

# Pierwotna hodowla komórek nerwowych hipokampa – zastosowanie metody w modelach neuroprotekcji doświadczalnej

## Primary culture of dissociated hippocampal neurons – the use of method in the experimental models of neuroprotection

Krzysztof Sendrowski, Wojciech Sobaniec, Elżbieta Iłendo, Izabela Jałosińska

Klinika Neurologii i Rehabilitacji Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

### STRESZCZENIE

Stale powiększająca się populacja osób z udarami mózgu, padaczką lekooporną oraz postępującymi chorobami neurodegeneracyjnymi stanowi największe wyzwanie współczesnej neurologii. Pomimo znaczącego postępu naukowego, jaki dokonał się w tej dziedzinie w ostatnich latach, dostępne strategie terapeutyczne są wciąż niezadowolające. Dlatego też dużą nadzieję neurologów budzi neuroprotekcja, czyli możliwość zapobiegania destrukcji tkanki nerwowej spowodowanej określonym czynnikiem uszkadzającym z zastosowaniem tzw. neuroprotektantów. Substancje te oddziałując na określony etap niezwykle złożonego procesu śmierci neuronu, hamują go lub ograniczają. Modele neuroprotekcji doświadczalnej prowadzone są powszechnie na żywych zwierzętach (*in vivo*). Od ponad 30 lat, m.in. dzięki wprowadzaniu coraz to doskonalszych technik laboratoryjnych oraz nowoczesnych mediów odżywczych, komórki nerwowe mogą być hodowane w warunkach *in vitro*. Metody takie umożliwiają bezpośrednią obserwację żywych neuronów oraz ich dynamicznej „odpowiedzi” na zmieniające się warunki hodowli. Pozwalają również ocenić wpływ różnych substancji egzogennych dodanych do kultury (m.in. potencjalnych neuroprotektantów) na morfologię i fizjologię tych komórek. Autorzy na podstawie przeglądu piśmiennictwa i doświadczeń własnych przedstawili procedurę najczęściej wykorzystywanej hodowli komórek nerwowych hipokampa oraz zastosowanie metody w wybranych modelach neuroprotekcji.

**Słowa kluczowe:** pierwotna hodowla neuronów, hipokamp, neuroprotekcja

### ABSTRACT

Increasing population of patients with stroke, intractable epilepsy and progressive neurodegenerative disorders is the major clinical problem of current neurology. Despite of scientific progress in neuroscience, achieved in the last years, therapeutic strategies remain still unsatisfactory. Neuroprotection – the prevention from damage of nervous tissue by varied destructive factors with the use of pharmacological agents (neuroprotectants), hold out hopes to the neurologists. Neuroprotectants stop varied stages of complex mechanism of neuronal death. Experimental models of neuroprotection are common used in the living animals (*in vivo*). Since more than three decades neuronal cells can be cultured in lab conditions (*in vitro*). Primary neuronal culture is an excellent target for investigation of neurodegenerative and neuroprotective mechanisms. Authors, focused on experimental models of neuroprotection, described the widely used primary culture of dissociated hippocampal neurons according to the literature review and to the own experience.

**Key words:** primary neuronal culture, hippocampus, neuroprotection

### NEURODEGENERACJA I NEUROPROTEKCJA

Badania naukowe z ostatnich kilkudziesięciu lat znacząco przyczyniły się do zrozumienia złożonych mechanizmów fizjologii i patologii tkanki nerwowej. Tak dynamiczny postęp, jaki dokonał się w szeroko rozumianych naukach neurologicznych (ang. *Neuroscience*), szczególnie w ostatnim dziesięcioleciu XX wieku, zwanym „dekadą mózgu”, nie był dotąd spotykany. Przyczynił się do tego przede wszystkim szybki rozwój innych dziedzin nauki, jak biologia molekularna, genetyka, farmakologia czy nowoczesne

techniki neuroobrazowania. Najlepszym dowodem owego postępu było pojawienie się w ostatnim okresie szeregu leków przeciwpadaczkowych nowej generacji, których działanie opiera się na niezwykle precyzyjnie określonych mechanizmach biochemicznych. Jednak pomimo tak znaczącej poprawy stanu wiedzy i wynikających z tego aspektów praktycznych, w postaci nowych preparatów i metod terapeutycznych, wiele problemów pozostaje nadal nierozwiązanych.

W neurologii szczególną nadzieję budzi zjawisko neuroprotekcji, a więc możliwość zapobiegania uszkodzeniu tkanki nerwowej na skutek działania czynnika patogenego za pomocą określonych substancji i leków – tzw. neuroprotektantów.

Zaburzenia ośrodkowego układu nerwowego (OUN), rozpoczynające się zarówno w sposób ostry (udar, drgawki, ciężkie urazy czaszkowo-mózgowe), jak też postępujące przewlekłe choroby neurodegeneracyjne (np. choroba Alzheimera, choroba Parkinsona), uruchamiają niezwykle złożoną kaskadę zjawisk biochemicznych, której skutkiem jest uszkodzenie, a następnie śmierć neuronów. Modelem przykładem z praktyki klinicznej jest udar niedokrwienny mózgu, kiedy to w wyniku nagłego zamknięcia światła tętnicy mózgowej dochodzi do kaskady reakcji biochemicznych, prowadzących do śmierci komórek nerwowych. Na skutek głębokiego deficytu energetycznego, spowodowanego niedostatkami tlenu w mitochondriach, dochodzi do zaburzenia funkcji ATP-az błonowych. Niewydolność tego mechanizmu prowadzi do depolaryzacji błony komórkowej i mitochondrialnej, zaburzenia homeostazy jonowej (nadmierny napływ jonów sodu i wapnia do wnętrza komórki). Największe znaczenie odgrywają tu jony wapnia, dodatkowo uwalniane z retikulum endoplazmatycznego [1, 2]. Aktywują one „wyrzut” aminokwasów pobudzających, głównie glutaminianu, do przestrzeni synaptycznej. Glutaminian zaś po połączeniu ze swoistymi receptorami błonowymi jeszcze bardziej nasila napływ jonów wapnia do komórki. Daje to efekt patofizjologicznego „błędnego koła”, znanego jako ekscytotoksyczność [3, 4]. Wysokie stężenie jonów wapnia uruchamia ponadto szereg innych niekorzystnych reakcji, np. aktywację proteaz, endonukleaz i fosfolipazy A2. Ta z kolei przy udziale jonów wapnia i ATP katalizuje uwalnianie kwasu arachidonowego z błon komórkowych. Efektem dalszych przemian biochemicznych kwasu arachidonowego (tzw. „kaskady” kwasu arachidonowego) jest nie tylko wytworzenie szeregu mediatorów reakcji zapalnej, ale również dużych ilości wolnych rodników tlenowych [5, 6]. Wolne rodniki tlenowe wspólnie z jonami wapnia powodują otwarcie tzw. megakanałów w błonie mitochondriów, co nieodwracalnie niszczy te organella komórkowe [7]. Zjawiskom owym towarzyszy również nadmierna ekspresja genów proapoptycznych [8]. Koincydencja powyższych reakcji prowadzi do śmierci komórki nerwowej. Dochodzi do niej w wyniku martwicy (nekrozy) lub apoptozy. Martwica następuje w ciągu krótkiego czasu i jest wynikiem nagłej zmiany wewnątrzkomórkowych stężeń jonów, obrzęku komórki i następnie jej lizy. W przeciwieństwie do martwicy apoptoza obejmuje szereg zjawisk biochemicznych, które prowadzą do destrukcji materiału genetycznego i zaprogramowanej śmierci komórki [9]. Najnowsze badania dowiodły, że oba te zjawiska zachodzą zwykle jednocześnie i określane są mianem aponekrozy [10, 11]. Mechanizm tego procesu jest niezwykle złożony – łączy bowiem niekorzystne współdziałanie jonów wapnia, aminokwasów pobudzających, produktów degradacji lipidów błon komórkowych, wolnych rodników tlenowych oraz mediatorów reakcji zapalnej i odpowiedzi autoimmunologicznej.

W ostatnich latach trwają intensywne poszukiwania substancji neuroprotektyjnych, które podane w określonym czasie i dawce mogłyby ochronić neurony przed zniszczeniem lub ograniczyć uszkodzenie funkcji mózgu w określonej sytuacji patofizjologicznej. W związku z postulowanymi wymienionymi mechanizmami śmierci komórki dotychczasowe badania nad neuroprotektantami skupiają się przede wszystkim na blokerach kanału wapniowego, antagonistach aminokwasów pobudzających, antyoksydantach, kortykosteroidach, modulatorach reakcji zapalnej i immunologicznej [9, 12, 13].

#### PIERWOTNE HODOWLE NEURONÓW

Na początku lat 70 ubiegłego wieku pojawiły się pierwsze doniesienia, które wytyczyły nowy kierunek badań nad tkanką nerwową i umożliwiły dogłębne poznanie opisanych wcześniej mechanizmów jej uszkodzenia. Stwierdzono, że neurony uzyskane ze zwojów współczulnych przy obecności swoistego czynnika wzrostu mogą być hodowane w warunkach *in vitro* [14]. W następnych latach uzyskano hodowle neuronów ośrodkowego układu nerwowego, m.in. pochodzących z rdzenia kręgowego [15] i mózdzku [16]. Opisana po raz pierwszy przez Bankera i Cowana w r. 1977 hodowla pierwotna rozproszonych komórek nerwowych hipokampa szczura [17] stała się niejako, obok tzw. hodowli organotypowych, „złotym standardem” hodowli neuronalnych, przyjętym przez wiele ośrodków na świecie.

Z wielu względów obserwacja „odpowiedzi” tego własnego regionu mózgu na działający czynnik uszkodzający czy ochronny stanowi doskonały model doświadczalny. Po pierwsze hipokamp jest strukturą *archeocortex*, w związku z czym jego budowa histologiczna jest znacznie prostsza niż innych obszarów mózgu (zwłaszcza kory nowej), co zdecydowanie ułatwia jego ocenę morfologiczną. Ponadto dobrze poznane i zdefiniowane zostały połączenia hipokampa z innymi strukturami mózgu [18]. Nie mniej ważny jest praktyczny aspekt łatwości zidentyfikowania i pobrania tej struktury od zwierzęcia laboratoryjnego. Z punktu widzenia badań nad uszkodzeniem tkanki nerwowej i prób neuroprotekcji niezwykle ważne jest kliniczne znaczenie kory amonalnej. Hipokamp obok ciała migdałowatego jest najważniejszą strukturą, zawiadującą procesami emocji, uczenia się i pamięci [19]. W badaniach rezonansu magnetycznego wykazano atrofię zakrętu hipokampa w szeregu schorzeń neurodegeneracyjnych przebiegających z upośledzeniem tych funkcji: chorobie Alzheimera, otępieniu naczyniowym czy otępieniu towarzyszącym chorobie Parkinsona [20]. Stwardnienie hipokampa jest również najczęstszą przyczyną lekoopornej padaczki płata skroniowego i spowodowane może być m.in. nawracającymi i długotrwałymi drgawkami gorączkowymi [21].

Kora amonalna jest w mózgu strukturą najbardziej wrażliwą na uszkodzenie zarówno endo-, jak i egzogenne. Komórki piramidowe hipokampa w stanach patologicznych mózgu, zwłaszcza niedokrwiennie-niedotlenieniowych, najszybciej ulegają procesom nekrozy i/lub apoptozy. Związane to jest z szeroką reprezentacją w hipokampie (szczególnie w rejonach CA1 i CA3) receptorów dla neu-

roprzekazników pobudzających [22]. Procesy ekscytotoksyczności są więc tutaj najbardziej wyrażone i przebiegają niezwykle intensywnie.

Hodowle neuronów piramidowych hipokampa prowadzone są zwykle na materiale pobranym z 16–18-dniowych zarodków szczura, których hipokamp jest już dobrze uformowany i łatwy do odróżnienia od innych struktur mózgu. Idealna hodowla neuronalna z definicji powinna zawierać jedynie komórki nerwowe. Oczywiście w materiale „startowym” hodowli oprócz neuronów znajdują się liczne komórki makro- i mikrogleju i inne elementy tkanki nerwowej. Ich eliminacja z hodowli możliwa jest dzięki zastosowaniu specjalnych podłoży (mediów). Od czasu pierwszej, wspomnianej już hodowli przeprowadzonej w r. 1977 przez Bankera i Cowana [17] znacząco poprawiła się metodyka laboratoryjna z jednoczesnym udoskonaleniem stosowanych mediów odżywczych [23, 24]. Nowoczesne metody hodowli umożliwiają uzyskanie prawie czystych (pozbawionych gleju) kultur neuronalnych o wielotygodniowym przeżyciu.

Najczęściej stosowanym medium w hodowli embrionalnych komórek nerwowych hipokampa jest opracowany przez Brewera i wsp. Neurobasal (NB) z dodatkiem suplementu B27, który zapobiega niepożądanemu rozplemowi gleju w kulturze [25]. Hodowle z użyciem NB zawierają < 5% komórek glijowych. NB jest medium stosowanym nie tylko w hodowlach pochodzących z mózgowi embrionów i osesków, ale również pobranych od dorosłych zwierząt [26]. Ze względu jednak na zawartość witaminy E, dysmutazy nadtlenkowej, glutationu i innych antyoksydantów NB nie powinno być stosowane w modelach oceniających procesy stresu oksydacyjnego [25]. Innym popularnym medium jest MEM+ (ang. *minimal essential medium*). MEM+ nie zawiera antyoksydantów, dlatego jest podstawowym podłożem w tego typu doświadczeniach [27]. Medium to nie zapewnia jednak tak dobrego przeżycia neuronów jak NB, ponadto zawarta w jego składzie surowica generuje niepożądany w kulturach neuronalnych rozplem gleju. Xie i wsp. opracowali nowe obiecujące podłoże, będące kombinacją NB i MEM+. Medium to, zwane NM-2, umożliwia wykonywanie szeregu doświadczeń na kulturach neuronalnych dostępnych przy użyciu NB i jednoczesne badania gospodarki wolnorodnikowej w tej samej hodowli. Zawartość komórek gleju w NM-2 nie przekracza 2–3% [28].

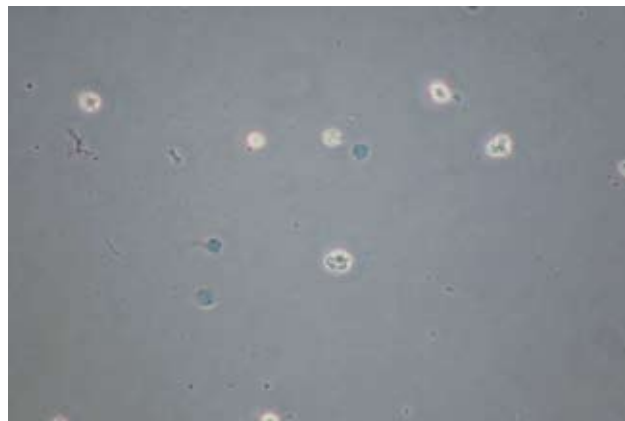
W niektórych ośrodkach do medium dodawane są antybiotyki (najczęściej streptomycyna i penicylina) oraz leki przeciwgrzybicze. Zapobieganie w ten sposób kontaminacji kultury tkankowej stosowane jest zwykle w hodowlach długoterminowych. Z naszych doświadczeń wynika, że przy zachowaniu warunków pełnej sterylności nie jest to konieczne. Należy również pamiętać, że dodatek np. penicyliny, ze względu na jej działanie prodrżawkowe, w sposób znaczący może zaburzyć wyniki badań elektrofizjologicznych przy użyciu mikroelektrod komórkowych.

Biologiczny materiał wyjściowy do założenia hodowli rozproszonych komórek nerwowych hipokampa stanowią najczęściej mózgowia pobrane od 16–18-dniowych embrionów szczura lub od zwierząt postnatalnych. Obecnie,

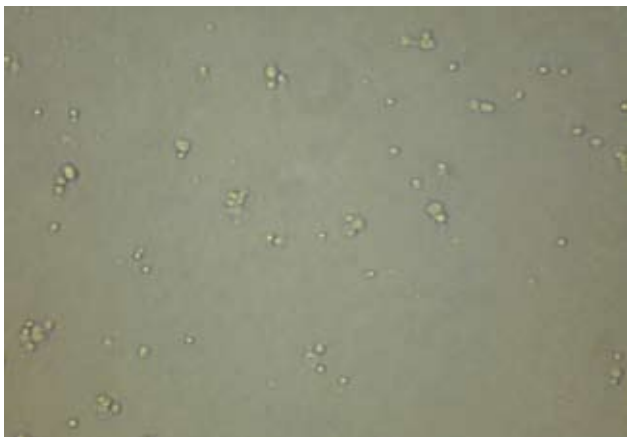
jak wspomniano wcześniej, możliwe jest również wyprawienie hodowli z mózgu dorosłego zwierzęcia [26, 29]. Metodyka mikrochirurgicznej izolacji hipokampa z mózgu opisana jest w wielu opracowaniach dotyczących hodowli tkankowych neuronów [np. 30]. Hipokampy natychmiast po wyizolowaniu powinny zostać umieszczone w medium (np. Neurobasal/B27) i poddane dalszym procedurom hodowli. Opracowana przez Brewera substancja płynna pod nazwą Hibernate E umożliwia przeżycie zatopionych w niej embrionalnych komórek nerwowych jeszcze przez co najmniej tydzień od pobrania materiału w temperaturze 4–8°C. Hibernate E pozwala więc na konieczne nieraz z różnych względów opóźnienie rozpoczęcia procedury hodowli oraz na transport materiału do innych laboratoriów.

W naszym ośrodku prowadzimy hodowle neuronalne z wyizolowanych i zawieszonych w Hibernate E hipokampów 18-dniowych embrionów szczura (BrainBits Inc. USA). Po otrzymaniu materiału należy przygotować płytki do hodowli. Standardowo stosowane są płytki plastikowe 4-, 6- lub 24-dolkowe. Pokrywa się je poly-D-lizyną w stężeniu 10 µg/ml, a następnie dokładnie suszy. Poly-D-lizyna warunkuje dobrą przyczepność komórek do płytki. Substancją alternatywną, rzadziej używaną, jest poly-DL-ornityna [31]. Niekiedy płytki z poly-D-lizyną są dodatkowo pokrywane lamininą-1, która poprawia adhezję do podłoża i przeżycie komórek hodowli [32].

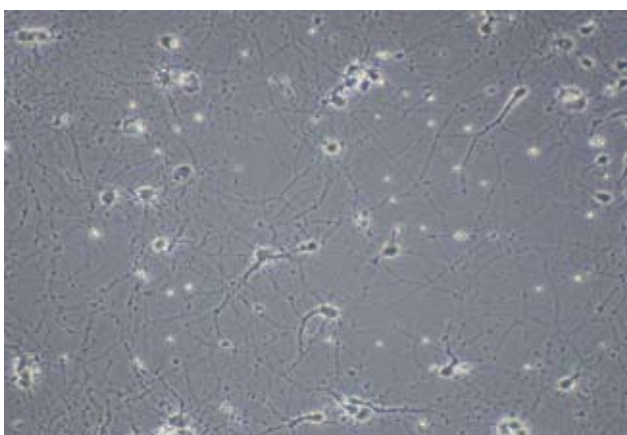
W następnej kolejności wykonuje się mechaniczne rozdrobienie hipokampów pipetą automatyczną do uzyskania jednolitej zawiesiny komórkowej. Po odwirowaniu i zlaniu nadsącza zawiesinę komórkową przenosi się do medium. W naszej pracowni stosujemy Neurobasal/B27 z dodatkiem glutaminy. Celem oceny odsetka żywych komórek wykonuje się test z 0,4% błękitem trepanu – komórki martwe barwią się na niebiesko (ryc. 1). Następnie przenosi się zawiesinę komórek o pożądanej gęstości na przygotowane wcześniej płytki z poly-D-lizyną i wstawia do inkubatora (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Po 4–5 dniach inkubacji komórki są dobrze zróżnicowane i mogą być używane w eksperymentach (ryc. 2 i 3).



Ryc. 1. Test z 0,4% błękitem trypanu – komórki martwe wybarwione na niebiesko 0.4% Trypan blue exclusion test – dead cells taking blue dye

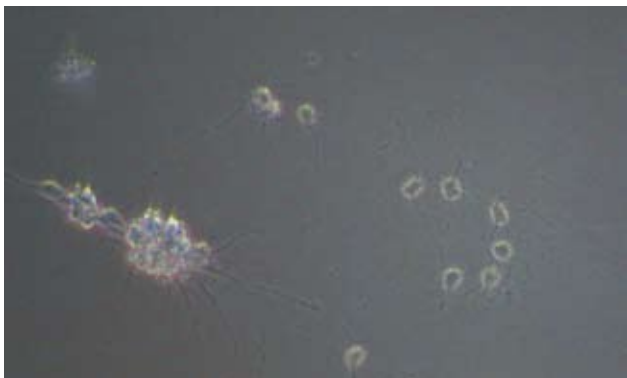


Ryc. 2. Neurony hipokampa – pierwszy dzień hodowli *Hippocampal neurons* – 1<sup>st</sup> day of culture



Ryc. 3. Neurony hipokampa – czwarty dzień hodowli. Komórki nerwowe dobrze zróżnicowane, widoczna dość gęsta sieć wypustek neuronalnych *Hippocampal neurons* – 4<sup>th</sup> day of culture. Well differentiated neuronal cells with good-formed tree of neuronal processes

Głównym czynnikiem determinującym powodzenie hodowli jest gęstość neuronów na podłożu. Zwykle stosuje się 50–100 kom./mm<sup>2</sup>. Zbyt duża gęstość komórek powoduje powstawanie niepożądanych agregatów komórkowych (ryc. 4). Hodowla neuronalna o małej gęstości nie powinna trwać dłużej niż dwa tygodnie ze względu na samoistną śmierć tych komórek. Aby utrzymać hodowlę dłużej stosuje się bFGF (ang. *basic fibroblast growth factor*), który umożliwia jej przeżycie nawet do pięciu tygodni [33].



Ryc. 4. Agregat komórek nerwowych hipokampa. Obok prawidłowe neurony *Complex of aggregated neurons. Normal neurons besides*

## ZASTOSOWANIE HODOWLI NEURONALNYCH W WYBRANYCH MODELACH NEUROPROTEKCJI

Jak wynika z definicji neuroprotekcji, jest ona postępowaniem mającym na celu zapobieganie destrukcji tkanki nerwowej, zachodzącej na skutek działania określonego czynnika patogennego. W badaniach doświadczalnych najczęściej stosowanymi czynnikami uszkadzającymi jest niedotlenienie lub niedotlenienie–hypoglikemia (ang. *oxygen-glucose deprivation*), które w praktyce klinicznej w sposób uproszczony odpowiadają udarowi niedokrwienemu mózgu. Drugim szeroko stosowanym modelem neurodegeneracji doświadczalnej jest uszkodzenie ekscytotoksyczne, w którym najczęściej wykorzystuje się kwas kainowy lub agonistów receptorów dla aminokwasów pobudzających. Dużą zaletą tego modelu jest fakt, że procesy ekscytotoksyczności zachodzą w większości schorzeń neurologicznych prowadzących do uszkodzenia tkanki nerwowej. Dotyczy to nie tylko stanów ostrych (udar mózgu, drgawki, stan padaczkowy), ale również długotrwałych postępujących chorób neurodegeneracyjnych. Ze względu na narastającą zachorowalność na te ostatnie wykorzystuje się również eksperymentalne uszkodzenia imitujące chorobę Alzheimera (uszkodzenie indukowane beta-amyloidem) [34, 35].

Wrażliwość hodowli embrjonalnych neuronów na procesy ekscytotoksyczności jest zależna od czasu zadziałania czynnika uszkadzającego. W badaniach Kajty i wsp. obserwowano uszkodzenie neuronów korowych szczura, zachodzące za pośrednictwem receptorów NMDA dopiero w hodowli 12-dniowej, podczas gdy w hodowli 7-dniowej neurony te były jeszcze niezmienione [36]. Związane jest to najprawdopodobniej z procesem „dojrzwiania” ekspresji genetycznej podjednostek receptora aminokwasów pobudzających w rozwijającym się mózgu [37].

Lista substancji potencjalnie neuroprotekcyjnych jest długa i obejmuje przede wszystkim wspomniane związki i substancje chemiczne. W modelach neuroprotekcji wykorzystuje się ich działanie na określone „punkty uchwytu” w złożonym i w skrócie opisanym powyżej procesie neurodegeneracji.

W hodowlach neuronalnych (organotypowych i rozproszonych) obiecujące efekty neuroprotekcyjne uzyskano z antagonistami receptorów dla aminokwasów pobudzających [38–41], agonistami dla receptorów neuroprzekazników hamujących [35, 42] i blokerami kanału wapniowego [43]. Coraz większą uwagę poświęca się również neuroprotekcijnemu działaniu neurosteroidów [44], antybiotyków beta-laktamowych [45] (nasilają ekspresję transportera glutaminianu) i melatoniny [46]. Wszystkie te substancje znamienne poprawiały przeżycie neuronów poddanych działaniu czynnika uszkadzającego.

Ze względu na wielokierunkowy mechanizm działania dobre właściwości neuroprotekcyjne w badaniach doświadczalnych na kulturach neuronalnych wykazywały niektóre z antyepileptyków [47–51]. Jak wynika z przeglądu piśmiennictwa, gama leków i substancji potencjalnie neuroprotekcyjnych wciąż się powiększa. Szczególnie duże nadzieje budzą immunofiliny, regulujące transport jonów

przez błony mitochondrialne [52], oraz endokannabinoidy, blokujące presynaptyczne uwalnianie glutaminianu [53].

Niestety, dotychczasowe doniesienia dotyczące neuroprotekcji, chociaż często bardzo obiecujące w wielu modelach *in vitro*, nie przyniosły znaczącego postępu klinicznego. Jednak ze względu na wciąż wzrastającą liczbę

chorób naczyniowych mózgu i postępujących procesów neurozwyrodnieniowych neuroprotekcja stanowi wyzwanie i szansę współczesnej neurologii. Dotychczasowe dane naukowe wskazują na to, że możliwość prowadzenia badań nad żywą tkanką nerwową w postaci hodowli neuronalnej znacznie taką szansę przybliża.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Kułak W., Sobaniec W.: Współczesne dane na temat uszkodzenia komórki nerwowej. *Medycyna* 2000, 1991:15/16, 24–27.
- [2] Kułak W., Sobaniec W., Wojtał K. et al.: Calcium modulation in epilepsy. *Pol. J. Pharmacol.*, 2004:56, 29–41.
- [3] Choi DW.: Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.*, 1992:23, 1261–1276.
- [4] Artemowicz B., Sobaniec W.: Rola aminokwasów pobudzających w padaczkę i drgawkach. *Epileptologia*, 1997:5, 189–207.
- [5] Sadurska B., Szumiało M.: Fosfolipazy A w komórkach ssaków – budowa, właściwości, rola fizjologiczna i patologiczna. *Post. Hig. Med. Dosw.*, 2005:59, 116–123.
- [6] Muir K.W., Tyrrell P., Sattar N., Warburton E.: Inflammation and ischaemic stroke. *Curr. Opin. Neurol.*, 2007:20, 334–342.
- [7] Rejda K.: Strategie neuroprotekcji w postępowaniu z pacjentem z udarem niedokrwiennym mózgu. *Neurol. Prakt.*, 2007:5, 8–14.
- [8] Graham S.H., Chen J.: Programmed cell death in cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2001:21, 99–109.
- [9] Yakovlev A.G., Faden A.I.: Mechanism of neural cell death: implications for development of neuroprotective strategies. *Neuro Rx*, 2004:1, 5–16.
- [10] Formigli L., Papucci L., Tani A. et al.: Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncletic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J. Cell Physiol.*, 2000:182, 41–49.
- [11] Sendrowski K., Sobaniec-Łotowska M.E., Sobaniec W.: Aponecrosis of hippocampal neuronal cells in the experimental model of valproate encephalopathy. *Acta Neuropathol.*, 2004:108, 364 (abstract).
- [12] Sobaniec W., Kułak W., Boćkowski L. et al.: Badania procesów uszkodzenia układu nerwowego i możliwości neuroprotekcji. *Przeg. Lek.*, 2001:58 (Suppl. 1), 41–47.
- [13] Ferro D.M.: Protecting neurons. *Epilepsia*, 2005:46 (Suppl. 7), 45–51.
- [14] Mains R.E., Patterson P.H.: Primary cultures of dissociated sympathetic neurons. Establishment of long-term growth in culture and studies of differentiated properties. *J. Cell Biol.*, 1973:59, 329–345.
- [15] Fischbach G.D., Dichter M.A.: Electrophysiologic and morphologic properties of neurons in dissociated chick spinal cord cells cultures. *Dev. Biol.*, 1974:37, 100–116.
- [16] Lasher L.S.: The uptake of [3H] GABA and differentiation of stellate neurons in cultures of dissociated postnatal rat cerebellum. *Brain Res.*, 1974:69, 235–254.
- [17] Banker G.A., Cowan W.M.: Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res.*, 1977:126, 297–342.
- [18] Super H., Soriano E.: The organization of the embryonic and early postnatal murine hippocampus. II. Development of entorhinal, commissural, and septal connections studied with the lipophilic tracer Dil. *J. Comp. Neurol.*, 1994:344, 101–120.
- [19] Phelps E.: Human emotion and memory: interactions of the amygdala and hippocampal complex. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2004:14, 198–202.
- [20] Laakso M. MRI of hippocampus in incipient Alzheimer's disease. 1996, URL: <http://www.uku.fi/neuro/37the.htm>
- [21] Sendrowski K., Sobaniec W., Sobaniec-Łotowska M., Artemowicz B.: Topiramate as a neuroprotectant in the experimental model of febrile seizures. *Adv. Med. Sc.*, 2007:52 (Suppl. 1), 161–165.
- [22] Conn P.J., Pin J.P.: Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1997:37, 205–237.
- [23] Romijn H. J., Van Huizen F., Walters P. S.: Towards an improved serum-free, chemically defined medium for long-term culturing of cerebral cortex tissue. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 1984:8, 301–334.
- [24] Romijn H. J.: Development and advantages of serum-free, chemically defined nutrient media for culturing of nerve tissue. *Biol. Cell*, 1988:63, 263–268.
- [25] Brewer G.J., Torricelli J.R., Evege E.K. et al.: Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented neurobasal, a new serum-free medium combination. *J. Neurosci. Res.*, 1993:35, 567–576.
- [26] Brewer G.J.: Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons. *J. Neurosci. Methods*, 1997:71, 143–155.
- [27] Mattson M.P., Barger S.W., Begley J.G. et al.: Calcium, free radicals, and excitotoxic neuronal death in primary cell culture. *Methods Cell Biol.*, 1995:46, 187–216.
- [28] Xie C, Markesbery WR, Lovell MA.: Survival of hippocampal and cortical neurons in a mixture of MEM+ and B27-supplemented Neurobasal medium. *Free Radical Biol. Med.*, 2000:5, 665–672.
- [29] Brewer G.J., Torricelli J.R.: Isolation and culture of adult neurons and neurospheres. *Nat. Protocol*, 2007:6, 1–9.
- [30] Poindron P, Pigué P, Forster E. (eds.): New methods for culturing cells from nervous tissues. *Bio Valley Monogr.*, Karger, Basel, 2005.
- [31] Letourneau P.C.: Cell-to-substratum adhesion in neuronal morphogenesis. *Dev. Biol.*, 1975:44, 92–101.
- [32] Mercurio A.M.: Laminin: multiple forms, multiple receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1990:2, 845–849.
- [33] Ray J., Peterson D.A., Schinstine M. et al.: Proliferation, differentiation and long-term culture of primary hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993:90, 3602–3606.
- [34] Ren R.F., Flanders K.C.: Transforming growth factors-beta protect primary rat hippocampal neuronal cultures from degeneration induced by beta-amyloid peptide. *Brain Res.*, 1996:732, 16–24.
- [35] Paula-Lima A.C., De Felice F.G., Brito-Moreira J. et al.: Activation of GABA(A) receptors by taurine and muscimol blocks the neurotoxicity of beta-amyloid in rat hippocampal and cortical neurons. *Neuropharmacology*, 2005:49, 1140–1148.
- [36] Kajta M., Lasoń W., Bień E. et al.: Neuroprotective effect of estrone on NMDA-induced toxicity in primary cultures of rat cortical neurons are independent of estrogen receptors. *Pol. J. Pharmacol.*, 2002:54, 727–729.
- [37] McDonnell J.W., Johnston M.V.: Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res. Rev.*, 1990:15, 41–70.
- [38] Barth A., Barth L., Morrison R.S. et al.: bFGF enhances the protective effects of MK-801 against ischemic neuronal injury *in vitro*. *Neuroreport*, 1996:7, 1461–1464.
- [39] Pringle A.K., Iannotti F., Wilde G.J. et al.: Neuroprotection by both NMDA and non-NMDA receptor antagonists in *in vitro* ischemia. *Brain Res.*, 1997:755, 36–46.
- [40] May P.C., Robison P.M., Fuson K.S.: Stereoselective neuroprotection by novel 2,3-benzodiazepine non-competitive AMPA antagonist against non-NMDA receptor-mediated excitotoxicity in primary rat hippocampal cultures. *Neurosci. Lett.*, 1999:262, 219–221.

- [41] Adamchik Y., Baskys A.: Glutamate-mediated neuroprotection against N-methyl-D-aspartate toxicity: a role for metabotropic glutamate receptors. *Neuroscience*, 2000:99, 731–736.
- [42] Kristensen B.W., Noraberg J., Zimmer J.: The GABA(A) receptor agonist THIP is neuroprotective in organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Res.*, 2003:973, 303–306.
- [43] Barone F.C., Lysko P.G., Price W.J. et al.: SB 201823-A antagonizes calcium currents in central neurons and reduces the effects of focal ischemia in rats and mice. *Stroke*, 1995:26, 1683–1689.
- [44] Jellinck P.H., Lee S.J., McEwen B.S.: Metabolism of dehydroepiandrosterone by rat hippocampal cells in culture: possible role of aromatization and 7-hydroxylation in neuroprotection. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2001:78, 313–317.
- [45] Lipski J., Wan C.K., Bai J.Z. et al.: Neuroprotective potential of ceftriaxone in *in vitro* models of stroke. *Neuroscience*, 2007:146, 617–629.
- [46] Skaper S.D., Ancona B., Facci L. et al.: Melatonin prevents the delayed death of hippocampal neurons induced by enhanced excitatory neurotransmission and the nitridergic pathway. *FASEB J.*, 1998:12, 725–731.
- [47] Macdonald R.L.: Anticonvulsant drug actions on neurons in cell culture. *J. Neural. Transm.*, 1988:72, 173.
- [48] Frandsen A., Quistorff B., Schousboe A.: Phenobarbital protects cerebral cortex neurones against toxicity induced by kainate but not by other excitatory amino acids. *Neurosci. Lett.*, 1990:111, 233–238.
- [49] Wallis R.A., Panizzon K.L., Fairchild M.D. et al.: Protective effects of felbamate against hypoxia in the rat hippocampal slice. *Stroke*, 1992:23, 547–551.
- [50] Poulsen C.F., Simeone T.A., Maar T.E. et al.: Modulation by topiramate of AMPA and kainate mediated calcium influx in cultured cerebral cortical, hippocampal and cerebellar neurons. *Neurochem. Res.*, 2004:29, 275–282.
- [51] Boscia F., Annunziato L., Tagliatela M.: Retigabine and flupirtine exert neuroprotective actions in organotypic hippocampal cultures. *Neuropharmacology*, 2006:51, 283–294.
- [52] Guo X., Dillman J.F., Dawson V.L. et al.: Neuroimmunophilins: novel neuroprotective and neurodegenerative targets. *Ann. Neurol.*, 2001:50, 6–16.
- [53] Marsicano G., Goodenough S., Monory K. et al.: CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science*, 2003:302, 84–88.

**Adres do korespondencji:**

Klinika Neurologii i Rehabilitacji Dziecięcej, Akademii Medycznej w Białymstoku, 15-274 Białystok, ul. J. Waszyngtona 17,  
e-mail: krsen@mp.pl