

Obezite Araştırmaları İçin *In Vitro* Adiposit Hücre Kültürü İle Etkili Model Oluşturma: Ön Çalışma

Ezgi Nur ÇİL , Yasemin SOYSAL  

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Bu makaleye yapılacak atf: Çil EN ve Soysal Y. Obezite araştırmaları için *in vitro* adiposit hücre kültürü ile etkili model oluşturma: ön çalışma. Turk J Diab Obes 2024;1: 59-64.

ÖZ

Amaç: 3T3-L1 preadipositlerin farklılaşma etkinliği obezite, diyabet ve ilgili bozukluklarla ilişkili hücresel mekanizmalar üzerine yapılan çalışmaları etkileyen önemli bir faktördür. 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşması genellikle insülin, deksametazon (DEX) ve 3-izobütill-1-metilksantin (IBMX) içeren bir adipojenik kokteyl ile indüklenmektedir. 3T3-L1 hücreleri çoğaltılırken dikkat edilmesi gereken önemli noktalar içeren bir sürece sahip hassas bir hücre grubu olup ilerleyen pasajlarda farklılaşma yeteneğini kaybedebilmektedir. Bu sorunu çözmek için, çalışmamızın amacı doğrultusunda, yaygın olarak kullanılan üç farklı adipojenik kokteylin farklılaşma verimliliği karşılaştırılmıştır. Bununla birlikte, birtakım parametreler değiştirilerek 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşma yetenekleri test edilmiştir.

Gereç ve Yöntemler: Çalışmamızda 3T3-L1 hücre kültürü, fibroblast hücrelerin olgun adiposit hücrelere farklılaştırılması, Oil Red O boyama ile lipidlerin mikroskop altında gösterilmesi ve kantitatif analiz için boyanın spektrofotometrik ölçümü yöntemleri kullanılmıştır.

Bulgular: Deneysel sonuçları, 0,5 mM IBMX, 0,25 µM DEX ve 1 µg/mL insülin içeren adipojenik kokteylin 3T3-L1 hücre farklılaşması için en etkili kokteyl olduğunu ($p < 0,0001$) ve farklılaşmanın etkinliğinin adipojenik ajanların konsantrasyonları ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir.

Sonuç: Çalışmamızda ATCC'nin 3T3-L1 hücreleri için vermiş olduğu protokolün alternatifi olarak *in vitro* prelinik obezite modeli için kullanılabilir önemli modifikasyonlar bildirilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Obezite, Hücre kültürü, 3T3-L1, Adipogenez, Adiposit

Creating An Effective Model with *In Vitro* Adipocyte Cell Culture for Obesity Research: Preliminary Study

ABSTRACT

Aim: The differentiation efficiency of 3T3-L1 preadipocytes is a crucial factor affecting studies on cellular mechanisms associated with obesity, diabetes and related disorders. Differentiation of 3T3-L1 cells is usually induced by an Adipogenic cocktail containing insulin, dexamethasone (DEX), and 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX). There is a process that includes important points to consider when growing 3T3-L1 cells. It is a sensitive cell group and may lose its ability to differentiate in later passages. To solve this problem, for the purpose of our study, the differentiation efficiency of three different commonly used Adipogenic cocktails was compared. Additionally, the differentiation abilities of 3T3-L1 cells were tested by changing some parameters.

Material and Methods: In our study, 3T3-L1 cell culture, differentiation of fibroblast cells into mature adipocyte cells, demonstration of lipids under the microscope with Oil Red O staining, and spectrophotometric measurement of the dye for quantitative analysis were used.

Results: Experimental results Showed that the Adipogenic cocktail containing 0.5 mM IBMX, 0.25 µM DEX and 1 µg/mL insulin was the most effective cocktail for 3T3-L1 cell differentiation ($p < 0.0001$) and the effectiveness of differentiation was closely related to the concentrations of adipogenic agents.

Conclusion: In our study, important modifications that can be used for the *in vitro* preclinical obesity model have been reported as an alternative to the protocol given by ATCC for 3T3-L1 cells.

Keywords: Obesity, Cell culture, 3T3-L1, Adipogenesis, Adipocyte

ORCID: Ezgi Nur Çil / 0000-0002-2960-9616, Yasemin Soysal / 0000-0003-1580-0564

Yazışma Adresi / Correspondence Address:

Yasemin SOYSAL

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye
Tel: 0 (542) 346 35 76 • E-posta: yasemin.soysal@deu.edu.tr

DOI: 10.25048/tudod.1418459

Geliş tarihi / Received : 13.01.2024

Revizyon tarihi / Revision : 24.03.2024

Kabul tarihi / Accepted : 14.04.2024



GİRİŞ

Son yıllarda dünya çapında pandemik hâle gelen obezite, insan sağlığına ciddi olumsuz etkileri bildirilen, vücutta aşırı yağ (adipoz doku) birikimi ile karakterize multifaktöriyel bir hastalıktır. Aşırı kalori alımı, sedanter yaşam ve genetik yatkınlık gibi faktörlerin bir araya gelmesinden kaynaklanan pozitif enerji dengesi obezitenin tanımı olarak kullanılmaktadır (1). Pozitif enerji dengesinden kaynaklanan ve vücutta kullanılmayan fazla enerji adipoz dokuda yağ olarak birikim göstermektedir. Adipoz dokuda bulunan yağ hücrelerinin (adiposit) depolama kapasitesinin uyarlanması ile yağ hücrelerinin sayısı (hiperplazi) ve hacim (hipertrofi) olarak artışı gözlenmektedir (2,3). Preadipositlerden olgun yağ hücrelerinin oluşumu adipogenez olarak adlandırılmaktadır. Obezite adipogenez ile başlayıp yağ hücrelerindeki yoğun hiperplazi ve hipertrofi ile dünya çapında mortalite ve morbidite ile sonuçlanan ciddi bir sağlık sorunudur (3). Hiperplazi, olgun adiposit gelişimine yol açan transkripsiyonel faktörler ve hücre döngüsü proteinlerini içeren bir adipojenez ile gerçekleşir. Adipojeniz sürecindeki dengenin bozulması sonucu meydana gelen aşırı hipertrofi lokal inflamatuvar yanıtı tetiklemekte, insülin direnci ve buna bağlı tip 2 diyabet gelişimine neden olmaktadır (3,4). Karbonhidrat veya yağ içeriği yüksek bir beslenme tarzı sonucu yağ hücrelerinin hiperplazisi ratlarda olduğu gibi diyet bileşenlerine bağlı olarak obez bireylerde de gözlenmektedir. Obezitenin etkin tedavisine yönelik yapılan araştırmalarda ana yaklaşımlar genelde lipid depolanmasını ve yağ hücrelerinin yayılımını sınırlama yollarına odaklanmıştır (5). Obeziteye karşı kullanılabilecek potansiyel terapötik stratejilerin başında adiposit farklılaşmasının engellenmesi yöntemi gelmektedir. Bu sayede adipogenez ve dolayısıyla obezitenin önlenmesi sağlanabilecektir. Obezite, metabolik sendrom tablosuna eşlik eden insülin direnci, hipertansiyon, tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar ve post-travmatik stres bozukluğu ile ilişkilendirilmiştir (6, 7). Obezitenin tedavisi ve önlenmesi ile bu komplikasyonlarda da iyileşme sağlanacak, yaşam kalitesinin artırılmasına katkıda bulunulacaktır. Obezitenin indüklediği sistemik inflamasyon hepatik dokudan önce adipoz dokudan köken alır. Yağdan yüksek bir diyetle beslenmeye bağlı olarak yağ dokusunda nötrofil ve makrofaj sayıları hızlıca artış göstermektedir. Bahsi geçen metabolik bozuklukların ve mortalitenin azaltılması ve yaşam kalitesinin artırılması için obezite ilişkili bazı adipokinlerin baskılanması ve/veya salgısının artırılması ile gelecek çalışmalara yön verilmesi gerekmektedir (8).

Obezitenin patofizyolojisini araştıran in vitro çalışmalar, adiposit oluşumunun düzenlenmesinin obeziteye karşı potansiyel bir terapötik strateji olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Dolayısıyla in vitro çalışmalarda adipositlerin etkin bir şekilde farklılaşması mekanizmaların aydınlatılması

bilmesi için önemli bir faktördür. 3T3-L1 hücreleri fibroblastlardan olgun adipositlere farklılaşabilme potansiyelleri nedeniyle obezite, diyabet ve ilişkili patolojilerin temel hücresel ve moleküler mekanizmalarının anlaşılmasında kullanılan en yaygın in vitro modeldir (9).

Adipogenez mekanizmalarını inceleyen çalışmalarda 3T3-L1 preadipositlerin etkin farklılaşması önemli bir faktördür. 3T3-L1 hücreleri obezite ve diyabet üzerine yapılan çalışmalarda onlarca yıldır yaygın olarak kullanılmış olsa da adipojenik kokteylin hâlâ bir standardizasyonu yoktur (10). Bu çalışmanın amacı doğrultusunda literatürde bildirilen yöntemler ve ATTC'nin önerdiği protokol modifiye edilerek 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşma verimliliğinin nasıl etkilendiği test edilmiş ve farklılaşma sürecinde yaşanan zorluklara ait çözümleri içeren yöntem deneyimleri sunulmuştur.

GEREÇ ve YÖNTEMLER

3T3-L1 Hücre Kültürü

Fare, sıçan veya insandan alınan yağ dokularının stromal vasküler fraksiyonundan elde edilen primer ya da klon hücre kültürleri adiposit farklılaşmasının araştırılması amacıyla kullanılır. Bu hücre kültürlerinin adipositlere farklılaşması indüklendiğinde hücreler yapısal ve biyokimyasal olarak adiposit karakteristiklerini gösterirler. Yağ hücresinin farklılaşmasında en yaygın olarak kullanılan klon hücre tipi 3T3-L1 hücreleridir. Bu preadiposit hücre kültürleri diferensiyasyon için temas inhibisyonuna gereksinim duyarlar ve farklılaşma çalışmaları için hücre kültürlerinin konfluent hâle gelmesi beklenir. Farklılaşmayı uyarmak için 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) ajanı beraberinde dexamethasone (DEX) ve insülin kullanılır (11).

Bu çalışmada beyaz yağ hücresi öncülü fare embriyonik fibroblast klon hücre tipi olan 3T3-L1 preadiposit hücre hattı (CL-173; ATCC, Manassas, VA, USA) Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonundan (ATCC) temin edilmiştir. Öncelikle ATCC'nin önerdiği protokol ile %10 bovine calf serum (BCS), %2 L-Glutamin, %1 penislin streptomisin ilave edilerek yüksek glikozlu (4,5 g/L) DMEM (Gibco) ile tamamlanmış besi yerinde 37 °C'de ve %5 CO₂'li nemlendirilmiş ortamda hücreler inkübatörde çoğaltılmıştır. Deney ve kontrol gruplarında diferensiyasyonun indüklenmesi amacı ile aynı protokol kullanılmıştır (12).

Hücrelerin çoğalması günlük takip edilerek %70-80 yoğunluğa ulaştıklarında PBS (Fosfat Tamponlu Salin) ile hücre atıklarından ve fazla besi yerinden arındırmak için iki kez yıkanmış ve %0,25 Trypsin-EDTA (Gibco) ilave edilerek 2-3 dakika süreyle inkübatörde bekletilmiştir. Hücreler invert mikroskop altında incelenip, kalktıklarından emin olunduktan sonra 1:3 veya 1:5 oranında yeni kültür kaplarına pasajlanmıştır.

Tablo 1: 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşması için kullanılan adipojenik kokteyller.

Mix 1	Mix 2	Mix 3
0.5 mM IBMX	0.5 mM IBMX	25 mM IBMX
0.25 µMDEX	0.1 µM DEX	0.25 µM DEX
1 µg/mlİnsülin	1 µg/ml İnsülin	1 µg/ml İnsülin

IBMX: 3-isobutyl-1-methylxanthine, **DEX:** Dexamethasone

3T3-L1 Hücre Farklılaşması

Farklılaşma için yeterli sayıda hücre elde edildikten sonra 6 well plate'in her kuyucuğuna sayım yapılarak yaklaşık 150 000 hücre gelecek şekilde ekim yapılmıştır. 48 saat sonra tam hücre yoğunluğu (%100) gözlemlendikten sonra besi yeri yenilenecek 48 saat daha inkübe edilmiştir. 96 saatlik inkübasyonun sonunda farklılaşma besi yerinin eklendiği gün sıfırıncı (0. gün) olarak adlandırılmaktadır. Bu aşamada hacim olarak fetal sığır serumu (FBS %10), L-Glutamin (%2), penisilin streptomisin (%1) ve yüksek glikozlu DMEM sabit iken, çalışmanın değişkeninin oluşturduğu IBMX (Sigma), DEX (Sigma) ve 1 µg/ml insülin (Sigma) farklı konsantrasyonlarda belirlenerek 3 grup farklılaşma kokteyli hazırlanarak kullanılmıştır (Tablo 1). 2. gün eski besiyeri atılarak 1 µg/mlİnsülin içeren tamamlanmış besiyeri eklenmiş ve her 48 saatte bir besiyeri yenilenecek 4 ve 6. günler %10 FBS içeren tamamlanmış DMEM besiyeri eklenmiştir. Hücreler farklılaşmanın tamamlanmasına kadar (8. Gün) inkübe edilmiştir. Hücre pasajı %70 konfluensin altında gerçekleştirilmiştir ve yalnızca farklılaşma deneylerinden önce %100 konfluense ulaşmalarına izin verilmiştir.

OilRed O (ORO) Boyama

Hücre morfolojisini ve farklılaşmanın ilerlemesini değerlendirmek için Oilred O boyama yöntemi nötral trigliseritleri ve lipidleri görüntüleyebilen yaygın kullanılan geçerli bir lipid boyama yöntemidir. Işık ve floresan mikroskobu ile görüntüleme ve spektrofotometre ile kantitatif ölçüm imkânı sunarak lipid birikiminin analizine imkan sağlayan bir yöntemdir (13). Optimize ORO boyama protokolü, adiposit farklılaşmasını niceliksel olarak değerlendirmek için evrensel olarak kullanılmaktadır. Deney ve kontrol gruplarında diferansiyasyon ve hücre içi lipid birikiminin değerlendirilmesi için ayrılmış hücreler 8. günlerde ORO boyama ile incelenmiştir.

ORO boya için stok solüsyonu hazırlama (14): toz formunda satın alınan OilRed O (Sigma) boyadan %0.5 konsantrasyonda ana stok çözelti hazırlamak için 0,2 gram tartılarak 40 mL 2-propanol içinde çözündürülmüştür. Bu stok çözelti oda sıcaklığında alüminyum folyo ile sarılı bir şekilde ışıktan korunarak saklanmıştır. Stok çözelti 3:2 oranında seyrelti-

lerek çalışma solüsyonu hazırlanmıştır. Çalışma solüsyonu her deney için taze olarak 3 birim boya ile 2 birim distile su karıştırılarak hazırlanmış ve kullanımdan hemen önce 0,45 µm filtre ile bir kez filtrelenmiştir (14).

Farklılaşmanın ardından 6 kuyulu kültür plaklarına ekilen hücrelerin besi yeri atılmış ve PBS ile yıkama yapılmıştır. Fiksasyon için %4'lük paraformaldehit (PFA) ile oda sıcaklığında 45 dakika boyunca inkübe edilen hücrelerin sabitlenmesi sağlanmıştır. Paraformaldehit uzaklaştırıldıktan sonra hücrelerin üzerine %60'lık izopropanol eklenmiş ve 5 dakika beklenmiştir. Eklenen izopropanol 5 dakikanın sonunda uzaklaştırıldıktan sonra ORO boyama solüsyonundan kuyulara 2 mL eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından, bağlanmamış boyayı çıkarmak için hücreler distile suyla 4-5 defa yıkanmıştır. Kuyulara su ekleyerek invert mikroskopta yağ damlacıkları görüntülenmiştir. Bağlı (boyanmış) ORO boya %100 izopropil alkol ile hücrelerden ekstrakte edilmiş ve ELISA okuyucu cihazda 490 nm optik absorbansta ölçülerek miktarı tayin edilmiştir.

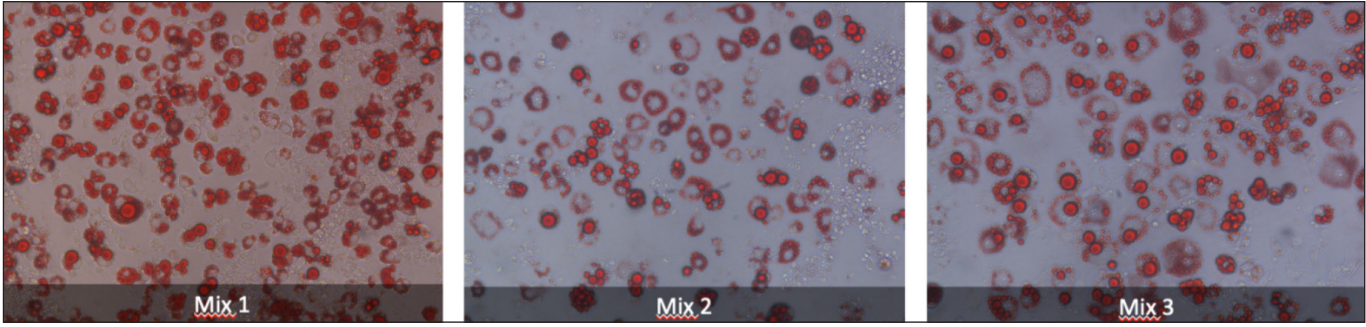
İstatistiksel Analiz

3T3-L1 hücre tabakası invert mikroskopta 20x büyütmede parlak bir alanda fotoğraflanmıştır. Elde edilen veriler gruplar arasında istatistiksel belirginliği ortaya çıkarmak için GraphPad Prism 9 programı kullanılmıştır. Veriler SPSS 29 programında t-testi ile analiz edilmiştir. Sonuçların doğruluğunu sağlamak için tüm deneyler üç kez tekrarlanmıştır. $p \leq 0.05$ çıkan sonuçlar anlamlı kabul edilerek şekillerde * olarak belirtilmiştir.

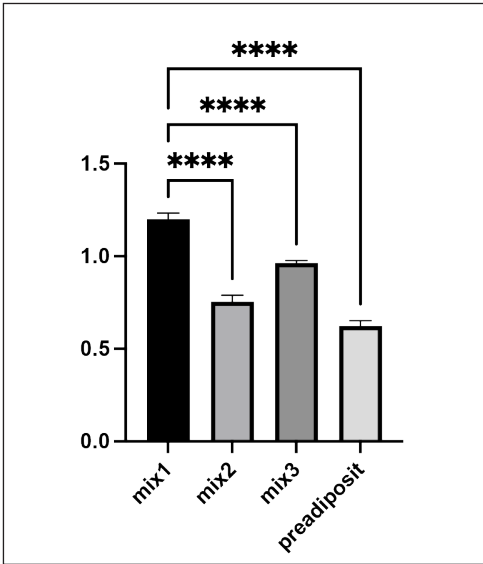
BULGULAR

Fare 3T3-L1 hücreleri, adipogenezdeki hücreler ve moleküler olayları incelemek için en iyi karakterize edilmiş modeldir (15). Büyümenin durmasının ardından farklılaşma ajanlarıyla tedavi üzerine 3T3-L1 hücreleri hücre döngüsüne yeniden girer ve fenotip fibroblasttan adiposite dönüşür. 3T3-L1 hücrelerinin başarıyla farklılaşması, in vitro adipogenezini incelemek için kritik bir adımdır. Adipojenik kokteyl adı verilen üç ana bileşen, IBMX, DEX ve insülin, 3T3-L1 hücre farklılaşmasına ilişkin neredeyse tüm çalışmalarda kullanılır. Bununla birlikte, her bileşenin konsantrasyonu, bireysel çalışmaya bağlı olarak büyük ölçüde değişir.

Ön çalışmalarımızda ATCC tarafından önerilen yöntemle (0,5 mM IBMX, 1µM DEX ve 1µg/mL insülin) 3T3-L1 hücrelerinin başarılı bir şekilde farklılaşması sağlanamamıştır. Nedenleri araştırıldığında, bu başarısız farklılaşmanın hücrelerin farklılaşmaya uygun şekilde çoğaltılmaması, ortam değişimi için el uygulamalarında gereken hassasiyetin gösterilmemiş olması ve hücrelerin farklılaşma kokteylindeki ilaçların konsantrasyonundan olumsuz etkilenmeleri gibi



Şekil 1: OilRed O boyama ile lipitlerin gösterilmesi. Kırmızı ile boyanan hücreler lipitleri göstermektedir. 3T3-L1 hücre tabakası invert mikroskopla 20x büyütmede parlak bir alanda fotoğraflanmıştır.



Şekil 2: OilRed O 490 nm spektrofotometrik ölçüm. ****p<0,0001

sorunlardan kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Buna göre adipojenik ilaçların daha düşük konsantrasyonları ile farklı kombinasyonları literatürde yaygın kullanılan kokteyllere göre tasarlanmıştır. Çalışmaların çoğunda 0,5 mM IBMX ve 0,25 µM DEX içeren farklılaşma karışımları kullanıldığı belirlenmiştir. ATCC protokolünde belirtilen 1 µM DEX içeren farklılaşma kokteyli yerine çalışmamızda 0,25 µM DEX veya 0,1 µM DEX kullanıldığında hücrelerde sağlıklı bir farklılaşma sağlanmış olup daha önce yaşanan sorunlardan hücrelerde kültür kabından ayrılma ve kopma gibi etkiler görülmemiştir. Bununla birlikte farklı kokteyllerin lipit oluşumuna etkisi ORO boyama ile analiz edilmiş, mikroskopta ve spektrofotometrik ölçümlerde karşılaştırılarak en etkili farklılaşma kokteyli taranmıştır.

Lipit damlacıklarının ORO boyanması sonucu lipit yoğunlukları mikroskopta kırmızı renkte görülmektedir. Buna göre, Mix 1 karışımı ile indüklenen hücrelerin daha çok sayıda ve daha büyük lipit damlacıkları içerdiği değerlendirilmiştir (Şekil 1).

İnvert mikroskop altında nitel olarak gözlenen olgun adipositler kantitatif olarak Oil Red O'nun spektrofotometrik ölçümü ile nicel olarak da gösterilmiştir. Buna göre Mix 1 karışımı ile indüklenen hücrelerin lipit birikiminin en yüksek olduğu, düşük konsantrasyonda DEX ve IBMX içeren karışımlarla indüklenen hücrelerin lipit birikiminin daha düşük olduğu görülmektedir. Mix 1, Mix 2 ve Mix 3 kokteyllerinin lipit oluşumunu tetiklemesi anlamlı olarak birbirinden farklı bulunmuştur (Şekil 2).

TARTIŞMA

Bu zamana kadar, 3T3-L1 preadipositlerin farklılaşmasına yönelik mevcut protokollerin veya kitlerin düşük etkinliği, adipositlerdeki hücrel ve moleküler mekanizmalara ilişkin çalışmaların sürdürülmesini zorlaştırmaktadır. Burada, 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşma sürecinde etkili bir protokol ile başarılı sonuç alabilmek için dikkat edilmesi gereken hassas el manipülasyonları, büyüme koşulları ve adipojenik kokteylin içeriği uygulanmış olan modifikasyonlar üzerinden açıklanmaktadır.

ATCC farklılaşma protokolüne göre yapılan ilk çalışmalarımızda hücrelerde tutunduğu kültür kabından ayrılma ve kopma gibi deneyi sonlandıracak derecede önemli olan olumsuz sonuçlar görülmüştür. 2019 yılında Zhao ve arkadaşları bir çalışmada; karşılaştığımız sonuçlara benzer şekilde sorunlar yaşandığı bildirilmiş ve adipojenik kokteyilde bulunan ilaç konsantrasyonlarından kaynaklanabileceği öne sürülmüştür. Adipojenik etken maddelerin yoğunluklarında yapılan değişiklikler ile oluşturulan farklılaşma kokteylleri adiposit farklılaşma verimini ve lipit kapasitesini bizim çalışmamızda da etkilemiştir (10). Bunun üzerine ilerleyen çalışmalarımızda kullanılmak üzere bir farklılaşma protokolü optimize edilmesi gerekmiş ve literatürde en sık kullanılan karışımlar baz alınarak farklı üç kokteyl oluşturulmuştur. Literatürde de çalışmamıza benzer olarak adipojenik ajanların uygulanma süresinin veya konsantrasyonunun modifiye edilerek farklılaşmanın daha verimli bulunduğu çalışmalar bildirilmiştir (10, 16-18).

DEX, mezenkimal kök hücrelerin adipositlere, kas hücrelerine ve kondrositlere farklılaşması üzerinde hem konsantrasyona hem de zamana bağlı etkiler sergileyen sentetik bir kortikosteroiddir. IBMX, erken adipojenik farklılaşmayı tetiklemek için önemlidir (19). Çalışmamızda DEX ve IBMX konsantrasyonlarının azaltılması, 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşma etkinliğinin azalmasıyla sonuçlanmıştır. Bunun nedeni olarak DEX ve IBMX maddelerinin iyi birer adipojenik indükleyici olmaları gösterilebilir.

Hücre hattının orijini, pasaj sayısı, kültür kapları gibi birçok faktör 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşma verimliliğini etkileyebilmektedir. 3T3-L1 hücrelerinin genellikle ölümsüzleştirildiği düşünülse de birçok çalışma 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşma etkinliğinin değişebileceğini bulmuştur (10). Özellikle pasaj sayısının artmasıyla veya sıvı nitrojen çözülükten sonra farklılaşma verimliliğinin azaldığı bildirilmiştir (18).

2007 yılında Mehra ve ark., çalışmalarında 3T3-L1 hücrelerinin farklılaşma oranlarının düşük olmasıyla ilgili benzer problemlerle karşılaştıklarında, 3T3-L1 adiposit farklılaşmasındaki değişkenliğin hücre kültür kaplarına büyük ölçüde bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Hem kültür kabı sağlayıcısı (yani plastik yüzeyin malzemesi ve/veya işlenmesi) hem de tabak tipi (örn. 35 mm petri veya 6 kuyulu plaka) 3T3-L1 farklılaşması için çok önemli faktörler olduğu açığa çıkarılmıştır. Yazarlar, optimal kültür kaplarının seçilmesiyle yaklaşık %80'lik bir farklılaşma düzeyi elde edebildiklerini bildirmişlerdir (20). Çalışmamızda Corning (Costar, Corning Inc., USA) marka petri kültür kapları kullandığımızda hücre yapışmalarında başarı oranımızın arttığı gözlemlenmiştir. Bu literatür bilgileri ışığında çalışmalarımızda benzer sorunlar görülmüş ve çözümü için birçok parametre değiştirilerek optimal deney sürecine ulaşılmıştır. Farklılaşmanın başarısı özellikle hücrelerin yapışarak büyüdükleri yüzeyi oluşturan hücre kültür kabı (flask ve well plate) gibi laboratuvar malzemelerinin kalitesinden ve el manüplasyonundan etkilenmektedir. Etkili bir farklılaşma için çalışmaların düşük pasaj sayılarında yapılması gerekmektedir. Çalışma amacına uygun kültür kabı kullanılmalı ve ekim yapılacak hücre sayısına, hücre dondurma protokolüne, sıvı azotta depolamaya ATCC protokolünde belirtildiği şekilde dikkat edilmesi gerekmektedir. Hücrelerin bulunduğu yüzeyden ayrılmamaları için el uygulamaları dikkatli bir şekilde yapılmalı, ortam değişimi esnasında hücre kültür kabının kenarından hücre temasının olmadığı bölgeden olabilecek en düşük hızla besi yeri eklenmelidir (10).

Sonuçlarımız obezitenin hücresel ve moleküler mekanizmalarına ilişkin ileri çalışmalara temel oluşturacak protokol yöntemleri içermekte ve özellikle 3T3-L1 hücrelerini fark-

lılaştırma protokolünü kullanan araştırmacıların laboratuvar çalışmalarında karşılaşılabilecekleri zorluklar için önemli ipuçları sunmaktadır.

Teşekkür

Yok.

Yazar Katkı Beyanı

Yazarların katkıları eşit düzeydedir. Sorumlu yazar olarak Yase-min Soysal yayın sürecini yürütmüştür.

Çıkar Çatışması

21-22 Kasım 2023 tarihlerinde 2. Uluslararası Spor ve Sağlık Araştırmaları Kongresi'nde sözlü sunumu çevrimiçi platformda yapmıştır. Bu bildiri metni ile ilgili herhangi bir kurum, kuruluş, kişi ile mali çıkar çatışması yoktur ve yazarlar arasında çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Finansal Destek

Bu çalışma 222S104 proje numarası ile TÜBİTAK ve TDK-2022-2810 proje numarası ile DEÜ BAP tarafından desteklenmektedir.

Etik Kurul Oluru

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurul Karar No: 2021/02-71 ve Tarih:18.01.2021.

Hakemlik Süreci

Kör hakemlik süreci sonrası yayına uygun bulunmuştur.

KAYNAKLAR

- Torres-Carot V, Suárez-González A, Lobato-Foulques C. The energy balance hypothesis of obesity: do the laws of thermodynamics explain excessive adiposity? *Eur J Clin Nutr.* 2022;76(10):1374-1379.
- Başkent H, Çin NNA, Bayraktaroğlu T, Barut F. Obezite Yönetiminde Adipoz Doku Kahverengileşmesi. *Türkiye Diyabet ve Obezite Dergisi.* 2023;7(1):81-91.
- Ghaben AL, Scherer PE. Adipogenesis and metabolic health. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(4):242-258.
- Meldrum DR, Morris MA, Gambone JC. Obesity pandemic: causes, consequences, and solutions-but do we have the will?. *Fertil Steril.* 2017;107(4):833-839.
- Derosa G, Maffioli P. Anti-obesity drugs: a review about their effects and their safety. *Expert Opin Drug Saf.* 2012;11(3):459-471.
- Ahima RS, Lazar MA. Physiology. The health risk of obesity—better metrics imperative. *Science.* 2013;341(6148):856-858.
- Bak EJ, Park HG, Kim JM, Kim JM, Yoo YJ, Cha JH. Inhibitory effect of evodiamine alone and in combination with rosiglitazone on in vitro adipocyte differentiation and in vivo obesity related to diabetes. *Int J Obes (Lond).* 2010;34(2):250-260.
- Khalilpourfarshbafi M, Gholami K, Murugan DD, Abdul-Sattar MZ, Abdullah NA. Differentialeffects of dietaryflavonoids on adipogenesis. *Eur J Nutr.* 2019;58(1):5-25.
- Armani A, Mammi C, Marzolla V, Calanchini M, Antelmi A, Rosano GM, Fabbri A, Caprio M. Cellular models for understanding adipogenesis, adipose dysfunction, and obesity. *J Cell Biochem.* 2010;110(3):564-572.

10. Zhao X, Hu H, Wang C, Bai L, Wang Y, Wang W, Wang J. A comparison of methods for effective differentiation of the frozen-thawed 3T3-L1 cells. *Anal Biochem.* 2019;568:57-64.
11. Gregoire FM. Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Exp Biol Med (Maywood).* 2001;226(11):997-1002.
12. Legeza B, Balázs Z, Odermatt A. Fructose promotes the differentiation of 3T3-L1 adipocytes and accelerates lipid metabolism. *FEBS Lett.* 2014;588(3):490-496.
13. Melo RC, D'Ávila H, Bozza PT, Weller PF. Imaging lipid bodies within leukocytes with different light microscopy techniques. *Methods Mol Biol.* 2011;689:149-161.
14. Kraus NA, Ehebauer F, Zapp B, Rudolphi B, Kraus BJ, Kraus D. Quantitative assessment of adipocyte differentiation in cell culture. *Adipocyte.* 2016;5(4):351-358.
15. Poulos SP, Dodson MV, Hausman GJ. Cell line models for differentiation: preadipocytes and adipocytes. *Exp Biol Med (Maywood).* 2010;235(10):1185-1193.
16. Hua Y, Ke S, Wang Y, Irwin DM, Zhang S, Wang Z. Prolonged treatment with 3-isobutyl-1-methylxanthine improves the efficiency of differentiating 3T3-L1 cells into adipocytes. *Anal Biochem.* 2016;507:18-20.
17. Liu X, Liu XN, Li TJ, Liu B. Research Progress of the Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes into Mature Adipocytes. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao.* 2017;39(5):727-731.
18. Zebisch K, Voigt V, Wabitsch M, Brandsch M. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Anal Biochem.* 2012;425(1):88-90.
19. Sakoda H, Ogihara T, Anai M, Funaki M, Inukai K, Katagiri H, Fukushima Y, Onishi Y, Ono H, Fujishiro M, Kikuchi M, Oka Y, Asano T. Dexamethasone-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is due to inhibition of glucose transport rather than insulin signal transduction. *Diabetes.* 2000;49(10):1700-1708.
20. Mehra A, Macdonald I, Pillay TS. Variability in 3T3-L1 adipocyte differentiation depending on cell culture dish. *Anal Biochem.* 2007;362(2):281-283.