

## BÖLÜM 3

# KANSER ARAŞTIRMALARINDA ÜÇ BOYUTLU DOKU KÜLTÜR SİSTEMLERİNİN ÖNEMİ

Özge ŞÜKRÜOĞLU ERDOĞAN<sup>1</sup>

Canlıların kullanılmasının mümkün olmadığı pek çok bilimsel alanda gereklilik olarak hücre kültür sistemleri geliştirilmiştir. Kanser araştırmalarının önem taşıdığı ve kanser ilaçlarının geliştirildiği çalışmaların arttığı günümüzde hücre kültürleri daha da önemli hale gelmiştir [1].

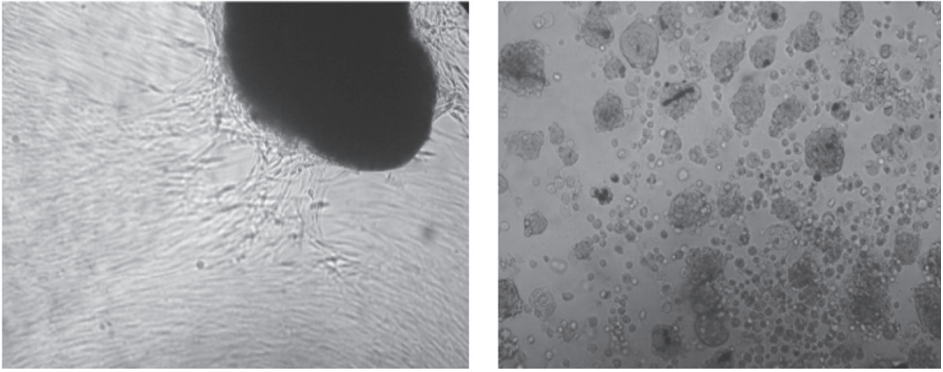
Tüm hücreler kültür kabına ilk koyulduklarında yuvarlak şekillidirler ve daha sonra kültür kabının yüzeyine tutunurlar. Hücre kültür kabına yapışan hücrelerin oluşturduğu bu tek katlı hücre tabakası “*tek tabaka (monolayer)*” olarak adlandırılmaktadır [2] Kanser hücrelerinin kullanıldığı monolayer hücre kültürlerinde oksijen ve besinler hücrelere eşit oranda dağılmakta ve bu durumda yüzeyde hücrelerin iki boyutlu büyüdüğü gözlenmektedir. Solid tümörler ise uzaysal bir konumda büyümekte ve bu durumda tümör hücreleri arasında oksijen ve besin dağılımı ne yazık ki eşit oranda olmamaktadır. Tümörü oluşturan hücreler, tıpkı vücutta var olan ve canlılıklarını sürdürmekte olan normal hücreler gibi fiziksel etkenlerden, kimyasal stresten, besin maddelerinden ve oksijenden farklı etkilenmektedirler [3]. Mikroçevrede oluşan bu değişiklikler tümör dokusunda hücrenel heterojenite meydana getirmektedir [3]. Besin ve oksijenin yetersiz olduğu durumlarda sıklıkla hücre hasarı ve nekroz oluşmaktadır. Tek tabaka hücre kültür ortamında büyütülen tümör hücrelerinin tamamı, besin ve oksijenden eşit şekilde yararlanmaları nedeniyle, ne yazık ki gerçek anlamda tümör karakteristiklerini tam olarak ortaya koyamamaktadır.

Günümüzde üç boyutlu doku kültür (3D) sistemleri, biyobelirteç ve hedefe yönelik tedavilere sağladığı katkılarla kanser biyolojisine yeni bir bakış açısı getirmiştir [3]. Normal bir dokunun büyüme ve canlılığının korunması, büyüme faktörleri, hormonlar, adezyon molekülleri ve ekstrasellüler matriksten oluşan bir mikroçevre ile hücrelerarası etkileşime bağlıdır. Üç boyutlu doku kültür sistemleri doku homeostazı, hücrenel farklılaşma, doku organizasyonu gibi durumların

<sup>1</sup> Dr. Moleküler Biyolog, İstanbul Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Kanser Genetiği BD., ozge.erdogan@istanbul.edu.tr

anlaşılmasının yanı sıra kanser araştırmalarında tümör hücresinin mikroçevre özelliklerinin ortaya çıkarılmasında kullanılan *in vitro* deneysel sistemler olarak kullanılmaktadır.

İki (2D) ve üç boyutlu doku kültürü sistemlerinde primer tümör dokusu ve kültürlenmiş tümör hücrelerinin (Şekil 1) *PAX5*, *TMPRSS2* ve *SBDS* genleri için aynı metilasyon imzasına sahip olup olmadığını belirlemek amacıyla yaptığımız bir çalışmada, meme kanseri ve malign melanom primer tümör dokuları ilk olarak 2D ve 3D kültürleri, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak değişiklikler açısından araştırılmıştır. Malign melanom dokularında hem *PAX5* hem de *TMPRSS2* için birincil dokularda ve kültür sistemlerinde hiçbir farklılık gözlenmedi. Bu preliminer çalışma, *PAX5* geninin, 5-azasitidin ve 5-azadeoksitidin gibi metilasyon inhibitörlerinin malign melanom için *in vitro* sistemlerdeki etkilerini ölçmek amacıyla kullanılabilir etkili bir belirteç olduğunu göstermektedir, çünkü metilasyon seviyeleri primer doku ve kültür sistemlerinde aynıdır. Ayrıca sonuçlar, *SBDS* geninin memenin primer tümör dokusunda ve kültürlenmiş meme tümör hücrelerinde genin tamamen metillenmemiş olması nedeniyle *in vitro* model sistemlerde negatif kontrol olarak kullanılabileceğini göstermektedir [4].



**Şekil 1.** Malign Melanom Primer tümör dokusu ve sferoid kültürlerinin çizimleri. (a) Primer hücre kültürleri; (b) 3D sferoid kültürler.

İki boyutlu tek tabaka kültürde, kültürü yapılan hücreler tekrarlanan pasajlardan sonra virüs duyarlılığı, morfoloji ve yüzey reseptörleri gibi fenotipik karakteristiklerini kaybedebilirler. *İn vivo* şartlarda 3 boyutlu hücresel yapılanma, doğru bir gelişim, fonksiyon ve hücrelerin kararlılığı için son derece önemlidir. Hücrelerin özelleşmiş fonksiyonlarından birçoğu 2D kültürlerde kaybolmakta veya çok düşük seviyelerde ekspresyon göstermektedir. Yani uygun hücre-hüc-

re ve hücre-matriks etkileşimi gözlenmemektedir. Üç boyutlu doku kültür (3D) sistemleri ise, hormon salınımı, ekstrasellüler matriks bileşenlerinin üretimi ve farklılaşma markerlarının ekspresyonu gibi karakteristik hücre fonksiyonları ile aktive edilebilen sistemlerdir. Elde edilen hücresel yapılar, araştırma geliştirme çalışmalarında, ilaç metabolizması, toksisite, biyotransformasyon, patogenez ve mikroorganizma replikasyonunda model olarak kullanılabilirlerdir.

Genellikle anti kanser ilaçların etkinliğinin araştırılmasında 3D kültürlerin 2D kültürlerle göre daha kesin sonuçlar verdiği gösterilmiştir [5]. Yapılan bir çalışmada  $\beta_1$ -integrin üzerine geliştirilen bir antikorun üç boyutlu kültürde büyütülen kanseröz meme hücrelerinin davranışını tamamen değiştirdiği gösterilmiştir [6]. Bu hücreler, anormal şekillerini ve büyüme özelliklerini kaybederek kanseröz özellik göstermeyen hücreler haline dönüşmüşlerdir. 3D sistemlerde büyütülen hücre hatlarının daha yüksek oranda kimyasal dirence sahip olduğu ve bu durumun gelişim açısından son derece önem teşkil ettiği ileri sürülmektedir [7].

Farklı bir çalışmada, over kanseri kök hücrelerinde kemoterapi sonrası ilaç etkilerinin incelenmesi için MDAH-2774 hücre hattı kullanılmıştır. Bu hücreler 3D kültür sistemlerinde çoğaltıldıktan sonra Gemcitabine adlı kemoteröpatik ilaçla etkileştirilmiş ve p53, bcl-2, caspase-3'ün immun sistem üzerine etkisi incelenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, Gemcitabine'in kanser hücrelerini yok etmede bcl-2 yolağını kullandığını, caspase-3'de beklenen artışın olmaması nedeniyle kaspaz yolağını kullanmadığını göstermektedir [8].

Üç boyutlu doku kültür çalışmaları, hücre-hücre, hücre ekstrasellüler matriks etkileşimlerine ilave olarak mikroçevre, proliferasyon, apoptoz gibi durumların araştırılmasında kullanılabilen *in vivo* sistemlere yakın sonuçların alındığı *in vitro* sistemlerdir. Canlı bir dokunun modellenmesinde üç boyutlu doku kültür sistemleri bilimin birçok dalında kullanım alanı bulmuştur [3].

Kanser kök hücresi ve kanser tedavilerinin etkinliği ile ilgili çalışmaların yapılacağı sistemlerin, farklı hücre tiplerini bir arada bulundurabilecek üç boyutlu uzaysal konum oluşturacak ekstrasellüler matriks bileşenlerini içinde bulunduran yapılar olması gerekmektedir. Epitelyal ve stromal hücre hatları kullanılarak, meme dokusuna ilişkin üç boyutlu *in vitro* model sistem geliştirilmiş ve bu sistemin normal doku özelliklerini yansıtan bir doku oluşumu gösterdiği belirlenmiştir [9]. Bu sistemin en önemli avantajı yeniden bazal membran oluşturulmasına ihtiyaç duyulmaması ve kültürde uzun süre üç boyutlu yapının stabil olarak kalmasıdır.

İnsanda meme, prostat ve kolon dokusundan gelişen karsinomlar kısa süre içinde metastaz yapmak veya yıllar içinde invaziv özellik kazanmak için farklı-

laşırlar [10]. Bu gözlemler insanlarda kanserin dinamik ve ilerleyen bir doğasının olduğunu göstermektedir. Bu nedenle bu çeşit kanserler için model sistemler tasarlarlarken hastalığın doğası ve karmaşıklığı mutlaka akılda bulundurulmalıdır. Günümüzde 3D doku kültür sistemleri bu talepleri karşılayabilecek niteliktedir. Bu sistemler ilke olarak insan tümör hücrelerinin farklı invaziv davranışlarının ortaya koyulabildiği, insan karsinomlarında tümör-stromal hücre etkileşimlerini taklit edilebildiği, tümör ve stromal hücreler arasında çoklu düzenleyici geri bildirim mekanizmalarının incelenebildiği ortamı sağlamaktadır [11].

3D kültür sistemleri, hayvan modelleri ile 2D kültür sistemleri arasındaki boşluğu dolduran son derece önemli model sistemlerdir. *KRAS* mutasyonları kolorektal kanserlerde yüksek oranda gözlenmektedir. *KRAS* geni inaktif olan HKe3 ve *KRAS* geni aktif olan CRC HCT116 insan hücreleriyle yapılan bir çalışmada, 3D hücre kültüründe kolonik kripte benzeyen bir yapı oluşturulmuştur. Bu üç boyutlu kolonik kripte modelinde HKe3 hücreleri normal kolonik kripte özelliği olan terminal farklılaşma ve transit çoğalma özelliklerini göstermektedir. Aktif *KRAS*'a sahip HCT116 hücreleri ise üç boyutlu ortamda normal hücre polaritesi ve apoptozu inhibe etme yeteneğine sahip bir hücre haline dönüşmüşlerdir. Bu iki hücre tipi ile yapılan çalışmada farklı kültür sistemlerinde hücre davranışları karşılaştırılmıştır. Aktif *KRAS* geni olan hücre soyunun üç boyutlu kültür ortamında DNA tamir mekanizmaları ile ilişkili olan *TP53*, *BRCA1*, *BRCA2* ve *EXO-1* genlerinin anlatımlarının baskılandığı gösterilmiştir. Oysaki bu durum iki boyutlu kültür sistemlerinde gözlenmemiştir [12].

Kanser hücrelerinin *in vitro* da üç boyutlu büyümeleri, iki boyutlu kültürlerle göre *in situ* kanser hücre büyümesini daha iyi yansıtmaktadır. Bir çalışmada, iki boyutlu kültürler ile karşılaştırıldığında, üç boyutlu kültürdeki tümör hücrelerinin adaptasyonunda görevli protein ve fosfoprotein yapılarındaki değişiklikler incelenmiştir. Bu çalışmada, 5 glioma ve 6 farklı adenokarsinom hücre hattında, normal ve hipoksik koşullarda, fosforile ve fosforile olmayan toplam 121 protein, tek tabaka kültürler ile üç boyutlu kültürlerde çoğaltılarak incelenmiştir. Buna göre üç boyutlu doku kültür sistemlerinde de, iki boyutluya göre FAK, AKT, Src, GSK3 $\alpha$ , TSC2, p38, ve NF $\kappa$ p65 proteinlerinin anlatımlarının arttığı ATRIP, ATR,  $\beta$ -catenin, BCL-X, cyclin B1, Egr-1, ve HIF-1 $\alpha$  proteinlerinin ise ekspresyonlarının azaldığı gösterilmiştir [13]. Bu durum, üç boyutlu kültür sistemlerinde çoğaltılan hücrelerde, protein düzeyinde büyük farklılıklar olduğunu ortaya koymaktadır.

Kültür şartlarının fiziksel özelliklerinin değiştirilebilmesi doku modellerinin oluşturulması için kayda değer gelişmelerdir ve her geçen gün daha da önem kazanmaktadır. Yapılan üç boyutlu kültür sistemi çalışmaları ile organ benzeri

yapılar oluşturulmakta ve yine bu sistemler kullanılarak ilaç araştırmaları yapılmaktadır. Ayrıca bu sistemler, yeni biyomarkerların geliştirilmesine olanak sağlamaktadır [14].

Bir çalışmada, küçük hücreli dış akciğer kanseri hastalarından ve hücre hatlarından zenginleştirilmiş kanser kök hücreleri (CSC) farklı üç boyutlu doku kültür platformlarında çoğaltılmıştır. İlgili hücrelerde gen ekspresyonu analizleri yapıldığında, hidrojel yapı iskelelerine ekilen tümör kürelerinin ve hücrelerin, 2D kültürde büyütülen kontrol hücrelerine kıyasla test edilen kök ve istila promotörlerinin çoğunu önemli ölçüde aşırı ifade ettiği doğrulanmıştır. Birlikte ele alındığında, sonuçların 3D baskılı yapı iskelelerinin CSC' leri kültürlemek için güvenilir bir şekilde kullanılabilmesi fikrini desteklemektedir ve karşılığında bu iskeleler daha derin CSC' lerin karakterizasyonu için potansiyel araçlar olarak hizmet edebileceği ve belki bir gün çeşitli tümör popülasyonlarına karşı ilaç tarama platformları olarak işlev görebileceği düşünülmektedir [15].

Doku mühendisliği alanı ile üç boyutlu sistemlerdeki gelişmeler, gen ekspresyon analizleri, morfogenez, organogenez, patogenez gibi çeşitli biyolojik mekanizmaların daha detaylı olarak araştırılmasını ve açığa çıkarılmasını sağlamaktadır.

Hepatositler, erişkin insan glioma hücreleri [16] ve insan saç folikülleri hariç hiçbir hücre için tek tabakalı kültürde yüksek farklılaşma kapasitesi sağlanamamıştır [17]. Bu durum özellikle yeni ilaçların test edilmesinde ve etkinliklerinin araştırılmasında son derece önem taşımaktadır. Çünkü biyokimyasal verileri elde edebilmek için doğal metabolik aktivitelerin üst sınırı gereklidir ve bu da ancak doku benzeri yapılarda tam anlamıyla ölçülebilir.

## ÜÇ BOYUTLU (3D) DOKU KÜLTÜRÜNDE KULLANILAN TEKNİKLER

Yıllar içerisinde üç boyutlu doku kültürlerinde hücrelerin çoğaltılması için çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Her teknik, belirli avantajlara ve sınırlamalara sahiptir (Tablo 1) [18]. Küre boyutu ve karmaşıklığı, tek tek hücre tiplerinin büyüme kinetiğine, tohumlama sırasında hücre yoğunluğuna, kültür süresine ve kültür kuyularının çapı gibi uzamsal sınırlamalara bağlıdır [19].

**1. Üç Boyutlu (3D) Çoklu Tabakalar Ve Sferoidler:** Sferoidler, yapay substrata bağlanmak yerine birbirlerine yapışarak üreyen çoklu hücre topluluklarıdır. Kısa süreli sferoid kültürler, uygun küresel yapılar oluştururlar ve uygun koşullarda, primer hücrelerin farklılaşma karakteristiklerinin kültürde korunmasını sağlarlar. Moscona [20] tarafından yapılan ilk çalışmada, sferoid olarak kültüre edilmiş embriyonik hücreler üzerinde *in vivo* ya benzer gelişim

ve yapısal özellikler gözlemlenmiştir. Sferoid kültürler farklı uygulamalarla oluşturulabilirler. Bunlardan biri “sıvı üst tabaka” kültürüdür. Bu yöntemde tripsinize edilmiş tümör hücreleri, yapışmanın engellendiği bir yüzeye sahip hücre kültür flasklarında süspansiyon kültür şeklinde büyütülür. Hücre kültür kaplarının tabanı 1:1 oranında agar-medium karışımıyla kaplanarak, tümör hücrelerinin flask zeminine yapışması engellenir ve hücreler agarlı zeminde büyümeye devam ederler. 1-3 gün içinde küçük hücre kümeleri oluşuktan sonra, tümör hücreleri sıkı bir şekilde organize olarak düzgün sferoid yapılar oluşturmaktadır [21]. Sferoid kültür ortamının oluşturulmasında agardan başka agaroz, bakteriyal sınıf plastik kültür kapları veya Matrigel olarak isimlendirilen bir çeşit yeniden düzenlenmiş membranlar da kullanılabilir. İkinci yöntem ise “Spinner flask” yöntemidir. Bu sistemde [22] sferoidler, ekspanansiyel büyüme fazındaki monolayer kültür hücreleri ile oluşturulur. Ekspanansiyel büyüme fazındaki hücreler tripsinizasyon ile toplanır ve içine manyetik karıştırıcı koyulan flaskta sürekli olarak 190 rpm hızda karıştırılmak suretiyle hücrelerin flaska yapışması engellenerek süspansiyon kültür halinde çoğalması sağlanır [22]. Bir diğer yöntem ise “Sarmal dönüş (gyratory rotasyon)” yöntemidir ve ilk olarak Moscona tarafından embriyonik hücrelerde denenmiştir [23]. Tripsinize edilmiş süspansiyon halindeki monolayer tümör hücreleri bir cama veya belirli bir miktarda büyüme medyumunu içeren bakteriyal sınıf plastik flaska ekilir. Daha sonra flasklar ısı kontrolünün sağlandığı sarmal dönüş inkübatörüne kaldırılır. Rotasyon oranı kültür flaskının büyüklüğüne bağlıdır. Genellikle sferoidler bir günde oluşur. Gerekli sferoid büyüklüğü oluşana kadar, flasklar bu inkübatörde tutulurlar.

- 2. Üç boyutlu (3D) mikrotarıyıcılar:** Endüstriyel amaçlar için kullanılan üç boyutlu kültür sistemleridir. Bu sistemin en önemli özellikleri işlemin biyoreaktörlerde yapıyor olması sebebiyle düşük maliyetli ve sürekli bir üretim yapılmasına uygun olmasıdır. Aynı zamanda bu sistemlerin büyük yüzey alanı ve hacime sahip olmaları nedeniyle yüksek hücre yoğunluğuna ulaşılması kolaylıkla sağlanabilmektedir. Geniş ölçekli üretimler için sıklıkla başvurulan sistemlerdir. Hassas hücre hatlarının geliştirilmesi ve yapışma bağımlı hücrelerin

agregasyonu bu kültür sistemleri ile kolaylıkla oluşturulmaktadır. Ayrıca farklı tipte fakat birbirine yakın özellik gösteren hücrelerin bir arada büyütülmesi de yine bu sistemde mümkün olmaktadır [24]. Mikrotaşıyıcı sistemlerde büyütülen hepatositler karaciğer yetmezliğinde ve ilaç metabolizması çalışmalarında kullanılmaktadır. Akut karaciğer yetmezliği durumunda mikrotaşıyıcılarda yetiştirilen hepatositler ile yapılan transplantasyon deneyleri sonucu amonyum detoksifikasyonunun ve bilirubin konsantrasyonunun düşük seyretmesi bu sistemlerin başarısını ortaya koymuştur [25]. Karma kültürlerin mikrotaşıyıcı sistemlerdeki başarılı uygulamalarına sinir hücreleri ile kas hücreleri arasındaki etkileşimin incelendiği [26], vasküler endotel ile ağız kas hücrelerinin birlikte kültüre edildiği mikrotaşıyıcılar [27] ve cerebellar granül hücreleri, cerebral kortikal nöronlar ve kortikal astrositlerin birlikte kültüre edildiği sistemler olarak kollajen kaplı dekstran kürecikleri (Cytodex 3) örnek olarak verilebilir.

3. **Üç Boyutlu matriksler (Scaffold), jeller, süngerler ve gözenekli mikrotaşıyıcılar:** Polimerik matriksler(scaffold) kullanılarak oluşturulan üç boyutlu kültürlerde üretilen hücreler, biyolojik süreç açısından tek tabakada büyütülen hücrelerden daha avantajlıdır [28]. Üç boyutlu kültür sistemlerini dizayn ederken, polimerik matriks yapısı ve niteliği mutlaka yapılacak olan kültürün özelliklerine göre belirlenmelidir. Polimerik matriks olarak polylactide (PL), polyglycolide(PG), poly-D,L-lactide-co-glycolide (PLG) gibi sentetik polimerler ve kollajen (en çok kollajen tip 1), alginat, chitosan gibi doğal polimerler kullanılabilir [29],[30].
4. **Rotatif (Dönel Devimli) üç boyutlu hücre kültürü sistemi:** NASA tarafından geliştirilen ve doku kültüründe yeni bir çağ başlatan bir yöntemdir. Bu sistemde hücreler mikroyerçekimi oluşturularak ve minimal hidrodinamik kuvvetlerle karıştırılan dinamik sıvı süspansiyonlar şeklinde büyütülmektedir. Bir yandan tamamen medyum ile dolu kültür flaskının yatay ekseninde dönmesi hücrelerin karışmasını sağlarken diğer yandan dönme sebebiyle meydana gelen köpüğün ortadan kaldırılmasında yarı geçirgen bir membran aracılığı ile hidrodinamik kuvvet uygulanmaktadır. Yarı geçirgen membran sayesinde kültür ortamının havalandırılması da sağlanmış olmaktadır.

**Tablo 1. Üç boyutlu Kültür Oluşturma Tekniklerinin Karşılaştırılması**

DOKU KÜLTÜRÜ METODU	AVANTAJLARI	DEZAVANTAJLARI
SIVI ÜST TABAKA YÖNTEMİ	Ucuz	Bu Yöntemle Çok Az Sayıda Sferoid Elde Edilir
	Oluşturulması Kolay	
	Statik Bir Metod	
	Hızlı ve Kolay Görüntüleme	
SCAFFOLD TABANLI KÜLTÜRLER	İyi Ekstraselüler Destek	Pahalı Bir Teknik
	Üç Boyutlu Destek	
	Oluşturulması Kolay	
GYRATORY ve SPINNER FLASK YÖNTEMLERİ	Ucuz	Büyük Kısa Süreli Stres (Shear Stress) Etkenleri
	Kolay Kullanılabilir	Sferoid İç Yapısının İyi Korunamaması
	Uzun Süreli Kültür Elde Edilebilir	Kültüre Edilebilirliği Zor
	Büyük Miktarda Sferoid Oluşturma Özelliği	Hassas Hücrelerde Kullanılabilir
	Ph, Besin Konsantrasyonu, Glukoz ve Oksijenasyon Gibi Fizyokimyasal Parametrelerin Kusursuz Kontrolü	
	Birbirine Yakın Özellikte Farklı Hücre Hatlarının Beraber Üretilmesi (Co-Culture)	
	Ecm Uyarımı İçin Önceden Yapılandırılmış	
	Çok Küçük Kısa Süreli Stres (Shear Stress) Etkenleri	
	Damar Duvarı İle Minimal Düzeyde Bağlantı	
	Uyarılmış Sıfır Yerçekimi	
	Hızlı Sferoid Üretimi	
	Daha Fazla Farklılaşmış Epitele Benzer Yapı Oluşturulması	



## KAYNAKÇA

1. Lacroix, M. Persistent use of "false" cell lines. *Int J Cancer*,(2008); 122(1): p. 1-4.
2. *Uygulamalı Hücre Kültürü Teknikleri Kursu, Kurs Kitabı I.*, 2003. Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji A.B.D.
3. Kim, J.B., R. Stein and M.J. O'Hare. Three-dimensional in vitro tissue culture models of breast cancer-- a review. *Breast Cancer Res Treat*,(2004); 85(3): p. 281-91.
4. Sukruoglu Erdogan, O., S. Kilic Erciyas, A. Bilir, et al. Methylation Changes of Primary Tumors, Monolayer, and Spheroid Tissue Culture Environments in Malignant Melanoma and Breast Carcinoma. *Biomed Res Int*,(2019); 2019: p. 1407167.
5. Xing, H., S. Wang, K. Hu, et al. Effect of the cyclin-dependent kinases inhibitor p27 on resistance of ovarian cancer multicellular spheroids to anticancer chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol*,(2005); 131(8): p. 511-9.
6. Weaver, V.M., O.W. Petersen, F. Wang, et al. Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. *J Cell Biol*,(1997); 137(1): p. 231-45.
7. David, L., V. Dulong, D. Le Cerf, et al. Hyaluronan hydrogel: an appropriate three-dimensional model for evaluation of anticancer drug sensitivity. *Acta Biomater*,(2008); 4(2): p. 256-63.
8. Demiray S B, A.S., Oltulu F, Çavusoğlu T, Akarca Ö, Dilsiz Ö Y, Ergüven M, Öktem G, Bilir A. Apoptotic effects of chemotherapy in the MDAH- 2774 ovarian cancer stem cell. *Ege Journal of Medicine* (2011); 50 (2): p. 103-109.
9. Campbell, J.J., N. Davidenko, M.M. Caffarel, et al. A multifunctional 3D co-culture system for studies of mammary tissue morphogenesis and stem cell biology. *PLoS One*,(2011); 6(9): p. e25661.
10. Smith, H.S., S.R. Wolman and A.J. Hackett. The biology of breast cancer at the cellular level. *Biochim Biophys Acta*,(1984); 738(3): p. 103-23.
11. Petersen, O.W., L. Ronnov-Jessen, A.R. Howlett, et al. Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*,(1992); 89(19): p. 9064-8.
12. Tsunoda, T., Y. Takashima, T. Fujimoto, et al. Three-dimensionally specific inhibition of DNA repair-related genes by activated KRAS in colon crypt model. *Neoplasia*,(2010); 12(5): p. 397-404.
13. Levin, V.A., S. Panchabhai, L. Shen, et al. Protein and phosphoprotein levels in glioma and adenocarcinoma cell lines grown in normoxia and hypoxia in monolayer and three-dimensional cultures. *Proteome Sci*,(2012); 10(1): p. 5.
14. Lai, Y., A. Asthana and W.S. Kisaalita. Biomarkers for simplifying HTS 3D cell culture platforms for drug discovery: the case for cytokines. *Drug Discov Today*,(2011); 16(7-8): p. 293-7.
15. Herreros-Pomares, A., X. Zhou, S. Calabuig-Farinas, et al. 3D printing novel in vitro cancer cell culture model systems for lung cancer stem cell study. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*,(2021); 122: p. 111914.
16. Glimelius, B., B. Norling, T. Nederman, et al. Extracellular matrices in multicellular spheroids of human glioma origin: increased incorporation of proteoglycans and fibronectin as compared to monolayer cultures. *APMIS*,(1988); 96(5): p. 433-44.
17. Fusenig, N.E., A. Limat, H.J. Stark, et al. Modulation of the differentiated phenotype of keratinocytes of the hair follicle and from epidermis. *J Dermatol Sci*,(1994); 7 Suppl: p. S142-51.
18. Kapalczynska, M., T. Kolenda, W. Przybyla, et al. 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci*,(2018); 14(4): p. 910-919.
19. Nath, S. and G.R. Devi. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacol Ther*,(2016); 163: p. 94-108.
20. Moscona, A.A. How cells associate. *Sci Am*,(1961); 205: p. 142-62.
21. Öktem G, A.Ş., Tuna S, Baka M, Bilir A. Doksozobisinin Multisellüler Sferoid Hücre Kültürlerinde MCF-7 Hücreleri Üzerine Etkisi: Elektron mikroskopik Çalışma. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* (2005); 25: p. 337-342.

22. Sutherland, R.M., W.R. Inch, J.A. McCredie, et al. A multi-component radiation survival curve using an in vitro tumour model. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*,(1970); 18(5): p. 491-5.
23. Moscona, A. Rotation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cells. A quantifiable approach to cell interactions in vitro. *Exp Cell Res*,(1961); 22: p. 455-75.
24. Bing, R.J., T. Binder, J. Pataricza, et al. The use of microcarrier beads in the production of endothelium-derived relaxing factor by freshly harvested endothelial cells. *Tissue Cell*,(1991); 23(2): p. 151-9.
25. Nagaki, M., T. Kano, Y. Muto, et al. Effects of intraperitoneal transplantation of microcarrier-attached hepatocytes on D-galactosamine-induced acute liver failure in rats. *Gastroenterol Jpn*,(1990); 25(1): p. 78-87.
26. Shankar, R. and J.D. Sallis. Phosphocitrate inhibition of  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake in rat aortic smooth muscle cells in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun*,(1985); 131(2): p. 793-9.
27. Davies, P.F. and C. Kerr. Co-Cultivation of Vascular Endothelial and Smooth-Muscle Cells Using Microcarrier Techniques. *Experimental Cell Research*,(1982); 141(2): p. 455-459.
28. Bell, E. Strategy for the selection of scaffolds for tissue engineering. *Tissue Eng*,(1995); 1(2): p. 163-79.
29. Martin, I., R.F. Padera, G. Vunjak-Novakovic, et al. In vitro differentiation of chick embryo bone marrow stromal cells into cartilaginous and bone-like tissues. *J Orthop Res*,(1998); 16(2): p. 181-9.
30. Tan, W., R. Krishnaraj and T.A. Desai. Evaluation of nanostructured composite collagen--chitosan matrices for tissue engineering. *Tissue Eng*,(2001); 7(2): p. 203-10.