



Farklı Hücre Hatlarında Besiyeri ve FBS'in Hücre Proliferasyonu Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi

Murat IHLAMUR*¹, Buşra AKGÜL¹, Emrah Şefik ABAMOR¹

¹Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, 34230, İstanbul, Türkiye

*yazışılan yazar e-posta: ihlamurmurat@gmail.com

(Alınış / Received: 24.04.2021, Kabul / Accepted: 03.01.2022, Yayınlanma / Published: 27.05.2022)

Öz: Hücre kültürü, laboratuvar şartlarında hücrelerin canlılığının ve proliferasyonunun devam ettirilmesi için oluşturulan yapay, steril bir ortamdır. Bu yapay ortam şartlarında, hücrelerin büyümelerinin desteklenmesi amacıyla besiyerine ek olarak fetal bovine serum (FBS) gibi hücre proliferasyonunu artırıcı maddeler de eklenmektedir. Hücreler uygun besiyeri ve FBS oranı kullanıldığı takdirde daha etkili bir şekilde proliferere olabilmektedir. Bu çalışmada, farklı besiyeri çeşitlerinin (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), RPMI-1640, DMEM High-Glucose ve DMEM/F12) ve farklı FBS oranlarının (%0, %5, %10, %15, %20, %25) belirlenen hücre hatlarındaki (L929, J774, Arpe-19, RVECs, AU-565, MCF-7, HEK293T) hücre proliferasyonuna etkileri incelendi. Hücre canlılık analizleri MTT testi ile yapıldı. MTT testi sonuçlarına göre belirlenen hücre hatlarının proliferere olacağı en uygun besiyeri çeşidi ve kullanılacak FBS oranları belirlendi. Bu çalışmayla birlikte, belirtilen hücre hatlarının birçok besiyeri çeşidinde ve farklı FBS oranlarında proliferere olabileceği gözlemlenmiştir. Elde edilen veriler dikkate alındığında, farklı hücre hatlarında optimum hücre proliferasyonun gerçekleştiği besiyeri çeşidi ve maliyeti yüksek ürünlerden biri olan FBS'in optimum hücre proliferasyonunu sağladığı ideal düzeydeki kullanım oranları saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Hücre Kültürü, Besiyeri, FBS, MTT, Proliferasyon

Investigation of the Effects of Medium and FBS on Cell Proliferation in Different Cell Lines

Abstract: Cell culture is an artificial, sterile environment created to maintain the viability and proliferation of cells under laboratory conditions. In these artificial environment conditions, in addition to the medium, cell proliferation enhancing substances such as Fetal bovine serum (FBS) are added to support the growth of cells. Cells can proliferate more effectively if appropriate medium and FBS ratio are used. In this study, it was determined that different media types (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), RPMI-1640, DMEM High-Glucose and DMEM/F12) and different FBS ratios (0%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%) effects on cell proliferation in determined cell lines (L929, J774, Arpe-19, RVECs, AU-565, MCF-7, HEK293T) were examined. Cell viability analyzes were performed with the MTT test. According to the results of the MTT test, the most suitable medium type on which the cell lines will proliferate and the FBS ratios to be used were determined. With this study, it was determined that the specified cell lines could proliferate in many media types and at different FBS ratios. When cell studies are carried out considering the study data, the production of cells will be carried out using the most effective medium type for different cell lines and the FBS ratio at which optimum cell proliferation occurs. In this way, it is aimed to produce cells by using FBS, which is one of the most costly products in cell studies, at the most ideal level.

Key words: Cell Culture, Medium, FBS, MTT, Proliferation

1. Giriş

Hücre kültürü, laboratuvar koşullarında belirli ısı, nem, sıcaklık ve besin ortam şartlarında çok hücreli organizmaların yaşatılması ve proliferasyonunun sağlanması olarak tanımlanmaktadır [1]. Hücre kültürü laboratuvarında yapay bir çoğalma ortamında hücresel büyümeyi desteklemek amacıyla bazı cihazlar kullanılmaktadır. Hücrelerin büyüme ortamında; besiyerinin türü ve miktarı, serum kaynağı; içeriği ve miktarı, CO₂, nem, ozmolarite ve pH hücreler için önemli parametrelerdendir [2]. Hücre kültürü ilaç geliştirilmesi, aşı çalışmaları ve *in vitro* sitotoksitesite çalışmalarında kullanılmaktadır [3].

Hücre kültürü ortamları, hücresel büyümeyi desteklemek için belirlenmiş bileşenlerin ve besinlerin bir kombinasyonundan oluşmaktadır. Bu büyüme ortamı besiyeri olarak da adlandırılmaktadır. Kullanılan besiyerleri hücre tiplerine ve hücre hatlarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Hücre kültüründe genel olarak DMEM, RPMI-1640, DMEM High-Glucose, DMEM/F12 vb. besiyerleri kullanılmaktadır [4]. Hücre kültürü ortamında amino asitler, vitaminler, karbonhidratlar, inorganik tuzlar, tamponlama sistemleri, hormonlar, enzim inhibitörleri, elementler, serum ve antibiyotikler gibi bileşenler bulunmaktadır. Kültür ortamlarında kullanılan bu bileşenlerden biri olan hem esansiyel hem de esansiyel olmayan amino asitler, hücre canlılığını ve büyüme hızını arttırmaktadır. Canlı hücreler için enerji kaynağı olarak glikoz, galaktoz, fruktoz veya maltoz gibi karbonhidratlar besiyerinde bulunmaktadır. Hücrelerin membran potansiyelini ve ozmolaritesini düzenlemek amacıyla da inorganik tuzlar kullanılmaktadır. Hücrelerin büyümesi için demir, potasyum, magnezyum ve çinko gibi elementlere de ihtiyaç duyulmaktadır. Besiyerinin pH'sını dengelemek amacıyla da Tampon çözeltileri kullanılmaktadır. Kullanılan antibiyotikler ise hücre kültüründe meydana gelebilecek kontaminasyonları engellemektedir. Hücre kültür ortamını en çok etkileyen materyallerden biri olan serumlar da vitaminleri, büyüme faktörleri ve inhibitörleri, hormonları, proteaz inhibitörlerini, amino asitleri, karbonhidratları, lipitleri, vitaminleri, eser elementleri, mineralleri ve hücresel büyüme için gerekli olan bileşenleri içerir. Serum olarak genellikle sığır serumu (FBS) yaygın olarak kullanılmaktadır. FBS'in içeriği tam olarak bilinmemekle birlikte hücre proliferasyonunda etkisi yüksektir. FBS miktarları ve kullanılan besiyeri çeşidi hücre canlılığında önemli bir etken olarak bilinmektedir [5-7]. Buna ek olarak serum, ortamın pH tamponlama kapasitesini geliştirmeye ve pipet manipülasyonu ve karıştırmanın neden olduğu fiziksel hasarı azaltmaya yardımcı olur [8].

FBS'in hücre kültüründe kullanılan at ve buzağı serumlarına göre büyüme faktörleri açısından daha zengin olduğu bilinmektedir. Ayrıca daha düşük seviyede γ -globulin (hücre büyüme inhibitörlerinden biri) içermektedir [9, 10]. Yıllar geçtikçe artan talep, yüksek fiyat, kompozisyonda gelen ürünlerdeki değişkenlik ve artan etik kaygılar gibi birçok dezavantaj FBS'e alternatif kaynak arayışına yol açmıştır [11]. Geçmişte sığır göz sıvısı [12], serisin proteinleri [13], insan trombosit lizatı [14], solucanlardan alınan sölomik sıvı [15] gibi birkaç yaklaşım önerilmiş ve kullanılmıştır. Ancak her birinin FBS gibi dezavantajları olmuştur. Ayrıca hiçbiri FBS kadar yaygın olarak kullanılmamıştır. Birçoğu FBS ile karşılaştırılabilir performans iddia etmesine rağmen, uzun vadeli hücre büyümesine destekleri ve hücre fenotipi üzerindeki etkileri ortaya konmamıştır [16, 17]. Bundan dolayı hücre kültürü çalışmalarında FBS'in dezavantajları olmasına rağmen sıklıkla kullanılmaktadır. Fakat FBS'in maliyetinin yüksek olması en büyük dezavantajdır. Bundan dolayı hücre kültür çalışmalarında en az FBS oranı kullanılarak hücre proliferasyonunun gerçekleştirilmesi istenmektedir.

Bu çalışmanın amacı belirlenen hücre hatlarında (L929, J774, Arpe-19, RVECs, AU-565, MCF-7, HEK293T) farklı besiyeri çeşitlerinin ve farklı FBS oranlarının hücre proliferasyonuna etkilerinin incelenmesi ve hücre hatları için en uygun besiyeri çeşidinin ve FBS oranlarının belirlenmesidir. Ayrıca gerçekleştirilen optimizasyon çalışmalarında, yapılacak hücre kültürü çalışmaları için belirlenen oranlar kullanıldığı takdirde hücreler için en ideal FBS ve besiyerinin seçilerek hücrelerin üretileceği öngörülmektedir.

2. Materyal ve Metot

2.1 Hücre kültürü

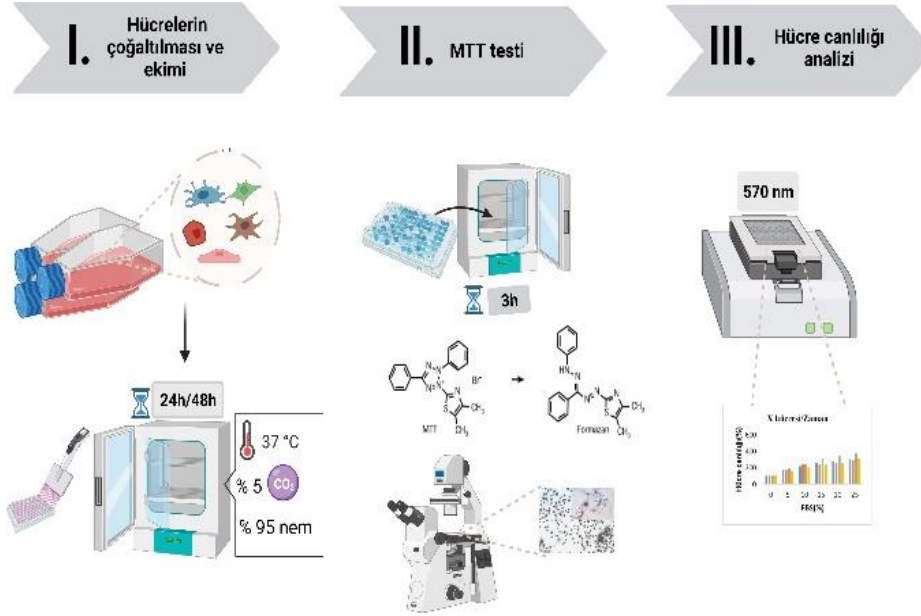
Yapılan çalışmada laboratuvarındaki kriyobankta bulunan fare fibroblast hücre hattı (L929), fare makrofaj hücre hattı (J774), retina epitel hücre hattı (Arpe-19), retinal vasküler endotelial hücre hattı (RVECs), insan meme kanseri hücre hattı (AU-565), insan meme kanseri kök hücre hattı (MCF-7) ve insan böbrek dokusu hücre hattı (HEK 293T) kullanıldı. Hücrelerin proliferasyonu için DMEM (Gibco), RPMI-1640 (Gibco), DMEM High Glucose (Gibco), ve DMEM/F12 (Gibco) medyumları kullanıldı. Stok medyumlar %1'lik penisilin– streptomisin ve %1'lik L-glutamin eklenerek hazırlandı. Fetal bovine serum (FBS) (Sigma) ise deneysel aşamada medyumlara eklendi. Çalışmada kullanılan hücre hatlarının pasaj sayıları 10. ile 15. arasındadır.

Deneysel süreçte hücreler 37 °C sıcaklık, %95 nem ve %5 CO₂ inkübasyon şartlarında tutuldu. %80-90 konflüente ulaştıktan sonra hücreler enzimatik olarak (L929, Arpe-19, RVECs, AU-565, HEK293T) ve fiziksel muamele (J774) ile toplanarak 25 °C, 1000 rpm'de 5 dk süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak pellet kısmında kalan hücrelerin üzerine 1 ml besiyeri eklenerek Thoma lamında hücre sayımı gerçekleştirildi. Çalışmada her hücre hattı için 4 farklı medyum (DMEM, RPMI-1640, DMEM High-Glucose ve DMEM/F12) kullanılarak %0, 5, 10, 15, 20 ve 25 FBS oranlarında medyumlar hazırlandı. 96 kuyulu plaklarda kuyu başına 1x10⁵ hücre/ml olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirildi. Oluşturulan kültür ortamlarına ekilen hücreler inkübasyon şartlarında 24 saat ve 48 saat tutuldu (Şekil 1).

2.2 MTT testi

37 °C sıcaklık, %95 nem ve %5 CO₂ inkübasyon şartlarında 24 saat ve 48 saat inkübasyon süresi sonunda hücre canlılığı analizi için MTT testi yapıldı. 96 kuyucuklu mikroparka üzerindeki her bir kuyucuğa 10 µl MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) solüsyonu ilave edildi. 96 kuyucuklu mikroparkalardaki hücreler karanlık ortamda, 37 °C' de 3 saat süreyle inkübe edildi. Inkübasyon sonrası MTT solüsyonu içeren sıvılar aspire edilerek ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra her bir kuyucuğa oda sıcaklığında 100 µl dimetilsülfoksit (DMSO) ilave edildikten sonra 96 kuyucuklu mikroparkalar 30 dk karanlık ortamda tutuldu. Formazan kristallerinin tamamen çözünmesi ile mikroparka ELISA okuyucusuna yerleştirildi. Örnekler 570 nm dalga boyunda ölçülerek hücre canlılığı analizi gerçekleştirildi (Şekil 1). Her deney grubu için üç tekrarlı çalışıldı ve elde edilen verilerin ortalaması alındı. Hücre canlılığı analiz verileri Denklem 1 kullanılarak elde edildi ve veri grafikleri oluşturuldu.

$$\text{Hücre canlılığı (\%)} = \left(\frac{\text{Örnek absorbanı}}{\text{Kontrol absorbanı}} \right) * 100 \quad (1)$$



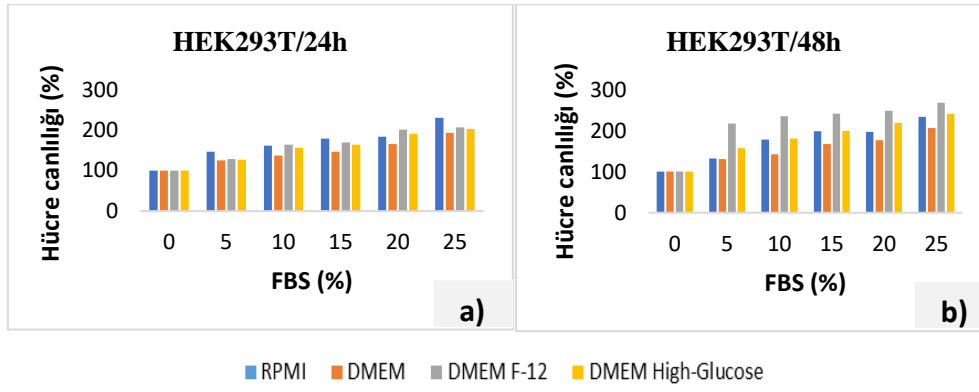
Şekil 1. Hücre kültürü ve MTT testi süreci

3. Bulgular ve Tartışma

Çalışmada 7 farklı hücre hattının 24. ve 48. saatlerinde farklı FBS oranları ve farklı besiyeri çeşitleri ile hücrelerin proliferasyon yüzdeleri grafiklerde gösterilmiştir. Hücrelerin proliferasyon yüzdeleri, pozitif kontrol grubunun değeri %100 olarak kabul edildiğinde, diğer gruplarda basit oran hesabı ile elde edilen % değeridir ve canlı hücre oranını belirtmektedir. Hücrelerin uzun süreli olarak üretilmesinde 48 saatlik verilerin kullanılması faydalı olacağı düşünülmektedir. Ayrıca %20-25 FBS oranının uygulandığı hücrelerde morfolojik bozulmalar görüldüğü için bu değerler tartışmada dikkate alınmamıştır. Deney sonucunda elde edilen veriler dikkate alındığında, *in vitro* çalışmalarda sık kullanılan bazı hücre hatlarında optimum hücre proliferasyonunun gerçekleşmesi için belirlenen besiyeri çeşidi ve FBS oranları aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 1).

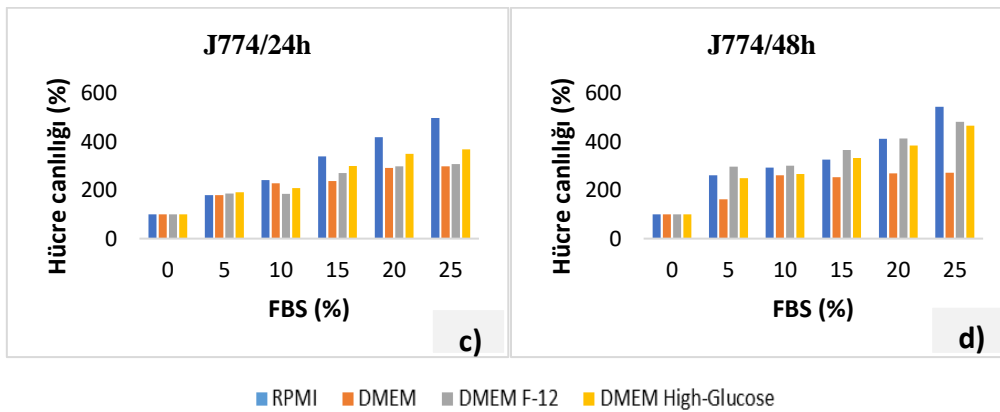
Tablo 1. Optimum hücre proliferasyonu için belirlenen besiyeri çeşidi ve FBS oranları

Hücre Hattı	Besiyeri Çeşidi	FBS Oranı
HEK 293T	DMEM/F12	%10-15
J774	RPMI-1640	%10-15
L929	DMEM High-Glucose	%10-15
Arpe-19	DMEM/F12	%15-20
RVECs	DMEM/F12	%15-20
AU-565	DMEM/F12	%15-20
MCF-7	DMEM High-Glucose	%15-20



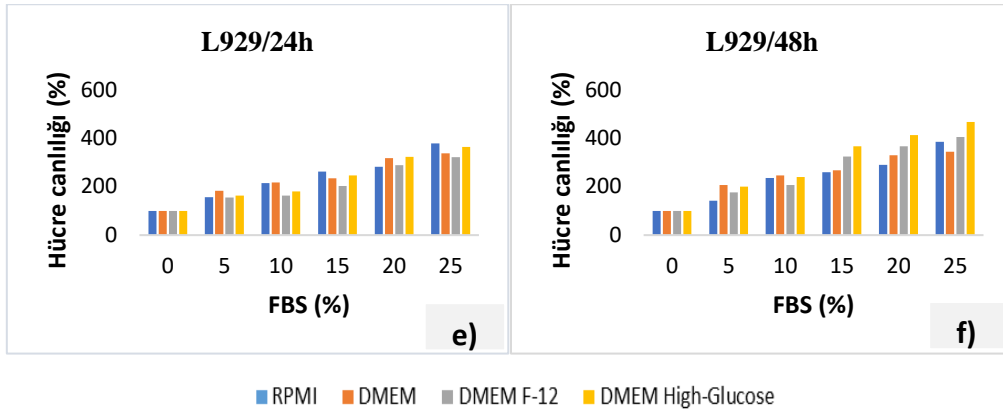
Şekil 2. RPMI, DMEM, DMEM F-12 ve DMEM High-Glucose besiyerleri ile %0, %5, %10, %15, %20 ve %25 FBS oranlarının HEK 293T hücre hattında hücre canlılığına etkisinin (%) MTT analizi sonucu elde edilen veri grafikleri a) ve b) HEK 293T hücre hattının sırasıyla 24h ve 48h veri grafikleri

Literatürde HEK 293T hücre hattı için genellikle %10 FBS içeren DMEM besiyerinin kullanıldığı çalışmalara rastlanmaktadır [18, 19]. Bu çalışmada HEK293T hattının 24 ve 48 saatlik kültür sürecinde maksimum hücre proliferasyonu sırasıyla %25 FBS içeren RPMI-1640 ve %25 FBS içeren DMEM/F12 büyüme ortamında gözlemlenmiştir (Şekil 2). HEK 293T hücreleri proliferasyon ile birlikte morfolojik olarak değerlendirildiğinde en verimli hücre yapılarının elde edildiği büyümüş ortamı %10-15 oranında FBS içeren DMEM/F12 besiyeri olarak belirlenmiştir (Tablo 1).



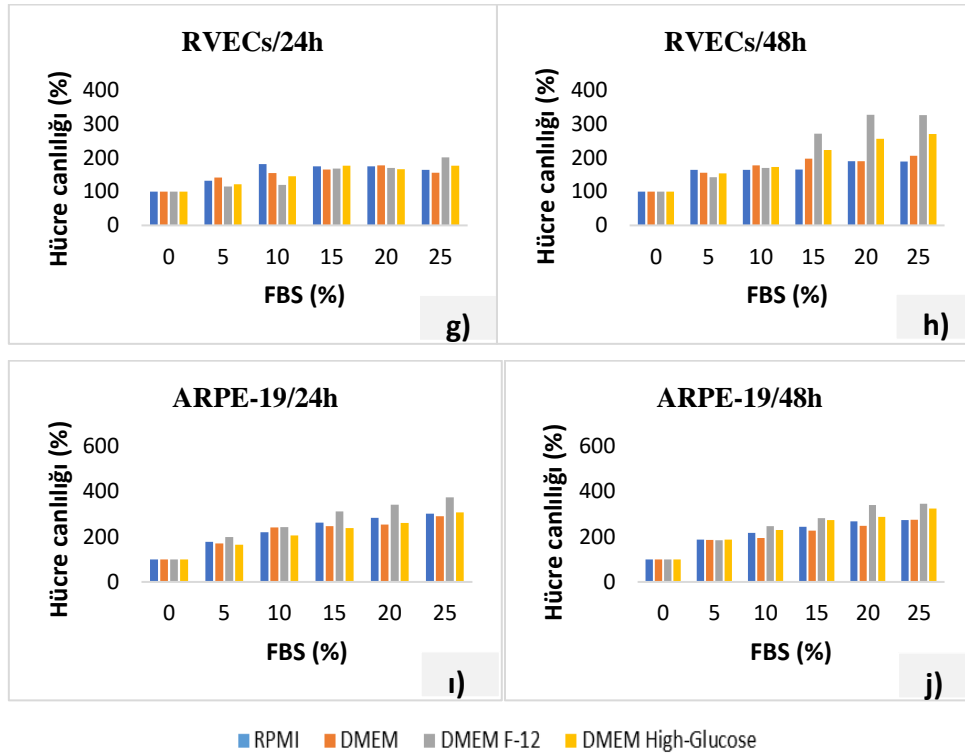
Şekil 3. RPMI, DMEM, DMEM/F-12 ve DMEM High-Glucose besiyerleri ile %0, %5, %10, %15, %20 ve %25 FBS oranlarının J774 hücre hattında hücre canlılığına etkisinin (%) MTT analizi sonucu elde edilen veri grafikleri c) ve d) J774 hücre hattının sırasıyla 24h ve 48h için veri grafikleri

J774 hücre hattının proliferasyonu için genel olarak %10 FBS oranında DMEM besiyeri kullanılmaktadır [20, 21] Yapılan çalışmada J774 hücrelerinde hem 24 hem de 48 saatlik kültür sürecinde en yüksek verim RPMI-1640 besiyerinde ve %25 FBS oranı ile alınmıştır (Şekil 3). J774 makrofaj hücre hattı için en verimli proliferasyon ortamının RPMI-1640 besiyerinde %10-15 oranında FBS kullanılması ile gerçekleşebileceği söylenebilir (Tablo 1). Literatür ile karşılaştırıldığında yapılan çalışmada J774 makrofaj hücre hattı için en uygun besiyeri çeşidi farklılık göstermektedir. Literatürde belirtilen DMEM besiyeri makrofaj hücre hattında proliferasyonu sağlamasına rağmen RPMI-1640 besiyerine göre daha az hücre üremesini sağlamıştır. %10-15 FBS oranında ise hücrelerin iki besiyerinde de etkili bir şekilde proliferasyon olduğu görülmektedir.



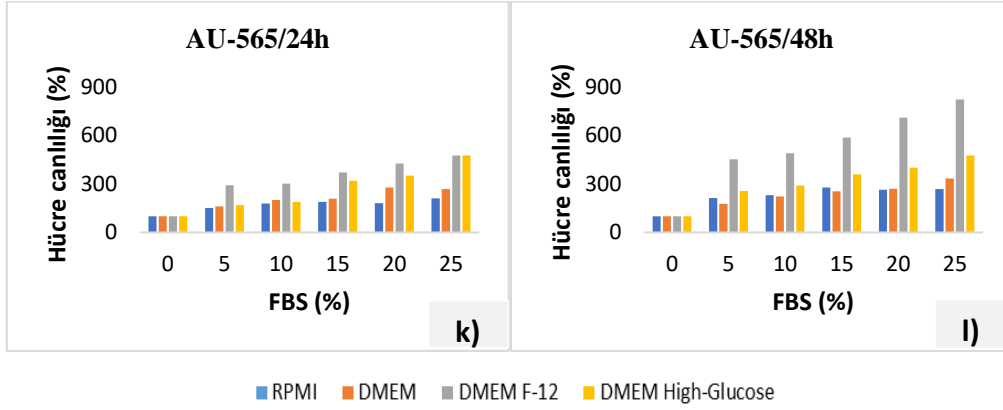
Şekil 4. RPMI, DMEM, DMEM/F-12 ve DMEM High-Glucose besiyerleri ile %0, %5, %10, %15, %20 ve %25 FBS oranlarının L929 hücre hattında hücre canlılığına etkisinin (%) MTT analizi sonucu elde edilen veri grafikleri **e)** ve **f)** L929 hücre hattının sırasıyla 24h ve 48h için veri grafikleri

Literatürdeki çalışmalarda L929 hücre hattı için %10 FBS içeren EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) besiyerinin kullanıldığı bildirilmiştir [22]. Bununla birlikte EMEM besiyeri haricinde MEM ve DMEM gibi farklı besiyeri çeşitlerinin de kullanıldığı çalışmalar mevcuttur [23, 24]. Yapılan çalışmada EMEM besiyerine alternatif olabilecek en ideal besiyeri belirlenmeye çalışılmıştır. Buna göre, L929 hücre hattında en yüksek verim 24 saatte RPMI-1640 besiyeri ve %25 FBS oranının, 48 saatte ise en yüksek verim DMEM High-Glucose besiyerinde %25 FBS oranının kullanıldığı büyüme ortamında elde edilmiştir (Şekil 4). Bundan dolayı literatürde L929 hücre hattı için kullanılan EMEM besiyerine alternatif olarak en verimli proliferasyon ortamının, DMEM High-Glucose besiyerinde %10-15 oranında FBS kullanılması ile gerçekleştirilebileceği söylenebilir (Tablo 1).



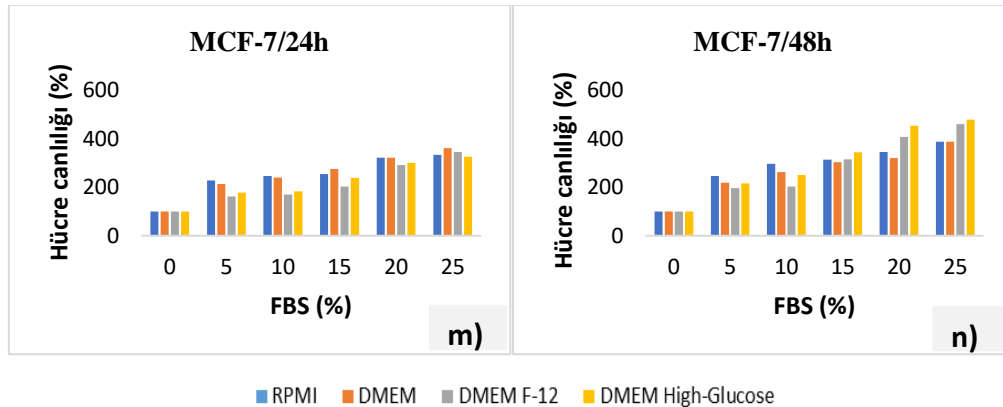
Şekil 5. RPMI, DMEM, DMEM/F-12 ve DMEM High-Glucose besiyerleri ile %0, %5, %10, %15, %20 ve %25 FBS oranlarının RVECs ve ARPE-19 hücre hatlarında hücre canlılığına etkisinin (%) MTT analizi sonucu elde edilen veri grafikleri **g)** ve **h)** RVECs hücre hattının sırasıyla 24h ve 48h için veri grafikleri **i)** ve **j)** ARPE-19 hücre hattının sırasıyla 24h ve 48h için veri grafikleri

RVECs hücre hattında büyüme ortamı olarak genellikle %10 FBS oranında DMEM besiyeri, Arpe-19 hücre hattında ise %10 FBS oranında DMEM/F12 besiyerinin bulunduğu büyüme ortamları kullanılmaktadır [25, 26]. Bu çalışmada RVECs ve Arpe-19 hücre hattında 24 saatte en yüksek verim DMEM/F12 besiyerinde ve %25 FBS oranıyla, 48 saatte ise DMEM/F12 besiyerinde %15-20 FBS oranı ile alınmıştır (Şekil 5). Bununla birlikte, RVECs ve Arpe-19 hücre hattı için en verimli proliferasyon ortamının DMEM/F12 besiyerinde %15-20 oranında FBS kullanılması ile gerçekleştirilebileceği söylenebilir (Tablo 1).



Şekil 6. RPMI, DMEM, DMEM/F-12 ve DMEM High-Glucose besiyerleri ile %0, %5, %10, %15, %20 ve %25 FBS oranlarının AU-565 hücre hattında hücre canlılığına etkisinin (%) MTT analizi sonucu elde edilen veri grafikleri **k)** ve **l)** AU-565 hücre hattının sırasıyla 24h ve 48h için veri grafikleri

AU-565 hücre hattı için genel olarak %10 FBS içeren RPMI-1640 besiyeri kullanılmaktadır [27]. Bu çalışmada AU-565 hücre hattı için 24 saatte en yüksek verim DMEM/F12 besiyerinde ve %25 FBS oranıyla, 48 saatte DMEM/F12 besiyerinde %25 FBS oranı ile elde edilmiştir (Şekil 6). Ayrıca AU-565 hücre hattı için en verimli proliferasyon ortamının DMEM/F12 besiyerinde %15-20 oranında FBS kullanılması ile gerçekleştirilebileceği belirlenmiştir (Tablo 1). RPMI-1640 besiyeri ile kıyaslandığında DMEM/F12 besiyerinin AU-565 hücre hattında daha çok hücre proliferasyonu sağladığı gözlemlenmiştir.



Şekil 7. RPMI, DMEM, DMEM/F-12 ve DMEM High-Glucose besiyerleri ile %0, %5, %10, %15, %20 ve %25 FBS oranlarının MCF-7 hücre hattında hücre canlılığına etkisinin (%) MTT analizi sonucu elde edilen veri grafikleri **m)** ve **n)** MCF-7 hücre hattının sırasıyla 24h ve 48h veri grafikleri

MCF-7 hücre hattı için büyüme ortamı olarak genellikle %10 FBS oranında EMEM besiyeri ve EMEM haricinde diğer besiyeri çeşitlerinin de kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır [28, 29]. Bu çalışmada EMEM besiyeri kullanılmamış olup bu besiyerinin yerine kullanılacak, ideal bir besiyeri çeşidinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MCF-7 hücrelerinde 24 saatte en yüksek verim DMEM besiyerinde ve %25 FBS oranı ile 48 saatte ise en yüksek verim DMEM High-Glucose besiyerinde %25 FBS oranı ile elde edilmiştir (Şekil 7). Ayrıca MCF-7 hücre hattı için en verimli proliferasyonun DMEM High-Glucose besiyeri ve %15-20 FBS oranının kullanıldığı büyüme ortamı ile sağlanabileceği belirlenmiştir (Tablo 1).

4. Sonuç ve Yorum

Bu çalışma, hücre kültürü çalışmalarında sık kullanılan bazı hücre hatlarının optimum verimlilikte proliferasyon olmaları için besiyeri çeşitlerini ve FBS oranlarını belirlemeyi amaçlamaktadır. Literatürde her hücre hattı için en uygun besiyeri ortamları ile ilgili veriler bulunmaktadır. Fakat laboratuvar çalışmalarında bu besiyeri ortamlarının proliferasyon edebilme etkileri farklılık göstermektedir. Kullanılan FBS oranlarına bağlı olarak da hücrelerin proliferasyon yüzdeleri değişmektedir. Çalışmamızda kullanılan hücrelerin seçilme nedeni laboratuvar çalışmalarında sıklıkla kullanılmaları ve çalışılan besiyerlerinde proliferasyon olabilmeleridir. Yapılan bu çalışma bazı hücre hatlarının optimum büyüme koşullarının oluşturulması için kullanılacak olan besiyeri çeşitleri ve FBS oranları hakkında hücre kültürü alanında yeni çalışmaya başlayacak kişiler için bir fikir niteliği taşımaktadır.

Yapılan çalışmada, kullanılan FBS oranı arttıkça daha yüksek hücre canlılığı elde edilmektedir. Fakat yüksek FBS oranlarında hücrelerin proliferasyonu yüksek olsa da hücre morfolojilerinde bozulmalar göstermesi ve FBS'in maliyetinin çok yüksek olması bu oranlarda hücrelerin proliferasyonu için FBS kullanımını zorlaştırmaktadır. Ayrıca güncel piyasada, FBS fiyatlarının medyumların fiyatlarından çok yüksek olması, serumların hayvandan elde edilmesi aşamasında yaşanan etik sorunlar ve üretim aşamasında stabiliteye dayalı sorunlar nedeniyle hücre proliferasyonunun sağlanması için en ideal FBS oranları istenmektedir. Bundan dolayı hücre kültürü çalışmalarında hücre proliferasyonunun gerçekleştiği optimum FBS oranlarının belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Aynı zamanda hücrelerin proliferasyonunu etkileyen diğer etkenlerden biri de besiyerleridir. Her besiyeri çeşidi her hücre hattı için uygun olmayabilir. Bundan dolayı bu çalışmada genel olarak hücre hatları için uygun olan 4 besiyeri çeşidi kullanılmıştır. Literatürde hücreler için en uygun besiyeri çeşitleri belirtilmiş olsa da laboratuvar çalışmalarında hücre hatları için farklı besiyeri çeşitleri de kullanılmaktadır. Yapılan bu çalışmada literatürde hücre hatları için belirlenen besiyerlerine alternatif olarak kullanılacak besiyeri çeşitleri de belirlenmiştir.

Sonuç olarak hücrelerin morfolojik yapıları bozulmadan hücre proliferasyonunun sağlanmasında, hücre hattına bağlı olarak büyüme ortamında kullanılan besiyeri çeşidi (RPMI, DMEM, DMEM/F-12 ve DMEM High-Glucose) ve FBS oranı (%0, %5, %10, %15, %20 ve %25) büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada da laboratuvar çalışmalarında kullanılan HEK293T, J774, L929, RVECs, ARPE-19, AU-565 ve MCF-7 hücre hatlarının optimum hücre proliferasyonunun gerçekleştiği besiyeri çeşidi ve FBS oranları MTT testi ile % hücre canlılığı üzerinden belirlenmiştir. Bu çalışmayla birlikte elde edilen veriler dikkate alındığında bu hücre hatlarının kullanılacağı hücre büyüme ortamlarını hazırlamada en uygun besiyeri ve FBS oranı kullanıldığı takdirde optimum hücre proliferasyonuna ulaşılabileceği gözlemlenmiştir. Sonuç olarak elde

edilen veriler hücre kültürü çalışmalarında görev alan araştırmacılara hücre üretim süreçlerinde kolaylık sağlayacaktır.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyanı

Murat IHLAMUR: Araştırma, Deneysel Süreçleri Yürütme, Taslak Yazımı
Buşra AKGÜL: Araştırma, Taslak Yazımı, Görselleştirme
Emrah Şefik ABAMOR: Doğrulama, İnceleme ve Düzenleme

Destek ve Teşekkür Beyanı

Bu çalışmanın yazarları olarak herhangi bir destek ve teşekkür beyanımız bulunmadığını bildiririz.

Çatışma Beyanı

Bu çalışmanın yazarları olarak herhangi bir çatışma beyanımız bulunmadığını bildiririz.

Etik Kurul Onayı ve/veya Aydınlatılmış Onam Bilgileri

Bu çalışmanın yazarları olarak herhangi bir etik kurul onayı ve/veya aydınlatılmış onam bilgileri beyanımızın bulunmadığını bildiririz.

Kaynakça

- [1] D.E. Lynn, *Encyclopedia of insects*. Academic Press, 2009, ch 39.
- [2] C. Eskes, A.C. Boström, G. Bowe, S. Coecke, T. Hartung, G. Hendriks D. Pamies, A. Piton, and C. Rovida, "Good cell culture practices & in vitro toxicology," *Toxicology in Vitro*, 45, 272-277, 2017.
- [3] D.F. Gilbert and M. Boutros, "A protocol for a high-throughput multiplex cell viability assay," *Methods Mol Biol.*, 1470, 75-84, 2016.
- [4] T. Ackermann, and S. Tardito, "Cell culture medium formulation and its implications in cancer metabolism," *Trends in Cancer*, 5(6), 329-332, 2019.
- [5] C.P. Segeritz, and L. Vallier, *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. Academic Press, 2017, ch 9.
- [6] M.A. Schwartz, G. Both, and C. Lechene, "Effect of cell spreading on cytoplasmic pH in normal and transformed fibroblasts," *Proc Natl Sci U S A*, 86(12), 4525-4529, 1989.
- [7] C.E. Jochems, J.B. Valk, F.R. Stafleu, V. Baumans, "The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem," *Altern Lab Anim*, 30(2), 219-227, 2002.
- [8] T. Yao and Y. Asayama, "Animal-cell culture media: history, characteristics, and current issues," *Reprod. Med. Biol.*, 16(2), 99-117, 2017.
- [9] T. Yao and Y. Asayama, "Human preimplantation embryo culture media: past, present, and future," *J. Mamm. Ova Res.*, 33(1), 17-34, 2016.
- [10] G. Gstraunthaler, T. Lindl and J. Van Der Valk, "A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media," *Cytotechnology*, 65(5), 791-793, 2013.
- [11] J.V. der Valk, K. Bieback, C. Buta, B. Cochrane, W.G. Dirks, J. Fu, J.J. Hickman, C. Hohensee, R. Kolar, M. Liebsch, F. Pistollato, M. Schulz, D. Thieme, T. Weber, J. Wiest, S. Winkler and G. Gstraunthaler, "Fetal Bovine Serum (FBS): Past-Present-Future," *Altex*, 35(1), 99-118, 2018.
- [12] P. Pazos, M. Boveri, A. Gennari, J. Casado, F. Fernandez and P. Prieto, "Culturing cells without serum: lessons learnt using molecules of plant origin," *Altex*, 21(2), 67-72, 2004.
- [13] T.T. Cao and Y.Q. Zhang, "Viability and proliferation of L929, tumour and hybridoma cells in the culture media containing sericin protein as a supplement or serum substitute," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 99(17) 7219-7228, 2015.
- [14] Z. Wei, A.O. Batagov, D. R. Carter and A. M. Krichevsky, "Fetal Bovine Serum RNA interferes with the cell culture derived extracellular RNA," *Sci Rep*. 6(1), 1-6, 2016.
- [15] A. Wojdani, E.A. Stein, L.J. Alfred and E.L. Cooper, "Mitogenic effect of earthworm (*Lumbricus terrestris*) coelomic fluid on mouse and human lymphocytes," *Immunobiology*, 166(2), 157-167, 1984.
- [16] S. Johnston and C. Siegel, "Comparison of a serum replacement (Omni Serum) and fetal bovine serum in cell cultures used to isolate herpes simplex virus from clinical specimens," *J Clin Microbiol.*, 28(4), 643-645, 1990.

- [17] D.R. Dahling and B.A. Wright, "Comparison of fortified calf serum, serum substitutes and fetal calf serum with or without extenders for propagation of cell cultures for virus plaque assays," *J Virol Methods.*, 27(3), 287–294, 1990.
- [18] S.Y. Gong, D. Chatterjee, J. Richard, J. Prévost, A. Tauzin, R. Gasser, Y. Bo, D. Vézina, G. Goyette, G. Gendron-Lepage, H. Medjahed, M. Roger, M. Côté and A. Finzi, "Contribution of single mutations to selected SARS-CoV-2 emerging variants spike antigenicity," *Virology.*, 563, 134-145, 2021.
- [19] J.M. Termini, Z.A. Silver, B. Connor, A. Antonopoulos, S.M. Haslam, A. Dell and R.C. Desrosiers, "HEK293T cell lines defective for O-linked glycosylation," *PLoS One*, 12(6), e0179949, 2017.
- [20] C. Perdomo, E. Aguilera, I. Corvo, P. Faral-Tello, E. Serna, C. Robello, S.R. Wilkinson, G. Yaluff and G. Alvarez, "Preclinical Studies in Anti-Trypanosomatidae Drug Development," *Pharmaceuticals*, 14(7), 644, 2021.
- [21] J. Lam, M. Herant, M. Dembo and V. Heinrich, "Baseline mechanical characterization of J774 macrophages," *Biophys J.*, 96(1), 248-254, 2009.
- [22] E. Jablonská, J. Kubásek, D. Vojtěch, T. Ruml and J. Lipov, "Test conditions can significantly affect the results of in vitro cytotoxicity testing of degradable metallic biomaterials," *Sci Rep.*, 11(1), 1-9, 2021.
- [23] V. Cannella, R. Altomare, V. Leonardi, L. Russotto, S. Di Bella, F. Mira and A. Guercio, "In Vitro Biocompatibility Evaluation of Nine Dermal Fillers on L929 Cell Line," *Biomed Res Int.*, 2020.
- [24] M. Xu, C. Cai, X. Sun, W. Chen, Q. Li and H. Zhou, "Clnk plays a role in TNF-alpha-induced cell death in murine fibrosarcoma cell line L929," *Biochem Biophys Res Commun.*, 463(3), 275-279.
- [25] T. Hirase, J.M. Staddon, M. Saitou, Y. Ando-Akatsuka, M. Itoh, M. Furuse, K. Fujimoto, S. Tsukita and L.L. Rubin, "Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells," *J Cell Sci.*, 110(4), 1603-1613, 1997.
- [26] E. Fasler-Kan, N. Aliu, K. Wunderlich, S. Ketterer, S. Ruggiero, S. Berger and P. Meyer, "The retinal pigment epithelial cell line (ARPE-19) displays mosaic structural chromosomal aberrations," *Cellular Heterogeneity.*, 305-314, 2018.
- [27] S.S. Bacus, K. Kiguchi, D. Chin, C.R. King and E. Huberman, "Differentiation of cultured human breast cancer cells (AU-565 and MCF-7) associated with loss of cell surface HER-2/neu antigen," *Mol Carcinog.*, 3(6), 350-362, 1990.
- [28] J.J. Kim, W. Liang, C.C. Kang, M.D. Pegram and A.E. Herr, "Single-cell immunoblotting resolves estrogen receptor- α isoforms in breast cancer," *PLoS One*, 16(7), e0254783, 2021.
- [29] A. Booms, G.A. Coetzee and S.E. Pierce, "MCF-7 as a model for functional analysis of breast cancer risk variants," *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 28(10), 1735-1745, 2019.