

MDAH- 2774 over kanser kök hücrelerinde kemoterapi sonrası apoptotik etkilerin incelenmesi

Apoptotic effects of chemotherapy in the MDAH- 2774 ovarian cancer stem cell

Demiray Ş B¹ Ayla Ş² Oltulu F¹ Çavuşoğlu T¹ Akarca Ö¹ Dilsiz Ö Y¹ Ergüven M⁴ Öktem G¹ Bilir A³

¹Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

²Süleymaniye Kadın Doğum Hastanesi, Semiha Şakir Doğumevi, İstanbul, Türkiye

³İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

⁴Yeni Yüzyıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Özet

Amaç: Mortalitesi en yüksek jinekolojik kanser olan over kanserinin tedavisindeki asıl problem nüks ve kemoterapi direncidir. Kanser dokusunda, patogenezisden sorumlu tutulan, artmış büyüme potansiyeline sahip, uzun ömürlü hücre popülasyonu kanser kök hücreleri (KKH) olarak adlandırılırlar. KKH'lerinin kemo-rezistans ve agresif tekrarlayan tümörlerden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Normal kök hücreden farklılaşarak kanser dokusunu oluşturan bu hücreler in-vitro koşullarda Multisellüler Tümör Sferoid Model (MTS) kullanılarak izole edilmektedirler. Bu çalışmada yüksek anti-tümör aktivitesine sahip, deoksitidin analogu Gemcitabine (2'2'-difluorodeoxycytidine, Gemzar®)'nin KKH'leri üzerinde anti-apoptotik etkileri incelenmiştir.

Yöntem ve Gereç: MDAH-2774 insan over kanseri hücre hattından üç boyutlu hücre kültürü ile KKH izolasyonu yapılmış ve sferoidler Gemcitabine ile etkileştirilmiştir. 24. ve 96. saatlerde ilaçla etkileşen hücrelerdeki apoptotik değişiklikler p53, bcl-2, caspase-3 immunoreaktivitesiyle değerlendirilmiştir.

Bulgular: p53 immunoreaktivitesi açısından Gemcitabine uygulanan grupta 24. ve 96. saatlerde artış görülmektedir. 24. saatlerde Gemcitabine uygulanan grupta bcl-2 immunoreaktivitesi azalmışken, 96. saatte 24. saate oranla bcl-2 belirgin artmıştır. Caspase-3 immunoreaktivitesi 24/96 saat arasında her iki grupta azalırken, 96. saatte Gemcitabine grubunda caspase-3'te azalma görülmüştür.

Sonuç: p53 immunoreaktivitesinde artış ile bcl-2'deki azalma ilaç etkinliğinin bu apoptotik yolları kullanarak gerçekleştiğini düşündürürken, caspase-3'de beklenen artışın olmaması caspase yolağının kullanılmadığını düşündürmektedir. Bugüne kadar ilaç duyarlılık testleri ve KKH üzerine etki mekanizmaları araştırma deneyleri tek tabaka hücre kültürleri ile değerlendirilmiştir. Bu araştırmaların KKH izolasyon tekniği kullanılarak değerlendirilmesi uygun olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Gemcitabine, apoptozis, over kanseri, kanser kök hücresi.

Summary

Aim: A major problem in the treatment of ovarian cancer, which has the highest mortality rates among gynecological malignancies, is recurrence and chemoresistance. In the cancer tissue, this population of long-lived cells with extraordinary expansion potential has been called tumor initiating cells or cancer stem cells (CSCs). It is thought that CSCs are responsible for these aggressive and recurrent tumors. These cells that differentiate from normal stem cells and form tumor tissue are isolated in-vitro via the Multicellular Tumor Spheroid Model. In this study, Gemcitabine (2'2'-difluorodeoxycytidine, Gemzar®), which is a deoxycytidine analog with excellent antitumor activity has been used for its anti-apoptotic effects..

Yazışma Adresi: Şirin BAKTI DEMİRAY

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İZMİR

Makalenin Geliş Tarihi: 19.09.2010 Kabul Tarihi:16.12.2010

Material and Methods: CSC isolation was been performed in-vitro three dimensional cell cultures from MDAH-2774 ovarian CSC line and acts of Gemcitabine were determined. CSCs treated at 24th and 96th hours were analyzed for apoptotic alterations with p-53, bcl-2, and caspase-3 immunoreactivity.

Results: For the Gemcitabine group, p53 immunoreactivity increased at 24th and 96th hours and bcl-2 decreased at the 24th hour while an apparent increase was determined at 96th hours. Caspase-3 decreased for both groups at 24/96 hours while caspase-3 revealed decrease at 96th hours.

Conclusion: Increase in p53 immunoreactivity as well as decrease in bcl-2 display that drug activity is through these pathways while caspase-3 pathway is not active. Therefore, the expected increase could not be assessed. Until now, drug sensitivity tests and effects on CSCs have been evaluated with monolayer cell culture systems. It is appropriate to evaluate these studies with CSCs isolation technique.

Key Words: Gemcitabine, apoptosis, ovarian cancer, cancer stem cell.

Giriş

Over kanseri, kadınlarda jinekolojik maligniteye bağlı ölüm nedenleri arasında başta gelen nedendir ve ileri evre over kanserinde genel sağkalım oranları kötüdür (1). Kemoterapi ve radyoterapi gibi konvansiyonel tedaviler, kanser hücresi ile sağlıklı hücre arasında ayırım yapamamakta ve sonuç olarak sağlıklı hücrelerde bu tedavilere bağlı olarak hasar oluşmaktadır. Yeni gelişmeler, normal hücreler ile malign hücreler arasında, farklı olan çok sayıda moleküler hedefi açığa çıkarmıştır. Bu hedefler; hücre siklus düzenleyicileri, büyüme faktör reseptörleri, sinyal iletim yolları, ilaç direncine neden olan moleküller ve anjiogenezis ile ilgili mekanizmalardır (2). Tedavide yaşanan en büyük problem nüks ve kemoterapi direncidir (3). Gemcitabine, deoksitidin nükleozid analogu olup, benzersiz etki mekanizması, olumlu yan etkilerinin olması gibi özellikleri nedeniyle aralarında over kanserinin de bulunduğu birçok farklı kanser tipinde tek başına veya diğer ilaçlarla birlikte kullanılmasının etkinliği test edilmiştir. Uygulanma sonrasında hafif derecelerde kemik iliği baskılanması ve transaminazlarda artışın yanı sıra, soğuk algınlığı benzeri durum en sık görülen toksik etkileridir (4). Platinum-rezistan over kanserlerinde; topotecan, lipozomal doksorubisin ve Gemcitabine içeren monoterapiler alternatif seçenekler olarak tedavideki yerini almıştır (5). Pek çok memeli hücresi tutunmayı önleyici çevrede ya da süspansiyon halinde kültüre edildiklerinde 3 boyutlu multisellüler sferoidlere farklılaşabilir. Klasik tek tabakalı kültürlerle kıyaslandıklarında multisellüler sferoidler yapısal ve fonksiyonel özellikleri bakımından gerçek dokulara çok benzemektedir. Transformasyon hücreleri tarafından oluşturulan multisellüler sferoidler metastaz ve invazyon çalışmalarında ve tedaviye yanıtın incelenmesi için damarsız tümör modelleri şeklinde yaygın olarak kullanılmaktadır (6). KKH'leri; embriyolojik kök hücrelerde de olduğu gibi kendini yenileme, asimmetrik ve

simetrik hücre bölünmesi özelliklerine sahip olmaları nedeniyle "Kanser Başlangıç Hücreleri" (KBH) olarak adlandırılırlar. KBH'lerinin çok küçük bir bölümü normal kök hücre fenotipik özelliklerine sahiptir ve asimmetrik bölünme yeteneğindedir. Çoğalan hücrelerin bazıları değişikliğe uğramadan KKH özelliklerini sürdürür (7, 8). Bu çalışmada MDAH 2774 insan over kanseri hücre hattında üç boyutlu hücre kültürü ile kanser kök hücresi izolasyonu yapılarak elde edilecek sferoidler üzerinde Gemcitabinin apoptotik etkilerinin p53, bcl-2, caspase-3 immünüreaktivitesi üzerinden analiz edilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Hücre kültürü koşulları ve kullanılan ilaçlar

Bu çalışmada Amerikan Hayvan Hücre Kültür Koleksiyonu (ATCC) hücre bankasından sağlanan MDAH-2774 (CRL no: 10303) hücre soyu kullanıldı.

Sferoid model ve doku takibi

Üç boyutlu kültür modelinde, her bir grup için agarla kaplanmış 6 kuyucuklu kültür kaplarının her bir kuyucuğuna 5 ml medyum içerisinde 1.000.000 canlı MDAH-2774 hücresi ekildi. Hücreler rutin bakımları yapılmak kaydıyla nemli %5 CO₂ hava karışımı ortamda 37° C'de 7 gün süreyle sferoid oluşumu için bekletildi. Deneysel grubu sferoidlerine etkin dozlarda ilaçlar uygulanırken kontrol grubu sferoidlerine ise herhangi bir ilaç uygulaması yapılmadı. 24 ve 96. saatlerin sonunda gruplardaki sferoidler %10 paraformaldehitte (Sigma Chemical Co, St. Louis, Missouri, U.S.A.) tespit edildi. Rutin doku takip işlemlerinden sonra parafinde bloklandı.

İmmunohistokimyasal analiz

Dokular 24 saat boyunca 4°C'de paraformaldehitte fikse edildi ve daha sonra rutin protokollere göre parafine gömme işlemi yapıldı. Mikrotom (Leica MR 2145, Heerbrugg, Switzerland); kullanılarak 5 mikrometre

kalınlığında kesitler alındı. Rutin protokole uygun olarak etanol serilerinden geçirildi ve immunohistokimyasal analiz için hazır hale getirildi. Dokulara önce distile su ardından 10 dakika fosfat tamponlu salin (PBS) uygulandı. Sonrasında 50 mM Tris buffer (pH 7,5) içerisindeki % 2 tripsinde (Sigma chemical Co. St. Lois, Missouri, USA) 37°C'de 15 dakika bekletildi. Kesitlerin çevresi Dako pen (Dako, Glostrup, Denmark) ile çizilerek görünür hale getirildi ve %3 H₂O₂ solüsyonunda 15 dakika endojen peroksidaz aktivitesi için bekletildi. Kesitler primer antikorlar ile inkübe edildi. p53 (1:100, Lab Vision), bcl-2 (1:50, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA), caspase-3 (1:100, Invitrogen) antikorları kullanıldı. Kesitler Biotinli sekonder antikorla ve Streptavidin konjuge horseradish peroxidase (her ikisi de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) ile en az 30 dakika inkübe edildi. Son olarak Diaminobenzidine (DAB) (DeadEnd Colorimetric TUNEL system, Promega, Madison, USA) eklendi ve 5 dakika kadar beklenerek immunohistokimyasal işaretlenmesi sağlandı. Bütün dilüsyonlar ve yıkama basamaklarında PBS kullanıldı. Kesitlere Mayer hematoksilen (Zymed Laboratories, U.S.A.) ile zıt boyama yapıldı. Sudan geçirildikten sonra etanol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Ksilol ile temizlenerek entellan (Merck) ile kapatıldı.

Negatif kontrol örnekleri için primer antikor uygulanmaksızın ve yerine PBS uygulanarak tüm aşamalardan geçirildi. Pozitif kontroller ilgili markerlar için pozitif olan nöroblastoma örnek kesitleri ile boyanarak gösterildi.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler Student's *t*-test kullanılarak yapılmıştır.

İmmunohistokimyasal olarak değerlendirilen p53, bcl-2 ve caspase-3 ekspresyon düzeyleri semikantitatif olarak HSCORE ile değerlendirildi.

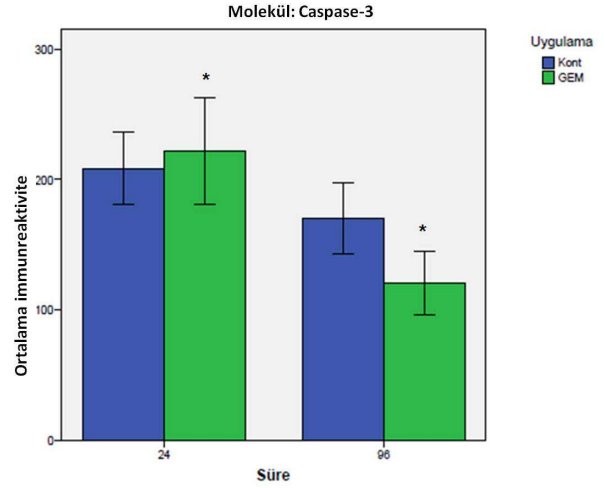
Buna göre, intensite skoru "i" ile gösterilmiş olup, her bir mikroskop alanında işaretlenme düzeyi 1, 2 veya 3 (sırasıyla zayıf, orta veya güçlü) olarak derecelendirilmiş ve her bir intensitede işaretlenen hücrelerin dağılım yüzdesi %0 dan %100'e kadar belirlenerek formülde "Pi" ile belirtilmiştir. HSCORE= $\sum Pi (i+1)$ formülü kullanılmıştır.

Bulgular

Gemcitabine bağlı caspase-3 ekspresyonu

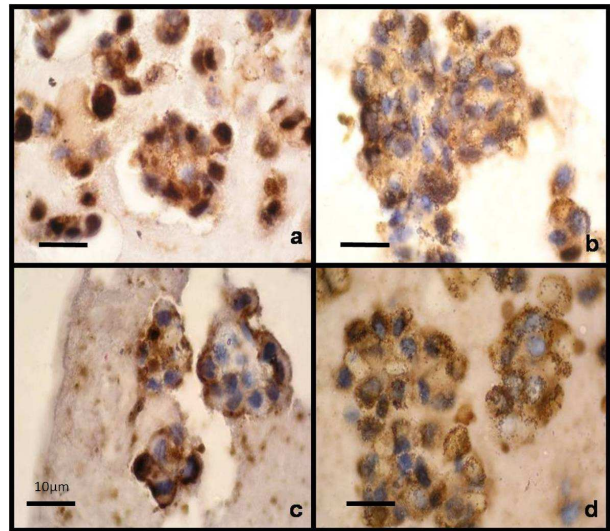
Gemcitabine 24 ve 96 saat sürelerle MDAH-2774 sferoidleri ile etkileştirilmiş ve yapılan immunohistokimyasal analizde 96. saat Gemcitabine uygulanan grupta 24. saate oranla belirgin azalma görülmüştür ($p < 0.05$)

(Tablo-1). Caspase-3 immunoreaktivitesi 96. saatte Gemcitabine uygulanan grupta kontrol grubuna oranla belirgin azalmıştır ($p < 0.05$) (Şekil-1).



Tablo 1. MDAH 2774 hücre hattının 24 ve 96. saatlerde uygulanan Gemcitabine'e bağlı caspase-3 immunreaktivitesinin karşılaştırılması.

24-96 saatler arasında Gemcitabine uygulanan grupta Caspase-3 immünoreaktivitesindeki azalış asteriks (*, $P < 0,05$) ile ifade edilmiştir.

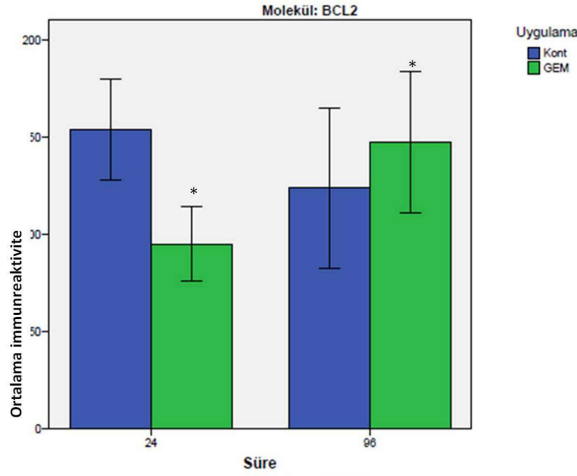


Şekil 1. MDAH 2774 hücre hattının 24 ve 96. saatlerde caspase-3 ile immunohistokimyasal olarak incelenmesi (Orijinal büyütme X40.)

a) Kontrol grubu 24. saat caspase-3 immunoreaktivitesi b) Gemcitabine uygulanan grup 24. saat caspase-3 immunoreaktivitesi c) Kontrol grubu 96. saat caspase-3 immunoreaktivitesi d) Gemcitabine uygulanan grup 96. saat caspase-3 immunoreaktivitesi.

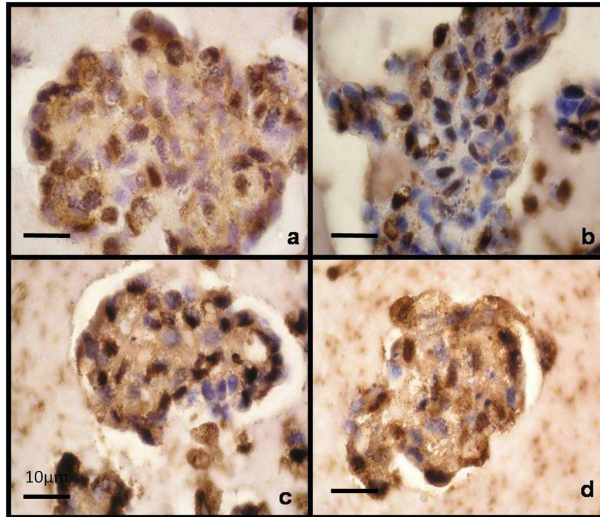
Gemcitabine bağılı bcl-2 ekspresyonu

Gemcitabine 24 ve 96 saat sürelerle MDAH-2774 sferoidleri ile etkileştirilmiş ve yapılan immunohistokimyasal analizde 24. saatte bcl-2 immunoreaktivitesinin Gemcitabine uygulanan grupta kontrol grubuna oranla azaldığı görülmüştür ($p<0.05$) (Tablo-2). Gemcitabine uygulanan grupta 96. saatte 24. saate oranla belirgin şekilde arttığı görülmüştür ($p<0.05$) (Şekil-2).



Tablo-2: MDAH 2774 hücre hattının 24 ve 96. saatlerde uygulanan Gemcitabine'e bağılı Bcl-2 immunreaktivitesinin karşılaştırılması.

24-96 saatler arasında Gemcitabine uygulanan grupta Bcl-2 immünoreaktivitesindeki artış asteriks (*, $P<0,05$) ile ifade edilmiştir.

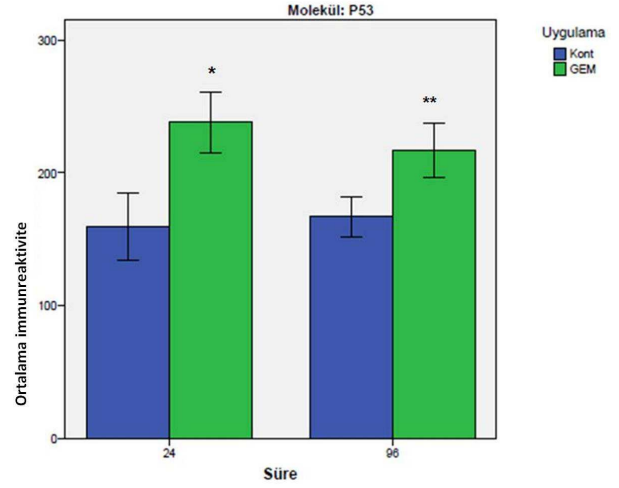


Şekil 2. MDAH 2774 hücre hattının 24 ve 96. saatlerde bcl-2 ile immunohistokimyasal olarak incelenmesi. (Orijinal büyütme X40.)

a) Kontrol grubu 24. saat bcl-2 immunoreaktivitesi b) Gemcitabine uygulanan grup 24.saat bcl-2 immunoreaktivitesi c) Kontrol grubu 96. saat bcl-2 immunoreaktivitesi d) Gemcitabine uygulanan grup 96. saat bcl-2 immunoreaktivitesi

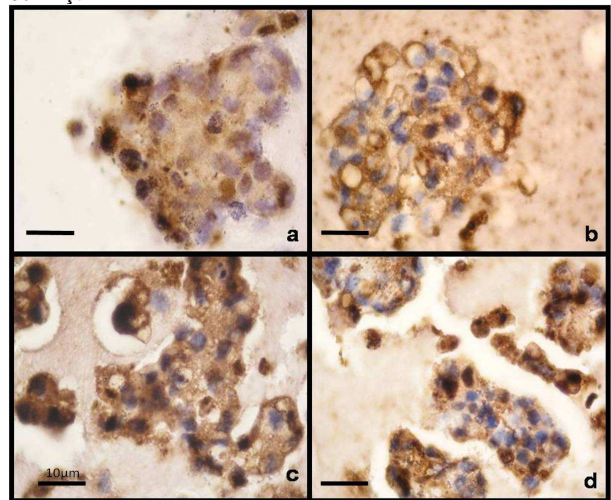
Gemcitabine'e bağılı p53 immunoreaktivitesi

Gemcitabine 24 ve 96 saat sürelerle MDAH-2774 sferoidleri ile etkileştirilmiş ve yapılan immunohistokimyasal analizde 24 saat ve 96 saat inkübasyon sonunda kontrol grubuna oranla belirgin olarak artmış p53 immunoreaktivitesinin bulunduğu gösterilmiştir ($p<0.05$) (Tablo-3), (Şekil-3).



Tablo-3: MDAH 2774 hücre hattının 24 ve 96. saatlerde uygulanan Gemcitabine'e bağılı p53 immunreaktivitesinin karşılaştırılması.

24. saatte Gemcitabine uygulanan grupta kontrol grubuna oranla artmış p53 immünoreaktivitesindeki artış asteriks (*, $P<0,05$) ile ifade edilmiştir. 96. saatte Gemcitabine uygulanan grupta kontrol grubuna oranla artmış p53 immünoreaktivitesindeki artış asteriks (**, $P<0,05$) ile ifade edilmiştir.



Şekil 3. MDAH 2774 hücre hattının 24 ve 96. saatlerde p53 ile immunohistokimyasal olarak incelenmesi. (Orijinal büyütme X40.)

a) Kontrol grubu 24. saat p53 immunoreaktivitesi b) Gemcitabine uygulanan grup 24.saat p53 immunoreaktivitesi c) Kontrol grubu 96. saat p53 immunoreaktivitesi d) Gemcitabine uygulanan grup 96. saat p53 immunoreaktivitesi

Sonuç

Over kanseri “kanseri kök hücrelerinde” p53'e bağlı apoptotik aktivite etkin olabilir. Diğer yolları aktive edebilecek ilaçlarla kombine tedavi protokolleri denenmelidir. Bugüne kadar ilaç duyarlılık testleri ve ilaçların kanser hücreleri üzerine etki mekanizması araştırma deneyleri tek tabaka hücre kültürleri ile değerlendirilmiştir. Bu tip araştırmaların KKH izolasyon tekniği kullanılarak değerlendirilmesi uygun olabilir.

Tartışma

Gemcitabine'nin tümör karşıtı etkisinin hangi apoptotik yollar üzerinden olabileceğine dair literatür bilgisi sınırlıdır. Bu çalışmada KKH üzerine Gemcitabine'nin olası apoptotik etkilerinin, p53, bcl-2 yolları kullanılarak gerçekleştirilebileceği ortaya konulmuştur. Gemcitabine birçok solid tümör için mükemmel tümör karşıtı aktiviteleri olan bir deoksitidin analogudur. Gemcitabine deoksitidin kinaz ya da diğer kinazlar ile trifosfat analogu olan Gemcitabine trifosfata aktiflendikten sonra DNA ve RNA yapısına katılarak etkilerini oluşturabilmektedir (9).

DNA onarımının inhibisyonu üzerinden gösterdiği etkileri ile birçok faz I araştırmada çeşitli kombine rejimlerde kendine yer bulmuş olan Gemcitabine'in belirgin tümör karşıtı etkileri mesane, meme, over, pankreas ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde tanımlanmıştır (10). Bütün bu başarılı etkilerinin yanı sıra kemoterapi rejimlerindeki başarılı etkileri klinik düzelmelerin yanı sıra toksisitesinin de hafif myelosupresyonla sınırlı oluşu ile oldukça düşük düzeydedir. Apoptozu tetikleyen hem fizyolojik hem de patolojik birçok çeşitli uyaran ve durum olmasına rağmen, bütün hücreler aynı uyaranlara ölümle yanıt vermezler. Bu çalışmada caspase-3 immunoreaktivitesi 96. saat Gemcitabine uygulanan grupta 24. saate oranla, 96. saatte Gemcitabine uygulanan grupta kontrol grubuna oranla azalmıştır.

Caspase-3 ekspresyonu Winter RN ve ark. (2001) yaptıkları çalışmada normal prostat ve iyi differensiyel prostat adenokarsinomlarına kıyasla orta ve kötü differensiyel prostat tümörlerinde de azalmış bulunmuştur (11). Buna göre çalışmamızda ya caspase-3 yolağı kullanılmadığı için ya da kullanılan hücre hatları az ya da orta derecede differensiyel hücre popülasyonlarından olduğundan ekspresyonlarda azalma saptanmış olabilir. İleri moleküler araştırmalar ile bu durum belirlenebilir.

Kanser kemoterapisi için kullanılan ışınlama ya da ilaçlar bazı hücrelerde p53 bağımlı yollar aracılığıyla apoptotik ölüme neden olabilen DNA zararıyla sonuçlanırlar (12). Bu çalışmada bcl-2 immunohistokim-

yasal analizde 24. saatte bcl-2 immunoreaktivitesinin Gemcitabine uygulanan grupta kontrol grubuna oranla azalması ve 96. saatte 24. saate oranla belirgin şekilde artışı ilacın 24. saatte etkinliği mevcutken; ilerleyen saatlerde etkinliğinde düşme olarak düşünülebilir. Buna göre kombine rejimlerin denenmesi uygun olacağı fikrini akla getirmektedir. Apoptotik mitokondrial olayların kontrol ve regulasyonu bcl-2 protein ailesinin üyeleri aracılığıyla olur (13). Yapılan bu çalışmada Gemcitabine uygulanan grupta 24. saatte ve 96. saatte p53 immunoreaktivite artışı ilaç etkinliğinin olduğunu ve apoptoz yönünde gidişin olduğunu düşündürebilir. Tümör supresor proteini p53, bcl-2 protein ailesinin düzenlenmesinde kritik bir role sahiptir, ancak bu mekanizma tam olarak açıklanamamıştır (14). Bcl-2 protein ailesi mitokondrial zar geçirgenliğini kontrol eder ve hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik olabilir. Şimdiye kadar bcl-2 ailesinde toplam 25 gen tanımlanmıştır. Anti-apoptotik proteinler arasında bcl-2, bcl-x, bcl-XL, bcl-XS, bcl-w, BAG yer alırken pro-apoptotik proteinler arasında da bcl-10, bax, bak, bid, bad, bim, bik ve blk yer almaktadır. Bütün bu sayılan proteinler hücrenin apoptozise gideceğini ya da bu süreçten kaçacağını belirlemeleri bakımından son derece önemlidirler. Bcl-2 ailesi proteinlerin temel etki mekanizmasının mitokondrial membran permeabilitesini değiştirerek mitokondrilerden sitokrom c salınımını engelleyici rolleri ile düzenleyici oldukları sanılmaktadır. Caspase'lar apoptotik süreçte rol oynayan önemli mediatörlerdir. Caspase-3 en önemli caspase'dır ve (caspase 8,9 ya da 10 gibi) öncü caspase'lar tarafından aktive edilir. Caspase-3 özellikle endonükleaz CAD'i aktive eder. Prolifere olan hücrelerde CAD inhibitör molekülü olan ICAD ile bileşik oluşturur. Apoptotik hücrelerde aktive olan caspase-3 ICAD molekülünü parçalayarak CAD'yi serbest bırakmaktadır (15). Kemoterapi direnci apoptozis mekanizmalarındaki bir azalma ile ilişkili olarak ortaya çıkmış olabilir (16). Anti apoptotik bir protein olan bcl-2 nin varlığı ve onun proapoptotik ilişkili eşi bax kemoterapi, radyasyon ve benzeri DNA hasarlayıcı rejimlerden sonra hücre yaşayabilirliğin önemli bir belirleyicisidir (17, 18).

Önceki kanserleşme modellerinde hücrelerin önlenemeyen büyümesinin bir seri genetik kazanım sonunda olduğu ve bu genetik aktivasyonların hücrelerin çoğalma potansiyellerinin artması, hücre çoğalmasını inhibe eden genlerin sessizleşmesi ve programlı hücre ölümüne ait genlerin 'bypass' edilmesi şeklinde ortaya çıktığı düşünülmüştür. KKH kavramı, tümör biyolojisindeki normal kök hücre/projenitör hücre yakınlığı ve buna bağlı olarak organlarda görülen “Kendini yenileyebilme

potansiyeli" ile kanser hücrelerinde görülen "Süregelen proliferasyonlar" arasındaki benzerliklerin gözlenmesiyle ortaya çıkmıştır (19, 20, 21). Primer olarak kemoterapötik tedavinin başlangıçtaki bütün etkinliğine rağmen ileri evreli over kanserlerinin çoğu tanıdan sonra aylar ile yıllar içinde tekrarlamaktadır. Hastalığın nüks nedeni bilinmemekle beraber kemoterapi sırasında direnç kazanan kanser başlatıcı hücrelerinin nüksten sorumlu olabileceği ve yeniden büyüme yönünde tetiklenene kadar nişler içinde sessiz kalmış olabilecekleri düşünülmektedir (22). Bu çalışmada teknik olarak seçtiğimiz MTS hücre kültürü modeli; tek tabaka hücre kültürü modelinden yararlanılarak oluşturulmuş, üç boyutlu hücre kültürüdür. Ancak tek tabakalı kültür ortamında oksijen ve besinler kanser hücrelerine eşit oranda ulaşmakta ve hücreler bu koşullar altında iki boyutlu bir büyüme göstermekteyken; vücutta kitle oluşturan solid tümörler üç boyutlu konumda büyümektedir. Bu durum tümörlerin kompartmanları arasında oksijen, besin ve büyüme faktörleri dağılımının eşit olmamasına yol açmakta ve hücreler farklı düzeylerde fiziksel ve kimyasal streslerle karşılaşmaktadır. Oksijenlenmenin düşük olduğu bölümlerde hücre hasarı ve hatta nekroz kendiliğinden gelişebilmektedir. Tek tabakalı hücre kültür modelinin tersine hücre sel yanıtının gelişmesinde önemli rol oynadığı düşünülen hücreler arası iletişim ve moleküler etkileşim üç boyutlu yapıda gerçekleşmektedir (23). Son yıllarda yapılan

çalışmalar MTS'nin kanserin yayılmasında mikro-metastaz modeli olarak kabul edilebileceğini ortaya koymuştur. MTS'yi oluşturan hücrelere ait transmembran proteinleri ve hücre-hücre adezyon molekülleri tek tabakalı kültürlerle göre farklılıklar göstermektedir (24).

Kanser tedavisinde yaşanan en önemli problem kullanılan konvansiyonel tedavilerin normal ve malign hücreler arasındaki ayrımı tam olarak yapamaması, rekürrens ve kemoterapi direncinin kırılmamasıdır. Bu problemlerin normal ve malign hücrelerde farklı olan çok sayıdaki hücre siklus düzenleyicileri, sinyal ileti yolları, anjiogeneziste etki eden mekanizmalar, büyüme faktör reseptörleri ve ilaç rezistansına neden olan moleküllerden kaynaklandığı düşünülmüş bunların araştırılması için farklı kültür modelleri üzerinde ilaç araştırmaları yapılmıştır. Günümüzde üç boyutlu hücre kültürleri, özellikleri bakımından gerçek solid tümörler ile tek tabaka hücre kültürleri arasında yer aldığı düşünülmektedir. Organizasyon bakımından tek tabakalı hücre kültürü ile *in-vivo* tümör arasında yer alan multiselüler tümör sferoid modeli *in-vivo* tümör ilişkisi yüksek bir sistem olarak kanser araştırmalarında kullanılmaya başlanmıştır. Tümör büyümesi üzerine çeşitli faktörlerin etkisini değerlendirmede iki boyutlu kültürler yerine üç boyutlu kültürlerin kullanılması son yıllarda tercih edilmektedir (3, 6, 22). Bu çalışma, MTS'lerinin farklı bir bakış açısı ile kanser araştırmalarında kullanılabilirliğini ortaya koymuştur.

Kaynaklar

1. Hu L, McArthur C, Jaffe RB. Ovarian cancer stem-like side-population cells are tumorigenic and chemoresistant. *Br J Cancer*. 2010 Apr 13;102(8):1276-83. Epub 2010 Mar 30.
2. Güngör M, Kahraman K. Epitelyal Over Kanserinde Targeted Tedavi. *Türkiye Klinikleri J Surg Med Sci* 2007, 3(31):63-9.
3. Shield K, Ackland ML, Ahmed N, Rice GE. Multicellular spheroids in ovarian cancer metastases: Biology and pathology. *Gynecol Oncol*. 2009 Apr;113(1):143-8. Epub 2009 Jan 10.
4. Xenidis N, Neanidis K, Amarantidis K, Dimopoulos P, Chamalidou E, Pitsiava D, Tentis A, Chatzaki E, Karakitsos P, Kakolyris S. Biweekly vinorelbine and Gemcitabine as second-line and beyond treatment in ovarian cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010 Mar 11.
5. Joly F, Petit T, Pautier P, Guardiola E, Mayer F, Chevalier-Place A, Delva R, Sevin E, Henry-Amar M, Bourgeois H. Weekly combination of topotecan and Gemcitabine in early recurrent ovarian cancer patients: a French multicenter phase II study. *Gynecol Oncol*. 2009 Dec;115(3):382-8. Epub 2009 Sep 20.
6. Lin RZ, Chang HY. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J*. 2008 Oct;3(9-10):1172-84.
7. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007; 445:106-10.
8. Neuzil J, Stantic M, Zabolova R, Chladova J, Wang X, Prochazka L, et al. Tumour-initiating cells vs cancer "stem" cells and CD133: what's in the name? *Biochem Biophys Res Commun* 2007;355:855-9.
9. Crino L et al (2001) Gemcitabine in advanced pancreatic cancer: a phase II trial. *Am J Clin Oncol* 24:296-298.
10. Van Moorsel CJ et al. Gemcitabine: future prospects of single-agent and combination studies. *Oncologist*. 1997; 2:127-134.

11. Winter RN, Kramer A, Borkowski A, Kyprianou N. Loss of Caspase-1 and Caspase-3 Protein Expression in Human Prostate Cancer. *Cancer Res* February 2, 2001 *61*; 1227.
12. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;*35*(4):495-516.
13. Cory S and Adams, J. M. The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.* 2002; *2*: 647–56.
14. Schuler M and Green D R. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans .* 2001: *29*; 684–8.
15. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature.* 1998 Jan 1;*391*(6662):96-9.
16. Sartorius UA, Krammer PH. Upregulation of Bcl-2 is involved in the mediation of chemotherapy resistance in human small cell lung cancer cell lines. *Int J Cancer.* 2002 Feb 10;*97*(5):584-92.
17. Zimmermann KC, Green DR. How cells die: apoptosis pathways. *J Allergy Clin Immunol.* 2001 Oct;*108*(4 Suppl):S99-103.
18. Korsmeyer SJ, Shutter JR, Veis DJ, Merry DE, Oltvai ZN. Bcl-2/Bax: a rheostat that regulates an anti-oxidant pathway and cell death. *Semin Cancer Biol.* 1993 Dec;*4*(6):327-32.
19. Heppner GH. Tumor heterogeneity. *Cancer Res* 1984; *44*: 2259–2265.
20. Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea—a paradigm shift. *Cancer Res* 2006; *66*: 1883–1890.
21. Hill RP. Identifying cancer stem cells in solid tumors: case not proven. *Cancer Res* 2006; *66*: 1891–1895.
22. Oktem G, Bilir A, Ayla S, Yavasoglu A, Goksel G, Saydam G, Uysal A. "Role of intercellular communications in breast cancer multicellular tumor spheroids after chemotherapy." *Oncology Res.* 2007,*16*(5), 225-233
23. Oktem G, Bilir A, Selvi N, Yurtseven ME, Vatansever S, Ates U, Uysal A, Omay SB., "Chemotherapy influences inducible nitric oxide synthase (iNOS) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity on 3D breast cancer cell line.", *Oncology Res.* 2006, *16*(4), 195-203.
24. Murphy SK. Targeting ovarian cancer-initiating cells. *Anticancer Agents Med Chem.* 2010 Feb;*10*(2):157-63.