

# Doksorubisinin Multisellüler Sferoid Hücre Kültürlerinde MCF-7 Hücreleri Üzerine Etkisi: Elektronmikroskopik Çalışma

## EFFECT OF DOXORUBICIN ON A MCF-7 CELL LINE MULTICELLULAR TUMOR SPHEROID MODEL: AN ELECTRONMICROSCOPIC STUDY

Dr. Gülperi ÖKTEM,<sup>a</sup> Dr. Şule AYLA,<sup>b</sup> Dr. Sevilcan TUNA,<sup>c</sup> Dr. Meral BAKA,<sup>a</sup> Dr. Ayhan BİLİR<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Histoloji ve Embriyoloji AD, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İZMİR

<sup>b</sup>Histoloji ve Embriyoloji AD, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi,

<sup>c</sup>Histoloji ve Embriyoloji AD, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, İSTANBUL

### Özet

**Amaç:** Üç boyutlu (3D) multisellüler sferoidlerde çoğaltılan insan tümör hücrelerinin, ilaç duyarlılığı, bağlantı kompleksleri ve invazyon yetenekleri gibi pek çok biyolojik özellikleri tek tabakalı hücre kültürlerinden farklıdır. Multisellüler sferoidler, tek tabaka hücre kültürleriyle in vivo tümörler arasındaki bir ara modeldir. Bu çalışmada doksorubisinin insan meme kanseri hücrelerindeki etkileri ultrastrüktürel olarak incelendi.

**Gereç ve Yöntemler:** Sıvı üst tabaka tekniği kullanılarak sferoidler oluşturuldu. Doksorubisin uygulanan MCF-7 meme kanseri hücre serisi sferoidlerinde meydana gelen değişiklikler elektronmikroskopik olarak incelendi.

**Bulgular:** Hücrelerde, ilaç etkisine bağlı olarak ortaya çıkan apoptotik değişikliklerin, sferoidin merkezinde yoğun olmak üzere arttığı gözlemlendi.

**Sonuç:** Bu çalışmada tümör oluşumundaki fizyolojik ve patolojik değişikliklerin aydınlatılması yanında, uygulanan kemoterapi ilaçlarının tümör hücresi düzeyindeki etkileri incelendi. Ayrıca tümörün biyolojik davranışının aydınlatılması ve tedavinin farklı ilaçlarla, doğru kullanılmasından faydalanılabilecek uygun bir metot olduğu gösterildi.

**Anahtar Kelimeler:** MCF-7, doksorubisin, elektronmikroskop, neoplasma

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2005, 25:337-342

### Abstract

**Objective:** Many properties of human tumor cells that propagate in three-dimensional multicellular spheroids (e.g., drug sensitivity, junctional complexes, and invasive capabilities) differ from those exhibited in monolayer cell cultures. Multicellular spheroids may offer convenient in vitro experimental models capable of occupying a niche between monolayer cell cultures and in vivo tumors. In the present study, the effects of doxorubicin on human breast cancer cells were investigated ultrastructurally with the aid of spheroids.

**Material and Methods:** We employed the liquid overlay technique of obtaining spheroids. MCF-7 breast cancer cell spheroids were then electron-microscopically examined for the effects of subsequently applied doxorubicin.

**Results:** Tumor cells exhibiting evidence of the apoptotic process were seen in spheroid centers.

**Conclusion:** In this study, in addition to annotating the physiological and pathological changes manifested in the formation of tumors, many of the effects of chemotherapy on tumor cells were elucidated. The spheroid method was determined to be useful in the assessment of treatment efficacy with various chemotherapeutic agents.

**Key Words:** MCF-7 (estrogen receptor related protein p29, human), doxorubicin, microscopy, electron, neoplasms

Uzun zamandır bilim adamları, kanser araştırmalarında tümör hücre serilerini tek tabakalı kültürlerde üreterek sürdürdüler. Bu in vitro hücre modeli, malign büyümenin temel

mekanizmasının anlaşılmasında yardımcı olmuş, ancak in vivo tümör hücre büyümesinin moleküler mekanizmalarını ortaya konmasında yeterli olmamıştır. Bu amaçla, oluşturulan multisellüler tümör sferoid (MTS) model, organizasyon bakımından tek tabakalı hücre kültürü ile in vivo tümör arasında yer alan, in vivo tümör korelasyonu gösteren yüksek bir sistemdir. Sferoid modelde, tümörü oluşturan hücreler tıpkı vücutta büyümekte olan tümör dokusundaki hücreler gibi, fiziksel etmenlerden, kimyasal stresden, oksijenden ve besin

Geliş Tarihi/Received: 13.10.2004

Kabul Tarihi/Accepted: 03.03.2005

**Yazışma Adresi/Correspondence:** Dr. Gülperi ÖKTEM  
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Histoloji ve Embriyoloji AD, İZMİR  
goktem@med.ege.edu.tr

Copyright © 2005 by Türkiye Klinikleri

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2005, 25

337

maddelerinden farklı etkilenirler. Bunun nedeni tümör dokusunun farklı mikro çevreye sahip olmasıdır. Mikro çevrede oluşan bu değişiklikler tümör dokusunda hücrel heterojenite meydana getirmektedirler. Oksijen ve besin kaynaklarının az olduğu alanlarda hücre hasarı ve nekroz daha fazla görülmektedir. Monolayer hücre kültür modelinde ise hücrelerin tamamının oksijen ve besinden eşit şekilde yararlanmaları nedeniyle tümör biyolojisinin aydınlatılmasında pek çok engelin oluşmasına neden olmaktadır.<sup>1</sup>

Kadınlarda en sık görülen kanserler arasında birinci sırada olan meme kanseri ve tedavisi ile ilgili pek çok araştırma yapılmaktadır. Tedavide kullanılan kemoterapi ajanlarından biri olan doksorubisin antrasiklin grubundandır. Sitotoksik etkilerinin majör komponentini topoizomeraz II aktivitesini olumsuz etkileyerek gösterirler. DNA tamiri bozulur ve DNA kırıkları oluşur. Ayrıca DNA baz çiftlerinin arasına girerek DNA replikasyonunun ve RNA transkripsiyonunun bozulmasına neden olurlar. Antrasiklinler, oksijen serbest radikalleri, hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit radikalleri içeren reaktif oksijen partikülleri oluşturarak DNA, mRNA, protein ve lipid hasarı yapar. Oluşan lipid peroksidasyonu bu ilacın kalp kası toksisitesi için karakteristiktir.<sup>2,3</sup>

Sitotoksik ilaçların çoğu tümör içindeki klonojenik hücrelere ulaşabilmek için çeşitli engelleyici hücre tabakalarından geçmekte ve bu yüzden hedef bölge veya oraganelde etkili yoğunlukta birikmemektedir. Bu konuyla ilgili olarak solid tümörlerin antikanser ilaçlara direncine yol açan faktörlerden biri olarak ilaç penetrasyon bariyerleri tanımlanmıştır.<sup>4,5</sup> Solid tümörlerin tüm bu karakteristiklerinin her biri tedavinin sonuçlarını etkileyebilmektedir. Tümör mikro çevre deneysel modelleri antikanser ilaçlarının prelinik değerlendirilmesine katkıda bulunabilmektedir. Multisellüler sferoidler solid tümör karakteristik özelliklerinin çoğunu yakından taklit eder ve deneysel bir modelin kontrollü çevresi içinde ilaç penetrasyon kinetiği ve kemoteropetik ilaçların etkinliğine dair çalışmak üzere değerli bilgiler verir.<sup>6</sup>

Yapılan çalışmalarda, antikanser ilaçlarla tedavide monolayerlara göre sferoidlerin daha fazla

dirençli olduğu ve multisellüler sferoidlerde belirgin ilaç penetrasyon bariyeri bulunduğu, çeşitli antikanser ilaçlar, özellikle de doksorubisin için tanımlanmıştır.<sup>7,8</sup> Ancak ilaç penetrasyon bariyerlerinin tanımlanmasında sferoidlerin kullanılması, kullanılan bileşiklerin doksorubisinde olduğu gibi doğal halde floresan göstermesine ya da radyoaktif olarak işaretlenebilir olmalarıyla sınırlanmıştır. Prelinikal ilaç geliştirme çalışmalarında birçok bileşik bu ihtiyacı karşılamamaktadır ancak yine de ilaç penetrasyonunun değerlendirilmesinde alternatif yolların geliştirilmesine ve değişimin ultrastrüktürel düzeyde incelenmesine ihtiyaç vardır.

## Gereç ve Yöntemler

### Hücre kültürü

Bu çalışmada meme kanseri hücre hattı MCF-7 (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, USA) kullanıldı. "Dimethylsulfoxide (DMSO)" ve trypan blue Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA) firmasından satın alınmıştır. Reaginlerin stok solüsyonları uygun şekilde DMSO ile hazırlandı. RPMI 1640 besi yeri (Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, USA) içine %1 nonesansiyel aminoasit (Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, USA), %1 L-glutamine (Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, USA), 10 000 ünite/mL penisilin (Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, USA), 10 mg/mL streptomisin (Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, USA) ve %10 ısı ile inaktive edilmiş fetal sıgır serumu (Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, USA) eklendi.

### MCF-7 hücrelerinin ikilenme zamanının belirlenmesi:

Deney çift kontrollü olarak planlandı. Altı kuyucuk içeren plaklar kullanıldı. Her kuyucuk içine  $5 \times 10^5$  hücre eklendi ve toplam volüm 2 mL'ye besiyeri ile tamamlandı. Nemlendirilmiş, 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> ortamında inkübe edildi. Sırasıyla 24, 48 ve 72. saatte hücreler tripsinize edilerek kaldırıldı. Hücrelerin canlılığı "trypan blue dye exclusion" testi ile değerlendirildi. Sayım işlemi için her aşamada 100 µL hücre ve aynı miktarda trypan blue (Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, USA)

karıştırıldı. Thoma lamında sayım yapıldı.  $5 \times 10^5$  hücre temel alınarak MCF-7 hücre dizisinin ikilenme zamanı hesaplandı.

### **MCF-7 meme kanseri hücre hattında doksorubisinin sitotoksik etkisinin belirlenmesi**

Deney altı kuyucuklu plaklar kullanılarak yapıldı. Hücreler kuyucuklara konulduktan sonra tabakalaşmasını beklemek için 24 saat inkübe edildi. Yirmi dört saat sonunda doksorubisin ile 1 mg/mL stok solüsyon hazırlandı. Stok solüsyonunun 1/10 dilüsyonları yapılarak ilaç dozları belirlendi. 0.01/0.1/0.5/1.0 µg/mL olacak şekilde gruplara ayrıldı. Medium içerisinde dilüsyonları yapılan ilaç grupları hücrelerle etkileştirildi. Kontrol grubuna ilaç içermeyen medium verildi. Yetmiş iki saatlik inkübasyon sonucunda hücreler trypsinle kaldırıldı. Thoma lamında sayıldı. "Trypan blue dye exclusion" testi kullanılarak sitotoksosite belirlendi. IC<sub>50</sub> değerinin belirlenmesi amacıyla 1/10 dilüsyonlar arasında da dilüsyonlar gerçekleştirildi.

### **Sferoid model**

MTS üretimi için sıvı üst tabaka (liquid overlay) yöntemi kullanıldı.<sup>9</sup> Altı kuyucuklu plakların zemini agarla kaplandı. Bu işlem için bidistile su içinde eritildikten sonra sterilize edilerek hazırlanan %3'lük stok agar solüsyonu ile 1:1 oranında karıştırılmış beslenme medyumunu karışımı kullanıldı. %3'lük agar solüsyonu kaynatıldıktan sonra 60°C'ye kadar soğutuldu ve 40°C'ye kadar ısıtılmış serumlu beslenme medyumunu ile eşit hacimlerde (1:1) dikkatlice karıştırıldı. Bu solüsyondan altı kuyucuklu hücre kültür kaplarındaki her kuyucuğa 1 mL konularak, kuyucuk tabanına yayılması sağlandı. Daha sonra hücre kültür kapları 4°C'de buzdolabında 10 dk. bekletilerek zemindeki agar tabakasının jel halini alması sağlandı. Ardından tek tabakalı hücre kültürlerinden tripsinize edilerek kaldırılan tümör hücreleri 5 mL medyum içerisinde  $1 \times 10^6$  hücre/kuyucuk olacak şekilde süspanse edilerek kuyucuklara ekildi. Haftada 2 kez olmak üzere taze medyum değişimleri yapıldı. Sferoid gelişimleri 10 gün boyunca invert mikroskopta gözlemlendi.

### **İlaç penetrasyon çalışması**

37°C'de %5 CO<sub>2</sub> ortamında hazırlanan

sferoidler kontrol grubu ve ilaç grubu olarak ayrıldı. Deneyler çift kontrollü olarak planlandı. İlaç grubundaki sferoid modelleri üzerine IC<sub>50</sub> değeri belirlenen doksorubisin dozu eklendi. Hücreler belirlenen ikilenme zamanı süresince ilaçla inkübe edildi.

### **Elektronmikroskopik inceleme**

MCF-7 meme kanseri hücre hattından üretilen sferoidler 4°C'de %3 glutraldehitdeki 0.1 M Sodium Cacodylate/HCl buffer'da ph 7.2-7.4'te 2 saat bekletildi. Fiksasyon sonrası 3 defa 20 dk. süresince bidistile su ile yıkandı. Kırk beş dk. %1 osmium tetroksit (OsO<sub>4</sub>)'e kondu. Takibinde %100 etanolde dehidrate edildi ve 30 dk. propilenoksitte bekletildi. Bir gece, oda ısısında, Epon-812 (SPI Chem., Pennsylvania, USA) içinde bırakıldı. Polimerizasyonu takiben mikrotom ile transvers semithin kesitler alındı. Sonrasında kesitler uranil asetat ile boyandı.

### **Bulgular**

#### **MCF-7 hücrelerinin ikilenme zamanının belirlenmesi:**

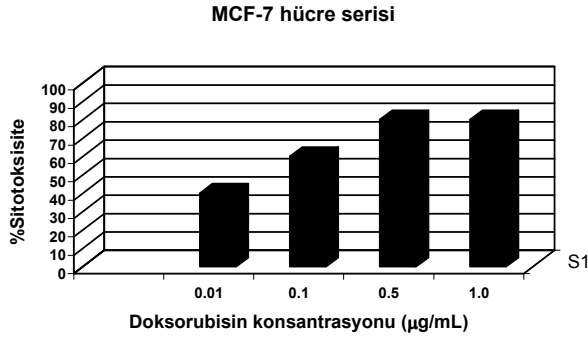
$5 \times 10^5$  hücre temel alınarak MCF-7 hücre dizisinin ikilenme zamanı hesaplandı. RPMI 1640 medium değiştirilmeden tüm hücreler ölünceye kadar sayımlara devam edildi. Hücre sayıları her aşamada saptandı ve başlangıç hücre sayısına göre canlı hücrelerin 2 katına çıktığı zamansal nokta ikilenme zamanı olarak kabul edildi. Deney en az 3 kez tekrarlandı. Üç deneyin ortalamaları alındı. Bu yöntemle MCF-7 hücre dizisinin ikilenme zamanı 72 saat bulundu.

#### **MCF-7 meme kanseri hücre hattında doksorubisin sitotoksik etkisi:**

Doksorubisin 72 saatlik inkübasyonda IC<sub>50</sub> değeri 0.1 µg/mL olarak belirlendi. İlaç dilüsyonları azaldıkça sitotoksitenin arttığı gözlemlendi. 0.5 µg/mL ile 1 µg/mL ilaç konsantrasyonlarında sitotoksiste değerlerinde anlamlı bir değişiklik bulunmadı (Şekil 1).

#### **Doksorubisinin ultrastrüktürel etkileri:**

Kontrol grubu MCF-7 sferoid model görüntülerinde düzgün yüzeyli ve özellikle sferoid dış yüzeyindeki hücrelerde bol miktarda mikrovillus



**Şekil 1.** Doksorubisinin MCF-7 hücre serisi üzerine sitotoksik etkisi ( $IC_{50}=0.1 \mu\text{g/mL}$ ).

içeren hücreler yer almaktaydı. Ayrıca bu hücreler arasında sıkı bağlantı bölgeleri ve desmozomlar belirgin bir şekilde izlendi. Kontrol grubundaki hücrelerde düzgün yüzeyli bir nükleus membranı ve bol miktarda mitokondriler bulunmaktaydı (Resim 1).

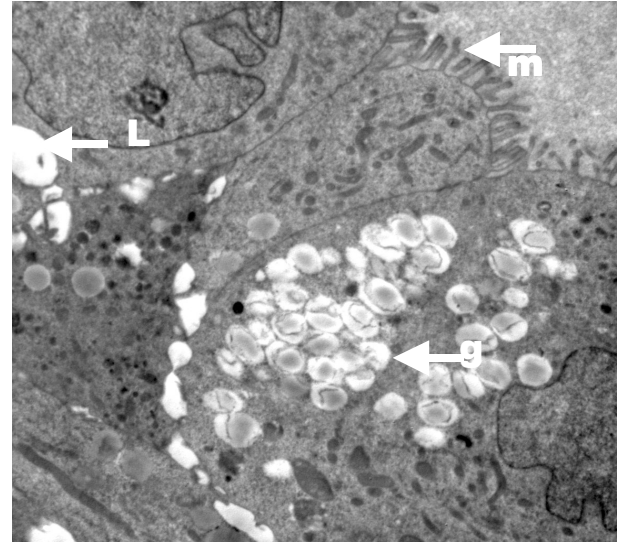
Doksorubisin uygulanan sferoidlerden elde edilen elektronmikroskop görüntülerinde kontrol hücrelerinde nadir olarak görülen intrasitoplazmik lümenin genişliğinde belirgin bir artış olduğu gözlemlendi. Ayrıca sferoid çevresinde yer alan ve beslenme medyumuyla etkileşim içerisinde bulunan hücrelerin dış yüzeylerinde boyları kısalmış ve sayıları azalmış villus yapıları dikkati çekiyordu. Hücrelerin sitoplazmalarında bol miktarda, değişen büyüklükte ve yoğunlukta salgı granülleri saptandı. Apoptotik bir görünümü çağrıştıran nükleus fragmentasyonları yanında derin invaginasyonlar doksorubisin grubunda en sık karşılaştığımız görüntü oldu. Hücreler arası bölgelerdeki desmozom yapılarının sferoid bütünlüğünü korumakta zorlandığı belirlendi (Resim 2).

### Sonuç

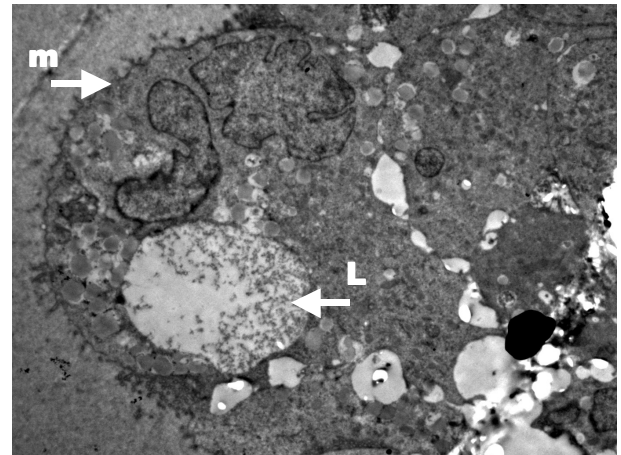
MTS'leri, hücre büyümesinde *in vitro* monolayer kültürler ve deney hayvanlarındaki solid tümörler arasında bir ara grup olarak görülmektedir.<sup>10,11</sup> Bu çalışmanın amacı doksorubisinin meme kanseri hücreleri üzerine etki mekanizmasının ve oluşturduğu elektronmikroskopik değişikliklerin sferoid model üzerinden gösterilmesidir.

Meme kanseri tedavisinde kullanılan önemli bir kemoterapi ajanı olan doksorubisin, ilerlemiş

meme kanseri tedavisinde önerilen “en iyi tekli ajan” olarak bilinmektedir. Ancak kanser araştırmalarının çok önemli bir bölümünü yeni ilaç kombinasyonlarının incelenmesi ve yeni ilaçların denenmesi oluşturmaktadır. İlaçların etki mekanizmaları ve oluşturduğu morfolojik ultrastrüktürel değişikliklerin araştırılması yeni ilaçların sinerjik



**Resim 1.** Kontrol grubu. Düzgün yüzeyli hücreler ve çok sayıda salgı granülü (g) bulunmaktadır. Özellikle sferoid dış yüzeyindeki hücrelerde bol miktarda mikrovillus (m) içeren hücreler izlenmektedir. Bazı hücrelerde izlenebilen intrasitoplazmik lümen küçüktür (L) (x 10.000).



**Resim 2.** Doksorubisin grubu. İntrasitoplazmik lümenin (L) genişliğinde belirgin bir artış vardır. Hücrelerin dış yüzeylerinde boyları kısalmış ve sayıları azalmış villus yapıları (m) gözlenmektedir (x 5000).

veya aditif etkilerinin ortaya konmasında yararlı olacaktır.

Araştırmalar antrasiklin grubu ilaçlardan biri olan doksorubisinin sitotoksitesinin oldukça karmaşık mekanizmalar içerdiğini göstermektedir. Bunlardan ilki, 4 halkalı yapının DNA baz çiftleri arasına yerleşmesidir. İnterkalasyon adı verilen DNA'ya bu bağlanma, DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu bozar. İkinci olarak antrasiklinler DNA'nın tek veya çift ipliklerinde kırılmalara sebep olur. Böylece DNA'nın onarılması mümkün olmaz. Bu olay topoizomera II interkalasyonu ile ilgilidir. Üçüncü mekanizma ise serbest radikallerin oluşması sonucu gelişen DNA kırılmalarıdır.<sup>12</sup> DNA hasarı oluşturarak etkili olan sitotoksik ilaçların mutant olmayan (wild-type, WT) p-53 gen ekspresyonunu arttırdığı ve bu artışı takiben tümör hücrelerinin apoptozise gittikleri bilinmektedir.<sup>13</sup> p-53 geninin apoptozis üzerinde önemli bir etkisi vardır ancak tüm mekanizmalardan yalnız başına sorumlu değildir. Örneğin p-53 geni bulunmayan (p53 knock-out) HL-60 promiyelositer lösemi hücreleri, pek çok kemoterapi ajanına ve radyoterapiye dirençli olduğu halde, deksametazon bu hücrelerde etkin olarak apoptozisi indüklemektedir.<sup>14</sup> Bu da bazı hücrelerde p-53'ten bağımsız apoptozis yollarının bulunduğunu göstermektedir.<sup>15,16</sup> Bu çalışmada doksorubisin uygulanan sferoid hücrelerinde nükleus ve mitokondri membranlarındaki düzensizlik, nükleus içinde iç membrana bitişik DNA yoğunlaşması ve fragmantasyonlar izlenmesi apoptotik sürecin devam ettiğini gösteren bulgulardır. Daha az oranda, nekroz olarak yorumlanan hücresel şişme, membranda yırtılma, kromatinde erime, kayıp bulguları, sferoidin özellikle orta kesimlerinde dikkati çekmiştir. Yapılan başka çalışmalarda da, oluşturulan sferoid modelde 5. haftanın sonunda santral alanda apoptozis/nekrozis merkezi olduğu gözlenmiştir.<sup>17</sup> Bu in vivo tümör histopatolojisiyle de uyumludur.

Klinik çalışmalardaki ilaca dirençli tümör hücreleri kemoterapide önemli bir sorunu oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalar direnç mekanizmasının enerji bağımlı P-glikoprotein pompası ile bağlantılı olduğunu ortaya koymuştur.<sup>18</sup> Nicholson ve ark.nın

yaptığı bir çalışmada MCF-7 ve DLD-1 hücreleri MTS modelde ve tek tabaka hücre kültüründe çoğaltılmış, MTS'deki hücrelerin tek tabaka kültür hücrelerine göre ilaç etkisine daha rezistan olduğu gözlenmiştir.<sup>19</sup>

Antrasiklinlere karşı direnç, ilacın direkt olarak hücre membranlarının yapısını bozması, DNA yapısına girmesi, DNA topoizomera II'yi inhibe etmesi ve serbest oksijen radikallerinin oluşumuna neden olması yoluyla meydana gelmektedir. Pgp, MRP, LRP, topoII'de değişiklik, glutatyon metabolizmasında rol oynayan enzimlerin düzeylerinde değişiklik olması antrasiklin direncinde rol oynamaktadır.<sup>20</sup> Doksorubisin ve verapamilin sferoid tümör modelinde aynı hücre serisinin monolayer kültürlerine göre daha dirençli olduğu gösterilmiştir.<sup>21</sup> Bu dirençte dokunun derinliklerindeki hücre-hücre bağlantılarının etkili olabileceği düşünülmektedir.<sup>22</sup> Bu çalışmada, zayıflamış hücreler arası bağlantı komplekslerinin sferoidin dış yüzündeki hücrelerde daha belirgin olarak göze çarpması, ilaç direncinin hücre-hücre bağlantıları ile ilişkisinin ortaya konmasında etkili olduğunu göstermektedir.

Deney grubunda doksorubisin uygulanan hücrelerde en sık görülen patoloji artmış nükleus fragmantasyonuydu ve bu doksorubisinin kanser hücrelerindeki etki mekanizmasıyla uyumluydu. Bununla birlikte villus yapılarının boyunda ve sayısında değişikliklerde gözlemlendi. Farklı etki mekanizmasıyla kemoterapötik etki gösteren bir ilacın doksorubisinle kombine kullanımı tümör dokusu üzerine etkiyi arttıracaktır. Bağlantı komplekslerini değiştirebilecek ilaçlar bu kombinasyonda etkili olabilecektir. Taxanlar, mikrotübüller ve çözülebilir tubulin arasındaki dengeyi, gerekli kritik tubulin konsantrasyonunu azaltarak değiştirirler. Böylece mikrotübülün gruplaşmasına etki ederler. Normalde mikrotübüllerin dağılmamasını sağlayan, düşük ısı ve ortamdaki kalsiyum düzeyinin yüksek olması durumlarında bile mikrotübüllerin stabilize halde kalmasını sağlayan ilaçlardır. Bu çalışmada tümör oluşumundaki fizyolojik ve patolojik değişikliklerin aydınlatılması yanında, uygulanan kemoterapi ilaçlarının tümör hücresi düzeyindeki etkileri incelendi. Ayrıca tümörün biyolojik davranışının ay-

dınlatılması ve tedavinin farklı ilaçlarla, doğru kullanılmasından faydalanılabilecek uygun bir metot olduğu gösterildi. Bundan önceki çalışmamızda, mikrotübül aktivitesini değiştiren bir anti-kanser ilaç olan Docetaksel'in etkilerinin doksorubisinle karşılaştırılması ve bunun indüklenbilir nitrik oksit sentaz (iNOS) üzerine etkileri monolayer kültürlerde incelenmişti.<sup>23</sup> Bu ilaç kombinasyonunun meme kanseri hücreleri üzerine aditif etkisinin ultrastrüktürel düzeyde multisellüler sferoid modelde incelenmesi bundan sonraki çalışmamızın konusu olacaktır.

### KAYNAKLAR

- Santini MT, Rainaldi G. Three-dimensional spheroid model in tumor biology. *Pathobiology* 1999;67:148-57.
- Harris JR, Lippman ME, Veronesi U, Willet W. Breast cancer. *N Engl J Med* 1992;327:319-28, 473-80.
- Steele GD Jr, Osteen RT, Winchester DP, Murphy GP, Menck HR. Clinical highlights from the National Cancer Data Base: 1994. *CA Cancer J Clin* 1994;44:71-80.
- Henderson IC, Berry D, Demetri G, et al. Improved disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) from the addition of sequential paclitaxel (T) but not from the escalation of doxorubicin (A) dose level in the adjuvant chemotherapy of patients (PTS) with node-positive primary breast cancer (BC). *Proc Am Soc Clin Oncol* 1998;17:101a.
- Kerr DJ, Kaye SB. Diversity of penetration of anti-cancer agents into solid tumours. *Cell Prolif* 1991;24:355-65.
- Sutherland RM, Eddy HA, Bareham B, Reich K, Vanantwerp D. Resistance to adriamycin in multicellular spheroids. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1979;5:1225-30.
- Erlanson M, Daniel-Szolgay E, Carlsson J. Relations between the penetration, binding and average concentration of cytostatic drugs in human tumour spheroids. *Cancer Chemother Pharmacol* 1992;29:343-53.
- Sutherland RM. Cell and environment interactions in tumor microregions: The multicell spheroid model. *Science* 1988;240:177-84.
- Yuhas JM, Li AP, Martinez AO, Ladman AJ. A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. *Cancer Res* 1997;37:3639-43.
- Dangles V, Femenia F, Laine V, et al. Two-and three-dimensional cell structures govern epidermal growth factor survival function in human bladder carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1997;57:3360-4.
- Kunz-Schughart LA, Kreutz M, Knuechel R. Multicellular spheroids: A three-dimensional in vitro culture system to study tumour biology. *Int J Exp Pathol* 1998;79:1-23.
- Aydiner A, Dinçer M, Topuz E. Meme kanseri. In: Topuz E, Aydiner A, Karadeniz AN, eds. *Klinik Onkoloji*. İstanbul: İstanbul Üniv Onkoloji Enstitüsü Yayınları; 2000. p.70-81.
- Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609-19.
- Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, et al. Tumor cell apoptosis induced by p53- dependent and independent pathways. *Nature* 1993;362:849-52.
- Bedi A, Zehnbaue BA, Barber JP, et al. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. *Blood* 1994;83:2038-44.
- Bissonnette RP, Echeverri F, Mahboubi A, Greene DR. Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by Bcl-2. *Nature* 1992;359:554-6.
- Desoize B, Gimonet D, Jardiller JC. Cell culture as spheroids: An approach to multicellular resistance. *Anticancer Res* 1998;18:4147-58.
- Van der Blik AM, Borst P. Multidrug resistance. *Adv Cancer Res* 1989;52:165-203.
- Nicholson KM, Bibby MC, Phillips RM. Influence of drug exposure parameters on the activity of paclitaxel in multicellular spheroids. *Eur J Cancer* 1997;33:1291-8.
- Poddubnaia IV, Manziuk LV, Artamonova EV, Arkad'eva TV, Davidenko IS. Combination of taxotere and doxorubicin in chemotherapy of disseminated breast cancer. *Vopr Onkol* 2001;47:728-30. Russian.
- Sakata K, Kwok TT, Gordon GR, Waleh NS, Sutherland RM. Resistance to verapamil sensitization of multidrug-resistant cells grown as multicellular spheroids. *Int J Cancer* 1994;59:282-6.
- Waleh NS, Gallo J, Grant TD, Murphy BJ, Kramer RH, Sutherland RM. Selective down-regulation of integrin receptors in spheroids of squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1994;54:838-43.
- Oktem G, Karabulut B, Selvi N, et al. Differential effects of doxorubicin and docetaxel on nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in MCF-7 human breast cancer cells. *Oncol Res* 2004;14:381-6.