcı teknolojisi

Lazer destekli biyobaskı olarak da bilinen lazer kaynaklı ileri transfer (LIFT) baskı sistemi, üç ana bölümden oluşur: (1) genellikle ultraviyole (UV) veya UV'ye yakın dalga boylarıyla çalışan darbeli lazer kaynakları, (2) üstte lazer kaynağının uyarımına yanıt veren enerji emici bir katman (Au/Ti) ve donör katmanın altına sarkan hücre içeren biyomürekkep içeren bir donör slayt (şerit), (3) basılı materyali alan bir toplayıcı tabaka (Mandrycky vd., 2016). LIFT biyobaskının tipik bir çalışma sürecinde, bir lazer darbesi emici tabakanın küçük bir bölgesine odaklanır, burada emici tabaka geçici olarak buharlaşır ve bu nedenle biyomürekkep ve emici tabaka arayüzünde yüksek basınçlı bir kabarcık oluşturur. Bu yüksek basınçlı kabarcık,

çapraz bağlanmanın ardından toplayıcı alt tabakaya doğru ilerlemek için biyomürekkep üzerine baskı uygular (Michael vd., 2013). LIFT'in çözünürlüğü ve ilişkili damlacık boyutu genellikle biyomürekkebin kalınlığı ve viskozitesi, lazer atım enerjisi, verici ve alıcı slaytlar arasındaki hava boşluğu, yüzey gerilimi ve alt tabakanın hidrofilikliği gibi bir dizi faktöre bağlıdır (Catros vd., 2011).

LIFT biyobaskı tekniğinin avantajları, nozülsüz çalışma sürecinden kaynaklanmaktadır (Compaan vd., 2017). Örneğin, diğer biyobaskı modları baskı sırasında sıklıkla nozül tıkanmasıyla karşılaşırken, LIFT biyobaskıda nozül tıkanması sorunu yaşanmamaktadır. Ayrıca, LIFT modunun nozulsuz süreci, hücrelerin diğer baskı modlarında nozul boyunca maruz kaldığı mekanik kayma stresini önleyerek daha yüksek hücre canlılığı sağlar (Hakobyan vd., 2020). Buna ek bir özellik olarak, LIFT biyobaskı düşük-orta viskoz biyomürekkep basabilir, bu da mürekkep püskürtme tabanlı tekniğe kıyasla çok çeşitli biyomürekkepleri basmak için kullanım alanını genişletir.

Diğer biyobaskı teknikleriyle karşılaştırıldığında üstün özelliklerine rağmen, dezavantajları da vardır (Jovic vd., 2019). İlk olarak, LIFT biyobaskı tekniğinin yaygın dezavantajı, büyük ölçekli doku üretimini engelleyen uzun işlem süresidir (Poomathi vd., 2018). İkinci olarak, LIFT baskı parametrelerinin uyarlanması kullanıcılar için karmaşık bir süreç oluşturmaktadır. Üçüncüsü, LIFT sisteminin maliyeti hızlı bir düşüş yaşamış olsa da diğer biyobaskı tekniklerine kıyasla hala oldukça pahalı bir sistemdir. Dördüncüsü, lazerle ışınlandığında lazer emici tabakanın buharlaşması metalik kalıntıların izini bırakarak kontaminasyon riskini beraberinde getirebilir. Bu sorunu ele almak için, metalik lazer emici tabakanın metalik olmayan bir lazer emici tabaka ile değiştirilmesi önerilmektedir (Huh vd., 2020). Beşinci olarak, lazer termal şoku nedeniyle hücrelere zarar verebilir (Gudapati vd., 2014). Bu sınırlamalar göz önüne alındığında, LIFT biyobaskı diğer baskı modlarına kıyasla daha az popülerdir.

2.6.2.4. Stereolitografi teknolojisi

Diğer biyobaskı tekniklerinin yanı sıra, stereolitografi, ışığa duyarlı biyomürekkeplerin katman katman çapraz bağlanması için ışık kullanan daha çarpıcı bir biyobaskı tekniğidir (Yue vd., 2016). Bu teknikte, tek bir baskı düzlemi oluşturmak için ışığa duyarlı biyomürekkep banyosu üzerinde bir lazer/dijital ışık projektörü kullanılır (Mandrycky vd., 2016). Daha sonra, baskı aşaması aşağı doğru hareket

ederek yeni biyomürekkep çözeltisinin basılı katmanı kaplamasına ve ardından yeni katmanın önceki katmanın üzerine yansıtılmasına izin verir. Bu nedenle, yazıcı kafasının yalnızca tek yönlü bir düzlemde hareket etmesi gerekir, bu da yüksek çözünürlüklü baskı kalıpları sağlar (Zakeri vd., 2020). Buna ek olarak, kalıbın karmaşıklığına bakılmaksızın, her katman için baskı süresi aynıdır çünkü tüm kalıp baskı düzlemi üzerine yansıtılır, bu da bu modun baskı sürecini kontrol etmeyi görece kolaylaştırmaktadır (Chartier vd., 2012).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Materyaller

İnsan akciğer adenokarsinoma epitelyal hücre hattı, A549	: ATCC CCL-185™, Washington, DC, ABD
İnsan endotelyal hücre hattı, EA.hy926	: ATCC, CRL-2922™, Washington, DC, ABD
İnsan normal bronşiyal epitelyal hücre hattı, BEAS-2B	: ATCC, CRL-3588™, Washington, DC, ABD
Primosin	: ant-pm-2, İnvivogen, California, ABD
Stabil glutamin	: STA-B, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya
RPMI-1640	: RPMI-A, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya
DMEM	: DMEM-HG, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya
Glutamax	: Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Amerika
Dulbecco's phosphate buffered saline	: PBS-1A, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya
Tripsin-EDTA	: 25200056, Thermo Fisher Scientific, Gibco, Massachusetts, ABD
Rekombinant insan EGF	: 585506, Biolegend, California, ABD
Rekombinant insan FGF	: 571506, Biolegend, California, ABD
Sığır serum albumin (BSA)	: BSA-1S, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya

Fetal sığır serumu (FBS)	: Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya
PerCP/Cyanine5.5 anti-human CD326 antibody	: 324214, Biolegend, California, ABD
PE/Cyanine7 anti-human CD133 antibody	: 372810, Biolegend, California, ABD
FITC anti-human CD44 antibody	: 338804, Biolegend, California, ABD
APC Annexin V kit	: 20-6410-KIT, TONBO, California, ABD
Propidium iodide solüsyonu	: 10008351, Cyman Chemical, Michigan, ABD
FITC anti human ABCG-2 antibody	: 332014, Biolegend, California, ABD
FITC anti human CD90 antibody	: 328108, Biolegend, California, ABD
Alexa Flour 488 seconder antibody	: 4408S, Cell Signaling Technology, Massachusetts, ABD
Alexa Flour 594 seconder antibody	: 8889S, Cell Signaling Technology, Massachusetts, ABD
Triton X-100	: 93443, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, ABD
Sodyum azid	: 26628-22-8, Thermo Scientific Chemicals, Massachusetts, ABD
Proteaz inhibitörü	: HY-K0010, MCE, New Jersey, ABD
Gelatin Methacrylate (GELMA) Lyophilizate	: Zetamatrix, İstanbul, Türkiye
Foto başlatıcı (fenil-2,4,6-trimetilbenzoilfosfinat, LAP)	: Cellink, İsveç

Metilselüloz	: SIGMA, Almanya
Aljinat	: 150–250 kDA, PRONOVA SLM100
Kalsiyum klorür	: C4901, Sigma Aldrich
%4 Paraformaldehit	: PFA, AAJ61899AP, Thermo Scientific
Canlı/ölü boyama kiti	: Live or Dead™ Fixable Dead Cell Staining Kit, ATT Bioquest, Kaliforniya, ABD

3.2. Kullanılan Cihazlar

Laminar air flow-class II	: Telstar Biovanguard, Tokyo, Japonya
CO_2/O_2- çok gazlı inkübatör	: Panasonic MCO-170M-PE, Kadoma, Japonya
-150°C derin dondurucu	: Panasonic MDF-C2156VAN-PE, Kadoma, Japonya
Floresan ataşmanlı inverted araştırma mikroskobu	: Carl Zeıss Axıo Observer D1, Oberkochen, Almanya
Taramalı elektron mikroskobu	: Hitachi Regulus 8230 FE-SEM, Japonya
Flow sitometri cihazı	: Agilent Novacyte 3500, Kaliforniya, ABD
qRT-PCR	: QIAGEN Rotor-GeneQ, Hilden, Almanya
Floresan ataşmanlı araştırma mikroskobu	: Leica DM2500, Wetzlar Almanya
Işık mikroskobu	: Kern, OBL-12/OBL-13, Balingen, Almanya
Otomatik pipet seti	: Eppendorf, Research® plus, Hamburg Almanya
Masaüstü soğutmalı santrifüj	: Hettich Rotına 380R, Westphalian, Almanya
Çalkalamalı su banyosu	: JeioTech BS-11, Seul, Kore
Şarjlı pipetör	: Rainin PX-100 EU, Kaliforniya, ABD

Kit saklama dolabı (+4/-20°C)	: Panasonic MPR-414F-PE, Kadoma, Japonya
Spektrofotometre	: Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ABD
Bilgisayar destekli tasarım programı	: CorelCAD™ 2021, Ottawa, Kanada
Üç boyutlu biyoyazıcı	: A3, Axolotl, İstanbul, Türkiye
Bilgisayar	: Asus Vivobook X509JB, Çin

3.3. Deney Grupları

Çalışmamızda, KHDAK hücre hattından (A549) izole edilen kök benzeri akciğer kanser hücrelerinin ($CD326^+$ $CD133^+$ $CD44^+$) 3 Boyutlu (3B) biyobaskılama yöntemi kullanılarak tasarlanan organotipik bir tümor mikro çevresinin incelenmesi için Tablo 3.1.'de gösterildiği gibi 3 farklı hücre grubu kullanılmıştır. Bu hücrelerle oluşturulan 2 deney grubumuz bulunmaktadır (Tablo 3.2).

Tablo 3.1. Hücre grupları.

1. Sağlıklı akciğer hücre grubu: İnsan normal bronşiyal epitelyal hücre hattı (BEAS-2B)
2. Endotelyal hücre grubu: İnsan endotelyal hücre hattı (EA. hy926)
3. Akciğer kanser kök hücresi grubu (AKKH): $CD326^+CD133^+CD44^+$ akciğer kanser kök hücreleri

Tablo 3. 2. Deney grupları.

3B Kültür Sonrası (7. gün)
1. Grup: Kontrol grubunun 7. gün 3B kültürü ile sağlıklı akciğer (BEAS-2B) modelinin oluşturulması
2. Grup: 2. deney grubunun 7 gün 3B kültürü ile akciğer tümör modelinin (BEAS-2B, AKKH ve EA. hy926) oluşturulması

3.4. Hücrelerin Temini, Çözdürülmesi, İzolasyonu ve Kültüre Edilmesi

3.4.1. İnsan endotelyal hücrelerinin (EA.hy926) çözdürülmesi ve kültüre edilmesi

İnsan endotelyal hücreleri (EA.hy926, CRL-2922, ATCC) önceden su banyosunda ısıtılmış 37°C'de %10 fötal sığır serumu (FBS; Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) ve %1 glutamax (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Amerika) içeren DMEM high glucose (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) besiyeri hazırlandıktan sonra dondurucudan getirilen ve 37°C su banyosundan çok hızlıca buzu çözülmesi sağlanan hücre vialine hızlıca eklendi. Hücreler konik tabanlı 15 ml'lik santrifüj tüpüne alındı. 125xg'de 5 dk boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında hücre pelletinin üzerindeki süpernatant atıldı. Pellet üzerine besiyeri eklenmek suretiyle tekrar süspansiyon haline getirildi. Hücre süspansiyonundan alınan 20 µL örnek ile uygun sayıda hücre tespiti için Thoma lamında tripan mavisi (1:1) ile boyandı ve ışık mikroskobunda hücreler sayılarak canlılıkları tespit edildi. Daha sonra pellete kültür besiyeri eklenerek T25 ve ardından T75 kültür flasklarında ekilerek kültüre devam edildi. T75 flask için 700.000, T25 flask için 250.000-300.000 hücre ekildi. Konfluensi yüksek iken bir T75 flasktan 1.5-2 milyon hücre elde edildi. 8 ml besi yeri T75 için, 4 ml besi yeri ise T25 için kullanıldı ve 2 günde bir besiyeri değiştirildi. Pasaj için tripsin (T75 için 600 µL, T25 için 200 µL) ilave edilip, 2-3 dakika inkübatörde (Panasonic, MCO-170M-PE, Kadoma, Japonya) bekletildi. 2 ml'ye tamamlanacak şekilde kendi besiyeri ile tripsin inaktive edildi. Thoma lamında tripan mavisi 1:1 oranında karıştırılıp mikroskopta (Kern, OBL-12/OBL-13, Balingen, Almanya) hücreler sayılarak canlılıkları tespit edildikten sonra pellete kültür besiyeri eklenerek T75 kültür flasklarına ekildi. Kültürü devam eden hücreler olası deney tekrarlamada kullanılmak üzere her pasajda kriyoprezervasyon işlemine tabi tutuldu.

3.4.2. İnsan normal bronşiyal epitel hücrelerinin çözülmesi ve kültüre edilmesi

BEAS-2B (insan normal bronşiyal epitelyal hücre hattı, ATCC, CRL-3588™, Washington, DC, ABD) hücreleri; %10 fötal sığır serumu, %1 glutamax (Sigma-Aldrich) içeren RPMI-1640 besiyeri (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) içerisinde %5 CO_2, %5 O_2 ve %95 bağıl nem ve 37°C kültür besiyerinde çoğaltıldı. Kültür kabı %70 oranında hücre yoğunluğuna sahip olduğu zaman (yaklaşık 2-3 gün)

alt kültürlere pasajlandı. Bunun için eski besiyeri çekilerek 1 mL PBS ile 2 kez yıkama yapılarak eski besiyeri uzaklaştırıldı. Ardından hücreler tripsin ile süspanse edildi. Tripsin enzimini nötralize etmek için tripsin miktarının en az iki katı kadar miktarda besiyeri eklendi. Süspanse hale gelen hücreler santrifüj tüpüne alınarak 300xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı. Tüpün dibinde kalan hücrelerin bir kısmı dondurulmak üzere ayrılıp, kalan kısmı ile ise pasaja devam edildi ve hücrelerin flasklara yeniden ekimi yapılarak inkübatöre kaldırıldı. Kültürü devam eden hücreler olası deney tekrarlamalarında kullanılmak üzere her pasajda kriyoprezervasyon işlemine tabi tutuldu.

3.4.3. Akciğer kanseri hücrelerinin temini, çözdürülmesi ve kültürü

İnsan adenokarsinomik alveoler bazal epitel hücreleri olan A549 akciğer kanser hücre hattı (ATCC CCL-185™, Washington, DC, ABD) ticari olarak satın alındı ve deneylerde gerekli olan sayının elde edilmesine kadar kültür edildi ve çoğaltıldı. Bunun için hücreler; %10 fötal sığır serumu (Capricorn), %1 primocin (Invivogen) ve %1 stabil glutamin (Capricorn) içeren RPMI-1640 (Capricorn) besiyerinde, %5 CO_2, %5 O_2 ve %95 bağıl nemde ve 37°C inkübatörde çoğaltıldı.

Kültür kabı %70 oranında proliferasyona ulaştığı zaman (yaklaşık 2-3 gün) alt kültürlere pasajlandırıldı. Bunun için eski besiyeri çekilerek 3 mL Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (dPBS, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) ile 3 kez yıkama yapılarak eski besiyeri uzaklaştırıldı. Ardından hücrelerin üzerine %0.25 tripsin-EDTA (Etilendiamin tetra asetik asit, Thermo Fisher Scientific, Gibco, Massachusetts, ABD) ile süspanse edildi. Üç dakika inkübatörde bekletilen flasklar inkübatörden alındıktan sonra hücrelerin üzerine tripsin-EDTA'yı nötralize etmek için tripsin miktarının en az iki katı kadar miktarda besiyeri eklendi. Süspanse hale gelen hücreler santrifüj tüpüne (Sarstedt, Nümbrecht, Almanya) alınarak 300xg'de 5 dakika boyunca santrifüj cihazında (Hettich, Rotina 380R, Westphalian, Almanya) santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı. Bu işlem iki kez daha tekrarlandı. Son evrede hücre sayımı için hücre pelleti 1 ml besiyeri ile resüspanse durumuna getirildi. İçerisinden 10 µl alınarak 200 µl'lik kapaklı konik tabanlı tüpe aktarıldı. Üzerine 1:1 oranında tripan mavisi eklenerek Thoma lamında ışık mikroskobunda sayıldı. Yapılan sayım ile elde edilen sonuç aşağıdaki formül ile hesaplanarak hücre sayısı elde edildi.

Toplam hücre sayısı = 16 büyük karedeki hücre sayısı x 10,000 x dilüsyon faktörü

Sonraki kültürlerde kullanılmak üzere A549 hücreleri $7x10^5$ hücre/flask olacak şekilde T75 flasklara ekilerek kültürlerine devam edildi. Hücre pelletinin kalan kısmı ilerideki çalışmalarda kullanılmak üzere dondurulduu. Bunun için hücreler 300xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı ve hücre pelletine daha önce hazırlanıp 2-8°C bekletilmiş olan kriyoprezervasyon solüsyonu (%35 FBS içeren RPMI-1640 besiyeri) ile mikropipet ile hızla homojenize hale getirildi. Hızlı bir şekilde her bir kriyovialde $3x10^6$ hücre olacak şekilde kriyoviallere paylaştırıldı. Yine hızlı bir şekilde her bir kriyoviale %5 dimetil sülfoksit (DMSO) pipetaj işlemi yapılmadan eklendi. Hücrelerin homojenize olması için kriyoviallerin dış kısmından el ile tabanına yakın nazikçe vuruldu. Hızlı bir şekilde, dondurma işleminden önce kriyoprezervasyon kayıt defterinde belirlenmiş olan alana, ulaştırılarak -150°C derin dondurucuya (Panasonic MDF-C2156VAN-PE, Kadoma, Japonya) yerleştirildi ve kriyoprezerve edildi.

Tüpün dibinde kalan hücrelerin bir kısmı dondurulmak üzere ayrılıp, kalan kısmı ise pasajı devam edecek flasklara yeniden ekilerek inkübatöre kaldırıldı. Kültürü devam eden hücreler olası deney tekrarlamada kullanılmak üzere her pasajda kriyoprezerve edildi.

3.5. İzole edilmiş $CD326^+CD133^+CD44^+$ Akciğer Kanser Kök Hücrelerin Karakterizasyonu ve Kültürü

A549 hücre hatlarından immünoselektif olarak izole edilmiş olan $CD326^+CD133^+CD44^+$ akciğer kanser kök hücreleri tümörsferik tipteki kültür ortamında çoğaldı ve flow sitometri cihazı ile immunofenotipik karakterizasyonu yapıldı.

3.5.1. İzole edilen $CD326^+CD133^+CD44^+$ akciğer kanser kök hücrelerinin tümörsferik kültürü

Kanser kök hücreler, kanser kök hücre karakterlerini monolayer kültürde koruyamazken tümörsferik tipte üç boyutlu kültür modelinde kanser kök hücre karakterini koruyabilmektedir. Bu nedenle izole edilen $CD326^+CD133^+CD44^+$ akciğer kanser kök hücreler izolasyonun başarılı olmasını sağlayan pozitiflik belirlendikten

sonra bir sonraki deneylerde kullanmak üzere tümörsferik tipte üç boyutlu kültür ortamında çoğaltıldı.

Bunun için öncelikle hücre kültür kaplarının yüzeyleri, hücrelerin yüzeye tutunmasını engellemek amacıyla, Poly2-hydroxyethylmethacrylate (p-D-HEMA) ile kaplandı. Toz halinde satın alınan p-D-HEMA 2.4 gram tartılarak 20 mL %95 etanol içersinde, 50°C-70°C'de 16 saat boyunca çözdürüldü. Böylece 10x konsantrasyonunda ana stok hazırlandı. Hücre kültür kaplarının yüzeylerini kaplamak amacıyla ana stok %95 ethanol kullanarak, 1:10 oranında dilüe edildi ve 0.22 µm filtreden süzdürülerek steril edildi. Hücre kültür kaplarının yüzeyini kaplayacak şekilde steril 1x p-D-HEMA solüsyonu eklendi ve 45-60°C etüvde 24 saat boyunca inkübasyona tabi tutularak yüzey kaplanması sağlandı. 24 saat sonunda yüzeyi kaplanan kültür kapları PBS ile yıkandı ve ardından hücreler serum içermeyen tümörsfer-XF (Promocell, Heidelberg, Almanya) besiyeri içerisinde, yüzeyi kaplanan kültür kaplarına ekilerek 37°C inkübatörde çoğaltıldı. Tümörsferik kültürün oluşumu her gün faz kontrast ışık mikroskobu altında kontrol edilerek 3 günde bir besiyeri değişimi yapıldı. Bir sonraki aşamada $CD326^{+}CD133$ $CD44^{+}$ akciğer kanser kök hücre tümörsferik kültürler, karakterizasyon işlemleri için çoğaltıldı.

3.5.2. $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ akciğer kanser kök hücrelerin flow sitometri ile karakterizasyonu

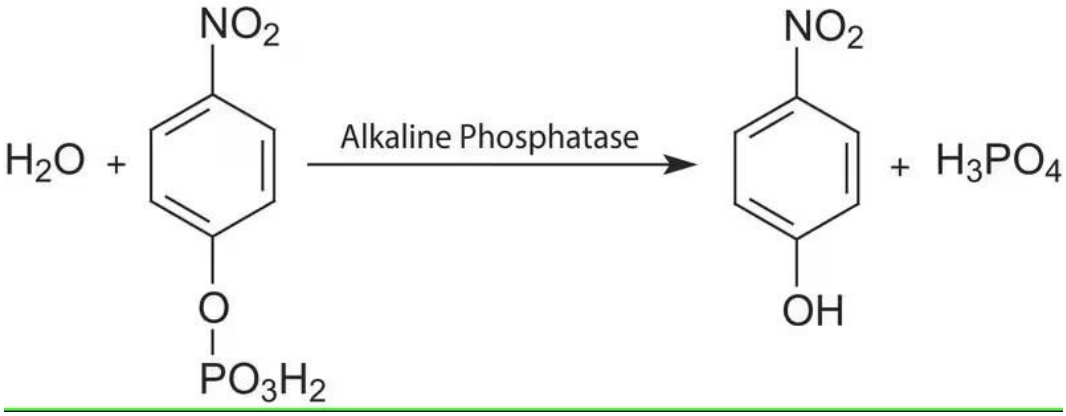
İzole edilip tümörsferik tipte 3B kültür ortamında çoğaltılan $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ kanser kök hücrelerin karakterizasyon analizleri için hücrelerde; CD44, CD90, CD117, CD326, CD338 (ABCG2) ve CD133 belirteçleri flow sitometri yöntemi ile analiz edildi.

PerCP/Cyanine5.5 anti-human CD326, PerCP/Cyanine7 anti-human CD133, FITC anti human CD44, FITC anti human ABCG2/CD338 (Biolegend, California, ABD), FITC anti human CD90 (Biolegend, California, ABD) antikorlar ile hücrelerde flow sitometri cihazında ileri karakterizasyon analizleri yapıldı. Bunun için hücreler tripsin-EDTA ile süspanse edilerek 300xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Hücre pelleti soğuk PBS ile yıkandı. Üzerine 100 µL bağlanma solüsyonu (%2 FBS içeren PBS) ve 1 µL ilgili antikor eklenerek, 30 dakika boyunca +4°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 400 µL PBS eklenerek flow sitometri (Agilent Novacyte 3500,

Santa Clara, ABD) cihazında okutuldu. NovoExpress (Agilent, Santa Clara, ABD) programında analiz işlemleri gerçekleştirildi.

3.5.3. $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ akciğer kanser kök hücrelerinin ALP analizi

KKH'lerin köklülüğünü gösteren karakterizasyon analizi olarak uyguladığımız ALP analizi için hücrelerin liziz edilebilmesi için PBS üzerine, %0,1 Triton X-100 (Sigma Aldrich, 93443), %0,1 sodyum azid (Acros Organics, 26628-22-8) ve %1 proteaz inhibitörü (MCE, HY-K0010) eklenerek liziz solüsyonu hazırlandı. Ardından tüm tüpler 30 dakika boyunca buzda bekletilmiştir. Sonrasında her bir tüpe liziz solüsyonu kadar (600 µl) besiyeri eklenmiş ve pipetleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Pipetleme işlemi sonrasında 20 µl besiyeri-lizat solüsyonu 96 kuyulu hücre kültürü kabına aktarılmıştır. Ardından her bir kuyuya, 100 µl (25°C) p-nitrofenil fosfat (pNPP) (Sigma Aldrich, P7998) eklenmiştir. Alkalin fosfataz ile hidrolize olan pNPP substratları reaksiyon sonucunda sarı renk meydana getiren, p-nitrofenol'e dönüşmektedir (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. pNPP'den, *p*-nitrofenol oluşumu (Sigma Aldrich'ten, 2023).

Ardından, örnekler 37 °C'de, 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, reaksiyonu durdurmak için her bir kuyuya 150 µl 1M NaOH solüsyonu eklenmiştir. Elde edilen kolorimetrik değişimler 405 nm dalga boyunda 3 kez okundu ve her hücre tipi için sonuçların ortalaması alınarak, ortalama absorbans değerleri elde edilmiştir. Bu ortalama absorbans değerleri, sığır serum albümini (BSA) referans grafiğine ait denklemdeki ilgili parametrede yerine yazılarak, içerdiği protein miktarı hesaplanmıştır.

3.5.4. $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ akciğer kanser kök hücrelerin telomeraz aktivitesi analizi

A549 akciğer kanser hücre hattından izole edilen $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ akciğer kanser kök hücrelerin pasaj 3'te telomeraz aktivitesi, Telomerase Activity Quantification qPCR Assay kiti (ScienCell Research Laboratories, Kaliforniya, ABD) ile üretici protokolünü takiben değerlendirildi. PCR ile telomer tekrar dizisi çoğaltılması protokolü (TRAP) uygulanarak ve qRT-PCR ürünlerinin kantitatif analizleri ΔΔCt hesaplama yöntemiyle belirlendi. Kısaca hücreler süspanse hale getirildikten sonra liziz tampon çözeltisi kullanılarak lizat hale getirildi. Daha sonra örnekler telomeraz reaksiyon tamponu ile 20 µl hacimde olacak şekilde hazırlandı. 20µl PCR reaksiyon hacmi için, 1µl telomeraz reaksiyon örneğinden, 2µl primer stok solüsyon (TPS, ScienCell Research Laboratories), 10µl 2xGoldNStart TaqGreen qPCR master mix (MB6018a-1, ScienCell Research Laboratories), ve 7µl nükleaz free su eklendi. Kit içerisinde bulunan pozitif kontrol örnekleri kullanılarak pozitif ve negatif kontrol tüpleri hazırlandı.

3.6. Transwell Membranların İnsan Endotelyal Hücreleri ile İki Taraflı Kaplaması

Transwel membranın (0,4 µm) alt ve üst yüzeyi 0,2 mg/ml kollajen ile 2 saat boyunca %5 CO_2'lik atmosfer, %95 bağıl nem ve 37°C'de kaplandı. İnsan endotelyal hücreleri (EA.hy926), 660 hücre/cm^2 olacak şekilde ekildi ve gece boyu kültüre edildi. İnkübasyon sonrası mikroskopta hücreleri kontrol edilen transwel örnekleri üzerine BEAS ve AKKH biyobaskılaması yapıldı.

3.7. Ön Biyobaskı Çalışması için Biyomürekkep Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Biyomürekkep ile ön baskı ve karakterizasyon işlemi, %5 (w/v) jelatin ve %5 (w/v) aljinat içeren, PBS ile mekanik karıştırıcıda 60°C sıcaklıkta bir saat boyunca çözünme süreci devam eden hidrojelin oluşturulmasıyla yapıldı. BEAS hücresi yüklü iskele oluşturma amacıyla yapılan bu ön çalışmada öncelikle bir bilgisayar destekli tasarım (CorelCAD™ 2023, Almanya) programında 12 mm daire şekli 3B olarak STL formatına dönüştürüldükten sonra 3B biyoyazıcının (Axolotl A3, İstanbul, Türkiye) kendi yazdırma programına (AxoSuite, Axolotl, Türkiye) yüklendi. Ardından bu modeli G kodlara dönüştüren program ile biyobasım işlemi gerçekleştirdi. Biyobasım

öncesinde ve sırasında biyobasım parametreleri kaydedildi (Tablo 3.3.). Yazdırma işleminden sonra iskelenin çözünürlüğü ve filamentler arası mesafenin çapının ölçümü floresan ataşmanlı inverted araştırma mikroskobunda (Leica DM2500, Wetzlar Almanya) yapıldı (Şekil 3.2.).

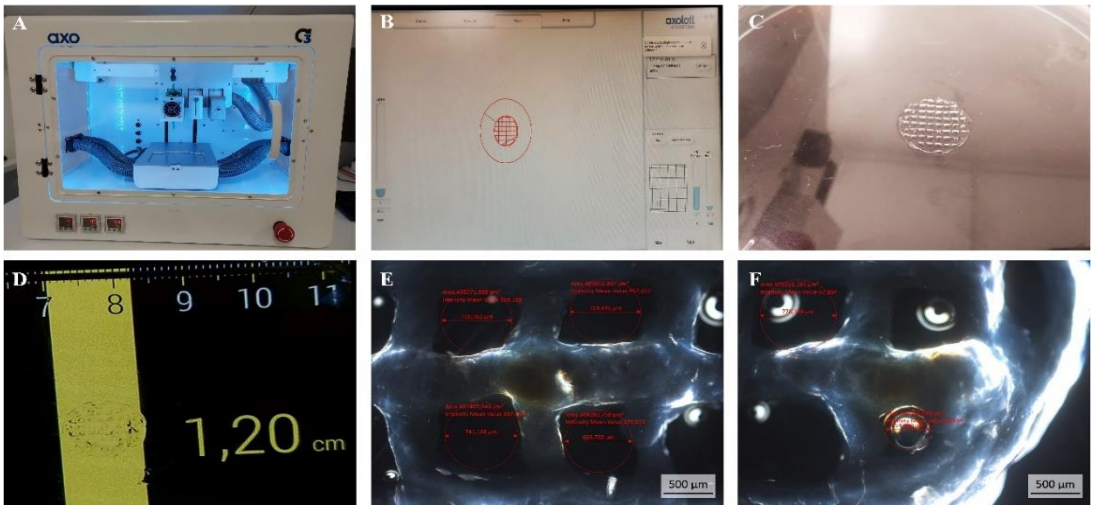
Tablo 3.3. Üç boyutlu biyoyazıcı operasyonel parametreleri.

Materyal	%5 jelatin %5 aljinat
Nozul	22G konikal
Dolgu deseni	Kafes
Dolgu yoğunluğu	%70
Ekstrüzyon basıncı	4-5 psi
Baskı kafası sıcaklığı	15 ^{o}C
Plaka Sıcaklığı	24 ^{o}C
Katman yüksekliği	0.10 mm
Katman sayısı	4

Biyomürekkebin malzeme seçiminin genel prensibi, biyouyumluluğa ek olarak, yazdırılırken iyi akışkanlığa ve uygun viskoziteye sahip olması ve yazdırıldıktan sonra kolayca katılaşabilmesi, böylece yapının belirli bir süre boyunca şeklini koruyabilmesidir (Chung vd., 2013). Bu nedenle çalışmamızda, öncelikle ön biyobasım denemesi yapmak için aljinat ve jelatin karışımı bir hidrojel oluşturuldu. Aljinat ve jelatinin seçilme nedeni ise aljinat hızlı çapraz bağlanmaya izin verirken, jelatin ısı duyarlılığı sağlar (Paxton vd., 2017). Aljinat-jelatin biyomürekkebi, aljinatın hızlı iyonik çapraz bağlanmasını ve jelatinin çok katmanlı baskı için sıcaklık hassasiyetini birleştirir ve biyobaskı uygulamalarında biyomürekkep olarak yaygın şekilde kullanılır (Ouyang vd., 2016). Hidrofilik yapısından dolayı, aljinat iskeleler kültür sırasında hücre canlılığının korunmasına olanak sağlar, çünkü besiyeri ve hücreler kapiller hareket yoluyla iskele içine çekilir. Hücrelerin yoğun biçimde kültürlenmesinin faydalarından biri de hücreler arasındaki temas etkileşimlerinin arttırılmasıdır (Luong & Gerecht, 2009). Diğer taraftan, biyouyumluluğu korurken jelatin ekleyerek sodyum aljinatın yapısını güçlendirmek mümkündür, çünkü çözünmüş jelatin vücut sıcaklığında (37 °C) bir çözelti oluşturur ve soğuduktan sonra

(<29°C) bir jel oluşturabilir (Cadamuro vd., 2023). Jelatinin bu termal özellikleri, biyomürekkepler için iyi akış özelliklerini garanti eder ve biyobaskı işlemi sırasında Ca^{+2} ile birleştirilmiş aljinata kıyasla daha hızlı jelleşmeye izin verir, bu da üretilen yapının başlangıçtaki stabilitesini artırır (Fan vd., 2005; Chung vd., 2013; Berg vd., 2021).

Çalışmamızda, hücreler ile biyomürekkep hazırlamak için iki ayrı içeriğe sahip hidrojel hazırlandı. BEAS-2B hücreleri yüklü biyomürekkep için %10 GelMA (w/v) (Zetamatrix, İstanbul, Türkiye) hidrojeli (biyomürekkep 1) hazırlandı. $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ kanser kök hücre yüklü biyomürekkep için ise %5 GelMA (w/v), %0.5 aljinat (w/v) (150–250 kDA, PRONOVA SLM100) ve %0.5 metilselüloz (w/v) (SIGMA, Almanya) hidrojelleri (biyomürekkep 2) kullanıldı (Şekil 3.3. ve Şekil 3.4.). Metakriloil grupları içeren jelatinden türetilen bir hidrojel olan GelMA'nın foto başlatıcılar kullanılarak çapraz bağlanması sağlandı. Hidrojeller içinde hücresel kapsülleme için, lityum fenil-2,4,6-trimetilbenzoilfosfinat (LAP) (Cellink, İsveç) fotobaşlatıcı kullanılarak görünür ışıkta (λ = 405 nm) çapraz bağlanması gerçekleştirildi. Buna ilaveten biyomürekkep 2 kullanıldığında ekstradan 150 mM kalsiyum klorür ile 2 dakika muamele edilerek aljinat polimerinin iyonik çapraz bağlanması sağlandı.



Şekil 3.2. Üç boyutlu ön biyobaskı. **A:** Kullanılan 3B biyoyazıcı görüntüsü. **B:** 12 mm çapa sahip STL formatında dairesel şeklin biyoyazıcı programına yüklendiği ve baskı parametrelerinin ayarlandığı kısmı gösteren görüntü. **C:** Biyobaskı süreci sonunda ortaya çıkan iskele görüntüsü. **D:** İskelenin çapını gösteren görüntü. **E-F:** Filamentlerin mikroskobik görüntüsü (Filamentler arası mesafe ortalaması: 682.5 µm, filament çapı ortalaması: 444 µm. Skala bar: 500 µm).

3.8. Üç Boyutlu (3B) Biyoyazıcı ile Hücre Yüklü Biyomürekkebin Kokültür için EA Kaplı Transwell Membranlara Basılması ve Karakterizasyonu

3.8.1. BEAS-2B yüklü biyomürekkebin basılması (1. grup)

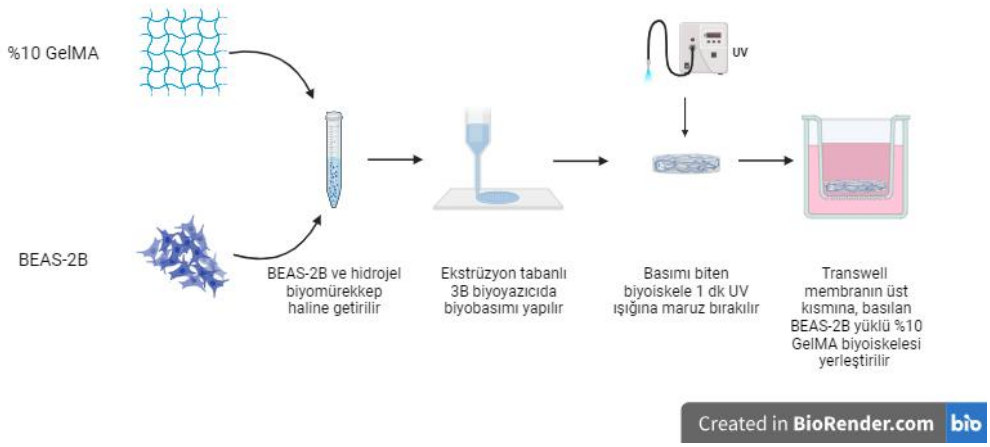
Biyobaskı için hücre yüklü GelMA (Zetamatrix) çözeltisini hazırlamak amacıyla, %10 (w/v) GelMA hidrojel çözeltisi, dondurularak kurutulmuş GelMA'nın 37°C'de %10 fötal sığır serumu (Capricorn), %1 primocin (Invivogen) ve %1 stabil glutamin (Capricorn) içeren RPMI-1640 (Capricorn) besiyerinde, çözülmesi ve homojen çözelti oluşturmak için bir saat boyunca bu sıcaklıkta tutulmasıyla hazırlandı. Lityum fenil-2,4,6 trimetilbenzoilfosfinat (LAP) prepolimer çözeltilerine %0,05 (w/v) oranında eklendi. Hücre yoğunluğu (konfluensi) %70 olan flasklar eski besiyeri çekilerek 3 mL Ca+2 ve Mg+2 içermeyen Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (dPBS, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Almanya) ile yıkandı. Hücreleri flasklardan ayırmak için %0,25 tripsin-EDTA (Thermo) ile 37°C'de %5 CO_2'de 3 dakika inkübe edildi. Üç dakika sonra mikroskopta hücrelerin flasklardan ayrıldığı

belirlenince tripsin-EDTA'yı nötralize etmek için tripsin miktarının en az iki katı kadar serum içeren besiyeri eklendi. Hücre solüsyonu santrifüj tüpüne (Sarstedt, Nümbrecht, Almanya) alınarak mikropipet ile nazikçe homojenize edildi. 300xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı. Bu işlem iki kez daha yapıldı. Son aşamada hücre sayımı için pelleti 1 ml besiyeri ile resüspanse hale getirildi. İçerisinden 10 µl alınarak 200 µl'lik kapaklı konik tabanlı tüpe aktarıldı. Üzerine 1:1 oranında tripan mavisi eklenerek Thoma lamında ışık mikroskobu (Kern) altında sayıldı. Yapılan sayımdan sonra sonuç aşağıdaki formül ile hesaplanarak hücre sayısı bulundu.

Toplam hücre sayısı = 16 büyük karedeki hücre sayısı x 10,000 x dilüsyon faktörü

Hücre sayımı yapıldıktan sonra $2x10^6$ hücre/mL olacak şekilde kullanılacak hücre miktarı belirlendikten sonra hücre süspansiyonu tekrar oda sıcaklığında 5 dakika boyunca 300xg'de santrifüj edildi, süpernatant atıldı ve hücreler %0,05 (w/v) LAP içeren %10 (w/v) GelMA solüsyonu içinde resüspanse edildi. Hücre yüklü GelMA hidrojel biyomürekkebi, 3B biyoyazıcının (Axolotl A3, İstanbul, Türkiye) kartuşuna $2x10^6$ hücre/mL olarak enjektör ve luer/lock adaptör yardımıyla yüklendi. Kartuş biyoyazıcı baskı kafasına yerleştirildikten sonra 22G (410 µm) nozül bağlandı. Bu işlemler süresince laboratuvar ışıkları kapalı tutuldu. Baskı parametreleri: Basınç 1-2 psi ve hız 14 mm/saat olarak ayarlandı.

İlk deney grubu (1. grup) olarak konulan EA.hy926 kaplı Transwell insert membran üzerine biyomürekkep 12 mm transwell insert membranla uyumlu bir şekilde daha önce bir bilgisayar destekli tasarım (CorelCAD™ 2021) programında tasarımı yapılan model, modele uygun 12 mm çapında daire oluşturacak şekilde biyoyazıcıyla basıldı. Ardından üzerine BEAS-2B yüklü biyomürekkep basıldı. 12 kuyucuklu plakaya baskı yapılan transwell insert membran konuldu, alt ve üst odacıklara RPMI-1640 besi yeri eklenip inkübe edildi (Şekil 3.3.).

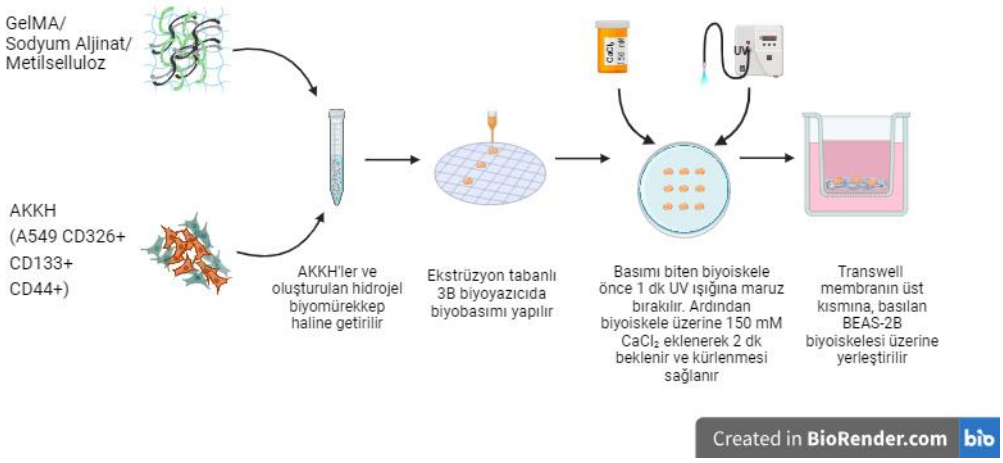


Şekil 3.3. BEAS-2B yüklü biyomürekkebin (1. grup) basılması.

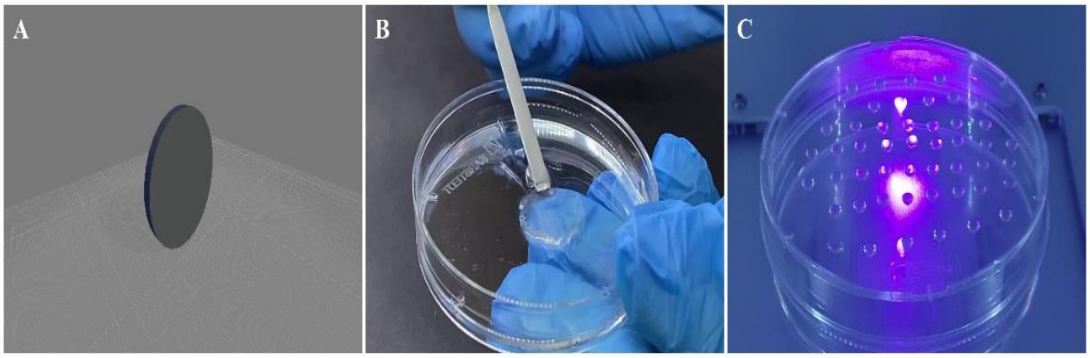
3.8.2. BEAS (biyomürekkep 1) ve $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ akciğer kanser kök hücre yüklü biyomürekkebin (biyomürekkep 2) basılması (2. grup)

İkinci deney grubu olarak kartuşa konulan EA.hy926 kaplı transwell insert membran üzerine BEAS-2B hücre yüklü biyomürekkep basıldı (Şekil 3.4.). Sonrasında izole edilen $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ akciğer kanser kök hücre yüklü biyomürekkep damlacık şeklinde basıldı. İşlem sonunda biyoyazıcıda bulunan UV lambası ile GelMA fotopolimerizasyonu gerçekleştirilip hemen ardından 150 mM $CaCl_2$ (kalsiyum klorür) ile 2 dakika boyunca muamele edilerek aljinat polimerinin iyonik çapraz bağlanması sağlandı. 12 kuyucuklu plakaya baskı yapılan transwell insert membran konuldu. Alt ve üst odacıklara RPMI-1640 besiyeri eklenip %5 CO_2, %5 O_2 ve %95 bağıl nem ve 37°C kültür ortamında inkübe edildi (Şekil 3.5.).

Baskı parametreleri: Basınç 3-4 psi ve hız 14 mm/saat olarak ayarlandı.



Şekil 3.4. Kanser kök hücre yüklü biyomürekkebin (2. grup) basılması.



Şekil 3.5. Genel biyobaskı aşamalarından görüntüler. **A:** 12 mm daire modelinin STL formatı görünümü. **B:** BEAS yüklü iskelenin biyobasımdan sonraki görüntüsü. **C:** AKKH damlacık basımından sonraki UV ile kürleme görüntüsü.

3.8.3. Biyomürekkep 1 'in taramalı elektron mikroskobuyla (SEM) karakterizasyonu

SEM incelemesi Eskişehir Osmangazi Üniversitesi – Merkezi Araştırma Laboratuvarı ve Uygulama Araştırma Merkezi (ARUM)'da gerçekleştirildi. Kullanılan biyobaskılanmış BEAS-2B yüklü iskeleler önce %4 gluteraldehit (EMS) solusyonu içerisine alınmıştır. Bu solusyon içerisinde 1-1,5 saat fiksasyona tabi tuttuktan sonra PBS (Sigma Aldrich) çözeltisi ile iki defa 1-2 dakika yıkama yapılmıştır. Yıkamanın ardından ikinci fiksasyon için %1'lik osmiyum tetraoksit (EMS) çözeltisine alınmıştır. 15 dakika fikse ediledikten sonra PBS çözeltisi ile iki defa 1-2 dakika yıkama yapılmıştır. Bu aşamadan sonra örnekler dehidrasyon için artan alkol konsantrasyonlarında (soğuk %30 - %50 - %70 - %90) 10 dakika +4 °C'de

bekletilmiştir. En son %100 alkolde oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sona örnekler kritik noktada kurutma cihazına (Leica CPD300) alınarak hazır hale getirilmiştir. Örnekler stub üzerine alındıktan sonra Leica ACE600 cihazı kullanılarak 3-5 nm kalınlığında Au/Pd karışımı ile kaplanarak iletken hale getirilmiş ve örnekler SEM cihazında (Hitachi Regulus 8230) incelenmeye alınmıştır.

3.8.4. Canlı/ölü işaretleme ile hücre metabolik aktivite testi

Bu yöntemde floresan boyalar kullanılmaktadır. Normalde floresan olmayan Casein AM canlı hücrelerde hücre içi esterazlar tarafından asetoksimetil ester hidrolizinden sonra yeşil floresan Calseine dönüştürülür. Propidyum iyodür ise ölü hücrelerin DNA'sına bağlanarak kırmızı floresan renk yaymaktadır. Farklı renkte floresan renklerin ışımaları sayesinde doku iskelesi ile hücrelerin etkileşimleri incelenebilmektedir. Hücrelerin 3 boyutlu hidrojel/ECM yapılarına tutunmasını, yayılmasını ve toksisitesini incelemek için etkili bir yöntemdir (Risbud vd., 2002).

Canlı-ölü işaretleme kiti (Live or Dead™ Fixable Dead Cell Staining Kit, ATT Bioquest) kullanımı için önce biyoiskelelerin fosfat tamponu (1x PBS) ile yıkaması yapıldı. Sonrasında biyoiskeler içerisine 2 µM calcein-AM ve 4 µM propidium iodide boyalarını içeren besiyeri çözeltisi eklendi, karanlıkta 30 dk boyunca 37°C, %5 CO_2 ve nemli ortamda canlı boyama yapıldı. Hücrelerin canlı/ölü durumları hızlı bir şekilde ZEISS Axio Observer D1 zıt faz mikroskopta floresan görüntüleme ile gözlendi. Analiz edilen görüntülerde canlı hücreler yeşil renkte ve ölü hücreler kırmızı renkte gösterilmiştir.

Hücre canlılığı:

Hücre canlılığı (%): Canlı hücreler (yeşil) / Tüm hücreler (yeşil+kırmızı) X 100 (%) denklemine göre ImageJ yazılımı kullanılarak ölçüldü.

3.8.5. Histokimyasal analiz

Üç boyutlu biyobaskılanmış ve 7 gün boyunca hava-sıvı ara yüzeyinde kokültür edilmiş sağlıklı akciğer modeli ve akciğer tümör modeli %1 agara (SIGMA) gömüldükten sonra dokular oda sıcaklığında bir gece boyunca %4 paraformaldehit (PFA, AAJ61899AP, Thermo Scientific) fosfat tampon çözeltisi ile sabitlendi. Sonrasında örnekler akan musluk suyunda yıkandı, kademeli etil alkolde dehidrate edildi ve ksilende yıkandı. Dokular parafinle kapatıldı, bir mikrotom kullanılarak 4 µm

kalınlığında dilimler halinde kesildi ve H&E ile boyandı Örnekler daha sonra Leica DM2500 (Wetzlar Almanya) mikroskobu kullanılarak görüntülendi.

3.8.6. İmmunoflouresan işaretleme

Yapılmış olan 3B in-vitro model ile köklülük genlerindeki değişim immunositokimyasal (İF, İmmunoflouresan) yöntemler karakterize edildi. Bunun için İF işaretleme deneylerinde tüm deney gruplarında (membran üzerindeki hücreler) öncelikle %4 paraformaldehit fiksasyonu (oda sıcaklığında) yapıldı ve boyamalar için hazır hale getirildi. İF kapsamında biyobaskılanmış yapılar akciğer kanser kök hücre karakterizasyonu için kanser kök hücrelere özgü CD44 ve CD133 primer antikorlarıyla işaretlenerek Floresan ataçmanlı inverted faz kontrast araştırma mikroskobunda (Zeiss) görüntülendi. Antikor boyaması için fikse edilmiş hücreler uygun blok solüsyonlar ile 30 dk muameleye bırakıldıktan sonra CD44 ve CD133 antikorları ile gece boyu +4°C'de bekletildi. Ertesi gün örnekler oda sıcaklığında PBS ile yıkanarak primer antikor uzaklaştırıldı. Primer antikorlara uygun sekonder antikorlar ile 1 saat muamele edilen hücreler, en son çekirdek belirteci olan DAPI ile boyanarak floresan mikroskopta görüntülendi.

3.9. İstatistiksel Analiz

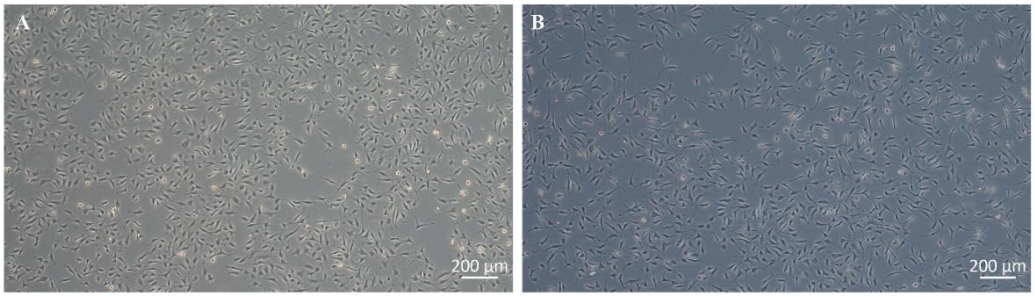
Sonuçlar genel olarak ortalama±standart sapma olarak sunulacaktır. İstatistiksel analizler için uygun yazılımlar (GraphPad Prism yazılımı) kullanılarak gerçekleştirildi. Deney grubu arasındaki farklar çalışmaya uygun istatistiksel testler kullanılarak $p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{*}p<0.001$ ve $^{***}p<0.0001$ şeklinde gösterildi.

4. BULGULAR

4.1. Hücrelerin Temini, Çözdürülmesi, Kültürü ve Karakterizasyonu

4.1.1. İnsan endotelyal hücrelerinin çözülmesi ve kültürü

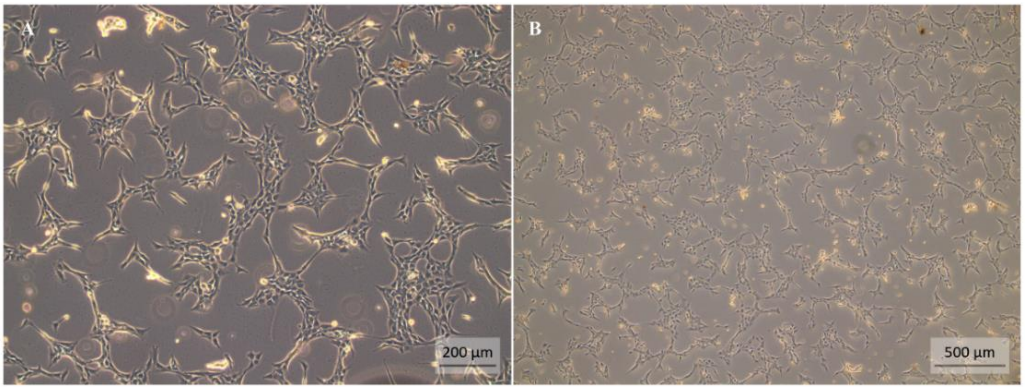
Çözülerek kültür edilen insan endotelyal hücreleri (EA.hy926), kültür sırasında günlük olarak faz-kontrast mikroskobu (Zeiss Axıo Observer D1, Oberkochen, Almanya) ile incelendi ve fotoğraf çekimleri yapıldı. Yapılan mikroskobik incelenmelerde, hücrelerin yıldız şekilli veya daha çok epitelyal benzeri morfolojiye sahip oldukları görüldü (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Kültüre alındıktan sonra insan endotelyal hücrelerinin (EA.hy926) erken ve ileri pasajlardaki faz kontrast mikroskop görüntüleri. **A:** 13. Pasaj, 4. gün. **B:** 20. pasaj, 3. gün. Skala barlar: 200 µm.

4.1.2. İnsan normal bronşiyal epitel hücrelerinin çözülmesi ve kültürü

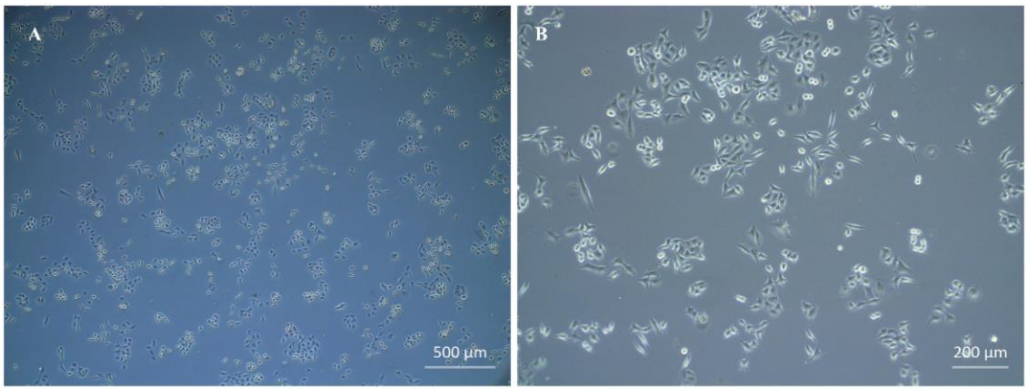
Çözülerek kültür edilen insan normal bronşiyal epitel hücrelerinin (BEAS-2B), kültür sırasında günlük olarak faz kontrast mikroskobu ile (Zeiss) incelemeleri ve fotoğraf çekimleri yapıldı. Hücreler yapılan mikroskobik incelenmelerinde yıldız şekilli veya daha çok epitelyal benzeri morfolojiye sahipti (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Kültüre alındıktan sonra BEAS-2B hücrelerinin erken ve ileri pasajlardaki faz-kontrast mikroskop görüntüleri. **A:** 5. Pasaj, 4. gün. **B:** 11. pasaj, 5. gün. Skala barlar: 200 µm ve 500 µm.

4.1.3. İnsan adenokarsinomik alveoler bazal epitel hücresinin (A549) çözdürülmesi ve kültürü

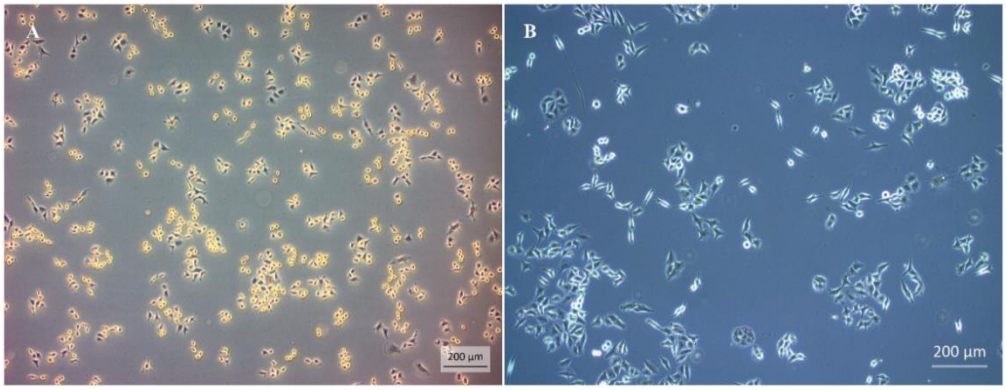
Çözülerek kültür edilen A549 hücre dizisinin, kültür sırasında günlük olarak faz-kontrast mikroskobu ile (Zeiss) incelemeleri ve fotoğraf çekimleri yapıldı. Hücreler yapılan mikroskobik incelenmelerinde yıldız şekilli veya daha çok epitelyal benzeri morfolojiye sahipti (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. Kültüre alındıktan sonra insan adenokarsinomik alveoler bazal epitel hücresinin (A549) erken ve ileri pasajlardaki faz-kontrast mikroskop görüntüleri. **A:** 8. Pasaj, 4. gün. **B:** 37. pasaj, 3. gün. Skala barlar: 500 µm ve 200 µm.

4.1.4. $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ akciğer kanser kök hücrelerin çözdürülmesi ve kültürü

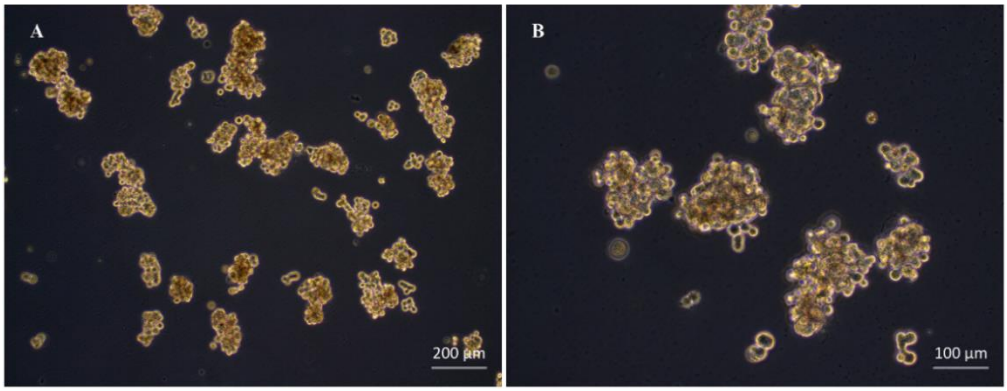
Çözülerek kültür edilen $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ akciğer kanser kök hücrelerin, kültür sırasında günlük olarak faz kontrast mikroskobu ile incelemeleri ve fotoğraf çekimleri yapıldı. Mikroskobik incelemelerde hücrelerin yıldız şekilli veya daha çok epitelyal benzeri morfolojiye sahip olduğu görüldü (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. Kültüre alındıktan sonra $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ akciğer kanser kök hücrelerin erken ve ileri pasajlardaki faz-kontrast mikroskop görüntüleri. **A:** 5. pasaj, 4. gün. **B:** 11. pasaj, 3. gün. Skala barlar: 200 µm.

4.1.5. $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ akciğer kanser kök hücrelerin tümörsferik üç boyutlu kültürde çoğaltılması

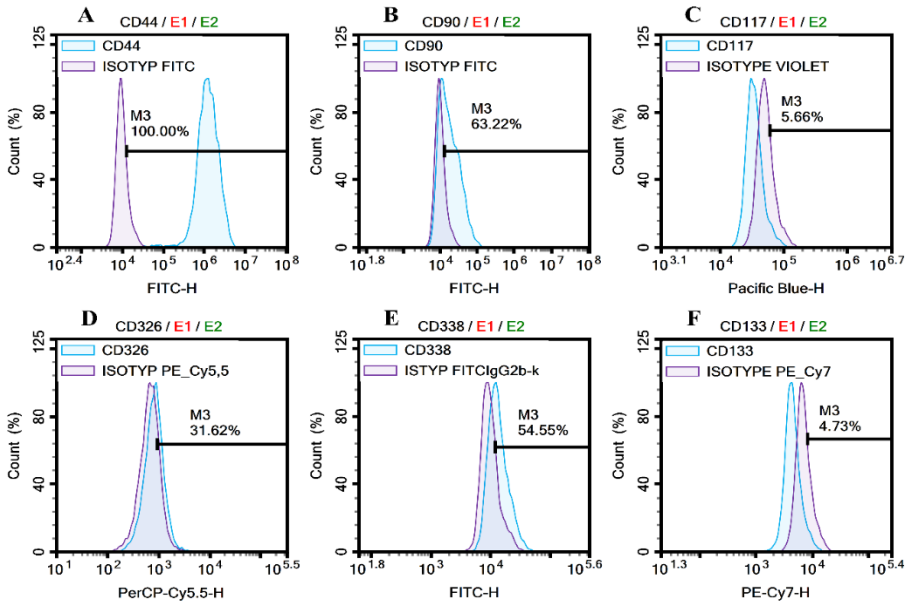
Kanser kök hücreler, kanser kök hücre karakterlerini tek tabakalı (monolayer) kültürde koruyamazken tümörsferoid tipte 3B kültür modelinde kanser kök hücre karakterini koruyabilmektedir. Bu nedenle izole edilen $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ akciğer kanser kök hücrelerin izolasyonun başarılı olmasını sağlayan pozitiflik belirlendikten sonra ileri deneylerde kullanmak üzere tümörsferik tipte 3B kültür ortamında çoğaltıldı. Hücreler ilk aşamada Poly-D-HEMA polimeri ile kaplı 6 gözlü plakaların her kuyucuğuna $50x10^{3}$ hücre olacak şekilde ekildi. 5. gün itibari ile faz kontrast mikroskobunda, sfer oluşturdukları ve yaklaşık 7.gün pasajlanacak duruma geldikleri görüldü (Şekil 4.5.).



Şekil 4.5. Akciğer kanser kök hücrelerin tümörsferoid tipte 3B kültür ortamında sferoid oluşumlarının faz kontrast mikroskobik görüntüleri. **A:** Akciğer kanser kök hücrelerin 24-48 saatlik görüntüleri. **B:** Akciğer kanser kök hücrelerin 4. gün sferoid görünümleri. Skala barlar: 200 µ ve 100 µm.

4.1.6. $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ akciğer kanser kök hücrelerin flow sitometri ile karakterizasyonu

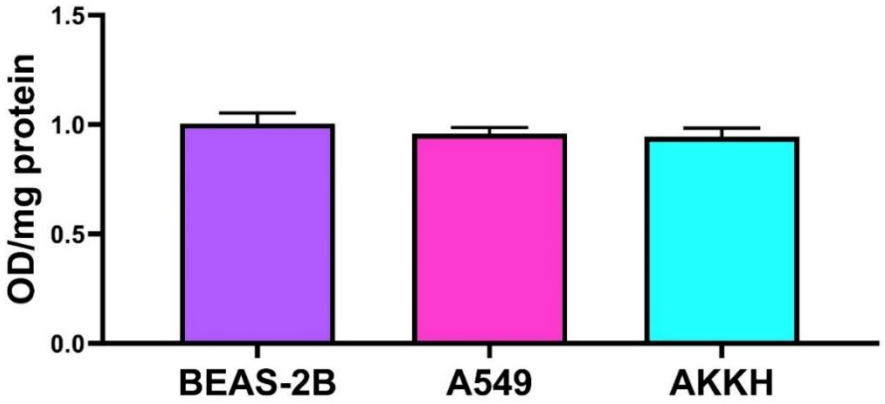
İzole edilen ve tümörsferik tipte 3B olarak kültüre edilen akciğer kanser kök hücrelerinin ileri kanser kök hücre karakterizasyonları için CD44, CD90, CD117, CD326, CD338 ve CD133 pozitifliklerini belirlemek üzere flow sitometri analizleri yapıldı. $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ akciğer kanser kök hücreler için CD44, CD90, CD117, CD326, CD338 (ABCG2) ve CD133 pozitiflikleri sırasıyla, %100, %63.22, %5.66, %31.62, %54.55 ve %4.73 olarak belirlendi (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ akciğer kanser kök hücrelerin flow sitometri ile immunofenotipik karakterizasyonu. $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ akciğer kanser kök hücreler için CD44, CD90, CD117, CD326, CD338 (ABCG2) ve CD133 pozitiflikleri sırasıyla, %100, %63.22, %5.66, %31.62, %54.55 ve %4.73 olarak belirlendi.

4.1.7. $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ akciğer kanser kök hücrelerin ALP analizi

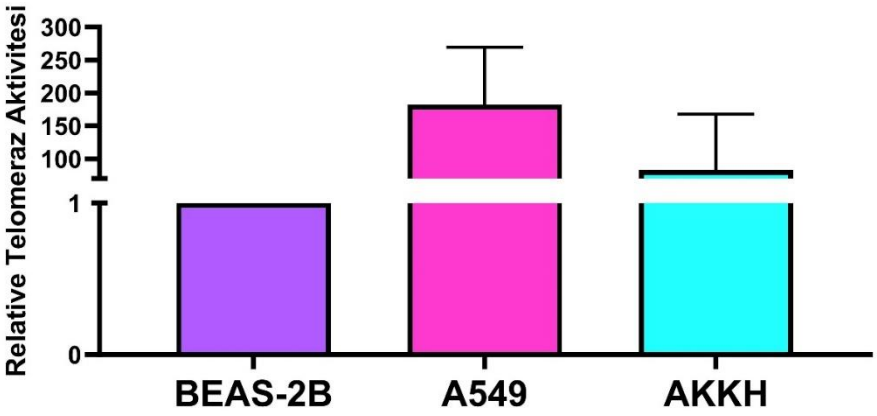
A549 hücre hattından izole edilen akciğer kanser kök hücrelerinin ALP enzim aktivitesi açısından hem ebeveyni (A549) hem de sağlıklı BEAS-2B hücreleri ile karşılaştırıldığında enzim aktivitelerinin benzer olduğu görüldü (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. A549 hücre hattından izole edilen akciğer kanser kök hücrelerinin (AKKH) ALP enzim aktivitesi açısından hem ebeveyni (A549) hem de sağlıklı BEAS-2B hücreleri ile karşılaştırılması.

4.1.8. $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ akciğer kanser kök hücrelerin telomeraz aktivitesi analizi

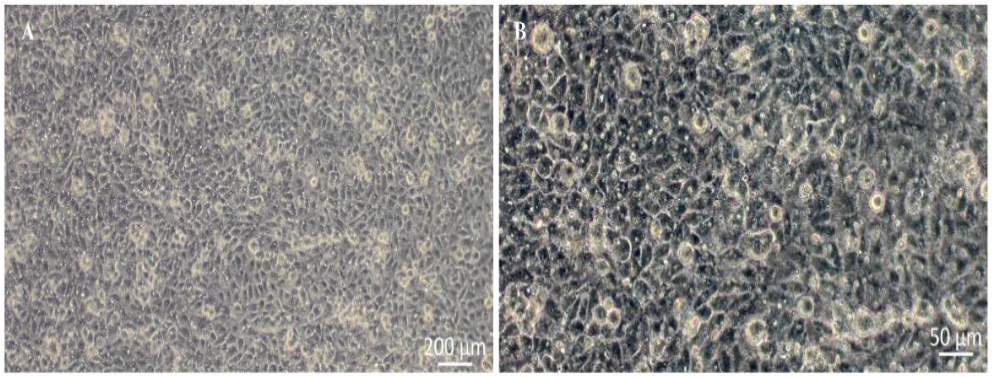
A549 hücre hattından izole edilen akciğer kanser kök hücreleri, telomeraz enzim aktivitesi açısından, hem ebeveyni (A549) hem de sağlıklı BEAS-2B hücreleri ile karşılaştırıldığında, enzim aktivitelerinin benzer olduğu görüldü. İstatistiksel anlamlı olmasa da kanser ve kanser kök hücrelerin sağlıklı hücrelerden daha fazla enzim aktivitesi olduğu belirlendi (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. A549 hücre hattından izole edilen akciğer kanser kök hücrelerinin (AKKH) telomeraz enzim aktivitesi açısından hem ebeveyni (A549) hem de sağlıklı BEAS-2B hücreleri ile karşılaştırılması.

4.2. İnsan Endotelyal Hücrelerinin Membran Kaplaması

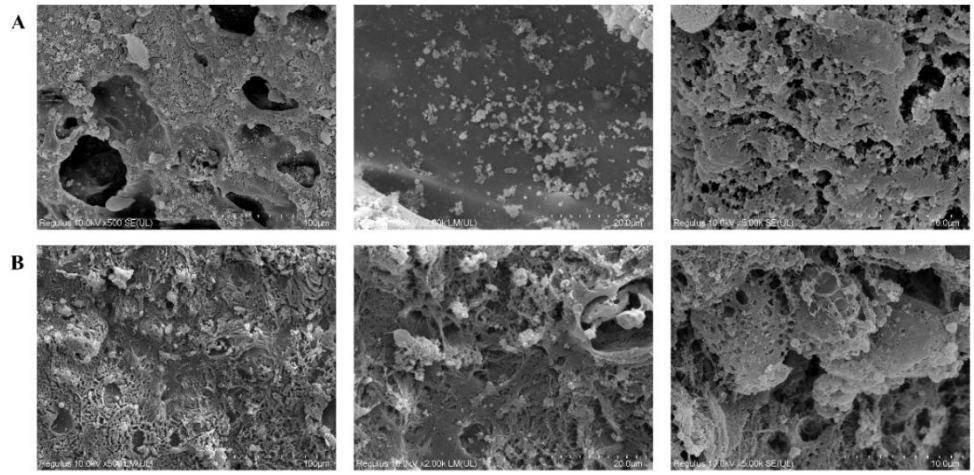
İnsan endotelyal hücrelerin (EA.hy926) transwell membranla kaplandıktan 24 saat sonra faz kontrast invert mikroskobunda sağlıklı ve endotel hücrelerine özgü epitelyal (kaldırım taşı, poligonal) şekilli %100 konfluent görünümde oldukları belirlendi (Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. İnsan endotelyal hücreleri (EA.hy926) hücrelerinin transwell membranla kaplandıktan sonra besiyerinde 24 saatlik kültür sonrası görüntüleri. Sağlıklı ve endotel hücrelerine özgü epitelyal (kaldırım taşı, poligonal) şekilli %100 konfluent hücreler izlendi. Skala barlar: **A:** 200 µm ve **B:** 50 µm.

4.3. Biyomürekkep 1 Karakterizasyonu

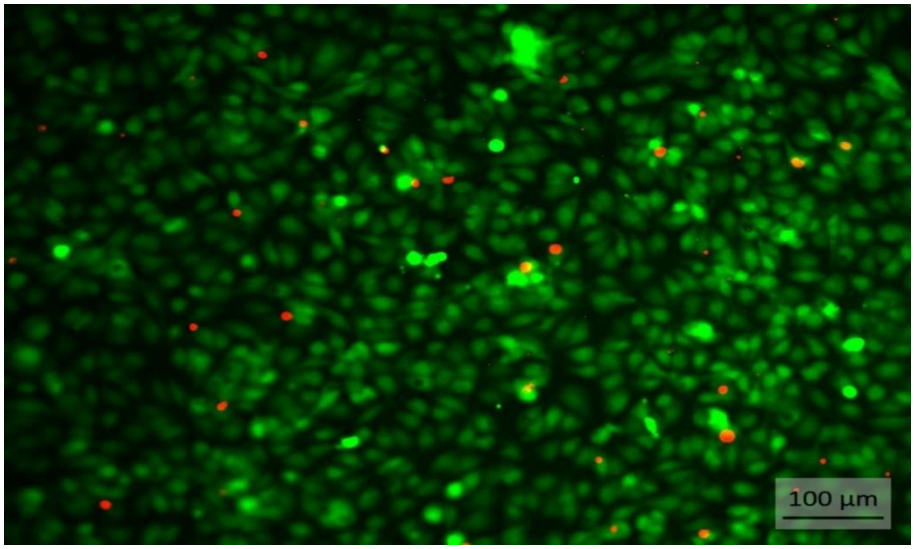
Hücre kültürü ortamında besiyerinde (su bazlı yada suya batırılmış) kültür edilen BEAS-2B hücreleri ile yüklü biyomürekkep 1 (1. grup) basım öncesi ve sonrası kürlenmiş örnekler SEM ile analiz edildiğinde, pürüzsüz yüzeyli düz şekiller sergilerken görüldü. Basım öncesi örnekler ile sonrası örnekler por çapları açısından karşılaştırıldığında 100 µm skala barlarda yapılan ölçümlerde basım öncesi ortalama por çapı 203 µm iken basım sonrası 97 µm olarak hesaplandı. Basım öncesi örnekler ile sonrası örnekler por çapları açısından karşılaştırıldığında basım sonrası por çaplarının daha küçük çapta olduğu ve yaklaşık %50 oranında çapta azalma olduğu gözlendi (Şekil 4.10.).



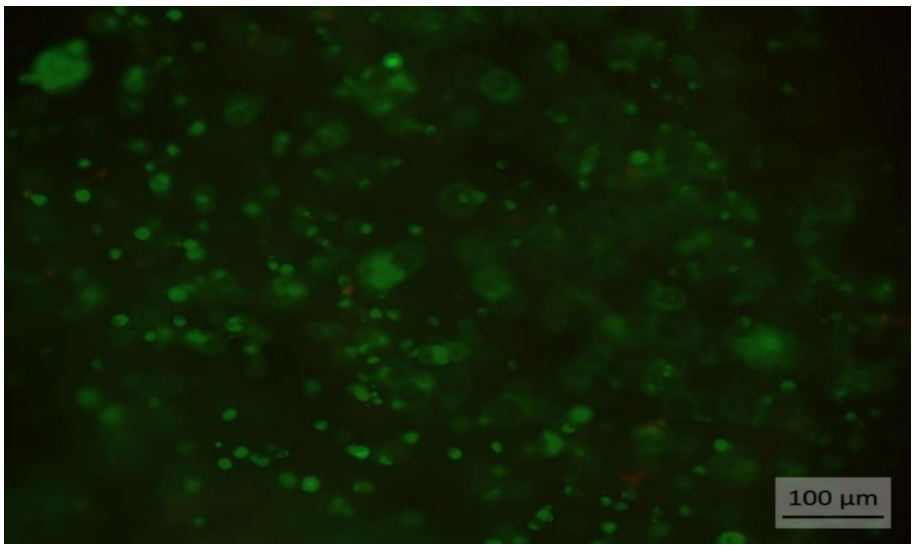
Şekil 4.10. BEAS-2B yüklü iskelelerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) görüntüsü. **A:** Biyobasım öncesi %10 GelMA ve BEAS-2B hücreleri yüklü iskelenin SEM görüntüsü. **B:** Biyobasım sonrası %10 GelMA ve BEAS-2B hücreleri yüklü iskelenin SEM görüntüsü. Skala Barlar: 100 µm, 20 µm ve 10 µm.

4.4. Canlı/Ölü İşaretleme ile Hücre Metabolik Aktivite Testi

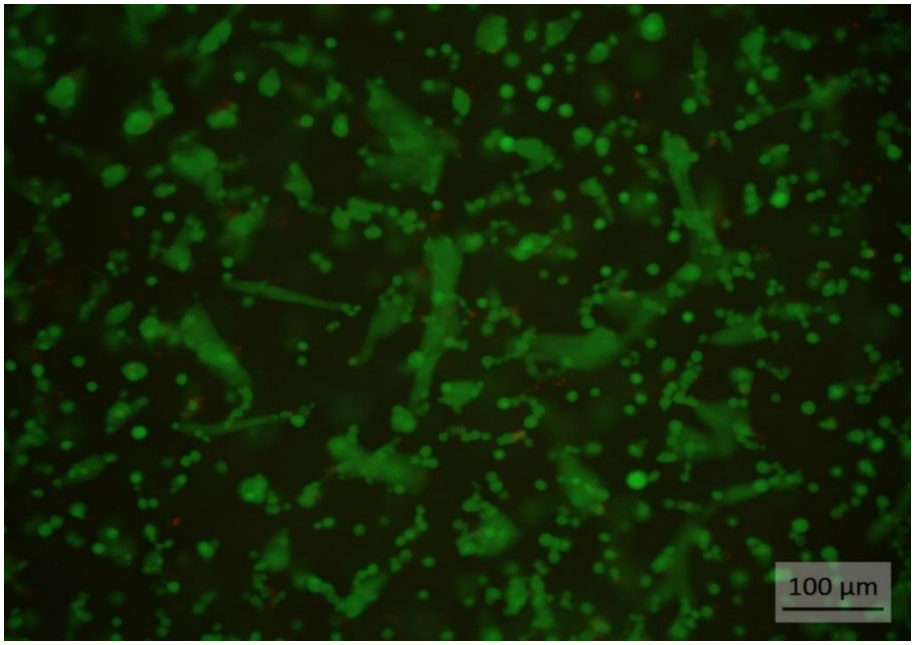
7 gün boyunca transwell membran kullanılarak hava-sıvı arayüzeyinde kültür edilen insan endotelyal hücreleri (EA. hy926) kaplı membran (Şekil 4.11.), $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ akciğer kanser kök hücreleri yüklü damlacık şeklindeki iskeleler (Şekil 4.12) ve insan normal bronşiyal epitel hücrelerinin (BEAS-2B) yüklü olduğu iskelenin (Şekil 4.13.) ayrı ayrı canlı/ölü durumları hızlı bir şekilde zıt faz mikroskopta floresan görüntüleme ile gözlendi. Analiz edilen görüntülerde canlı hücreler yeşil renkte ve ölü hücreler kırmızı renkte gösterilmiştir. Her bir hücre yüklü iskele grubu için en az on değişik alan seçildi. Bu alanların ImageJ programında canlı/ölü sayımı yapıldı. Sayım sonucunda hücreler Şekil 4.14., Şekil 4.15 ve Şekil 4.16.'da görüldüğü üzere, biyobasım sonrası hava-sıvı arayüzeyi kültür sisteminde %90'ın üstünde hücre canlılığı ile 7 gün boyunca başarılı bir şekilde muhafaza edilebildiği gösterilmiş oldu.



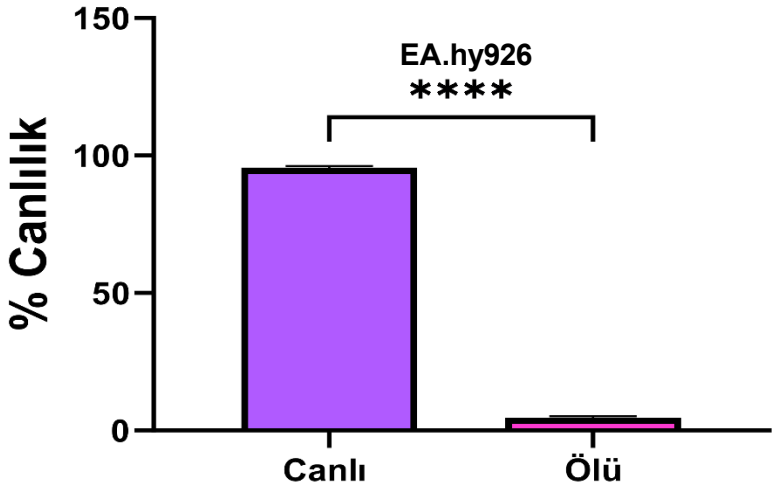
Şekil 4.11. Üç boyutlu biyobaskılanmış ve 7 gün boyunca hava-sıvı arayüzeyinde (ALI) kokültür edilmiş akciğer tümör modelindeki EA.hy926 hücreleri kaplı transwell membranın canlı/ölü boyama testi. Canlı (Yeşil)/Ölü (Kırmızı) birlikte (merge) görüntülenmiştir. Skala bar: 100 µm



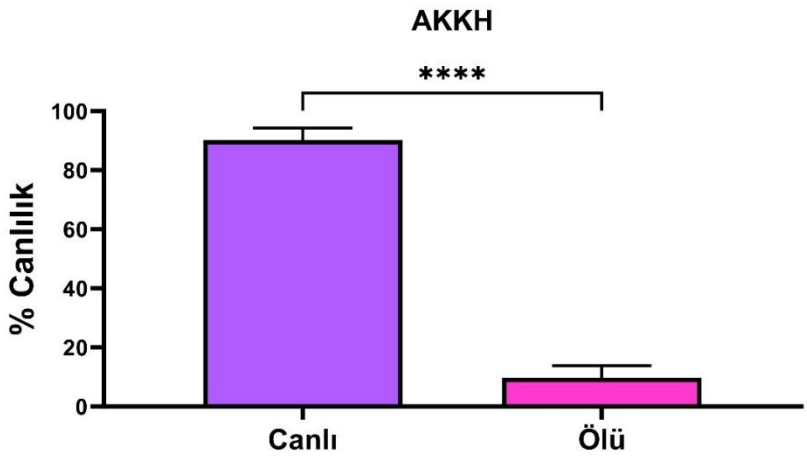
Şekil 4.12. Üç boyutlu biyobaskılanmış ve 7 gün boyunca hava-sıvı arayüzeyinde kokültür edilmiş akciğer tümör modelindeki $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ akciğer kanser kök hücre yüklü damlacık şeklindeki iskelenin canlı/ölü boyama testi. Canlı (Yeşil)/Ölü (Kırmızı) birlikte (merge) görüntülenmiştir. Skala bar: 100 µm.



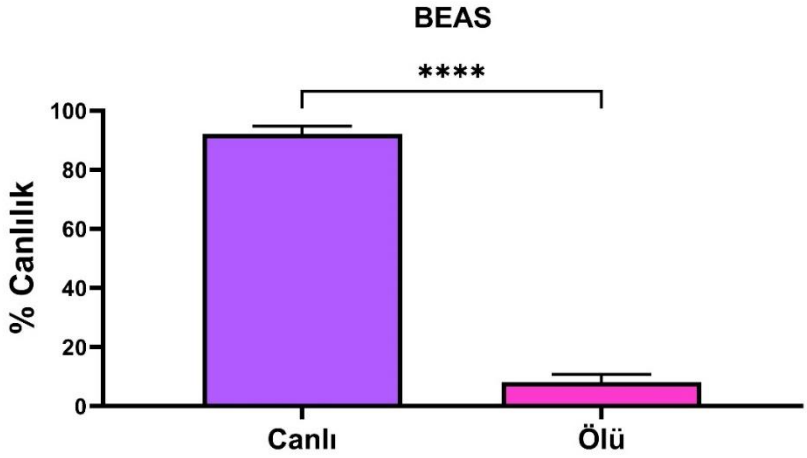
Şekil 4.13. Üç boyutlu biyobaskılanmış ve 7 gün boyunca hava-sıvı arayüzeyinde kokültür edilmiş akciğer tümör modelindeki BEAS-2B hücresi yüklü iskelenin canlı/ölü boyama testi. Canlı (yeşil)/Ölü (Kırmızı) birlikte (merge) görüntülenmiştir. Skala bar: 100 µm.



Şekil 4.14. Üç boyutlu biyobaskılanmış ve 7 gün boyunca hava-sıvı arayüzeyinde kokültür edilmiş akciğer tümör modelinde transwell membrana kaplanmış olan EA.hy926 hücrelerinin canlı/ölü boyama karşılaştırması.



Şekil 4.15. Üç boyutlu biyobaskılanmış ve 7 gün boyunca hava-sıvı arayüzeyinde kokültür edilmiş akciğer tümör modelindeki $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ akciğer kanser kök hücre yüklü damlacık şeklindeki iskelenin canlı/ölü boyama karşılaştırması.

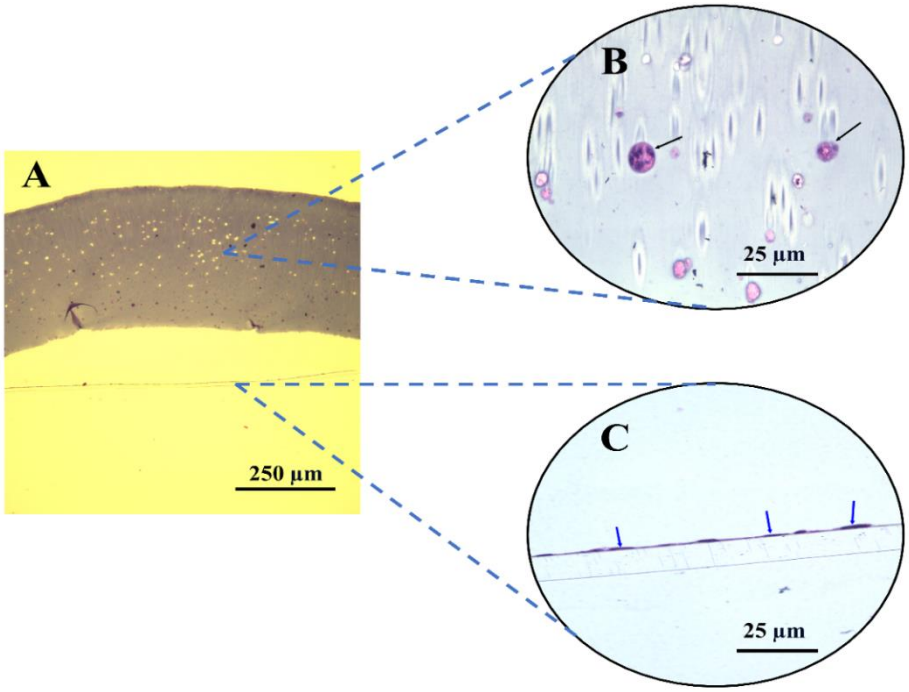


Şekil 4.16. Üç boyutlu biyobaskılanmış ve 7 gün boyunca hava-sıvı arayüzeyinde kokültür edilmiş akciğer tümör modelindeki BEAS-2B hücresi yüklü iskelenin canlı/ölü boyama karşılaştırması.

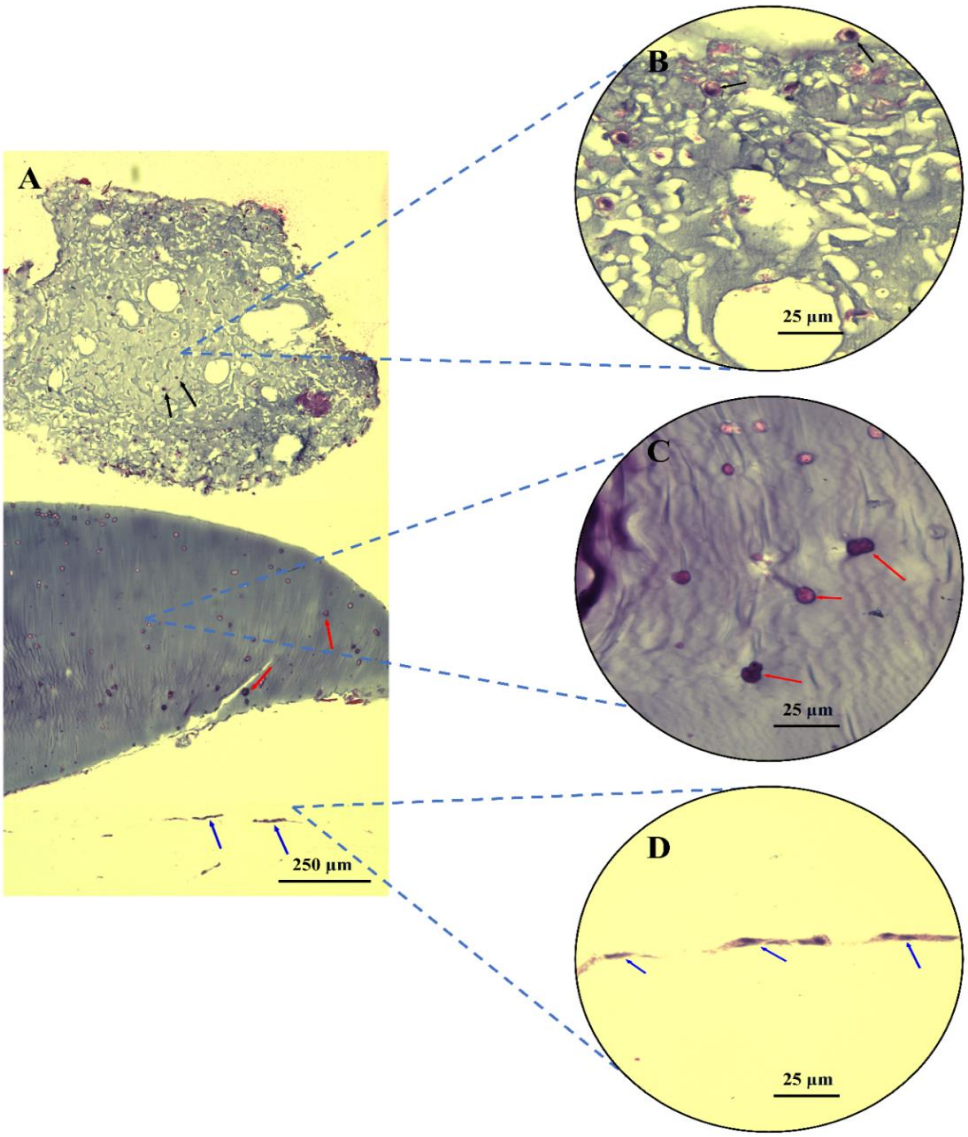
4.5. Histokimyasal Analiz

Üç boyutlu biyobaskılanmış ve 7 gün boyunca hava-sıvı ara yüzeyinde kokültür edilmiş sağlıklı akciğer modeli ve akciğer tümör modeli parafin bloklanarak hematoksilen-eozin ile boyandı. Işık mikroskobu ile incelenen kesitlerde hücrelerin eozinofilik sitoplazmaları ve bazofilik nükleusları belirgindi. Biyobasım sonrası

BEAS ve AKKH yüklü biyoiskelelerde, hücrelerin homojen dağılım gösterdiği, ancak birbirinden uzak yerleşimde olduğu gözlenmiştir. EA.hy926 hücrelerinin mevcut büyüme yüzeyinde tek katlı yassı epitel formunda yerleştiği ve hücrelerin birbiriyle kontakt halinde olduğu görüldü (Şekil 4.17 ve Şekil 4.18).



Şekil 4.17. Grup 1 H&E boyama görüntüleri. **A:** Üç boyutlu biyobaskılanmış ve 7 gün boyunca hava-sıvı ara yüzeyinde kokültür edilmiş sağlıklı akciğer modelinin (kontrol grubu) genel görüntüsü (Parafine gömme işlemi sırasında iskeleler birbirinden uzaklaştığı için fotoğrafta birleştirme yapılmıştır). (H&E). Skala bar: 250 µm. **B:** Beas yüklü (siyah ok) biyobaskılanmış iskelenin görüntüsü. H&E. Skala bar: 25 µm. **C:** Transwell membrana kaplama yapılmış olan EA hücrelerinin (mavi ok) görüntüsü. Skala bar: 25 µm.

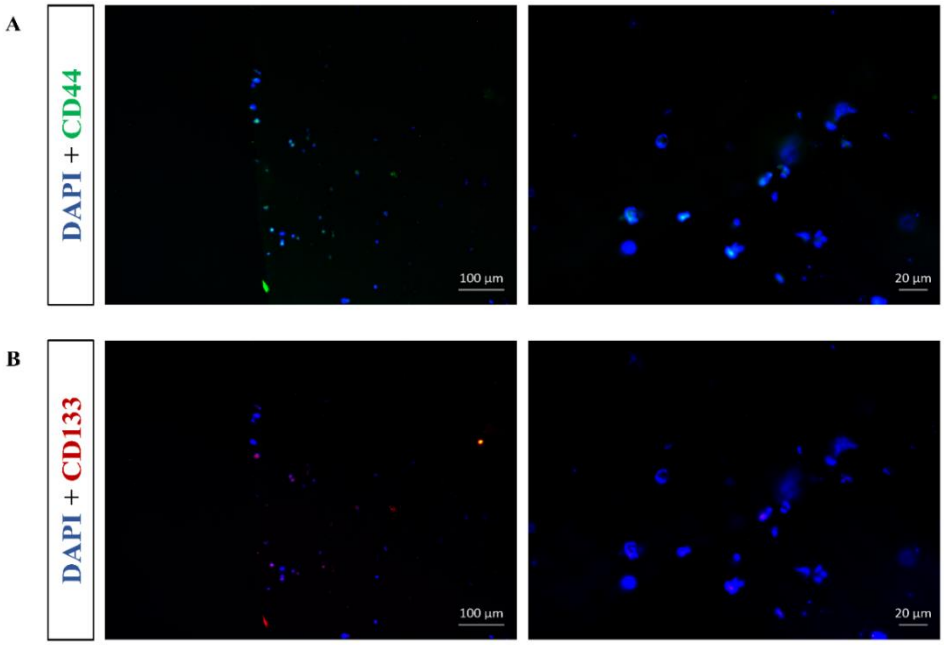


Şekil 4.18. Grup 2 H&E boyama görüntüleri. **A:** Üç boyutlu biyobaskılanmış ve 7 gün boyunca hava-sıvı ara yüzeyinde kokültür edilmiş akciğer tümör modelinin genel görüntüsü (Parafine gömme işlemi sırasında iskeleler birbirinden uzaklaştığı için fotoğrafta birleştirme yapılmıştır). H&E. Skala bar: 250 µm. **B:** Akciğer KKH yüklü (siyah ok) damlacık şeklindeki biyobaskılanmış iskelenin görüntüsü. H&E. Skala bar: 25 µm. **C:** Beas yüklü (kırmızı ok) biyobaskılanmış iskelenin görüntüsü. H&E. Skala bar: 25 µm. **D:** Transwell membrana kaplama yapılmış olan EA hücrelerinin (mavi ok) görüntüsü. Skala bar: 25 µm.

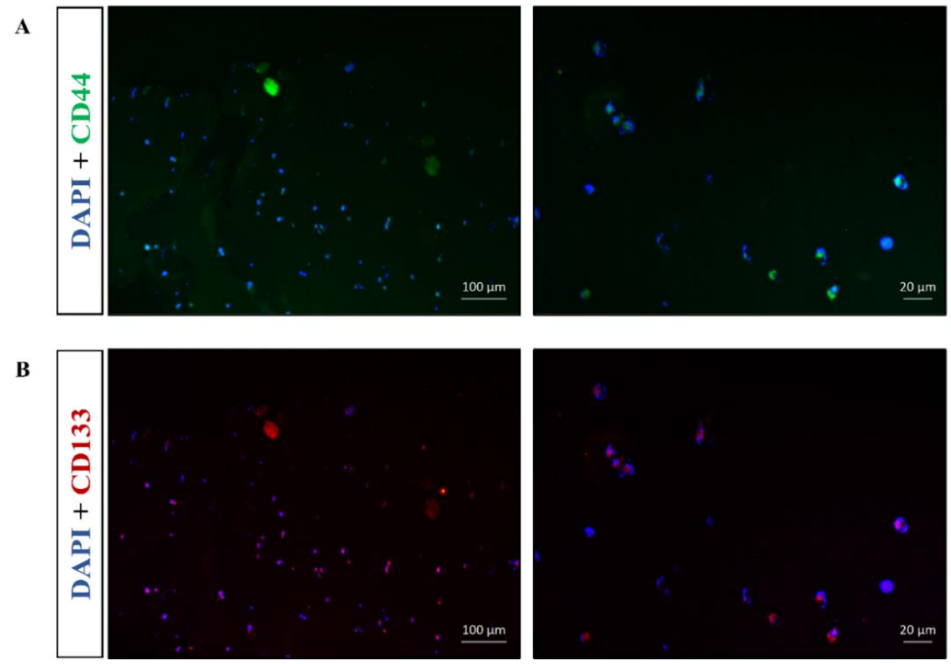
4.6. İmmunofloresan İşaretleme

3B *in-vitro* model ile köklülük genlerindeki değişim immunositokimyasal (İF, İmmunofloresan) yöntem ile karakterize edildi.

CD44 ve CD133 antikorları ile boyanan sağlıklı AC hücreleri (BEAS, grup 1) immunofloresan olarak düşük pozitiflik (Şekil 4.19.), AKKH'leri (grup 2) ise pozitif boyanma gösterdi (Şekil 4.20.). A549'tan izole ettiğimiz hücrelerin AKKH olduğunu, kanser kök hücrelere özgü belirteçler ile doğrulandı.

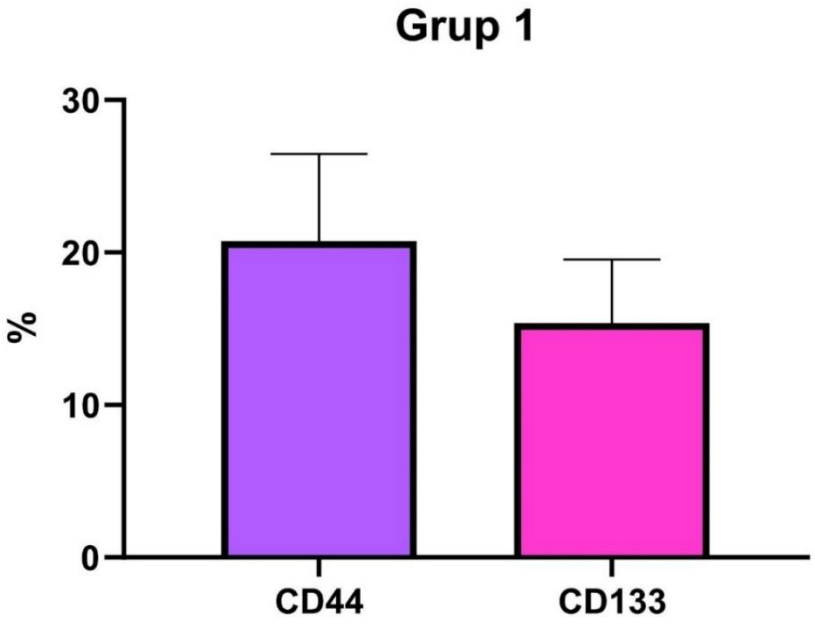


Şekil 4.19. Üç boyutlu biyobaskılanmış ve 7 gün boyunca hava-sıvı arayüzeyinde kokültür edilmiş BEAS iskelesinin immunofloresan işaretleme yöntemi ile CD44 ve CD133 karakterizasyon analizi. **A:** Hücrelerde CD44 aktivasyonu (yeşil), **B:** CD133 aktivasyonu (kırmızı) ve nükleuslar DAPI (mavi) ile işaretlenerek gösterilmiştir. Skala barlar: A ve B:100 µm ve 20 µm.

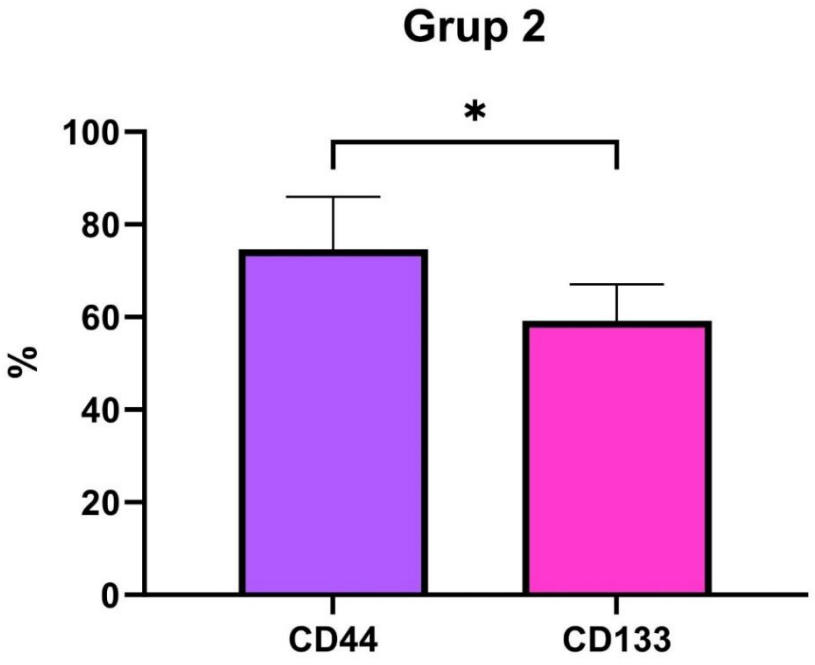


Şekil 4.20. Üç boyutlu biyobaskılanmış ve 7 gün boyunca hava-sıvı arayüzeyinde kokültür edilmiş akciğer tümör modelinin (AKKH'lerin) immunofloresan işaretleme yöntemi ile CD44 ve CD133 karakterizasyon analizi. **A:** Hücrelerde CD44 aktivasyonu (yeşil), **B:** CD133 aktivasyonu (kırmızı) ve nükleuslar DAPI (mavi) ile işaretlenerek gösterilmiştir. Skala barlar: A ve B:100 µm ve 20 µm.

Sonuçlara göre grup 1'deki CD44 ve CD133 pozitifliği sırasıyla %20 ve %15 (Şekil 4.21.), grup 2'deki CD44 ve CD133 pozitifliği ise sırasıyla %74 ve %59 (Şekil 4.22.) olarak tespit edildi.



Şekil 4.21. Grup 1'in immunofloresan boyamada CD44 ve CD133 belirteçlerinin pozitiflik oranı karşılaştırması.



Şekil 4.22. Grup 2'nin immunofloresan boyamada CD44 ve CD133 belirteçlerinin pozitiflik oranı karşılaştırması.

5. TARTIŞMA

Üç boyutlu (3B) biyobaskı, biyomedikal araştırma alanında, son yıllarda hızla gelişmiştir ve doku mühendisliğinde en popüler teknolojilerden biri haline gelmiştir (Veeravalli vd., 2023). Bilgisayar kontrolü ile 3B biyoyazıcı, *in-vitro* doku benzeri veya organ benzeri yapılar oluşturmak için hücre ve biyolojik materyal karışımını katman katman istifleyebilir. Canlı hücreler, büyüme faktörleri ve matris malzemelerinden oluşan karmaşık şekillere sahip bu 3B yapılar, yapışma, büyüme, göç, farklılaşma ve iletişim gibi çoğu hücre aktivitesi için uygun mikro ortam sağlar (Ashammakhi vd., 2019; Nikolova & Chavali, 2019). İki boyutlu (2B) kültür ortamına kıyasla yapı ve hücre ortamındaki iyileşme ile 3B biyobaskı, *in-vitro* hücre büyümesini ve farklılaşmasını kontrol etmeye ve nihayetinde ilaç taraması, gen ifadesinin işlev analizi ve hatta insan organ ve doku nakli gibi çoğu tıbbi araştırmada kullanılabilecek normal, fizyolojik aktivitelere ve işlevlere sahip doku veya organlar oluşturmaya yardımcı olabilir (Knowlton vd., 2015; Ozbolat vd., 2016).

Akciğer kanserlerini incelemek, özellikle de invazyon ve metastaz özelliklerini yeniden canlandırmak için uygun bir *in-vitro* model eksikliği halen bulunmaktadır (Monleón-Guinot vd., 2023). Akciğer kanseri araştırmaları için uygun bir *in-vitro* model geliştirmek amacıyla, bu çalışmada biyolojik üretimin düşük sıcaklıkta kalıplama prensibi ve 3B biyobaskı, biyomürekkep olarak Gelma, aljinat, metilselüloz akciğer kanseri hücresi (A549) insan normal bronşiyal epitelyal hücre hattı (BEAS-2B), insan endotelyal hücre hattı (EA. hy926) ve CD133+CD326+ akciğer kanser kök hücreleri süspansiyonu kullanılarak hücre yüklü bir hidrojel ızgara iskele yapısı üretmek için kullanılmıştır. Hücreler bu modelde yüksek canlılıkla eşit olarak dağılmış ve sürdürülebilir bir şekilde kültüre edilebilmiştir. Bu model 7 güne kadar kültüre alınabilir ve yapısal bütünlüğünü koruyabilir. Histolojik analizler 3B baskılı hücrelerin 2B ortamda kültüre edilenlere kıyasla gelişmiş istila ve göç kabiliyetine sahip olduğunu göstermiştir; bu da bu çalışmada geliştirilen *in-vitro* modelin 2B modellere kıyasla daha biyomimetik olduğunu ve biyomedikal araştırmalarda oldukça değerli olduğunu göstermektedir. Yazıcının konumsal tekrarlanabilirliğini ve doğruluğunu test etmek için yapılan ilk deneyler, bu teknolojinin kontrollü bir uzamsal düzenlemede son derece hassas ve tekrarlanabilir desenleme sağladığını göstermiştir.

Fizibilite çalışması olarak ön biyobaskı çalışmasında öncelikle kafes şekli (grid) benzeri bir iskele basıldı. Mürekkep, yüksek baskı kalitesi, iyi basılabilirlik ve

yapıların boyutsal stabilitesini gösterdi. Oluşturulan model net ve düzenli bir yapıya sahipti. Basit kafes benzeri hücresiz iskelenin başarılı bir şekilde biyobasılmasının ardından iskele, baskı sonrasında herhangi bir büzülme olmaksızın sabit kaldı ve iyi bir doku sergiledi. 3 boyutlu doku yapılarının katman katman üretimi için ekstrüzyon tabanlı bir biyobaskı işlemi, biyoyazıcının tekrarlanabilirliğini ve doğruluğunu test etmek için yapılan ilk deneyler, kontrollü bir şekilde hassas ve tekrarlanabilir desen oluşturmayı mümkün kıldığını gösterdi. Sonuçlarımız diğer araştırmacılarla benzerdi (Sun vd., 2020).

Akciğer dokuları için, akciğer katı tümörlerinin sertlik derecesinin (20-30 kPa), normal akciğer parankimine (0.5-5 kPa) göre sertlik derecesinin fazla olduğu öne sürülmüştür (Ishihara & Haga, 2022). Bu nedenle bu tez çalışmasında akciğer dokusunu daha doğru mimik edebilmek amacıyla Biyomürekkep 1 (%10 GelMA), AKKH'lerin sertlik derecesini normal akciğer dokusuna göre daha iyi mimik edebilmek için ise Biyomürekkep 2 (%5 GelMA, %0.5 Aljinat, %0.5 Metilselüloz) kullanıldı. 1. grup için BEAS-2B yüklü hidrejelde (Biyomürekkep 1) biyobasım öncesi SEM görüntülerinde hücrelerin biyobasım sonrasına nazaran daha düzensiz yerleşim gösterdiği izlenmiştir. Böylece biyoyazıcı tarafından basımda hücre dağılım organizasyonu daha kontrollü yapılmış oldu. Ayrıca biyobasım sonrasında por çapının biyobasım öncesine göre yarı yarıya azaldığı tespit edilmiştir. Bu da bize literatür bilgisiyle uyumlu şekilde, basım sırasında nozulun kayma gerilmesi yarattığını, biyobaskı sırasında baskı çözünürlüğünün arttığını ve basım sürecinde baloncuk oluşumun mümkün olduğunca az olduğunu göstermektedir (Ramadan & Zourob, 2021).

Kanser kök hücreler, kanser kök hücre karakterlerini tek tabakalı (monolayer) kültürde koruyamazken tümörsferoid tipte 3B kültür modelinde kanser kök hücre karakterini koruyabilmektedir (Zhang vd., 2020). Bu nedenle izole edilen $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ akciğer kanser kök hücrelerin izolasyonun başarılı olmasını sağlayan pozitiflik belirlendikten sonra ileri deneylerde kullanmak üzere tümörsferoid tipte 3B kültür ortamında çoğaltıldı. İzole edilen ve tümörsferoid tipte 3B olarak kültüre edilen akciğer kanser kök hücrelerinin ileri kanser kök hücre karakterizasyonları için CD44, CD90, CD117, CD326, CD338 ve CD133 pozitifliklerini belirlemek üzere flow sitometri analizleri yapıldı.

$CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ akciğer kanser kök hücrelerin köklülüğünün analizini doğrular şekilde yüzey belirteçleri açısından pozitiflik gösterdi.

Akciğer kanseri araştırmaları için uygun bir *in-vitro* model geliştirmeyi amaçladığımız çalışmamızda hücre biyolojisini değerlendirmek için birtakım çalışmalar yapıldı. İnsan endotelyal hücreleri (EA.hy926), $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ akciğer kanser kök hücreleri ve insan normal bronşiyal epitel hücrelerinin (BEAS-2B) canlı/ölü durumları hızlı bir şekilde zıt faz mikroskopta floresan görüntüleme ile gözlendi. Canlı/ölü hücre analizi sonucu elde ettiğimiz bulgular diğer çalışmalara benzerdi (Hassan vd., 2021). Canlı/ölü hücre analizi sonuçlarımızda hem endotel hem de epitel (BEAS-2B, AKKH) hücrelerinde yüksek oranda hücre canlılığı tespit edildi. Kanser kök hücrelerin köklülüğünü gösteren karakterizasyon analizi olarak uyguladığımız ALP analizi ve A549 akciğer kanser hücre hattında izole edilen $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ akciğer kanser kök hücrelerin telomeraz aktivitesini belirlemek için yaptığımız analizler yaptık. A549 hücre hattından izole edilen akciğer kanser kök hücrelerinin ALP enzim aktivitesi açısından hem ebeveyni (A549) hem de sağlıklı BEAS-2B hücreleri ile karşılaştırıldığında enzim aktivitelerinin benzer olduğu görüldü. A549 hücre hattından izole edilen akciğer kanser kök hücreleri, telomeraz enzim aktivitesi açısından, hem ebeveyni (A549) hem de sağlıklı BEAS-2B hücreleri ile karşılaştırıldığında, enzim aktivitelerinin benzer olduğu görüldü. İstatistiksel anlamlı olmasa da kanser ve kanser kök hücrelerin sağlıklı hücrelerden daha fazla enzim aktivitesi olduğu belirlendi. Hücre biyobaskısını kullanarak elde ettiğimiz bu umut verici sonuçlar, *in-vitro* ilaç geliştirme ve toksisite testlerinin önünü açabilir.

Optik mikroskopi ve H&E boyama sonucuna göre, hücrelerin baskı sonrasında model içerisinde homojen bir şekilde dağıldığını ve model içerisinde kümelenme eğiliminde olduklarını göstermiştir. Endotel hücrelerinin gözlemlenen yüksek geçirgenlikleri biyolojik işlevleriyle açıklanabilir. Yani in vivo hücreler arasındaki nispeten sızdıran tıkayıcı bağlantılar kan plazması ve interstisyel boşluk arasında neredeyse sınırsız su, çözünmüş madde ve daha küçük makromolekül alışverişine izin verir (Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders, 2008). Kokültürlerin sızdırmazlığı, manuel olarak oluşturulan kokültürlerde mevcut olan kalın ECM katmanlarının bariyer işlevi dikkate alındığında benzerdir. Ayrıca, hem mono hem de kokültürlerde, kullanılan yaklaşımdan (manuel veya baskı) bağımsız olarak esasen benzer olan yüksek hücre canlılığı (epitel hücreleri ve kokültürler için %95 ve endotel

hücreleri için %86) ve incelenen hücre tiplerinin çoğalmasını tespit ettik. Basılı epitelyal ve endotelyal mono-kültürler, manuel olarak ekilen hücrelerin kümeler halinde organize olması ve bunun da düzensiz hücre katmanları ile sonuçlanması, basılı hücrelerin ise daha düzgün uzanmış morfolojiye sahip olması nedeniyle karşılık gelen manuel kültürlerden daha sıkı katmanlar sergilemiştir. Endotel hücrelerinin gözlenen daha yüksek geçirgenliği biyolojik işlevleriyle de açıklanabilir, yani in vivo hücreler arasındaki nispeten sızdıran tıkayıcı bağlantılar, kan plazması ile endotel hücreleri arasındaki interstisyel boşlukta neredeyse sınırsız su, çözünen madde ve daha küçük makromolekül alışverişine izin verir. Benzer gözlem, yani yüksek geçirgenlik EA.hy926 hücreleri Klein ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir. İki yaklaşım kullanılarak üretilen kokültürler benzerdi ve kalın ECM katmanlarının bariyer işlevini dikkate alarak manuel olarak kurulan ortak kültürlerde mevcut bulunmaktaydı.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Akciğer kanseri araştırmaları için uygun bir *in-vitro* model geliştirmek amacıyla, bu çalışmada 3B biyobaskı, biyomürekkep olarak GelMA, aljinat, metilselüloz akciğer kanseri hücresi (A549) insan normal bronşiyal epitelyal hücre hattı (BEAS-2B), insan endotelyal hücre hattı (EA.hy926) ve $CD326^{+}CD133^{+}CD44^{+}$ akciğer kanser kök hücreleri süspansiyonu kullanılarak hücre yüklü bir hidrojel ızgara iskele yapısı üretmek için kullanıldı.

Yazıcının konumsal tekrarlanabilirliğini ve doğruluğunu test etmek için yapılan ilk deneyler, bu teknolojinin kontrollü bir uzamsal düzenlemede son derece hassas ve tekrarlanabilir desenleme sağladığını gösterdi (Sun vd., 2020). 1. grup için BEAS-2B yüklü hidrejelde (Biyomürekkep 1) biyobasım öncesi SEM görüntülerinde hücrelerin biyobasım sonrasına nazaran daha düzensiz yerleşim gösterdiği izlenmiştir. Böylece biyoyazıcı tarafından basımda hücre dağılım organizasyonu daha kontrollü yapılmış oldu. Ayrıca biyobasım sonrasında por çapının biyobasım öncesine göre yarı yarıya azaldığı tespit edildi. KKH belirteçleri pozitiflik gösterdi. İstatistiksel anlamlı olmasa da kanser ve kanser kök hücrelerin sağlıklı hücrelerden daha fazla enzim aktivitesi olduğu belirlendi. Hava-sıvı arayüzeyinde 7 gün boyunca kokültür sonrası hücre yüklü iskelelerde yüksek canlılık tespit edildi. Histokimyasal boyama sonucunda incelenen kesitlerde hücrelerin eozinofilik sitoplazmaları ve bazofilik nükleusları belirgindi. Biyobasım sonrası BEAS ve AKKH yüklü biyoiskelelerde, hücrelerin homojen dağılım gösterdiği, ancak birbirinden uzak yerleşimde olduğu gözlendi. EA.hy926 hücrelerinin mevcut büyüme yüzeyinde tek katlı yassı epitel formunda yerleştiği ve hücrelerin birbiriyle konakt halinde olduğu görüldü. Immunofloresan işaretleme sonucunda AKKH'ler CD133 ve CD44 belirteçleri pozitiflik gösterdi.

Bu model 7 güne kadar kültüre alınabilir ve yapısal bütünlüğünü koruyabilir. Histolojik analizler 3B baskılı hücrelerin 2B ortamda kültüre edilenlere kıyasla gelişmiş istila ve göç kabiliyetine sahip olduğunu göstermiştir; bu da bu çalışmada geliştirilen *in-vitro* modelin 2B modellere kıyasla daha biyomimetik olduğunu ve biyomedikal araştırmalarda oldukça değerli olduğunu göstermektedir. Yazıcının konumsal tekrarlanabilirliğini ve doğruluğunu test etmek için yapılan ilk deneyler, bu teknolojinin kontrollü bir uzamsal düzenlemede son derece hassas ve tekrarlanabilir desenleme sağladığını gösterdi.

Oluşturduğumuz organotipik tümör modeli akciğer tümör modelini yansıtsa da akciğer tümör mikroçevresini tam anlamıyla oluşturabilmek için geliştirilen bu biyomürekkepler, biyobaskılama tasarımı ve hava-sıvı arayüzeyi modellerinin; ileride tümör mikroçevresinde bulunan diğer hücrelerin de eklendiği ve uzun süreli kültüre olanak tanıyan biyoreaktörler kullanılarak kurgulanan çalışmalara ihtiyaç duyulduğu düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR DİZİNİ

Ahmed, T. A. E., Dare, E. V., & Hincke, M. (2008). Fibrin: A Versatile Scaffold for Tissue Engineering Applications. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, *14*(2), 199–215. https://doi.org/10.1089/ten.teb.2007.0435

Alcantar, N. A., Aydil, E. S., & Israelachvili, J. N. (2000). Polyethylene glycol-coated biocompatible surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research*, *51*(3), 343–351. Scopus. https://doi.org/10.1002/1097-4636(20000905)51:3<343::AID-JBM7>3.0.CO;2-D

Ambrosini, V., Nicolini, S., Caroli, P., Nanni, C., Massaro, A., Marzola, M. C., Rubello, D., & Fanti, S. (2012). PET/CT imaging in different types of lung cancer: An overview. *European Journal of Radiology*, *81*(5), 988–1001. https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2011.03.020

Asghar, W., El Assal, R., Shafiee, H., Pitteri, S., Paulmurugan, R., & Demirci, U. (2015). Engineering cancer microenvironments for in vitro 3-D tumor models. *Materials Today*, *18*(10), 539–553. https://doi.org/10.1016/j.mattod.2015.05.002

Ashammakhi, N., Ahadian, S., Xu, C., Montazerian, H., Ko, H., Nasiri, R., Barros, N., & Khademhosseini, A. (2019). Bioinks and bioprinting technologies to make heterogeneous and biomimetic tissue constructs. *Materials Today Bio*, *1*, 100008. https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2019.100008

Atala, A., Lanza, R., Thomson, J. A., & Nerem, R. M. (Eds.). (2008). Front Matter. In *Principles of Regenerative Medicine* (p. iii). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-369410-2.50086-3

Avnet, S., Lemma, S., Cortini, M., Di Pompo, G., Perut, F., & Baldini, N. (2019b). Pre-clinical Models for Studying the Interaction Between Mesenchymal Stromal Cells and Cancer Cells and the Induction of Stemness. *Frontiers in Oncology*, *9*(305). https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00305

Baker, B. M., & Chen, C. S. (2012). Deconstructing the third dimension – how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *Journal of Cell Science*, *125*(13), 3015–3024. https://doi.org/10.1242/jcs.079509

Bareschino, M. A., Schettino, C., Rossi, A., Maione, P., Sacco, P. C., Zeppa, R., & Gridelli, C. (2011). Treatment of advanced non small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Disease*, *3*(2), 122–133. https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2010.12.08

Batlle, E., & Clevers, H. (2017). Cancer stem cells revisited. *Nature Medicine*, *23*(10), Article 10. https://doi.org/10.1038/nm.4409

Becher, O. J., & Holland, E. C. (2014). Sox2, a Marker for Stem-like Tumor Cells in Skin Squamous Cell Carcinoma and Hedgehog Subgroup Medulloblastoma. *The Embo Journal,* 33:1984-1986.https://doi.org/10.15252/embj.201489479

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Belkas, J. S., Munro, C. A., Shoichet, M. S., Johnston, M., & Midha, R. (2005). Long-term in vivo biomechanical properties and biocompatibility of poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-methyl methacrylate) nerve conduits. *Biomaterials*, *26*(14), 1741–1749. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.05.031

Benhardt, H. A., & Cosgriff-Hernandez, E. M. (2009). The Role of Mechanical Loading in Ligament Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, *15*(4), 467–475. https://doi.org/10.1089/ten.teb.2008.0687

Benien, P., & Swami, A. (2014). 3D tumor models: History, advances and future perspectives. *Future Oncology*, *10*(7), 1311–1327. https://doi.org/10.2217/fon.13.274

Benoit, D. S. W., Schwartz, M. P., Durney, A. R., & Anseth, K. S. (2008). Small functional groups for controlled differentiation of hydrogel-encapsulated human mesenchymal stem cells. *Nature Materials*, *7*(10), Article 10. https://doi.org/10.1038/nmat2269

Berg, J., Weber, Z., Fechler-Bitteti, M., Hocke, A. C., Hippenstiel, S., Elomaa, L., Weinhart, M., & Kurreck, J. (2021). Bioprinted Multi-Cell Type Lung Model for the Study of Viral Inhibitors. *Viruses*, *13*(8), 1590. https://doi.org/10.3390/v13081590

Bertolini, G., Roz, L., Perego, P., Tortoreto, M., Fontanella, E., Gatti, L., Pratesi, G., Fabbri, A., Andriani, F., Tinelli, S., Roz, E., Caserini, R., Lo Vullo, S., Camerini, T., Mariani, L., Delia, D., Calabrò, E., Pastorino, U., & Sozzi, G. (2009). Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(38), 16281–16286. https://doi.org/10.1073/pnas.0905653106

Bielecka, Z. F., Maliszewska-Olejniczak, K., Safir, I. J., Szczylik, C., & Czarnecka, A. M. (2017). Three-dimensional cell culture model utilization in cancer stem cell research. *Biological Reviews*, *92*(3), 1505–1520. https://doi.org/10.1111/brv.12293

Boland, T., Xu, T., Damon, B., & Cui, X. (2006). Application of inkjet printing to tissue engineering. *Biotechnology Journal*, *1*(9), 910–917. https://doi.org/10.1002/biot.200600081

Boneva, R. S., Folks, T. M., & Chapman, L. E. (2001). Infectious Disease Issues in Xenotransplantation. *Clinical Microbiology Reviews*, *14*(1), 1–14. https://doi.org/10.1128/cmr.14.1.1-14.2001

Brown, B. N., Valentin, J. E., Stewart-Akers, A. M., McCabe, G. P., & Badylak, S. F. (2009). Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component. *Biomaterials*, *30*(8), 1482–1491. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.11.040

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Cadamuro, F., Nicotra, F., & Russo, L. (2023). 3D printed tissue models: From hydrogels to biomedical applications. *Journal of Controlled Release*, *354*, 726–745. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.01.048

Caliari, S. R., & Burdick, J. A. (2016). A practical guide to hydrogels for cell culture. *Nature Methods*, 13 (5), 405–414. https://doi.org/10.1038/nmeth.3839

Caliari, S. R., Ramirez, M. A., & Harley, B. A. C. (2011). The development of collagen-GAG scaffold-membrane composites for tendon tissue engineering. *Biomaterials*, *32*(34), 8990–8998. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.035

Carney, D. N., Bunn, P. A., Gazdar, A. F., Pagan, J. A., & Minna, J. D. (1981). Selective growth in serum-free hormone-supplemented medium of tumor cells obtained by biopsy from patients with small cell carcinoma of the lung. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *78*(5), 3185–3189. https://doi.org/10.1073/pnas.78.5.3185

Catros, S., Guillotin, B., Bačáková, M., Fricain, J.-C., & Guillemot, F. (2011). Effect of laser energy, substrate film thickness and bioink viscosity on viability of endothelial cells printed by Laser-Assisted Bioprinting. *Applied Surface Science*, *257*(12), 5142–5147. https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2010.11.049

Chan, B. P., & Leong, K. W. (2008). Scaffolding in tissue engineering: General approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal*, *17*(4), 467–479. https://doi.org/10.1007/s00586-008-0745-3

Chartier, T., Badev, A., Abouliatim, Y., Lebaudy, P., & Lecamp, L. (2012). Stereolithography process: Influence of the rheology of silica suspensions and of the medium on polymerization kinetics – Cured depth and width. *Journal of the European Ceramic Society*, *32*(8), 1625–1634. https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2012.01.010

Chen, M., Przyborowski, M., & Berthiaume, F. (2009). Stem Cells for Skin Tissue Engineering and Wound Healing. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*, *37*(4–5). https://doi.org/10.1615/CritRevBiomedEng.v37.i4-5.50

Chen, Y.-C., Hsu, H.-S., Chen, Y.-W., Tsai, T.-H., How, C.-K., Wang, C.-Y., Hung, S.-C., Chang, Y.-L., Tsai, M.-L., Lee, Y.-Y., Ku, H.-H., & Chiou, S.-H. (2008). Oct-4 Expression Maintained Cancer Stem-Like Properties in Lung Cancer-Derived CD133-Positive Cells. *PLOS ONE*, *3*(7), e2637. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002637

Chimene, D., Miller, L., Cross, L. M., Jaiswal, M. K., Singh, I., & Gaharwar, A. K. (2020). Nanoengineered Osteoinductive Bioink for 3D Bioprinting Bone Tissue. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *12*(14), 15976–15988. https://doi.org/10.1021/acsami.9b19037

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Chung, J. H. Y., Naficy, S., Yue, Z., Kapsa, R., Quigley, A., Moulton, S. E., & Wallace, G. G. (2013). Bio-ink properties and printability for extrusion printing living cells. *Biomaterials Science*, *1*(7), 763. https://doi.org/10.1039/c3bm00012e

Compaan, A. M., Christensen, K., & Huang, Y. (2017). Inkjet Bioprinting of 3D Silk Fibroin Cellular Constructs Using Sacrificial Alginate. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, *3*(8), 1519–1526. https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00432

Crowe. (2009). Tumor Initiating Cancer Stem Cells From Human Breast Cancer Cell Lines. *International Journal of Oncology*, 34, 1449-1453. https://doi.org/10.3892/ijo_00000273

da Cunha, B. R., Domingos, C., Buzzo Stefanini, A. C., Henrique, T., Polachini, G. M., Castelo-Branco, P., & Tajara, E. H. (2019). Cellular Interactions in the Tumor Microenvironment: The Role of Secretome. *Journal of Cancer*, 10(19):4574-4587. https://doi.org/10.7150/jca.21780

Dare, E. V., Vascotto, S. G., Carlsson, D. J., Hincke, M. T., & Griffith, M. (2007). Differentiation of a Fibrin Gel Encapsulated Chondrogenic Cell Line. *The International Journal of Artificial Organs*, *30*(7), 619–627. https://doi.org/10.1177/039139880703000710

Datta P, Ayan B, Ozbolat IT (2017) Bioprinting for vascular and vascularized tissue biofabrication. Acta Biomater 51:1–20

De Palma, M., Biziato, D., & Petrova, T. V. (2017). Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nature Reviews Cancer*, *17*(8), Article 8. https://doi.org/10.1038/nrc.2017.51

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

Dhandapani, M., Balakrishnan, B., & Ganesan, S. (2018). Anti-CSC Combination Therapy Using WNT Signaling-Targeted Drug. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 8(5-s), 139-142. https://doi.org/10.22270/jddt.v8i5-s.1921

Donati, I., & Paoletti, S. (2009). Material Properties of Alginates. In B. H. A. Rehm (Ed.), *Alginates: Biology and Applications* (pp. 1–53). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-92679-5_1

Dragani, T. A., Canzian, F., & Pierotti, M. A. (1996). A Polygenic Model of Inherited Predisposition to Cancer. The Faseb Journal, 10: 865-870 https://doi.org/10.1096/fasebj.10.8.8666163

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Drury, J. L., & Mooney, D. J. (2003). Hydrogels for tissue engineering: Scaffold design variables and applications. *Biomaterials*, *24*(24), 4337–4351. https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00340-5

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

Fan, L., Du, Y., Huang, R., Wang, Q., Wang, X., & Zhang, L. (2005). Preparation and characterization of alginate/gelatin blend fibers. *Journal of Applied Polymer Science*, *96*(5), 1625–1629. https://doi.org/10.1002/app.21610

Fitzpatrick, L. E., & McDevitt, T. C. (2014). Cell-derived matrices for tissue engineering and regenerative medicine applications. *Biomaterials Science*, *3*(1), 12–24. https://doi.org/10.1039/C4BM00246F

Gao, G., Yonezawa, T., Hubbell, K., Dai, G., & Cui, X. (2015). Inkjet-bioprinted acrylated peptides and PEG hydrogel with human mesenchymal stem cells promote robust bone and cartilage formation with minimal printhead clogging. *Biotechnology Journal*, *10*(10), 1568–1577. https://doi.org/10.1002/biot.201400635

Geevarghese, R., Somasekharan, L. T., Bhatt, A., Kasoju, N., & Nair, R. P. (2022). Development and evaluation of a multicomponent bioink consisting of alginate, gelatin, diethylaminoethyl cellulose and collagen peptide for 3D bioprinting of tissue construct for drug screening application. *International Journal of Biological Macromolecules*, *207*, 278–288. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.02.191

GhavamiNejad, A., Ashammakhi, N., Wu, X. Y., & Khademhosseini, A. (2020). Crosslinking Strategies for 3D Bioprinting of Polymeric Hydrogels. *Small*, *16*(35), 2002931. https://doi.org/10.1002/smll.202002931

Global Burden of Disease Cancer Collaboration. (2017). Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. JAMA Oncology, *3*(4), 524–548. https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.5688

Grippi M.A., & Elias J.A., & Fishman J.A., & Kotloff R.M., & Pack A.I., & Senior R.M., & Siegel M.D.(Eds.), (2015). *Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders, Fifth Edition*. McGraw Hill. https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1344&sectionid=79339192

Gu, Z., Fu, J., Lin, H., & He, Y. (2020). Development of 3D bioprinting: From printing methods to biomedical applications. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *15*(5), 529–557. https://doi.org/10.1016/j.ajps.2019.11.003

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Gudapati, H., Yan, J., Huang, Y., & Chrisey, D. B. (2014). Alginate gelation-induced cell death during laser-assisted cell printing. *Biofabrication*, *6*(3), 035022. https://doi.org/10.1088/1758-5082/6/3/035022

Guo, C., Ahmed, S., Guo, C., & Liu, X. (2017). Stability Analysis of Mathematical Models for Nonlinear Growth Kinetics of Breast Cancer Stem Cells. *Mathematical Methods in the Applied Sciences,*40: 5332–5348. https://doi.org/10.1002/mma.4389

Gupta, S. K., Torrico Guzmán, E. A., & Meenach, S. A. (2017). Coadministration of a tumor-penetrating peptide improves the therapeutic efficacy of paclitaxel in a novel air-grown lung cancer 3D spheroid model. *International Journal of Cancer*, *141*(10), 2143–2153. https://doi.org/10.1002/ijc.30913

Hakobyan, D., Médina, C., Dusserre, N., Stachowicz, M.-L., Handschin, C., Fricain, J.-C., Guillermet-Guibert, J., & Oliveira, H. (2020). Laser-assisted 3D bioprinting of exocrine pancreas spheroid models for cancer initiation study. *Biofabrication*, *12*(3), 035001. https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab7cb8

Hammerschmidt, S., & Wirtz, H. (2009). Lung Cancer. *Deutsches Ärzteblatt International,* 106(49): 809–20. https://doi.org/10.3238/arztebl.2009.0809

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

Hassan, S., Cecen, B., Peña-Garcia, R., Marciano, F. R., Miri, A. K., Fattahi, A., Karavasili, C., Sebastian, S., Zaidi, H., & Lobo, A. O. (2021). Survival and Proliferation under Severely Hypoxic Microenvironments Using Cell-Laden Oxygenating Hydrogels. *Journal of Functional Biomaterials*, *12*(2), Article 2. https://doi.org/10.3390/jfb12020030

Heath, C. A. (2000). Cells for tissue engineering. *Trends in Biotechnology*, *18*(1), 17–19. https://doi.org/10.1016/S0167-7799(99)01396-7

Hench, L. L., & Jones, J. R. (Eds.). (2005). Related titles. In *Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering* (p. ii). Woodhead Publishing. https://doi.org/10.1016/B978-1-85573-737-2.50029-8

Herreros-Pomares, A., Zhou, X., Calabuig-Fariñas, S., Lee, S.-J., Torres, S., Esworthy, T., Hann, S. Y., Jantus-Lewintre, E., Camps, C., & Zhang, L. G. (2021). 3D printing novel in vitro cancer cell culture model systems for lung cancer stem cell study. *Materials Science and Engineering: C*, *122*, 111914. https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.111914

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Hesuani, Y. D., Pereira, F. D. A. S., Parfenov, V., Koudan, E., Mitryashkin, A., Replyanski, N., Kasyanov, V., Knyazeva, A., Bulanova, E., & Mironov, V. (2016). Design and Implementation of Novel Multifunctional 3D Bioprinter. *3D Printing and Additive Manufacturing*, *3*(1), 64–68. https://doi.org/10.1089/3dp.2015.0040

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

Hodgkinson, T., Yuan, X.-F., & Bayat, A. (2009). Adult stem cells in tissue engineering. *Expert Review of Medical Devices*, *6*(6), 621–640. https://doi.org/10.1586/erd.09.48

Hollister, S. J. (2005). Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature Materials*, *4*(7), Article 7. https://doi.org/10.1038/nmat1421

Hölzl, K., Lin, S., Tytgat, L., Vlierberghe, S. V., Gu, L., & Ovsianikov, A. (2016). Bioink properties before, during and after 3D bioprinting. *Biofabrication*, *8*(3), 032002. https://doi.org/10.1088/1758-5090/8/3/032002

Horváth, L., Umehara, Y., Jud, C., Blank, F., Petri-Fink, A., & Rothen-Rutishauser, B. (2015). Engineering an in vitro air-blood barrier by 3D bioprinting. *Scientific Reports*, *5*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/srep07974

Huh, J. T., Yoo, J. J., Atala, A., & Lee, S. J. (2020). Chapter 74—Three-dimensional bioprinting for tissue engineering. In R. Lanza, R. Langer, J. P. Vacanti, & A. Atala (Eds.), *Principles of Tissue Engineering (Fifth Edition)* (pp. 1391–1415). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818422-6.00076-9

Ikada, Y. (2006). Challenges in tissue engineering. *Journal of The Royal Society Interface*, *3*(10), 589–601. https://doi.org/10.1098/rsif.2006.0124

Ishihara, S., & Haga, H. (2022). Matrix Stiffness Contributes to Cancer Progression by Regulating Transcription Factors. *Cancers*, *14*(4), Article 4. https://doi.org/10.3390/cancers14041049

Jasim, A. A., & Bahir, B. H. (2020). Assessment of Risk Factors of Lung Cancer Patients in Babylon Governorate ,Iraq. *Medico-Legal Update,* 20(3), 1154–1158. https://doi.org/10.37506/mlu.v20i3.1557

J. Ferris, C., J. Gilmore, K., Beirne, S., McCallum, D., G. Wallace, G., & Panhuis, M. in het. (2013). Bio-ink for on-demand printing of living cells. *Biomaterials Science*, *1*(2), 224–230. https://doi.org/10.1039/C2BM00114D

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Jin, Y., Xu, Y., Xu, M., & Xue, S. (2005). Increased Risk of Cancer Among Relatives of Patients with Lung Cancer in China. *BMC Cancer*, 5, 146 https://doi.org/10.1186/1471-2407-5-146

Jovic, T. H., Kungwengwe, G., Mills, A. C., & Whitaker, I. S. (2019). Plant-Derived Biomaterials: A Review of 3D Bioprinting and Biomedical Applications. *Frontiers in Mechanical Engineering*, *5*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmech.2019.00019

Kang, H.-W., Lee, S. J., Ko, I. K., Kengla, C., Yoo, J. J., & Atala, A. (2016). A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity. *Nature Biotechnology*, *34*(3), Article 3. https://doi.org/10.1038/nbt.3413

Kang, Y., Datta, P., Shanmughapriya, S., & Ozbolat, I. T. (2020). 3D Bioprinting of Tumor Models for Cancer Research. *ACS Applied Bio Materials*, *3*(9), 5552–5573. https://doi.org/10.1021/acsabm.0c00791

Karzyński, K., Kosowska, K., Ambrożkiewicz, F., Berman, A., Cichoń, J., Klak, M., Serwańska-Świętek, M., & Wszoła, M. (2018). Use of 3D bioprinting in biomedical engineering for clinical application. *Medical Studies/Studia Medyczne*, *34*(1), 93–97. https://doi.org/10.5114/ms.2018.74827

Kim, J.-H., Lee, S., Sun, R., & Kim, J. (2022). Juglone and KPT6566 Suppress the Tumorigenic Potential of CD44+CD133+ Tumor-Initiating Caco-2 Cells in Vitro and in Vivo. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10:861045. https://doi.org/10.3389/fcell.2022.861045

Klebe, R. J. (1988). Cytoscribing: A method for micropositioning cells and the construction of two- and three-dimensional synthetic tissues. *Experimental Cell Research*, *179*(2), 362–373. https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90275-3

Knowlton, S., Onal, S., Yu, C. H., Zhao, J. J., & Tasoglu, S. (2015). Bioprinting for cancer research. *Trends in Biotechnology*, *33*(9), 504–513. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.007

Koch, T. G., Berg, L. C., & Betts, D. H. (2009). Current and future regenerative medicine—Principles, concepts, and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine. *The Canadian Veterinary Journal*, *50*(2), 155–165.

Kumagai, Y., Naoki, H., Nakasyo, E., Kamioka, Y., Kiyokawa, E., & Matsuda, M. (2014). Heterogeneity in ERK Activity as Visualized by in Vivo FRET Imaging of Mammary Tumor Cells Developed in MMTV-Neu Mice. *Oncogene*. https://doi.org/10.1038/onc.2014.28

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Landers, R., Hübner, U., Schmelzeisen, R., & Mülhaupt, R. (2002). Rapid prototyping of scaffolds derived from thermoreversible hydrogels and tailored for applications in tissue engineering. *Biomaterials*, *23*(23), 4437–4447. https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00139-4

Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). Tissue Engineering. *Science*, *260*(5110), 920–926. https://doi.org/10.1126/science.8493529

Langhans, S. A. (2018). Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Frontiers in Pharmacology*, *9*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2018.00006

Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J. vd. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature,* 367, 645–648 (1994). https://doi.org/10.1038/367645a0

Lee, C. H., Singla, A., & Lee, Y. (2001). Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics*, *221*(1), 1–22. https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00691-3

Lee, C. R., Grodzinsky, A. J., & Spector, M. (2001). The effects of cross-linking of collagen-glycosaminoglycan scaffolds on compressive stiffness, chondrocyte-mediated contraction, proliferation and biosynthesis. *Biomaterials*, *22*(23), 3145–3154. https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00067-9

Lee, J. M., Ma, W. C., & Yeong, W. Y. (2022). Chapter 7—Hydrogels for Bioprinting. In L. G. Zhang, J. P. Fisher, & K. W. Leong (Eds.), *3D Bioprinting and Nanotechnology in Tissue Engineering and Regenerative Medicine (Second Edition)* (pp. 185–211). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824552-1.00021-9

Lee, K., Silva, E. A., & Mooney, D. J. (2010). Growth factor delivery-based tissue engineering: General approaches and a review of recent developments. *Journal of The Royal Society Interface*, *8*(55), 153–170. https://doi.org/10.1098/rsif.2010.0223

Li, J., Chen, M., Fan, X., & Zhou, H. (2016). Recent advances in bioprinting techniques: Approaches, applications and future prospects. *Journal of Translational Medicine*, *14*(1), 271. https://doi.org/10.1186/s12967-016-1028-0

Li, Y., Rogoff, H. A., Keates, S., Gao, Y., Murikipudi, S., Mikule, K., Leggett, D., Li, W., Pardee, A. B., & Li, C. J. (2015). Suppression of Cancer Relapse and Metastasis by Inhibiting Cancer Stemness. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. https://doi.org/10.1073/pnas.1424171112

Liu, J., Xu, T., Jin, Y., Huang, B., & Zhang, Y. (2021). Progress and Clinical Application of Single-Cell Transcriptional Sequencing Technology in Cancer Research. *Frontiers in Oncology*. https://doi.org/10.3389/fonc.2020.593085

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Liu, Y., Xia, Z., Wang, J., Yang, J., & Tan, W. (2015). JNK Is Required for Maintaining the Tumor-Initiating Cell-Like Properties of Acquired Chemoresistant Human Cancer Cells. *Acta Pharmacologica Sinica*. https://doi.org/10.1038/aps.2015.58

Loh, Q. L., & Choong, C. (2013). Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, *19*(6), 485–502. https://doi.org/10.1089/ten.teb.2012.0437

Luo, W., Tahara, S., Kawasaki, K., Kobayashi, A., Nojima, S., & Morii, E. (2020). The Expression of Trefoil Factor 3 Is Related to Histologic Subtypes and Invasiveness in Lung Adenocarcinoma. *Oncology Letters*. https://doi.org/10.3892/ol.2020.12325

Luong, E., & Gerecht, S. (2009). Stem Cells and Scaffolds for Vascularizing Engineered Tissue Constructs. In U. Martin (Ed.), *Engineering of Stem Cells* (pp. 129–172). Springer. https://doi.org/10.1007/10_2008_8

Malda, J., Visser, J., Melchels, F. P., Jüngst, T., Hennink, W. E., Dhert, W. J. A., Groll, J., & Hutmacher, D. W. (2013). 25th Anniversary Article: Engineering Hydrogels for Biofabrication. *Advanced Materials*, *25*(36), 5011–5028. https://doi.org/10.1002/adma.201302042

Maman, S., & Witz, I. P. (2018). A history of exploring cancer in context. *Nature Reviews Cancer*, *18*(6), 359–376. https://doi.org/10.1038/s41568-018-0006-7

Mandal, S., Pradhan, R. R., Bethala, M. G., Khan, S., & Karki, A. (2020). Non-Small Cell Lung Cancer With Synchronous Peritoneal Adenocarcinoma: A Rare Independent Combination. *Cureus*. https://doi.org/10.7759/cureus.10166

Mandrycky, C., Wang, Z., Kim, K., & Kim, D.-H. (2016). 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnology Advances*, *34*(4), 422–434. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.011

Mannello, F. (2013). Understanding Breast Cancer Stem Cell Heterogeneity: Time to Move on to a New Research Paradigm. *BMC Medicine*. https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-169

McMillin, D. W., Negri, J. M., & Mitsiades, C. S. (2013). The role of tumour–stromal interactions in modifying drug response: Challenges and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, *12*(3), Article 3. https://doi.org/10.1038/nrd3870

Meuwissen, R., Linn, S. C., der Valk, M. van, Mooi, W. J., & Berns, A. (2001). Mouse Model for Lung Tumorigenesis Through Cre/Lox Controlled Sporadic Activation of the K-Ras Oncogene. *Oncogene*. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204837

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Michael, S., Sorg, H., Peck, C.-T., Koch, L., Deiwick, A., Chichkov, B., Vogt, P. M., & Reimers, K. (2013). Tissue Engineered Skin Substitutes Created by Laser-Assisted Bioprinting Form Skin-Like Structures in the Dorsal Skin Fold Chamber in Mice. *PLOS ONE*, *8*(3), e57741. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057741

Ming, Z., Tang, X., Liu, J., & Ruan, B. (2023). Advancements in Research on Constructing Physiological and Pathological Liver Models and Their Applications Utilizing Bioprinting Technology. *Molecules*, *28*(9), 3683. https://doi.org/10.3390/molecules28093683

Mironov, V., Boland, T., Trusk, T., Forgacs, G., & Markwald, R. R. (2003). Organ printing: Computer-aided jet-based 3D tissue engineering. *Trends in Biotechnology*, *21*(4), 157–161. https://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00033-7

Mitchell, M. J., Jain, R. K., & Langer, R. (2017). Engineering and physical sciences in oncology: Challenges and opportunities. *Nature Reviews Cancer*, *17*(11), Article 11. https://doi.org/10.1038/nrc.2017.83

Moghaddam, A. S., Khonakdar, H. A., Arjmand, M., Jafari, S. H., Bagher, Z., Moghaddam, Z. S., Chimerad, M., Sisakht, M. M., & Shojaei, S. (2021). Review of Bioprinting in Regenerative Medicine: Naturally Derived Bioinks and Stem Cells. *ACS Applied Bio Materials*, *4*(5), 4049–4070. https://doi.org/10.1021/acsabm.1c00219

Monleón-Guinot, I., Milian, L., Martínez-Vallejo, P., Sancho-Tello, M., Llop-Miguel, M., Galbis, J. M., Cremades, A., Carda, C., & Mata, M. (2023). Morphological Characterization of Human Lung Cancer Organoids Cultured in Type I Collagen Hydrogels: A Histological Approach. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(12), 10131. https://doi.org/10.3390/ijms241210131

Motono, N., Matsui, T., Machida, Y., Usuda, K., & Uramoto, H. (2017). Prognostic Significance of Histologic Subtype in pStage I Lung Adenocarcinoma. *Medical Oncology*. https://doi.org/10.1007/s12032-017-0962-x

Movia, D., Bazou, D., Volkov, Y., & Prina-Mello, A. (2018). Multilayered Cultures of NSCLC cells grown at the Air-Liquid Interface allow the efficacy testing of inhaled anti-cancer drugs. *Scientific Reports*, *8*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/s41598-018-31332-6

Nakamura, H., & Saji, H. (2013). A Worldwide Trend of Increasing Primary Adenocarcinoma of the Lung. *Surgery Today*. https://doi.org/10.1007/s00595-013-0636-z

Nikolova, M. P., & Chavali, M. S. (2019). Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review. *Bioactive Materials*, *4*, 271–292. https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2019.10.005

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Noor, N., Shapira, A., Edri, R., Gal, I., Wertheim, L., & Dvir, T. (2019). 3D Printing of Personalized Thick and Perfusable Cardiac Patches and Hearts. *Advanced Science*, *6*(11), 1900344. https://doi.org/10.1002/advs.201900344

Nunes, T., Hamdan, D., Leboeuf, C., Bouchtaoui, M. E., Gapihan, G., Nga Nguyen, T. T., Meles, S., Angeli, E., Ratajczak, P., Lu, H., Benedetto, M. D., Bousquet, G., & Janin, A. (2018). Targeting Cancer Stem Cells to Overcome Chemoresistance. *International Journal of Molecular Sciences*. https://doi.org/10.3390/ijms19124036

Nyga, A., Cheema, U., & Loizidou, M. (2011). 3D tumour models: Novel in vitro approaches to cancer studies. *Journal of Cell Communication and Signaling*, *5*(3), 239–248. https://doi.org/10.1007/s12079-011-0132-4

O'Brien, T., Jia, P., Aldrich, M. C., & Zhao, Z. (2018). Lung Cancer: One Disease or Many. *Human Heredity*. https://doi.org/10.1159/000488942

Odde, D. J., Renn, M. J., Odde, D. J., & Renn, M. J. (1999). Laser-guided direct writing for applications in biotechnology. *Trends in Biotechnology*, *17*(10), 385–389. https://doi.org/10.1016/S0167-7799(99)01355-4

Ogura, K., Mizowaki, T., Arakawa, Y., Ogura, M., Sakanaka, K., Miyamoto, S., & Hiraoka, M. (2013). Initial and cumulative recurrence patterns of glioblastoma after temozolomide-based chemoradiotherapy and salvage treatment: A retrospective cohort study in a single institution. *Radiation Oncology*, *8*(1), 97. https://doi.org/10.1186/1748-717X-8-97

Ouyang, L., Highley, C. B., Rodell, C. B., Sun, W., & Burdick, J. A. (2016). 3D Printing of Shear-Thinning Hyaluronic Acid Hydrogels with Secondary Cross-Linking. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, *2*(10), 1743–1751. https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00158

Ouyang, L., Yao, R., Zhao, Y., & Sun, W. (2016). Effect of bioink properties on printability and cell viability for 3D bioplotting of embryonic stem cells. *Biofabrication*, *8*(3), 035020. https://doi.org/10.1088/1758-5090/8/3/035020

Ozbolat, I. T., & Hospodiuk, M. (2016). Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting. *Biomaterials*, *76*, 321–343. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.10.076

Ozbolat, I. T., Peng, W., & Ozbolat, V. (2016). Application areas of 3D bioprinting. *Drug Discovery Today*, *21*(8), 1257–1271. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.04.006

Park, E. R., Japuntich, S. J., Rigotti, N. A., Traeger, L., He, Y., Wallace, R. B., Malin, J., Zallen, J. P., & Keating, N. L. (2012). A Snapshot of Smokers After Lung and Colorectal Cancer Diagnosis. *Cancer*. https://doi.org/10.1002/cncr.26545

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Park, S.-N., Park, J.-C., Kim, H. O., Song, M. J., & Suh, H. (2002). Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide cross-linking. *Biomaterials*, *23*(4), 1205–1212. https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00235-6

Paxton, N., Smolan, W., Böck, T., Melchels, F., Groll, J., & Jungst, T. (2017). Proposal to assess printability of bioinks for extrusion-based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability. *Biofabrication*, *9*(4), 044107. https://doi.org/10.1088/1758-5090/aa8dd8

Pfannenstill, V., Barbotin, A., Colin-York, H., & Fritzsche, M. (2021). Quantitative Methodologies to Dissect Immune Cell Mechanobiology. *Cells*. https://doi.org/10.3390/cells10040851

Poltavets, V., Kochetkova, M., Pitson, S. M., & Samuel, M. S. (2018). The Role of the Extracellular Matrix and Its Molecular and Cellular Regulators in Cancer Cell Plasticity. *Frontiers in Oncology*, *8*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2018.00431

Poomathi, N., Singh, S., Prakash, C., Patil, R. V., Perumal, P. T., Barathi, V. A., Balasubramanian, K. K., Ramakrishna, S., & Maheshwari, N. U. (2018). Bioprinting in ophthalmology: Current advances and future pathways. *Rapid Prototyping Journal*, *25*(3), 496–514. https://doi.org/10.1108/RPJ-06-2018-0144

Ramadan, Q., & Zourob, M. (2021). 3D Bioprinting at the Frontier of Regenerative Medicine, Pharmaceutical, and Food Industries. *Frontiers in Medical Technology*, *2*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmedt.2020.607648

Remes, A., & Williams, D. F. (1992). Review: Immune response in biocompatibility. In D. F. Williams (Ed.), *The Biomaterials: Silver Jubilee Compendium* (pp. 79–91). Elsevier Science. https://doi.org/10.1016/B978-008045154-1.50012-5.

Reynolds, B. A., & Weiss, S. (1992). Generation of Neurons and Astrocytes from Isolated Cells of the Adult Mammalian Central Nervous System. *Science*, *255*(5052), 1707–1710. https://doi.org/10.1126/science.1553558

Riedl, A., Schlederer, M., Pudelko, K., Stadler, M., Walter, S., Unterleuthner, D., Unger, C., Kramer, N., Hengstschläger, M., Kenner, L., Pfeiffer, D., Krupitza, G., & Dolznig, H. (2017). Comparison of cancer cells in 2D vs 3D culture reveals differences in AKT–mTOR–S6K signaling and drug responses. *Journal of Cell Science*, *130*(1), 203–218. https://doi.org/10.1242/jcs.188102

Risbud, M. V., Karamuk, E., Moser, R., & Mayer, J. (2002). Hydrogel-Coated Textile Scaffolds as Three-Dimensional Growth Support for Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs): Possibilities as Coculture System in Liver Tissue Engineering. *Cell Transplantation*, *11*(4), 369–377. https://doi.org/10.3727/000000002783985837

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Ruiz-Cantu, L., Gleadall, A., Faris, C., Segal, J., Shakesheff, K., & Yang, J. (2020). Multi-material 3D bioprinting of porous constructs for cartilage regeneration. *Materials Science and Engineering: C*, *109*, 110578. https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110578

Sarvi, S., Mackinnon, A. C., Avlonitis, N., Bradley, M., Rintoul, R. C., Rassl, D. M., Wang, W., Forbes, S. J., Gregory, C. D., & Sethi, T. (2014). CD133+ Cancer Stem-like Cells in Small Cell Lung Cancer Are Highly Tumorigenic and Chemoresistant but Sensitive to a Novel Neuropeptide Antagonist. *Cancer Research*, *74*(5), 1554–1565. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1541

Savage, P. (2016). Chemotherapy Curable Malignancies and Cancer Stem Cells: A Biological Review and Hypothesis. *BMC Cancer*. https://doi.org/10.1186/s12885-016-2956-z

Schiavone, K., Garnier, D., Heymann, M.-F., & Heymann, D. (2019b). The Heterogeneity of Osteosarcoma: The Role Played by Cancer Stem Cells. In A. Birbrair (Ed.), *Stem Cells Heterogeneity in Cancer* (pp. 187–200). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-14366-4_11

Schmedlen, R. H., Masters, K. S., & West, J. L. (2002). Photocrosslinkable polyvinyl alcohol hydrogels that can be modified with cell adhesion peptides for use in tissue engineering. *Biomaterials*, *23*(22), 4325–4332. https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00177-1

Seyfried, T. N., & Shelton, L. M. (2010). Cancer as a metabolic disease. Nutrition & Metabolism.7:7. doi:10.1186/1743-7075-7-7

Shamus R Carr, Wallace Akerley, Mia Hashibe, & Lisa A Cannon-Albright. (2015). Evidence for a genetical contribution to non-smoking-related lung cancer. *Thorax*, *70*(11), 1033. https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2014-206584

Shafiee A, Atala A (2016) Printing technologies for medical applications. Trends MolMed 22(3):254–265

Shipitsin, M., & Polyák, K. (2008). The Cancer Stem Cell Hypothesis: In Search of Definitions, Markers, and Relevance. *Laboratory Investigation*. https://doi.org/10.1038/labinvest.2008.14

Shrivastava, S. R. ; S., Prateek S. ;. Ramasamy, Jegadeesh. (2013). Lung cancer: Knowledge application gap. *South Asian Journal of Cancer*, *02*(01), 18–18. https://doi.org/10.4103/2278-330X.105884

Skardal, A., Mack, D., Kapetanovic, E., Atala, A., Jackson, J. D., Yoo, J., & Soker, S. (2012). Bioprinted Amniotic Fluid-Derived Stem Cells Accelerate Healing of Large Skin Wounds. *Stem Cells Translational Medicine*, *1*(11), 792–802. https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0088

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Slaughter, B. V., Khurshid, S. S., Fisher, O. Z., Khademhosseini, A., & Peppas, N. A. (2009). Hydrogels in Regenerative Medicine. *Advanced Materials, 21*(32–33), 3307–3329. https://doi.org/10.1002/adma.200802106

Sochol RD, Gupta NR, Bonventre JV (2016) A role for 3D printing in kidney-on-a-chip platforms. Curr Transplant Rep 3(1):82–92

Solis, L. H., Ayala, Y., Portillo, S., Varela-Ramirez, A., Aguilera, R., & Boland, T. (2019). Thermal inkjet bioprinting triggers the activation of the VEGF pathway in human microvascular endothelial cells in vitro. *Biofabrication, 11*(4), 045005. https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab25f9

Spinola, M., Meyer, P., Kammerer, S., Falvella, F. S., Boettger, M. B., Hoyal, C. R., Pignatiello, C., Fischer, R., Roth, R. B., Pastorino, U., Haeussinger, K., Nelson, M. R., Dierkesmann, R., Dragani, T. A., & Braun, A. (2006). Association of the *PDCD5* Locus With Lung Cancer Risk and Prognosis in Smokers. *Journal of Clinical Oncology*, 24:11, 1672-1678. https://doi.org/10.1200/jco.2005.04.4339

Stacer, A. C., Wang, H., Fenner, J., Dosch, J. S., Salomonnson, A., Luker, G. D., Rehemtulla, A., & Ross, B. D. (2015). Imaging Reporters for Proteasome Activity Identify Tumor- And Metastasis-Initiating Cells. *Molecular Imaging*. https://doi.org/10.2310/7290.2015.00016

Stange, D. E., & Clevers, H. (2013). Concise review: The Yin and Yang of intestinal (cancer) stem cells and their progenitors. *Stem Cells, 31*(11), 2287–2295. https://doi.org/10.1002/stem.1475

Suda, K., Sato, K., Shimizu, S., Tomizawa, K., Takemoto, T., Iwasaki, T., Sakaguchi, M., & Mitsudomi, T. (2014b). Prognostic Implication of Predominant Histologic Subtypes of Lymph Node Metastases in Surgically Resected Lung Adenocarcinoma. *BioMed Research International, 2014*, 645681. https://doi.org/10.1155/2014/645681

Sun, Y.-J., Hsu, C.-H., Ling, T.-Y., Liu, L., Lin, T.-C., Jakfar, S., Young, I.-C., & Lin, F.-H. (2020). The preparation of cell-containing microbubble scaffolds to mimic alveoli structure as a 3D drug-screening system for lung cancer. *Biofabrication*, *12*(2), 025031. https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab78ee

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell, 131*(5), 861–872. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019

Tan, H., & Marra, K. G. (2010). Injectable, Biodegradable Hydrogels for Tissue Engineering Applications. *Materials, 3*(3), Article 3. https://doi.org/10.3390/ma3031746

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Tang, M., Abbas, H. A., Negrao, M. V., Ramineni, M., Hu, X., Hubert, S. M., Fujimoto, J., Reuben, A., Varghese, S., Zhang, J., Li, J., Chow, C.-W., Mao, X., Song, X., Lee, W.-C., Wu, J., Little, L., Gumbs, C., Behrens, C., … Kalhor, N. (2021). The Histologic Phenotype of Lung Cancers Is Associated With Transcriptomic Features Rather Than Genomic Characteristics. *Nature Communications*. https://doi.org/10.1038/s41467-021-27341-1

Tang, X., Liang, J., Xiang, B., Yuan, C., Wang, L., Zhu, B., Ge, X., Fang, M., & Ding, Z. (2022). Positron Emission Tomography/Magnetic Resonance Imaging Radiomics in Predicting Lung Adenocarcinoma and Squamous Cell Carcinoma. *Frontiers in Oncology*. https://doi.org/10.3389/fonc.2022.803824

Taube, J. M., Klein, A. P., Brahmer, J. R., Xu, H., Pan, X., Kim, J. H., Chen, L., Pardoll, D. M., Topalian, S. L., & Anders, R. A. (2014). Association of PD-1, PD-1 Ligands, and Other Features of the Tumor Immune Microenvironment With Response to Anti–PD-1 Therapy. *Clinical Cancer Research*. https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-13-3271

Todd, D. B. (2014). Chapter 11—Solvent Extraction. In H. C. Vogel & C. M. Todaro (Eds.), *Fermentation and Biochemical Engineering Handbook (Third Edition)* (pp. 225–238). William Andrew Publishing. https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-2553-3.00012-X

Torras, N., García-Díaz, M., Fernández-Majada, V., & Martínez, E. (2018). Mimicking Epithelial Tissues in Three-Dimensional Cell Culture Models. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *6:197*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2018.00197

Tung, S.-L., Wc, H., Fc, H., Zp, Y., Th, J., Chang, J. W., Cm, C., Cr, L., & Lh, W. (2017). miRNA-34c-5p Inhibits Amphiregulin-Induced Ovarian Cancer Stemness and Drug Resistance via Downregulation of the AREG-EGFR-ERK Pathway. *Oncogenesis*. https://doi.org/10.1038/oncsis.2017.25

Vaira, V., Fedele, G., Pyne, S., Fasoli, E., Zadra, G., Bailey, D., Snyder, E., Faversani, A., Coggi, G., Flavin, R., Bosari, S., & Loda, M. (2010). Preclinical model of organotypic culture for pharmacodynamic profiling of human tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(18), 8352–8356. https://doi.org/10.1073/pnas.0907676107

Valkenburg, K. C., de Groot, A. E., & Pienta, K. J. (2018). Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *15*(6), Article 6. https://doi.org/10.1038/s41571-018-0007-1

Veeravalli, R. S., Vejandla, B., Savani, S., Nelluri, A., & Peddi, N. C. (2023). Three-Dimensional Bioprinting in Medicine: A Comprehensive Overview of Current Progress and Challenges Faced. *Cureus*. https://doi.org/10.7759/cureus.41624

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Velasco, M. A., Narváez-Tovar, C. A., & Garzón-Alvarado, D. A. (2015). Design, Materials, and Mechanobiology of Biodegradable Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *BioMed Research International*, *2015*, 729076. https://doi.org/10.1155/2015/729076

Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A., & Kinzler, K. W. (2013). Cancer Genome Landscapes. *Science*, *339*(6127), 1546–1558. https://doi.org/10.1126/science.1235122

Wainwright, D. J., & Bury, S. B. (2011). Acellular Dermal Matrix in the Management of the Burn Patient. *Aesthetic Surgery Journal*, *31*(7_Supplement), 13S-23S. https://doi.org/10.1177/1090820X11418202

Wang, W. (2019). Understanding the Molecular Link Between SPOP Gene Expression and Breast Cancer Stem Cell. *European Journal of Gynaecological Oncology*. https://doi.org/10.12892/ejgo4994.2019

Wang, X., Zhang, X., Dai, X., Wang, X., Li, X., Diao, J., & Xu, T. (2018). Tumor-like lung cancer model based on 3D bioprinting. *3 Biotech*, *8*(12), 501. https://doi.org/10.1007/s13205-018-1519-1

Wicha, M. S. (2008). Cancer Stem Cell Heterogeneity in Hereditary Breast Cancer. *Breast Cancer Research*. https://doi.org/10.1186/bcr1990

Worp, H. B. van der, Howells, D. W., Sena, E. S., Porritt, M. J., Rewell, S., O'Collins, V., & Macleod, M. R. (2010). Can Animal Models of Disease Reliably Inform Human Studies? *PLOS Medicine*, *7*(3), e1000245. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000245

Wu, H., & Zhang, S. (2015). Effects of cutting conditions on the milling process of titanium alloy Ti6Al4V. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, *77*(9), 2235–2240. https://doi.org/10.1007/s00170-014-6645-2

Xu, H., Liu, T., Xiao, J., & Mu, J. (2017). Dig the Root of Cancer: Targeting Cancer Stem Cells Therapy. *Journal of Medical Discovery*. https://doi.org/10.24262/jmd.2.2.17003

Xu, T., Zhao, W., Zhu, J.-M., Albanna, M. Z., Yoo, J. J., & Atala, A. (2013). Complex heterogeneous tissue constructs containing multiple cell types prepared by inkjet printing technology. *Biomaterials*, *34*(1), 130–139. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.09.035

Yabut, O., & Bernstein, H. S. (2011). The promise of human embryonic stem cells in aging-associated diseases. *Aging*, *3*(5), 494–508. https://doi.org/10.18632/aging.100328

Yannas, I. V. (2015). *Tissue and Organ Regeneration in Adults: Extension of the Paradigm to Several Organs*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1865-2

7. KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam Ediyor)

Yu, D., Shin, H. S., Lee, Y. S., & Lee, Y. C. (2014). miR-106b Modulates Cancer Stem Cell Characteristics Through TGF-β/Smad Signaling in CD44-positive Gastric Cancer Cells. *Laboratory Investigation*. https://doi.org/10.1038/labinvest.2014.125

Yue, Z., Liu, X., Coates, P. T., & Wallace, G. G. (2016). Advances in printing biomaterials and living cells: Implications for islet cell transplantation. *Current Opinion in Organ Transplantation*, *21*(5), 467–475. https://doi.org/10.1097/MOT.0000000000000346

Zakeri, S., Vippola, M., & Levänen, E. (2020). A comprehensive review of the photopolymerization of ceramic resins used in stereolithography. *Additive Manufacturing*, *35*, 101177. https://doi.org/10.1016/j.addma.2020.101177

Zhang, X., Morits, M., Jonkergouw, C., Ora, A., Valle-Delgado, J. J., Farooq, M., Ajdary, R., Huan, S., Linder, M., Rojas, O., Sipponen, M. H., & Österberg, M. (2020). Three-Dimensional Printed Cell Culture Model Based on Spherical Colloidal Lignin Particles and Cellulose Nanofibril-Alginate Hydrogel. *Biomacromolecules*, *21*(5), 1875–1885. https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01745

Zhao, C., Setrerrahmane, S., & Xu, H. (2015). Enrichment and characterization of cancer stem cells from a human non-small cell lung cancer cell line. *Oncology Reports*, *34*(4), 2126–2132. https://doi.org/10.3892/or.2015.4163

Zheng, Z., Eglin, D., Alini, M., Richards, G. R., Qin, L., & Lai, Y. (2021). Visible Light-Induced 3D Bioprinting Technologies and Corresponding Bioink Materials for Tissue Engineering: A Review. *Engineering*, *7*(7), 966–978. https://doi.org/10.1016/j.eng.2020.05.021

Zhou, X., Zhu, W., Nowicki, M., Miao, S., Cui, H., Holmes, B., Glazer, R. I., & Zhang, L. G. (2016). 3D Bioprinting a Cell-Laden Bone Matrix for Breast Cancer Metastasis Study. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *8*(44), 30017–30026. https://doi.org/10.1021/acsami.6b10673

Zhu, K., Chen, N., Liu, X., Mu, X., Zhang, W., Wang, C., & Zhang, Y. S. (2018). A General Strategy for Extrusion Bioprinting of Bio-Macromolecular Bioinks through Alginate-Templated Dual-Stage Crosslinking. *Macromolecular Bioscience*, *18*(9), 1800127. https://doi.org/10.1002/mabi.201800127

Zein NN, Hanouneh IA, Bishop PD, Samaan M, Eghtesad B, Quintini C, Miller C, Yerian L, Klatte R (2013) Three-dimensional print of a liver for preoperative planning in living donor liver transplantation. Liver Transpl 19(12):1304–1310