

Araştırma Makalesi

Mersin Üniv Sağlık Bilim Derg 2020;13(3):331-338

doi:10.26559/mersinsbd.771704

HT22 hücre hattının farklılaşma karakterinin koloni canlılık testi ile sınanması

 Nail Can Öztürk

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi AD

Öz

Amaç: Bu çalışmanın amacı hali hazırda çeşitli nörodejeneratif hastalıkların modellenmesinde kullanılmakta olan HT22 hücre hattının nörogenез modeli olarak da kullanılabilirliğinin koloni canlılık testi ile sınanmasıdır. **Yöntem:** Yalnızca HG-DMEM medyumunu ile muamele edilen hücreler kontrol grubu (K), 24 saat HG-DMEM medyumda bırakıldıktan sonra sırasıyla 24, 48 ve 72 saat B27+ katkılı NB+ medyumunu ile inkübe edilen hücreler ise grup 1 (G1), grup 2 (G2) ve grup 3 (G3) olarak belirlenmiştir. Tüm gruplar daha sonra %0.5'lik kristal violet ile boyanarak görüntülenmiştir. Elde edilen görüntülerden koloni sayımı yapılarak hücre canlılık oranları tayin edilmiş ve istatistiksel analiz gerçekleştirilmiştir. **Bulgular:** Tüm gruplar arasındaki koloni canlılık oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır ($p<0.0001$). Farklılığın yönü, kontrol grubuna kıyasla deney gruplarındaki düşüş eğilimi olmakla birlikte; grup 1 ile grup 2 ve grup 3 birbirleriyle karşılaştırıldığında gözlenen azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0.0001$). Ancak grup 2 ve grup 3 arasında farklılık görülmemiştir ($p=0.254$). **Sonuç:** Özetle, HT22 hücre hattının nörogenез modeli olarak kullanılabilirliği basit ve ucuz bir yöntem ile sınırlı düzeyde olsa da sınanmıştır. Bu çalışmada uygulanan farklılaştırma protokolü kullanılarak hücrelerel farklılaşmanın değişik basamaklarını temsil eden faktörler gen ve/veya protein ekspresyonu seviyesinde de test edilebilirse, HT22 hücrelerinin yaygın biçimde nörogenез modeli olarak kullanılabilirliği ortaya çıkarılabilir.

Anahtar kelimeler: HT22, hipokampus, nörogenез, nöronal farklılaşma, koloni canlılık testi

Yazının geliş tarihi: 20.07.2020

Yazının kabul tarihi: 25.09.2020

Sorumlu Yazar: Nail Can Öztürk, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi AD, Çiftlikköy Kampüsü, PK. 33110, Tel: 0324 36100001(29055), E-posta: nail.ozturk@mersin.edu.tr

Testing the differentiation character of HT22 cell line via colony survival assay

Abstract

Aim: The aim of this study is to test the feasibility of HT22 cell line, which is in a current use in the modeling of various neurodegenerative diseases, as a neurogenesis model by colony survival assay. **Method:** Group of cells treated with HG-DMEM medium was designated as control group (K) while equivalent counterparts upon the same treatment that subjected to NB + medium supplemented with B27+ for 24 (G1), 48 (G2), and 72 hours (G3), respectively. All groups were then imaged by staining with 0.5% crystal violet under inverted microscope. Cell viability rates were determined by counting the colonies from the visuals obtained and statistical analysis was performed. **Results:** A statistically significant difference in colony viability rates between different groups was evident ($p < 0.0001$). The direction of difference was in a decrement trend in the experimental groups compared to the control group ($p < 0.0001$). However, when the two individual experimental groups (G2 vs G3) were compared, there was no significance ($p = 0.254$). **Conclusion:** In summary, feasibility the use of HT22 cell line as a neurogenesis model has been tested in the current study, albeit limited, by a simple and inexpensive method. If the factors representing the different stages of cellular differentiation can also be tested at the gene and / or protein expression level using the differentiation protocol used in this study, the availability of HT22 cells as a neurogenesis model will be better revealed.

Keywords: HT22, hippocampus, neurogenesis, neuronal differentiation, colony survival assay

Giriş

Nörogenez, genel tanım olarak nöral kök hücrelerin bir seri çoğalma ve farklılaşma basamaklarına girerek olgun nöronlara dönüşmesi olarak tanımlanabilir.¹ İntra-uterin yaşamda oldukça hızlı gerçekleşen nöron üretim döngüsünün doğumla birlikte yavaşladığı ve yaşamın ilerleyen kısımlarında beynin sadece iki tabakasında sınırlandığı anlaşılmıştır.²⁻⁵ Bu iki alandan birinin hipokampus'un (HP) gyrus dentatus'undaki subgranüler tabakası olduğu bilinmektedir. Bu tabakada gerçekleşen çoğalma, farklılaşma ve olgunlaşma gibi hücrel basamakları kapsayan nörobiyolojik döngüye Erişkin Hipokampal Nörogenez (EHN) adı verilmektedir.⁶⁻⁹

Nöron üretimini farklı açılardan inceleyen çok sayıda araştırmacı, nörogenez çalışmaları altında bir kulvar oluşturmuştur. Konuya ait geniş bir yelpazedeki sorular, in-vivo araştırmalarının yanı sıra hücre kültürü ortamında icra edilen in-vitro çalışmalarla da önemli ölçüde cevaplanabilmektedir. Nörobiyolojik araştırmalar için kullanılan insan, fare ve sıçan dokularından elde edilerek ölümsüzleştirilmiş birçok hücre

hattı bulunmaktadır.¹⁰ Fare HP dokusundan elde edilmiş HT22 hücreleri de söz konusu hücre hatlarından birisi olarak kabul edilebilir. Glutamat'a olan aşırı duyarlılığından dolayı HT22 hücreleri, Alzheimer, Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklarda oluşan glutamat sitotoksitesini modellemek için kullanılmaktadır.^{11,12} Fakat, EHN ile nöron üretim merkezlerinden biri olan HP'den elde edilmiş HT22 hücre hattının nöral farklılaşma modeli olarak kullanılması yok denecek kadar azdır.^{13,14}

Çalışmamızda, HT22 hücre hattı, ticari bir nöral farklılaştırma medyumuna farklı süreler tabi tutularak, hücrelerin zamanla bu medyum içerisinde canlı kalabilme durumları koloni canlılık yöntemi kullanılarak sınanmıştır.

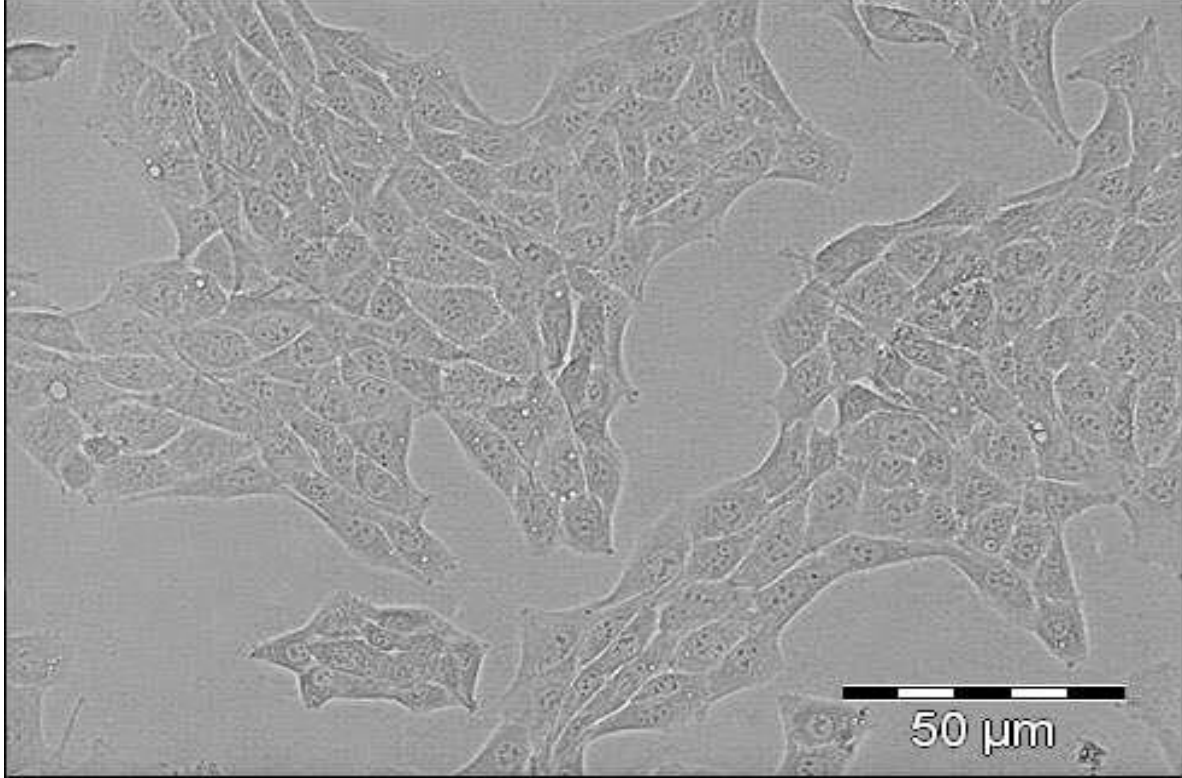
Yöntem

Hücre Kültürü

HT4 hücrelerinin subklonu olarak, nöronal özelliklere sahip, ölümsüzleştirilmiş fare hipokampal hücre hattı olarak üretilen HT22 hücreleri, üretici firması olan MERCK'in talimatları doğrultusunda kültüre edilmiştir (Katolog No: SCC129).¹⁵ Buna

göre, hücreler %10 fetal sıgır serum (fetal bovine serum, FBS, (Katolog No: ES-009-B), 2mM L-glutamin (Katolog No: TMS-002-C) ve %1 penisilin-streptomisin (Katolog No: TMS-AB2-C) içeren yüksek-glikozlu DMEM medyumla (HG-DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium, Sigma, Katolog No: D6546), %5 CO₂ içeren ve 37 °C sıcaklıktaki

inkübatörde kültüre edilmiştir. 2-3 günde bir medyumları (katkılı medyum) değişen hücreler, %70 konfluent olduğunda tripsin-EDTA ile (Katolog No: SM-2003-C), 37 °C sıcaklıkta muamele edilerek, 1/10 oranında pasajlanmıştır. Tüm deneyler için 7. pasajdaki (P7) hücreler kullanılmıştır (Resim 1).

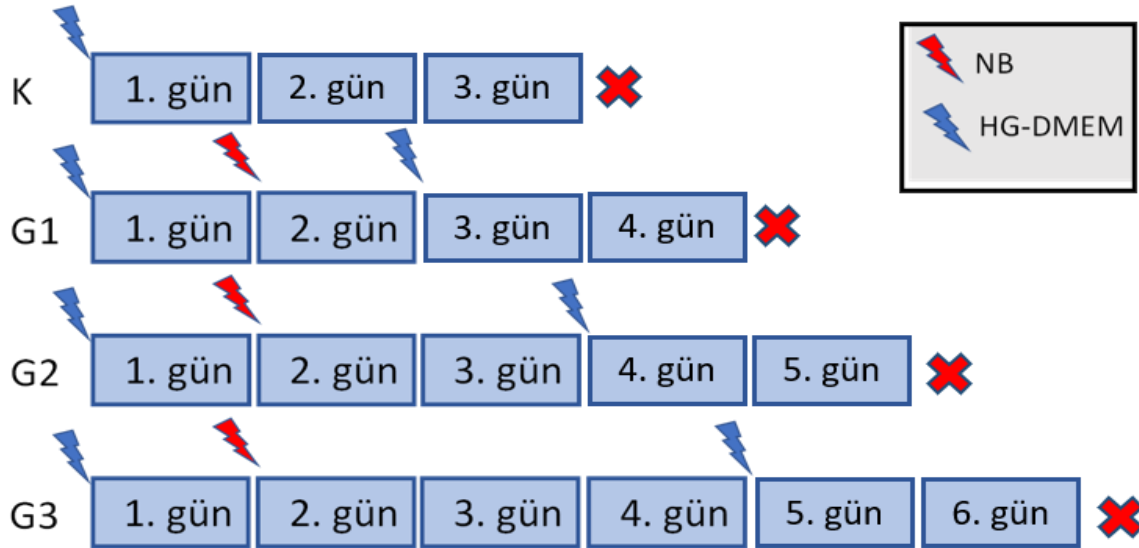


Resim 1. HT22 (fare hipokampal) hücre hattının genel morfolojisi, 200X.

Hücre canlılık testi

Hücre canlılık testi için uygulanan yöntem Franken ve ark.'nın¹⁶ yaptığı çalışma modifiye edilerek tasarlanmıştır. Kısaca, hücreler kuyucuk başına 500 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu petrilere katkı HG-DMEM medyumunda ekilip bir gece boyunca tutunmaları için beklenmiştir. Ertesi gün, kontrol (K) grubu dışındaki grupların medyumları B27+ katkısı (Katolog No: A3582801, Gibco™, 50X) içeren Nörobazal+ (NB+) medyum (NB, Katolog No: A3582901, Gibco™) ile değiştirilmiştir. İlk gruptaki hücreler (G1) 24 saat, ikinci gruptaki hücreler (G2) 48 saat ve üçüncü gruptaki hücreler (G3) ise 72 saat boyunca bu

farklılaştırma medyumunu ile muamele edilmiştir. Bu sürelerin sonunda, farklılaştırma medyumları uzaklaştırılmış ve hücrelerin medyumları eski medyumları ile değiştirilip (katkılı HG-DMEM) bir kolonide 50'den fazla sayıda koloni oluşana kadar beklenmiştir (2 gün). Deney tasarımı anlatan şematik görünüm Şekil 1'de verilmiştir. Bu süreçte hücreler, %5 CO₂ içeren ve 37°C sıcaklıktaki inkübatörde kültüre edilmiştir. Koloni oluşumu gözlemlendikten sonra hücreler %0.5'lik kristal violet (KV, Katolog No: C0775, Sigma-Aldrich) ile boyanmıştır. Daha sonrasında koloni sayımı yapılarak koloni canlılık oranları (%) tayin edilmiştir.



Şekil 1. Deney tasarımının şematik gösterilmesi. HG DMEM (yüksek glikoz katkılı-high glucose, DMEM), NB+ medyum, kontrol (K), G1 (1. grup), G2 (2. grup), G3 (3. grup), deneyin sonlandırılması (kırmızı çarpı).

İstatistiksel analiz

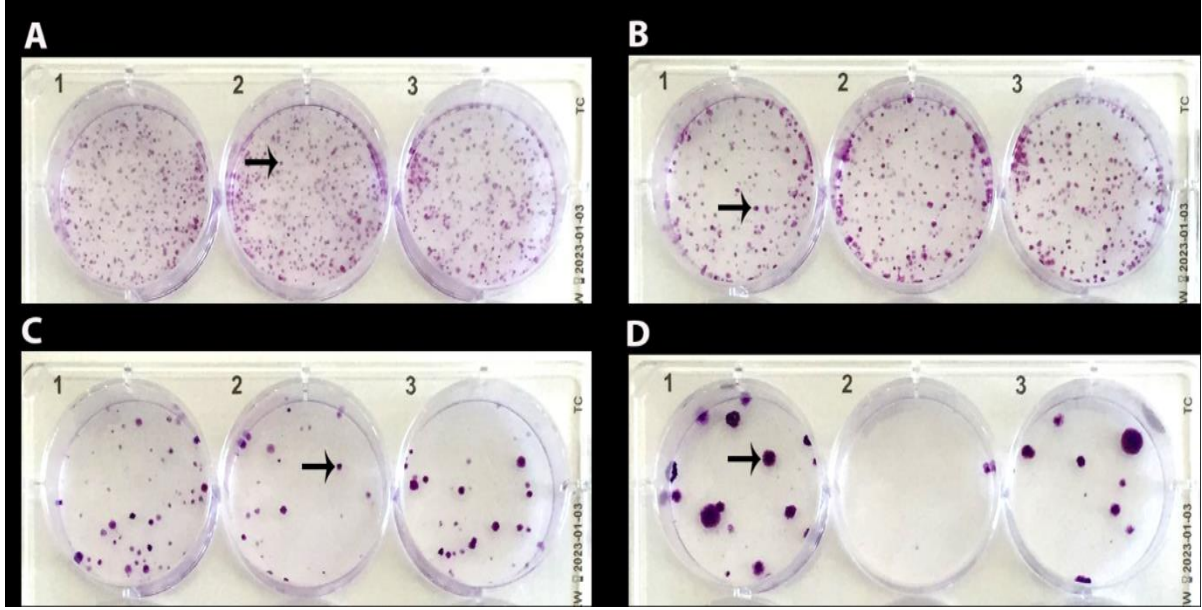
Verilerin her grupta normal dağılıma uygun olup olmadığı Shapiro Wilk testi ile değerlendirilmiştir. Çalışmadan elde edilen veriler için tanımlayıcı istatistik olarak ortalama ve standart sapma değerleri verilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak bir farklılık olup olmadığını anlamak için parametrik One Way ANOVA testi uygulanmıştır. One Way ANOVA testi tüm gruplar arasında anlamlı bir farklılık olduğunu ($p=0.0002$) göstermiştir. Bu anlamlılığın hangi ikili gruplar arasındaki farklılıktan kaynaklandığını tespit etmek için ise LSD posthoc testi gerçekleştirilmiştir. Verilerin analizi IBM Statistics paket programının deneme sürümünde gerçekleştirilmiş ve istatistik anlamlılıkta $p<0.05$ olarak kabul edilmiştir.

Bulgular

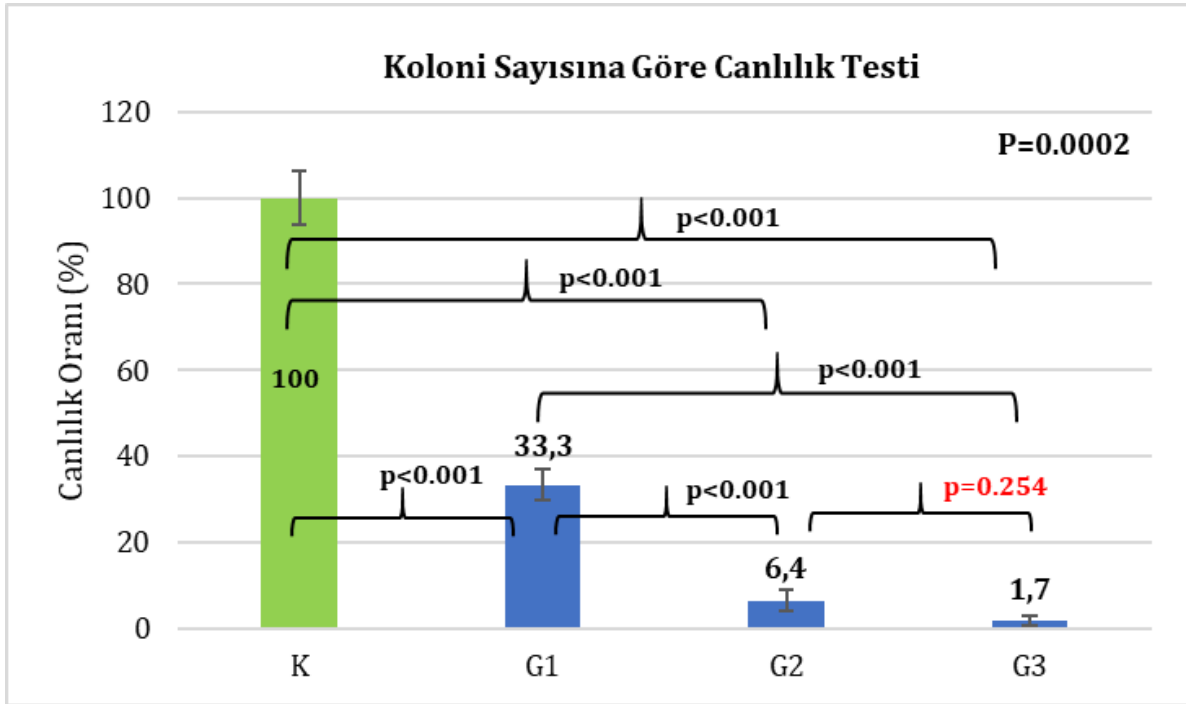
Standart katkılı HG-DMEM medyumuna ekilip koloni oluşana kadar bekletilen grup (K) ve standart katkılı HG-DMEM medyumuna ekilip hücreler tutunana kadar beklendikten sonra bu medyum uzaklaştırılıp yerine nöral farklılaşma

medyumunu olan B27+ katkılı NB+ ile sırasıyla 24 saat (G1), 48 saat (G2) ve 72 saat (G3) muamele edilip, bu sürelerin sonunda farklılaştırma medyumunu uzaklaştırılıp, yerine yeniden katkılı HG-DMEM medyumunu ilave edildikten ve koloni oluşumu gözlenip koloni canlılık testine tabi tutulan HT22 hücrelerini içeren 6'lı kuyucuklu petripler (grup başına üç kuyucuk) sırasıyla Resim 2'de verilmiştir.

Değişik süreler boyunca farklılaştırma medyumunda tutulan hücre grupları (Resim 2B-D) kontrol grubu (Resim 2A) ile çoklu olarak karşılaştırıldığında, canlılık oranı açısından istatistiksel olarak farklılık tespit edilmiştir ($p<0.0001$) (Şekil 2). Farklılığın yönü, kontrol grubuna kıyasla deney gruplarındaki düşüş eğilimi olmakla birlikte; 24 saat farklılaştırma medyumunda tutulan hücreler ile 48 ve 72 tutulan hücre grupları ayrı ayrı birbirleriyle karşılaştırıldığında gözlenen azalmanın da istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0.0001$) (Şekil 2). Ancak 48 saat ve 72 saat farklılaştırma grupları arasındaki canlılık oran farkında istatistiksel olarak anlamlılık görülmemiştir ($p=0.254$) (Şekil 2).



Resim 2. Hücre canlılık testi sonucu 6'lı kuyucuklu petrilere ait kolonilerin görünümü. Kontrol grubu (A); 24; 48 ve 72 saat B27+ katkılı NB+ medyumunu ile inkübe edilen G1 (B); G2 (C) ve G3 (D) gruplarına ait HT22 hücre kolonileri (siyah oklar) görülmektedir (%0,5'lik kristal violet).



Şekil 2. Canlı koloni sayısına göre analiz edilen yüzdesel canlılık oranı grafiği. Yalnızca HG-DMEM medyumunda bırakılan K grubu ve 24, 48 ve 72 saat B27+ katkılı NB+ medyumunu ile inkübe edilen G1, G2 ve G3 gruplarına ait HT22 hücre koloni canlılık oranlarına ait değişim grafiği görülmektedir. Çoklu gruplar arasında yapılan One Way ANOVA testi sonucu grafiğin üst sağ köşesinde verilmiştir ($p=0.002$). İkili gruplar arasındaki LSD post hoc testi değerleri ise ikili grafik barları arasındaki parantez işaretlerinin üzerinde belirtilmiştir.

Tartışma

Erişkin nörogenez alanında günümüze dek yayınlanan bilimsel makale sayısı 10.000'li sayılara ulaşmış ve özellikle 2016-2019 yılları arasındaki yayın hacminin bile yaklaşık 2500 kadar olduğu bildirilmiştir.^{17,18} Bu bilgi, nörogenez ve onun temel alt kulvarı olan nöral farklılaşma ile ilgili konulara ne kadar ilgili duyulduğunu ortaya koymaktadır. Bu konularda soruların standart biçimde cevaplanmasında ölümsüzleştirilmiş hücre hatlarının rolü büyüktür. Bu bağlamda, nörogenez'in erişkin beyinde sınırlandığı iki bölgeden biri olan HP'den köken alan ölümsüzleştirilmiş HT22 hücre hattının neden yaygın bir nöral farklılaşma modeli olarak kullanılmadığı halen soru işaretidir.

Literatür incelendiğinde HT22 hücre hattını nöral farklılaşma modeli olarak kullanılabilirliğini sınavan yalnızca iki araştırma olduğu gözlenmiştir.^{13,14} Sınırlı sayıdaki bu literatür örneklerinde, HT22 hücrelerinin 24-48 saat boyunca N2 takviyesi içeren NB medyumuna ile muamele edildiğinde aktif kolinerjik nöronlarda gözlenen faktörleri eksprese ettiği bildirilmiştir.^{13,14} Bu bilgilere dayanarak ilgili araştırma ekipleri, farklılaştırma ortamına alınan HT22 hücrelerinin, farklılaştırılmamış HT22 hücrelerine kıyasla daha iyi bir HP modeli ve ayrıca kolinerjik faktörleri sentez etmeleri açısından da iyi bir Alzheimer hastalığı modeli olabileceği önermesinde bulunmuşlardır.^{13,14} Bahsedilen iki çalışmada farklılaştırma protokolüne alınan HT22 hücrelerinin kolinerjik özellikler gösterdiğine dair bulgular heyecan verici olsa da sadece bu bilgiler üzerinden nöral farklılaşma veya olgunlaşmanın derecesini anlamak güçtür. Oysaki, nöral farklılaşma sırasında veya sonucunda olgunlaşan nöronların sentez etmesi gereken altın standart değerindeki NeuN, Map2, B-tubulin vb. nöron spesifik proteinlerin ekspresyonları ne morfolojik (immünohistokimyasal) ne de Western-Blot gibi immün-fenotipik yöntemlerle desteklenmemiştir. Bu tip nöron spesifik olgunlaşma faktörlerinin HT22 hücre hattında eksprese olduğunu gösteren bir

araştırmaya da rastlanmamıştır. Eğer, HT22 hücrelerinin nöron spesifik olgunlaşma faktörlerini de sentez edip etmediği sinanabilir ve olumlu belirtiler gözlenebilirse HT22 hücreleri çok daha yaygın biçimde nöral farklılaştırma modeli olarak kullanılabilir.

Öte yandan, çalışmamızda kullanılan B27+ katkılı NB+ ya da bunların bir önceki ticari nesli olan sade B27 katkılı NB medyumları, nöral farklılaştırma amacıyla ticari olarak kullanılan besi yerleridir.^{19,20} Çalışmamızda HT22 hücrelerinin zamana bağlı olarak B27+ katkılı NB+ medyumuna verdiği tepki ölçülerek, bu medyumun HT22 hücrelerinin farklılaştırılması için uygunluğu en temel anlamda sınanmıştır. Bu amaçla, nöral farklılaştırma çalışmalarında daha önce hiç kullanılmamış ve aynı zamanda oldukça basit bir yöntem olan koloni canlılık testi uygulanmıştır. Koloni canlılık testi, kültürde kullanılan kuyuya ya da petriye tutunan hücrelerden kaç tanesinin koloni oluşturduğunu histokimyasal boyalarla tespit edebilmek üzerine tasarlanmış bir metottur.¹⁶ Bu yöntem genellikle farklı doz radyasyon ya da ilaç uygulamalarına maruz bırakılan hücrelerin, söz konusu uygulamalar sonrasında koloni oluşturabilme yeteneklerini ölçmek için kullanılmaktadır.^{16,21,22}

Çalışmamızda, ana medyum olan HG-DMEM'de 24 saat kaldıktan sonra 24, 48 ve 72 saat nöral farklılaştırma medyumuna tabi tutulan gruplardaki koloni sayısı; sadece HG-DMEM medyumunda tutulan kontrol grubunda oluşan koloni sayısı ile kıyaslandığında, K'den G1 ve G3'e doğru gidildikçe istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır (Şekil 2). Bu eğiliminin ne anlama geldiğini doğru biçimde yorumlamak kritik öneme sahiptir. Örneğin, G2 ile G3 kıyaslandığında, koloni sayısının %33.3'ten %6.4'e kadar düşmesi; G1'deki hücrelerin farklılaştırma medyumuna 24 saat daha maruz bırakıldıklarında canlı kalabilme ya da koloni oluşturma yeteneklerinin 4.2 kat azaldığını işaret etmektedir. Öte yandan, koloni sayısı ifadesi kullanıldığında, ilk etapta, tutunan bir

hücrenin en azından 50 adet hücre içeren bir topluluk oluşturma kapasitesi akla gelmektedir. HT22 hücre hattının ölümsüzleştirilmiş olduğu düşünüldüğünde, bu sayı teorik olarak sınırsız olabilir. Fakat in-vivo nöral farklılaşma mekanizmaları düşünüldüğünde, proliferasyona uğrayan hücre sayısı ve devamında farklılaşan hücre sayısı arttıkça, proliferasyonun yavaşlaması, farklılaşma evresini tamamlayıp post-mitotik olgun nöronlar oluştuğunda ise proliferasyonun tekrar artması biçiminde nöral kök hücre havuzu koruyucu doğal bir denge olduğu düşünülmektedir.^{6,23} Buna göre, farklılaştırma medyumuna maruz kaldıkça hücrelerin canlı halde kalabilmeleri yani koloni oluşturabilme yeteneklerinin azalması nöral farklılaşmanın ilerlediği anlamına gelebilir. Ya da canlı koloni kavramı sayı değil de büyüklük açısından irdelenecek olursa, oluşan kolonilerin kapladıkları alan büyüklüğü analiz edilebilir. Koloni canlılık testinden elde edilen bilgiler hücresel farklılaşmayla ilgili başkaca faktörler açısından da desteklenebilirse (immünohistokimya, western blot, flow sitometri vb. yöntemlerle) araştırma soruları daha ayrıntılı biçimde cevaplanabilir.

Sonuç olarak çalışmamızda, literatürde zaten başkaca modellerin oluşturulması için kullanılmakta olan HT22 hücre hattının bir nöronal farklılaşma modeli olarak kullanılabilirliği basit ve ucuz bir yöntem ile test edilmiştir. Ek olarak çalışmamızda uygulanan farklılaştırma protokolü uygulandığında, hücresel farklılaşmanın farklı basamaklarını temsil eden faktörler, gen ve/veya protein ekspresyonu seviyesinde de test edilebilirse, HT22 hücrelerinin yaygın biçimde nörogenez modeli olarak kullanılabilirliği ortaya çıkarılmış olacaktır.

Teşekkür

HT22 hücre hattı Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD. öğretim üyesi, Prof. Dr. Betül Karademir tarafından, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı'na hediye olarak verilmiştir.

Yazar katkısı: Yazar, yazıya tüm kısımlarda (makaledeki çalışmanın planlanması ve yapılması, makalenin yazımı ve revize edilmesi, makalenin son halinin kabul edilmesi) katkı vermiştir.

Çıkar çatışması: Yazarın çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Mali destek: Çalışma, Mersin Üniversitesi BAP birimi tarafından desteklenmiştir (Proje no:2018-1-AP4-2875).

Kaynaklar

1. Rakic P. Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in *Macacus rhesus*. *J Comp Neurol*. 1971; 141:283-312.
2. Altman J, ve Das G Post-Natal Origin of Microneurons in the Rat Brain. *Nature* 1965;207: 953-956.
3. Altman J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology*. 1969; 137(4):433-457.
4. Eriksson P, Perfilieva E, Björk-Eriksson T., Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA., Gage FH., Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 1998; 4:1313-1317.
5. Lois C ve Alvarez-Buylla A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. **Science** 1994; 264(5162): 1145-1148.
6. Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends in Neuroscience*. 2004; 27(8): 447-452.
7. Noonan M, Bulin SE, Fuller DC, Eisch J. Reduction of Adult Hippocampal Neurogenesis Confers Vulnerability in an

- Animal Model of Cocaine Addiction. *Journal of Neuroscience*. 2010; 30(1):304-315.
8. Aimone J.B., Deng W, Gage FH. Resolving New Memories: A Critical Look at the Dentate Gyrus, Adult Neurogenesis, and Pattern Separation. *Neuron*. 2011;70(4): 589-596.
 9. Sahay A, Scobie KN, Hill AS et al. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature*. 2011; 472: 466-470.
 10. Gordon J, Amini S ve White MK. General Overview of Neuronal Cell Culture. *Neuronal Cell Culture, Methods in Molecular Biology Book Series*. New York, Springer Science+Business Media, 2013: 1-8.
 11. Wang C, Cai X, Hu W et al. Investigation of the neuroprotective effects of crocin via antioxidant activities in HT22 cells and in mice with Alzheimer's disease. *Int J Mol Med* 2019;43: 956-966.
 12. Park JS, Park JH, Kim KY, Neuroprotective effects of myristargenol A against glutamate-induced apoptotic HT22 cell death. *RSC Adv.*, 2019;9:31247-31254.
 13. Liu J, Li L, Suo W. HT22 hippocampal neuronal cell line possesses functional cholinergic properties. *Life Sciences* 2009; 84(9-10): 267-271.
 14. He M, Liu J, Cheng S, Xing Y, Suo WZ. Differentiation renders susceptibility to excitotoxicity in HT22 neurons. *Neural Regen Res*. 2013;8(14):1297-1306.
 15. Davis JB ve Maher P. Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line. *Brain Res* 1994; 652(1): 169-173.
 16. Franken N, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, Bree CV. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols* 2006; 1(5): 2315-2319.
 17. Lipp HP ve Bonfanti L. Adult Neurogenesis in Mammals: Variations and Confusions. *Brain Behav Evol* 2016; 87:205-221.
 18. Kempermann G. Environmental enrichment, new neurons and the neurobiology of individuality. *Nat Rev Neurosci*. 2019; 20:235-245.
 19. Hogins J, Crawford DC, Zorumski CF, Mennerick S. Excitotoxicity Triggered by Neurobasal Culture Medium. *PLoS ONE* 2011;6(9): e25633.
 20. Kuijlaars J, Oyelami T, Diels, A. et al. Sustained synchronized neuronal network activity in a human astrocyte co-culture system. *Sci Rep* 2016;6: 36529.
 21. Munshi A, Hobbs M, Meyn RE. Clonogenic cell survival assay. *Methods Mol Med*. 2005;110: 21-8.
 22. Kabakov AE ve Gabai LV. Cell Death and Survival Assays. *Methods Mol Med*. 2018;1709: 107-127.
 23. Chang DS, Lasley FD, Das IJ. Mendonca M.S., Dynlacht J.R. *Basic Radiotherapy Physics and Biology*, New York, Springer Science+Business Media, 2014: 211-219.
 24. Abbott LC ve Nigussie F. Adult neurogenesis in the mammalian dentate gyrus. *Anat Histol Embryol*. 2019; 49: 3-16.