IN VITRO NERVOUS TISSUE CULTURE METHODS: A BRIEF REVIEW

DAVIT GHAZARYAN
Ph.D. Student at the Laboratory of Toxinology and Molecular Systematics,
L. A. Orbeli Institute of Physiology NAS RA,
davitscience@gmail.com

NAIRA AYVAZYAN
Head of the Laboratory of Toxinology and Molecular Systematics,
L. A. Orbeli Institute of Physiology NAS RA,
taipan@ysu.am

DOI: 10.54503/2579-2903-2023.1-186

Abstract

Nervous tissue investigation has always been in the interest of many scientists. Throughout the whole period of nervous system research, many investigations were conducted on animals in vivo to understand the underlying mechanisms of pathologies and pharmacological effects of medications. However, some research needs are challenging or cannot be fulfilled with in vivo research on animals. Many methods are developed to isolate and culture nervous tissue in vitro to investigate neuronal physiology, disease mechanisms, and drug safety in vitro.

Through in vivo studies of a particular organ system, numerous influences of the entire organism interfere with the precise scope of the study. Hence, it is not possible to eradicate the impacts of other organ systems and regulations of the organism before the study of the isolated system in scope. As a solution to this issue, the idea to isolate and keep the wanted tissue in vitro ascended. The tactic of culturing tissues was initiated about a century before. The tissue culture technique was first conducted with aggregated tissue particles, which limited the growth with the radial migration of cells from the tissue particle. Nevertheless, this method gave very restricted prospects for the study, which, successively, served as an opening move for the further development of the approaches.

The categories of studies that may be implemented with the tissue cultures embrace elementary studies on cellular metabolism, the regulation of gene expression, and the cell phenotype at different stages of development. Moreover, the tissue cultures can be applicated to immunology, pharmacology, toxicology, tissue regeneration, and transplantation.

In obtaining primary neuron cultures, alive cells are used from an organism. Then, these cells are cultivated in cultural media, where they have all the needed materials to maintain their normal life. Neurons have no capacity to divide, and in the primary cultures, they only grow and expand cellular outputs, which are axons and dendrites. Primary neurons can be gained from different parts of a rodent's brain, and depending on the study objective, that part can be the cortex, hippocampus, or cerebellum. These cultures, parallelly with neurons, may and may not contain glial

cells. In some instances, for example, when these cells are the study's objective, only glial cells may be cultured. As a source of primary cells can serve both embryonal and early postnatal animals.

Another type of culturing neuronal tissue, called organotypic culture, is to harvest and culture the whole tissue without disaggregating the cells. Compared to neuronal cell cultures, organotypic cultures are relatively difficult to obtain. Still, as they more accurately represent the complex structure and unity of nervous tissue, new tactics were desired to solve this problem. Steps frontward were the invention of the organotypic slice technique and the roller tube technique to culture organotypic brain slices. In these methods, the intact brain tissue slices are plated on coverslips and semipermeable membranes that are put in nutritious media.

Thanks to the technologies and methods of tissue engineering, another possible way to obtain a nervous cell culture is the usage of already differentiated somatic cells. These cells are harvested from different sources and can be reprogrammed into induced pluripotent stem cells. The latter is capable of proliferating and differentiating into new specialized cells, such as neurons.

As mentioned, in vitro neuronal culture methods have been developed for different research tasks. The resultant cultures resolve many problems for researchers, make the research more accessible, and allow the studies of isolated nervous tissue. However, they still are not capable of satisfying all desires, as they are limited in terms of lifecycle and cell number and do not embody the structural and functional complexity of the nervous tissue. Therefore, the approaches need to be enhanced, and more studies should be done regarding this topic to improve the similarity of the cultures to the actual natural nervous tissue.

This review summarizes the historical development, the methodological approaches, and the opportunities given by two- and three-dimensional nervous tissue cultures and organotypic brain slice cultures.

Keywords and phrases: nervous tissue, cell culture, tissue culture, organotypic culture

ՆՅԱՐԴԱՅԻՆ ՀՅՈՒՍՎԱԾՔԻ IN VITRO ԿՈՒԼՏԻՎԱՑՄԱՆ ՄԵԹՈԴՆԵՐ. ՀԱՄԱՌՈՏ ԱԿՆԱՐԿ

ԴԱՎԻԹ ՂԱԶԱՐՅԱՆ
ՀՀ Գիտությունների ազգային ակադեմիայի
Լ. Ա. Օրբելու անվան ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտի
թունաբանության և մոլեկուլային սիստեմատիկայի լաբորատորիայի
ասպիրանտ
davitscience@gmail.com

ՆԱԻՐԱ ԱՅՎԱԶՅԱՆ
ՀՀ Գիտությունների ազգային ակադեմիայի
Լ. Ա. Օրբելու անվան ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտի
թունաբանության և մոլեկուլային սիստեմատիկայի լաբորատորիայի վարիչ
taipan@ysu.am

Համառոտագիր

Նյարդային հյուսվածքի հետազոտությունը միշտ եղել է շատ գիտնականների հետաքրքրության շրջանակում: Նյարդային համակարգի հետազոտության ողջ ժամանակահատվածում բազմաթիվ հետազոտություններ են իրականացվել կենդանիների վրա in vivo՝ հասկանալու համար ախտաբանությունների հիմքում ընկած մեխանիզմները և դեղերի դեղաբանական ազդեցությունները: Այնուամենայնիվ, որոշ հետազոտական կարիքներ դժվար են կամ չեն կարող բավարարվել կենդանիների վրա in vivo հետազոտություններով: Մշակվել են բազմաթիվ մեթոդներ՝ in vitro նյարդային հյուսվածքը մեկուսացնելու և մշակելու համար՝ հետազոտելու նեյրոնների ֆիզիոլոգիան, հիվանդությունների մեխանիզմները և դեղամիջոցների անվտանգությունը in vitro:

Որոշակի օրգան համակարգի in vivo ուսումնասիրությունների դեպքում ամբողջ օրգանիզմի բազմաթիվ ազդեցությունները խանգարում են հետազոտության կոնկրետ շրջանակին: Հետևաբար, հնարավոր չէ վերացնել օրգանիզմի այլ օրգան համակարգերի և կարգավորման ազդեցությունները, նախքան առանձնացված թիրախային համակարգի ուսումնասիրությունը: Որպես այս հարցի լուծում՝ առաջ է քաշվել հետազոտվող հյուսվածքը in vitro մեկուսացնելու և պահելու գաղափարը: Հյուսվածքների մշակման մարտավարությունը սկսվել է մոտ մեկ դար առաջ: Հյուսվածքների կուլտուրայի տեխնիկան առաջին անգամ իրականացվել է ագրեգացված

հյուսվածքային մասնիկներով, որոնցում աճը սահմանափակվել է հյուսված-քային մասնիկից բջիջների ճառագայթային գաղթով: Այնուամենայնիվ, այս մեթոդը շատ սահմանափակ հեռանկարներ է տվել ուսումնասիրության համար, ինչը սկիզբ է տվել մոտեցումների հետագա զարգացմանը:

Հետազոտությունների խմբերը, որոնք կարող են իրականացվել հյուսվածքային կուլտուրաներով, ներառում են տարրական ուսումնասի-րություններ բջջային նյութափոխանակության, գեների արտահայտման կարգավորման և զարգացման տարբեր փուլերում բջիջների ֆենոտիպի վերաբերյալ: Ավելին, հյուսվածքային կուլտուրաները կարող են կիրառվել իմունաբանության, դեղաբանության, թունաբանության, հյուսվածքների վերականգնման և փոխպատվաստման համար:

Առաջնային նեյրոնային կուլտուրաներ ստանալու համար օգտա-գործվում են օրգանիզմի կենդանի բջիջները: Այդ բջիջները կուլտիվացվում են կուլտուրային միջավայրում, որտեղ նրանք ունեն բոլոր անհրաժեշտ նյութերը՝ իրենց բնականոն կենսագործունեությունն ապահովելու համար: Նեյրոնները բաժանվելու ունակություն չունեն, և առաջնային կուլտու-րաներում դրանք միայն աճում և ընդլայնում են բջջային ելուստները, որոնք աքսոններն և դենդրիտներն են: Առաջնային նեյրոնները կարելի է ձեռք բերել կրծողի ուղեղի տարբեր մասերից, և կախված ուսումնասիրության նպատակից՝ այդ մասը կարող է լինել կեղևը, հիպոկամպը կամ ուղեղիկը: Այս կուլտուրաները, նեյրոնների հետ զուգահեռ, կարող են պարունակել կամ չպարունակել գլիալ բջիջներ: Որոշ դեպքերում, օրինակ, երբ գլիալ բջիջներն են հետազոտության թիրախը, կարող են կուլտիվացվել միայն այդ բջիջները: Առաջնային բջիջների աղբյուր կարող են ծառայել ինչպես սաղմնային, այնպես էլ վաղ հետծննդյան շրջանի կենդանիները:

Նեյրոնային հյուսվածքի մեկ այլ տեսակ, որը կոչվում է օրգա-նոտիպային կուլտուրա, ամբողջ հյուսվածքի ձեռքբերումն ու մշակումն է առանց բջիջների առանձնացման: Նեյրոնային բջիջների կուլտուրաների համեմատ օրգանոտիպային կուլտուրաներ ձեռք բերելը համեմատաբար դժվար է: Այդուհանդերձ, քանի որ դրանք ավելի ճշգրիտ են ներկայացնում նյարդային հյուսվածքի բարդ կառուցվածքն ու միասնությունը, այս խնդիրը լուծելու համար նոր մոտեցումներ են պահանջվում: Առաջընթաց քայլերից էին օրգանոտիպային հատվածային տեխնիկայի և պտտվող անոթի տեխնիկաները՝ ուղեղի օրգանոտիպային շերտեր մշակելու համար: Այս մեթոդներում ուղեղային ինտակտ հյուսվածքի կտորները տեղադրվում են

ծածկապակիների և կիսաթափանցիկ թաղանթների վրա, որոնք դրվում են սննդային միջավայրում:

Հյուսվածքների ճարտարագիտության տեխնոլոգիաների մեթոդների շնորհիվ նյարդային բջիջների կուլտուրա ստանալու մեկ այլ հնարավոր միջոց է արդեն տարբերակված մարմնական բջիջների օգտագործումը: Այս բջիջները հավաքվում են տարբեր աղբյուրներից և կարող են վերածրագրավորվել ինդուկացված պլյուրիպոտենտ ցողունային բջիջների: Վերջինս ունակ է բազմանալու և տարբերակվելու նոր մասնագիտացված բջիջների, ինչպիսիք են նեյրոնները:

Ինչպես նշվեց, in vitro նեյրոնային կուլտուրայի մեթոդները մշակվել են տարբեր հետազոտական առաջադրանքների համար: Ստացված կուլտուրաները հետազոտողների համար լուծում են բազմաթիվ խնդիրներ, հետազոտությունը դարձնում ավելի մատչելի, և թույլ են տալիս ուսումնասիրել մեկուսացված նյարդային հյուսվածքը: Այնուամենայնիվ, նրանք դեռևս ի վիճակի չեն բավարարելու բոլոր կարիքները, քանի որ սահմանափակ են կյանքի ցիկլի և բջիջների քանակի առումով և չեն մարմնավորում նյարդային հյուսվածքի կառուցվածքային և ֆունկցիոնալ բարդությունը: Հետևաբար, մոտեցումները պետք է ընդլայնվեն, և պետք է ավելի շատ ուսումնասիրություններ կատարվեն այս թեմայի շուրջ՝ բարելավելու կուլտուրաների նմանությունը իրական բնական նյարդային հյուսվածքին:

Այս ակնարկն ամփոփում է երկչափ և եռաչափ նյարդային հյուսվածքների կուլտուրաների և ուղեղի հատվածային օրգանատիպային կուլտուրաների պատմական զարգացումը, մեթոդաբանական մոտեցումները և ընձեռած հնարավորությունները:

Բանալի բառեր և բառակապակցություններ. նյարդային հյուսվածք, բջջային կուլտուրա, հյուսվածքային կուլտուրա, օրգանոտիպիկ կուլտուրա:

МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НЕРВНОЙ ТКАНИ IN VITRO: КРАТКИЙ ОБЗОР

ДАВИД КАЗАРЯН
Институт физиологии им. Л. А. Орбели НАН РА
аспирант лаборатории токсинологии и молекулярной систематики
davitscience@gmail.com,

НАИРА АЙВАЗЯН
Институт физиологии им. Л. А. Орбели НАН РА,
заведующая лабораторией токсинологии и молекулярной систематики
taipan@ysu.am

Аннотация

Исследование нервной ткани всегда интересовало многих ученых. На протяжении всего периода изучения нервной системы проводилось множество исследований на животных in vivo для понимания глубинных механизмов патологий и фармакологического действия лекарственных препаратов. Тем не менее некоторые исследовательские потребности являются сложными или не могут быть удовлетворены с помощью исследований на животных in vivo. Разработано множество методов выделения и культивирования нервной ткани in vitro для исследования физиологии нейронов, механизмов заболевания и безопасности лекарств in vitro.

В исследованиях in vivo конкретной системы органов многочисленные влияния всего организма мешают точному исследованию. Следовательно, невозможно искоренить влияние других систем органов и регуляций организма для изучения изолированной системы интереса. В качестве решения этой проблемы возникла идея выделения и сохранения нужной ткани in vitro. Тактика культивирования тканей была начата примерно за столетие до этого. Техника культивирования ткани была впервые применена к агрегированным частицам ткани, где рост ограничивался радиальной миграцией клеток из частицы ткани. Тем не менее этот метод давал очень ограниченные перспективы для исследования, что впоследствии послужило начальным шагом для дальнейшего развития подходов.

Категории исследований, которые могут быть реализованы с культурами тканей, охватывают элементарные исследования клеточного метаболизма, регуляции экспрессии генов и фенотипа клеток на разных стадиях развития. Кроме того, культуры тканей могут применяться в иммунологии, фармакологии, токсикологии, регенерации тканей и трансплантации.

При получении первичных культур нейронов используют живые клетки организма. Затем эти клетки культивируют в культуральных средах, где у них есть все необходимые материалы для поддержания нормальной жизнедеятельности. Нейроны не обладают способностью делиться, и в первичных

культурах они только растут и расширяют клеточные отростки, которые представляют собой аксоны и дендриты. Первичные нейроны можно получить из разных частей мозга грызунов, и в зависимости от цели исследования этой частью может быть кора, гиппокамп или мозжечок. Эти культуры, наряду с нейронами, могут содержать, а могут и не содержать глиальных клеток. В некоторых случаях, например, когда эти клетки являются целью исследования, можно культивировать только глиальные клетки. Источником первичных клеток могут служить как эмбриональные, так и ранние постнатальные животные.

Другой тип культивирования нейронной ткани, называемый органотипической культурой, заключается в сборе и культивировании всей ткани без дезагрегации клеток. По сравнению с культурами нейрональных клеток получить органотипические культуры относительно сложно. Тем не менее, поскольку они более точно отражают сложную структуру и единство нервной ткани, для решения этой проблемы требовались новые тактики. Шагами вперед было изобретение метода органотипических срезов и метода роликовых пробирок для культивирования органотипических срезов мозга. В этих методах срезы интактной мозговой ткани высевают на покровные стекла и полупроницаемые мембраны, которые помещают в питательную среду.

Другим возможным способом получения культуры нервных клеток, благодаря технологиям и методам тканевой инженерии, является использование уже дифференцированных соматических клеток. Эти клетки собираются из разных источников и могут быть перепрограммированы в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. Последняя способна пролиферировать и дифференцироваться в новые специализированные клетки, например нейроны.

Как уже упоминалось, методы культуры нейронов in vitro были разработаны для различных исследовательских задач. Полученные культуры решают многие проблемы для исследователей, делают исследования более доступными и позволяют изучать изолированную нервную ткань. Однако они еще не способны удовлетворить все нужды, так как ограничены по жизненному циклу и количеству клеток и не воплощают структурно-функциональную сложность нервной ткани. Таким образом, подходы необходимо улучшить, и необходимо провести дополнительные исследования по этой теме, чтобы улучшить сходство культур с реальной природной нервной тканью.

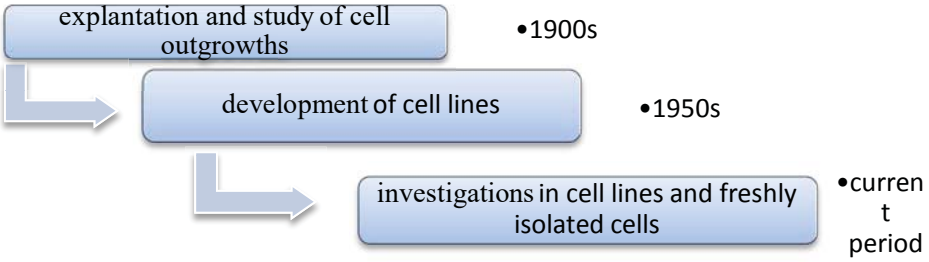
В этом обзоре обобщены историческое развитие, методологические подходы и возможности, предоставляемые двух- и трехмерными культурами нервной ткани и культурами органотипических срезов мозга.

Ключевые слова и словосочетания: нервная ткань, клеточная культура, тканевая культура, органотипическая культура.

Introduction

During in vivo examinations of a particular organ system, many factors of the whole organism interfere with the specific scope of research. During in vivo research, it is impossible to eliminate influences of other organ systems and regulations of the organism and investigate the isolated system of interest. To solve this problem, the idea of isolating maintaining of the desired tissue in vitro arose. The approach of culturing tissues was originated about a century ago. In the evolution of the technique, three stages can be denoted: first step, Harrison, Carrel, and others tried to explant and study the outgrowth from cells **[17, 2]**; the second step was the development of cell lines, both limited **[18]** and continuous **[7, 14]**; and the third, contemporary period, is the investigation of gene expression in cell lines and freshly isolated cells. Step by step, the method was changed from simply exploring into a robust instrument in cell and molecular biology, virology, cellular pathology, bioengineering, and industrial pharmaceutics.

Chart 1: Tissue culturing method evolution stages



The tissue culture technique was first elaborated with non-disaggregated tissue fragments, and growth was limited with the migration of cells from the tissue fragment radially. However, this approach gave very limited opportunities for the research, which, in turn, served as a starting point for the further improvement of the methods.

The types of investigation that can be conducted using the tissue culture are summarized in ***Table 1***. These include basic studies on cellular metabolism, the regulation of gene expression and the cell phenotype at different stages of development, and the application to immunology, pharmacology, toxicology, and tissue regeneration and transplantation.

Table 1: Different areas of tissue culture method usage **[44, 11]**

Intracellular activity	**Genomics**	**Cell to cell interactions**	**Cell products**
• DNA transcription • protein synthesis • metabolism • apoptosis	• genetic analysis • transfection • immortalization	• morphogenesis • proliferation • adhesion • motility	• biotechnology • bioreactors • product harvesting
Immunology	**Pharmacology**	**Tissue engineering**	**Toxicology**
• epitopes • immune response • antibody production • signaling	• drug action • molecular targeting	• tissue constructs • matrices and scaffolds • stem cells	• infection • cytotoxicity • carcinogenesis • inflammation

Antiviral vaccine production and investigation of neoplasia were the first medical research directions that induced cell culture development. Emerging commercial supply of cultural media, sera, and antibiotics to manage the contaminations opened the doors for developing standardized conditions, making tissue cultures available to a dispersed range of interests. Nowadays, tissue culture is not extraordinary but a powerful research tool in many biomedical disciplines and biotechnology.

Another force for empowering tissue culture methods development has been the presentation of worry by many animal-rights groups about the unneeded usage of experimental animals **[41, 30]**. Although most accept that some animals will resume being required for preclinical trials of new medications, there is overall apprehension that extensive usage of animals for cosmetics development and similar actions are not morally defendable. Thus, there is continuing propaganda for more in vitro assays.

The culture of nervous tissue began at the beginning of the 20th century when neuronal outgrowth was detected in frog embryos attached to coverslips **[17]**. However, effective long-term culture of mammalian central nervous tissue was first accomplished years later with the Rollertube method **[13, 39]**.

Neurological research has not profited from working with bred cell lines from the normal nervous tissue, as it has not been possible in vitro without using the transformed cells. However, developments with human embryonic stem cell cultures

[42,46] indicate that this strategy may supply reproducing cultures that differentiate into neurons and provide valuable and distinct models for neuronal diseases **[8]**.
In cultures, cells need to attach to a base for growth, making intercellular interactions and behaving as integral tissue. Different cell types need different materials to attach, and for this reason, the dishes are treated with particular materials to enhance cell attachment. Neurons cannot tolerate untreated glass or plastic satisfactorily but demonstrate neurite outgrowth on collagen and poly-D-lysine. Neurite outgrowth is encouraged by the polypeptide nerve growth factor **[25]** other factors secreted by glial cells **[27, 9]**.

In mammals' central nervous system (CNS), neural stem cells (NSCs) can be isolated from embryonic and adult tissues **[28]**. Different research questions need neurons from different areas of the CNS. Therefore, it is essential to mind the possibilities of acquiring particular neuronal types. Embryonal NSCs can be isolated from multiple regions, while in the adult brain it can be performed only two regions, where cell proliferation occurs: the subventricular zone and the subgranular zone of the hippocampal dentate gyrus **[26]**.

Producing in vitro cultures of neuronal cells has been central to expanding the nervous system's performance knowledge. While different highly proliferating cells, such as epithelium, are relatively easy to maintain in vitro, culturing neuronal cells is incredibly complex because mature neurons are not dividing **[10]**. An approach to overcome this is to make secondary cell lines that are originated from neuronal tumors and were immortalized. These lines can grow effortlessly in cell culture and give unlimited cells. Another plus is minimized unevenness among cultures. The minus of these cell lines is that they show numerous dissimilarities with the cell type derived from them **[15]**.

Another application of the tissue culturing technique can be the treatment of some nervous system diseases with NSCs. Here the culturing method is an intermediate step for acquiring the cells and applying them to the target organism. In an animal model of multiple sclerosis, adult neuronal stem cells were obtained and injected into the affected mice **[33]**. The intervention showed some recovery of the pathological process. In another study with animal modes of impaired dopaminergic neurons **[32]**, neural stem cell implantation resulted in the recovery of lost neurons and neuroprotective effects.

Primary cell cultures are not immortal, and therefore the quantity of cells present for research is restricted and remains the same throughout the whole research. Consequently, it complicates the task, as more efforts should be made to keep these cells alive. Moreover, as animal tissues in vivo consist of several cell types, it is required to isolate the required cell type from others and determine the cleanliness of the resultant cultures, for instance, through immunocytochemistry **[16]** by cell lineage-specific markers **[23]**. For the primary neuronal cell cultures, it is required to isolate them from the glial cells as much as possible. Another essential consideration for primary cultures is obtaining ethical approvals and using animal or human cells **[35]**.

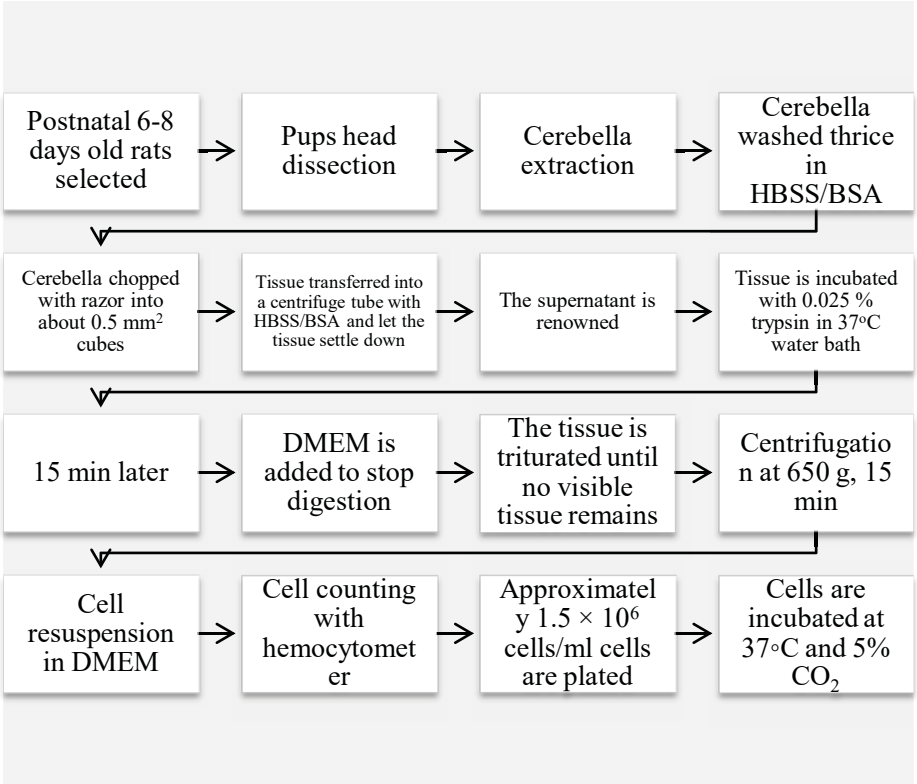
Sometimes the research tasks require the same environment for neurons as in vivo. However, the complex structure of the central nervous system (CNS) is not reconstructed in cultures; hence, other approaches, such as thin slice culture, have become valued. For investigating neuronal and glial physiology inside the environment of the physiologically relevant tissue setting **[4]**. The slice culturing methodology with a membrane interface ensures direct access to both CNS tissue and feeding medium, enabling experiments that would be impossible in vivo. The technique includes the settlement of brain slices on a semipermeable membrane insert **[20]**. The latter is assembled in a medium to balance the slices between medium and a humidified atmosphere. A thin layer of medium is let to cover the slice to ensure sufficient hydration and nutrient absorption without interfering with the gas exchange **[29]**. The modeled slices can be effectively maintained for up to several weeks. The described methods can be used to perform a broad assortment of investigations within pathology, immunology, and pharmacology for neural tissue **[5, 31]**.

Primary neuronal cell cultures

Primary neuron cultures are obtained via taking cells from an organism and cultivating them in cultural media. Neurons are not dividing, and hence in the primary cultures, they are only capable of growing and expanding outputs. Primary neurons can be obtained from rodent brain different parts, and depending on the research aim, it can be the cortex, hippocampus, or cerebellum **[15, 3]**. The cultures may contain neurons with or without glial cells. On some occasions, only glial cells may be cultured when these cells are in the scope of research **[43]**. As a primary cell source can serve both embryonal and early postnatal animals.

To enhance the adhesion of cells, the culture dishes and plates are coated with different compounds, such as poly-D-lysine **[22]**. One of the standard culture media used to grow neurons is Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) **[45]**. This medium contains essential compounds needed for the cells' survival. Neurons use glucose as the primary energy source; thus, high-glucose DMEM is preferred. In addition to glucose, sodium pyruvate can be used as a supplement to provide additional carbon and energy. Cell cultures are often contaminated with bacteria and fungi. To prevent these contaminations, antibiotics such as gentamycin are added **[21]**. To have no endothelial and glial cells in the culture, their reproduction can be stopped with a cytostatic cytosine arabinoside [24]. Other standard operations performed are the same as in other tissue cultures.

Chart 2: Main steps of primary cerebellar granular cells culture preparation **[24]**



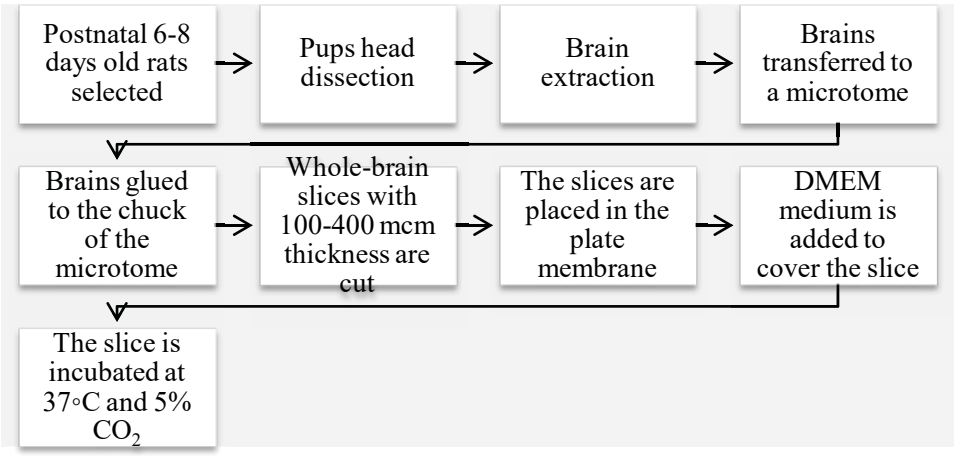
Organotypic nervous tissue cultures

Neuronal cell cultures, compared to organotypic cultures, are relatively easily affordable. However, as they do not represent nervous tissue's complex structure and unity, new approaches were desired to solve this problem. A step forward was the invention of the organotypic slice technique. The term "organotypic" was first used in Reinbold's work **[34]** in 1954 regarding the chicken embryo eye differentiation. More detailed technical approaches were described in further works. Gähwiler's group proposed the ***roller tube technique*** to culture organotypic brain slices **[12]**. In this method, the brain slices were plated on coverslips plasma. The plasma was coagulated with thrombin to attach the slices to the coverslip.

Later, the roller tube method was developed by Stoppini and coauthors **[38]**, and the ***semipermeable membrane technique*** was proposed. In this approach, the brain slices are put on a semipermeable membrane, and the medium is added under the membrane. This allows having two compartments, separated by a membrane, where the slices can be cultured above the membrane, and cells can be cultured under it. The membrane pores size governs if some cells and substrates can diffuse to slice and whether the slices can be cultured with the particular cells; thus, the method mimics the blood-brain barrier **[6]**.

To get the slices, the brain is removed, and with vibratome, whole-brain sagittal or coronal slices are cut with 100-400 micron thickness. As the tissue is native, the cutting process should be performed very carefully and quickly to minimize tissue integrity and functionality damage. After cutting, the slices are placed in the plate membrane, the general culturing media, such as DMEM, are added, and the slice is incubated in a 37°C and 5% CO_2 incubator. Medium is renowned weekly or twice a week.

Chart 3: Main steps of organotypic brain slice culture preparation



Induced pluripotent stem cell-derived neuronal cultures

Already differentiated somatic cells from different sources can be reprogramed into induced pluripotent stem cells (iPSCs) that are capable of proliferating and differentiating into new specialized cells **[36]**. After acquiring, the iPSCs are differentiated into neurons by in vitro neuroectodermal induction **[37]**. The resulting neurons can be maintained in the culture and represent the functional characteristics of the same type of neurons in the brain **[40]**.

The first stage of iPSC differentiation is primitive and neural rosette-type NSC generation in a two-dimensional (2D) setting **[47]**. This gives a patient-specific neuron culture that can serve as a model for investigating drug effects and underlying mechanisms of pathologies. Besides the 2D modality, three-dimensional (3D) cultures can be acquired. The 3D cultures are developed as neurospheres and floating 3D NSC cultures that are more similar to in vivo settings than 2D cultures **[19]**.

Adding to the 3D cultures of the artificial scaffolds and extracellular-matrix materials can mimic the anatomical structure of the brain, and consequently, the cultures will become more accurate for studying the pathology mechanisms **[1,48]**.

Table 2: Comparison of several neuronal culturing methods

Methods / Properties	Primary neuronal cell cultures	Immortalized neuronal cell line cultures	Organotypic nervous tissue cultures	Induced pluripotent stem cell-derived neuronal cultures
Source	animals	tumor cells	animals	cells
Similarity to the actual structure	low	low	high	low
Approachability	easy	hard	easy	hard
Life span	limited	unlimited	limited	limited

As described, methods of in vitro neuronal cultures have been developed to fulfill different research tasks. The resulting cultures solve many problems for researchers, simplify the research, allow investigating the nervous tissue isolated. However, these methods still cannot satisfy many needs, as they are limited in terms of lifespan and cell quantity and do not represent the structural and functional complexity of the nervous tissue. Consequently, the methods need to be improved, and more research should be done regarding this topic to maximize the similarity of the cultures to the natural nervous tissue.

REFERENCE

1. Brännvall K, Bergman K, Wallenquist U, et al. Enhanced neuronal differentiation in a three-dimensional collagen-hyaluronan matrix. J Neurosci Res.2007; 85(10):2138-2146. doi:10.1002/JNR.21358
2. Carrel A. ON THE PERMANENT LIFE OF TISSUES OUTSIDE OF THE ORGANISM. The Journal of Experimental Medicine. 1912;15(5):516. doi:10. 1084/JEM.15.5.516
3. Choi WS, Kim HW, Xia Z. Preparation of primary cultured dopaminergic neurons from mouse brain. Methods Mol Biol. 2013;1018:61-69.doi:10.1007/9 78-1-62703-444-9_6
4. Croft CL, Futch HS, Moore BD, Golde TE. Organotypic brain slice cultures to model neurodegenerative proteinopathies. Molecular Neurodegeneration 2019 14:1. 2019;14(1):1-11. doi:10.1186/S13024-019-0346-0
5. Croft CL, Noble W. Preparation of organotypic brain slice cultures for the study of Alzheimer's disease. F1000Res. 2018;7:592. doi:10.12688/F1000RESEAR CH.14500.2
6. Duport S, Robert F, Muller D, Grau G, Parisi L, Stoppini L. An in vitro blood–brain barrier model: Cocultures between endothelial cells and organotypic brain slice cultures. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1998;95 (4):1840-1845. doi:10.1073/PNAS.95.4.1840

7. Earle WR, Schilling EL, Stark TH, Straus NP, Brown MF, Shelton E. Production of malignancy in vitro; IV: The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. J Natl Cancer Inst . 1943;4(165−212).
8. Ebert AD, Yu J, Rose FF, et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. Nature 2008 457:7227. 2008;457(7227):277-280. doi:10.1038/nature07677
9. Ernsberger U. The role of GDNF family ligand signalling in the differentiation of sympathetic and dorsal root ganglion neurons. Cell and Tissue Research. 2008;333(3):353-371. doi:10.1007/S00441-008-0634-4/TABLES/2
10. Fishel ML, Vasko MR, Kelley MR. DNA repair in neurons: So if they don't divide what's to repair? Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2007;614(1-2):24-36. doi:10.1016/J.MRFM MM.2006. 06.007
11. Freshney RI. Culture of Animal Cells. John Wiley & Sons, Inc.; 2010.doi:10. 1002/9780470649367
12. Gahwiler BH. Morphological differentiation of nerve cells in thin organotypic cultures derived from rat hippocampus and cerebellum. Proceedings of the Royal Society of London - Biological Sciences. 1981;211(1184):287-290. doi:10.1098/RSPB.1981.0007
13. Geller HM. Effects of some putative neurotransmitters on unit activity of tuberal hypothalamic neurons in vitro. Brain Res. 1976;108:423-430.
14. Gey GO, Coffman WD, Kubicek MT. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. Cancer Res. 1952;12: 364-365.
15. Gordon J, Amini S, White MK. General overview of neuronal cell culture. Methods Mol Biol. 2013;1078:1. doi:10.1007/978-1-62703-640-5_1
16. Grabinski TM, Kneynsberg A, Manfredsson FP, Kanaan NM. A Method for Combining RNAscope In Situ Hybridization with Immunohistochemistry in Thick Free-Floating Brain Sections and Primary Neuronal Cultures. PLOS ONE. 2015;10(3):e0120120. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0120120
17. Harrison RG. Observations on the living developing nerve fiber. Experimental Biology and Medicine. 1906;4(1):140-143. doi:10.3181/00379727-4-98
18. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp Cell Res. 1961;25:585-621.
19. Hofrichter M, Nimtz L, Tigges J, et al. Comparative performance analysis of human iPSC-derived and primary neural progenitor cells (NPC) grown as neurospheres in vitro. Stem Cell Res. 2017;25:72-82. doi:10.1016/J.SCR.2017. 10.013
20. Humpel C. Organotypic brain slice cultures: A review. Neuroscience. 2015;305: 86-98. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.07.086
21. Jin Y, Lundkvist G, Dons L, Kristensson K, Rottenberg ME. Interferon-γ Mediates Neuronal Killing of Intracellular Bacteria. Scandinavian Journal of Immunology. 2004;60(5):437-448. doi:10.1111/J.0300-9475.2004.01500.X

22. Kim YH, Baek NS, Han YH, Chung MA, Jung SD. Enhancement of neuronal cell adhesion by covalent binding of poly-d-lysine. Journal of Neuroscience Methods. 2011;202(1):38-44. doi:10.1016/J.JNEUMETH.2011.08.036
23. Kotani M, Osanai T, Tajima Y, et al. Identification of neuronal cell lineage-specific molecules in the neuronal differentiation of P19 EC cells and mouse central nervous system. Journal of Neuroscience Research. 2002;67(5):595-606. doi:10.1002/JNR.10150
24. Krämer D, Minichiello L. Cell Culture of Primary Cerebellar Granule Cells. Methods Mol Biol. 2010;633:233-239. doi:10.1007/978-1-59745-019-5_17
25. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor: Its mode of action on sensory and sympathetic nerve cells. Harvey Lect. 1966;60:217-259.
26. Li W, Wang S, He H, et al. Expression and function of Ndel1 during the differentiation of neural stem cells induced by hippocampal exosomesticle. Stem Cell Res Ther. 2021;12(1). doi:10.1186/S13287-020-02119-2
27. Marchionni MA, Goodearl ADJ, Chen MS, et al. Glial growth factors are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system. Nature 1993 362:6418. 1993;362(6418):312-318. doi:10.1038/362312a0
28. Moghadam FH, Sadeghi-Zadeh M, Alizadeh-Shoorjestan B, et al. Isolation and Culture of Embryonic Mouse Neural Stem Cells. J Vis Exp. 2018;2018(141). doi:10.3791/58874
29. Morrison B, Cater HL, Benham CD, Sundstrom LE. An in vitro model of traumatic brain injury utilising two-dimensional stretch of organotypic hippo-campal slice cultures. Journal of Neuroscience Methods. 2006;150(2):192-201. doi:10.1016/J.JNEUMETH.2005.06.014
30. Nikodijević DD, Jovankić J v., Cvetković DM, Anđelković MZ, Nikezić AG, Milutinović MG. L-amino acid oxidase from snake venom: Biotransformation and induction of apoptosis in human colon cancer cells. European Journal of Pharmacology. 2021;910. doi:10.1016/j.ejphar.2021.174466
31. Noraberg J. Organotypic brain slice cultures: An efficient and reliable method for neurotoxicological screening and mechanistic studies. ATLA Alternatives to Laboratory Animals. 2004;32(4):329-337. doi:10.1177/026119290403200403
32. Ourednik J, Ourednik V, Lynch WP, Schachner M, Snyder EY. Neural stem cells display an inherent mechanism for rescuing dysfunctional neurons. Nat Biotechnol. 2002;20(11):1103-1110. doi:10.1038/NBT750
33. Pluchino S, Quattrini A, Brambilla E, et al. Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. Nature. 2003; 422(6933):688-694. doi:10.1038/NATURE01552
34. Reinbold R. Différenciation organotypique, in vitro, de l'oeil chez l'embryon de poulet [Organotypic differentiation of the eye of the chick embryo in vitro]. C R Seances Soc Biol Fil. 1954;148(15-18):1493-1495.
35. Robertson JA. Ethics and Policy in Embryonic Stem Cell Research. Kennedy Institute of Ethics Journal. 1999;9(2):109-136. doi:10.1353/KEN.1999.0013

36. Shi Y, Inoue H, Wu JC, Yamanaka S. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. Nat Rev Drug Discov. 2017;16(2):115-130. doi:10.1038/NRD.2016.245
37. Shi Y, Kirwan P, Livesey FJ. Directed differentiation of human pluripotent stem cells to cerebral cortex neurons and neural networks. Nature Protocols 2012 7:10. 2012;7(10):1836-1846. doi:10.1038/nprot.2012.116
38. Stoppini L, Buchs P, methods DMJ of neuroscience, 1991 undefined. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. Elsevier. Accessed January 18, 2022. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016502709190128M
39. Storts RW, Koestner A. General cultural characteristics of canine cerebellar explants. Am J Vet Res. 1968;29:2351-2364.
40. Tao Y, Zhang SC. Neural Subtype Specification from Human Pluripotent Stem Cells. Cell Stem Cell. 2016;19(5):573-586. doi:10.1016/J.STEM.2016.10.015
41. Teixeira TL, Oliveira Silva VA, da Cunha DB, et al. Isolation, characterization and screening of the in vitro cytotoxic activity of a novel L-amino acid oxidase (LAAOcdt) from Crotalus durissus terrificus venom on human cancer cell lines. Toxicon. 2016;119:203-217. doi:10.1016/j.toxicon.2016.06.009
42. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. Science (1979). 1998;282(5391):1145-1147. doi:10.1126/SCIENCE.282.5391.1145
43. Verkhratsky A, Kettenmann H. Calcium signalling in glial cells. Trends in Neurosciences. 1996;19(8):346-352. doi:10.1016/0166-2236(96)10048-5
44. Verma A, Verma M, Singh A. Animal tissue culture principles and applications. Animal Biotechnology. Published online January 1, 2020:269-293. doi:10.1016/B978-0-12-811710-1.00012-4
45. Wang TTH, Jing AH, Luo XY, et al. Neural stem cells: Isolation and differentiation into cholinergic neurons. NeuroReport. 2006;17(13):1433-1436. doi:10.1097/01.WNR.0000227980.06013.31
46. Webber DJ, Minger SL. Therapeutic potential of stem cells in central nervous system regeneration. Current Opinion in Investigational Drugs (London, England: 2000). 2004;5(7):714-719. Accessed January 18, 2022. https://europepmc.org/article/med/15298066
47. Yan Y, Shin S, Jha BS, et al. Efficient and rapid derivation of primitive neural stem cells and generation of brain subtype neurons from human pluripotent stem cells. Stem Cells Transl Med. 2013;2(11):862-870. doi:10.5966/SCTM.2013-0080
48. Zhang ZN, Freitas BC, Qian H, et al. Layered hydrogels accelerate iPSC-derived neuronal maturation and reveal migration defects caused by MeCP2 dysfunction. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113(12):3185-3190. doi:10.1073/PNAS.1521255113

The article has been submitted for publication: 14.12.2022
Հոդվածը ներկայացվել է տպագրության. 14.12.2022
Статья представлена к публикации: 14.12.2022

The article is sent for review: 05.03.2023
Հոդվածն ուղարկվել է գրախոսության. 05.03.2023
Статья отправлена на рецензию: 05.03.2023

The article is accepted for publication: 15.05.2023
Հոդվածն ընդունվել է տպագրության. 15.05.2023
Статья принята к печати: 15.052023