

TÜMÖR HÜCRELERİNİN MULTİSELÜLER TÜMÖR SFEROİD MODELİNDE ÜRETİLMESİ

Bülent AHİSHALI, Ayhan BİLİR*

ÖZET

Organizasyon bakımından tek tabakalı hücre kültürü ile in vivo tümör arasında yer alan multi-selüler tümör sferoid modeli in vivo tümör korelasyonu yüksek bir sistem olarak kanser araştırmalarında kullanılmaya başlanmıştır. Biz laboratuvarımızda bulunan MCF7, CC531s ve C6 tümör hücrelerinden sıvı üsttabaka yöntemine göre sferoidler oluşturduk. MCF7 ve CC531s hücreleri genel sferoid oluşturma süreçleri açısından benzer özellikler göstermesine karşın CC531s sferoidleri psödoglandüler yapılarıyla ışık mikroskopunda farklı bir görünüm sergilediler. C6 sferoidleri sürekli bir büyüme sürecinde birbirleriyle birleşerek büyük düzensiz kümelenebilirler gösterdi. MCF7 ve CC531s sferoidlerinin merkezi bölümlerinde apoptotik hücre profilleri saptanırken C6 sferoidlerinde nekrotik bölüm görülmedi. FM3A hücreleri sıvı üsttabaka yönteminde sferoid oluşturmazlar. Bu özellikleriyle MCF7, CC531s ve C6 tümör hücrelerinin antineoplastik ilaç ve radyasyon uygulamaları için in vitro değerlendirmelerde kullanılmaya uygun sferoidler oluşturduğu saptandı.

Anahtar kelimeler: Multiselüler sferoidler, tümör, hücre kültürü.

SUMMARY

Production of multicellular tumor spheroids from tumor cell lines. The multicellular tumor spheroid model which is of intermediate complexity between in vivo tumors and monolayer cultures represents a system having a high correlation with tumors in vivo in cancer research. In this study we cultured spheroids using the MCF7, CC531s and C6 tumor cell lines according to the liquid overlay technique. Although the general characteristics of spheroid formation were similar in CC531s and MCF7 cell lines, CC531s spheroids showed a distinct pseudoglandular structure under the light microscope. C6 spheroids displayed a continuous growth with large irregular aggregates of spheroid assembly. While profiles of apoptotic cells were detected in the inner regions of MCF7 and CC531s spheroids, C6 spheroids had no necrotic centers. FM3A cells did not form spheroids. In conclusion, MCF7, CC531s and C6 tumor cells formed typical multicellular tumor spheroids which are suitable for use as a realistic model to study tumor response to antineoplastic agents and radiation.

Key words: Multicellular spheroids, tumors, cell culture.

GİRİŞ

Tümör hücreleri ile yapılan in vitro deneylerde birçok laboratuvarında tek tabakalı (monolayer) tümör hücre kültürleri kullanılmaktadır. Bu in vitro hücre modeliyle kanserin temel oluşum mekanizmaları ve tedavisi üzerinde oldukça değerli bilgiler edinilmiştir (13,14). Ancak, tek tabakalı kültür ortamında oksijen ve besinler kanser hücrelerine eşit oranda ulaşmakta ve hücreler bu koşullar altında iki boyutlu bir büyüme göstermektedir. Oysa vücutta kitle oluşturan solid tümörler üç boyutlu uzaysal bir konumda büyümekte-

dir. Bu durum tümörlerin iç bölümündeki hücreler arasında oksijen ve besin dağılımının eşit olmamasına yol açmakta ve hücreler farklı düzeylerde fiziksel ve kimyasal streslerle karşılaşmaktadır. Oksijen ve besin kaynaklarının düşük olduğu bölümlerde hücre hasarı ve hatta nekroz kendiliğinden gelişebilmektedir (2). Ayrıca tek tabakalı hücre kültür modelinin aksine hücrelerin yanıtlarının gelişmesinde önemli rol oynadığı düşünülen hücreler arası temaslar üç boyutlu bir ortamda gerçekleşmektedir (14).

Kemoterapötik ajanların toksik etkilerine

karşı tümör hücrelerinin direnç geliştirmesi kanser tedavisindeki en önemli problemlerden biridir. İlaç direncinin oluşum mekanizmalarını belirlemek üzere çeşitli ilaçlar tek tabakalı kültür ortamında tümör hücre soylarına uygulanmış ve bu şekilde ilaç penetrasyonunda azalma, ilacın hücre dışına aktif pompalanması, ilaç inaktivasyonunun ve DNA onarım işleminin artması ve hücre içinde ilaçların hedef moleküllerinin ekspresyonun değişmesi gibi hücre düzeyde işleyen birçok biyokimyasal mekanizmalar ortaya çıkarılmıştır (5,8). Ancak bu gibi tek hücre düzeyinde ortaya çıkan (uniselüler) direnç mekanizmalarının klinikte izlenen ilaç direnci için geçerli olup olmadığı konusunda ciddi endişeler bulunmaktadır. Bu konuda literatürde yapılmış olan çalışmalarda kullanılan tek tabakalı kültürde büyütülen hücrelerin kemoterapiye karşı oluşturdukları yanıt ile klinik gözlemler arasında birçok farklılık bulunduğu gözlenmektedir. Bu durumda tek tabakalı kültürde çok etkili bulunan ve belirgin antitümoral etkinliği saptanan bir ilacın ya da ilaç kombinasyonlarının klinikte bu derece etkili olmadığı görülmektedir (7). Bu nedenle tek tabakalı hücre kültürünün üç boyutlu in vivo solid tümörlerin özelliklerini tam olarak yansıtmada yetersiz kaldığı giderek daha çok araştırmacı tarafından kabul edilmektedir (14).

Sonuç olarak, solid tümörlerin üç boyutlu düzeni dikkate alınarak daha uygun in vitro sistemler oluşturulması amacıyla multiselüler tümör sferoidleri (MTS) geliştirilmiştir. Tümör sferoidleri, solid tümörlerin üç boyutlu büyüme ve organizasyonunu oldukça gerçekçi bir biçimde yansıtmakta ve bunun sonucunda tümörlerde söz konusu hücreler arası ilişkileri ve mikroçevresel koşulları çok daha net olarak ortaya koyabilmektedir (2,10,14). Buna paralel olarak birçok tümör hücre soyunun üç boyutlu sferoidler şeklinde üretildiğinde antineoplastik ajanlara ve radyasyona karşı tek tabakalı kültüre göre daha dirençli olduğu gösterilmiştir (6,12,13,16).

Klinik uygulamalarda elde edilen bulgularla da uyumlu olan sferoidlerdeki bu direnç, multiselüler direnç olarak tanımlanmakta ve tümör hücrelerinin üç boyutlu organizasyonuna bağlı olarak geliştiği belirtilmektedir (5,8). Üstelik sferoidler, çeşitli hücre tipleri kullanılarak üretilebilmekte, laboratuvar koşullarına kolaylıkla uyum sağlayarak yinelenabilirliği çok yüksek bir deney modeli oluşturmaktadır (14).

Bu bilgiler ışığında biz de laboratuvarımızda bulunan FM3A sıçan meme kanseri, MCF7 insan meme kanseri, CC531s sıçan kolon kanseri ve C6 fare glioma hücrelerinden multiselüler tümör sferoidleri üretmek amacıyla bu çalışmayı planladık.

MATERYAL ve METOD

Tek tabakalı tümör hücre kültürleri

FM3A (ETCC) ve CC531s [Prof. E. Wisse (Free University of Brussels, Belçika) tarafından sağlanmıştır] hücre soyları RPMI 1640 medyumunda, MCF7 (ATCC) insan meme kanser hücre soyu %1 nonesansiyel aminoasit solüsyonu, 1mM sodyum piruvat ve 0.5 Ü/ml insan rekombinan insülini içeren MEM medyumunda ve C6 glioma (ATCC) hücre soyu DME-F12 medyumunda, 37 C°'de %0.5 CO₂'li nemlendirilmiş inkübasyon ortamında üretildiler. Tüm medyumlara %10 fetal kalf serumu, 100 IU/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin ve 2 mM L-glutamin eklendi.

Sferoid hücre kültürleri

MTS üretimi için sıvı üst tabaka (liquid overlay) yöntemi kullanıldı (19). Buna göre 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarının zemini agarla kaplandı. Bu işlem için bidistile su içinde eritildikten sonra sterilize edilerek hazırlanan %3'lük stok agar solüsyonu kullanıldı. Zemin kaplama işleminden hemen önce 60C°'ye dek ısıtılarak sıvı hale getirilen

stok agar solüsyonu, hücre soylarının üretildiği medyumlarla seyreltilerek %0.5'lik konsantrasyona getirildi. Bu solüsyondan 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarındaki her kuyucuğa 1 ml konularak, kuyucuk tabanına yayılması sağlandı. Daha sonra hücre kültür kapları 4C°de 10 dakika bekletilerek zemindeki agar tabakasının jel halini alması sağlandı. Ardından tek tabakalı hücre kültürlerinden tripsinize edilerek kaldırılan tümör hücreleri uygun medyumlarda $2,5 \times 10^5$ hücre/kuyucuk olacak şekilde süspanse edilerek kuyucuklara ekildi. Haftada 2 kez olmak üzere taze medyum değişimleri yapıldı. Sferoid gelişimleri 21 gün boyunca invert mikroskopta gözlemlendi.

Işık mikroskopik inceleme

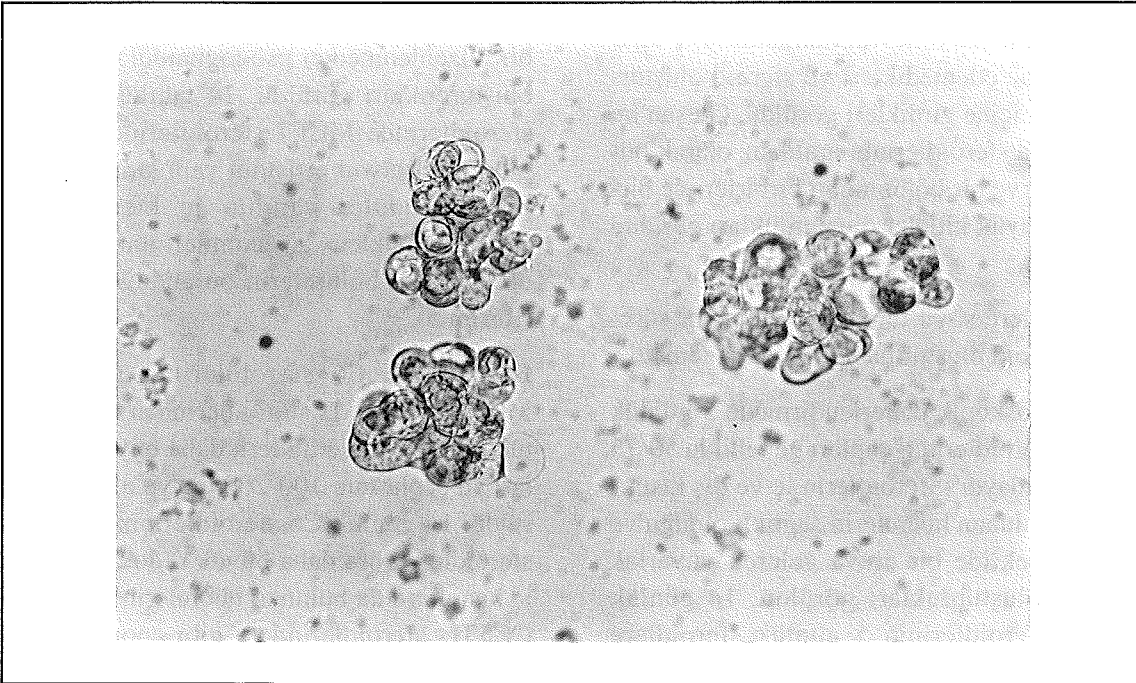
MCF7, CC531s ve C6 hücrelerinden üretilen tümör sferoidleri erken ve geç dönem morfolojik özelliklerini belirlemek üzere 5 ve 14. günlerde toplanarak %4'lük paraformaldehitte 10 dakika süreyle tesbit edildi. Ardından Sawicki yöntemine göre ⁽¹⁵⁾ yumurta

akına sarılarak ışık mikroskopik takibe alındı ve parafin bloklara gömüldü. Bloklardan alınan 4 µm'lik kesitler hematoksilin eosinle boyanarak, ışık mikroskopik değerlendirilme alındı.

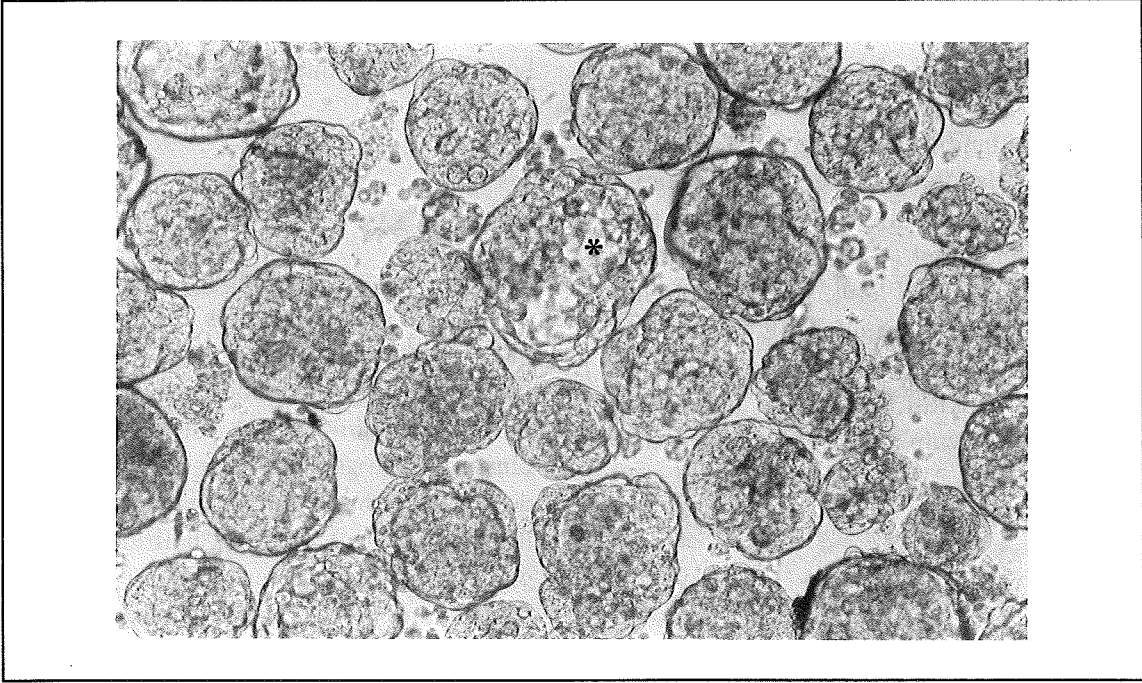
BULGULAR

Sıvı üst tabaka yöntemine göre sferoid oluşturmaya çalıştığımız C531s ve MCF7 tümör hücre soylarında ilk birkaç saat içinde hücrelerin agarlı zemin üzerine yığıldıkları ve 24 saat içinde kümelenerek küçük agregatlar oluşturdukları gözlemlendi (Resim 1). Bu şekilde oluşmaya başlayan sferoidler 48. saatten itibaren yuvarlak, sınırları belirgin ve düzgün sferoid görünümünü aldılar ve ardından büyümeye başlayarak yaklaşık 1 hafta içinde olgun tümör sferoidleri oluşturdular (Resim 2). Bu dönemde bazı MCF7 ve CC531s sferoidlerinin iç bölümlerinde saydam ve boş görümlü kesimler saptandı. Bu görüntüyü taşıyan sferoidlerin sayısı 10. günden itibaren giderek arttı.

Resim 1. İlk 24 saat içinde MCF7 hücrelerinin oluşturduğu küçük agregatların invert mikroskoptaki görüntüleri. (H&E X 320)



Resim 2. MCF7 hücrelerinin 7. günde oluşturduğu olgun sferoidlerin invert mikroskoptaki görüntüleri. (*saydam, boş görünümlü iç kesim). (H&E X 100)



C6 tümör hücrelerinin %0,5'lik agarlı zemin içine nüfuz ederek agar içinde büyümeye başladıkları ve bir kısım hücrenin de agarlı zemin üzerinde yayılarak, tabaka oluşturmaya çalıştıkları görüldü. Bunun üzerine zemini kaplayan agarın konsantrasyonu %1,5 olacak şekilde artırıldı ve bu durumda C6 hücrelerinin zemine tutunamadıkları, agar içine nüfuz edemedikleri ve sferoid oluşturma süreci içine girdikleri görüldü. Oluşan bu C6 glioma sferoidlerinin aralıksız olarak büyüdükleri ve bir bölümünün birbirleriyle birleşerek büyük kitleler oluşturdukları görüldü (Resim 3).

FM3A hücre soyu tüm deney dönemi süresince sferoid oluşturma eğilimi sergilemedi.

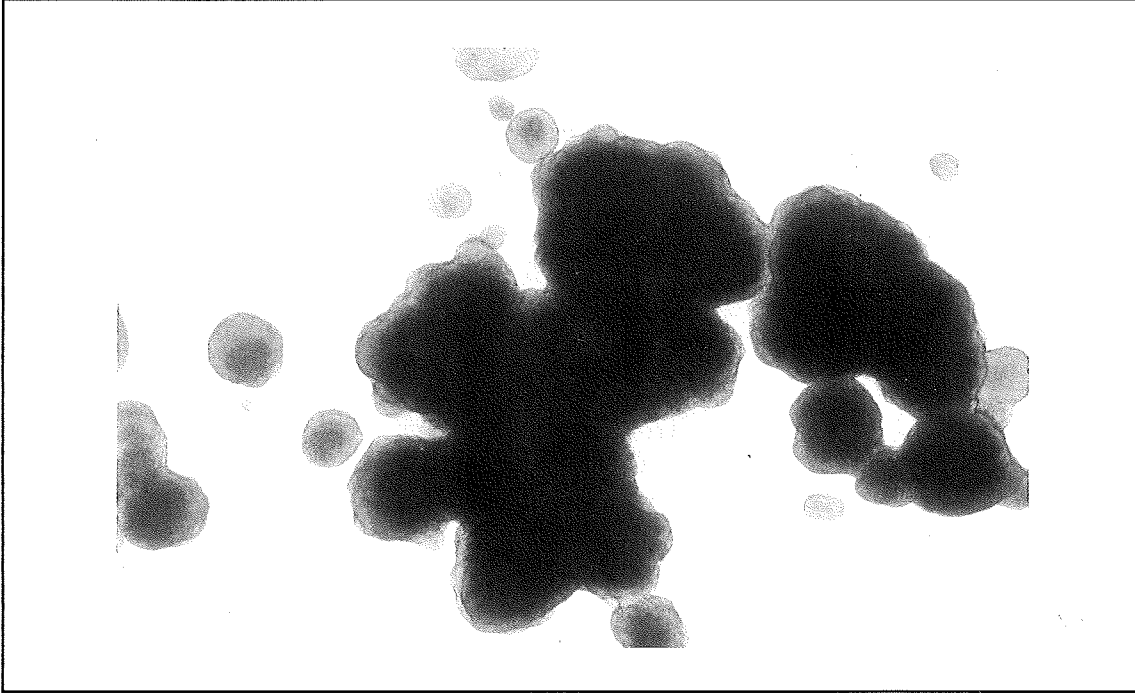
Işık mikroskopik değerlendirmede 5 günlük MCF7 sferoidlerinin çapları genellikle 50-75 μm arasındaydı. Sferoidlerin iç ve dış kısımlarında bulunan hücrelerin sağlıklı olduğu ve sıkı bir şekilde bir araya gelerek yuvarlak kitleler oluşturdukları görüldü. 14 günlük MCF7 sferoidlerinin 5 günlük sferoidlere göre büyümüş oldukları ve çaplarının 100-

150 μm 'ye ulaştığı görüldü. Bu dönemde sferoidlerin dış kısımlarında bulunan hücreler sağlıklı görünürken, iç kısımlarda kromatini kondanse olmuş ve fragmantasyona uğramış apoptotik hücre çekirdeği görüntüleri izlendi (Resim 4).

Beş günlük CC531s sferoidlerinin küresel bir düzenlenmeden psödoglandüler bir yapı oluşturdukları görüldü. 14 günlük CC531s sferoidlerinde MCF7 sferoidlerinde olduğu gibi genel boyut artışının yanı sıra düzensiz psödoglandüler yapının iç kısımlarında apoptotik nükleus görünümünün ön planda olduğu bazı bölümlerin bulunduğu görüldü (Resim 5).

Beş günlük C6 sferoidlerinin genellikle MCF7 ve CC531s sferoidlerinden daha fazla tümör hücresi içerdikleri, daha büyük oldukları ve çaplarının 100-200 μm 'ye ulaştığı görüldü. 14 günlük C6 sferoidlerinin 5 günlük sferoidlere göre daha büyük oldukları ancak iç kısımlarında bulunan hücrelerin MCF7 ve CC531s sferoidlerindeki gibi apoptotik görünümde olmadıkları izlendi (Resim 6).

Resim 3. Bir bölümü birbirleriyle birleşmiş ve kitleler oluşturmuş C6 sferoidlerinin invert mikroskoptaki görüntüleri. (H&E X 25)



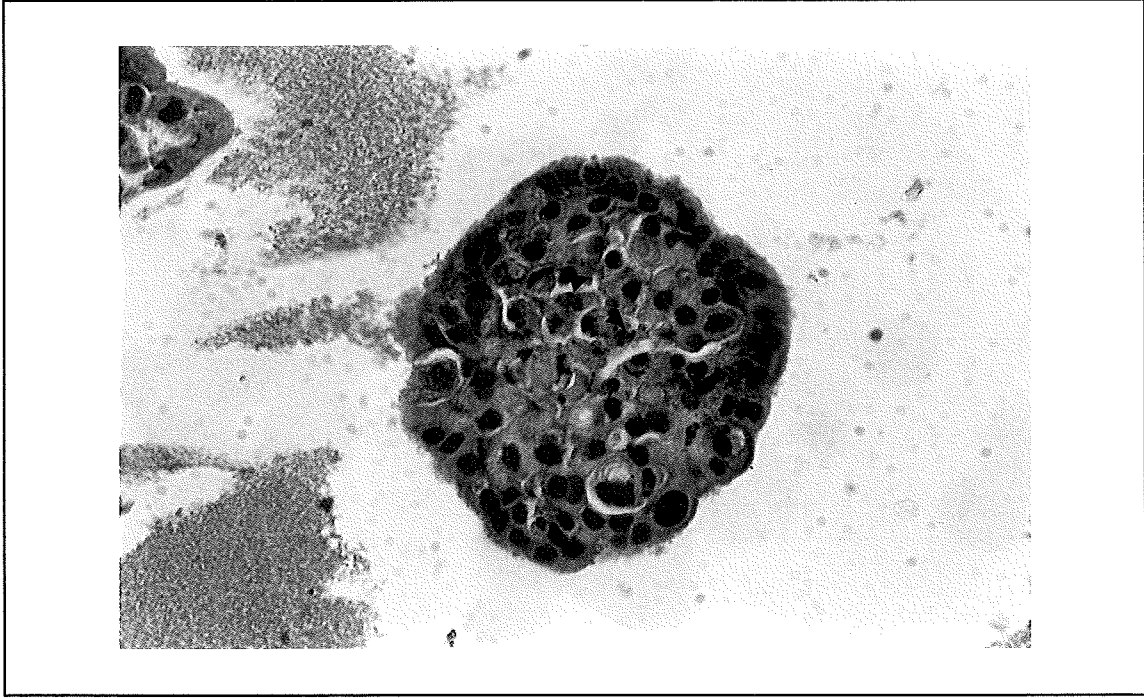
TARTIŞMA

Biz bu çalışmada hücre kültür laboratuvarımızda bulunan tümör hücrelerinden sıvı üst tabaka yöntemine göre sferoid oluşturarak, gelişim süreçlerini in vitro invert mikroskop ve ışık mikroskobu ile değerlendirmeyi amaçladık. İn vitro sferoid kültürleri çeşitli metodlarla elde edilebilir. Bunlardan en sık kullanılanı sıvı üsttabaka yöntemidir (14). Bu yöntemde (19) hücre kültür kaplarının tabanı agarla kaplanarak tümör hücrelerinin plastik zemine yapışmaları önlenmekte ve hücreler agarlı zemin üzerinde büyümelerini sürdürmektedir. Daha sonra bizim de deneylerimizde izlediğimiz gibi 1-3 gün içinde küçük hücre kümelenmeleri oluşmakta ve ardından içinde tümör hücrelerinin sıkı bir şekilde organize olduğu düzgün sferoid yapıları şekillenmektedir. Sferoid üretme teknikleri arasında sıvı üsttabaka yönteminden başka "spinner flask" ve "gyratory rotation" gibi teknikler de bulunmaktadır (10,14,16). Ancak bu yöntemler ek donanım gereksinimi göstermekte ve çalışma maliyet-

leri oldukça yüksek olmaktadır. Sıvı üsttabaka yöntemi ise laboratuvarlarda kolaylıkla uygulanabilecek ucuz, kolay ve hızlı bir yöntem olarak dikkati çekmektedir (14).

Multiselüler tümör sferoidlerinin oluşum ve büyüme süreçlerinde farklı tip gelişmeler izlenebilmektedir (2). Bazı tümör hücre soyları bizim MCF7 ve CC531s hücre soylarında izlediğimiz gibi belirgin sferoid yapıları geliştirmekte ve belli bir dönem boyunca büyümelerini sürdürdükten sonra in vivo tümörlerde olduğu gibi bir duraklama dönemine girmektedir (3,4). Başka bir sferoid gelişme tipinde ise düzenli sferoid yapılarının yanı sıra, oldukça büyük ve düzensiz şekilli kümelenmeler de oluşabilmektedir (2). Bu durum, bizim C6 sferoidlerinde izlediğimiz gelişmeye uymaktadır. Biz çalışmamızda C6 glioma sferoidlerinin sürekli olarak büyüdüklerini ve bir bölümünün birbirleriyle birleşerek büyük kitleler oluşturduklarını gördük. Bu durum tüm glioma hücre soyları için geçerli olmamaktadır. Örneğin U87 glioblastoma hücrelerinden oluşturulan sferoid-

Resim 4. 14 günlük bir MCF7 sferoidinin ışık mikroskoptaki görünümü. (ok başları: kromatini kondanse olmuş ve fragmantasyona uğramış apoptotik hücre çekirdeği profilleri. (H&E X 400)



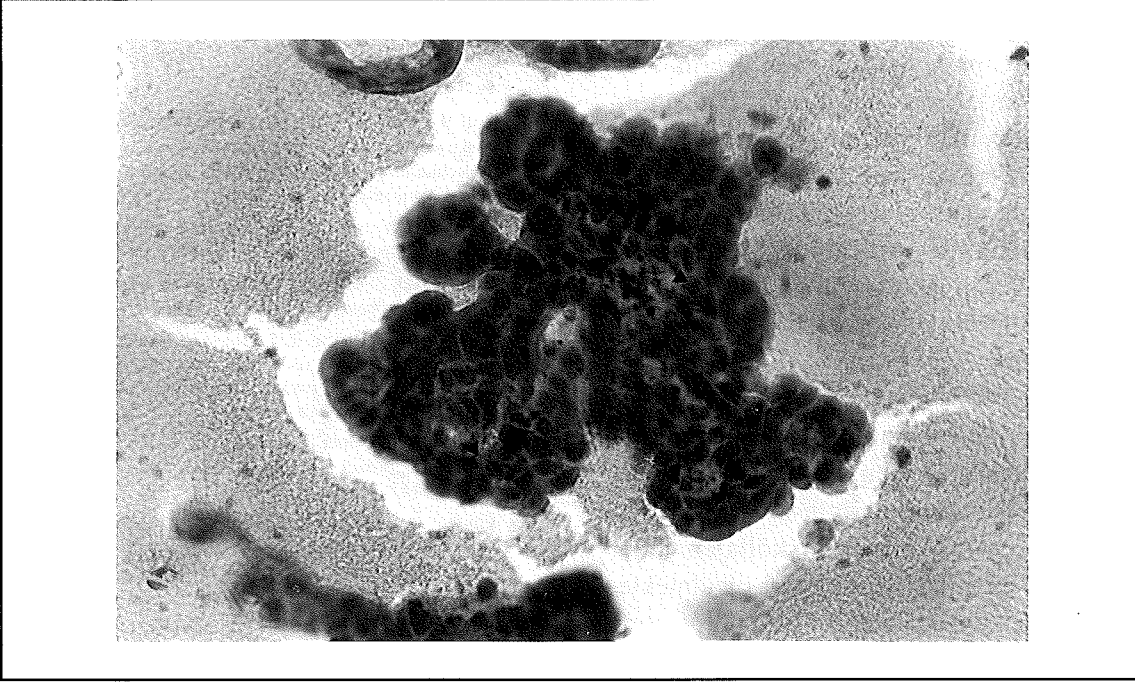
ler sürekli bir büyüme göstererek 1 mm çapına ulaşabilirken U251 glioblastoma sferoidleri yaklaşık 100 µm çapına ulaştıktan sonra büyümeleri durmaktadır (9). Sferoid gelişmesinde söz edilen bu farklılıklar nedeniyle sadece bir ya da birkaç sferoid sistem üzerinde yapılan çalışmalara dayanarak genelleme yapmaktan kaçınılması gerektiği ve farklı tip sferoidler arasında in vivo tümörlerde de çoğunlukla söz konusu olduğu üzere belirgin farklılıklar bulunduğu ifade edilmektedir (16).

Literatürde CC531s hücre soyundan üretilen sferoidler üzerinde yayınlanmış hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Bu sferoidlerin saptadığımız genel özellikleri, çalıştığımız hücrelerden ürettiğimiz MCF7 sferoidlerine benzemektedir. Her iki sferoidin MTS oluşturma süreçleri, genel büyüme özellikleri ve boyutları birbirine yakın niteliktedir. Ancak ışık mikroskopik değerlendirmemizle CC531s sferoidlerinde bez yapısına farklılaşma benzeri psödoglandüler bir yapı geliştiğini izledik. Bu durum Wag Rij sıçanla-

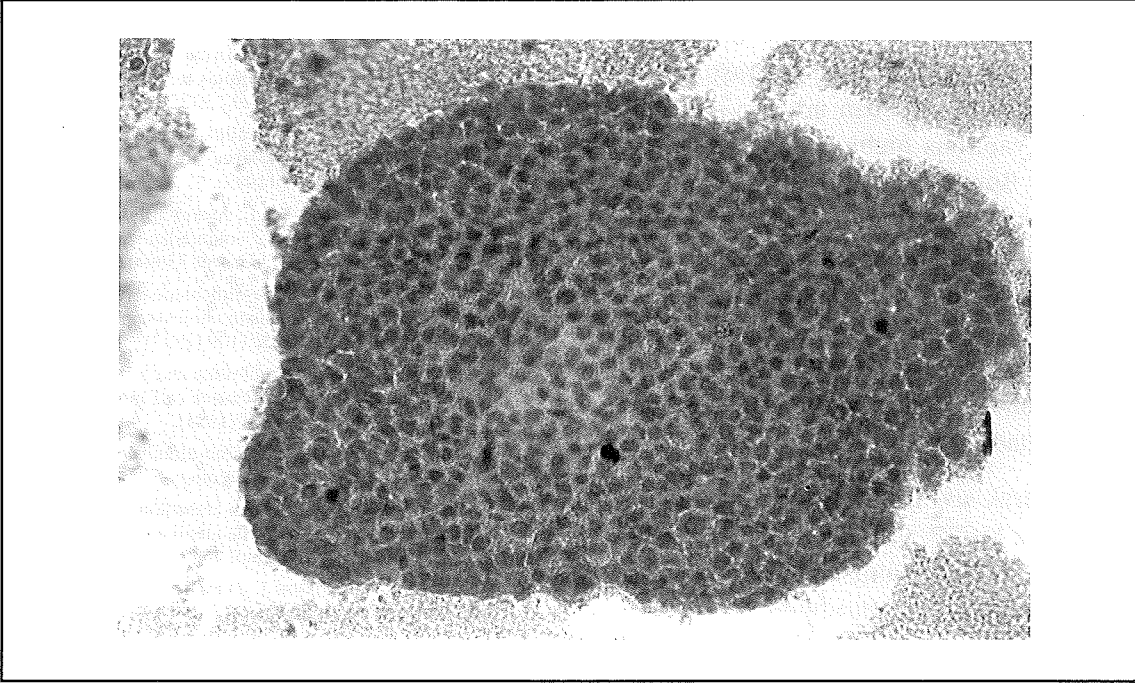
rından dimetilhidrazin ile oluşturulmuş CC531s kolon adenokarsinoma hücre soyundan (11) üretilen sferoidlerin morfolojik olarak in vivo tümör özelliklerini iyi yansıttığına işaret edebilir. Buna paralel olarak in vivo morfolojiye yakın düzenlenme gösteren bir deney modeli ile yürütülecek bir çalışmanın in vivo tümör yanıtının araştırılmasında daha sağlıklı sonuçlar verebileceği de açıktır.

Ayrıca MCF7 ve CC531s sferoidlerinde birinci haftadan başlamak üzere süre geçtikçe daha fazla oranda sferoidin içinde saydam, hücre sınırları belirsiz bölümler saptadık. Bu bölümler ışık mikroskobunda izlediğimiz apoptotik hücre profillerinin bol miktarda bulunduğu iç kesimlere karşılık gelmektedir. Sferoidlerin başlıca özelliklerinden biri de merkezlerinde nekrotik bölümlerinin bulunmasıdır (14,16). Kültür ortamında bulunan oksijen ve besinlerin iç kesimlere geçmesindeki güçlüklerle bağlı olduğu düşünülen bu nekrotik bölümler, in vivo tümörlerin damarlanması zayıf olan

Resim 5. 14 günlük bir CC531s sferoidinin ışık mikroskopik görünümü. (ok başları: kromatini kondanse olmuş ve fragmantasyona uğramış apoptotik hücre çekirdeği profilleri. (H&E X 400)



Resim 6. 14 günlük bir C6 sferoidinin ışık mikroskopik görünümü. (H&E X 400)



kesimlerinde de saptanmaktadır⁽²⁾. Sferoidlerde periferde bulunan hücrelerin proliferasyon gösterdiği, buna karşın nekrotik bölüme komşu ara bölümde bulunan hücrelerin dinlenme (quiescent) durumunda oldukları

bilinmektedir. Bu durum söz konusu hücreleri antineoplastik ajanlara karşı dirençli kılmakta ve sferoidlerdeki multiselüler direncin başlıca nedenini oluşturmaktadır^(5,17).

C6 hücrelerinden MTS oluştururken hücrelerin %0.5'lik agarlı zemin içine nüfuz ederek agar içinde büyümeye başladıklarını ve bir kısım hücrenin de agarlı zemin üzerinde tabaka oluşturduğunu gözlemledik. Bu durumda agarlı zeminin konsantrasyonunu yükselterek sertliğini artırmak suretiyle C6 glioma hücrelerinin agar içine geçmesini önlemeye çalıştık. Gerçekten de agarın konsantrasyonu %1,5'e çıkardığımızda C6 hücrelerinin zemin içine nüfuz edemediklerini ve sferoid oluşturma sürecine geçtiklerini gözlemledik. Bu durum C6 hücrelerinin MCF7 ve CC531s hücrelerine göre daha saldırgan nitelikte bir tümör hücresi olduğunu düşündürülebilir. Literatürde tümör sferoidlerinin invazif özelliklerini belirlemek amacıyla kollajen jeller içinde penetrasyon kapasiteleri ölçülmektedir (1,18). Bu durumda agar içine nüfuz etme kapasitesi de hücrelerin motilite ve invazyon özelliklerini yansıtır olabilir.

Biz bu çalışmada FM3A hücrelerinin sıvı üst tabaka yöntemine göre MTS oluşturmadığını gözledik. Yaptığımız literatür araştırmasına göre, bu hücre soyundan üretilen sferoidler üzerinde yapılmış hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Bunun nedeni FM3A hücrelerinin süspansiyon hücre kültürü halinde üretilen bir hücre soyu olmasından kaynaklanıyor olabilir. Bu durum süspansiyon kültürlerinde üretilen hücrelerin sferoid oluşturma kapasitesinin tek tabakalı kültürde üretilen hücre soylarından daha düşük olduğu gözlemlerine de uymaktadır (2).

Sonuç olarak sıvı üsttabaka yöntemine göre ürettiğimiz MCF7, CC531s ve C6 sferoidleri gerek invert hücre kültür mikroskobu ve gerekse ışık mikroskobu düzeyinde gerçekleştirilen gözlem koşullarında farklı gelişim özellikleri göstermesine karşın, üç boyutlu genel sferoid morfolojisini tam olarak yansıtmaktadır. Bu haliyle çeşitli ilaçların ve ilaç kombinasyonlarının antineoplastik özelliklerinin değerlendirilmesinde in vivo yanıtları daha gerçekçi bir şekilde yansıtması açısından tek

tabakalı kültürlerle birlikte değerlendirmeye alınması gerekir.

KAYNAKLAR

1. Bell HS, Wharton SB, Leaver HA, Whittle IA: Effects of N-6 essential fatty acids on glioma invasion and growth: experimental studies with glioma spheroids in collagen gels. *J Neurosurg* 91:989 (1999).
2. Carlsson J, Yuhas JM: Liquid-overlay culture of cellular spheroids. *Recent Results Cancer Res* 95:1 (1984).
3. Conger AD, Ziskin MC: Growth of mammalian multicellular tumor spheroids. *Cancer Res* 43:556 (1983).
4. Demichelli R, Foroni R, Ingrosso A, Pratesi G, Soranzo C, Tortoreto M: An exponential-Gompertzian description of LoVo cell tumor growth from in vivo and in vitro data. *Cancer Res* 49:6543 (1989).
5. Desoize B, Gimonet D, Jardillier JC: Cell culture as spheroids: an approach to multicellular resistance. *Anticancer Res* 18:4147 (1998).
6. Frankel A, Buckman R, Kerbel RS: Abrogation of taxol-induced G2-M arrest and apoptosis in human ovarian cancer cells grown as multicellular tumor spheroids. *Cancer Res* 57:2388 (1997).
7. Kaye SB: Multidrug resistance: clinical relevance in solid tumors and strategies for circumvention. *Curr Opin Oncol* 10 (supp 1):S15 (1998).
8. Kobayashi H, Man S, Kapitain SJ, Teicher BA, Kerbel RS: Acquired multicellular resistance to alkylating agents in cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:3294 (1993).
9. Kolchinsky A, Roninson IB: Drug resistance conferred by MDR1 expression in spheroids formed by glioblastoma cell lines. *Anticancer Res* 17:3321 (1997).
10. Kunz-Schughart LA: Multicellular tumor spheroids: intermediates between monolayer culture and in vivo tumor. *Cell Biol Int* 23:157 (1999).
11. Marquet RL, Westbroek DL, Jeekel J. Interferon treatment of a transplantable rat colon adenocarcinoma: importance of tumor site. *Int J Cancer* 33:689 (1984).
12. Mueller-Klieser W: Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *Am J Physiol Cell Physiol* 273:C1109 (1997).
13. Nederman T: Effects of vinblastine and 5-fluorouracil on human glioma and thyroid cancer cell monolayers and spheroids. *Cancer Res* 44:254 (1984).
14. Santini MT, Gabriella R: Three-dimensional spheroid model in tumor biology. *Pathobiology* 67:148 (1999).
15. Sawicki W, Lipetz J: Albumen embedding and individual mounting of one or many mammalian ova on slides for fluid processing. *Stain Technol* 46:261 (1971).
16. Sutherland RM, Carlsson J, Durand RF, Yuhas J: Spheroids in cancer research. *Cancer Res* 41:2980 (1981).
17. Sutherland RM: Cell and environment interactions in tumor microregions: The multicell spheroid model. *Science* 240:177 (1988).
18. Tamaki M, McDonald W, Amberger VR, Moore E, Del Maestro RF: Implantation of C6 astrocytoma spheroid into collagen type I gels: invasive, proliferative, and enzymatic characterizations. *J Neurosurg* 87:602 (1997).
19. Yuhas JM, Li AP, Martinez AO, Ladman AJ: A simplified method for production and growth of multicellular tumor spheroids. *Cancer Res* 37:3639 (1977).