

**ÜÇ BOYUTLU (3B) ORTAMDA OLUŞTURULAN MEME
KANSERİ SFEROİDLERİNDE ABEMACİCLİBİN
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**INVESTIGATION OF THE EFFECT OF ABEMACICLIB
ON BREAST CANCER SPHEROIDS CREATED IN A
THREE-DIMENSIONAL (3D) ENVIRONMENT**

CAN SÜRÜCÜOĞLU

PROF. DR. AYSUN KILIÇ SÜLOĞLU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2025

ÖZET

ÜÇ BOYUTLU (3B) ORTAMDA OLUŞTURULAN MEME KANSERİ SFEROİDLERİNDE ABEMACİCLİBİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Can SÜRÜCÜOĞLU

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Aysun KILIÇ SÜLOĞLU

Haziran 2025, 82 sayfa

Kanser, küresel ölçekte en yaygın ve ölümcül hastalıkların başında gelmektedir. Kadınlarda en yaygın türü olan meme kanseri, kansere bağlı ölümlerde ilk sırada yer alır. Bu hastalığın alt tiplerinden biri olan üçlü negatif meme kanseri, yüksek agresifliği, metastatik özellikleri ve kötü prognozu ile öne çıkmaktadır. İlaç çalışmalarında serin-treonin kinaz proteinlerinin inhibisyonu yenilikçi bir yaklaşım olarak öne çıkmaktadır. Bu kapsamda, kanser hücrelerinde siklin bağımlı kinaz 4/6 (CDK-4/6) proteinini inhibe ederek hücre döngüsünü durduran Abemaciclib, hücre döngüsünü durdurarak tümör hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasını engelleyebilmektedir.

Kanser araştırmalarında etik kısıtlamalar insanlar üzerinde çalışma yapmayı kısıtlamaktadır; hayvan deneyleri ise insan fizyolojisini tam olarak yansıtmayabilir. Bu nedenle, tümör dokularını daha gerçekçi biçimde taklit eden 3 boyutlu (3B) hücre kültürleri giderek önem kazanmaktadır. Hücrelerin iskelesiz bir ortamda kendi kendine organize olması ile oluşan Sferoid denilen bu 3B yapılar, kanser oluşum mekanizmalarını anlamak ve ilaç testlerini geliştirmede yaygın Şekilde kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında, l negatif meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 kullanılarak 3B Petri Dish® yöntemiyle sferoidler oluşturulmuştur. Ardından, CDK-4/6'nın seçici inhibitörü olan Abemaciclib'in etkileri Doksorubisin pozitif kontrol olarak kullanılarak karşılaştırmalı bir Şekilde değerlendirilmiştir. Abemaciclib 10, 20 ve 25 μM ile Doksurubisin ise 5, 10 ve 20 μM olarak hücrelere uygulanmış ve 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum (MTS) ile hücrelere karşı ilaçların sitotoksik etkileri ölçülmüştür. Hücre iskeleti ve hücreler arası bağlantılardaki değişiklikleri incelemek için Epiteyal-kaderin (E-kaderin) ve Fibröz-aktin (F-aktin) immünofloresan boyamaları yapılmıştır. Son aşamada, hücre döngüsü akış sitometrisiyle analiz edilerek hücre sel ölüm yolakları araştırılmıştır. Çalışma bulguları, 3B sferoidlerin, 2 boyutlu (2B) hücre kültürlerine göre Abemaciclib'e daha yüksek direnç gösterdiğini ortaya koymuştur. Fibröz-aktin boyamada, hücre iskeletinde ve bağlantılarında yapısal değişiklikleri doğrulanmış, Epiteyal-kaderin ifadesindeki değişikliklere bağlı olarak boyanma olmamıştır. Hücre döngüsü analizi sonuçları Abemaciclibin, MDA-MB-231 hücrelerinde hücre döngüsünü farklı dozlarda hem G0/G1 hem de G2/M fazlarında durdurarak kontrolsüz hücre çoğalmasını azalttığını göstermiştir. Sonuç olarak, bu alışma, 3B hücre kültürlerinin l negatif meme kanseri (TNBC) gibi agresif kanser modellerinde ilaç etkilerini daha gerçekçi bir Şekilde değerlendirme imkânı sunduğunu ve Abemaciclib'in TNBC tedavisinde potansiyel bir ajan olduğunu vurgulamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Abemaciclib, MDA-MB-231, Meme kanseri, Sferoid, 3B Petri Dish®

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF ABEMACICLIB ON BREAST CANCER SPHEROIDS CREATED IN A THREE- DIMENSIONAL (3D) ENVIRONMENT

Can SÜRÜCÜOĞLU

Master of Biology, Department of Zoology

Supervisor: Prof. Dr. Aysun KILIÇ SÜLOĞLU

June 2025, 82 pages

Cancer remains one of the most prevalent and lethal diseases worldwide. Breast cancer—the most common malignancy in women—also ranks first in cancer-related mortality. Among its subtypes, triple-negative breast cancer (TNBC) stands out for its pronounced aggressiveness, metastatic potential, and poor prognosis. Inhibiting serine/threonine kinases has emerged as an innovative drug-development strategy; in this context, Abemaciclib, a selective cyclin-dependent kinase 4/6 (CDK-4/6) inhibitor, halts the cell cycle and can curb the uncontrolled proliferation of tumour cells.

Because ethical constraints limit human studies and animal models do not fully recapitulate human physiology, three-dimensional (3D) cell-culture systems that better mimic tumour tissue are gaining importance. Spheroids—3D aggregates formed by self-organization of cells in a scaffold-free environment—are now widely used to elucidate oncogenic mechanisms and to improve drug screening.

In this thesis, spheroids of the triple-negative breast cancer (TNBC) cell line MDA-MB-231 were generated using the 3D Petri Dish® method. The effects of Abemaciclib, a selective CDK-4/6 inhibitor, were then compared with those of the positive control Doxorubicin. Abemaciclib was applied at 10, 20 and 25 μM , while Doxorubicin was administered at 5, 10 and 20 μM , and the cytotoxic effects of the drugs against the cells were measured with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay. Immunofluorescence staining for E-cadherin and filamentous actin (F-actin) was performed to assess changes in the cytoskeleton and cell–cell junctions. Finally, cellular death pathways were explored by analyzing the cell cycle via flow cytometry. The results showed that 3D spheroids exhibited greater resistance to Abemaciclib than conventional two-dimensional (2D) cultures. F-actin staining confirmed structural changes in the cytoskeleton and intercellular contacts, while E-cadherin expression was absent, reflecting the diminished expression of this junctional protein. Cell-cycle analysis revealed that Abemaciclib reduced uncontrolled proliferation of MDA-MB-231 cells by arresting them in both G0/G1 and G2/M phases in a dose-dependent manner. Overall, this study demonstrates that 3D cell-culture models provide a more realistic platform for evaluating drug responses in aggressive cancers such as TNBC and highlights Abemaciclib as a promising therapeutic candidate for TNBC.

Keywords: Abemaciclib, MDA-MB-231, Breast cancer, Spheroid, 3D Petri Dish®

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamıza FHD-2023-20610 nolu proje kapsamında destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkür ederim. Bu tez çalışması TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) 2210-A Yurt İçi Genel Yüksek Lisans Burs Programı tarafından desteklenmiştir. Ayrıca akış sitometri analizlerinin gerçekleştirildiği HÜNİTEK Laboratuvarı'na teşekkür ederim.

Tez sürecinde boyunca bana inanan, her stresi durumunda bana destek olan, zor durumda olduğumda bana bilgi ve tecrübesiyle destek veren, sabırla her türlü sorunumu dinleyen ve her konuda bana en içten şekilde yardım eden, güler yüzlülüğü ve şefkatiyle bana destek olan ve her sorumda en güzel şekilde bana yol gösteren ve yardımcı olan danışmanım Prof. Dr. Aysun KILIÇ SÜLOĞLU'na en içten teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tez süresince benden desteklerini esirgemeyen ve bir sorum olduğunda tecrübelerini aktaran Sayın Prof. Dr. Nurhayat BARLAS'a, Sayın Prof. Dr. Güldeniz SELMANOĞLU'na, Sayın Doç. Dr. Elif KARACAOĞLU'na, Sayın Doç. Dr. Hande CANPINAR'a ve Sayın Dr. Seçil KARAHİSAR TURAN'a

Yüksek lisans'a başladığım ve tez sürecinde yanımda olan, her türlü zorlukta yanına gittiğim ve güler yüzü ve engin tecrübeleriyle bana destek olan sevgili dostum Uzm. Biyolog Selen ÖZTÜRK'e, aynı laboratuvarı birlikte kullandığım ve paylaştığım tüm arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca bana her aldığım konuda destekleyen, ben koşulsuz seven, her halime katlanan ve beni hep motive eden sevgili annem Sema Nur SÜRÜCÜOĞLU ve Prof. Dr. Metin Saip SÜRÜCÜOĞLU'na

Her zaman yanımda olan, her konuda bana güvenen, en zor zamanlarımda ve aldığım kararlarda beni destekleyen, bana olan inancı asla eksilmeyen biricik yol arkadaşım Cansu ÇOBAN'a

Saygılarımı, sevgilerimi ve en içten dileklerimi sunar ve çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER.....	ix
ÇİZELGELER.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser.....	3
2.1.1. Kanser ve Temel Özellikleri	3
2.2. Meme Kanseri.....	4
2.2.1. Luminal A.....	7
2.2.2. Luminal B	7
2.2.3. HER-2 Pozitif.....	8
2.2.4. Üçlü Negatif Meme Kanseri	8
2.3. MDA-MB-231 Kanser Hücre Hattı	9
2.4. Abemaciclib.....	10
2.5. İki Boyutlu ile Üç Boyutlu Hücre Kültürleri Arasındaki Farklar	12
2.6. Sferoid	14
2.7. Ultra Düşük Bağlantı Plakaları (Ultra Low Attachment Plates (ULA))	16
2.8. Asılı Damla (Hanging Drop)	18
2.9. 3D Petri Dish®	19
2.10. Sterilite Testleri.....	21

2.11.	Epitelyal (E)-Kaderin.....	22
2.12.	Filamentöz (F)-aktin	23
2.13.	MTS Hücre Canlılığı Testi	24
2.14.	Akış Sitometrisi	25
2.14.1.	Hücre Döngüsü ve DNA Analizi	26
3.	DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	28
3.1.	Gereçler	28
3.2.	Mikoplazma Testi	29
3.3.	Hücre Kültür Çalışmaları	29
3.3.1.	Hücre Kültürü	29
3.3.2.	Hücre Çözdürme ve Dondurma	29
3.3.3.	Hücre Kültürü Üretimi ve Pasajlama	30
3.4.	Sferoidlerin Oluşturulması	31
3.4.1.	Agar Jellerin Oluşturulması.....	31
3.4.2.	Agar Solüsyonunun Hazırlanması	31
3.5.	Abemaciclib Stok Solüsyonun Hazırlanması ve Uygulanması	32
3.6.	Doksorubisin Stok Solüsyonun Hazırlanması ve Uygulanması.....	33
3.7.	MTS Canlılık Testi	33
3.7.1.	İki Boyutlu ve Üç boyutlu Kültürlerde MTS Analizi	34
3.8.	İmmünofloresan Boyama	35
3.8.1.	Canlı Hücre Boyama (Cell Tracker)	35
3.8.2.	E-Kaderin İmmünofloresan Boyaması.....	36
3.8.3.	F-Aktin İmmünofloresan Boyaması.....	37
3.9.	Akış Sitometride Hücre Döngüsünün Belirlenmesi.....	38
3.10.	İstatistiksel Analiz.....	39
4.	SONUÇLAR.....	40
4.1.	Mikoplazma Testi	40

4.2.	Sferoidlerin Oluşturulması ve ap-Alan Ölçüm Sonuçları.....	40
4.3.	2B ve 3B Kültürlerde Canlılık Analizi Sonuçları.....	44
4.3.1.	İki Boyutlu Hücrelerde Canlılık Analizleri	44
4.3.2.	Üç Boyutlu Hücrelerde Canlılık Analizleri	46
4.4.	İmmünofloresan Boyama	50
4.4.1.	Canlı Hücre Boyama (CellTracker™).....	50
4.4.2.	E-Kaderin İmmünofloresan Boyama.....	51
4.4.3.	F-Aktin İmmünofloresan Görüntüleri	51
4.5.	Akış Sitometri Hücre Döngüsü Sonuçları	52
5.	TARTIŞMA	55
6.	YORUM	64
	KAYNAKÇA	68
	EKLER	81
	EK 1 - Tez alıŐması Orjinallik Raporu	81
	ÖZGEÇMİŐ	82

ŞEKİLLER

Şekil	2.1.	Meme	kanserinin	gelişimi	ve		
metastazı.....							6
Şekil	2.2.	Meme	Kanseri	Alt			
Tipleri.....							7
Şekil	2.3.	MDA-MB-231	hücre	hattının	inverted	mikroskop	
görüntüsü.....							9
Şekil 2.4.							
Abemaciclib/Palbociclib/Ribociclib'in hücre döngüsüne etkisinin şematik olarak gösterilmesi.....							11
Şekil	2.5.	2B	ve	3B	hücre	kültürlerinin	
karşılaştırılması.....							13
Şekil	2.6.		Sferoidlerin			uygulama	
alanları.....							14
Şekil 2.7.							
ULA plakalarda sferoid oluşturulması. (a) ULA plakalara hücre ekimi. (b) sferoidlerin oluşumu ve görüntülenmesi.....							17
Şekil 2.8.							
Asılı damla tekniği ile sferoid oluşturulması. (A) Hücrelerin ekimi. (B) Asılı damlada hücrelerin tutulumu. (C) Hücrelerin sferoid oluşturması için toplanması.....							19
Şekil 2.9.							
3B Petri Dish® ile sferoid üretimi. (a) 3B Petri Dish® kalıpları. (a') Kalıpların içindeki agarozlar kalıpları. (a'') Kalıpların mikroskop görüntüsü. (b') Kalıpların içindeki oluşmuş sferoidler. (b'') İnkübasyon sonrası kalıplardan çıkartılmış sferoidler.....							20
Şekil	2.10.	Tetrazolyum (MTS)	tuzunun	Formazan	kristaline		
indirgenmesi.....							25
Şekil	3.1.	2B	hücre	kültüründe	deney		
planı.....							31

Şekil 3.2.	3B	hücre	kültüründe	deney	
planı.....					32
Şekil 4.1.				Sferoid hücre gruplarında 6 gün boyunca sferoidlerin inverted mikrop görüntüleri.....	41
Şekil 4.2.				1×10^5 hücre/agar gruplarında 24 saat sonra a. sferoid alan ve b. çap ölçümü.....	42
Şekil 4.3.				Sferoidlerin 1×10^5 hücre/agar grubunda hücre sayısını belirlemek için yapılan gözlemlerdeki alan ölçümü.....	43
Şekil 4.4.				Sferoidlerin 1×10^5 hücre/agar grubunda hücre sayısını belirlemek için yapılan gözlemlerdeki çap ölçümü.....	43
Şekil 4.5.				2B kültürde Abemaciclib ve Doksorubisin uygulamasından sonra inverted mikroskop görüntüleri.....	45
Şekil 4.6.				MDA-MB-231 2B hücre kültüründe 24, 48 ve 72 saat Abemaciclib ve Doksorubisin'in uygulaması sonrası canlılık analiz sonuçları.....	46
Şekil 4.7.				Sferoidlerde Abemaciclib ve Doksorubisin uygulamasından sonra hücre görüntüleri.....	48
Şekil 4.8.				MDA-MB-231 3B hücrelerinde Abemaciclib ve Doksorubisin'in farklı konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saat inkübasyonlarda canlılık analiz sonuçları.....	49
Şekil 4.9.				MDA-MB-231 hücrelerinde CellTracker™ boyama.....	50
Şekil 4.10.				MDA-MB-231 hücrelerinde F-aktin immüno Floresan boyama görüntüleri. A. Kontrol, B. 10 μ M Abemaciclib, C. 20 μ M Abemaciclib.....	52

Şekil 4.11. Abemaciclib uygulamasının (10 μ M ve 20 μ M) MDA-MB-231 hücrelerindeki hücre döngüsü dağılımı üzerindeki etkilerini gösteren akış sitometrisi histogram grafikleri.....53

Şekil 4.12. Abemaciclib uygulamasının (10 μ M ve 20 μ M) MDA-MB-231 hücrelerindeki hücre döngüsü dağılımı üzerindeki etkilerini gösteren akış sitometrik analizi.....54

ÇİZELGELER

Çizelge 4.1. Abemaciclib'in 2B ve 3B Kùltürlerde IC ₅₀ (µM) değerleri.....	49
---	----

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
µm ²	Mikrometre kare
cm ²	Santimetre kare
IC ₅₀	İnhibisyon Konsantrasyonu
mg	Miligram
mL	Mililitre
nm	Nanometre
nM	Nanomolar
OD	Optik dansite
rpm	Dakikada devir
UV	Ultraviyole

Kısaltmalar

2B	2 boyut
3B	3 boyut
CDK	Siklin bağımlı kinaz
CDK-4/6	Siklin bağımlı kinaz 4/6
DAPI	4', 6-diamidino-2 fenilindol

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
ECM	Ekstraselüler Matris
EDTA	Etilendiaminotetraasetik asit
E-kaderin	Epitelya-kaderin
ELISA	Enzime bağlı immünosorbent analizleri
EMT	Epitelyal mezenkimal geçiş
ER	Östrojen reseptörü
F-aktin	Fibröz-aktin
FBS	Fötal Sığır Serumumu
G-aktin	Globüler aktin
HER-2	İnsan epidermal büyüme faktörü-2
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)- 2H-tetrazolyum
NK	Doğal öldürücü hücreler
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz çözeltisi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PI	Propidyum iyodür
PR	Progesteron reseptörü
pRb	Retinoblastoma proteini
QUE	Kuersetin
TAM	Tamoksifen
TNBC	Üçlü negatif meme kanseri
ULA	Ultra low attachment plate

1. GİRİŞ

Kanser dünya genelinde en yaygın hastalıklardan biri olup ölüm ile sonuçlanan başlıca sağlık sorunları arasında yer almaktadır. Kadınlarda en sık görülen kanser türü olan meme kanseri kanser kaynaklı ölümlerin de başında gelmektedir. Meme kanserinin alt tiplerinden olan üçlü negatif meme kanseri (TNBC), agresif seyri ve metastaz yapma özelliği ile bilinmektedir. Bu alt tip diğerlerinin aksine herhangi bir reseptör ifadesi taşımamaktadır. Bu durum hormon tedavisi ve reseptör hedefli tedaviler gibi standart yaklaşımlar bu alt tipte yetersiz kalarak klinik olarak bir zorluğa neden olmaktadır. Bu nedenle, bu kanser türüne karşı yenilikçi tedavi stratejileri geliştirilmesi büyük bir önem taşımaktadır.

Serin-treonin kinaz ailesi, hücre profilerasyonu ve sinyal iletimini kontrol eden temel proteinler arasında yer almaktadır. Bu proteinlerin inhibisyonu, kanser tedavisinde hedefe yönelik yeni yaklaşımların ve tedavilerin geliştirilmesinde öne çıkar. Hücre döngüsünün sürdürülmesi ve RNA transkripsiyonunun düzenlenmesinde kilit rol oynayan siklin-bağımlı kinaz 4/6 (CDK4/6) inhibitörü olan Abemaciclib, hücre döngüsünü durdurarak kontrolsüz proliferasyonu engellemektedir. Son yıllarda geliştirilen pek çok CDK-4/6 inhibitörünün, benzer ilaçlara kıyasla daha az yan etkiye sahip olduğu bildirilmektedir.

Kanser araştırmalarında, insan denekler üzerindeki etik sınırlamalar ve hayvan deneylerinde kullanılan modellerin insan fizyolojisini tam olarak yansıtamaması nedeniyle *in vitro* modeller sıklıkla tercih edilmektedir. Ancak geleneksel 2 boyutlu (2B) modeller yapıları sebebiyle tümör mikro çevresinin 3 boyutlu (3B) ortamını ve hücre matriks etkileşimlerini yeteri kadar yansıtamaması sebebiyle, *in vivo* koşulları başarılı bir şekilde taklit edebilen 3B hücre kültür sistemleri önem kazanmaktadır. Bu sistemlerde oluşturulan sferoidler, iskelesiz bir ortamda organize olan hücre kümeleri olarak tanımlanmakta olup son yıllarda hem kanser oluşum mekanizmalarını daha iyi anlamada hem de yeni ilaçların geliştirilmesinde güçlü bir araç olarak kullanılmaktadır.

Tez çalışması, TNBC model hücre hattı olan MDA-MB-231 kullanılarak, hücre iskeleti ve proliferasyon mekanizmalarını incelemek üzere tasarlanmıştır. Özellikle, CDK4/6 inhibitörlerinden biri olan Abemaciclib'in, 2B ve 3B kültürlerdeki sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Çalışma boyunca üç boyutlu Petri Dish® yöntemiyle MDA-MB-231

sferoidleri literatürde ilk kez başarılı bir şekilde oluşturulmuş ve sferoidlerin hücre mimarisi, ilaç etkisine verdiği yanıtlar ve direnç mekanizmaları detaylı bir şekilde analiz edilmiştir. Böylece çalışma, 3B Petri Dish® yöntemi ile oluşturulan sferoidlerde TNBC'ye özgü farmakodinamik yanıtları nicel olarak raporlayan ilk kapsamlı veri setini literatüre kazandırmaktadır. Bu yönüyle çalışma, Abemaciclib'in TNBC gibi agresif kanser türlerinin tedavisindeki potansiyeline dair değerli ve yeni veriler sunarak, gelecekte geliştirilecek çeşitli tedavi stratejilerine önemli bir temel oluşturacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

2.1.1. Kanser ve Temel Özellikleri

Kanser, çeşitli faktörler sebebiyle sağlıklı bir hücrenin genetik materyalinde hasarların meydana gelmesi ve bu hasarların birikmesi sonucunda hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasına ve tümör oluşumuna yol açan bir hastalıktır (Gautam ve ark., 2014). Sağlıklı bir hücrenin kanser hücresine dönüşmesi tümör olarak isimlendirilip bu dönüşümde kalıtım, beslenme, sigara ve alkol kullanımı, karsinojenler, radyasyon, patojenler gibi çeşitli faktörler etkilidir (Hanahan ve Weinberg, 2011). Bu faktörler hücrenin genetik yapısını bozarak, hücrenin zaman içinde mutasyon biriktirmesine sebep olmaktadır. Biriken mutasyonlar hücrede döngüsünde yer alan proteinler ve genlerin ifade düzeylerini değiştirerek hücrenin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasına neden olmakta ve bu süreç hücrenin tümöre dönüşmesiyle sonuçlanmaktadır.

Bir kanser hücresinin en temel özelliklerini Hanahan ve Weinberg sekiz maddede sıralamışlardır. Bunlar sırası ile;

- a. **Hücre bölünmesine neden olan sinyallerin sürdürülmesi;** Kanser hücreleri, hücre büyümesi için gerekli olan sinyallerin ekspresyonunu arttırabilirler veya çekirdek zarındaki reseptörlerin çoğalmasını sağlayarak nükleusa sürekli bölünme sinyali göndermektedirler. Bir başka yöntem ise hücre proliferasyonunu durduran geribildirim sitemlerini bozmak suretiyle hücre bölünmesini sürdürmektir.
- b. **Büyüme baskılayıcılarından kaçış;** Mutasyon veya kontak inhibisyonun kaybı ile tümör baskılayıcı genlerde büyüme baskılayıcılar ortadan kalkmaktadır.
- c. **İnvazyonun ve metastazın aktifleştirilmesi;** E-kaderinler hücrelerin birbirlerine temas etmesi halinde büyümelerini durdurmaktadır. Bu proteinlerin ifadesinden yoksun olan hücreler birbirlerine temas ettikten sonra hücreler büyümeye devam etmektedir. Ayrıca sitosol işleyişindeki aksaklıklar da hücrelerin kontak inhibisyon durumunu kaybedip yayılmalarını sağlamaktadır (Akay., 2012).
- d. **Büyüme temelli ölümsüzlük;** Kanserli hücreler ve kök hücrelerde telomer aktivitesi devam etmektedir. Bu da hücrelerin sürekli bölünmesini sağlamaktadır.
- e. **Anjiyogenezin indüklenmesi;** Kanser hücrelerinin yüksek metabolik aktiviteleri için oksijen ve besine ihtiyaçları bulunmaktadır. Bu nedenle yeni kan damarları

oluşumunu (anjyogenez) tetikleyerek dolaşım sistemine bağlanarak tümörün büyümesini sürdürmektedirler.

f. Hücre ölümüne direncin kazanılması; Kanseri hücrelerde tümör baskılayıcı genler ve DNA onarım mekanizmaları hasar gördüğü için hücre ölüm mekanizmaları tetiklenememektedir. Bu durum, hasarlı hücrelerin yaşamını devam ettirmesine yol açmaktadır (Hanahan ve Weinberg, 2000).

g. Metabolizmanın yeniden programlanması; Kanseri hücreleri genellikle sağlıklı hücrelerin kullandığı oksidatif fosforilasyon yerine aerobik glikoliz yöntemini kullanmaktadır. Böylece kanseri hücreleri glikozu hızlıca laktata dönüştürerek gerekli metabolik yapıtaşlarını hızlıca elde etmektedir. Ayrıca kanseri hücreleri glikoza ek glutamin gibi ek enerji kaynaklarını da kullanabilmektedirler. Böylelikle tümörler hızlıca büyüyüp gelişerek yayılımlarını arttırmaları.

h. Bağışıklıktan kaçış; Kanseri hücreleri, bağışıklık sisteminden kaçmak için PD-L1 üretimi, bağışıklık baskılayıcı hücrelerin artışı ve antijen kaybı gibi stratejiler kullanarak bağışıklık hücrelerinin onları tanıyıp yok etmesini engellemektedir. Bu mekanizmalar, tümör mikroçevresini bağışıklık yanıtını baskılayan bir ortam haline getirmekte ve kanserin ilerlemesine katkıda bulunmaktadır (Hanahan, 2022).

Beslenme alışkanlıklarındaki değişiklikler, tütün ve alkol kullanımı, kronik hastalık ve enfeksiyonlar, radyasyon ve kimyasallara gereğinden fazla maruz kalma, kişilerin yaşam tarzı veya çevre kirliliğindeki değişiklikler küresel çapta kanseri vakalarının artmasında etkili olmaktadır (Gautam ve ark., 2014). 2020 yılında Uluslararası Kanseri Araştırmaları Ajansı'nın (IARC) yayınladığı raporda, dünya genelinde yeni tanımlanan kanseri vakası 19,3 milyon olup kansere bağlı ölüm ise 10 milyon olarak bildirilmiştir. Ayrıca her beş kişiden birinin kansere yakalandığı bildirilmiştir. En ölümcül kanseri türleri akciğer, meme, karaciğer, mide, kolorektal ve prostat olarak sıralanmaktadır (Wild, Weiderpass ve Stewart, 2020). Kanseri vakalarının önümüzdeki yirmi yılda %70 oranında artacağı öngörüsü, önümüzdeki yıllarda yeni ve etkili kemoterapik ilaçlara duyulan ihtiyacı desteklemektedir (Blowman ve ark., 2018).

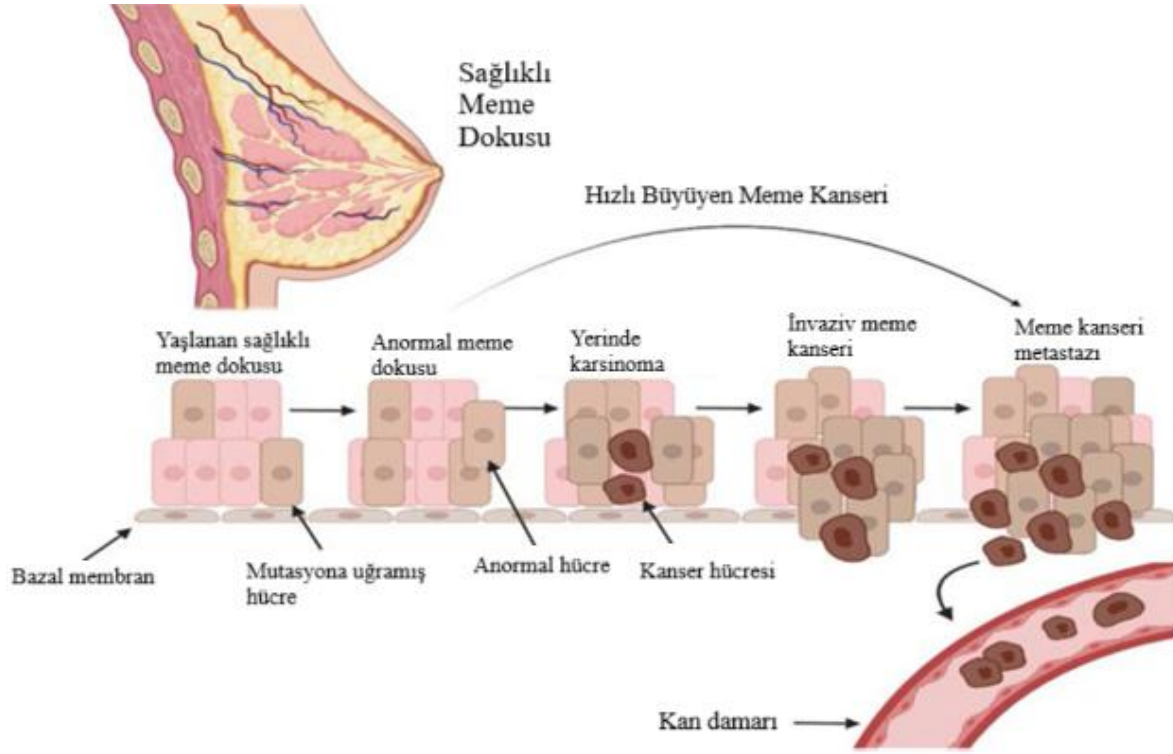
2.2. Meme Kanseri

Kadınlardaki en yaygın kanseri türlerinden biri olan meme kanseri, dünya genelinde kansere bağlı ölümlerde en üst sıralarda yer almaktadır (Parl, 2014). Yaşın ilerlemesine

bağlı olarak meme kanserinin görülme sıklığı artmakla birlikte erken tanı ve tedavi sayesinde ölüm oranı düşebilmektedir. Ancak metastaz yapan meme kanseri vakalarında kanser kaynaklı ölümlerin yaklaşık %15'ini oluşturmaktadır (Ferlay ve ark., 2015; Greaney ve ark., 2015).

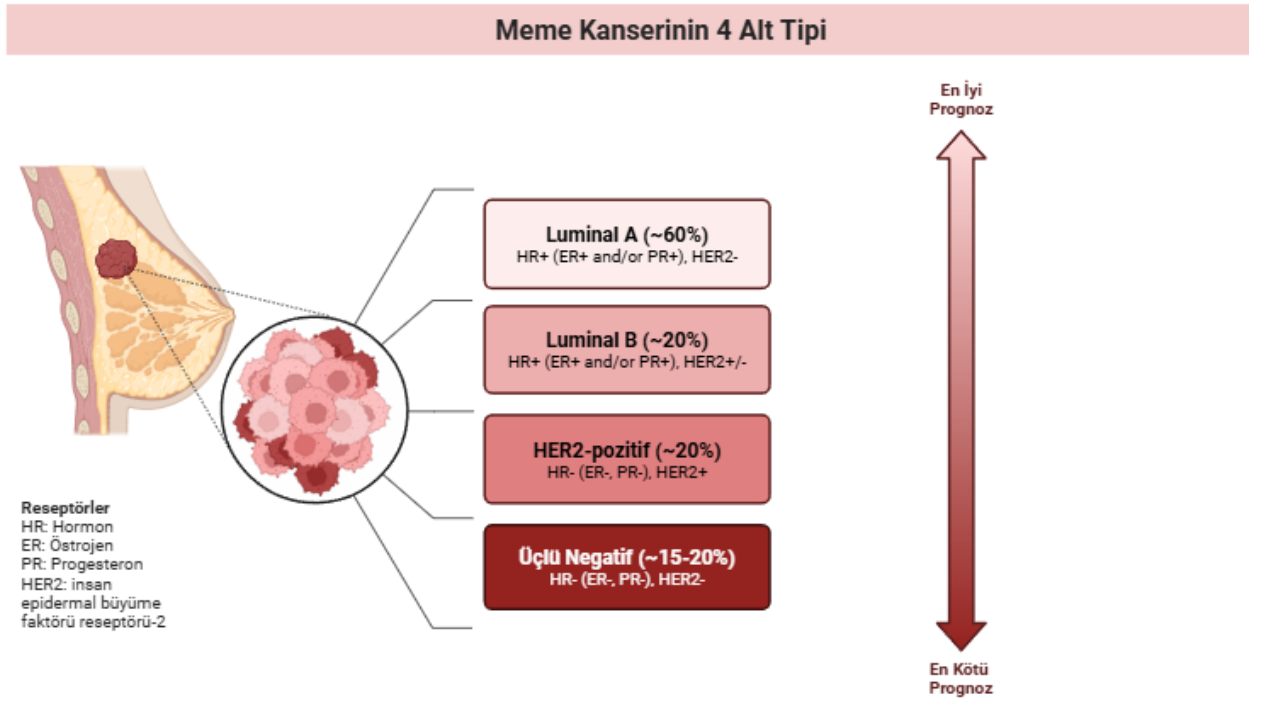
Epidemiyolojik veriler, meme kanseri insidansının coğrafi bölge, sosyoekonomik düzey ve yaşam tarzı gibi farklı etkenlere bağlı olarak değiştiğini göstermektedir. Kuzey Amerika ve Batı Avrupa gibi gelişmiş bölgelerde bu kanser türüne daha sık rastlanırken, Asya ve Afrika'daki gelişmekte olan ülkelerde ise görülme sıklığı nispeten daha düşüktür (Denizgil ve İpeksönmez, 2015). Son yayımlanan Dünya Kanser Raporu'nda (2020), her yıl yaklaşık 2,1 milyon yeni meme kanseri vakasının ortaya çıktığı ve 627 bin meme kanseri kaynaklı ölümün gerçekleştiği belirtilmektedir (Wild, Weiderpass ve B.W. Stewart, 2020).

Meme kanseri, süt bezlerinin bulunduğu yağ ve fibröz dokuların oluşturduğu glandüler kanallardan veya meme dokuya ait lobüllerden kaynaklanmaktadır (Benson ve ark., 2009). Bu yapılardaki hücrelerin anormal proliferasyon göstermesi ve çeşitli kanserojen faktörlerle uyarılması, primer tümörlerin oluşum sürecini başlatmaktadır (Şekil 2.1). Hücrelerin genetik ve epigenetik değişiklikler biriktirmesi sonucunda oluşan tümör mikroçevresi, tümörün invaziv hale gelmesine zemin hazırlayarak immün sistemin denetimini aşmasına yardımcı olmakta ve metastaza giden süreci tetiklemektedir (Davies, 2016; Basse and Arock, 2015; Polyak, 2007).



Şekil 2.1. Meme kanserinin gelişimi ve metastazı (Wekking ve ark., 2023)

Meme kanseri, tümör hücrelerinin moleküler ve genetik özellikleri doğrultusunda sınıflandırılmakta olup bu sınıflandırmada dört temel biyobelirteç kullanılmaktadır (Sørliie vd. 2001). Bu belirteçler insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 (HER-2), steroid reseptörlerinden olan progesteron reseptörü (PR) ve östrojen reseptörü (ER), ve hücre döngüsünün aktif fazlarında aktive edilen bir proliferasyon proteini olan Ki-67'dir. Bu biyobelirteçlerin ifade düzeylerine göre meme kanseri Luminal A, Luminal B, HER-2 Pozitif ile Üçlü Negatif olarak dört temel alt tiplere ayrılmaktadır. Her bir alt tipin moleküler özellikleri, klinik seyri ve tedavi yanıtları farklılık göstermektedir (Guiu ve ark., 2012). Meme kanseri alt tiplerinin şematik gösterimi Şekil 2.2'de gösterilmektedir.



Şekil 2.2. Meme Kanseri Alt Tipleri. BioRender ile oluşturulmuştur.

2.2.1. Luminal A

Bu alt tip, meme kanallarını kaplayan luminal hücrelerde başlayan meme kanseridir (Vodug ve ark., 2010). Bu meme kanseri yaklaşık %60 görülme sıklığı ile en yaygın alt tip olduğu bilinmektedir (Carey ve ark., 2006). Luminal A meme kanseri tümörleri, hormon reseptörleri pozitif (ER+/PR+) ve HER2 negatif olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca Ki67 ifadesi de düşüktür. Bu durum bu alt tipin metastasının düşük olduğunu ve aynı zamanda hormonal tedaviye de iyi bir cevap verdiğini göstermektedir (Cheang ve ark., 2009).

2.2.2. Luminal B

Bir diğer luminal meme kanseri ise Luminal B'dir. Luminal B, luminal A alt tipi ile aynı olarak ER/PR+ olsa da Ki-67'nin ifadesi Luminal A'ya göre daha yüksek olup HER-2 reseptörünün ifadesi negatif veya pozitif olarak değişebilmektedir. Bu durum Luminal B'nin Luminal A'dan yüksek bir çoğalma hızı ve agresif seyirli yayılım yaptığını göstermektedir (Cheang ve ark., 2009). Luminal B'ye sahip tümörler Luminal A alt tipine

göre hücre döngüsü ve proliferasyonu ile ilişkili genlerde daha yüksek bir gen ifadesine sahiptir (Kuong ve Loeb, 2013). Bunu bir sonucu olarak da Luminal B'nin daha kötü bir prognozu olduğu görülmektedir.

2.2.3. HER-2 Pozitif

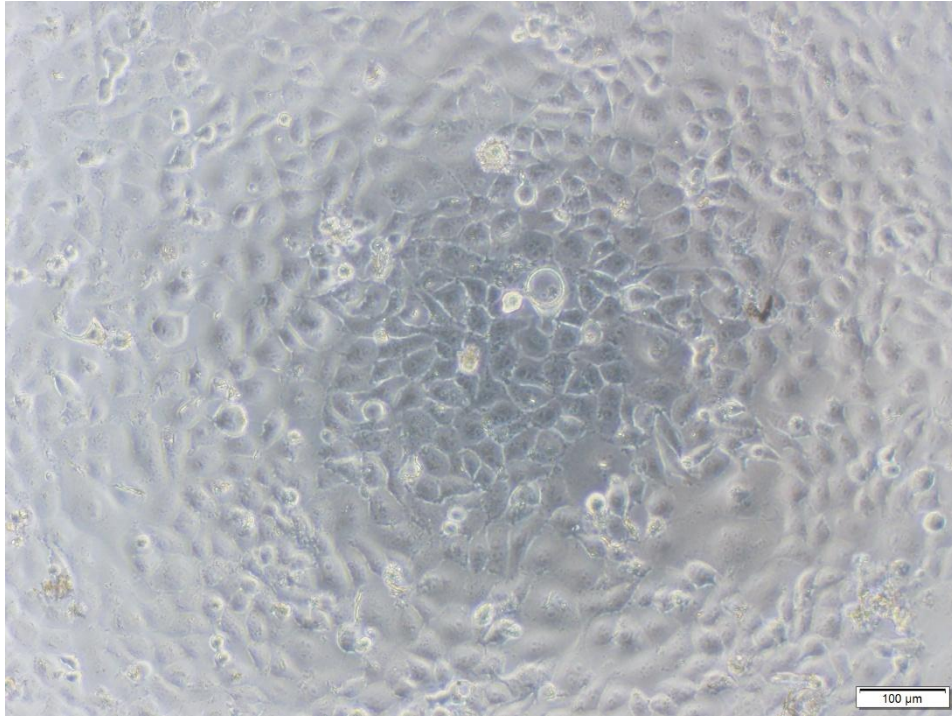
Bu alt tipte HER-2 geninde aşırı ifade veya amplifikasyon meydana gelmekte olup hormon reseptörlerinin ifadesi ise olmamaktadır. HER-2 aktive olduğunda hücre içi sinyal yollarını (örneğin MAPK ve PI3K) aktive ederek tümör hücresinin hızlı çoğalmasını ve metastaz yapma kapasitesini artırmaktadır (Feng ve ark., 2018). HER-2 pozitif tümörler, tüm meme kanseri vakalarının yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır (Keegan ve ark., 2012) protein ile RNA seviyelerinde incelendiğinde HER-2 ve proliferasyon genlerinin yüksek, luminal ile ilişkili genler ortalama, bazal ile ilişkili genlerin düşük bir seviyede ifade edildiği görülmektedir. Bunlara ek olarak DNA seviyesinde ise bu alt tipe ait tümörlerde mutasyonların birikimi en fazla olduğu raporlanmaktadır (Kuong ve Loeb, 2013). Tüm bunlara bağlı olarak HER-2 pozitif meme kanserine sahip hastalarda hücrelerin yayılımı vücutta yayılımı daha fazla olup prognozlarında kötü bir seyir gözlemlenmektedir.

2.2.4. Üçlü Negatif Meme Kanseri

Bu meme kanseri alt tipinde hem HER-2 hem de ER/PR ifadeleri olmadığı için bu türe üçlü negatif denmektedir. Bu kanserde, Ki67 proteini ve bazal tabakada sentezlenen keratinlerin ekspresyonu yüksektir, buna karşın diğer kanser alt tipleri ile ilişkili genlerin ifadeleri genellikle düşük veya ortalama düzeydedir. Ayrıca DNA seviyesinde mutasyon taşıma oranı HER-2 pozitif alt tipinden sonra ikinci sırada olup bunların çoğunda hipermetilasyon bulunmaktadır (Prat ve ark., 2015). Bu alt tip, hücre büyümesi, proliferasyonu ve DNA onarımında görev alan *brca1* gen mutasyonlarına sahip kadınlarda daha sık görülmektedir (Huzarski ve ark., 2013). Bu kanser türünün görülme sıklığı yaklaşık %15 civarında olsa da agresif yapıları sebebiyle meme kanseri bağlantılı ölümlerde rol oynamakta olup ER+'ya sahip alt tiplere göre daha kötü bir prognoza sahiptir (Merino Bonilla ve ark., 2017; McGuire ark., 2017).

2.3. MDA-MB-231 Kanser Hücre Hattı

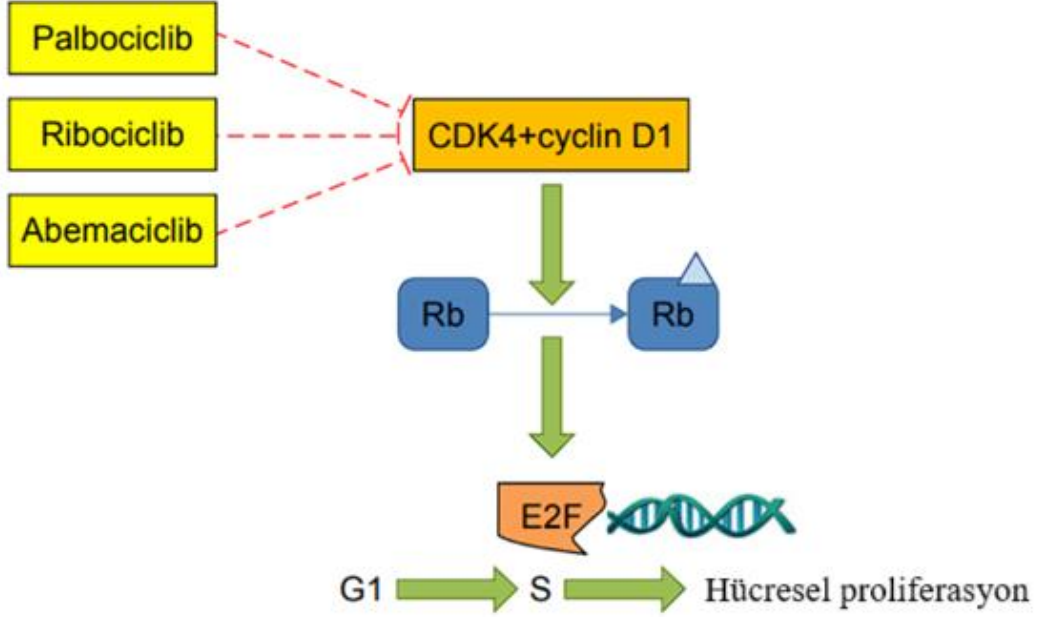
İlk kez Amerika’da yer alana M.D. Anderson Cancer Centar’da 51 yaşında olan bir Kafkas kökenli kadının plevral efüzyona sahip metastatik bölgesinden üretilmiş olan MDA-MB-231 (Şekil 2.3), iyi karakterize edilen ve literatürde sıkça kullanılan bir meme kanseri hücre hattıdır (Cailleu ve ark., 1974). Bu hücre hattında ER, PR ve HER-2 reseptörlerinin ifadesi bulunmamaktadır. Bu nedenle bu hücre hattı üçlü negatif meme kanseri (TNBC) alt tipine aittir (Lehmann ve ark., 2011). Buna bağlı olarak *in vitro* çalışmalarda agresif ve invaziv özellik taşımasını sağlamaktadır. MDA-MB-231 hücre hattı özelliklerinden dolayı metastaz, ilaç direnci ve TNBC’nin immün kaçış mekanizmalarının araştırılmasında kritik bir rol oynamakta ve hücre hareketliliğini, invazyonunu ve üç boyutlu mikroçevrelerde tümör davranışını incelemek için genellikle yara iyileşme testi, transwell invazyon testleri ve 3D sferoid kültürleri gibi çalışmalarda kullanılmaktadır (Bonnier ve ark., 2015).



Şekil 2.3. MDA-MB-231 hücre hattının inverted mikroskop görüntüsü (Ölçek Çubuğu: 10x)

2.4. Abemaciclib

Serin/treonin kinaz sınıfına bağılı olan siklin bağımlı kinaz (CDK) ailesi, hücre döngüsünün G1, S, G2 ve M fazlarının ilerlemesinde ve buna bağılı olarak hem hücre proliferasyonunu hem de hücre içi veya dışı yollar ile ilgili transkripsiyonu düzenlemede kilit rol oynamaktadır (Praveenkumar ve ark., 2021; Chong ve ark., 2020). Bu ailenin üyelerinden CDK4/6, hücre proliferasyonunun kontrolünde özellikle önem taşımaktadır (Kwapisz, 2017). Kanser hücrelerinde düzensiz bir şekilde aktive olan büyüme sinyalleri, Siklin D'nin CDK4/6 ile etkileşimine yol açarak bu kinazları aktif hale getirmektedir (Guney Eskiler ve ark., 2022). Aktive olmuş CDK4/6, tümör baskılayıcı protein olan retinoblastoma proteininin (pRb) hiperfosforilasyonuna neden olmakta ve bunun sonucunda bu protein inaktive olmaktadır. Böylelikle hücreler G1 fazını aşarak kontrolsüz şekilde bir bölünmeye başlamaktadır (Arslan ve ark., 2022). Bu nedenle kanser tedavisinde CDK4/6 inhibitörleri yaygın biçimde kullanılmakta olup, bunlardan biri de Abemaciclib'dir. Abemaciclib, öncelikle meme kanseri başta olmak üzere diğer kanser tiplerinde de kullanılan bir CDK4/6 inhibitörüdür (Arslan ve ark., 2022). Abemaciclib, CDK4/6'nın N ve C terminal uçlarında yer alan ATP bağlanma bölgelerine rekabetçi bir şekilde bağlanarak etkinlik gösterir (Zhou ve ark., 2020). Hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları sayesinde ATP'nin yerine geçerek CDK4/6 aktivitesini engellemektedir (Arslan ve ark., 2022). Bu engelleme, pRb ve ilişkili gen ve proteinlerin ekspresyonunu baskılayarak hücre döngüsünün G1 fazından S fazına geçişini önler. Sonuç olarak nükleotid sentezi ve DNA replikasyonu baskılanır, hücrenin kontrolsüz bölünmesi azalmaktadır (Zhou ve ark., 2020) (Şekil 2.4). Böylelikle abemaciclib, kanser hücrelerinin proliferasyonunu hedef alarak tedaviye önemli ölçüde katkı sağlamaktadır.



Şekil 2.4. Abemaciclib/Palbociclib/Ribociclib'in hücre döngüsüne etkisinin şematik olarak gösterilmesi (Corona ve Generali, 2018)

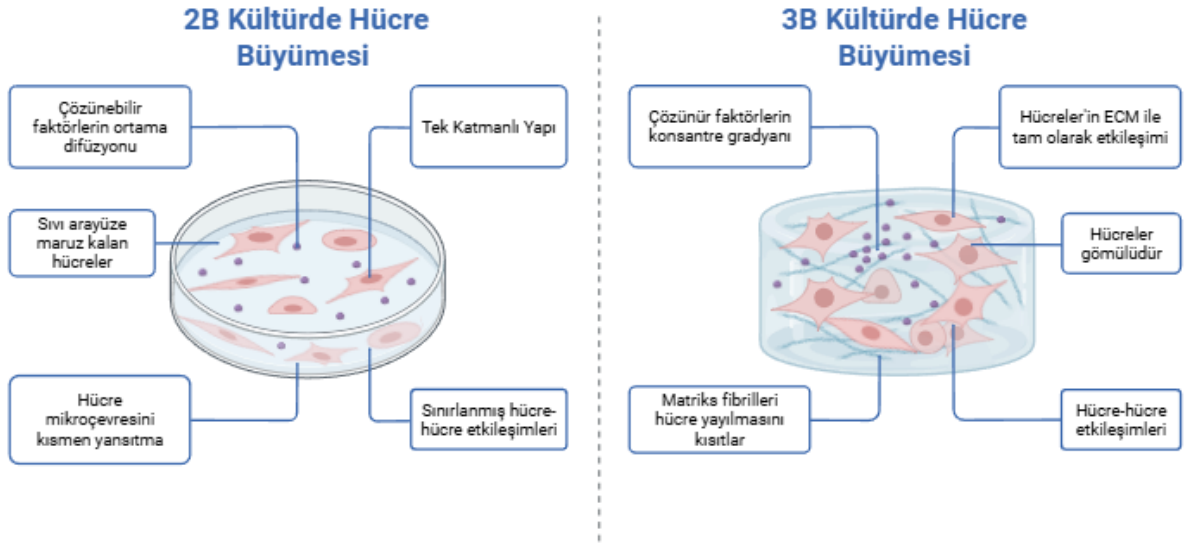
Abemaciclib'in MDA-MB-231 hücre hatları üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalar, bu ilacın hücrelerde antiproleratif ve apoptotik etkiler gösterdiğini ortaya koymaktadır. Ozman ve ark. 2021 yılında yaptıkları çalışmada MDA-MB-231 hücrelerinde Abemaciclib'in etkilerine bakmışlardır. Abemaciclib hücre hattında hücrelerin G0-G1 fazında kaldığını, kromatinlerin yoğunlaştığını, kaspaz-3 ve Bax seviyelerinde artışın ile Bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinlerin seviyesinde azalışa bağlı olarak apoptotik hücre ölümüne neden olduğunu ayrıca geniş sitoplazmik vakuollerin de oluştuğunu rapor etmişlerdir (Ozman ve ark., 2021). 2019 yılında yapılan bir çalışmada araştırmacılar Abemaciclib ve Doksorubisin ilaçlarının MDA-MB-231, BT-549 ile MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında yaşlanmayı (senescence) nasıl indüklediği ve bu hücrelerin bağışıklık hücreleri tarafından öldürülmeye karşı duyarlılığı incelenmişlerdir. Doksorubisin'in DNA hasarı oluşturarak MDA-MB-231 ve BT-549 hücrelerinde yaşlanmayı tetiklediği ve bu hücrelerin T hücreleri ve doğal öldürücü hücreler (NK) tarafından kolayca hedef alındığı görülmüştür. Buna karşın, Abemaciclib CDK4/6 inhibisyonu yoluyla MDA-MB-231 hücrelerinde yaşlanma oluşturmalarına rağmen, bu hücreler anti-apoptotik proteinlerin yüksek seviyede kalması nedeniyle bağışıklık hücrelerine karşı direnç göstermiştir. Sonuç olarak Doksorubisin'in hücreleri

yaşlandırarak bağışıklık hücreleri tarafından öldürülmelerini kolaylaştırdığını Abemaciclib'in ise hücreleri apoptotik yoldan öldürdüğünü tespit etmişlerdir (Inoa ve ark., 2019).

2.5. İki Boyutlu ile Üç Boyutlu Hücre Kültürleri Arasındaki Farklar

İki boyutlu (2B) hücre kültürü, bir kültür tüpü veya düz petri kaplarında oluşturularak uzun yıllardır bilimsel çalışmalarda kullanılmaktadır (Kapałczyńska ve ark., 2018; Jensen ve Teng 2020). Ayrıca düşük maliyetleri ve geniş kaynak erişimleriyle birlikte *in vitro* hücre çalışmalarında en çok tercih edilen teknik haline gelmişlerdir (Wang ve ark., 2022). Bununla birlikte kanser ve tümör biyolojisine ait çalışmalar ilerleyip derinleştikçe, 2B kültürlerin sınırlamaları daha belirgin hale gelmektedir. Kanser hücreleri kendi mikro çevrelerini de oluşturan diğer sağlıklı hücreler ve ekstraselüler matris (ECM) ile çevrili oksijen ve besinler ile diğer kimyasal ve fiziksel streslere maruz kalacak şekilde üç boyutlu (3B) bir ortamda gelişir. Bu koşullarda, tümör hücreleri optimum büyüme ve hayatta kalma koşulları altında büyüme eğiliminde olup hücre etkileşimleri ve ECM'den gelen diğer sinyallerden büyük oranda etkilenmektedir. 2B hücre kültürleri ise tümör davranış ve mekanizmalarını belirli bir ölçüye kadar yansıtılabilseler de 3B yapıdan yoksundurlar (Wang ve ark., 2014). Bu sebeple hücreler arası etkileşimler ile hücre-matris arası etkileşimlerden ve dokuların sahip olduğu *in vivo* yapısal organizasyonunu taklit edemezler. Bu bağlamda, 3B hücre kültürleri, *in vivo* koşulları daha iyi bir şekilde taklit etmekte ve araştırmacılara kanser hücrelerinin yapıları hakkında daha derin ve doğru bilgi sağlamaktadır. İki kültür modelinin karşılaştırması Şekil 2.5.'de gösterilmektedir.

2B ve 3B Hücre Kültürlerinin Karşılaştırılması



Şekil 2.5. 2B ile 3B hücre kültürlerinin karşılaştırılması. BioRender ile tasarlanmıştır.

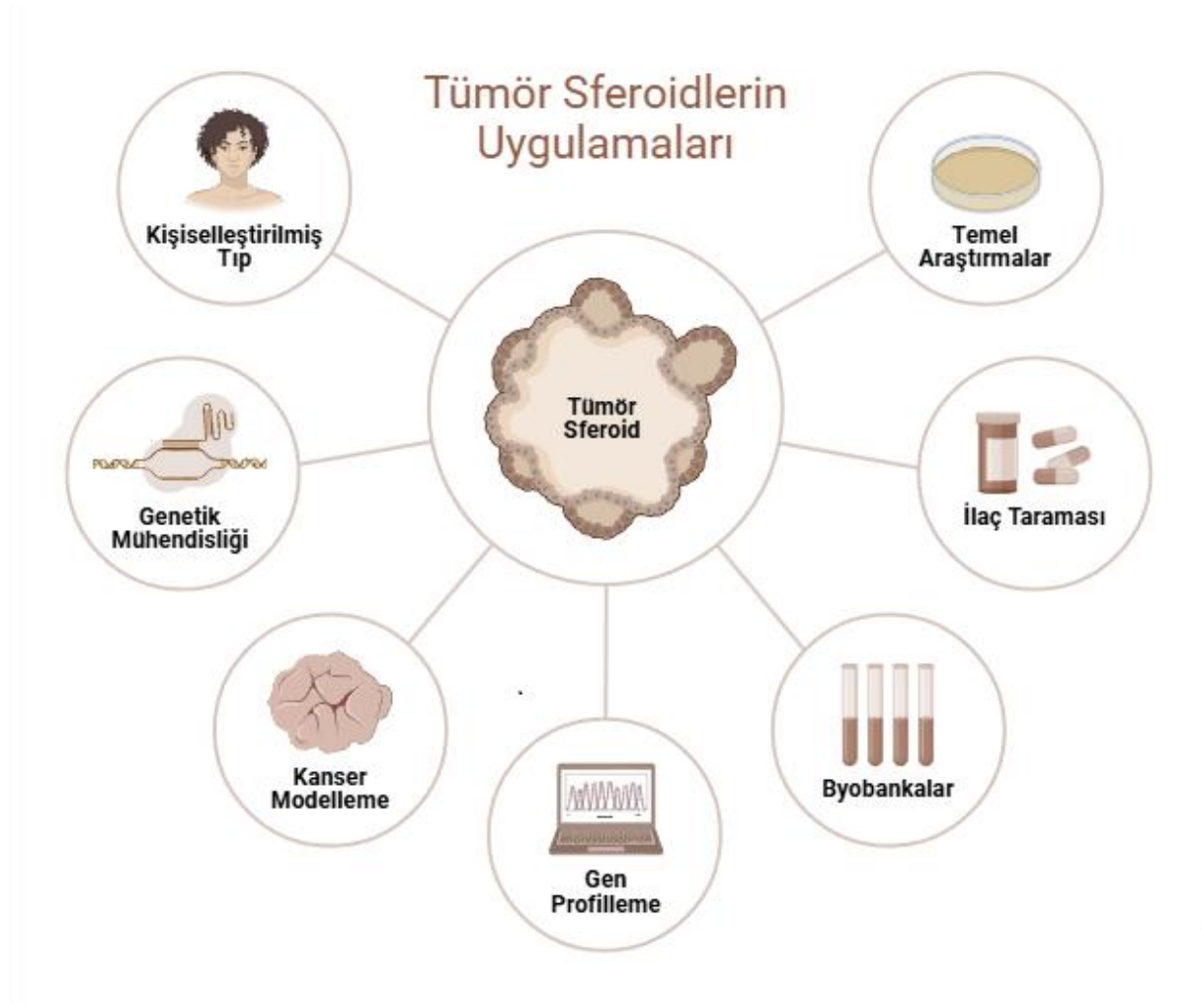
3B hücre kültürü, hücrelerin birden fazla katmanda organize olduğu yapıları temsil eder. Bu sayede *in vivo* bir ortamda tümör hücrelerinin fiziksel ve kimyasal yapılarını 2B kültürlerine göre daha başarılı bir şekilde taklit etmektedir (Kapałczyńska ve ark., 2018). Dolayısıyla bu kültürler, tümörlerin hücre dışı matris organizasyonunu, hücre-hücre etkileşimlerini ve sinyalleri ile üç boyutlu mimarisini daha iyi yansıtmaktadır (Rolver ve ark., 2019). Bunlara ek olarak tümörlerin fizikokimyasal yapılarını ve davranışlarını yansıttıkları için son yıllarda yapılan çalışmalarda iyi ve kötü huylu tümörlerin doku mimarisini tanımlamak ve malign transformasyondaki değişikliklerini açıklamak amacıyla 2B kültürlerin yerine kullanımları yaygınlaşmaktadır (Habanjar ve ark., 2021).

Üç boyutlu kültürler, tümörün fizikokimyasal yapılarını ve davranışlarını yansıttıkları için, son yıllarda yapılan çalışmalarda iyi ve kötü huylu tümörlerin doku organizasyonlarını tanımlamak ve malign transformasyondaki değişiklikleri açıklamak amacıyla iki boyutlu kültürlerin yerine kullanılmaktadır (Habanjar ve ark., 2021). 2B kültürler, kanser hücrelerinin gen ve protein ifadelerini tam olarak yansıtamadıklarından dolayı bu durum fonksiyonel farklılıklara yol açmaktadır. Buna karşılık 3B kültürlerin gen ve protein ifadeleri orijinal hücrelerin gen ifade profillerine büyük oranda benzemektedir. Bunlara ek olarak, ilaç çalışmalarında 3B kültürlerin ilaç direnci

açısından 2B kültürlerle oranla daha dirençli oldukları belirlenmiş olup bu çalışmalarda 3B kültürlerin kullanımı zamanla artmaktadır (Rolver ve ark., 2019; Fang & Eglen 2017).

2.6. Sferoid

Sferoidler, 3B kültür teknikleri ile oluşturulan ve hücrelerin üç boyutlu bir ortamda toplandığı hücre kümeleridir. Bu yapılar, hücre-hücre ve hücre-matris etkileşimlerini üç boyutlu bir ortamda sağlayarak *in vivo* tümör mikro çevresini gerçekçi bir şekilde modellemektedir (Velliou ve ark., 2020). Bu özellikleri sayesinde sferoidler temel araştırmalar, ilaç takibi, biyobanka depolamaları, gen profillemeye, kanser modelleme, genetik mühendisliği ve kişiselleştirilmiş tıp gibi birçok farklı bilim dallarında kullanılmaya devam etmektedir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Sferoidlerin uygulama alanları. BioRender ile tasarlanmıştır.

Sferoidlerin kaynakları, üretildikleri hücreye göre farklılık göstermektedir. Kanser araştırmalarında, kanser hücresinden üretilen sferoidler “tümör kaynaklı sferoidler” olarak isimlendirilmektedirler. Tümör kaynaklı sferoidlerde, kullanılan kanser hücrelerinin türleri ve kökenleri değişkenlik gösterebilir. Araştırma amacına bağlı olarak farklı sferoid modelleri geliştirilmiş olup, bu modellerin kullanım tercihleri araştırmacının hedeflerine göre çeşitlenmektedir (Ishiguro ve ark., 2017). Örneğin, Han ve ark. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, 3B sferoid modelleri kullanılarak CRISPR taramaları gerçekleştirilmiş ve bu taramaların 2B hücre kùltürlerine göre tümör biyolojisini daha iyi yansıttığı gösterilmiştir. Bu alışma, kanser büyümesiyle ilişkili genetik farklılıkları daha iyi anlamak için sferoid modellerinin önemini vurgulamaktadır (Han ve ark., 2020).

Tu ve arkadaşları (2021), pankreas kanser hücre hattı PANC-1’in 2B kùltürleri ve 3B sferoidleri üzerinden eksozomları incelemişlerdir. Beřinci günde oluşan sferoidlerin boyutları tek tip olarak gözlenmiştir. Eksozomların varlığı, RNA seçici boya ve floresan görüntüleme ile doğrulanmış; sonuçlar 2B kùltürlere kıyasla sferoidlerde eksozom miktarının arttığını göstermiştir. Aynı durum, TEM görüntüleriyle de desteklenmiştir. Sonraki aşamada, PANC-1 hücrelerindeki ve sferoidlerdeki miRNA’lar (miR-17-5p, miR-21, miR-96, miR-196, miR-1246, miR-4454) qRT-PCR ile ölçülmüştür. Genel olarak 3B sferoidlerde miRNA ekspresyonu daha yüksek saptanmıştır. Eksozomal miRNA’lardan miR-44454 sferoidlerde azalırken, miR-96’da belirgin fark bulunmamakla birlikte ekspresyonda artış gözlenmiştir. Genel olarak eksozomlardaki miRNA seviyeleri, hücre içi seviyelerden yüksektir. Ayrıca hücrelerden ve sferoidlerden izole edilen eksozomlardaki GPC-1 protein miktarları ölçülmüştür. PANC-1 eksozomları ile sferoidler arasında GPC-1 seviyelerinde farklılık görölmesine rağmen, eksozomların GPC-1 düzeylerinde anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bununla birlikte, sferoidlerin GPC-1 konsantrasyonu daha yüksek, fakat mRNA seviyesi 2B kùltürdekine göre daha düşüktür. Sonuç olarak 3B sferoidler, pankreas kanser ilerlemesiyle ilgili daha fazla özellik taşımakta ve 2B kùltürden daha fazla eksozom üretebilmektedir. Bu da sferoidlerin kanser gelişimi ve ilerlemesini incelemede önemli bir model olabileceğini vurgulamaktadır.

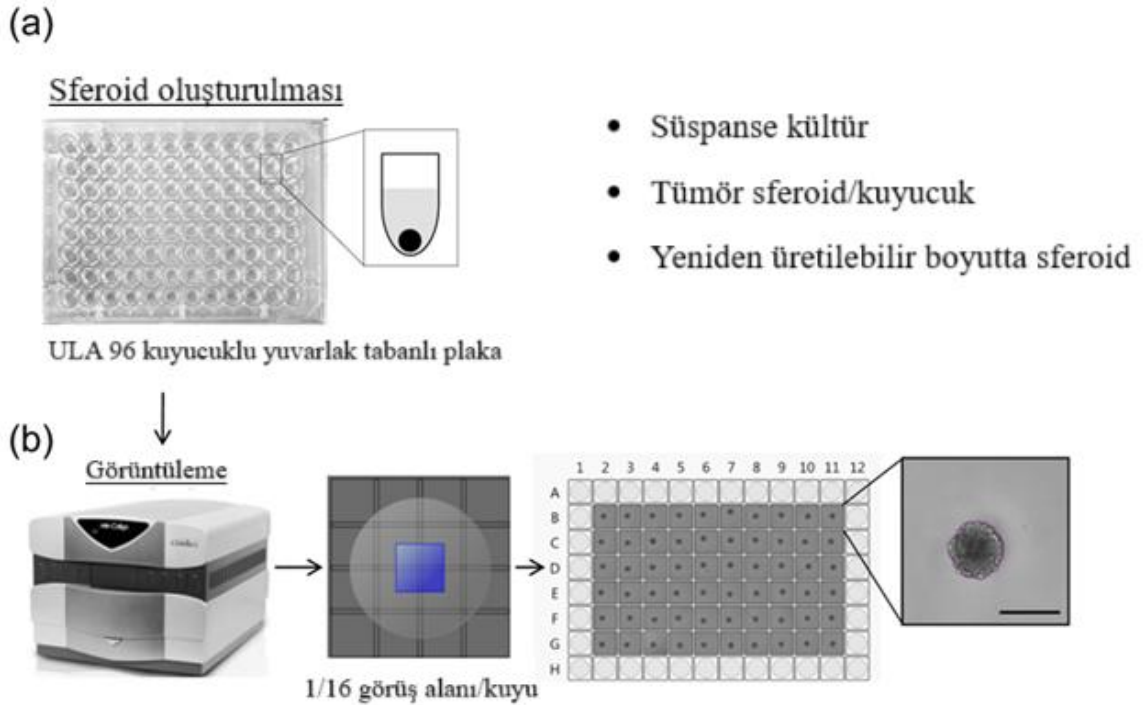
Reynolds ve arkadaşları (2017), MCF-7 ile MDA-MB-23 hücre hatlarını, üç farklı modelde (2D tek tabaka, kolajen jelde 3B yaygın model ve tümör mimarisine benzer 3B sferoid) Sisplatin (10 ng/mL) ve Paklitaksel (1,5 µg/mL) ile 72 saatlik inkübasyon sonrası

incelemişlerdir. MDA-MB-231 hücrelerinde, 2B ve 3B yaygın modelde küresel hücre artışı gözlenmiş, ancak sferoid modelde farklı bir yanıt alınmıştır. Paklitaksel uygulamasında sferoid çevresinde önemli azalma olurken, Sisplatin ile benzer fakat daha az belirgin bir azalma görülmüştür. İlaçların sferoid içine nüfuz edebildiğini göstermek için paklitakselin floresan analogu izlenmiş ve çekirdeğe kadar penetrasyon sağladığı doğrulanmıştır. Hücre canlılığı MTS yöntemiyle ölçülmüştür. 2D modelde Paklitaksel ve Sisplatin sonrası canlılık %17 ve %16, 3D yaygın modelde ise %30 ve %37 bulunmuştur. Sferoidlerde, periferik hücreler bu değerlere yakın yanıt verirken, çekirdek hücreleri %91 ve %97 canlılık göstererek daha dirençli olduklarını göstermiştir. Bu farklılığı anlamak için çekirdek ayrılıp yeniden kolajende kültürlenmiş; metabolik aktivite ve oksijen tüketimi incelendiğinde, sisplatin ile yüksek oksijen varlığı, ilacın proliferasyonu yavaşlattığını ancak tamamen inhibe edemediğini göstermiştir. Kanser kök hücresi (CSC) analizi, ALDEFLUOR, mammosphere ve RT-qPCR yöntemleriyle yapılmıştır. Sferoidlerde ALDH+ hücre oranı, özellikle çekirdek kısmında çevre hücrelere göre yaklaşık iki kat yüksek bulunmuş ve mammosphere sonuçlarıyla da desteklenmiştir. RT-qPCR verilerinde ALDH1A3 ifadesi hem çekirdekte hem çevrede arttığı görülmüştür. TaqMan testi ile ALDH1A3, SOX2, OCT4 ve NANOG ekspresyonu değerlendirilmiş; Paklitaksel sonrası bu genlerde artış en çok sferoid çekirdeğinde gözlenmiştir. Sisplatinde ise 2D ve 3D yaygın modelde artış olsa da sferoid modelde önemli bir değişim olmamıştır. Benzer deneyler MCF-7 hücre hatlarında da yapılmış ve genel olarak aynı sonuçlar elde edilmiştir. Sonuç olarak, Paklitaksel ve sisplatin tek başlarına tümör büyümesini tamamen engelleyememiştir. Ancak sferoid modeli, kemoterapiye direnç ve kanser kök hücrelerinin etkisini daha net ortaya koyarak, tümörlerin doğal mikroçevre özelliklerinin önemini vurgulamaktadır.

2.7. Ultra Düşük Bağlantı Plakaları (Ultra Low Attachment Plates (ULA))

Sferoid oluşturmak için kullanılan bir yöntem ULA plateelerdir. Bu yöntemi ilk olarak 2012'de Vinci ve ark., 96 kuyulu U-tabanlı ultra-düşük bağlantı mikroplate'leri (ULA-plates) ile 3B tümör sferoidlerini oluşturmak ve analiz etmek için kullanmışlardır. Polistiren kuyu yüzeyine kovalent olarak bağlı hidrofilik, nötr yüklü bir kaplama ile muamele edilmiş U-tabanlı 96 oyuklu ULA plateeleri, çeşitli insan tümör hücre hatlarında sferoidlerin, yoğun veya gevşek kümelenmelerin büyümesini ve oluşumunu

desteklemiştir (Şekil 2.7). Bu platelerde yetiştirilen sferoidler, agarda yetiştirilenlere benzer şekilde morfolojiler göstermiş ve immüno-histokimyasal boyalamalar göstermiştir. Yine bir başka çalışmada Ekert ve ark (2014), yine bu yöntemi kullanarak akciğer kanserine ait 2B hücre hatlarını ve 3B sferoidleri karşılaştırmışlardır. Burada hücrelerin sferoidleri oluşturmak için kendiliğinden birleştiklerini ve 2B hücre hatları ile karşılaştırıldıklarında farklılaşmış epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve cMET ifadenmesi ve sinyalasyonları sergilediklerini göstermişlerdir. Bu yöntemde akciğer kanser sferoidlerinin hücresel yanıtlarının ilaçlara ve büyüme faktörlerine daha iyi yanıt verdiğini doğal tümör mikro çevresini daha iyi taklit ettiklerini göstermişlerdir (Ekert ve ark., 2014; Sant ve Johnston, 2017).



Şekil 2.7. ULA platelerde sferoid oluşturulması. (a) ULA plakalara hücre ekimi. (b) sferoidlerin oluşumu ve görüntülenmesi (Vinci ve ark., 2012).

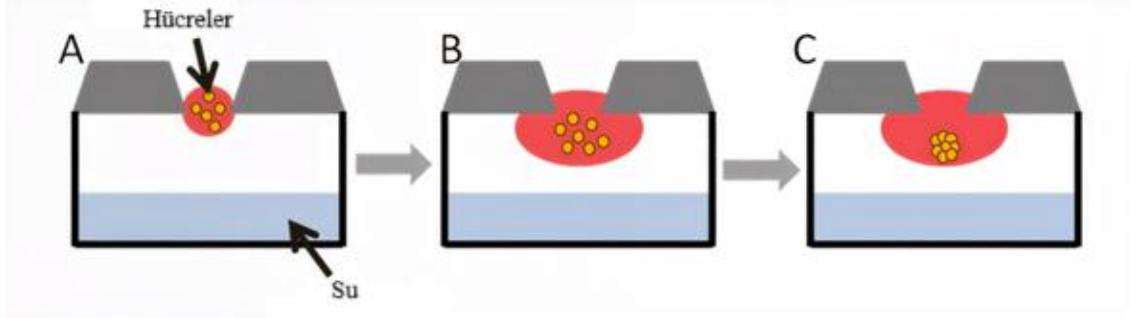
2022 yılına ait bir çalışmada Chen ve ark. MCF-7 hücrelerini kullanarak kendi geliştirdikleri ULA yöntemi ile oluşturulan sferoidler üzerinde kemoterapi ilaçlarının etkilerine bakmışlardır. Sferoidler 500 ila 5000 hücre olacak şekilde plakalara ekilmiş ve ardından santrifüjlenmiştir. Ardından inkübasyona bırakılmış ve hücreler gözlenmeye başlanmıştır. Mikroskop gözlemlerinde sferoidler üçüncü günden itibaren büyümeye

başlamışlardır. Steroidlerin büyümesi deney sonlanana kadar devam etmiştir. Kullandıkları yöntemin sferoidlerin herhangi bir ortama bağlanmadan kanser gibi büyüebildiklerini ortaya koymuştur. Çalışmacılar oluşturdukları yöntemi doğrulamak için 2000 adet hücreyi kuyucuklara ekmişler ve ertesi gün oluşan sferoidleri hem STX-64, kuersetin (QUE) ve tamoksifen (TAM) ile bunları birlikte sferoidler ile muamele etmişlerdir. Yedi günlük muamelenin sonucunda bir östrojen sentaz inhibitörü olan STX-64 sferoid büyümesini inhibe etse de bunları tamamen öldürememiştir. Bununla birlikte kuersetin ve tamoksifen ise bir haftanın sonunda sferoidleri tamamen yok etmiştir. Kuersetin hem bir flavonoid olup hem de SULT1E1 genini ifadesini meme kanseri hücrelerinde yukarı regüle eder ve böylece sferoidleri öldürür. Tamoksifen ilacı en eski meme kanseri ilaçlarından olup bir östrojen reseptörü antagonisti olarak sferoidleri öldürmüştür. G Protein-bağlı Östrojen reseptörü (GPER), hücre içi kalsiyum hareketini ve fosfatidilinositol (3,4,5)-trisfosfat sentezini kontrol eden bir plazma membran proteinidir. Bunun antagonistleri olan G-1 ve G15, hücre ekiminin ikinci gününde sferoidlere verilmiştir. İki de birbirleri ile uyumlu olarak sferoid büyümesini inhibe etmişlerdir. En sonunda spesifik östrojen reseptörlerinin α ve β antogonistlerini sferoidlerle muamele ettiklerinde sferoid büyümesini inhibe etmede çok etkili olmadıklarını görmüşlerdir. Bu antogonistlerin MCF-7 sferoid büyümesinde kritik bir rol oynamadığını düşündürmüştür. Çalışmanın sonucu olarak hedeflenen ilaç deney sonuçları her östrojen reseptörünün sferoid büyümesini etkilemediğini göstermekte olup kişiye yönelik tedavide sferoidlerin kullanılabileceğini göstermiştir.

2.8. Asılı Damla (Hanging Drop)

Asılı damla, sferoid oluşturmada iskele içermeyen yöntemlerdendir. Bu yöntem herhangi bir özel ekipman gerektirmemekte ve düşük hacimlerde hücre süspansiyonu içermektedir. Asılı damla yönteminde önce hücreler mikropalakada süspanse edilir ardından buradan alınan süspansiyon petri kapağının iç kısmına damlalar halinde eklenmektedir (Şekil 2.8.). Ardından petri kapağı ters çevrilir. Daha sonra hücreler birkaç günlüğüne inkübasyona bırakılır. Bu süreç boyunca yer çekimi ve yüzey geriliminin etkisiyle hücreler birbirlerine yapışmakta ve damlanın altında yoğunlaşmaktadır. Belirlenen süre sonunda ise sferoidler elde edilmektedir. Sferoidler oluşurken hücreler birbirleri ve ekstraselüler matris ile doğrudan temas halindedir. Asılı damla yönteminde karmaşık

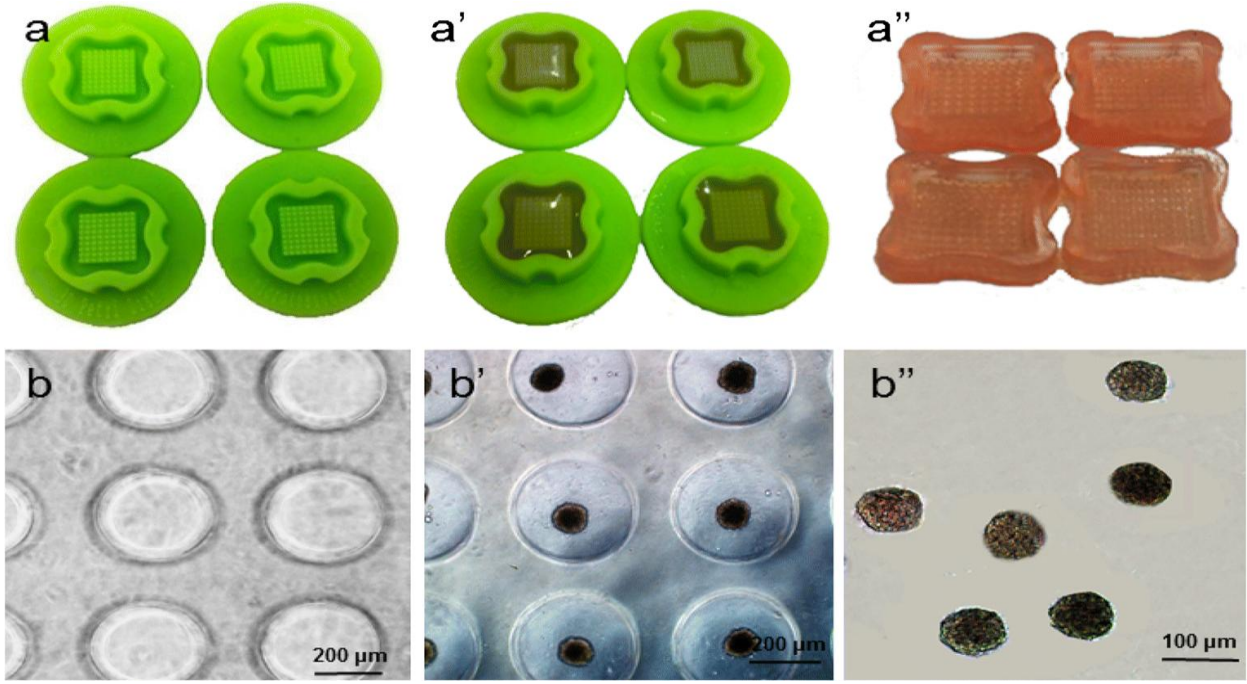
sferoid oluşmayabilir ve ayrıca düşük verim de oluşabilir. Yine de bu yöntem kullanılırken çeşitli modifikasyonlar yapılabilmektedir (Białkowska ve ark., 2020).



Şekil 2.8. Asılı damla tekniği ile sferoid oluşturulması. (A) Hücrelerin ekimi. (B) Asılı damlada hücrelerin tutulumu. (C) Hücrelerin sferoid oluşturması için toplanması (Białkowska ve ark., 2020).

2.9. 3D Petri Dish®

İskele kullanılmadan sferoid oluşturma yöntemlerinden biri, "3D Petri Dish®" olarak adlandırılan mikro kalıplardır. Bu kalıplar, hücrelerin homojen bir şekilde dağılmasını sağlayan girintili yüzeylere sahiptir ve hücrelerin üç boyutlu sferoidler oluşturmaya olanak tanımaktadır (Napolitano ve ark., 2007). Çapları 400 ila 800 μm arasında değişen bu boşluklara sahip kalıplar, 12 veya 24 kuyucuk içerebilecek şekilde tasarlanmıştır. Kuyucukların üzerine ısıtılarak uygulanan agaroz gibi hidrojeller dökülür ve jel oda sıcaklığında polimerleştiğinde, hücrelerin iskelesiz ortamda sferoid oluşturmaları sağlanır (Basu ve ark., 2020). İstenilen sayıda hücre ekimi ve kontrol edilebilen sferoid boyutları Petri Dish®'lerin kullanımına avantaj sağlamakta olup ayrıca kalıpların otoklavlanması hücre çalışmalarında steril koşullara uygunluk sağlamaktadır (Şekil 2.9.). Bunlara ek olarak bu kalıplar primer hücre, kök hücre ve kanser hücreleri gibi farklı özellikteki hücrelerin tek başlarına veya birden fazla ekimi gibi kolaylıklar sağlamaktadır. Bu model çeşitli hücre tiplerini bir araya getirip mikro doku oluşturma ve bu dokunun çeşitli ilaç ve kimyasallar ile etkileşimini rahatlıkla değerlendirilmesinin sağlanması nedeniyle son yıllarda bilimsel çalışmalarda kullanımı artmıştır (Napolitano ve ark., 2007; Basu ve ark., 2020).



Şekil 2.9. 3B Petri Dish® ile sferoid üretimi. (a) 3B Petri Dish® kalıpları. (a') Kalıpların içindeki agarozlar kalıplar. (a'') Agaroz Kalıplar. (b) Kalıpların mikroskop görüntüsü. (b') Kalıpların içindeki oluşmuş sferoidler. (b'') İnkübasyon sonrası kalıplardan çıkartılmış sferoidler (Guo ve ark., 2019)

Yapılan bir çalışmada iki tiyopirimidin türevi (BUC ve PEC), 3D Petri Dish® yöntemiyle oluşturulan MCF-7 sferoidlerindeki etkileri incelenmiştir. Öncelikle 2B hücre kültürlerinde BUC ve PEC ile yapılan sitotoksikite deneylerinde, iki bileşiğin de konsantrasyon ile inkübasyona bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı ve 24 saatin sonunda IC_{50} değerlerinin yaklaşık $20 \mu M$ olduğu; 48 saat sonunda ise bu değerin daha da azaldığı saptanmıştır. Bu nedenle sferoid çalışmaları için $10 \mu M$ derişim ve 48 saatlik inkübasyon seçilmiştir. BUC ve PEC, kanser hücrelerinde koloni oluşumunu tamamen engellemiş ve güçlü sitotoksik etki göstermiştir. 1×10^6 hücre kullanılarak oluşturulan sferoidlerde, 3-4 günlük inkübasyonun ardından $10 \mu M$ bileşiklerle muamele edilmiştir. Floresan boyamalar, kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığında azalma ve turuncu renkli ölü hücreler nedeniyle sferoid düzeninin bozulduğunu ortaya koymuştur. Hücre döngüsü analizinde, 48 saat sonunda G1 fazında artış tespit edilmiştir; bu durum en iyi

antiproliferatif etkinin 48 saat sonunda oluştuğunu göstermektedir. Oksidatif stres ölçümlerinde, PEC uygulaması H₂O₂ üretimini ve bunu yok eden katalaz enzim aktivitesini artırırken, BUC katalaz aktivitesini yükseltmemiştir. Ayrıca PEC, glutatyon derişimini azaltarak hücre ölümünü tetiklemiştir. H₂O₂ üretimiyle ilişkilendirilen lipid peroksidasyonu düzeyleri, her iki bileşikte de yükselmiştir. BUC, karbonillenmiş protein düzeyini artırırken, PEC anlamlı bir etki göstermemiştir. Sonuç olarak tiyopirimidin türevlerinin, 3B sferoid modellerinde etkili antitümör ajanlar olabileceği vurgulanmıştır (Gomes ve ark., 2021).

2.10. Sterilite Testleri

Steril bir laboratuvar ortamında hazırlanmış hücre kültüründe istenmeyen bakteri ve mantar gibi mikroorganizmaların hücreleri enfekte etmesine kontaminasyon denmektedir. Kontaminasyon laboratuvarlarda çalışan kişilerden, koruyucu giysilerden, kullanılan araçlardan veya birden fazla hücre kültürleri ile çalışılıyorsa da çapraz kontaminasyon şeklinde olmaktadır. Kontaminasyon, mikroskobik ya da makroskobik değerlendirilmeler ile gözlemlenebilmektedir. Kontaminasyonu önlemek için otoklav, kuru ısı olarak adlandırılan pasteur, ultraviyole (UV) ışın uygulaması gibi dezenfekte yöntemleri kullanılmaktadır. Ayrıca serum ve sıvı besiyeri gibi sıvı ürünlerin mekanik olarak ultra filtrelerden geçirilerek sterilitelevlerinin sağlanması, yeni hücre hatlarının deneylerde kullanmadan önce sterilitelevlerinin kontrolü, laboratuvarında çalışanların aseptik ortama uygun çalışması ve deney ortamının düzenli olarak temizliğine özen gösterilmesi kontaminasyon riskini azaltan önlemler arasında yer almaktadır (Freshney, 2021).

Makroskobik kontaminasyonlar besiyerinde bulanıklık veya pH değişimine bağlı renk değişikliklerinden kaynaklanabilmektedir. Buna ek olarak kültür kaplarının mikroskop altında incelenmesi ile mikrobiyal kontaminasyon gözlenmektedir. Mikrobiyal kontaminasyon olduğu belirlenen hücre kültürlerinin yaklaşık %30'dan fazlasının *Mollicutes* sınıfına ait *Mikoplazma* 'lardan kaynaklı olduğu rapor edilmiştir (Jung ve ark., 2003). Mikoplazmalar 0,3 µm ila 0,8 µm arasında değişen boyutlarda olmakta ve memeli hücrelerin endozomlarında yaşayan basit prokaryot hücrelerdir. Bir temel amino asit olan arjinini enerji kaynağı olarak kullanan bu mikroorganizmalar, kontamine ettiği hücreyi arjininden yoksun bırakmaktadır. Buna bağlı olarak konak hücreler protein bazlı sentez süreçlerinde aksaklıklar yaratarak metabolizmayı olumsuz bir şekilde etkilemektedir. Pek

çok bakterinin aksine Mikoplazmaların bir hücre duvarı yoktur. Dolayısıyla, bu organizmalar besiyerlerine eklenen ve hücre duvarlarını hedef alan penisilin/streptomisin gibi antibiyotiklere karşı direnç mekanizması sergilemektedirler (Nikfarjam ve Farzaneh, 2012). Bu nedenle mikoplazma kontaminasyonu hücre çalışmalarında büyük bir risk oluşturmaktadır.

Hücre kültürleri ile yapılan çalışmalarda mikoplazma kontaminasyonun tespit edilmesi için başvurulan yöntemler arasında polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), enzime bağlı immünosorbent testleri (ELISA) ve DAPI veya Hoechst gibi maddeler ile gerçekleştirilen floresan çekirdek boyama gibi teknikler yer almaktadır. Özellikle çekirdek boyamalarından olan 4', 6-diamidino-2 fenilindol (DAPI), uygun bir maliyete sahip olması ve sonuçlarının kısa sürede olması sebebiyle laboratuvar ortamında sıklıkla kullanılmaktadır. DAPI, hücre zarından geçerek nükleik asit zincirinde timin ve adenin bazlarına bağlanmakta, eğer hücre mikoplazma ile enfekte olmuşsa ekstrasükleer bölgede de parlama izlenebilmektedir (Tarnowski ve ark., 2003, Jung ve ark., 2003). Çalışmaların güvenilirliğini korumak adına, kültürlerin deney öncesinde ve her 10 pasajda bir düzenli olarak mikoplazma varlığı açısından kontrol edilmesi önerilmektedir (Nikfarjam ve Farzaneh, 2012). Bu sayede hücrelerin proliferasyonunda ve genetik yapısında yol açabileceği bozulmalar erken dönemde tespit edilerek olası hatalı sonuçlar veya hücre hattı kayıpları engellenebilmektedir.

2.11. Epitelyal (E)-Kaderin

Epitelyal kaderin (E-kaderin), epitel dokularda yer alan hücrelerin birbirlerine tutunmalarını ve doku bütünlüğünü sağlayan kalsiyum bağımlı bir hücreler arası adezyonu sağlayan transmembran glikoproteinler ailesinin bir molekülüdür (Takeichi, 1991). Bu molekül epitelyal bağlantı kompleksinde yer alan ve sıkı bağlantıların (Zonula occludens) altında bulunan kemer bağlantıların (Zonula adherens) yapısında bulunmaktadır (Gumbiner, 2005).

E-kaderinler adherens junctionların temel bileşenlerinden olup hücre dışında komşu hücreleri birbirine bağlayarak doku bütünlüğünü korumaktadır. Hücre içinde ise hücre zarının sitoplazmaya bakan yüzeyindeki β -katenin, Vinkulin ve α -aktinin gibi kenetlenme proteinleri aracılığı ile hücre iskeleti elemanlarından biri olan aktin filamentlere

bağlanmaktadır. Böylece hücre zarının ve aktin filamentlerinin kasılabilir yapısını destekleyerek hücre bütünlüğü korumaktadır (Harris ve Tapas, 2010, Akay, 2012).

Sağlıklı epitel hücrelerde E-kaderin, hücreler arası teması sağlayarak hücre göçünü önlemekte embriyonik gelişim ve doku homeostazisini sağlamaktadır (News-Medical, n.d.). Bununla birlikte kanser hücrelerinde özellikle metastatik durumlarda e-kaderin ifadesi azalmakta bu durumda *snai* ve *twist* gibi transkripsiyon faktörlerini içeren sinyal yollarını aktif ederek hücrelerin epitelyal mezenkimal geçişini (EMT) sağlamaktadır (Loh ve ark., 2019). Bu geçiş E-kaderin kayıpları ile N-kaderin ve Vimentin'in de dahil olduğu mezenkimal belirteçlerin kazanımı ile karakterize olmaktadır. Böylece kanser hücrelerinin invazyonu ve metastazını kolaylaştırmaktadır.

2.12. Filamentöz (F)-aktin

Filamentöz-aktin (F-aktin), hücre iskeletinin en temel bileşenlerinden olup globüler aktin (G-aktin) proteinin ATP-bağımlı polimerizasyonu ile oluşan polimerize olan filamentöz yapılardır. Hücre şeklinin korunumu sağlanırken aynı zaman da hücre içinde madde taşınması, hücre polarizasyonu, adhezyon, morfogenez ve hücre hareketi gibi temel hücrenin fizyolojik süreçlerinde aktif rol oynamaktadırlar (Dominguez ve Holmes, 2011).

F-aktinin dinamik doğası, aktin polimerizasyonu aktin depolimerizasyonunun düzenlenmesi ile sağlanmakta olup bu süreç hücre iskeletinin yeniden modellenmesi ve hareket etmesini mümkün kılmaktadır. Pozitif ve negatif uçlara sahip polar filament yapısı monomerlerin eklenme ve çıkartma hızlarının farklılıkları hücre hareketinin yönlülüğünü belirlemektedir. Bu süreç, lamellipodia, filopodia ve invadopodia gibi çeşitli hücre uzantılarının oluşumunda kritik rol oynayan aktin-bağlayıcı proteinlerle yakın etkileşim içinde gerçekleşmektedir (Pollard ve Cooper, 2009). Sonuç olarak, F-aktinin dinamik doğası hücre göçü, istila (invazyon) ve benzeri süreçlerin temel düzenleyicisi konumunda yer almaktadır.

2.13. MTS Hücre Canlılığı Testi

Metastatik ve invaziv kanser hücreleri anti-kanser ajanların etkilerini değerlendirmek amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır (Cailleau ve ark., 1978). Bu anti-kanser ajanlarının metabolik aktiviteleri ve canlılık düzeylerinin belirlenmesinde kolorimetrik yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır. Bu kolorimetrik ölçüm yöntemlerinden biri de MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum) canlılık testidir (Malich ve ark., 1997). Bu test, tetrazolium olarak bilinen tuz bileşiklerinin, canlı hücrelerin mitokondriyal enzimleri tarafından formazan adı verilen ve suda çözülebilen kristallerinin miktarına dayanarak hücrelerin metabolik aktivitelerini ölçmektedir (Riss ve ark., 2016). Kullanılan hücre kültür sistemleri MTS test sonuçlarını etkileyebilmektedir. Özellikle literatürde yapılan 2B ve 3B kültürlerin karşılaştırmalı sonuçları farklılıkları ortaya koymakta ve 3B kültürlerin hücre ortamlarını daha iyi taklit etmesinden kaynaklı anti-kanser ajanlarına daha dirençli oldukları ve hücre canlılıklarının daha düşük oldukları saptanmıştır (Vinci ve ark., 2012; Friedrich ve ark., 2009). 2014 yılına ait yapılmış bir çalışmada araştırmacılar, A549 akciğer hücre hattını kullanarak 2B ve 3B kültürlerinin oluşturulmasının ardından tripsin ile muamele ederek 3B sferoidleri ve 2B kültürde tutunan hücreleri MTS canlılık testi yaparak belirlemişlerdir. Tripsin ile muamele edilen hücreler tripsin ile muamele edilmeyen hücreler ile karşılaştırıldıklarında canlılık yüzdelerinde anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. Sonuç olarak MTS 3B hücre kültür sistemlerinde hücreler tarafından doğru bir şekilde işlendiği ve toksik cevabı doğru yansıttığı tespit edilmiştir (Kim ve ark., 2014). Bir başka çalışmada ise araştırmacılar potansiyel bir meme kanseri tedavisinde kullanılacak bir ilaç olan metformini MDA-MB-231 kanser hattının 2B ve 3B hücre hatlarına uygulayarak MTS testi ile canlılık yüzdelerini değerlendirmişlerdir. Her iki hücre hattında da glikozun varlığına bağlı olarak farklı koşullarda hücre canlılıklarının azaldığı saptanmıştır (Bizjak ve ark., 2019). Bu bağlamda MTS testinin hem 2B hem de 3B kültürde karşılaştırmalı testler ile güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar verdiği ortaya konmaktadır. Özellikle ilaç tarama ve toksisite testlerinde, 3B kültür sistemlerinin kullanılması, potansiyel ajanların gerçek biyolojik ortamlardaki etkilerine daha yakın sonuçlar elde edilmesine katkıda bulunmaktadır. Böylece hem ilaç geliştirme süreci hızlanmakta hem de *in vitro*–*in vivo* korelasyon daha güçlü hale gelmektedir. Şekil 2.10’da Tetrazolyumun Formazan kristaline indirgenmesi gösterilmektedir (Şekil 2.10.).

şekilde saçılmaktadır. İleri saçılma hücrenin büyüklüğü hakkında bilgi verirken, yan saçılma ise hücre içi bütünlüğü, hücrenin granüllük durumu ve çekirdek yapısı hakkında bilgi vermektedir (McKinnon, 2018). Hücrelerde yer alan floresan boya lazer ışını tarafından uyarıldıklarında spesifik dalga boylarında ışık yaymaktadır. Bu sinyaller, özel filtrelerden geçirilip dedektörlere yönlendirilmektedir (Shapiro, 2003). Dedektörlere yönlendirilmiş olan sinyaller elektronik sistemde elektriksel sinyallere dönüştürülmektedir (Thermo Fisher Scientific, t.y.). Bu sinyaller daha sonra dijital verilere dönüştürülerek istatistiksel analizler ile grafikler oluşturulup analiz edilmektedir.

2.14.1. Hücre Döngüsü ve DNA Analizi

Hücre döngüsü hücrelerin büyüme DNA sentezi ve bölünme evrelerini oluşturan ve yaşamın devamlılığını sağlayan bir süreçtir. Sağlıklı bir hücre döngüsünde normal somatik hücrelerde diploid ($2n$) kromozom sayısı bulunmaktadır. Ancak çeşitli genetik bozukluklar ve özellikle kanser hücrelerinde bu durum bozulmakta ve hücrelerde anormal kromozom sayısı oluşmaktadır. Bu kromozom sayısına da anöploidi denmektedir (Ben-David ve Amon, 2020). Kanser hücreleri sıklıkla hiperdiploid ($2n$ 'den fazla) yapıda olmakta ve bu durum hücre DNA miktarının artmasına neden olmaktadır. Bu yapısal bozukluk, hücre döngüsünün çeşitli fazlarında birikerek düzensiz bir şekilde hücrenin çoğalmasına ve metastazına neden olmaktadır (Maadi ve ark., 2022).

Hücre döngüsü interfaz ve mitoz faz denilen iki ana kısımdan oluşmaktadır. İnterfaz kendi içinde G1, S ve G2 fazlarından oluşmaktadır. G1 fazında hücreler büyümekte ve protein sentezine başlamaktadır. S fazında ise DNA sentezi gerçekleşmekte G2 fazında ise mitotik bölünme öncesi son hazırlıklar yapılarak mitoz bölünmeye geçilmektedir. Bunlara ek olarak G0 denilen hücre döngüsü dışında yer alan bir faz bulunmaktadır. Bu fazda döngüden çıkan hücreler yer almaktadır. Hücreler bölünme sinyallerini aldıklarında G1 fazına geçmekte, diğer hücreler ise farklılaşmak üzere ayrılmaktadırlar (Uludağ, 2001; Shapiro 2003). Bu fazların her birinde DNA miktarı ve hücresel aktiviteler farklı olmaktadır.

Hücre döngüsü evrelerini analiz etmek ve buldukları DNA miktarını ölçmek için akış sitometrisi sık kullanılan yöntemlerdendir. Akış sitometrisinde hücrelerin DNA miktarlarının ölçülmesi DNA'ya bağlanabilen floresan boyalar kullanılarak yapılmaktadır. Bu bağlamda en yaygın kullanılanlardan biri de propidyum iyodür (PI)

boyasıdır. PI DNA'ya bağlanabildiği gibi RNA'ya da bağlanabilmektedir (Riccardi ve Nicoletti, 2006). Bu nedenle hücreler önce RNaz ile muamele edilerek RNA'lar uzaklaştırılmalıdır. Ayrıca PI canlı hücre zarlarından geçemediği için, hücreler geçirgen hale getirilmelidir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Gereçler

Hücre kültür çalışmalarında 25 cm² filtresiz ve 75 cm² filtresiz, Dulbecco's Modified Eagle's Medium-High Glucose (DMEM) (Capricorn Scientific, DMEM-HPSTA), Fötal Sığır Serumu (FBS) (Capricorn Scientific, FBS-HI-11A), Penisilin/Streptomisin (Capricorn Scientific, PS-B), hücrelerin kaldırılması ve sayımları için Tripsin-EDTA (%0.25) (Thermo Fisher, 25200056) ve Tripkan Mavisini (Biochrome, L6323), Hücre ekimi için 6 kuyucuklu (Greiner Bio-One, 657160), 12 kuyucuklu (Nest Scientific, 712001), 48 kuyucuklu hücre plakası (Greiner Bio-One, 677180) ve 96 kuyucuklu hücre plakası (Greiner Bio-One, 655180), immünofloresan boyamalar için 4 kuyucuklu (Thermo Scientific, 17739) ve 8 kuyucuklu (Merck, PEZGS0816) chamber slide'lar, toksisitesi araştırılan Abemaciclib (Selleckchem, S5716-5MG) ve Doksorubisin (Medchem, HY-15142), Dimetil Sülfoksit (DMSO), DAPI içerikli kapama solüsyonu (Abcam, Ab104139), Triton-X (Merck, 108603) ve Tween-20 (Thermo Fisher, BP337-100), Metanol (Sigma, M10609), Glacial Asetik Asit (Carlo Erba, 64-19-7) ve Paraformaldehit (Merck, 104005), Propidyum iyodit (Appllichem, 01A2261, 0025), DAPI (Sigma, D9542), kalsiyum ve magnezyumsuz Fosfat Tamponlu Tuz çözeltisi (PBS) (Biowest, L0615 – 500) PBS tablet (Sigma, P4417-100TAB), Agaroz (Sigma A9539-500), 3D Petri Dish® (Sigma, Z764019-6EA), Sodyum Klorür (Sigma S5886-500), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum (MTS) (Promega, G3580), Cell Tracker boya (Thermo Fisher; C34552 kırmızı), RNAz (Sigma, R-4875), Alexa Fluor® 488 AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson Immuno Research, 111-545-003), E-cadherin primer antikor (Bioss-USA, bs-10009R), Falloidin Alexa Fluor® 555 (Thermo Fisher, A34055), BSA Fraction V (Thermo Fisher, 15260037) temin edilmiştir.

3.2. Mikoplazma Testi

MDA-MB-231 hücrelerinin çoğalması sırasında kontaminasyon baskılanmasını değerlendirmek amacıyla hücreler 3 pasaj boyunca antibiyotik içermeyen besiyeri kullanılarak üretilmiştir.

MDA-MB-231 hücreleri öncelikle 6 kuyucuklu hücre kültür plakalarına hücre sayısı 10^5 hücre/mL olacak şekilde ekilip 48 saat boyunca %5 CO₂ ve 37°C'lik etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra besiyeri hücreden uzaklaştırılmış ve sonrasında Carnoy's fiksatifli olan 3/1 oranında 2 mL metanol/asetik asit karışımı hazırlanmış ve petri ile oda sıcaklığında 3 dakika boyunca bekletilerek fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemden sonra hücreler PBS ile 2 dakika boyunca bir defa yıkanmıştır. Yıkamadan sonra hücrelere 300 nM DAPI eklenmiş ve 15 dakika boyunca karanlık ortamda bekletilmiştir. Boyamadan sonra DAPI aspire edilmiş ve tekrar 3 defa PBS ile yıkanmıştır. Bundan sonra DAPI içeren kapatma solüsyonu ile kapama işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından hücreler floresan eklentili inverted mikroskopta (Olympus CKX41, Japan), Dp Manager programı kullanılarak incelenmiştir.

3.3. Hücre Kültür Çalışmaları

3.3.1. Hücre Kültürü

Sunulan tez çalışması bağlamında hücre kültürü çalışmalarında, laboratuvarımızda bulunan MDA-MB-231 (ATCC®HTB-26) TNBC hücre hattını kullanmak için stoklar hazırlanmıştır. Deneylerin hepsi laboratuvarımızda bulunan laminar akıma sahip Esco, Laminar Kabin Plus II BSC kabininde steril koşullar içerisinde gerçekleştirilmiştir.

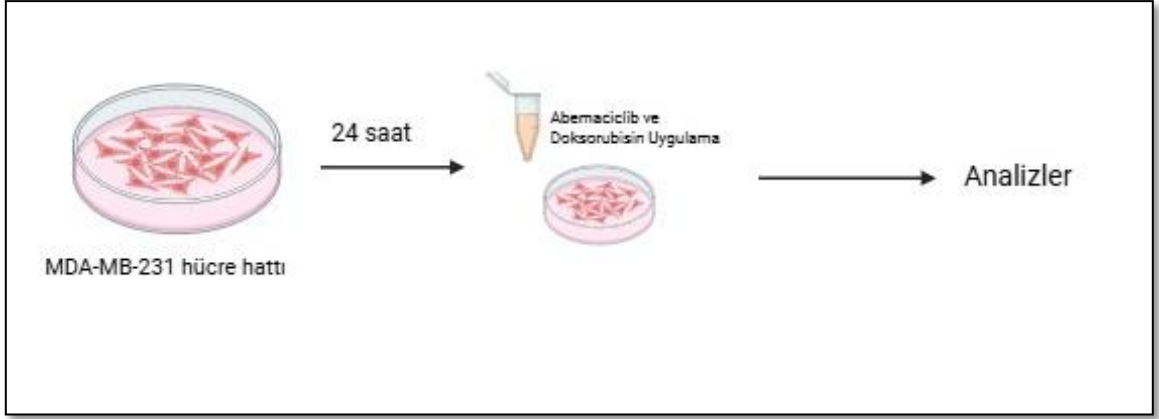
3.3.2. Hücre Çözdürme ve Dondurma

Hücreler sıvı azot tankında (-195°C) kriyotüpler içinde dondurulmuş olarak saklanmaktadır. Sıvı azot tankından alınan hücreler ilk olarak 2-3 dakika boyunca su banyosunda (Nüve, NB9) 37°C'de bekletilmiş ve sıvı faza geçmeleri sağlanmıştır. Çözülen hücreler ardından 800 rpm'de 5 dakika boyunca (Eppendorf Centrifuge, 5810R) santrifüjlenmiştir. Santrifüjün ardından süpernatant pipet ile çekilerek uzaklaştırılmıştır.

Pelet üzerine önceden hazırlanmış ve ısıtılmış besiyeri eklenerek dikkatlice pipetajlanmış ve üzerinde uygun besiyeri bulunan flaska aktarılmıştır. Flaskların üzerine hücre adı, çözündürme tarihi ve pasaj yazılarak 37°C %5 CO₂ koşullarındaki etüve (Sanyo, MCO18AC) kaldırılarak inkübe edilmiştir. Flasklar ışık mikroskopunda incelendiğinde hücreler %70-80 kaplama oranı gösterdiklerinde pasajlama işlemi yapılmıştır. Hücreler üretildikleri flasklardan tripsinizasyon işlemi ile kaldırılmıştır. Tripsinizasyon işleminin ardından süspanse hale gelen hücreler 800 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Santrifüj işleminin ardından süpernatant uzaklaştırılmıştır. Elde edilen hücre peleti daha önceden hazırlanmış olan dondurma vasatı ile biraraya getirilmiş ve pipetaj yapılmıştır. Ardından 1 mL olacak şekilde kriyotüplere paylaştırılmıştır. Kriyotüplerin üzerine hücre ile ilgili bilgiler yazılmış ve kademeli dondurmak için ilk olarak -80°C'de dondurulmuştur. 1-2 gün sonra ise sıvı azot tankına alınmışlardır.

3.3.3. Hücre Kültürü Üretimi ve Pasajlama

Hücreler Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) besiyerinde %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin antibiyotik besiyerinde üretilmiştir (Şekil 3.1.). Hücrelere ışık mikroskopunda incelenerek %70-80 kaplama oranına ulaştıklarında tripsinizasyon işlemi yapılmıştır. İlk olarak hücrelerin içinde buldukları atık besiyeri flasklardan uzaklaştırılmıştır. Ardından ölü hücreleri ve kalan besiyerini uzaklaştırmak için iki kez Tripsin/Etilendiaminotetraasetik asit (EDTA) işlemi uygulanmıştır. 75 cm² flasklarda üretilen hücreler 2 ml Tripsin/EDTA ile 2 kere muamele edilmiştir. İkinci işlemin sonucunda flaskta 1 ml Tripsin/EDTA bırakılmış ve etüvde yaklaşık 3 dakika bırakılarak süspanse hale gelmeleri beklenmiştir. İnkübasyon işleminin ardından flasklar etüvden çıkartılarak mikroskopta hücrelerin süspanse olma durumuna bakılmıştır. Süspanse hale gelmiş hücrelerin üzerine önceden su banyosunda 37°C'de ısıtılmış besiyeri eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır. Daha sonra hücre süspanسیونları yeni flasklara bölünmüş ve üzerlerine taze besiyerleri eklenmiştir. Hücreler daha sonra deneylerde kullanılmak için 37°C %5 CO₂ koşullarındaki etüve kaldırılmış ve deneylerde kullanılmak üzere üretimleri sağlanmıştır.



Şekil 3.1. 2B hücre kültüründe deney planı

3.4. Sferoidlerin Oluşturulması

3.4.1. Agar Jellerin Oluşturulması

Üç boyutlu Petri Dish® kalıplarında sferoid üretimi için ilk olarak kalıplara konulacak agaroz jellerin hazırlanması gereklidir. Hazırlanan agar solüsyonunun katılaşmasından sonra bu kalıplardan dikkatlice çıkartılıp üzerlerine hücreler ekilmektedir. Agar jeller üzerindeki homojen dağılmış boşluklar sayesinde, hücreler doğal olarak kümelenerek sferoid mikro dokuların oluşumunu gerçekleştirmektedir.

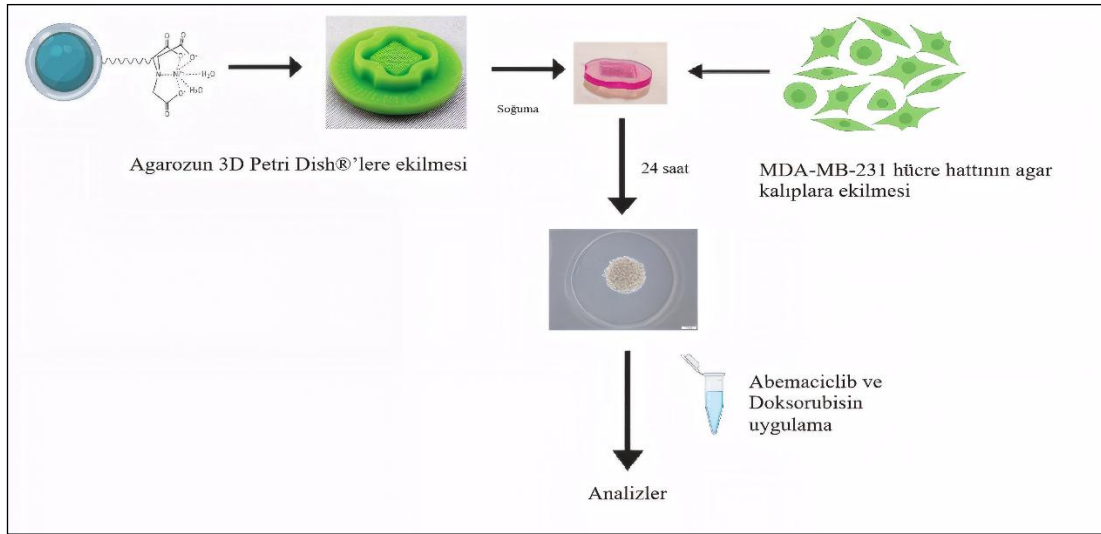
Üç boyutlu Petri Dish® kalıplar sterilizasyon için ilk olarak distile suda çalkanmış ve %70'lik etil alkolde 15 dakika bekletilmiştir. Kuruduktan sonra cam kaplara konularak otoklavlanmışlardır. Steril hale gelen kalıplar için 500 µL olacak şekilde agar solüsyonu hazırlanmıştır.

3.4.2. Agar Solüsyonunun Hazırlanması

Agar solüsyonu hazırlanırken ilk olarak 1 gram agaroz toz, cam bir şişe içerisine konmuştur. Daha sonra, bu agaroz tozuna 50 ml salin solüsyonu (distile su içerisinde %0,9 NaCl) eklenmiştir. Elde edilen bu karışım (%2 agaroz konsantrasyonu, g/ml olarak) iyice homojenize edildikten sonra otoklavlanmıştır. Otoklavlanan agar solüsyonu oda sıcaklığında 60-70°C'ye kadar soğutulmuş olup sonrasında solüsyon şişesi alkollenerek biyogüvenlik kabini içine alınmıştır. Biyogüvenlik kabini içinde daha önceden steril

edilmiş Petri Dish® kalıplarına mikropipet yardımıyla aktarılmıştır. Oda sıcaklığında polimerleşen agar solüsyonu, kalıplardan çıkarılarak agar jellere dönüştürülmüştür. Son olarak bu agar jeller, 12 kuyucuklu hücre kültür plakalarına yerleştirilmiş ve hücre ekiminden önce yukarıda belirtilen besiyerlerinin serumsuz formu (2,5 mL/kuyucuk) ile etüvde 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir (Şekil 3.2.).

MDA-MB-231 hücreleri kullanılarak agar jeller üzerinde oluşturulacak sferoidler için hücre sayısı belirlenmiştir. Hücre sayısını belirlerken 5×10^4 hücre/agar ve 10^5 hücre/agar olarak iki farklı hücre konsantrasyonu kullanılmıştır. Bu hücre konsantrasyonları 100 µL hücre süspansiyonu/agar olacak şekilde agar jellere ekilmiştir. Hücre konsantrasyonları ekildikten sonra etüve kaldırılmış ve 15 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Ardından agarların üzerlerine 2,5 mL besiyeri eklenmiş ve etüve kaldırılmıştır. Hücreler 48 saatte bir olmak üzere besiyerleri değiştirilmiş ve 6 gün boyunca çap ve alan ölçümleri sferoidleri oluşturmak için kullanılacak hücre sayısı belirlenmiştir.



Şekil 3.2. 3B hücre kültüründe deney planı

3.5. Abemaciclib Stok Solüsyonun Hazırlanması ve Uygulanması

Çalışmada kullanılan toz halindeki Abemaciclib'in 5 mg olan ana stoğu 1 ml DMSO içerisinde çözülürerek hazırlanmıştır. Ön çalışmalar sonucunda Abemaciclib'in 24, 48 ve 72 saat uygulamaları için seçilen dozlar ana stoktan hazırlanan ara stok çözeltilerden hazırlanarak serumsuz besiyeri ile seyreltilerek elde edilmiştir. Doz uygulamaları, iki

boyutlu hücre kültür deneylerinde tutunma oranlarına bağlı olarak hücre ekiminden 24 saat sonra, üç boyutlu hücre kültür deneylerinde ise yine 24 saat içinde hücre agregatları oluşumunu takiben uygulanmıştır. Hücrelerin toksik cevabına göre iki boyutlu hücre kültür deneylerinde toksik cevaba göre 10 μM , 20 μM ve 25 μM olarak seçilirken üç boyutlu hücre kültür deneylerinde ise 20 μM , 30 μM ve 40 μM olarak belirlenmiştir.

3.6. Doksorubisin Stok Solüsyonun Hazırlanması ve Uygulanması

Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan toz halindeki Doksorubisin'in 50 mg olan ana stoğu 1 mL DMSO içerisinde çözdürülerek hazırlanmıştır. Ön çalışmalar sonucunda Doksorubisin'in 24,48 ve 72 saat uygulamaları için seçilen dozlar ana stoktan hazırlanan ara stok çözeltiden hazırlanarak serumsuz besiyeri ile seyreltilerek elde edilmiştir. Doz uygulamaları, iki boyutlu hücre kültür deneylerinde tutunma oranlarına bağlı olarak hücre ekiminden 24 saat sonra, üç boyutlu hücre kültür deneylerinde ise yine 24 saat içinde hücre agregatları oluşumunu takiben uygulanmıştır. Hücrelerin toksik cevabına göre iki boyutlu hücre kültür deneylerinde toksik cevaba göre 5 μM , 10 μM ve 20 μM olarak seçilirken üç boyutlu hücre kültür deneylerinde ise 20 μM , 40 μM ve 60 μM olarak belirlenmiştir.

3.7. MTS Canlılık Testi

Canlılık oranlarının belirlenmesi için, satın alınan CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) kit kullanılmıştır. Bu kit ile 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarında ve 3D Petri Dish®'lerde sferoid formasyonu gerçekleştirilmiş MDA-MB-231 hücrelerinde canlılık testlerinde kullanılmıştır.

İki ve üç boyutlu deneylerde kullanılan MDA-MB-231 hücrelerinin canlılık testleri için, inkübasyon süreci sonrasında, kuyucuklardan ve agar yüzeylerinden 100 μL süpernatant bırakılmıştır. Bu işlemin ardından, her bir kuyucuğa ve agar yüzeyine 20 μL MTS reaktifi eklenmiştir. Eklenen reaktif ile hücre kültürleri, 3 saat boyunca etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sürecinin tamamlanmasının ardından, tetrazolium tuzlarının hücre kültürlerinde homojen bir şekilde dağılmasını sağlamak amacıyla, örnekler 5 dakika süreyle çalkalayıcıda bekletilmiştir. Bu işlem, reaktifin hücrelerle tam olarak reaksiyona girmesini ve doğru sonuçların elde edilmesini sağlamak için önemlidir. Son olarak,

hücrelerin absorbands değerleri, spektrofotometre (BIO-TEK μ Quant, BIO-TEK Instruments, Inc, Amerika) kullanılarak 490 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

3.7.1. İki Boyutlu ve Üç boyutlu Kültürlerde MTS Analizi

İlk olarak MDA-MB-231 hücreleri DMEM'li besiyerinde kültüre edildikten sonra 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarında kuyucuk başına 10^5 hücre olacak şekilde 100 μ L hacimde kuyucuklara ekilmişlerdir. Ardından hücrelerin 24, 48 ve 72 saat boyunca MTS canlılık analizleri yapılmıştır.

İki Boyutlu Hücreler: Deneyin başlangıcında, MDA-MB-231 hücreleri için 10^5 hücre/mL konsantrasyonda hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. Ardından bu süspansiyon, kuyucuklara 100 μ L/kuyucuk olacak şekilde (10^4 hücre) ekilmiştir. Hücreler, 24 saat boyunca 37°C ve %5 CO_2 koşullarında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra besiyeri kuyucuklardan dikkatlice uzaklaştırılmış ve ardından farklı konsantrasyonlarda Abemaciclib (10 μM , 20 μM ve 25 μM) ve Doksrubisin (5 μM , 10 μM ve 20 μM) içeren 100 μL çözelti hücelere uygulanmıştır. Bu dozlarla muamele edilen hücreler 24, 48 ve 72 saatlik süreler için tekrar inkübasyona alınmıştır. Her bir inkübasyon süresinin sonunda, kuyucuklara 20 μL MTS reaktifi eklenmiş ve 3 saat karanlık ortamda bekletilmiştir. İnkübasyonun ardından tetrazolyum tuzlarının daha homojen hale gelmesi için 5 dakika boyunca hücreler çalkalayıcıda bekletilmiştir. Ardından hücre canlılığının analizi için hücreler, spektrofotometreye (BIO-TEK μ Quant, BIO-TEK Instruments, Inc, Amerika) yerleştirilmiş ve 490 nm dalga boyundaki absorbands değerleri kaydedilmiştir.

Üç Boyutlu Hücreler: İlk olarak 10^6 hücre/mL olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlanmış ve sferoid oluşumu için 37°C ve %5 CO_2 koşullarındandaki etüvde 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından 12 kuyucuklu plakalarda bulunan sferoidlere 2,5 mL/kuyucuk olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda Abemaciclib (20 μM , 30 μM ve 40 μM) ve Doksrubisin (20 μM , 40 μM ve 60 μM) uygulamaları yapılmış olup hücreler 24, 48 ve 72 saatlik süreler için tekrar inkübasyona alınmıştır. Her bir inkübasyondan sonra kuyucukların üzerine MTS reaktifi eklenmiş ve 3 saat karanlık ortamda bekletilmiştir. İnkübasyondan sonra MTS reaktifi ile ilaçların solüsyonu 96 kuyucuklu plakalara alınıp tetrazolyum tuzlarının daha homojen hale gelmesi için 5 dakika boyunca hücreler çalkalayıcıda bekletilmiştir. Ardından hücre canlılığının

analizi için hücreler, spektrofotometreye (BIO-TEK μ Quant, BIO-TEK Instruments, Inc, Amerika) yerleştirilmiş ve 490 nm dalga boyundaki absorbans değerleri kaydedilmiştir.

Gruplarda canlılık analizi şu şekilde hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{\{\text{Uygulama grubu OD}\}}{\{\text{Kontrol grubu OD}\}} \times 10$$

Tez önerisinde MDA-MB-231 hücrelerinin canlılık analizlerinin MTT ile ölçüleceği belirtilmiştir. Ama 3B Sferoid kültüründe MTS analizi sonuçları MTT analizlerine göre daha tutarlı yanıtlar vermiştir. Bu nedenle deneylerde MTS canlılık analizi kullanılmıştır.

3.8. İmmünofloresan Boyama

3.8.1. Canlı Hücre Boyama (Cell Tracker)

Cell Tracker boyama genellikle birden fazla hücre kültürlerinin lokalizasyonlarını ve davranışlarını takip etmek için kullanılan bir yöntemdir.

-20°C'de saklanan CellTracker™ boya ilk olarak ana stoğu 10 mM olacak şekilde DMSO içinde çözdürülmüştür. Ardından MDA-MB-231 hücreleri için ana stoktan 500 μ M ve 15 μ L olacak şekilde dilüe edilmiştir. Boyanın kullanılmasından önce 37°C'de ısıtılmıştır. Boyalar ile inkübe edilecek hücreler uygun kofluentliğe geldiklerinde besiyeri uzaklaştırılmıştır. Boyaların zardan daha rahat bir şekilde geçebilmesi için steril PBS solüsyonunda hazırlanmış %0,2'lik Tween-20 solüsyonu ile hücreler 20 dakika boyunca etüvde inkübe edilmiştir. Daha sonra Tween-20 uzaklaştırılmış ve hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Hücre sayımının ardından hücreler 15 mL falkonlara aktarılmış ve 800 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Bu sırada 500 μ L hacimde 15 μ M derişimde CellTracker™ boya serumsuz besiyerinde hazırlanmıştır. Santrifüjün ardından besiyeri aspire edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant uzaklaştırılarak üzerlerine hazırlanan boya eklenmiştir. Ardından hücreler etüve kaldırılarak 45 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler tekrar 800 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Boyalı süpernatantın uzaklaştırılmasından sonra hücrelerin üzerine serumlu besiyeri eklemiştir.

İki Boyutlu Hücreler: Deney için 48 kuyucuklu hücre plakaları kullanılmıştır. MDA-MB-231 hücreleri kuyucuk başına 10^5 hücre/400 μ L olacak ekilmiştir. Ekimin ardından alüminyum sarılı hücre plakaları etüve kaldırılarak inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından hücreler Olympus CKX18 inverted mikroskop ile görüntülenmiş ve Cellsens Master Software V1.12 Programı ile floresan görüntüler çekilmiştir.

Üç Boyutlu Hücreler: CellTracker™ boyama protokolu 2B kültürde bahsedildiği gibi yapılmıştır. İlk olarak 10^6 hücre/mL olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlanmış ve sferoid oluşumu için 37°C ve %5 CO_2 koşullarındandaki etüvde 24 saat inkübe boyunca edilmiştir. İnkübasyonun ardından 12 kuyucuklu plakalarda bulunan sferoidlere 2,5 mL/kuyucuk olacak serumlu besiyeri eklenmiştir. Ardından sferoidler karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından sferoidler Olympus CKX18 inverted mikroskop ile görüntülenmiş ve Cellsens Master Software V1.12 Programı ile floresan görüntüler çekilmiştir.

3.8.2. E-Kaderin İmmüno Floresan Boyaması

MDA-MB-231 hücreleri kuyucuk başına 10^5 hücre/300 μ L olacak şekilde chamber slide plakalara ekilmiştir. Ardından hücrelerin kuyucuklara tutunmasını sağlamak için 37°C sıcaklık ve %5 CO_2 koşullarında 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Hücre bağlantı noktalarını tespit etmek amacıyla kullanılan E-kaderin boyama aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir.

- Hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra, %4 paraformaldehit çözeltisi eklenerek $+4^\circ\text{C}$ 'de 15 dakika fikse edilmiştir.
- Fikse edilen hücreler PBS ile 3 defa 2 dakika yıkanmıştır.
- PBS aspire edildikten sonra hücre permeabilizasyonunu sağlamak için %0,2 Triton X içeren PBS çözeltisinde çalkalayıcı üzerinde 3 kez, 10 dakika süreyle bekletilmiştir.
- Daha sonra hücreler tekrar PBS ile 3 defa 2 dakika yıkanmıştır.
- Blokaj için hücreler %3'lük BSA ile 45 dakika inkübe edilmiştir.

- Primer antikor olarak, tavşanda üretilmiş insan poliklonal E-kaderin antikorunu %3 BSA içinde 1:50 oranında seyreltilerek hücrelere uygulanmış ve nemli, karanlık bir ortamda oda sıcaklığında bir gece inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon tamamlandıktan sonra hücreler PBS ile üç kez, her seferinde 3 dakika yıkanmıştır.
- Keçide üretilmiş ve tavşana karşı geliştirilmiş Alexa Fluor® 488 (yeşil) ile işaretli sekonder antikor, %3 BSA içinde 1:500 oranında seyreltilerek hazırlanmış ve 1 saat boyunca +4°C’de inkübe edilmiştir.
- Uygulamadan sonra hücreler PBS ile 3 defa 3 dakika yıkanmıştır.
- Son olarak, chamber slide plakalar çıkarılmış, DAPI içeren kapatma çözeltisi uygulanarak lamel ile kapatılmış ve hazırlanan preparatlar Olympus CKX18 inverted mikroskop ile görüntülenmiştir.

3.8.3. F-Aktin İmmüno Floresan Boyaması

MDA-MB-231 hücreleri kuyucuk başına 10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde 4 kuyucuklu chamber slide plakalara ekilmiştir. Hücrelerin yüzeye tutunmasını sağlamak amacıyla, 37°C ve %5 CO₂ koşullarında 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Abemaciclib’in uygulamasından önce ve sonra hücre iskeletindeki hasarları tespit etmek için kullanılan F-aktin boyama aşağıda yer alan protokole göre gerçekleştirilmiştir.

- Hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra, %4 paraformaldehit çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında fikse edilmiştir.
- Fikse edilen hücrelerden fiksatif uzaklaştırıldıktan sonra %0,3 Triton X içeren PBS çözeltisi ile üç kez, her seferinde 2 dakika boyunca yıkanmıştır.
- Blokaj işlemi için hücreler %3 BSA içeren çözelti ile 45 dakika inkübe edilmiştir.
- 66 µM (400X) Phalloidin Alexa Fluor 555 (Kırmızı) ana stoğu, DMSO içinde seyreltilmiş ve ardından %0,1 BSA içeren PBS çözeltisinde (0,5 µL ana stok/200 µL BSA/PBS) seyreltilerek çalışma solüsyonu olarak kullanılmıştır. Solüsyon hücrelere uygulandıktan sonra oda sıcaklığında karanlık ortamda 1 saat boyunca inkübe edilmiştir.
- Ardından hücreler PBS’ ile 3 defa 2 dakika yıkanmıştır.

- Son olarak, chamber slide plakalar çıkarılmış, DAPI içeren kapatma solüsyonu ile lamel kapatılmış ve hazırlanan preparatlar Olympus CKX18 ters mikroskop altında görüntülenmiştir.

3.9. Akış Sitometride Hücre Döngüsünün Belirlenmesi

MDA-MB-231 hücreleri 6 kuyucuklu hücre plakalarına başlangıç sayısı 3×10^5 olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelere Abemaciclib uygulamasından 48 saat sonra akış sitometrisinde hücre döngüsü analizi yapılmıştır.

- Hücrelerin üzerine Tripsin/EDTA solüsyonu eklenmiş ve hücreler 3 dakika boyunca 37°C 'de etüvde inkübe edilmiştir. Bu işlem sonrasında, tripsin aktivitesini durdurmak ve hücreleri toplamak için serum içeren besiyeri ilave edilmiştir.
- Toplanan hücreler daha sonra 4°C 'de 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş sonrasında ise oluşan süpernatant uzaklaştırılmıştır.
- Kalan hücre pelletinin üzerine 3 ml PBS eklenmiş ve vortekslenerek hücreler tekrar resüspanse edilmiştir. Daha sonra hücreler %70'lik alkol ile fikse edilmiş ve 4°C 'de bir gece boyunca bekletilmiştir.
- Hücreler bekletildikten sonra 4°C 'de 1200 rpm hızında 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant tekrar uzaklaştırılmış ve pellet, 1 mL PBS eklenerek yıkanmıştır.
- Yıkama işleminin ardından hücrelerin üzerine 70 μL RNaz (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ve 50 μL Propidyum Iyodür (PI) (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) eklenmiştir. Boyama sonrası örnekler oda sıcaklığında ışık almayacak şekilde 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
- İnkübasyondan sonra hücreler tekrar resüspanse edilmiş ve akış sitometrisi tüplerine aktarılmıştır. Hücre döngüsü analizi, Beckman Coulter Cytoflex LX (USA) cihazında 15.000 çekirdek sayılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçümler, iki değişkenli histogram kullanılarak değerlendirilmiş ve hücre döngüsü fazları (G0/G1, S, G2/M) Multicycle (Phoenix, USA) yazılım programı aracılığıyla yüzde oranları hesaplanarak belirlenmiştir.

3.10. İstatistiksel Analiz

Çalışma sonucu elde verilerin istatistiksel analizinde Graphpad Prism 10 Programı kullanılmıştır. İstatistiksel önem kontrolü $P \leq 0,05$ düzeyinde yapılmıştır. Abemaciclib ve Doksorubisin ilaçlarının hücre kültürleri üzerindeki etkisi için varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Deneylerde 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlar incelendiğinden dolayı varyans analiz modeli oluşturulurken her değer için “doz grubu” ve “inkübasyon süresi” olmak üzere iki bağımsız değişken seçilmiştir. Buna bağlı olarak, iki yönlü varyans analizi (Two-Way ANOVA) tercih edilmiştir. İki yönlü varyans analizinin sonuçlarının anlamlılıklarına bağlı olarak post hoc testler uygulanmıştır. Farklı doz grupların kontrole kıyasla anlamlılık farklarını değerlendirmek için Dunnett’s Testi kullanılmıştır.

4. SONUÇLAR

4.1. Mikoplazma Testi

MDA-MB-231 hücreleriyle gerçekleştirilecek deneylere başlamadan önce mikoplazma testi yapılmıştır. Hücre çekirdekleri DAPI ile boyanarak olası mikoplazma varlığı değerlendirilmiş ve boyama sonucunda ekstrasnükleer herhangi bir ışığa görülmemiştir. Böylelikle kontaminasyon olmadığı doğrulanmış ve deneylere başlanmıştır.

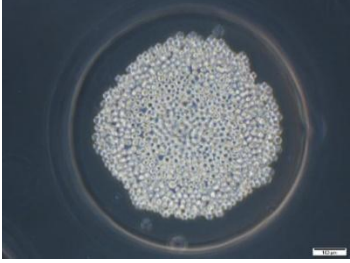
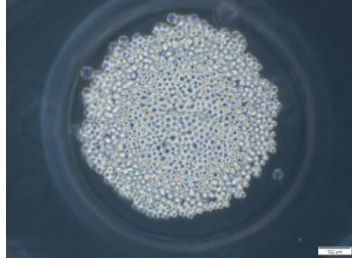
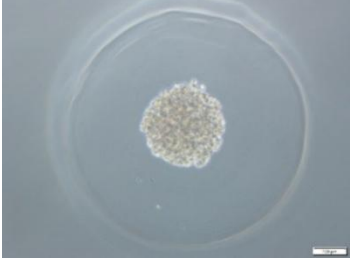


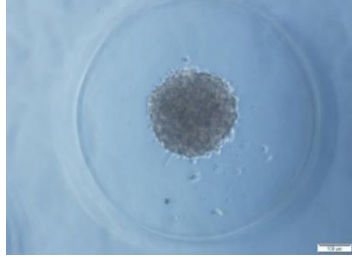

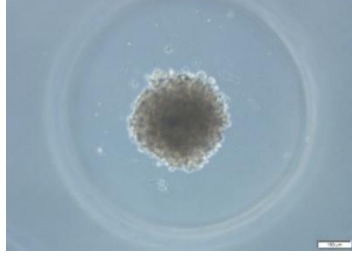
4.2. Sferoidlerin Oluşturulması ve Çap-Alan Ölçüm Sonuçları

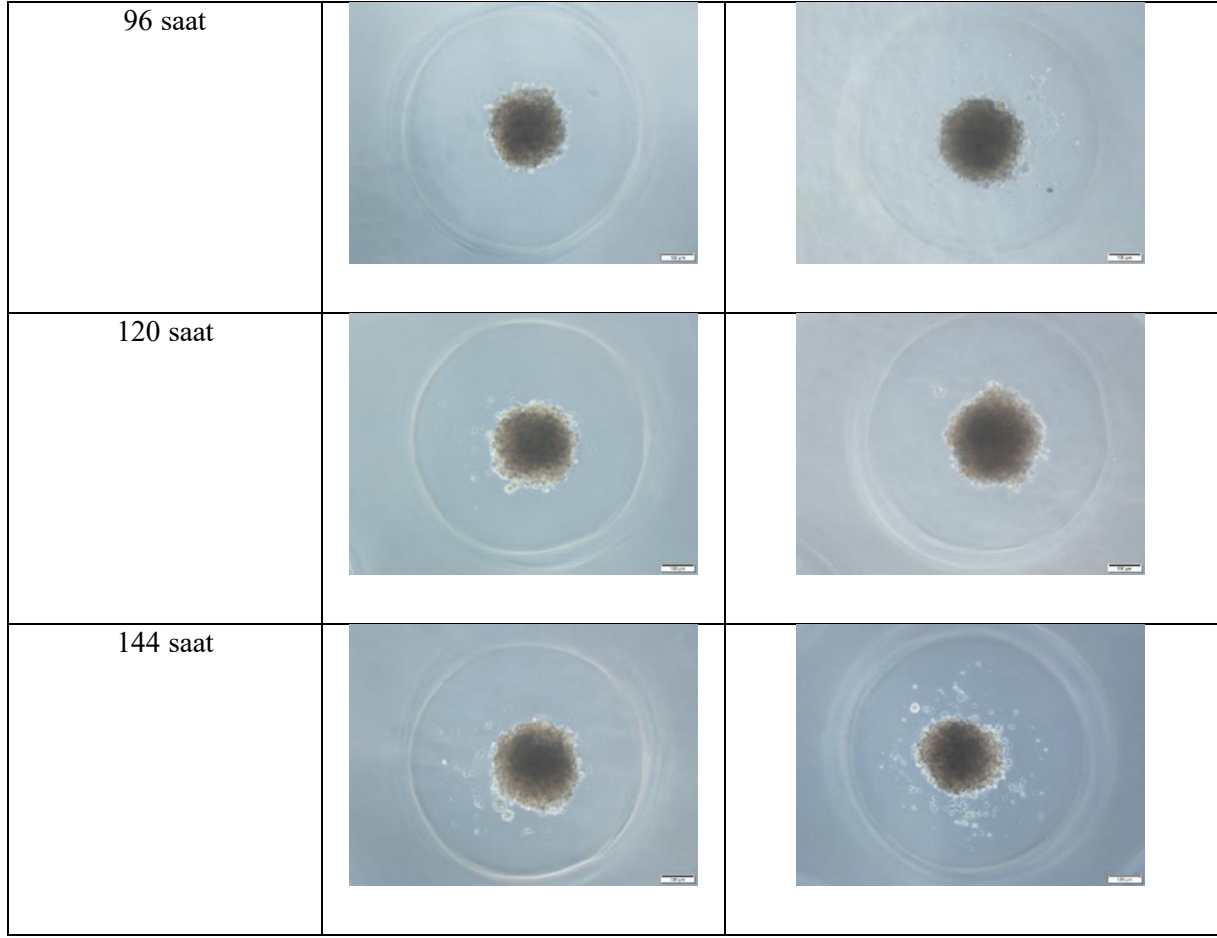
MDA-MB-231 hücreleri 3B Petri Dish'lere ekilmelerinin ardından altı gün boyunca düzenli aralıklarla inverted mikroskop altında sferoid yapıları incelenmiş ve çap ile alan ölçümleri CellSense Master V1.12 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deneyler, sferoid oluşumu ve morfolojik bütünlüğün değerlendirilmesi amacıyla, farklı hücre konsantrasyonları kullanılarak tasarlanmıştır (Şekil 4.1.). Bu kapsamda iki ayrı grup, sırasıyla 3B Petri Dish'lere 5×10^4 hücre/agar ve 1×10^5 hücre/agar konsantrasyonlarında ekilmiştir. Bu yaklaşım, hücre konsantrasyonlarının sferoid oluşumu üzerindeki etkisini ve mikrodoku bütünlüğünün sağlanması için gerekli olan hücre sayısını belirlemek için uygulanmıştır (Şekil 4.2.).

Birinci gün, 5×10^4 hücre/agar grubunda sferoid çapı ortalama $235,45 \mu\text{m}$ iken, 1×10^5 hücre/agar grubunda bu değer $264,95 \mu\text{m}$ olarak kaydedilmiştir. Altıncı günün sonunda, 5×10^4 hücre/agar grubu için ortalama çap $303,89 \mu\text{m}$ 'ye, 1×10^5 hücre/agar grubu için ise $415,02 \mu\text{m}$ 'ye ulaşmıştır. Toplam ortalama çap değerlerine bakıldığında, 5×10^4 hücre/agar grubunda $252,64 \mu\text{m}$ ve 1×10^5 hücre/agar grubunda $287,00 \mu\text{m}$ olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.3.).

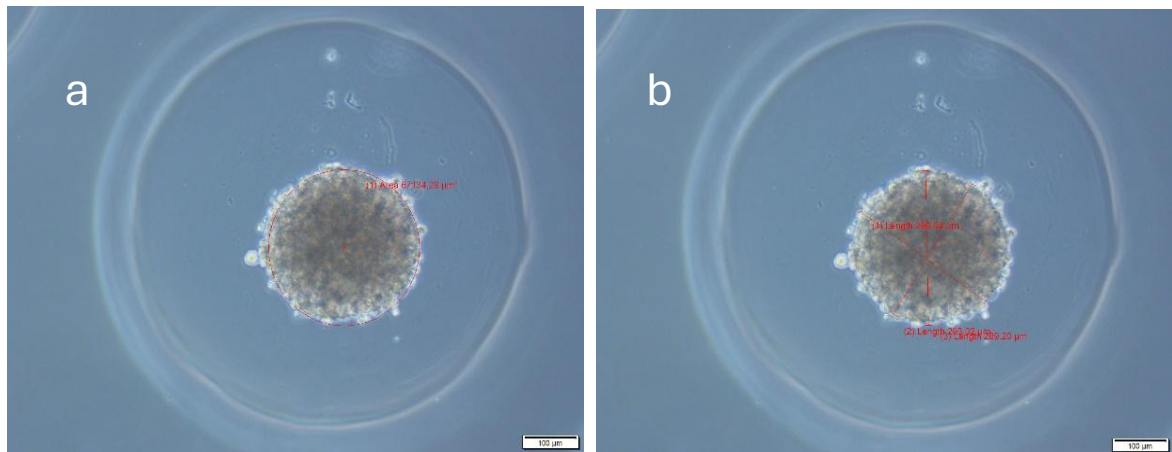
Alan ölçümlerinde, 1.gün 5×10^4 hücre/agar grubunda $46458,5 \mu\text{m}^2$, 1×10^5 hücre/agar grubunda ise $58484,21 \mu\text{m}^2$ değerleri elde edilmiştir. İnkübasyon sürecinin 6. gününde, 5×10^4 hücre/agar grubunun sferoid alanı $74894 \mu\text{m}^2$ 'ye ulaşırken, 1×10^5 hücre/agar grubunun alanı $131232 \mu\text{m}^2$ olarak belirlenmiştir. Her iki grup için hesaplanan ortalama sferoid alanları, 5×10^4 hücre/agar için $52907,99 \mu\text{m}^2$ ve 1×10^5 hücre/agar için $67486,9 \mu\text{m}^2$ 'dir (Şekil 4.4.).

Bu veriler ışığında, 1×10^5 hücre/agar konsantrasyonunun, 5×10^4 hücre/agar konsantrasyonuna göre hem çap hem de alan açısından anlamlı olarak daha büyük sferoidler oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle 1×10^5 hücre/agar grubu ileriki deneylerde kullanılmak üzere seçilmiştir.

İnkübasyon Zamanı	Hücre Sayısı	
	5×10^4 hücre/agar	1×10^5 hücre/agar
0 saat		
24 saat		
48 saat		
72 saat		

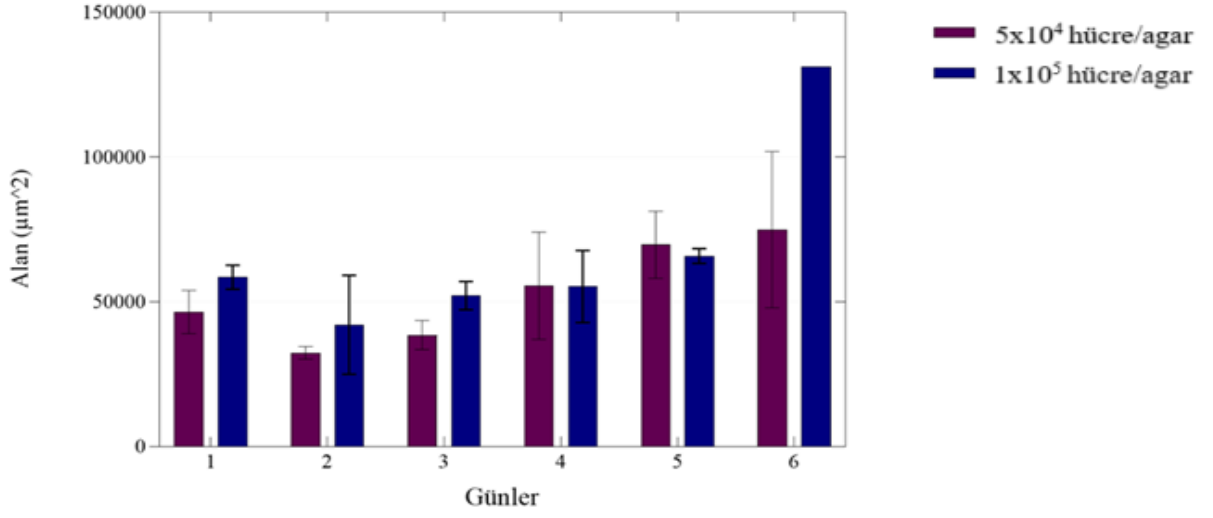


Şekil 4.1. Sferoid hücre gruplarında 6 gün (144 saat) boyunca sferoidlerin inverted mikrop görüntüleri (Ölçek Çubuğu: 10x).



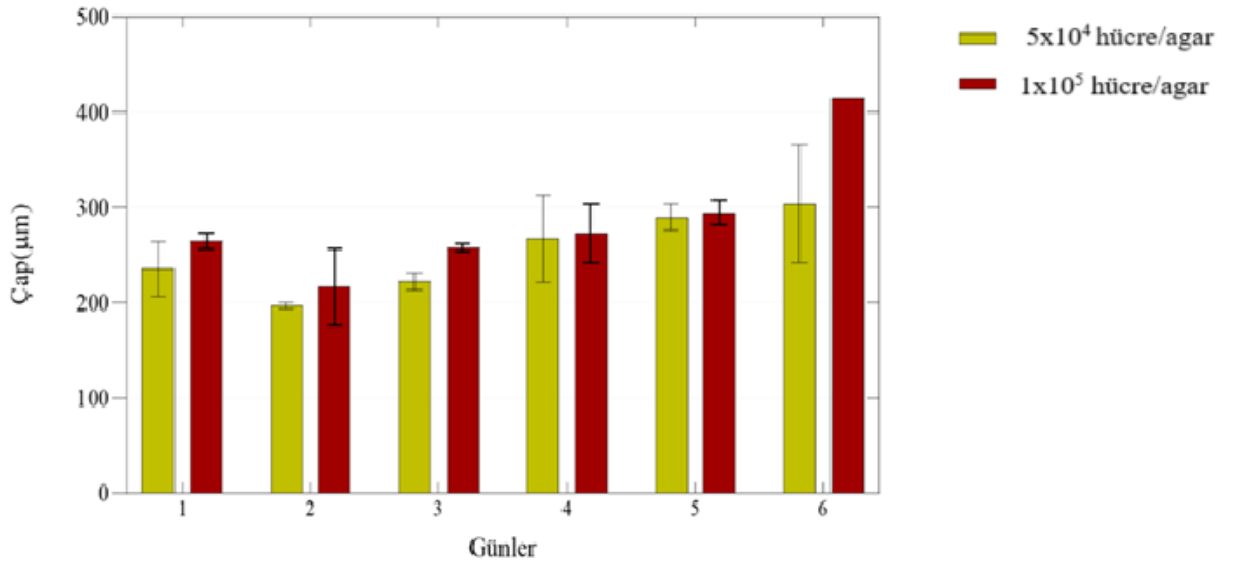
Şekil 4.2. 1×10^5 hücre/agar gruplarında 24 saat sonra a. sferoid alan ve b. çap ölçümü (Ölçek Çubuğu: 10x).

MDA-MB-231 Sferoidlerinde Alan Ölçümü



Şekil 4.3. Sferoidlerin 5×10^4 ve 1×10^5 hücre/agar grubunda alan ölçümü.

MDA-MB-231 Hücrelerinde Çap Ölçümü

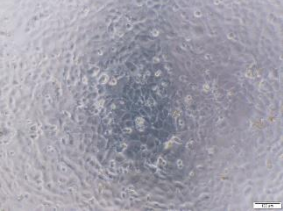
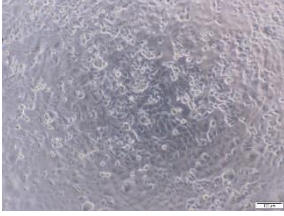
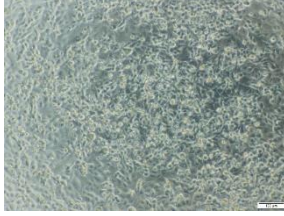
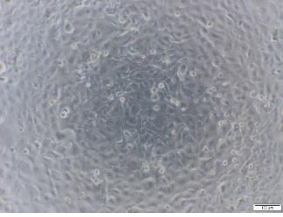
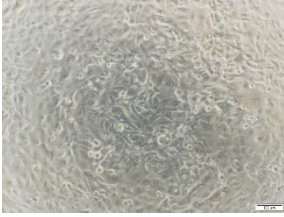
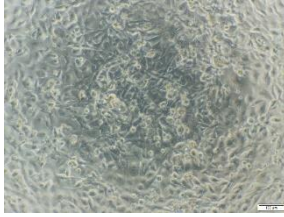

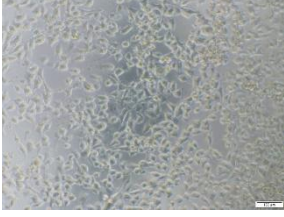
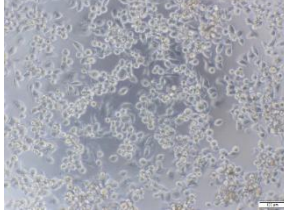






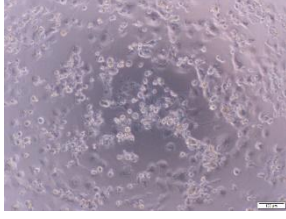


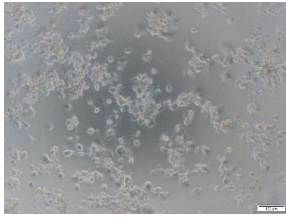
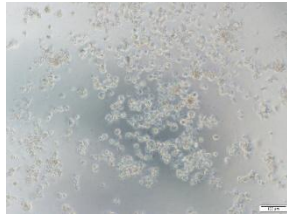
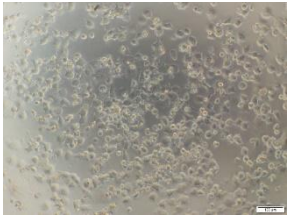
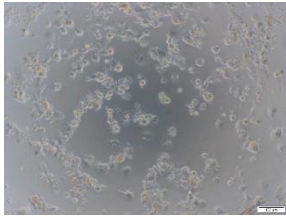
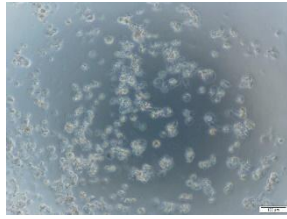
Şekil 4.4. Sferoidlerin 5×10^4 ve 1×10^5 hücre/agar grubunda çap ölçümü.

4.3. 2B ve 3B Kùltürlerde Canlılık Analizi Sonuçları

4.3.1. İki Boyutlu Hücrelerde Canlılık Analizleri

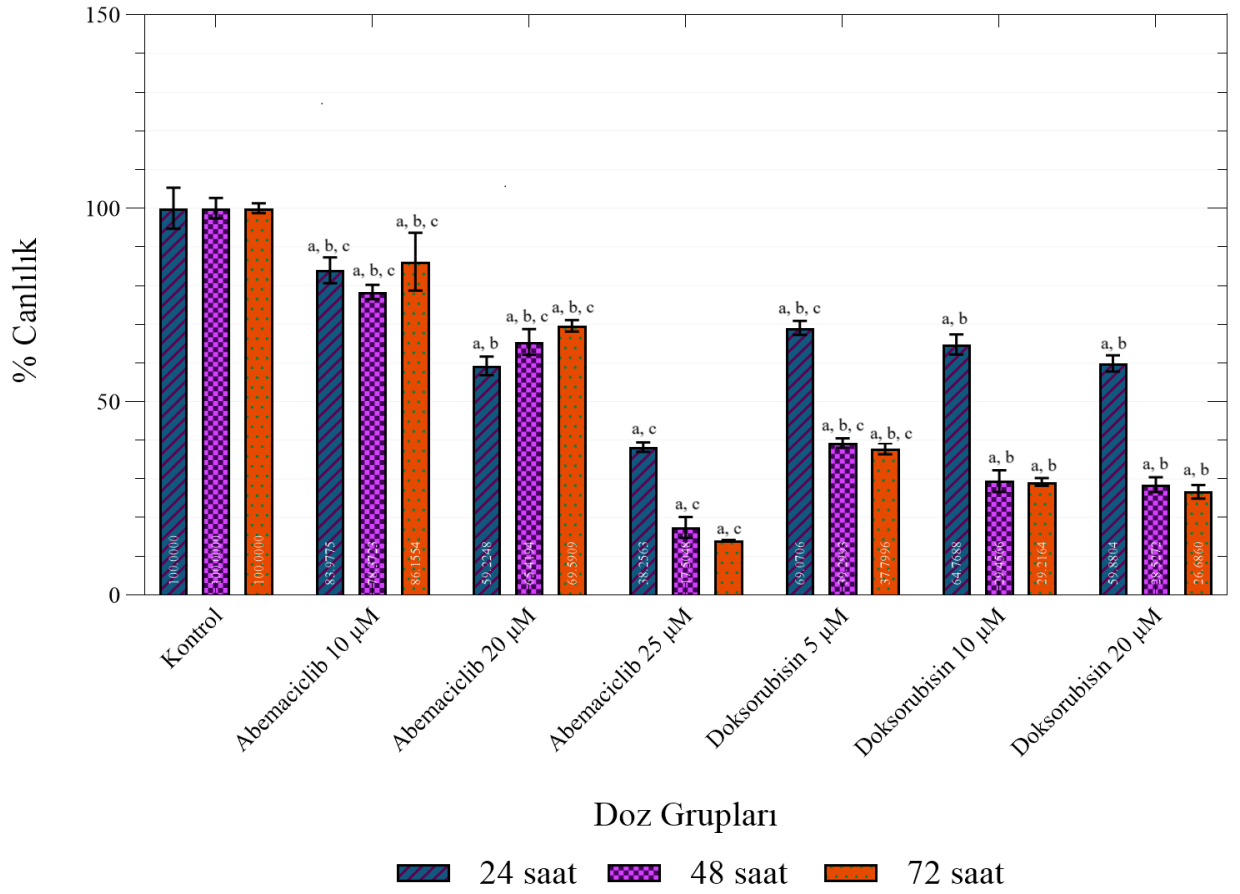
MDA-MB-231 hücre hattına uygulanan Abemacilib'in hücre canlılığı üzerindeki etkileri, pozitif kontrol grubu olarak Doksorubisin kullanılarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.5). Abemacilib, 10 µM, 20 µM ve 25 µM dozlarında uygulanmış ve 24, 48, ve 72 saatlik inkübasyon periyotlarında hücre canlılığında zamanla azalma gözlemlenmiştir. 72 saat sonunda, en yüksek dozun en belirgin etkiyi gösterdiği tespit edilmiştir. Doksorubisin ise 5 µM, 10 µM ve 20 µM dozlarında pozitif kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Bu ajanın, MDA-MB-231 hücrelerinde 48 ve 72 saat inkübasyon sonunda en yüksek iki dozun da hücre canlılığını zamana ve doza bağılı azalttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.6.). Abemacilib'in MDA-MB-231 hücrelerindeki IC₅₀ değeri çizelge 4.1.'de yer almaktadır.

	24 saat	48 saat	72 saat
Kontrol			
Abemacilib- 10 µM			
Abemacilib- 20 µM			

Abemaciclib- 25 μ M			
Doksorubisin- 5 μ M			
Doksorubisin- 10 μ M			
Doksorubisin- 20 μ M			

Şekil 4.5. 2B kültürde Abemaciclib ve Doksorubisin uygulamasından sonra inverted mikroskop görüntüleri (Ölçek Çubuğu: 10x).

MDA-MB-231 2B MTS Analizi

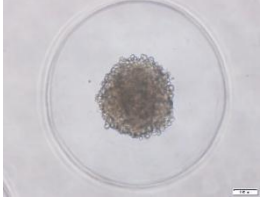
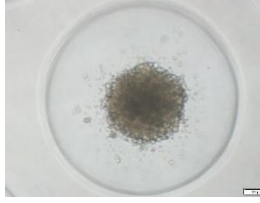
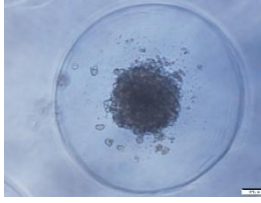
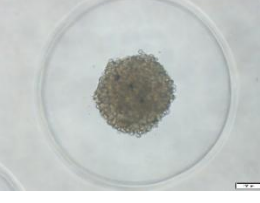
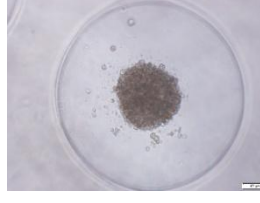
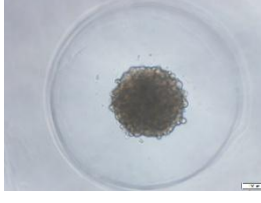
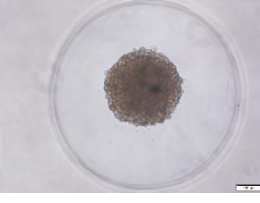

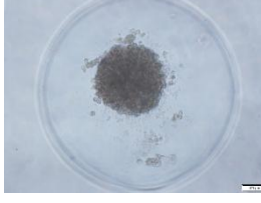

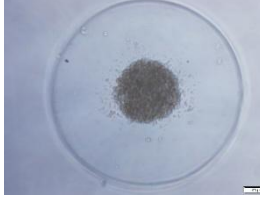
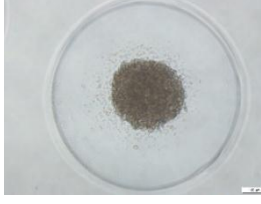

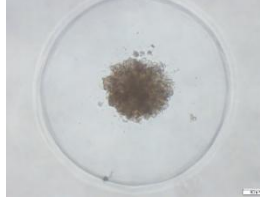
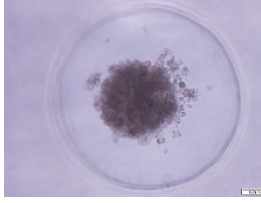
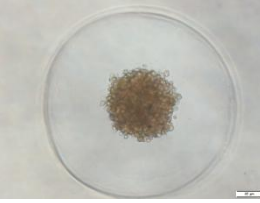
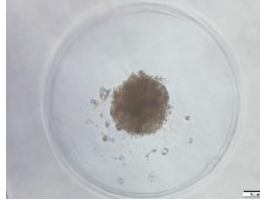
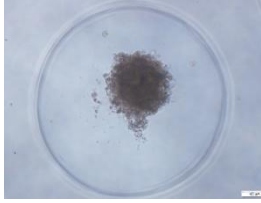
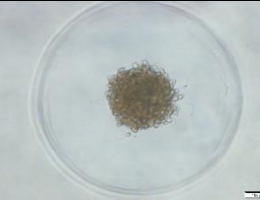
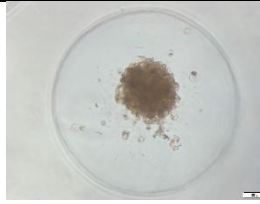
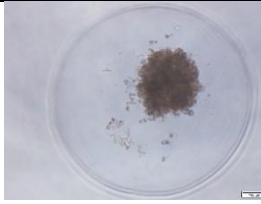


Şekil 4.6. MDA-MB-231 2B hücre kültüründe 24, 48 ve 72 saat Abemaciclib ve Dokсорubisin'in uygulaması sonrası canlılık analiz sonuçları. a: Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). b: Abemaciclib 25 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). c: Dokсорubisin 20 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

4.3.2. Üç Boyutlu Hücrelerde Canlılık Analizleri

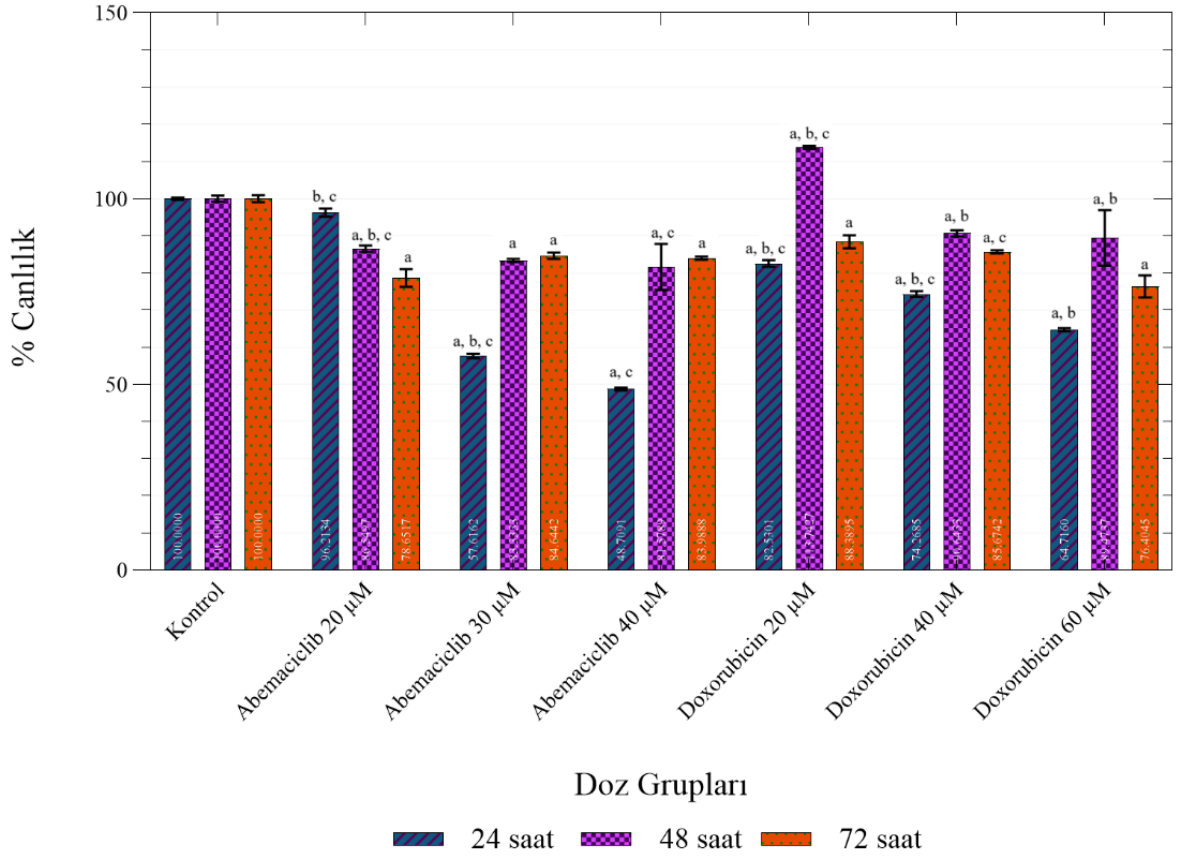
MDA-MB-231 sferoidlerinde Abemaciclib'in hücre canlılığı üzerindeki etkileri incelenmiş ve Dokсорubisin de pozitif kontrol grubu olarak kullanılmıştır (Şekil 4.7.). Abemaciclib, 20 µM, 30 µM ve 40 µM dozlarında uygulanmış ve 24, 48, ve 72 saatlik inkübasyon periyotlarında hücre canlılıkları gözlenmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonunda, Abemaciclib'in doz artışına bağlı olarak hücre canlılığında azalma olduğu ve en yüksek

dozun en yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Örneğin, Abemaciclib'in 40 µM dozu 24 saat sonunda hücre canlılığını %48,71'e düşürmüştür. Ancak, daha uzun inkübasyon sürelerinde (48 ve 72 saat), hücre canlılığı bir miktar artış göstermiştir. Doksorubisin ise 20 µM, 40 µM ve 60 µM dozlarında pozitif kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Doksorubisin de MDA-MB-231 sferoidlerinde, Abemaciclib gibi, 24 saatlik inkübasyon sonunda doz artışına bağlı olarak hücre canlılığını azaltmış ve en yüksek dozun en belirgin hücre canlılığı azalmasına neden olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, zamana bağlı olarak inkübasyon süresi arttıkça sferoidlerin ilaçlara karşı direnç kazandığı da tespit edilmiştir. Bu bulgular, MDA-MB-231 sferoidlerinde Abemaciclib'in güçlü bir sitotoksik ajan olduğunu ve hücrelerin zamanla bu ajanlara direnç geliştirebileceğini göstermektedir (Şekil 4.8.). Abemaciclib'in MDA-MB-231 sferoidlerindeki IC₅₀ değeri Çizelge 4.1.'de yer almaktadır.

	24 saat	48 saat	72 saat
Kontrol			
Abemaciclib-20 μM			
Abemaciclib-30 μM			
Abemaciclib-40 μM			
Doksürubisin-20 μM			
Doksürubisin-40 μM			
Doksürubisin-60 μM			

Şekil 4.7. Sferoidlerde Abemaciclib ve Doksürubisin uygulamasından sonra inverted mikroskop görüntüleri (Ölçek Çubuğu: 10x).

MDA-MB-231 Sferoidlerinde MTS Analizi



Şekil 4.8. MDA-MB-231 3B hücrelerinde Abemaciclib ve Doksorubisin'in farklı konsantrasyonlarda 24, 48 ve 72 saat inkübasyonlarda canlılık analiz sonuçları. a: Kontrol grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). b: Abemaciclib 40 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$). c: Doksorubisin 60 µM grubundan istatistiksel olarak önemli derecede farklı ($P \leq 0,05$).

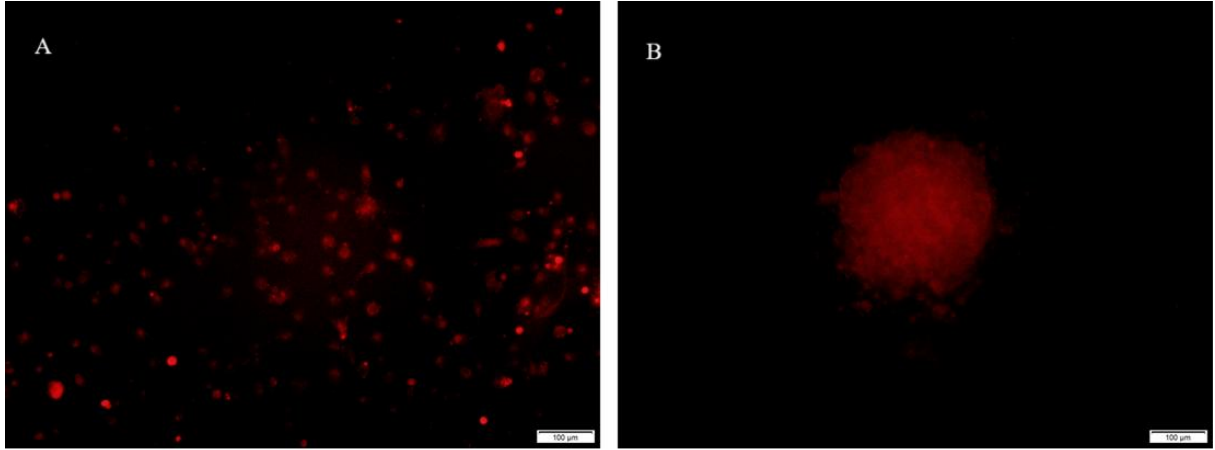
Abemaciclib IC ₅₀ (µM)	
2B Kültür	3B Kültür
21,471 µM	37,126 µM

Çizelge 4.1. Abemaciclib'in 2B ve 3B Kültürlerde IC₅₀ (µM) değerleri

4.4. İmmünofloresan Boyama

4.4.1. Canlı Hücre Boyama (CellTracker™)

CellTracker™ boya kullanılarak hem MDA-MB-231 hücre hattının hem 2B kültürde hem de 3B sferoid modellerinde hücre lokalizasyonu ve morfolojileri floresan boyamada görüntülenmiştir (Şekil 4.9). Bu boyama sonucunda, MDA-MB-231 sferoidlerinin tek bir hücre tipinden oluşan homojen ve bütüncül bir yapı sergilediği gösterilmiştir. Bu bulgu, modelin yapısal bütünlüğünü doğrulasa bile Abemaciclib'in sitotoksik etkilerinin altında yatan mekanzimaları tam olarak açıklamamakla birlikte hücrelerin 3B kültürde konumlarının net bir şekilde inverted mikroskop ile net bir şekilde görüntülenebilmesi tekrar değerlendirme yapılmasına imkân vermiştir. Böylece tezin bu noktadaki odağı hücrelerin morfolojik değişiklikleri ve Abemaciclib'in etkilerinin incelenmesi için diğer immünofloresan boyamalar ve akış sitometrisi ile doğrudan doğrudan analiz edilebilmesi olmuştur. Dolayısıyla, CellTracker™ boyaması, 3B sferoid modelinin başarılı bir şekilde oluşturulduğunu gösteren önemli bir doğrulama adımı olarak hizmet etmiş, ancak tezin ana bulguları ve tartışması, daha mekanistik veriler sunan diğer immünofloresan boyamalar ve akış sitometrisi analizleri üzerine yoğunlaştırılmıştır.



Şekil 4.9. MDA-MB-231 hücrelerinde CellTracker™ boyama A. 2B kültür. B. Sferoid (3B Kültür) (Ölçek Çubuğu: 10x).

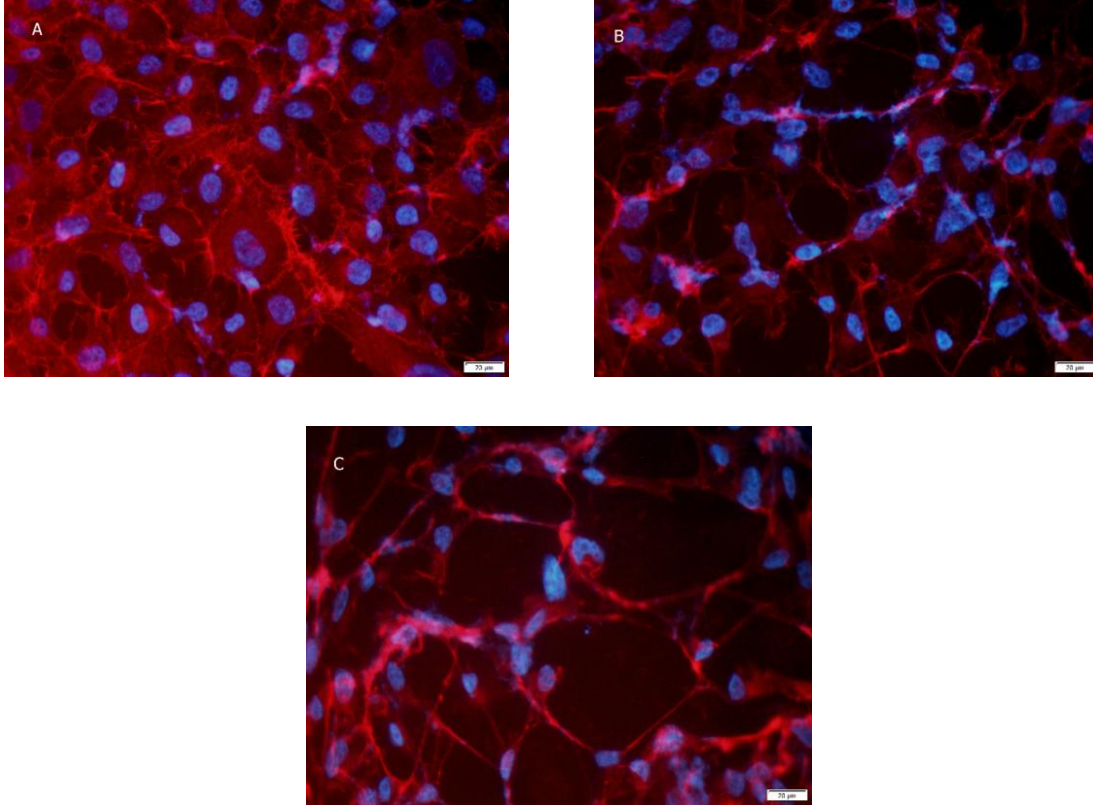
4.4.2. E-Kaderin İmmünofloresan Boyama

E-kaderin'in MDA-MB-231 hücrelerinde varlığını belirlemek için immünofloresan boyama yapılmıştır. Çalışmada farklı boyama metodları kullanılmıştır. Ancak bir E-kaderin ifadesi olmadığı için immünofloresan mikroskopta görüntü alınamamıştır. Buna bağlı olarak, farklı fiksasyon, permeabilizasyon ve boyama protokolleri denenmiştir. Alternatif fiksasyon yöntemi olarak paraformaldehit ile oda sıcaklığında 20 dakika inkübasyon, permeabilizasyon için %0,1-0,5 Triton-x, %5 keçi serumu ile blokaj, 1:100 ile 1:200 primer dilüsyon oranları, 2 saat +4°C'de inkübasyon, sekonder antikor için ise 1:500-1:1000 arasında değişen dilüsyonlar kullanılmıştır. Ancak uygulanan farklı metotlara rağmen, MDA-MB-231 hücrelerinde mikroskopta herhangi bir görüntü alınamamıştır. Literatürde Kowalczyk ve Nanes (2012) tarafından da belirtildiği gibi, E-Kaderin'in hücre yüzeyinde sürekli olarak endositoz ve geri dönüşüm süreçleri ile düzenlendiği ve bu durumun hücreler arası adezyon gücünü doğrudan etkilediği bilinmektedir. Bu nedenle, çalışmada kullanılan hücre hattı (MDA-MB-231), kültür koşulları ve uygulanan protokolün, özellikle permeabilizasyon ve antikor inkübasyonu aşamalarında E-kaderinin yüzey stabilitesini bozmuş olması muhtemeldir. Özellikle permeabilizasyon işlemi sırasında hücre membran bütünlüğünün bozulması veya E-kaderinin hücre yüzeyinden kaybolması nedeniyle, antikorların hedef proteine erişiminin zorlaşmış olabileceği öngörülmektedir.

4.4.3. F-Aktin İmmünofloresan Görüntüleri

MDA-MB-231 hücrelerine 24 saat boyunca Abemaciclib uygulamasının ardından, hücrelere mekanik destek sağlayan hücre iskeleti elemanlarından olan F-aktin filamentlerini belirlemek amacıyla immünofloresan boyama uygulanmış ve ardından immünofloresan mikroskopta inceleme gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubunda yer alan F-aktin filamentlerinin sitoplazma ve hücre zarında düzenli ve homojen bir şekilde dağıldığı gözlenmiştir. 10 µM Abemaciclib uygulamasında ise F-aktin filamentleri kontrole göre kıyaslandığında filamentler kalınlaşmış ve hücrelerin uzantılarının arttığı ve hücre iskeletinin hücre bütünlüğünü koruyamamaya başladığı gözlenmiştir. 20 µM Abemaciclib uygulamasından sonra ise F-aktin filamentleri bazı bölgelerde kaybolmuş ve çok büyük bir miktarda da azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca hücre sınırlarının netlikleri

de kaybolmuştur. Hücre şeklini kaybetmiş ve hücre iskeletinin ise tamamen dağınmışlığı tespit edilmiştir. Abemaciclib'in doz miktarının artması hücresel bütünlüğün yitirilmesine ve buna bağlı olarak da F-aktin filamentlerinin yapısının dağılmasına sebep olmuştur (Şekil 4.10.).

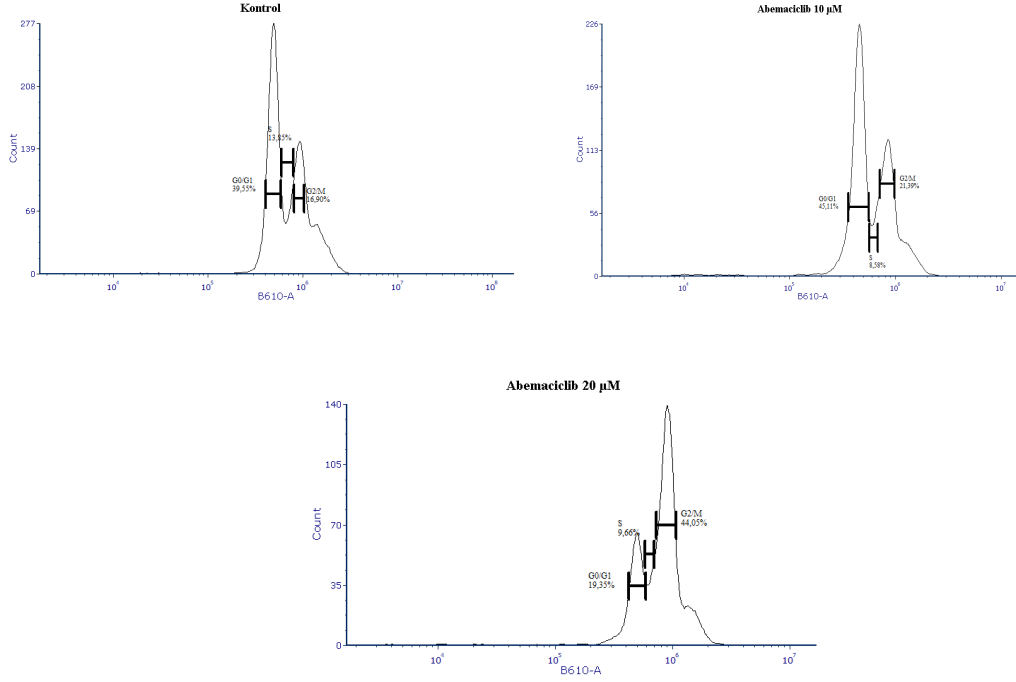


Şekil 4.10. MDA-MB-231 hücrelerinde F-aktin immüno Floresan boyama görüntüleri. A. Kontrol, B. 10 µM Abemaciclib, C. 20 µM Abemaciclib (Ölçek Çubuğu: 40x).

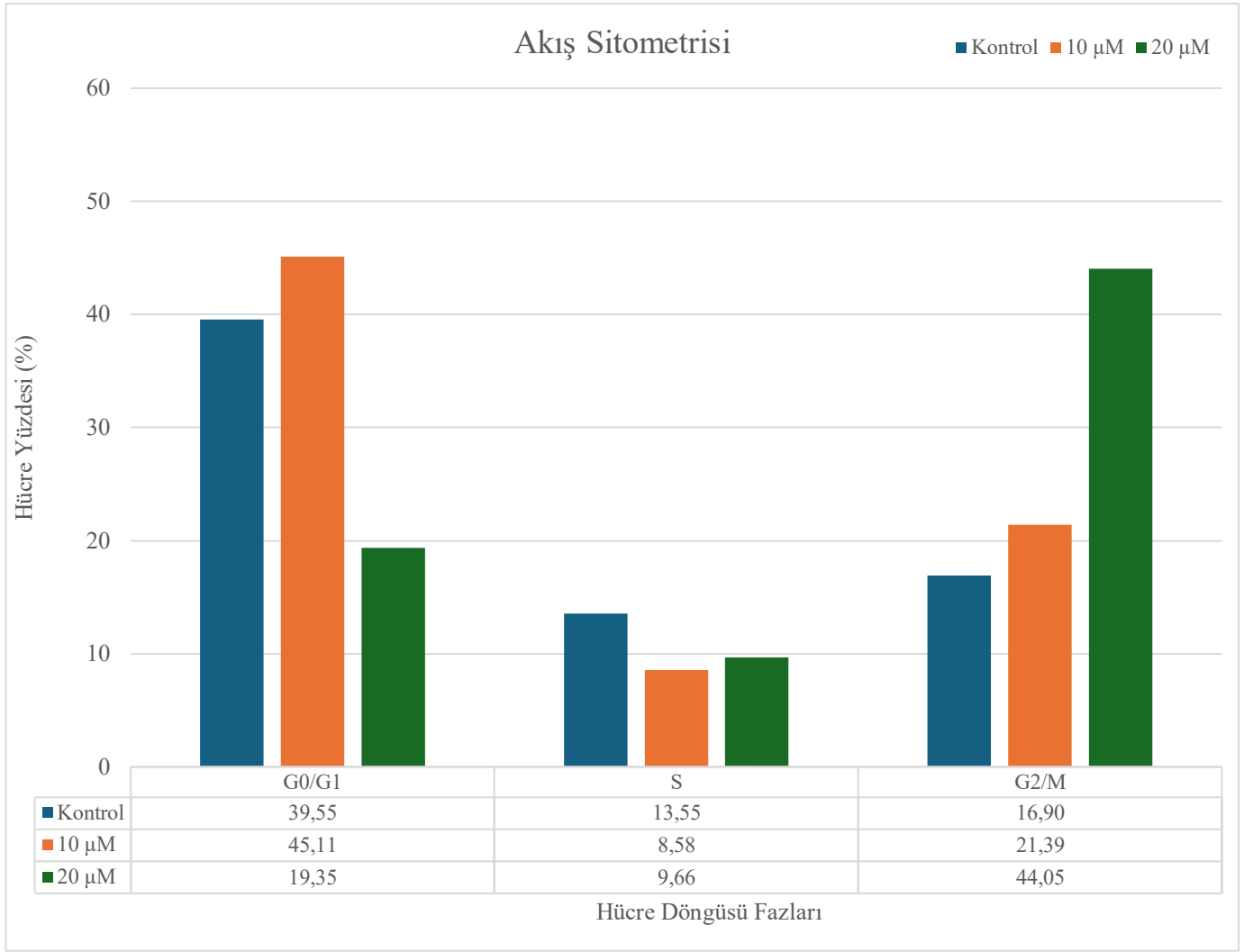
4.5. Akış Sitometri Hücre Döngüsü Sonuçları

MDA-MB-231 hücrelerine 48 saat boyunca Abemaciclib 10 µM ve 20 µM uygulanarak, ilacın hücre döngüleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Akış sitometrisi ile analiz edilen hücre döngüsü profilleri kontrol grubu da eklenerek 10 µM ve 20 µM dozları karşılaştırılmıştır (Şekil 4.11.). Kontrol grubunda, hücrelerin çoğunluğu G0/G1 fazında (%39,55) bulunurken, S fazında %13,55 ve G2/M fazında %16,90 oranında hücre saptanarak hücrelerin dengeli dağıldığı gözlenmiştir. 10 µM Abemaciclib uygulamasında ise hücrelerin en çok G0/G1 fazında %45,11 ile en çok toplandığı, buna karşın S fazındaki hücre oranının azaldığı (%8,58) ve G2/M fazındaki hücre oranının ise kontrol grubuna

kıyasla arttığı (%21,39) gözlenmiştir. 20 μ M Abemaciclib'in uygulandığı grupta ise G0/G1 fazında tutulan hücrelerin büyük bir oranda düştüğü (%19, 35) buna karşın G2/S fazında ise hücrelerin en çok tutuklu kaldığı (%44,05) tespit edilmiştir. S fazında ise 10 μ M uygulamasındaki gibi S fazındaki hücre oranı çok düşük olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.12.).



Şekil 4.11. Abemaciclib uygulamasının (10 μ M ve 20 μ M) MDA-MB-231 hücrelerindeki hücre döngüsü dağılımı üzerindeki etkilerini gösteren akış sitometrisi histogram grafikleri.



Şekil 4.12. Abemaciclib uygulamasının (10 µM ve 20 µM) MDA-MB-231 hücrelerindeki hücre döngüsü dağılımı üzerindeki etkilerini gösteren akış sitometrik analizi (G0/G1, S ve G2/M fazlarındaki hücre yüzdeleri, kontrol hücreleriyle karşılaştırılmıştır).

5. TARTIŞMA

Kanser, dünya genelinde en yaygın ve ölümcül hastalıkların başında gelmekte olup en yaygın ölüm sebeplerinden biridir (Wild, Weiderpass ve Stewart, 2020). Kanser türlerinin arasında en ölümcülleri arasında yer alan meme kanseri, kansere bağlı ölümlerin başında gelmektedir. Her ne kadar tedavi seçenekleri geliştirilmiş olsa bile özellikle metastatik meme kanserleri ölüm nedenlerinin yaklaşık %15'ini oluşturmaktadır. Metastatik meme kanser alt tipi olan üçlü negatif meme kanseri (TNBC), ER, PR ve HER-2 ifadelerine sahip olmadığı için hormonal ve hedefe yönelik tedavilere yanıt vermeyip en kötü prognoza sahiptir. Bu durum bu alt tipe sahip hastaların tedavisinde kemoterapi süresini uzatmakta ancak bu durum tümörlerin kemoterapötik ajanlara karşı direnç geliştirmesine ve buna bağlı olarak ilaçların yan etkilerini arttırmaktadır. Bu da klinik başarıyı kısıtlamaktadır.

Preklinik çalışmalarda *in vitro* çalışmalarda kullanılan düşük maliyetli ve kolay erişebilirlikleri ile 2B hücre kültürleri en çok tercih edilen teknik haline gelmişlerdir (Wang ve ark., 2022). Yine de 2B hücre kültürleri, kanser hücrelerinin geliştiği tümör mikro çevrelerini ve kanser hücrelerinin etkileşimlerini tam olarak yansıtamamaktadırlar. Bu nedenle son yıllarda gelişen teknikler ile tümör ortamını çok daha iyi yansıtan 3B hücre kültürlerinin kullanımları yaygınlaşmaya başlamıştır. MDA-MB-231 hücre hattı TNBC alt tipine ait bir hücre hattıdır (Lehmann ve ark., 2011). Bu hücre hattı özelliklerinden dolayı *in vitro* koşullarda ilaç direnci ve hücre davranışlarında ayrıca 3B ortamlarda da agresif kanser hücrelerinin çevreleri ile davranışlarının incelenmesi transwell invazyon testleri ve 3B sferoid kültürleri gibi çalışmalarda kullanılmaktadır (Bonnier ve ark., 2015).

Tez çalışması kapsamında MDA-MB-231 hücre hattı, 5×10^4 hücre/agar ve 1×10^5 hücre/agar olacak şekilde iki farklı hücre konsantrasyonunda hücre ekimi yapılarak 3B Petri Dish® metodu ile sferoidlerin oluşturulmuş ve bunların yapıları inverted mikroskop ile incelenmiştir. İlk gün 5×10^4 hücre/agar grubunda ortalama çap değeri 235,45 μm iken altıncı günün sonunda ise bu değer 303,89 μm 'ye çıkmıştır. Benzer şekilde 1×10^5 hücre/agar grubunun ilk gün ortalama çap değeri 264,95 μm iken altıncı günün sonunda ise ortalama çap 415,02 μm 'ye çıkmıştır. Bu bulgu farklı hücre konsantrasyonlarının TNBC hacimsel genişlemesini ve metastatik doğasını fizyolojik koşullara yakın bir şekilde taklit ettiğini düşündürmektedir. Literatürde MDA-MB-231 hücre hattının farklı

teknikler kullanılarak oluşturulan sferoidlerdeki farklı hücre konsantrasyonları farklı boyutları ortaya koymaktadır. Badea ve ark. 2022 yılında yaptıkları çalışmalarında MDA-MB-231 hücre hattını kullanarak damla başına farklı hücre sayısı kullanarak asılı damla yöntemi ile sferoidler oluşturmuşlardır. Elde edilen ortalama çap değerleri farklı konsantrasyonlarda çalışmamız ile uyumlu olarak farklı değerler sergilerken çap boyutlarını zamanla azaldığı tespit edilmiştir. Yapılan ölçümlerde, bu değerler 2500 hücre/damla grubunda ilk gün 430,71 μM iken altıncı günün sonunda bu değer ortalama 250, 54 μM 'e kadar düşmüştür. 5000 ve 8000 hücre/damla gruplarında da ortalama hücre çapı azalmıştır (Badea, Balas ve Dinishiou., 2022). Bununla birlikte, çalışmamız ile uyumlu olarak Dubois ve ark. MDA-MB-231 hücre hatlarını kullanarak ultra düşük bağlantı plakaları ve Geltrex® 3B sferoid modeli geliştirdikleri çalışmalarında hücre ekiminden sonra sferoid ortalama çap değerleri zamana bağlı olarak artmıştır. 2000 hücre/kuyucuk gruplarında ortalama çap değeri 612 μm olurken sekizinci günün sonunda bu değer 843 μm 'ye çıkarken 10.000 hücre/kuyucuk gruplarında ilk gün ortalama çap 826 μM , 8. gün ortalama çap düşerken 14. gün bu değer 848 μM 'e çıkmıştır. (Dubois ve ark., 2017). Çalışmalarımızın sonuçları 2019 yılında yapılmış olan bir çalışmanın sonuçları ile uyumlu olduğu görülmüştür. Bu çalışmada araştırmacılar MDA-MB-231 hücre hattını kullanarak Matrigel destekli ortamda 3B tümör sferoidleri geliştirmiş ve oluşan sferoidlerin yapılarının incelenmesi amaçlanmıştır. Yapılan sferoid gözlemlerinde 5000 hücre/kuyucuk gruplarında ilk gün 420 μM olan ortalama çap çalışmamızdaki ile benzer şekilde artarak altıncı günün sonunda bu değer 700 μM değerine ulaşmıştır. (Badea ve ark., 2019). Elde edilen bulguların farklılıklarının kullanılan yöntem farklılıklarına, başlangıçtaki hücre sayıları ve deneysel koşullar gibi değişkenliklerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Buna ek olarak tez çalışmamız kapsamında literatürden farklı olarak MDA-MB-231 hücre hattının 3B Petri Dish® yöntemi ile sferoidlerinin oluşturulmasının ilk uygulaması sunulmaktadır. Bu nedenle bu yaklaşım, tez önerisinde vurgulanan özgün değerlerin en önemli göstergesi olup literatürdeki önemli bir boşluğu doldurmaktadır. Aynı zamanda, yaygın etki açısından bakıldığında, bu model sayesinde üçlü negatif meme kanseri gibi agresif tümör hücrelerinin 3 boyutlu koşullar altında nasıl davrandığına dair yeni veriler elde edilmesi gerek ilaç endüstrisi gerekse akademik alanda gelecekteki çalışmalara ışık tutacak ve referans oluşturacaktır. Bu sonuçlar, hem kanser ilaçlarının etkilerinin 3 boyutlu mikro çevrede gerçekçi bir şekilde değerlendirilmesinde hem de *in vitro* koşulların *in vivo* ortama yaklaşmasında önemli bir katkı sağlamaktadır.

MDA-MB-231 hücre hattının iki boyutlu (2B) kültür koşullarında uygulanan Abemaciclib'in hücre canlılığını doza ve zamana bağlı olarak belirgin biçimde azalttığı gözlemlenmiştir. Özellikle 72 saat sonunda 25 μM dozunda hücre canlılığının %14,02'ye kadar gerilemesi, ilacın güçlü bir inhibe edici etkisini göstermektedir. Pozitif kontrol olarak değerlendirilen Doksorubisin (5, 10 ve 20 μM) de benzer şekilde, doza ve zamana bağlı olarak canlılığı düşürmüştür. Çalışmada elde edilen konsantrasyonlara bağlı Çizelge 4.1'de gösterilen 21,47 μM IC_{50} değeri literatürdeki veriler ile karşılaştırıldığında kısmi olarak benzerlik olsa da Abemaciclib'in farklı çalışmalarda farklı sonuçlar verdiğini göstermektedir. Anwer ve ark. tarafından yapılan Abemaciclib yüklü nanosüngerlerin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine etkilerini inceledikleri çalışmada Abemaciclib'in MDA-MB-231 hücrelerindeki IC_{50} değerini yaklaşık 36,7 μM olarak bildirmişlerdir (Anwer ve ark., 2022). Sodyum bütrat ve Abemaciclib'in MDA-MB-231 hücrelerinde etkilerinin incelendiği bir çalışmada ise Abemaciclib'in IC_{50} değeri 14,55 μM olurken kombine tedavide ise bu IC_{50} değeri 2,55 μM 'a kadar düştüğü rapor edilmiştir (Elnozahi ve ark., 2023). Abemaciclib'in kullanıldığı bir başka çalışmada da önceki literatür verileri gibi farklı bir IC_{50} değeri çıkmış olup bu değer ise 2,21 μM 'dır (Fleisher ve ark., 2021). O'Brien ve ark. 2018 yılında 44 farklı hücre hattında Abemaciclib'in etkileri gözlemledikleri çalışmada ise IC_{50} değeri 0,443 μM olarak hesaplanmıştır (O'Brien ve ark., 2018). Önceki senelere benzer şekilde 2025 yılında yayınlanmış iki farklı çalışmada da IC_{50} değerleri sırasıyla 32 μM ve 18,02 μM olarak rapor edilmiştir (Sharakay ve ark., 2025; He ve ark., 2025). Verilerdeki bu farklılık hücre ekim yoğunluğu, inkübasyon süresi ve kullanılan farklı formülasyonlar gibi deneysel koşullar ile hücre hattının alt popülasyonlarına bağlı değişkenlerin getirdiği farklı metodolojilerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Çalışmamız, standart 2B kültür koşullarında Abemaciclib'in MDA-MB-231 hücrelerinin profilerasyonunu baskılayarak etkinliğini doğrulayıp literatürdeki geniş IC_{50} aralığında bu ilacın hem laboratuvar hem de klinik çalışmalarda doz optimizasyonunun kritik bir öneme sahip olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, Abemaciclib'in MDA-MB-231 hücre hattı gibi TNBC alt tipi hücrelerinde umut verici bir terapötik ajan olabileceği, ancak farmakokinetik parametrelerin dikkatle belirlenmesi gerektiğini vurgulamaktadır.

MDA-MB-231 hücre hattının üç boyutlu (3B) kültür koşullarında Abemaciclib uygulaması sonucunda elde edilen bulgular 20, 30 ve 40 μM konsantrasyonlarında 24 saatlik Abemaciclib uygulamasının, sferoid canlılığını belirgin ölçüde azalttığını, ancak

48 ve 72 saatlik inkübasyon sürelerinde kısmi bir canlılık artışı gözlemlendiğini göstermiştir. Bu durum, özellikle üç boyutlu tümör modellerinde ilaç direncinin zamanla gelişebildiğini ortaya koyarak, ilaç etkinliğinin uzun süreli değerlendirmelerde değişebileceğine işaret etmektedir. Pozitif kontrol olarak kullanılan Doksorubisinin de benzer şekilde hücre canlılığını düşürmesine rağmen, aynı dozlarda Abemaciclib'in daha yüksek sitotoksik etki göstermesi, bu ilacın triple negatif meme kanseri hücreleri üzerindeki potansiyel etkinliğini vurgulamaktadır. Literatür karşılaştırmasında MDA-MB-231 hücre hattına ait 3B sferoid modelinde Abemaciclib'in etkilerini araştıran bir makale incelenmiştir. Bu çalışmada Abemaciclib'in MDA-MB-231 3B sferoid üzerine etkisini floresan boyama yöntemi ile incelemiş olmalarına rağmen hücre canlılık analizi yapılmamıştır (Nehme ve ark., 2025). Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi'nin (FDA) 2015 yılında onay verdiği ilk CDK4/6 inhibitörü olan Palbociclib ile yapılan literatür çalışmalarına bakıldığında (Beaver ve ark., 2015), Velez ve ark. (2022) tarafından bildirilen çalışmada Palbociclib'in MDA-MB-231 sferoid modelinde IC₅₀ değeri 29,7 µM olurken, bir başka çalışmada ise (Doello, 2021) Palbociclib'in MDA-MB-231 sferoidlerindeki IC₅₀ değeri 29,69 µM olarak rapor edilmiştir. Palbociclib ve bu tez çalışmasında Çizelge 4.1'de yer alan Abemaciclib'in 37,126 µM'deki IC₅₀ değeri farklı çıkmıştır. Bunun nedeni benzer etki mekanizmalarına sahip olsa ilaç etki mekanizmalarının farklı olduğu bildirilmiştir (George ve ark., 2021). Bununla birlikte bir başka inhibitör olan Ribociclib'in MDA-MB-231 3B sferoid modellerine yönelik etkilerini inceleyen herhangi bir yayına rastlanmamıştır. Literatürdeki diğer benzer ilaçlara ait çalışmaların az olması veya olmaması bu yöndeki eksikliği daha da belirgin hale getirmektedir. Sferoid modelin, 2B modele kıyasla ilaca karşı gelişen direnç mekanizmalarının daha belirgin hale geldiği görülmüştür. Çalışmamız ile uyumlu olarak literatürde, 3B modellerin *in vivo* tümör mikroçevresini daha gerçekçi yansıtarak ilaçlara karşı daha güçlü bir direnç gösterdiği vurgulanmaktadır (Sant ve Johnston, 2017). Sferoidlerde bulunan hücreler arası ve hücre-matris etkileşimler, temas aracılı sinyaller üreterek hayatta kalma yollarını güçlendirmektedir (Olive ve Durand, 2014). Sferoidlerin katmanlı ve çok hücreli yapısı ilacı, oksijeni ve besinlerin iç bölgeye ulaşmasını zorlaştırarak sferoid merkezinde hipoksi ve besince fakir bir bölge oluşturmaktadır. Böyle bir ortamda hücreler çoğunlukla G0/G1 fazına geçerek hücre bölünmesini duraksatabilir. (Minchinton ve Tannock, 2006). Bu durumda da Abemaciclib etkinliği azalmaktadır (Imamura ve ark., 2015). Buna ek olarak sferoid yapısı ilaç penetrasyonunu da azaltarak, ilacın sferoidin merkezine girmesini engellemektedir (Velliou ve ark., 2020).

Ayrıca, 3B ortam, ilacı dışarı atan pompaların ve anti apoptotik proteinlerin artan ifadesi ile birlikte yavaş döngülü kanser kök hücresi benzeri alt popülasyonları zenginleştirerek ilaca karşı doğal bir direnç havuzu oluşturmaktadır (Reynolds ve ark., 2017; Vinci ve ark., 2012). Dolayısıyla, 3B sferoid kültür sistemlerinde elde edilen veriler, klinik deneyleri öngörme bakımından daha değerli ipuçları sunmaktadır. Sonuç olarak, MDA-MB-231 sferoid modelinde Abemaciclib'in etkinliği hakkında sunulan bu yeni bulgular, hem literatürdeki önemli bir boşluğu kapatmakta hem de üç boyutlu modellerde ilaç etkileşimlerini ve direncini araştırma gerekliliğine dikkat çekmektedir. Gelecekte yapılacak çalışmaların, başta Palbociclib ve Ribociclib gibi benzer etki mekanizmalarına sahip ilaçlar olmak üzere, farklı moleküllerle veya kombinasyon tedavileriyle 3B sferoid modelleri kullanarak yapılması; direnç mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına, tedavi protokollerinin geliştirilmesine ve sonuçta klinik uygulamalarda daha etkin yaklaşımların oluşturulmasına katkı sağlayabilecektir.

Tez çalışması kapsamında E-Kaderin immünofloresan boyama denemelerinde, beklenen hücrel sinyallerin elde edilememesi, literatürdeki bilgiler ile tutarlılık göstermektedir. MDA-MB-231 hücre hattının karakteristik özelliklerinden olan düşük E-Kaderini ifadesi veya ifade kaybı bu sonucu açıklayan özelliklerden biridir. MDA-MB-231 hücre hattı epitelya mezankimal geçiş (EMG) sürecini tamamlayıp mezenşimal fenotipe geçmiştir. Bu geçiş sırasında, hücreler arası yapışmada rol oynayan E-Kaderin ifadesi genellikle azalmakta veya tamamen kaybolmaktayken, N-kaderin gibi belirteçlerin ifadesinde artışa neden olabilmektedir (Chu ve ark., 2013). Ayrıca MDA-MB-231 hücre hattında E-Kaderin eksiliğinin olası nedenlerinden biri de bu proteinin hücre yüzeyindeki dinamik dönüşüm döngüleri (endositoz, geri dönüşüm veya proteolitik parçalanma) ile ilişkilendirilebilir. Bu döngüler hücreler arası adezyon gücünün kontrolünde kritik bir role sahip olduğu bildirilmiştir (Le, Yap ve Stow, 1999). Kowalczyk ve Nanes (2012) tarafından da vurgulandığı üzere, E-Kaderin'in hücre yüzeyindeki varlığı sürekli olarak endositoz ve geri dönüşüm süreçleri ile düzenlenmekte ve bu durum hücreler arası adezyon gücünü doğrudan etkilemektedir (Kowalczyk ve Nanes, 2012). Tez çalışmasında kullanılan hücre hattı, kültür koşulları ve uygulanan protokolün, özellikle permeabilizasyon ve antikor inkübasyonu aşamalarında E-Kaderin'in yüzey stabilitesini bozmuş olması muhtemeldir. Bu durum, MDA-MB-231 hücreleri ile hücre adezyon mekanizmaları üzerine çalışırken, E-kaderin'in düşük ekspresyonu göz önünde bulundurularak alternatif moleküllerin (örneğin, N-kaderin, Vimentin, Integrinler)

incelenmesinin daha verimli bir yaklaşım olabileceğini işaret etmektedir. Ayrıca, boyama protokolünde tercih edilen antikörlerin etkinliği, dilüsyon oranları ve inkübasyon süreleri gibi teknik detayların da hedeflenen immünofloresan sinyallerinin elde edilememesinde rol oynadığı düşünülmektedir. Bu faktörlerin toplam etkisi, beklenen hücreSEL görüntüleri yakalamayı zorlaştırmış olup bu durum MDA-MB-231 hücre hattının düşük E-kaderin ifadesi ile tutarlı sonuç vermiştir. Bu durum, deneysel tasarım aşamasında hücre hattı seçiminin ve hedeflenen proteinin karakteristik özelliklerinin titizlikle değerlendirilmesinin önemini bir kez daha vurgulamaktadır.

Tez çalışması kapsamında Abemaciclib'in farklı konsantrasyonlarının MDA-MB-231 hücre hattındaki hücre iskeleti üzerinde oluşturduğu etkileri incelemek amacıyla gerçekleştirilen F-aktin immünofloresan boyama sonuçları, hücre iskeletinde belirgin doz-bağımlı değişimler olduğunu göstermiştir. Abemaciclib'in uygulanmayan kontrol grupta F-aktinler sitoplazmada düzenli ve homojen bir şekilde dağılışı gösterirken, 10 μ M derişimde filamentler kalınlaşmış ve hücre uzantılarında artış olmuştur. 20 μ M'de ise filamentler belirgin bir şekilde kaybolduğı ve hücre sınırlarının tamamen netliğinin kaybolduğı gözlenmiştir. Bu durum, hücrelerin morfolojik bütünlüğünün bozulduğunu ve iskelet yapısının dağınık bir görünüme büründüğünü göstermektedir. Elde edilen bulgular, Abemaciclib dozunun artmasıyla F-aktin filamentlerinde belirgin bir bozulmanın meydana geldiğini, buna bağılı olarak hücre bütünlüğünün ve şeklinin kaybolduğunu ortaya koymaktadır. Literatür incelendiğinde, Wu ve ark. 2016 yılında yaptıkları bir çalışmada, Sinoporfirin Sodyum (DVDMS) aracılı fotodinamik tedavinin (PDT) MDA-MB-231 hücrelerinde etkilerini incelediklerinde, bu tedavinin F-aktin kaybına neden olduğı ve bu durumun hücre hareketliliğini azalttığı bulmuşlardır. 2020'de yapılan bir çalışmada, güçlü bir antikanser aktivitesine sahip olduğı bilinen kebulinik asit'in MDA-MB-231 hücre hattı üzerine yarattığı etkiler incelendiğinde, bu bileşiğın kanser hücrelerinde invaziv özelliğı etkilediğini ve F-aktin boyamada ise kontrol grubuna göre stres liflerinin yapısında yer alan F-aktinin kaybına bağılı olarak hücre hattının epitelyal mezenşimal geçişin gerilediğı, epitelyal bir fenotipe geçtiğı ve bu nedenle hücre göçü ve metastazı azalabileceğı rapor edilmiştir (Sharma ve ark., 2020). Eyes Absent (EYA) tirozin fosfatazlar enzimine duyarlı ve kendi kendine toplanabilen peptitlerin geliştirildiğı ve bunların da Doksurubisin etkinliğini arttırmak için yapılan bir çalışmada bu peptitler hem kendi başlarına hem de Doksurubisin ile birlikte MDA-MB-231 hücrelerine uygulandığında peptitlerin uygulandığı hücrelerde F-aktin yapısının

bozulduğu, yüksek konsantrasyonlarda bu bozulmanın daha da arttığı bildirilmiştir. Ayrıca kombine uygulamadan sonra ise F-aktin yapısının neredeyse ortadan kalktığı tespit edilmiştir (Carney ve ark., 2024). Başka bir çalışmada uygulanan antikanser tedavisinin MDA-MB-231 hücrelerinde F-aktin mekanizmasını bozduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada araştırmacılar Laktoferrin ile MDA-MB-231 hücre hattını muamele etmişler ve bu bileşiğin hücredeki F-aktin ağının kaybolmasına yol açtığını ve bunun sonucunda da EMT'nin gerilediği ve hücre göçünün zayıfladığı gözlenmiştir. Tez çalışmasında kullanılan Abemaciclib ile elde edilen F-aktin kaybı, literatürdeki çalışmalar ile uyumlu olarak hücre bütünlüğünü ve yapısını bozarak hücre göçünü yavaşlatabileceği ve metastazı engelleyebileceği öngörüsünü güçlendirmektedir. Bu sonuçların deneysel olarak doğrulanması, ilacın anti-metastatik potansiyelini netleştirecektir. Bununla birlikte diğer CDK4/6 inhibitörleri olan Palbociclib ve Ribociclib'in MDA-MB-231 hücre hattında benzer hücre iskeleti hasarını etkileyen ya da MDA-MB-468, Hs578T, BT-549 gibi diğer triple negatif meme kanseri (TNBC) hücre hatlarında bu ilaçların iskelet yapısı üzerindeki etkilerini konu alan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dolayısıyla bu literatür eksikliği hem MDA-MB-231 hücre hattında hem de diğer TNBC hücre hatlarında CDK-4/6 inhibitörlerinin hücre iskeleti hasarı ve buna bağlı direnç mekanizmalarının incelenmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu görülmektedir. Bu alandaki eksiklikler göz önüne alındığında yalnızca Abemaciclib'in MDA-MB-231 hücre iskeleti üzerindeki olumsuz etkilerine ışık tutmakla kalmamakta, aynı zamanda CDK4/6 inhibitörlerinin genel olarak hücre morfolojisi ve iskelet dinamikleri üzerindeki rolüne ilişkin eksikliği de gözler önüne sermektedir.

Çalışmamızda, Abemaciclib'in MDA-MB-231 hücre hattında hücre döngüsü dağılımı üzerindeki etkileri akış sitometri yöntemi ile analiz edilmiştir. Elde edilen bulgular, Abemaciclib'in doza bağlı olarak hücre proliferasyonunu baskıladığını ve hücre döngüsünü farklı fazlarda durdurduğunu net bir şekilde ortaya koymaktadır. Abemaciclib gibi CDK4/6 inhibitörleri Rb proteininin fosforilasyonunu engelleyerek E2F transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini baskılayarak kanser hücrelerini genel olarak G0/G1 fazında durdurmaktadır. (Zhou ve ark., 2020). Bu bilgi ile uyumlu olarak, MDA-MB-231 hücrelerine uygulanan 10 µM derişimdeki Abemaciclib'in uygulanması sonrasında hücreler çok büyük oranda G0/G1 fazında tutulduğunu (%45,11), buna karşılık S fazına geçişin belirgin bir şekilde azaldığını ve G2/M fazında ise birikimin bir miktar arttığı (%21,39) tespit edilmiştir.

Literatürde, Sherr ve arkadaşlarının (2016) çalışması, Abemaciclib'in hücre döngüsünü öncelikli olarak G1 fazında bloke ederek DNA sentezini inhibe ettiğini raporlamıştır (Sherr vd, 2016). Bir başka çalışmada da elde ettiğimiz bulgular ile uyumlu olarak Abemaciclib'in MDA-MB-231 hücre hattını farklı konsantrasyonlarda G0/G1 fazında tutuklu kalmasına sebep olduğunu raporlamışlardır. Buna ek olarak yine çalışmamız ile uyumlu olarak yüksek konsantrasyonlarda G2/M fazında tutuklu kalan hücre oranını da bildirmişlerdir (Ozman, Guney Eskiler ve Sekeroglu, 2019). Benzer şekilde ekibimiz tarafından yapılan bir başka çalışmada ise Abemaciclib'in MCF-7 hücre hattındaki hücre döngüsü analizinde hücrelerin G1 fazında durduğu tespit edilmiştir (Tuncay, 2024). Ayrıca bir CDK4/6 inhibitörleri olan Palbociclib, Ribociclib ve Abemaciclib'in MDA-MB-231 hücrelerinin radyoterapi ile birlikte etkilerinin incelendiği bir çalışmada bu üç ilacın da benzer olarak hücre hattını G1 fazında tuttuğu rapor edilmiştir (Pesch ve ark., 2022). Ancak bu çalışmada kullanılan ilaç konsantrasyonları ve kombinasyon yaklaşımı, radyoterapi ve yüksek doz etkilerinden farklılık gösterebilir. Bu deneyin en dikkat çekici bulgusu ise yüksek ilaç derişiminde hücre döngüsü dağılımında gözlenen değişikliklerdir. 20 µM derişimdeki Abemaciclib uygulamasında hücrelerin G0/G1 fazında tutulu kalma oranı (%19,35) yüksek bir oranda azalırken G2/M fazında tutulu kalan hücrelerin miktarı (%44,05) ise artmıştır. Tez çalışmasında ve Ozman ve ark.'ları tarafından yapılan çalışmada elde edilen bu durum, Abemaciclib'in yüksek dozlarda sadece hücreleri CDK4/6 inhibisyonu ile değil, aynı zamanda hücreleri G2/M fazını da bloke eden ek mekanizmalar ile de etki edebileceğini düşündürmektedir. Goel ve arkadaşlarının (2017) yaptıkları bir çalışmada CDK4/6 inhibitörlerinin temel olarak hücreleri G1 fazında durdurarak etkilediğini yine de bu inhibitörlerin hücre biyolojisini farklı mekanizmalar üzerinden etkileyebileceğini de belirtmişlerdir (Goel ve ark., 2017). Ayrıca pozitif kontrol olarak değerlendirilen Doksorubisin'in de hücreleri G2/M fazında durdurduğu literatürde belirtilmektedir. Mehraj ve ark., 2022 yılında yaptıkları çalışmada Doksorubisin topoizomerz II enzimini inhibe ederek DNA'da çift sarmallı kırıklıklar oluşturmuştur (Mehraj ve ark., 2022). Buna ek olarak bu DNA hasarı p53 proteinin stabilizasyonu ve birikimi ile sonuçlandığını, p53'ün de p21 gibi CDK inhibitörlerinin ifadesini arttırarak hücre döngüsünü G2/M fazında durdurduğu bildirilmiştir (Kciuk ve ark., 2023). Ayrıca Doksorubisin içeriğinde yer alan kinon içerikli yapısıyla hücre içinde reaktif oksijen türleri (ROS) ürettiği literatürde gösterilmiştir (Mehraj ve ark., 2022). Doksorubisin siklin-CDK kompleksini de işlevsiz hale getirmektedir. Bir çalışmada Doksorubisin'in uygulandığı hücrelerde siklin B1 ifadesinin azaldığı (Newell, Brun ve Field, 2019) diğer

bir çalışmada ise Doksorubisin uygulaması sonrası MDA-MB-231 hücrelerinin p21 seviyelerini arttırarak siklin D1 proteinin azalmasına sebep olduğu (Maharjan ve ark., 2023) bildirilmiştir. Böylece CDK1-Siklin B1 kompleksi engellenerek MDA-MB-231 hücreleri hücre döngüsünün G2/M fazında tutuklu kalarak hücre çoğalması engellenmektedir. Bu bağlamda, yüksek doz Abemaciclib'in etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için DNA hasarı yanıtı ve apoptotik mekanizmalar gibi biyolojik süreçlerin daha ayrıntılı incelenmesi gerekebilir.

6. YORUM

Kanser, günümüzde küresel sağlık sorunlarının en başında gelmekte ve özellikle agresif alt tipleri, tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için yoğun araştırmaları zorunlu kılmaktadır. Kadınlarda sıkça rastlanan meme kanserinin en zorlu formlarından biri olan üçlü negatif meme kanseri (TNBC), heterojen yapısı, yüksek metastatik potansiyeli ve mevcut hedefe yönelik tedavilerin sınırlı etkinliği nedeniyle klinik açıdan önemli bir problem teşkil etmektedir. Geleneksel iki boyutlu (2B) hücre kültürü sistemleri, kanser araştırmalarında temel bir araç olmasına rağmen, tümör dokusunun karmaşık üç boyutlu (3B) yapısını, hücreler arası etkileşimleri, hücre dışı matriks (HDM) ile olan dinamik ilişkileri ve ilaçların tümör mikroçevresindeki gerçekçi yanıtlarını tam olarak yansıtamamaktadır. Bu eksiklik, *in vivo* koşullara daha yakın sonuçlar verebilen, ilaç etkinliğini ve direnç mekanizmalarını daha doğru bir şekilde değerlendirme imkânı sunan 3B hücre kültürü modellerine olan ilgiyi artırmıştır. Bu tez çalışması, TNBC'nin agresif özelliklerini yansıtan MDA-MB-231 hücre hattını kullanarak, 3D Petri Dish® yöntemiyle sferoid (mikro doku) modelleri oluşturmayı ve bu 3B platformda, umut vadeden bir terapötik ajan olan siklin bağımlı kinaz 4/6 (CDK4/6) inhibitörü Abemaciclib'in sitotoksik etkilerini, hücre iskeleti üzerindeki değişiklikleri ve hücre döngüsü regülasyonunu kapsamlı bir şekilde incelemeyi amaçlamıştır. Elde edilen bulguların, TNBC'nin 3B ortamdaki davranışlarına ve Abemaciclib'in potansiyel tedavi edici rolüne ışık tutması hedeflenmiştir. Yorumlar aşağıdaki gibi özetlenmiştir:

1. Agresif meme kanseri alt tipi hücre hattı MDA-MB-231'nin 3B Petri Dish® yöntemi ile 3B sferoid modelinin oluşturulabilmesi için hem 5×10^4 hücre/agar hem de 1×10^5 hücre/agar olacak şekilde iki farklı konsantrasyonda hücre grupları hazırlanmıştır. Daha büyük hücre konsantrasyonuna sahip grup sonraki deneylerde kullanılması için seçilmiştir. Böylece 3B Petri Dish® yöntemi ile ilk defa MDA-MB-231 hücreleri başarılı bir şekilde oluşturulmuştur. Bu model ile *in vivo* tümör mikroçevresini geleneksel yöntemlere göre daha gerçekçi bir şekilde taklit edebilmesi sağlanmıştır.
2. MDA-MB-231 hücre hattının hem 2B modeli hem de 3B modelinde siklin bağımlı kinaz 4/6 (CDK4/6) inhibitörü olan Abemaciclib'in sitotoksik etkileri incelenmiştir. 2B hücre modelinde hücre canlılığı doza ve zamana bağlı olarak azalırken 3B sferoid modelinde ise hücre canlılığı 24 saat sonunda hücre canlılıkları doza bağlı olarak artsa da

zaman geçtikçe sferoidler ilaca karşı direnç kazanmıştır. Ayrıca karşılaştırma yapıldığında 3B sferoidlerin, 2B hücre kültürlerine kıyasla Abemaciclib'e karşı daha yüksek bir direnç sergilediği bulunmuştur. Bu bulgu, 3B kültürlerin ilaç tarama çalışmalarında daha doğru ve klinik olarak anlamlı sonuçlar verebileceğine işaret etmektedir. Buna ek olarak ekibimiz tarafından MCF-7 hücre hattı 3B Petri Dish® yöntemi ile 3B sferoidleri hazırlanmış olup Abemaciclib'in etkileri de incelendiğinde bu hücre hattında düşük dozlarda sitotoksik etkisi fazla olup ilacın etkileri MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında karşılaştırılacaktır.

3. E-kaderin immünofloresan boyamalarında MDA-MB-231 hücre hattında herhangi bir immünofloresan görüntü alınamamıştır. Bu durum hücrelerinin bilinen mezenkimal fenotipiyle uyumlu olup E-kaderin ifadesinin bu hücre hattında eksikliği ve E-kaderinin hücre yüzeyindeki aktif olarak dinamik değişimler sebebiyle ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. Bu sonuç, kullanılan hücre hattının doğrulanması ve modelin karakterizasyonu açısından önemlidir.

4. Abemaciclib'in MDA-MB-231 hücre hattındaki etkileri F-aktin boyamayla incelenmiştir. İlacın dozu arttıkça 2B hücre hattı canlılık analizleri ile uyumlu olarak ilacın dozuna bağlı olarak F-aktin'in hücre içinde kaybolduğu ve buna bağlı olarak hücre iskeletinde yapısal değişiklikler ve bozulmalara neden olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, Abemaciclib'in hücre morfolojisi ve bütünlüğü üzerinde de etkili olduğunu göstermektedir.

5. Tez önerisinde yer alan Cell Tracker boyama uygulaması, MDA-MB-231 hücre hattının hem 2B hem de 3B sferoid modellerinde tek tip ve homojen bir yapı sergilemesi ve sferoid morfolojisinin standart inverted mikroskopi ile izlenebilmesi göz önüne alınarak yeniden değerlendirilmiştir. Hücrelerin Abemaciclib ile etkileşimleri sonucu ortaya çıkan morfolojik ve yapısal değişiklikler, daha spesifik ve hedefe yönelik bilgiler sunan F-aktin immünofloresan boyamaları ve hücre döngüsü üzerindeki etkileri detaylandıran akış sitometrisi analizleri ile kapsamlı bir şekilde incelenmiştir.

6. Abemaciclib'in MDA-MB-231 hücre hattının hücre döngüsü fazlarındaki dağılımı akış sitometrisi ile analiz edilmiş ve ilacın, literatüre uyumlu olarak hücreleri G0/G1 fanda tuttuğunu göstermiştir. Ayrıca daha yüksek konsantrasyonda G2/M fazında tutan hücre sayısının arttığı tespit edilmiştir. Bu durum, Abemaciclib'in hücre proliferasyonunu

birden fazla kontrol noktasında baskılayabildiğini ve literatürde bilinene ek mekanizmalar ile hücre proliferasyonunu durdurduğunu göstermektedir.

7. Bu çalışma, Abemaciclib'in TNBC hücreleri üzerindeki etkilerini, özellikle hücre iskeleti ve hücre döngüsü dinamikleri açısından, daha fizyolojik olarak kabul edilen 3B sferoid modelinde değerlendirerek literatüre önemli bir katkı sunmaktadır.

8. Elde edilen veriler, Abemaciclib'in TNBC tedavisinde potansiyel bir terapötik ajan olarak değerlendirilebileceğini ve 3B kültür modellerinin bu tür agresif kanserlerin ilaç yanıtlarını incelemek için değerli platformlar olduğunu bir kez daha vurgulamaktadır.

9. Gelecekteki çalışmaların, Abemaciclib'in 2B modellerde yol açtığı G2/M fazı duraksamasının altında yatan moleküler mekanizmaları (potansiyel off-target etkiler, DNA hasarı yanıtı gibi) daha detaylı araştırması ve bu bulguların olası terapötik kombinasyon stratejilerine etkisini değerlendirmesi faydalı olacaktır.

Bu tez çalışması, 3B hücre kültürü modellerinin, özellikle meme kanseri türlerinden olan üçlü negatif meme kanserine (TNBC) yönelik araştırmalarda ilaç yanıtlarını değerlendirme açısından kritik bir model sunduğunu ortaya koymuştur. Literatürde ilk kez, 3D Petri Dish® yöntemi kullanılarak oluşturulan MDA-MB-231 hücre sferoidleri üzerinden CDK4/6 inhibitörü Abemaciclib'in etkileri kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Tez çalışması kapsamında 3B kültür modellerinin, kanser hücreleri üzerindeki biyolojik tepkilerini ve ilaç direnç mekanizmalarını daha doğru yansıttığını göstermektedir. Ayrıca, literatürde ilk kez 3B MDA-MB-231 hücre hatlarında CDK4/6 inhibisyonunun etkileri detaylı bir şekilde analiz edilmiş olup hücre döngüsü düzenlenmesi bakımından Abemaciclib'in G0/G1 ve G2/M fazlarında tutulmaya yol açarak hücre proliferasyonunu baskıladığı belirlenmiştir. F-aktin immünofloresan boyamaları, hücre iskeletinde yapısal değişiklikleri doğrularken, E-kaderin boyamasında TNBC hücrelerinde belirgin bir ekspresyon gözlenmemesi, hücreler arası bağlantıların zayıflığı ve bu hücrelerin yüksek invaziv özelliklerini desteklemektedir. Elde edilen bulgular, CDK4/6 inhibitörlerinin TNBC gibi agresif ve hedeflenmesi zor olan tümörlerde farklı mikro çevrelerde nasıl etki ettiğini anlamak için önemli bir referans oluşturmuştur. Literatüre katkısı açısından, ilk kez 3B MDA-MB-231 sferoidlerinde CDK4/6 inhibisyonuna bağlı biyolojik değişimler detaylı olarak analiz edilmiş, 3D Petri Dish® platformunun TNBC çalışmalarında ilaç tarama ve hücresel mekanizma araştırmaları için güçlü bir model sunduğu gösterilmiştir. Tez çalışmasının bulgularına göre TNBC tedavisinde Abemaciclib'in tek başına yeterli

olmayabileceğini ve diğer kemoterapötik ajanlarla kombinasyon halinde değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Gelecekte, hasta kaynaklı 3B kültür modellerinin geliştirilmesi, farklı ilaç kombinasyonlarının etkinliğinin araştırılması ve CDK4/6 inhibisyonuna bağlı hücre iskeleti ve hücre-matris etkileşimlerinin daha detaylı incelenmesi önerilmektedir. Sonuç olarak, bu çalışma, TNBC araştırmalarında 3B kültürlerin ilaç etkinliğini anlamada kritik bir araç olduğunu kanıtlamış ve CDK4/6 inhibitörlerinin 3B mikroçevrede nasıl etki ettiğini literatürde ilk kez göstermiştir.

KAYNAKÇA

- Akay, M. T. (2012). *Sitoloji* (6. baskı). Ankara.
- Anwer, M. K., Fatima, F., Ahmed, M. M., Aldawsari, M. F., Alali, A. S., Kalam, M. A., Alshamsan, A., Alkholief, M., Malik, A., Az, A., & Al-Shdefat, R. (2022). Abemaciclib-loaded ethylcellulose based nanospheres for sustained cytotoxicity against MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells lines. *Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society*, 30(6), 726–734.
- Arslan, G., Önkol, T. & Özçelik, A. B. (2022). SIKLİN BAĞIMLI KİNAZ 4/6 VE İNHİBİTÖRLERİ. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 46(1), 193-208.
- Badea, M. A., Balas, M., & Dinischiotu, A. (2022). Biological properties and development of hypoxia in a breast cancer 3D model generated by hanging drop technique. *Cell biochemistry and biophysics*, 80(1), 63–73.
- Badea, M. A., Balas, M., Hermenean, A., Ciceu, A., Herman, H., Ionita, D., & Dinischiotu, A. (2019). Influence of Matrigel on Single- and Multiple-Spheroid Cultures in Breast Cancer Research. *SLAS discovery : advancing life sciences R & D*, 24(5), 563–578.
- Basse, C., & Arock, M. (2015). The increasing roles of epigenetics in breast cancer: Implications for pathogenicity, biomarkers, prevention and treatment. *International journal of cancer*, 137(12), 2785–2794.
- Basu, A., Dydowiczová, A., Trosko, J. E., Bláha, L., & Babica, P. (2020). Ready to go 3D? A semi-automated protocol for microwell spheroid arrays to increase scalability and throughput of 3D cell culture testing. *Toxicology mechanisms and methods*, 30(8), 590–604.
- Beaver, J. A., Amiri-Kordestani, L., Charlab, R., Chen, W., Palmby, T., Tilley, A., Zirkelbach, J. F., Yu, J., Liu, Q., Zhao, L., Crich, J., Chen, X. H., Hughes, M., Bloomquist, E., Tang, S., Sridhara, R., Kluetz, P. G., Kim, G., Ibrahim, A., Pazdur, R., ... Cortazar, P. (2015). FDA Approval: Palbociclib for the Treatment of Postmenopausal Patients with Estrogen Receptor-Positive, HER2-Negative Metastatic Breast Cancer. *Clinical cancer*

research: an official journal of the American Association for Cancer Research, 21(21), 4760–4766.

Ben-David, U., & Amon, A. (2020). Context is everything: aneuploidy in cancer. *Nature reviews. Genetics*, 21(1), 44–62.

Benson, J.R., et al. (2009). Early breast cancer. *Lancet*, 373(9673), 1463-79.

Białkowska, K., Komorowski, P., Bryszewska, M., & Miłowska, K. (2020). Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures-Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application. *International journal of molecular sciences*, 21(17), 6225.

Bizjak, M., Malavašič, P., Pirkmajer, S., & Pavlin, M. (2019). Comparison of the effects of metformin on MDA-MB-231 breast cancer cells in a monolayer culture and in tumor spheroids as a function of nutrient concentrations. *Biochemical and biophysical research communications*, 515(2), 296–302.

Blowman, K., Magalhães, M., Lemos, M. F. L., Cabral, C., & Pires, I. M. (2018). Anticancer Properties of Essential Oils and Other Natural Products. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2018, 3149362.

Bonnier, F., Keating, M. E., Wróbel, T. P., Majzner, K., Baranska, M., Garcia-Munoz, A., Blanco, A., & Byrne, H. J. (2015). Cell viability assessment using the Alamar blue assay: a comparison of 2D and 3D cell culture models. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 29(1), 124–131.

C.P. Wild, E. Weiderpass and B.W. Stewart, World Cancer Report; Cancer Research For Cancer Prevention, Lyon, 2020.

Cailleau, R., Mackay, B., Young, R. K., & Reeves, W. J., Jr (1974). Tissue culture studies on pleural effusions from breast carcinoma patients. *Cancer research*, 34(4), 801–809.

Cailleau, R., Olive, M., & Cruciger, Q. V. J. (1974). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro*, 10(6), 400–404.
<https://doi.org/10.1007/BF02616120>

Capes-Dabis A., & Freshney, R. I. (2021). *Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications* (8th ed.). John Wiley & Sons Inc.

Carey, L.A., Perou, C.M., Livasy, C.A., Dressler, L.G., Cowan, D., Conway, K., Karaca, G., Troester, M.A., Tse, C.K., Edmiston, S., Deming, S.L., Geradts, J., Cheang, M.C., Nielsen, T.O., Moorman, P.G., Earp, H.S., Millikan, R.C. (2006). Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina breast cancer study. *JAMA*, 295(21), 2492-2502.

Carney, E., Ghasem Zadeh Moslabeh, F., Kang, S.-Y., Bunnell, B. A., Lee, M.-Y., & Habibi, N. (2024). Self-assembling peptides induced by eyes absent enzyme to boost the efficacy of doxorubicin therapy in drug-resistant breast cancer cells. *Heliyon*, 10, e33629.

Cheang, M.C., et al. (2009). Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 101(10), 736-50.

Chen, G.P., Liu, W. and Yan, B.F. (2022). Breast Cancer MCF-7 Cell Spheroid Culture for Drug Discovery and Development. *Journal of Cancer Therapy*, 13, 117-130.

Chong, Q. Y., Kok, Z. H., Bui, N. L., Xiang, X., Wong, A. L., Yong, W. P., Sethi, G., Lobie, P. E., Wang, L., & Goh, B. C. (2020). A unique CDK4/6 inhibitor: Current and future therapeutic strategies of abemaciclib. *Pharmacological research*, 156, 104686.

Chu, K., Boley, K. M., Moraes, R., Barsky, S. H., & Robertson, F. M. (2013). The paradox of E-cadherin: role in response to hypoxia in the tumor microenvironment and regulation of energy metabolism. *Oncotarget*, 4(3), 446–462.

Corona, S. P., & Generali, D. (2018). Abemaciclib: a CDK4/6 inhibitor for the treatment of HR+/HER2- advanced breast cancer. *Drug design, development and therapy*, 12, 321–330.

Davies, E.L. (2016). Breast Cancer. *Medicine*, 44(1), 42-46.

Denizgil, T. & İpeksönmez, İ. (2015). Meme Kanseri Nedeni ile Meme Koruyucu Cerrahi Geçirmiş Kadınlarla Mastektomi Operasyonu Geçirmiş Kadınlar Arasında Benlik Saygısı, Beden Algısı, Cinsel Doyum ve Cinsel Yaşantıların Karşılaştırılması. *Yeni Symposium*, 53(3), 17-25.

Doello, K. (2021). STAT3 pathway in palbociclib resistance in breast cancer cell lines and the role of inhibitors such as tocilizumab and silymarin. *AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, 7-10 October 2021, Virtual*, p. 74.

Dominguez, R., & Holmes, K. C. (2011). Actin structure and function. *Annual Review of Biophysics*, 40, 169.

Dubois, C., Dufour, R., Daumar, P., Aubel, C., Szczepaniak, C., Blavignac, C., Mounetou, E., Penault-Llorca, F., & Bamdad, M. (2017). Development and cytotoxic response of two proliferative MDA-MB-231 and non-proliferative SUM1315 three-dimensional cell culture models of triple-negative basal-like breast cancer cell lines. *Oncotarget*, 8(56), 95316–95331.

Ekert, J., Johnson, K., Strake, B., Pardinias, J., Jarantow, S., Perkinson, R., & Colter, D.C. (2014). Three-dimensional lung tumor microenvironment modulates therapeutic compound responsiveness in vitro implication for drug development. *PLoS One*, 9.

Elnozahi, N. A., Abdelaziz, E. A., Helmy, M. W., & Bistawroos, A. E. (2023). Modulatory effect of sodium butyrate on the anticancer activity of abemaciclib in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology Research*, 7(1), 62–73.

Fang, Y., & Eglen, R. M. (2017). Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. *SLAS discovery : advancing life sciences R & D*, 22(5), 456–472.

Feng, Y., Spezia, M., Huang, S., Yuan, C., Zeng, Z., Zhang, L., Ji, X., Liu, W., Huang, B., Luo, W., Liu, B., Lei, Y., Du, S., Vuppalapati, A., Luu, H. H., Haydon, R. C., He, T. C., & Ren, G. (2018). Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & diseases*, 5(2), 77–106.

Ferlay, J., et al. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*, 136(5), E359-86.

Fleisher, B., Lezeau, J., Werkman, C., Jacobs, B., & Ait-Oudhia, S. (2021). In vitro to Clinical Translation of Combinatorial Effects of Doxorubicin and Abemaciclib in Rb-Positive Triple Negative Breast Cancer: A Systems-Based Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling Approach. *Breast cancer (Dove Medical Press)*, 13, 87–105.

Friedrich, J., Seidel, C., Ebner, R., & Kunz-Schughart, L. A. (2009). Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nature Protocols*, 4(3), 309–324.

Gautam, N., Mantha, A. K., & Mittal, S. (2014). Essential oils and their constituents as anticancer agents: a mechanistic view. *BioMed research international*, 2014, 154106.

George, M. A., Qureshi, S., Omene, C., Toppmeyer, D. L., & Ganesan, S. (2021). Clinical and Pharmacologic Differences of CDK4/6 Inhibitors in Breast Cancer. *Frontiers in oncology*, 11, 693104.

Goel, S., DeCristo, M. J., McAllister, S. S., & Zhao, J. J. (2017). CDK4/6 inhibition in cancer: beyond cell cycle arrest. *Trends in Cell Biology*, 27(11), 902-917.

Gomes, G. B., Zubieta, C. S., Weber, S. S., Lima, D. P., Reddy, T. N., Guerrero, A. T. G., Matos, M. F. C., Parisotto, E. B., & Perdomo, R. T. (2021). Thiopyrimidine derivatives induce cytotoxicity, cell cycle arrest and oxidative stress in breast cancer 3D-spheroids. *Chemical Papers*, 75(4), 1211–1220.

Greaney ML, Sprunck-Harrild K, Ruddy KJ et al (2015). Study protocol for Young & Strong: a cluster randomized design to increase attention to unique issues faced by young women with newly diagnosed breast cancer. *BMC Public Health* 31(15):37

Guiu, S., Michiels, S., André, F., Cortes, J., Denkert, C., Di Leo, A., Hennessy, B. T., Sorlie, T., Sotiriou, C., Turner, N., Van de Vijver, M., Viale, G., Loi, S., & Reis-Filho, J. S. (2012). Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 23(12), 2997–3006.

Gumbiner, B. M. (2005). Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(8), 622–634.

Guney Eskiler, G., Deveci Ozkan, A., Haciefendi, A., & Bilir, C. (2022). Mechanisms of abemaciclib, a CDK4/6 inhibitor, induced apoptotic cell death in prostate cancer cells in vitro. *Translational oncology*, 15(1), 101243.

Guo, X., Chen, Y., Ji, W., Chen, X., Li, C., & Ge, R. (2019). Enrichment of cancer stem cells by agarose multi-well dishes and 3D spheroid culture. *Cell and tissue research*, 375(2), 397–408.

Habanjar, O., Diab-Assaf, M., Caldefie-Chezet, F., & Delort, L. (2021). 3D Cell Culture Systems: Tumor Application, Advantages, and Disadvantages. *International journal of molecular sciences*, 22(22), 12200.

- Han, K., Pierce, S. E., Li, A., Spees, K., Anderson, G. R., Seoane, J. A., Lo, Y. H., Dubreuil, M., Olivás, M., Kamber, R. A., Wainberg, M., Kostyrko, K., Kelly, M. R., Yousefi, M., Simpkins, S. W., Yao, D., Lee, K., Kuo, C. J., Jackson, P. K., Sweet-Cordero, A., ... Bassik, M. C. (2020). CRISPR screens in cancer spheroids identify 3D growth-specific vulnerabilities. *Nature*, *580*(7801), 136–141.
- Hanahan D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer discovery*, *12*(1), 31–46.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, *100*(1), 57–70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674.
- Harris, T. J., & Tepass, U. (2010). Adherens junctions: From molecules to morphogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *11*(7), 502-514.
- He, J., Liu, S., Zhang, S., Gao, Q., Zhu, L., Xu, N., Hu, Z., Zhang, X., Ma, S., Wang, X., Liu, B., & Liu, W. (2025). Targeted degradation of CDK4/6 by LA-CB1 inhibits EMT and suppresses tumor growth in orthotopic breast cancer. *Scientific reports*, *15*(1), 7605.
- Herzenberg, L. A., Parks, D., Sahaf, B., Perez, O., Roederer, M., & Herzenberg, L. A. (2002). The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clinical chemistry*, *48*(10), 1819–1827.
- Huzarski, T., Byrski, T., Gronwald, J., Górski, B., Domagala, P., Cybulski, C., Oszurek, O., Szwiec, M., Gugala, K., Stawicka, M., Morawiec, Z., Mierzwa, T., Janiszewska, H., Kilar, E., Marczyk, E., Kozak-Klonowska, B., Siolek, M., Surdyka, D., Wisniowski, R., Posmyk, M., ... Narod, S. A. (2013). Ten-year survival in patients with BRCA1-negative and BRCA1-positive breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, *31*(26), 3191–3196.
- Iglesias-Figueroa, B. F., Siqueiros-Cendón, T. S., Gutierrez, D. A., Aguilera, R. J., Espinoza-Sánchez, E. A., Arévalo-Gallegos, S., Varela-Ramirez, A., & Rascón-Cruz, Q. (2019). Recombinant human lactoferrin induces apoptosis, disruption of F-actin structure and cell cycle arrest with selective cytotoxicity on human triple negative breast cancer cells. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, *24*(7-8), 562–577.

- Imamura, Y., et al. (2015). Heterogeneity of 3D cancer models and their contribution to drug screening. *Cancer Science*, 106(12), 1918-1927.
- Inao, T., Kotani, H., Iida, Y., Kartika, I. D., Okimoto, T., Tanino, R., Shiba, E., & Harada, M. (2019). Different sensitivities of senescent breast cancer cells to immune cell-mediated cytotoxicity. *Cancer science*, 110(9), 2690–2699.
- Ishiguro, T., Ohata, H., Sato, A., Yamawaki, K., Enomoto, T., & Okamoto, K. (2017). Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications. *Cancer science*, 108(3), 283–289.
- Jensen, C., & Teng, Y. (2020). Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture?. *Frontiers in molecular biosciences*, 7, 33.
- Jung, H., Wang, S. Y., Yang, I. W., Hsueh, D. W., Yang, W. J., Wang, T. H., & Wang, H. S. (2003). Detection and treatment of mycoplasma contamination in cultured cells. *Chang Gung medical journal*, 26(4), 250–258.
- Kapałczyńska, M., Kolenda, T., Przybyła, W., Zajączkowska, M., Teresiak, A., Filas, V., Ibbs, M., Bliźniak, R., Łuczewski, Ł., & Lamperska, K. (2018). 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of medical science : AMS*, 14(4), 910–919.
- Kciuk, M., Gielecińska, A., Mujwar, S., Kołat, D., Kałuzińska-Kołat, Ż., Celik, I., & Kontek, R. (2023). Doxorubicin-An Agent with Multiple Mechanisms of Anticancer Activity. *Cells*, 12(4), 659.
- Keegan, T. H., DeRouen, M. C., Press, D. J., Kurian, A. W., & Clarke, C. A. (2012). Occurrence of breast cancer subtypes in adolescent and young adult women. *Breast cancer research : BCR*, 14(2), R55.
- Kim, E., Jeon, W. B., Kim, S., & Lee, S. K. (2014). Decrease of reactive oxygen species-related biomarkers in the tissue-mimic 3D spheroid culture of human lung cells exposed to zinc oxide nanoparticles. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 14(5), 3356–3365.
- Kowalczyk, A. P., & Nanes, B. A. (2012). Adherens junction turnover: regulating adhesion through cadherin endocytosis, degradation, and recycling. *Sub-cellular biochemistry*, 60, 197–222.

- Kuong, K. J., & Loeb, L. A. (2013). APOBEC3B mutagenesis in cancer. *Nature genetics*, 45(9), 964–965.
- Kwapisz D. (2017). Cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitors in breast cancer: palbociclib, ribociclib, and abemaciclib. *Breast cancer research and treatment*, 166(1), 41–54.
- Le, T. L., Yap, A. S., & Stow, J. L. (1999). Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics. *The Journal of cell biology*, 146(1), 219–232.
- Lehmann, B. D., Bauer, J. A., Chen, X., Sanders, M. E., Chakravarthy, A. B., Shyr, Y., & Pietenpol, J. A. (2011). Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of clinical investigation*, 121(7), 2750–2767.
- Loh, C.-Y., Chai, J. Y., Tang, T. F., Wong, W. F., Sethi, G., Shanmugam, M. K., Chong, P. P., & Looi, C. Y. (2019). The E-cadherin and N-cadherin switch in epithelial-to-mesenchymal transition: Signaling, therapeutic implications, and challenges. *Cells*, 8(10), 1118.
- Maadi, H., Soheilifar, M. H., & Wang, Z. (2022). Analysis of Cell Cycle by Flow Cytometry. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2579, 183–195.
- Maharjan, S., Lee, M. G., Kim, S. Y., Lee, K. S., & Nam, K. S. (2023). Morin Sensitizes MDA-MB-231 Triple-Negative Breast Cancer Cells to Doxorubicin Cytotoxicity by Suppressing FOXM1 and Attenuating EGFR/STAT3 Signaling Pathways. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 16(5).
- Malich, G., Markovic, B., & Winder, C. (1997). The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. *Toxicology*, 124(3), 179–192.
- McGuire, A., Lowery, A. J., Kell, M. R., Kerin, M. J., & Sweeney, K. J. (2017). Locoregional Recurrence Following Breast Cancer Surgery in the Trastuzumab Era: A Systematic Review by Subtype. *Annals of surgical oncology*, 24(11), 3124–3132.
- McKinnon K. M. (2018). Flow Cytometry: An Overview. *Current protocols in immunology*, 120, 5.1.1–5.1.11.

- Mehraj, U., Mir, I. A., Hussain, M. U., Alkhanani, M., Wani, N. A., & Mir, M. A. (2022). Adapalene and Doxorubicin Synergistically Promote Apoptosis of TNBC Cells by Hyperactivation of the ERK1/2 Pathway Through ROS Induction. *Frontiers in oncology*, *12*, 938052.
- Merino Bonilla, J. A., Torres Tabanera, M., & Ros Mendoza, L. H. (2017). Breast cancer in the 21st century: from early detection to new therapies. El cáncer de mama en el siglo XXI: de la detección precoz a los nuevos tratamientos. *Radiologia*, *59*(5), 368–379.
- Minchinton, A. I., & Tannock, I. F. (2006). Drug penetration in solid tumours. *Nature Reviews Cancer*, *6*(8), 583-592
- Napolitano, A. P., Chai, P., Dean, D. M., & Morgan, J. R. (2007). Dynamics of the self-assembly of complex cellular aggregates on micromolded nonadhesive hydrogels. *Tissue engineering*, *13*(8), 2087–2094.
- Nehme, J., Maassen, S., Bravaccini, S., Zanoni, M., Gianni, C., De Giorgi, U., Soto-Gamez, A., Altulea, A., Gheorghe, T., Wang, B., & Demaria, M. (2025). Pharmacological CDK4/6 inhibition promotes vulnerability to lysosomotropic agents in breast cancer. *The EMBO journal*, *44*(7), 1921–1942.
- Newell, M., Brun, M., & Field, C. J. (2019). Treatment with DHA Modifies the Response of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells and Tumors from nu/nu Mice to Doxorubicin through Apoptosis and Cell Cycle Arrest. *The Journal of nutrition*, *149*(1), 46–56.
- News-Medical. (t.y.). What are cadherins? *News-Medical.net*. Erişim 25 Mart 2025, <https://www.news-medical.net/health/What-are-Cadherins.aspx>
- Nikfarjam, L., & Farzaneh, P. (2012). Prevention and detection of Mycoplasma contamination in cell culture. *Cell journal*, *13*(4), 203–212.
- O'Brien, N., Conklin, D., Beckmann, R., Luo, T., Chau, K., Thomas, J., Mc Nulty, A., Marchal, C., Kalous, O., von Euw, E., Hurvitz, S., Mockbee, C., & Slamon, D. J. (2018). Preclinical Activity of Abemaciclib Alone or in Combination with Antimitotic and Targeted Therapies in Breast Cancer. *Molecular cancer therapeutics*, *17*(5), 897–907.
- Olive, P. L., & Durand, R. E. (1994). Drug and radiation resistance in spheroids: Cell contact and kinetics. *Cancer Metastasis Reviews*, *13*(2), 121-138.

- Ozman, Z., Guney Eskiler, G., & Sekeroglu, M. R. (2021). In vitro therapeutic effects of abemaciclib on triple-negative breast cancer cells. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 35(9), e22858.
- Parl, F. F. (2014). *The Etiology of Breast Cancer: Endogenous and Exogenous Causes*: Fritz F. Parl; 1st edition (March 20, 2014).
- Perfetto, S. P., Chattopadhyay, P. K., & Roederer, M. (2004). Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nature reviews. Immunology*, 4(8), 648–655.
- Pesch, A. M., Hirsh, N. H., Michmerhuizen, A. R., Jungles, K. M., Wilder-Romans, K., Chandler, B. C., Liu, M., Lerner, L. M., Nino, C. A., Ward, C., Cobain, E. F., Lawrence, T. S., Pierce, L. J., Rae, J. M., & Speers, C. W. (2022). RB expression confers sensitivity to CDK4/6 inhibitor-mediated radiosensitization across breast cancer subtypes. *JCI insight*, 7(3), e154402.
- Pollard, T. D., & Cooper, J. A. (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. *Science*, 326(5957), 1208–1212.
- Polyak K. (2007). Breast cancer: origins and evolution. *The Journal of clinical investigation*, 117(11), 3155–3163.
- Prat, A., Pineda, E., Adamo, B., Galván, P., Fernández, A., Gaba, L., Díez, M., Viladot, M., Arance, A., & Muñoz, M. (2015). Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, 24 Suppl 2, S26–S35.
- Praveenkumar, E., Gurrupu, N., Kolluri, P. K., Shivaraj, Subhashini, N., & Dokala, A. (2021). Selective CDK4/6 inhibition of novel 1,2,3-triazole tethered acridinedione derivatives induces G1/S cell cycle transition arrest via Rb phosphorylation blockade in breast cancer models. *Bioorganic chemistry*, 116, 105377.
- Rahman, M. (2006). *Introduction to flow cytometry: Principles, data analysis, protocols, troubleshooting*. Serotec Ltd.
- Reynolds, D. S., Tevis, K. M., Blessing, W. A., Colson, Y. L., Zaman, M. H., & Grinstaff, M. W. (2017). Breast Cancer Spheroids Reveal a Differential Cancer Stem Cell Response to Chemotherapeutic Treatment. *Scientific reports*, 7(1), 10382.
- Riccardi, C., & Nicoletti, I. (2006). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature protocols*, 1(3), 1458–1461.

Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2013). Cell Viability Assays. In S. Markossian (Eds.) et. al., *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.

Rolver, M. G., Elingaard-Larsen, L. O., & Pedersen, S. F. (2019). Assessing Cell Viability and Death in 3D Spheroid Cultures of Cancer Cells. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (148), 10.3791/59714.

Sant, S., & Johnston, P. A. (2017). The production of 3D tumor spheroids for cancer drug discovery. *Drug discovery today. Technologies*, 23, 27–36.

Sant, S., & Johnston, P. A. (2017). The production of 3D tumor spheroids for cancer drug discovery. *Drug Discovery Today: Technologies*, 23, 27-36.

Shapiro, H. M. (2003). *Practical Flow Cytometry* (4th ed.). Wiley-Liss.

Sharaky, M., El Kiki, S. M., Effat, H., & Mansour, H. H. (2025). Effect of palliative radiotherapy and cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor on breast cancer cell lines. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 10.1007/s00210-025-03878-6. Advance online publication.

Sharma, A., Mishra, T., Thacker, G., Mishra, M., Narender, T., & Trivedi, A. K. (2020). Chebulinic acid inhibits MDA-MB-231 breast cancer metastasis and promotes cell death through down regulation of SOD1 and induction of autophagy. *Cell biology international*, 44(12), 2553–2569.

Sherr, C. J., Beach, D., & Shapiro, G. I. (2016). Targeting CDK4 and CDK6: From Discovery to Therapy. *Cancer Discovery*, 6(4), 353-367.

Singhai, R., Patil, V. W., Jaiswal, S. R., Patil, S. D., Tayade, M. B., & Patil, A. V. (2011). E-Cadherin as a diagnostic biomarker in breast cancer. *North American journal of medical sciences*, 3(5), 227–233.

Sørli, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J. C., Brown, P. O., Botstein, D., Lønning, P. E., & Børresen-Dale, A. L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of*

the National Academy of Sciences of the United States of America, 98(19), 10869–10874.

Takeichi, M. (1991). Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*, 251(5000), 1451–1455.

Tarnowski, B. I., Sens, D. A., Nicholson, J. H., Hazen-Martin, D. J., Garvin, A. J., & Sens, M. A. (1993). Automatic quantitation of cell growth and determination of mitotic index using DAPI nuclear staining. *Pediatric pathology*, 13(2), 249–265.

Thermo Fisher Scientific. (t.y.). Electronics of a flow cytometer. Erişim 3 Nisan 2025, <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/flow-cytometry-basics/flow-cytometry-fundamentals/electronics-flow-cytometer.html>

Tu, J., Luo, X., Liu, H., Zhang, J., & He, M. (2021). Cancer spheroids derived exosomes reveal more molecular features relevant to progressed cancer. *Biochemistry and biophysics reports*, 26, 101026.

Tuncay, C. (2024). *Abemaciclib'in 3B Petri Dish yöntemi ile üretilen MCF-7 meme kanseri sferoidlerinin üzerine etkisi* [2209-A Sonuç Raporu]. TÜBİTAK.

Velez, B. C., Petrella, C. P., DiSalvo, K. H., Cheng, K., Kravtsov, R., Krasniqi, D., & Krucher, N. A. (2023). Combined inhibition of ACLY and CDK4/6 reduces cancer cell growth and invasion. *Oncology reports*, 49(2).

Velliou, E. G., Chapman, A., et al. (2020). Bioprocessing of 3D human tumour models in stirred-tank micro-bioreactors for cancer drug testing. *Journal of Biotechnology*, 317, 29–38.

Velliou, E., Priyanka, G., Ricci, C., & Danti, S. (2020). Biomaterial-based in vitro models for pancreatic cancer. *Materials Today*, 11, 235–249.

Vinci, M., Gowan, S., Box, C., Patterson, L., Zimmermann, M., Court, W., ... & Eccles, S. A. (2012). Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC Biology*, 10, 29.

Wang, C., Tang, Z., Zhao, Y., Yao, R., Li, L., & Sun, W. (2014). Three-dimensional in vitro cancer models: a short review. *Biofabrication*, 6(2), 022001.

Wang, H., Xu, T., & Yin, D. (2022). Emerging trends in the methodology of environmental toxicology: 3D cell culture and its applications. *The Science of the total environment*, 857(Pt 2), 159501.

Wekking, D., Porcu, M., De Silva, P., Saba, L., Scartozzi, M., & Solinas, C. (2023). Breast MRI: Clinical Indications, Recommendations, and Future Applications in Breast Cancer Diagnosis. *Current oncology reports*, 25(4), 257–267.

Wild, C. P., Weiderpass, E., & Stewart, B. W. (Eds.). (2020). *World Cancer Report: Cancer research for cancer prevention*. International Agency for Research on Cancer.

Wu, L., Wang, X., Liu, Q., Wingnang Leung, A., Wang, P., & Xu, C. (2016). Sinoporphyrin sodium mediated photodynamic therapy inhibits the migration associated with collapse of F-actin filaments cytoskeleton in MDA-MB-231 cells. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 13, 58–65.

Zhou, Y., Li, Y., Shen, J., Li, J., & Li, X. (2020). Abemaciclib induces apoptosis in cardiomyocytes by activating the Hippo signaling pathway. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 52(8), 875–882.