

HT22 Fare Hipokampal Hücre Hattının Nöronal Farklanma Besiyerine Verdiği Apoptotik Tepkinin Ölçülmesi

Measuring the Apoptotic Response of the HT22 Mouse Hippocampal Cell Line to Neuronal Differentiation Medium

Ayla Batu Öztürk¹, Derya Yetkin², Nail Can Öztürk³

¹ Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Mersin, Türkiye

² Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezi, Mersin, Türkiye

³ Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Mersin, Türkiye

Yazışma Adresi / Correspondence:

Nail Can Öztürk

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Çiftlikköy Kampüsü, PK. 33110, Yenişehir/Mersin, Türkiye

T: +90 324 361 00001(29055)

E-mail : nail.ozturk@mersin.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 12.03.2023

Kabul Tarihi / Accepted: 26.06.2023

Çevrimiçi / Online: 30.09.2023

Orcid ve Mail Adresleri

Ayla Batu Öztürk <https://orcid.org/0000-0003-3221-4292>, abatuozturk@mersin.edu.tr

Derya Yetkin <https://orcid.org/0000-0002-1452-5655>, deryayetkin@mersin.edu.tr

Nail Can Öztürk <https://orcid.org/0000-0001-9459-2120>, nail.ozturk@mersin.edu.tr

Cite this article/Atf:

Deniz BÖ, Yetkin D, Öztürk NC. HT22 fare hipokampal hücre hattının nöronal farklanma besiyerine verdiği apoptotik tepkinin ölçülmesi.

Sakarya Tıp Dergisi 2023;13(3): 375-383 DOI: 10.31832/smj.1264019

Öz

Amaç	Bu çalışmanın amacı nörobiyoloji çalışmalarında sıkça kullanılmakta olan HT22 fare hipokampal hücre hattının, nöronal farklılaşma modeli olarak kullanılabilirliğinin anlaşılması için standart bir farklılaşma besiyerine farklı sürelerde verdiği apoptotik cevabın sınanmasıdır.
Yöntem ve Gereçler	HT22 hücrelerinin ekilmesi ve farklılaşma dışında kültüre edilmesi için HG-DMEM farklılaşma için ise B27+ katkılı NB+ medyum kullanılmıştır. Kontrol grubu da dâhil olmak üzere toplam 9 farklı grup standart olarak kültüre edilmiştir. Deney sonunda AnnexinV/PI işaretlemesiyle erken/geç apoptozis ve nekrozis oranları akım sitometrik olarak belirlenmiştir. Verilerin normal dağılıma uyup uyumadığı Shapiro-Wilks testi ile sılandıktan sonra en uygun testle istatistiksel analiz gerçekleştirilmiştir.
Bulgular	Gruplar arasındaki karşılaştırmada erken apoptozis (P<0.01) ve geç apoptozis (P<0.001) hücre popülasyon oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilirken nekrozis açısından anlamlı bir fark olmadığı gözlemlenmiştir (P=0.064). 48 ve 72 saat farklılaşma besiyerinde kültüre edilen grupların büyük çoğunluğunda, sadece HG-DMEM ile veya 24 saat farklılaşma hücrelere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde (P<0.001) erken apoptozis artışı olduğu görülmüştür. Farklılaşma besiyeri ile kültüre edilen grupların çoğunluğunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde geç apoptozis artışı gözlenirken (P<0.001), farklı süreler farklılaşma grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (P>0.05).
Sonuç	Nörodegeneratif hastalıklara ait önemli patobiyolojik özelliklerin in-vitro düzeyde modellenmesinde sıkça kullanılan, fakat nöronal farklılaşma açısından uygunluğu yeterince bilinmeyen HT22 hipokampal hücre hattının, yaygın olarak kullanılan bir farklılaşma besiyerine erken apoptozis (kültürleme süresine bağlı) ve geç apoptozis (süreden bağımsız) artışı şeklinde anlamlı tepkiler oluşturduğu anlaşılmıştır. Bulgularımız HT22 hücre hattının farklılaşma çalışmalarında kullanılabilirliği açısından apoptozis düzeyinde önemli ipuçları sunmaktadır.
Anahtar Kelimeler	HT22, Hipokampus, Nöronal Farklılaşma, Apoptozis, Akım Sitometri

Abstract

Introduction	The aim of this study is to test the apoptotic response of the HT22 mouse hippocampal cell line to a broadly accepted differentiation medium at different duration to understand its usability as a neuronal differentiation model.
Materials and Methods	For seeding and culturing HT22 cells aside the differentiation, HG-DMEM and for differentiation B27+ supplemented NB+ medium were used, respectively. A total of 9 different groups, including the control group, were cultured in standard cell culture environment. At the end of the experiment, the rates of early/late apoptosis and necrosis were determined via flow cytometric analysis of AnnexinV/PI labeled HT22 cells along with appropriate technical controls. After testing whether the raw data fit the normal distribution by utilizing Shapiro-Wilks test, further statistical analyzes were performed with the most appropriate parametric or non-parametric tests.
Results	Statistically significant differences were found in terms of early (P<0.01) and late apoptosis (P<0.001) cell population rates, while there was no significant difference of necrosis (P=0.064). Significant (P<0.001) increase in early apoptosis was evident in the majority of groups cultured with differentiation medium for 48 or 72 hours, compared to the cells cultured with only HG-DMEM or differentiation media for 24 hours. While there was a significant increment in late apoptosis in the majority of the groups cultured with the differentiation medium compared to the control group (P<0.001), no significant difference was observed between the groups differentiated for different durations (P>0.05).
Conclusion	HT22 hippocampal cell line, which is frequently used in in-vitro modeling of significant patho-biological features of neurodegenerative diseases, but poorly understood for the suitability in neuronal differentiation, has a markedly increased response to a widely accepted differentiation medium in terms of early apoptosis (culturing duration dependent) and late apoptosis (regardless of duration). Our findings provide important clues at the level of apoptosis in terms of the usability of the HT22 cell line in differentiation studies.
Keywords	HT22, Hippocampus, Neuronal Differentiation, Apoptosis, Flow Cytometry



INTRODUCTION

Nöronal farklılaşma gelişim ya da doğum sonrasında merkezi sinir sisteminde (MSS) nöron üretiminin yani nörogenezin temel basamaklarından birisi olarak kabul edilmektedir¹⁻³. Gelişim sırasında taslak halindeki MSS'nin birçok nörojenik tabakasında doğan nöral kök hücreler, bölünme yoluyla sayılarını arttırarak ve farklılaşmaya başlayıp glial hücre tiplerine ya da farklı tip nöronlara dönüşmek üzere hücresele kararlar vermektedir. Doğumdan sonra ise, MSS'nin yalnızca iki tabakasında (hipokampus'un subgranüler tabakası ve ventriculus lateralis'leri çevreleyen subventriküler tabaka) gözlenen nöron üretimi, Erişkin Hipokampal Nörogenez (EHN) ve Erişkin Olfaktör Nörogenez (EON) olarak isimlendirilmektedir⁴⁻⁷. Fetal gelişim sırasında ve doğumdan sonra gerçekleşen nörogenez ile ilgili sayısız makale bulunmaktadır. Örneğin, erişkin nörogenez (EN) konusu günümüze kadar on bini aşkın PUBMED makalesine konu olmuştur^{4,5}. Buna rağmen, fizyolojik işleyişi hakkında bile halen yeteri kadar bilgi sahibi olmadığımız nörogenez'in MSS ile ilgili birçok hastalıkla ilişkili olduğu anlaşılmıştır⁸.

Dolayısıyla, fetal ve/veya EN'yi sağlıklı ve hastalıkta çeşitli açılardan daha iyi anlayabilmek için deney hayvanı kullanımını gerektirmeyen, teknik olarak ölümsüzleştirilerek belli kültür pasajları boyunca hücresele ve moleküler karakterlerini koruyabilen hücre hatları üzerinde oluşturulan in-vitro modeller literatüre önemli katkılar sunmaktadır^{9,10}. Fetal gelişim sırasında nöral kök hücrelerin farklılaşmasına katkı sunan sinyal yollarını aktifleştirdiği düşünülen katkı maddeleri (retinoik asit, N2, B27), tropik faktörler (BDNF, GDNF) ve küçük moleküler (small molecules) vb. maddelerin kendi başına veya birleşim halinde kültür ortamına eklenmesiyle çeşitli hücre hatlarında suni olarak nöronal farklılaşma oluşturulduğu bilinmektedir¹⁰. Ancak nöronal farklılaşma modeli olarak kullanılan hücre hattı sayısı oldukça azdır¹⁰.

Bu çalışmada fare hipokampus (HP) dokusundan elde edilmiş, glutamata olan aşırı duyarlılığından dolayı

Alzheimer, Parkinson vb. nörodejeneratif hastalıklarda oluşan glutamat sitotoksitesini modellemek için sıklıkla kullanılan HT22 hücre hattının farklılaşma ortamına verdiği apoptotik tepkilerin akım sitometrik olarak test edilmesi amaçlanmıştır^{11,12}.

GEREÇ ve YÖNTEMLER

Hücre Kültürü

Nöral özelliklere sahip, ölümsüzleştirilmiş fare nöral hipokampal hücre hattı olan HT22 hücreleri (MERCK, Katolog No: SCC129), %10 fetal sığır 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 (Resim 1A) 13. 3 günde bir medyumları değiştirilen hücrelerin devamlılığını sağlamak amacıyla, hücreler %70-80 yoğunluğa ulaştığında, tripsin-EDTA ile (Katolog No: SM-2003-C), 37° C sıcaklıkta 3-4 dk muamele edildikten sonra 1:10 oranında pasajlanmıştır. Deneyler sırasında, tüm deney grupları için 6. pasajdaki (P6) hücreler kullanılmıştır (Resim 1).

Deney Tasarısı

Akım sitometrik analiz, hücrelerin farklanma medyumuna [%2 B27+ katkısı (Katolog No: A3582801, GibcoTM, 50X) içeren Nörobazal+ (NB+) medyum (NB, Katolog No: A3582901, GibcoTM)] ile değişik sürelerde (24, 48 ve 72 saat) muamelesi sonucunda erken apoptozis, geç apoptozis ve nekrozis oranlarının belirlenmesi için ticari olarak satın alınmış olan Annexin V/PI kiti (BioLegend, Katolog No:640932) kullanılarak hücrelerin, akım sitometri cihazıyla (BD FACSARIA III) ölçülmesi sonucu belirlenmiştir (n=6). Hücreler, flask başına başına 1X10⁶ hücre olacak şekilde T25 tip flaslara katkılı HG-DMEM medyumuna ekilmiştir. Toplam 9 grubu içeren deney tasarısı Şekil 1'de aşağıda verilmiştir.

1. Grupta (G1 grubu) hücreler katkılı HG-DMEM ile

- ekildikten 24 saat sonra,
2. Grupta (G2 grubu) ekildikten 48 saat sonra,
 3. Grupta (G3 grubu) katkılı HG-DMEM ile ekildikten 24 saat sonrasında medyum NB ile değiştirilip bu medyumla 24 saat muamele edildikten sonra,
 4. Grupta (G4 grubu) katkılı HG-DMEM ile ekildikten 24 saat sonrasında medyum NB ile değiştirilip bu medyumla 24 saat muamele edilip 24 saatin sonunda medyum tekrar katkılı HG-DMEM ile değişip bu şekilde 24 saat bekletildikten sonra,
 5. Grupta (G5 grubu) katkılı HG-DMEM ile ekildikten 24 saat sonrasında medyum NB ile değiştirilip bu medyumla 24 saat muamele edilip 24 saatin sonunda medyum tekrar katkılı HG-DMEM ile değişip bu şekilde 48 saat bekletildikten sonra,
 6. Grupta (G6 grubu) katkılı HG-DMEM ile ekildikten 24 saat sonrasında medyum NB ile değiştirilip bu medyumla 48 saat muamele edildikten sonra,
 7. Grupta (G7 grubu) katkılı HG-DMEM ile ekildikten 24 saat sonrasında medyum NB ile değiştirilip bu medyumla 48 saat muamele edilip 48 saatin sonunda medyum tekrar katkılı HG-DMEM ile değişip bu şekilde 24 saat bekletildikten sonra,
 8. Grupta (G8 grubu) katkılı HG-DMEM ile ekildikten 24 saat sonrasında medyum NB ile değiştirilip bu medyumla 48 saat muamele edilip 48 saatin sonunda medyum tekrar katkılı HG-DMEM ile değişip bu şekilde 48 saat bekletildikten sonra,
 9. Grupta (G9 grubu) katkılı HG-DMEM ile ekildikten 24 saat sonrasında medyum NB ile değiştirilip bu medyumla 72 saat muamele edildikten sonra, deney sonlandırılarak örnekler akım sitometrik analiz için hazırlanmıştır (Şekil 1).

Akım Sitometrik Analiz

Akım sitometrik analizler için Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde bulunan BD FACS Aria III cihazı kullanılmıştır. Her kullanım öncesi cihazın 70'lik nozzle ile performans kontrolü ve drop delay değer tespiti yapılmıştır. Farklı gru-

plara ait hücre popülasyonlarında Erken/Geç Apoptozis ve Nekrozis durumlarını belirlemek amacıyla Annexin V ve Propidyum İyodid (PI) kiti (BioLegend, Katalog No:640932) kullanılmıştır. Kit içerisindeki PI phycoerythrin (PE) ile Annexin V ise Allophycocyanin (APC) konjuge floresan boyalar ile işaretlidir. Hücrelerin bu boyalar ile işaretlenme özelliklerine göre hücrelerin durumunun nasıl belirlendiği aşağıdaki tabloda özetlenmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Annexin V/PI ile işaretlenen hücrelerin işaretlenme durumlarına göre sağlıklı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücreler olarak değerlendirilme koşullarının gösterilmesi

Hücrelerin durumu	Annexin V	PI
Canlı ve sağlıklı	-	-
Erken apoptotik	+	-
Geç apoptotik	+	+
Nekrotik	-	+

Deney tasarısında belirtildiği üzere, hücre kültürü deneyleri sonlandırıldıktan sonra her bir bağımsız deneyden elde edilen hücre süspansiyonu ticari kitin belirttiği protokole uygun biçimde akım sitometrik analize hazırlanmıştır. Öncelikle, G1 grubuna ait hiçbir boya ile işaretlenmemiş 1×10^6 sayıda hücre, süspansiyon içerisinde debris niteliğinde parçalar olup olmadığını kontrol etmek amaçlı Forward Scatter Area (FSC-A) /Side Scatter Area (SSC-A) plotunda analiz edilmiş ve eğer debris var ise istenen özelliklerdeki popülasyon (P) P1 kapısı içerisine alınmıştır. P1 kapısı içerisine alınan örnekler daha sonra APC'ye karşın PE plotunda analiz edilerek, P1 kapısında bulunan işaret-siz hücrelerin APC ve PE lazerleri açısından negatif ışımaya verip vermediğini kontrol etmek için değerlendirilmiştir. İkili işaretlemeler (Annexin V ve PI) gerçekleştirilmeden önce, sadece Annexin V ve sadece PI işaretlemeleri yapılan hücreler analiz edilerek boyaaların özgünlüğü plot analizi ve voltaj özellikleri değerlendirilerek kontrol edilmiştir. Tüm kontroller gerçekleştirildikten sonra, 1×10^6 /ml konsantrasyonda hücre örnekleri kitin talimatlarına uygun biçimde Annexin ve PI boya ile ikili olarak işaretlenerek, akım sitometrik olarak analiz edilmiştir.

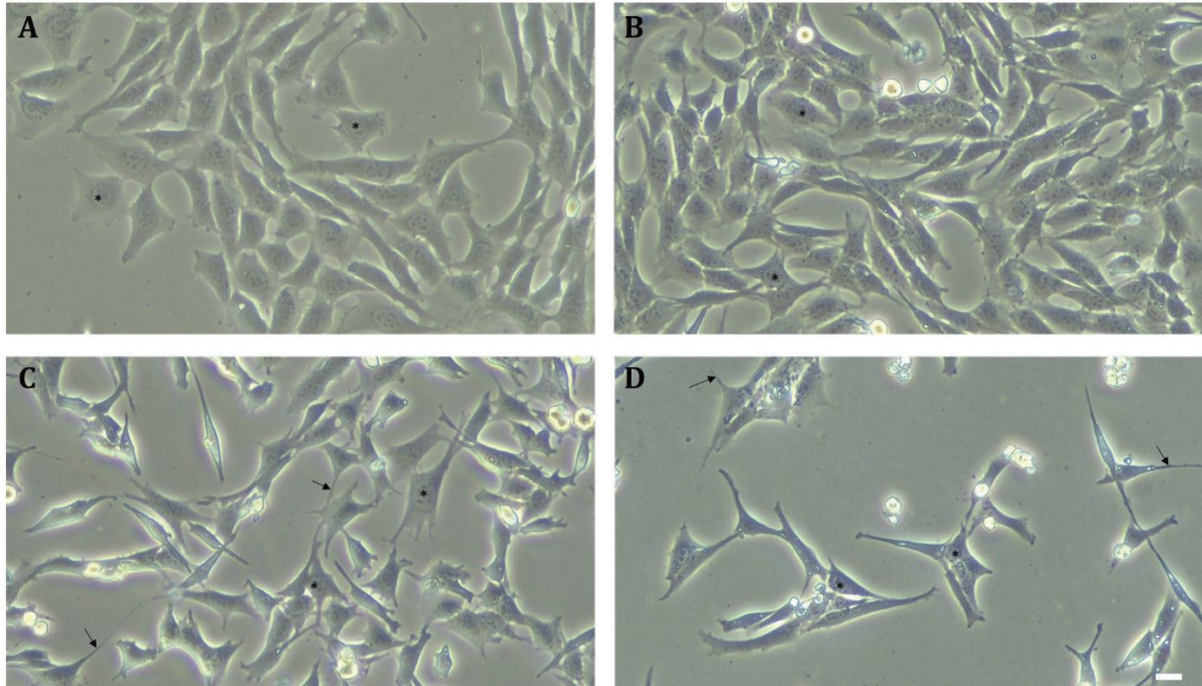
İstatistiksel Analiz

Her bir çalışma grubu altı bağımsız deneyden (n=6/grup) oluşacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Normallik varsayımı Shapiro-Wilk testi ile sınanmıştır. Shapiro-Wilk testi sonucuna göre normal dağılım yok ise ($P<0.05$) non-parametrik (Kruskal-Wallis) var ise ($P>0.05$) parametrik (One-Way ANOVA) testler uygulanmıştır. Bu testler sonucunda istatistiksel olarak anlamlı fark ($P<0.05$) görülen veriler için, anlamlılığın hangi ikili gruplar arasında olduğunu tespit etmek için Bonferroni post-hoc testi uygulanmıştır. Analizler için IBM SPSS Statistics yazılımının ücretsiz deneme sürümü (26) kullanılmıştır. Non-parametrik analiz uygulanan veriler box-plot grafiği, parametrik uygulananlar ise ortalama \pm standart sapmayı temsil eden bar grafiği biçiminde sunulmuştur. İstatistiksel analizi tamamlanan verilerin grafikler haline dönüştürülmesi ve düzenlenmesi için Microsoft Office yazılımı kullanılmıştır.

BULGULAR

Elde edilen verilerin normal dağılımı incelendiğinde (Shapiro-Wilk testi), Geç Apoptozis testinin normal dağılıma uyduğu ($P<0.001$), Erken Apoptozis ($P>0.05$) ve Nekrozis ($P>0.05$) verilerinin uymadığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla, Geç Apoptozis verilerinin istatistiksel analizi One-Way ANOVA (parametrik), Erken Apoptozis ve Nekrozis verileri ise Kruskal-Wallis (non-parametrik) testleriyle analiz edilmiştir.

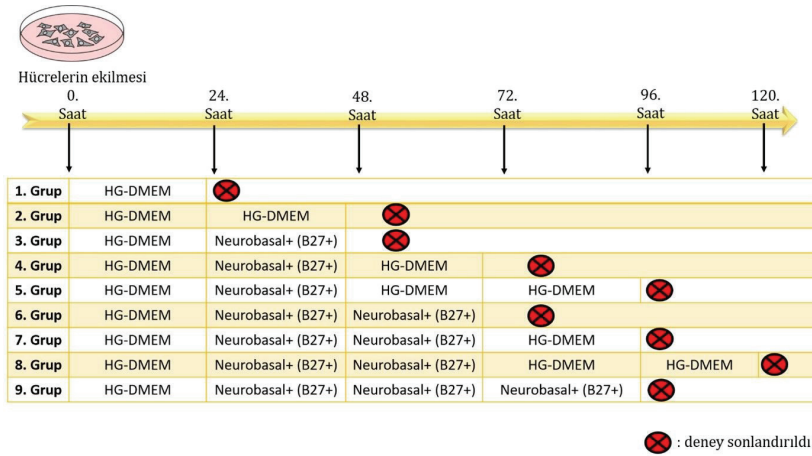
HT22 hücre hattı morfolojik olarak incelendiğinde, kontrol grubunun (G1) ökromatik nükleusa sahip, epiteloïd karakterde hücre morfolojisi sergilediği (Resim 1A), 2. Gruptaki (G2) hücrelerin de benzer bir morfolojide olduğu gözlenmiştir (Resim 1B). Farklandırma medyumuna eklenen gruplarda (G3-G9) ise özellikle 48 ve 72 saat süreyle muamele edilen farklandırma gruplarında daha belirgin olarak, nörit benzeri uzantılara rastlanmıştır (Resim 1C, D).



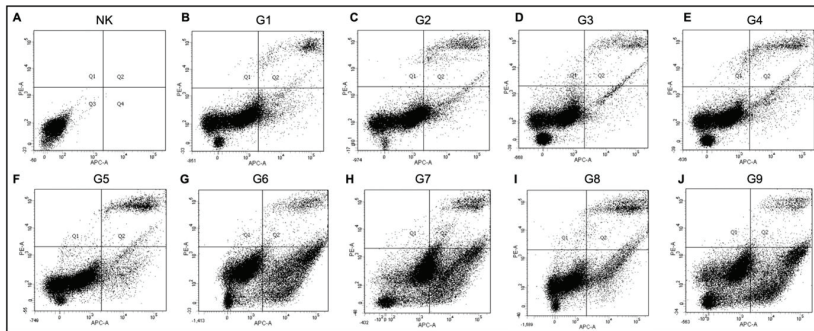
Resim 1. HT22 hücre hattının genel morfolojik ve farklandırma medyumları sonrasındaki görüntüsü. (A) Sadece HG-DMEM ile muamele edilen hücreler. (B) 24 saat farklandırma medyumuna muamele edilen hücreler. (C) 48 saat farklandırma medyumuna muamele edilen hücreler. (D) 72 saat farklandırma medyumuna muamele edilen hücreler. Nükleus (asterisk *), nörit benzeri uzantılar (siyah oklar). Objektif büyüklüğü 10X, ölçek 10 μ m.

Katkılı HG-DMEM medyum ile ekilip 24 saat tutunmaları için beklenen hücrelerin, değişik sürelerde farklanma medyumunu ile muamele edilmesi sonucu ölçülen erken apoptozis verileri incelendiğinde ise G6, G7 ve G9 gruplarındaki artışın, 1. Gruba (Kontrol, G1) göre (sırasıyla $P=0,010$, $P=0,011$ ve $P=0,015$) ve G3'e göre (sırasıyla $P<0,001$, $P<0,001$ ve $P=0,001$) istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2, Şekil 3A). Geç apoptozisin, 1.

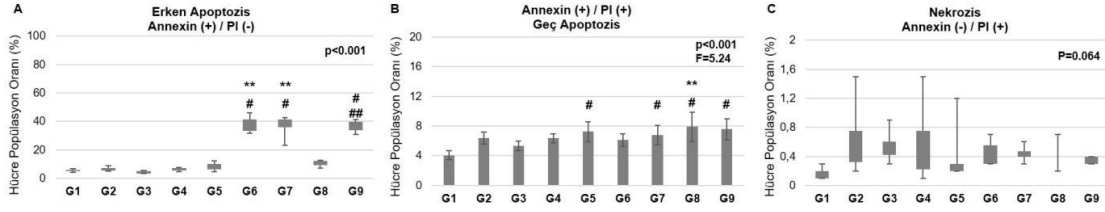
Gruba (Kontrol, G1) kıyasla G5, G7, G8 ve G9 gruplarında artış gösterdiği ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (sırasıyla $P=0,003$, $P=0,02$, $P=0,001$ ve $P=0,001$). Bu bulguların yanı sıra, G3'e göre G8'deki artışın da anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($P=0,04$) (Şekil 2, Şekil 3B). Nekrozis verileri incelendiğinde ise gruplar arasında anlamlı herhangi bir fark bulunmamıştır (Şekil 2, Şekil 3C).



Şekil 1. Deney tasarımının şematik olarak gösterilmesi. HG-DMEM (yüksek glikoz katkılı DMEM; high glucose DMEM).



Şekil 2. Farklı gruplarda Annexin V/PI işaretlemesine göre; canlı ve sağlıklı, erken apoptozis, geç apoptozis ve nekrozis durumundaki HT22 hücre popülasyon dağılımları kadrantlar (Q1-Q4) içerisinde gösterilmiştir. (A) Negatif kontrol (NK), (B) G1 grubu, (C) G2 grubu, (D) G3 grubu, (E) G4 grubu, (F) G5 grubu, (G) G6 grubu, (H) G7 grubu, (I) G8 grubu, (J) G9 grubu. Q1: nekrotik hücre popülasyonu, Q2: geç apoptotik hücre popülasyonu, Q3: sağlıklı hücre popülasyonu, Q4: erken apoptotik hücre popülasyonu. (n=6/grup).



Şekil 3. HT22 hücrelerinin gruplar arası erken apoptozis (A), geç apoptozis (B) ve nekrozis oranları (C). (n=6/ grup). **Şekil 3A** için; (**: G3'e göre anlamlı, P<0,001, #: G1'e göre anlamlı, P<0,05, ##: G3'e göre anlamlı, P<0,05). **Şekil 3B** için; Farklı çalışma gruplarında Annexin V (+) / PI (+) işaretlemesine göre tespit edilen geç apoptozis durumundaki HT22 hücre popülasyon oranları ortalama \pm standart sapmayı temsil eden bar grafiğinde gösterilmiştir. (*: G1'e göre anlamlı, P<0,001, #: G1'e göre anlamlı, P<0,05, ##: G3'e göre anlamlı, P<0,05). **Şekil 3C** için; Farklı çalışma gruplarında Annexin V (-) / PI (+) işaretlemesine göre tespit edilen nekrotik HT22 hücre popülasyon oranları box-plot grafiği ile gösterilmiştir. Gruplar arasında nekrotik hücre popülasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir.

TARTIŞMA

Bu çalışmada fare HP dokusundan elde edilmiş HT22 hücrelerinin, nöronal farklandırmada ve primer nöron kültürü protokollerinde sıkça kullanılan B27+ katkısı içeren medyum bileşimine, zamana bağlı verdiği apoptotik ve nekrotik tepkinin ölçülmesi amaçlanmıştır¹⁴. Bu doğrultuda, in-vitro ortamda farklı süre ve kombinasyonlarda farklandırma medyumuna tabi tutulan HT22 hücrelerinde, Annexin V/PI işaretlemesi ile erken apoptozis, geç apoptozis ve nekrozis hücre popülasyon oranları karşılaştırılmıştır. Annexin V işaretlemesi, hücre membranının dış yüzüne geçmiş olan fosfatidilserin tespitini yani hücrenin erken apoptozis evresine geçişini işaret etmektedir^{15,16}. Kontrol grubuna (G1) veya 24 saat farklandırma ortamında tutulan hücelere (G3) kıyasla, 48 saat ve daha uzun farklandırma ortamında tutulan HT22 hücrelerinin (G6, G7, G9) daha yüksek oranda erken apoptozise uğradığı görülmüştür (Şekil 2, Şekil 3A). HT22 hücrelerinin, 24 saatlik farklandırma medyumuna ise anlamlı seviyede bir erken apoptotik tepki (G1/G3, P>0.05) oluşturmadığı tespit edilmiştir. Diğer yandan, Annexin V (+) ve PI (+) boyanan hücre popülasyon oranları değerlendirildiğinde farklandırma medyumunun kültür süresinden bağımsız olarak, HT22 hücrelerinde geç apop-

tozise yol açtığı anlaşılmıştır (Şekil 2, Şekil 3B). Membran hasarı ve DNA fragmentasyonları sebebiyle, geç apoptoziste geri döndürülemeyen hücre kayıpları oluşabildiği bilinmektedir¹⁷. Bazı gruplarda tespit ettiğimiz anlamlı geç apoptozis artışı, bu gruplardaki HT22 hücrelerinin farklandırma medyumuna karşı geliştirdiği intrinsik ve ekstrinsik yollarla aktive olabilen, caspase ailesine ait proteinlerin ifadelerini de etkilenmiş olabilir. HT22 hücre hattının nöronal farklılaşması üzerine temellerini oluşturacak çalışmalarda, caspase ailesi proteinlerin ifade seviyeleri, akım sitometrik, western-blot veya immünofloresan işaretleme yöntemleriyle ya da söz konusu proteinleri kodlayan genlerin mRNA ifadeleri kantitatif RT-PCR veya floresan in situ hibridizasyon vb. yöntemlerle tespit edilebilir.

PI molekülünün membran bütünlüğü bozulmuş haldeki hücrelerin DNA'sına bağlandığı ve PI pozitif hücrelerin nekrotik hücreler olarak kabul edildiği bilinmektedir¹⁸. Annexin V (-) ve PI (+) işaretlenen hücre popülasyon oranları incelendiğinde, farklandırma medyumunun HT22 hücreleri üzerinde kayda değer bir nekrotik etki oluşturmadığını göstermiştir (Şekil 2, Şekil 3C). Bununla birlikte, farklandırma medyumuna süreden bağımsız olarak geç apoptoza neden olurken nekrozda herhangi bir artışa ned-

en olmaması da ilginç bir durumdur. Gerçekleştirdiğimiz akım sitometrik deneyler farklı süreler sonlandırılan kültür deneyleri sonrasında yapılmış olsa da farklandırma medyumunun HT22 hücrelerinin ölüm hızını nasıl etkilediği konusunda sınırlı bilgiler sunmaktadır. İlerleyen çalışmaların hücre ölüm hızı ya da hücre bölünme hızını gerçek zamanlı olarak analiz etme kapasitesine sahip yöntemler ile tüm deney süreleri boyunca hücrelerin farklandırma medyumuna verdiği süregelen tepkiler ölçülebilir.

HT22 hücrelerinin farklandırma medyumuna ile daha uzun süre kültüre edilmesine bağlı gözlemlendiğimiz erken apoptozis artışının ya da zamandan bağımsız olarak ortaya çıkan geç apoptozis artışının nöronal farklılaşma açısından ne ifade ettiği soru işaretidir. Bu bağlamda, fetal nörogenез sırasında programlanmış hücre ölümlerinin nöro-gliyal farklılaşma basamaklarının işlenmesine katkı sunduğu dikkat çekicidir^{19,20}. Erişkin rodentlerde nöral kök hücre oluşumundan elektrofizyolojik olarak aktif nöron oluşumuna kadar gerçekleşen dönüşüm basamakları sırasında hücre popülasyonunun yaklaşık olarak yarısının farklılaşmadan aynı basamakta kaldığı (nöral kök hücre havuzunu koruduğu) ya da apoptozise uğradığı da bilinmektedir^{21,22}. Dolayısıyla, doğal ortamında (fetal veya erişkin beyindeki nörojenik tabakalar) gerçekleşen nöronal farklılaşma basamakları sırasında programlı hücre ölümü olağan ve gerekli bir hücreyel olay olarak kabul edilebilir.

HT22 hücre hattının HP dokusu kaynaklı bir hücre hattı olması sebebiyle, hipokampal nörogenез sırasında gerçekleşen nöronal farklılaşmanın modellenmesi açısından makul bir model adayı olarak kabul edilebilir. Ancak HT22 hücrelerinin nöronal farklandırma kültür ortamlarındaki hücreyel ve moleküler davranışlarına ait oldukça az bilgi bulunmaktadır. Literatür incelendiğinde HT22 hücre hattını nöral farklılaşma modeli olarak kullanılabileceğini gösteren çok az sayıda araştırma olduğu görülmüştür²³⁻²⁶. Bu çalışmalarda, HT22 hücreleri N2 ve/veya B27 katkısı içeren NB ile kültüre edildiğinde, nöral karakterde olan bu hücrelerin kolinerjik nöron özel-

liklerini gösterdiği raporlanmıştır²³⁻²⁵. Bu çalışmalarda, HT22 hücrelerinin farklandırılarak kazandıkları nöronal fenotipler gösterilmiş olsa da hücrelerin bu medyumlara karşı verdiği apoptotik yanıt değerlendirilmemiştir. Ayrıca sadece bu çalışmalardan elde edilen bilgiler sonucunda HT22 hücrelerinin nöronal farklılaşmanın hangi aşamasında olduğunu ya da hücrelerdeki olgunlaşmanın derecesinin anlaşılması açısından da yeterli bilgiler sunmamaktadır²³⁻²⁵.

Bu çalışmada elde edilen, HT22 hücrelerinde, farklandırma medyumuna karşı zamana bağlı oluşan erken veya geç evre apoptotik tepkilere ait bilgiler, HT22 hücreleri ile farklandırma protokolleri uygulayacak araştırmacılara faydalı bir temel sağlamaktadır. Ancak ilerleyen çalışmalarda caspase bağımlı apoptotik tepkilerin de ölçülmesi bu çalışmada elde edilen, HT22 hücrelerin nöronal farklandırmaya karşı verdiği apoptotik tepkilerin daha kapsamlı biçimde anlaşılmasına yardımcı olabilir.

Sonuç olarak, literatürde sıklıkla kullanılmakta olan HT22 hücrelerinin nöronal farklılaşma medyumuna verdiği süreye bağlı apoptotik yanıtın değerlendirilmesi, basit ve yaygın olarak kabul gören bir yöntem ile incelenmiştir. Bu çalışma ile birçok araştırmacının konusunu oluşturan, nöronal farklılaşma mekanizmalarının devreye girmesiyle ilk basamakta proliferasyona uğrayan hücrelerin farklanma basamakları ilerledikçe programlı bir biçimde apoptoza uğraması ve farklılaşmayı tamamlayıp post-mitotik olgun nöronlar oluşturması şeklinde ilerleyen nörogenез sırasında gerçekleşen nöronal apoptoz ve bu olayın mekanizmasının daha iyi olarak anlaşılması açısından bazı soruları cevapladığı düşünülebilir.

Çıkar İlişkisi

Yazarlar arasında herhangi bir çıkar ilişkisi bulunmamaktadır.

Teşekkür

Bu araştırma, makine ve teçhizat alt yapısı, 2018-1-AP5-

2895 ve 2020-1-AP5-4104 numaralı Mersin Üniversitesi BAP birimi projelerinin destekleriyle kurulmuş olan Nöroanatomi ve Deneysel Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Akım sitometrik analizler için gerekli hizmet alımı 2020-1-AP5-4104 numaralı BAP projesi tarafından karşılanmıştır. 2018-1-AP5-2895 numaralı güdümlü altyapı projesinin geliştirilmesindeki desteklerinden dolayı başta Anatomi Anabilim Dalı'nın eski başkanlarından Prof. Dr. Zeliha KURTOĞLU OLGUNUS olmak üzere, emeği geçen Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı'nın tüm öğretim elemanlarına ve çalışanlarına teşekkürlerimizi sunarız.

Katkı Oranı Beyanı

Fikir, Ayla Batu Öztürk; Deneysel analizler, Ayla Batu Öztürk, Derya Yetkin, Nail Can Öztürk; Verilerin toplanması, Ayla Batu Öztürk, Derya Yetkin; Verilerin analizi, Ayla Batu Öztürk; Makale yazımı, Ayla Batu Öztürk, Nail Can Öztürk.

Kaynaklar

- Urbán N, Guillemot F. Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Front Cell Neurosci.* 2014;8(NOV). doi:10.3389/FNCEL.2014.00396
- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 1998 411. 1998;4(11):1313-1317. doi:10.1038/3305
- Moreno-Jiménez EP, Flor-García M, Terreros-Roncal J, et al. Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nat Med* 2019 254. 2019;25(4):554-560. doi:10.1038/s41591-019-0375-9
- Lipp HP, Bonfanti L. Adult Neurogenesis in Mammals: Variations and Confusions. *Brain Behav Evol.* 2016;8(3):205-221. doi:10.1159/000446905
- Kempermann G. Environmental enrichment, new neurons and the neurobiology of individuality. *Nat Rev Neurosci* 2019 204. 2019;20(4):235-245. doi:10.1038/s41583-019-0120-x
- Lim DA, Alvarez-Buylla A. The Adult Ventricular-Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016;8(5):a018820. doi:10.1101/CSHPERSPECT.A018820
- Aimone JB, Li Y, Lee SW, Clemenson GD, Deng W, Gage FH. Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. *Physiol Rev.* 2014;94(4):991-1026. doi:10.1152/PHYSREV.00004.2014/ASSET/IMAGES/LARGE/Z9J0041427010007.JPEG
- Welberg L. Adult neurogenesis is altered in neurodegenerative disease. *Nat Neurosci* 2021 2412. 2021;24(12):1640-1640. doi:10.1038/s41593-021-00978-3
- Gordon J, Amiri S. General Overview of Neuronal Cell Culture. *Methods Mol Biol.* 2021;2311:1-8. doi:10.1007/978-1-0716-1437-2_1/COVER
- Darbinian N. Cultured Cell Line Models of Neuronal Differentiation: NT2, PC12, and SK-N-MC. *Methods Mol Biol.* 2021;2311:25-38. doi:10.1007/978-1-0716-1437-2_3/COVER
- 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(2):956-966. doi:10.3892/IJMM.2018.4032/HTML
- Park JS, Park JH, Kim KY. Neuroprotective effects of myristargenol A against glutamate-induced apoptotic HT22 cell death. *RSC Adv.* 2019;9(54):31247-31254. doi:10.1039/C9RA05408A
- Davis JB, Maher P. Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line. *Brain Res.* 1994;652(1):169-173. doi:10.1016/0006-8993(94)90334-4
- Ishikawa M, Aoyama T, Shibata S, et al. miRNA-Based Rapid Differentiation of Purified Neurons from hPSCs Advancetowards Quick Screening for Neuronal Disease Phenotypes In Vitro. *Cells.* 2020;9(3). doi:10.3390/CELLS9030532
- Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM. Appearance of Phosphatidylserine on Apoptotic Cells Requires Calcium-mediated Nonspecific Flip-Flop and Is Enhanced by Loss of the Aminophospholipid Translocase. *J Biol Chem.* 1997;272(42):26159-26165. doi:10.1074/JBC.272.42.26159
- Zhang G, Gurtu V, Kain SR, Yan G. Early Detection of Apoptosis Using a Fluorescent Conjugate of Annexin V. <https://doi.org/10.2144/97233pf01>. 2018;23(3):525-531. doi:10.2144/97233PF01
- Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495. doi:10.1080/01926230701320337
- Brauchle E, Thude S, Brucker SY, Schenke-Layland K. Cell death stages in single apoptotic and necrotic cells monitored by Raman microspectroscopy. *Sci Rep.* 2014;4. doi:10.1038/SREP04698
- Malatesta P, Hartfuss E, Götz M. Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development.* 2000;127(24):5253-5263. doi:10.1242/DEV.127.24.5253
- Miyata T, Kawaguchi A, Okano H, Ogawa M. Asymmetric Inheritance of Radial Glial Fibers by Cortical Neurons. *Neuron.* 2001;31(5):727-741. doi:10.1016/S0896-6273(01)00420-2
- Hsieh J. Orchestrating transcriptional control of adult neurogenesis. *Genes Dev.* 2012;26(10):1010-1021. doi:10.1101/GAD.187336.112
- Sierra A, Encinas JM, Deudero JJP, et al. Microglia Shape Adult Hippocampal Neurogenesis through Apoptosis-Coupled Phagocytosis. *Cell Stem Cell.* 2010;7(4):483-495. doi:10.1016/j.stem.2010.08.014
- Liu J, Li L, Suo WZ. HT22 hippocampal neuronal cell line possesses functional cholinergic properties. *Life Sci.* 2009;84(9-10):267-271. doi:10.1016/j.lfs.2008.12.008
- 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. doi:10.3969/j.issn.1673-5374.2013.14.006
- Lim J, Bang Y, Kim KM, Choi HJ. Differentiated HT22 cells as a novel model for in vitro screening of serotonin reuptake inhibitors. *Front Pharmacol.* 2023;13:5432. doi:10.3389/FPHAR.2022.1062650/BIBTEX
- Zhao Z, Lu R, Zhang B, et al. Differentiation of HT22 neurons induces expression of NMDA receptor that mediates homocysteine cytotoxicity. <http://dx.doi.org/10.1179/1743132811Y0000000057>. 2013;34(1):38-43. doi:10.1179/1743132811Y0000000057