

Received: 2015.10.01
Accepted: 2016.11.07
Published: 2017.06.19

Zastosowanie trójwymiarowych hodowli komórek nerwowych w badaniach mechanizmów przebiegu chorób neurodegeneracyjnych *

Application of three-dimensional neuronal cell cultures in the studies of mechanisms of neurodegenerative diseases

Anna Słońska¹, Joanna Cymerys²

¹Zakład Fizjologii, Katedra Nauk Fizjologicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

²Zakład Mikrobiologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Streszczenie

Dwuwymiarowe (2D) hodowle komórek *in vitro* nie odzwierciedlają mikrośrodowiska tkanki i są coraz częściej zastępowane przez hodowle trójwymiarowe (3D). Podstawowe różnice między dwu- i trójwymiarowymi hodowlami wynikają z różnic w sposobie adhezji komórek do podłoża, ich rozprzestrzeniania, wzrostu, morfologii, proliferacji, różnicowania czy ekspresji genów i białek. Z tego względu hodowle trójwymiarowe znalazły szerokie zastosowanie w różnych dziedzinach nauki, takich jak farmakologia, onkologia, badaniach dotyczących różnicowania komórek czy neurobiologia. W pracy przedstawiono trójwymiarowe hodowle komórek nerwowych wykorzystywanych w badaniach dotyczących poznania mechanizmów patogenezy chorób neurodegeneracyjnych.

Słowa kluczowe:

hodowle komórkowe • neurony • hodowle 3D • choroby neurodegeneracyjne

Summary

In vitro models utilizing cells in planar two-dimensional (2D) cultures do not reflect the *in vivo* environment and are increasingly replaced by three-dimensional (3D) cultures. Fundamental differences between 2D and 3D cell cultures systems include cell attach, spread and grow, their morphology, proliferation, differentiation or gene and protein expression. For that reason 3D models have been proven to be invaluable tools of study for the various fields of science, such as drug discovery, cancer research, differentiation studies or neuroscience. In the present review, we discuss 3D neural *in vitro* models that might provide important insights about the mechanisms of pathogenesis of neurodegenerative diseases.

Key words:

cell cultures • neurons • 3D cultures • neurodegenerative diseases

* Badania finansowane z projektu KNOW Konsorcjum „Zdrowe Zwierzę - Bezpieczna Żywność”, MNiSW nr 05-1/KNOW2/2015 (grant nr 500-07-023100-D00100-01).

Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1240654
DOI:	10.5604/01.3001.0010.3832
Word count:	3626
Tables:	1
Figures:	2
References:	62

Adres autorki: dr Anna Słońska, Zakład Fizjologii, Katedra Nauk Fizjologicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie – SGGW, Nowoursynowska 159, 02-776, Warszawa; e-mail: anex007@op.pl

Wykaz skrótów: **2D** – hodowle komórek dwuwymiarowe; **3D** – hodowle komórek trójwymiarowe; **AD** – choroba Alzheimera; **ALS** – stwardnienie zanikowe boczne; **BGF** – mózgowy czynnik wzrostu; **CNP** – fosfodiesteraza-2',3'-cyklicznych nukleotydów; **COS-7** – mysie komórki nerki; **ECM** – macierz zewnątrzkomórkowa; **EHS** – mięsak Engelbreth-Holm-Swarm; **ESCs** – embrionalne komórki macierzyste; **GFAP** – glejowe kwaśne białko włóknkowe; **H4** – komórki ludzkiej linii neuroglioma; **HD** – choroba Huntingtona; **HEK293** – ludzkie embrionalne komórki nerki; **HeLa** – ludzka linia komórek nabłonkowych z raka szyjki macicy; **HL-60** – komórki ludzkiej białaczki promielocytarnej; **HN33** – linia mysich neuronów hipokampa; **iPSCs** – indukowane pluripotentjalne komórki macierzyste; **LUHMES** – ludzka linia komórek śródmózgowia the Lund; **MAP2** – białko towarzyszące mikrotubulom 2; **MN-1** – hybrydowa linia mysich komórek neuronalnych; **N2a** – komórki mysiej linii neuroblastoma; **NFTs** – splątki neurofibrilarne; **NG108-15** – hybrydowa linia komórek mysich i szczurzych neuroblastoma i glejaka; **NGF** – nerwowy czynnik wzrostu; **NSC-34** – mysia linia neuronów motorycznych; **NSCs** – neuronalne komórki macierzyste; **NT2** – komórki ludzkiej linii teratocarcinoma; **OUN** – ośrodkowy układ nerwowy; **PC-12** – komórki guza chromochłonnego nadnercza szczura; **PD** – choroba Parkinsona; **PVZ** – strefa okołokomorowa komór bocznych mózgu; **SCs** – komórki macierzyste; **SEM** – elektronowy mikroskop skaningowy; **SGZ** – strefa podziarnista zwoju zębatego hipokampa; **SH-SY5Y** – komórki ludzkiej linii neuroblastoma; **SSCs** – somatyczne komórki macierzyste; **tau** – białko tau; **TEM** – transmisyjny mikroskop elektronowy; **THP-1** – ludzka linia komórek białaczki.

WPROWADZENIE

Ośrodkowy układ nerwowy (OUN) składa się z dwóch podstawowych typów komórek: neuronów i komórek glejowych: makrogleju (astrocytów i oligodendrocytów) i mikrogleju, które ściśle ze sobą współpracują, a wzajemne powiązanie funkcjonalne neuron-komórka glejowa jest istotnym mechanizmem uczestniczącym w kontroli pracy mózgu [2,24,36,49,54]. Choroby neurodegeneracyjne OUN są spowodowane postępującym procesem zwyrodnienia komórek nerwowych prowadzącym do ich obumierania. Cechą procesu chorobowego jest pojawienie się stopniowych i nieodwracalnych zmian w morfologii i funkcji neuronów, uszkadzających szlaki sygnałowe, a tym samym zaburzające homeostazę w mózgu. W wyniku uszkodzenia neuronów oraz nagromadzenia agregatów nieprawidłowych form białek (np. złożeń β -amyloidu w chorobie Alzheimera) dochodzi do aktywacji mikrogleju i astrocytów. W warunkach fizjologicznych astrocyty zapewniają utrzymanie homeostazy jonowej, kontrolują działanie neuroprzekazników, regulują gospodarkę energetyczną i status prooksydacyjno-antyoksydacyjny neuronów, jak również biorą udział w tworzeniu bariery krew-mózg. Rola mikrogleju sprzawia się do kontrolowania mikrośrodowiska tkanki,

usuwania obumierających neuronów oraz odpowiedzi immunologicznej [36,49]. W wyniku aktywacji pod wpływem np. uszkodzenia tkanki, astrocyty dzielą się intensywnie i zajmują miejsce obumierających neuronów, a komórki mikrogleju stają się kompetentnymi komórkami układu odpornościowego – makrofagami mózgowymi. Aktywowane komórki glejowe wydzielają również wiele czynników zapalnych, takich jak cytokiny i chemokiny (IL-1, IL-6, TNF- α , IL-12, IL-8, MIP-1a, MIP-1b) oraz związki cytotoksyczne (tlenek azotu, wolne rodniki tlenowe). Ciągłe pobudzenie komórek glejowych, zwłaszcza w chorobach neurodegeneracyjnych, może wtórnie doprowadzić do niszczenia komórek nerwowych oraz do uszkodzenia bariery krew-mózg. Wiąże się to z intensywnym napływem komórek układu odpornościowego (makrofagów, limfocytów T i B, neutrofilów), pojawieniem się odczynu zapalnego i rozległą degeneracją struktur mózgu [44].

Do najpoważniejszych chorób neurodegeneracyjnych należą choroby Alzheimera, Parkinsona, Huntingtona oraz stwardnienie zanikowe boczne. Z powodu ciągle rosnącej liczby osób dotkniętych tymi schorzeniami są bardzo istotnym problemem zdrowia publicznego. Dokładne mechanizmy ich patogenezы nadal nie są w

pełni poznane. Uniemożliwia to stworzenie skutecznej terapii schorzenia, która obecnie opiera się głównie na terapii objawowej, polegającej jedynie na łagodzeniu objawów choroby. W ostatnich latach dużo uwagi poświęca się możliwości wykorzystania komórek macierzystych w medycynie regeneracyjnej i terapii genowej. Ponieważ ośrodkowy układ nerwowy ma ograniczoną zdolność regeneracji utraconych tkanek, badania nad możliwością wykorzystania komórek macierzystych w celu zastępowania obumarłych komórek nowymi neuronami uzyskanymi w wyniku ich różnicowania cieszą się dużym zainteresowaniem. Zastosowanie tego rodzaju terapii może złagodzić symptomy, jak również odwrócić postęp choroby w sytuacji, w której zawodzią inne metody leczenia. Mimo znacznego postępu wiedzy na temat medycyny regeneracyjnej i biologii komórek macierzystych, podstawowe pytanie dotyczące przebiegu procesu neurodegeneracyjnego oraz sposobu jego spowolnienia, zatrzymania czy zapobiegania, nadal pozostaje otwarte.

PATOGENEZA CHOROÓB NEURODEGENERACYJNYCH

Choroby neurodegeneracyjne są grupą wrodzonych lub nabytych schorzeń układu nerwowego, których cechą wspólną jest postępujący proces zwyrodnienia komórek nerwowych prowadzący do ich obumierania. W neuronach stwierdza się patologiczne zmiany będące wynikiem tworzenia się w komórkach agregatów zmodyfikowanych białek o konformacji β -harmonijki, charakteryzujących się neurotoksycznością i odpornością na działanie enzymów proteolitycznych. Agregaty te mogą mieć różny skład, jak również umiejscowienie w komórce. Ich pojawienie się w komórkach nerwowych zaburza funkcję neuronów, a tym samym homeostazę komórkową, co w konsekwencji pobudza astrocyty i komórki mikrogleju do produkcji czynników zapalnych, takich jak cytokiny, tlenek azotu czy reaktywne rodniki tlenowe. Neurony zawierające patologiczne białka są eliminowane z mózgu w wyniku nekrozy lub apoptozy. Do chorób neurodegeneracyjnych powodujących najpoważniejsze schorzenia należą: choroba Alzheimera (Alzheimer disease, AD), Parkinsona (Parkinson's disease, PD), Huntingтона (Huntington's disease, HD) i stwardnienie zanikowe boczne (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) [44].

Choroba Alzheimera należy do grupy chorób neurodegeneracyjnych najczęściej występujących wśród wszystkich schorzeń otępiennych. Dotyka przeważnie ludzi po 65 roku życia. W obrazie neuropatologicznym stwierdza się zewnątrzkomórkowe odkładanie nierozpuszczalnych, fibrylarnych złogów β -amyloidu w postaci płytek starczych, których obecność powoduje hiperfosforylację białka tau i jego wewnątrzkomórkową agregację w postaci spletków neurofibrylarnych (neurofibrillary tangle, NFTs). Proces zachodzi w sposób kaskadowy (tzw. kaskada amyloidowa), co oznacza, że degradacja β -amyloidu jest źródłem zmian patologicznych w mózgu, a pozostałe zmiany mają charakter wtórny. W wyniku

choroby dochodzi do rozległej degeneracji komórek nerwowych oraz zakończeń synaptycznych w obrębie części podstawnej przodomózgowia, hipokampu, węchomózgowia oraz kory skroniowej, z jednoczesnym wzrostem aktywności komórek glejowych i pojawieniem się stanów zapalnych [20,48,55,57,60].

Choroba Parkinsona to również choroba neurodegeneracyjna występująca u osób po 65 roku życia. Charakteryzuje się zwyrodnieniem komórek nerwowych w części zbitą istoty czarnej znajdującej się w śródmózgowiu pnia mózgu. Pojawienie się objawów choroby (sztywność mięśniowa, drżenie spoczynkowe, narastająca niesprawność ruchowa) jest spowodowane obumieraniem neuronów dopaminergicznych, związane ze zmniejszonym wytwarzaniem dopaminy - neuroprzekaźnika odpowiedzialnego za kontrolę napięcia mięśni i koordynację ruchu. Podobnie jak w innych chorobach neurodegeneracyjnych, w obrazie neuropatologicznym obserwuje się występowanie w cytoplazmie neuronów wtrętów zmodyfikowanego białka α -synukleiny, określanego mianem ciałek Lewy'ego. α -Synukleina jest jednym z czynników warunkującym utrzymanie homeostazy dopaminy, dlatego też wszelkie zmiany w jej stężeniu, również jej agregacja, wpływają niekorzystnie na neurony dopaminergiczne [6,40,42].

Choroba Huntingтона (płasawica Huntingтона) to genetyczna choroba, która w przeciwieństwie do choroby Alzheimera czy Parkinsona, dotyka przede wszystkim osoby młode po 30 i 40 roku życia. Przyczyną choroby jest mutacja w genie *HTT* znajdującym się na chromosomie 4 kodującym białko huntingtynę. Mutacja powoduje powstanie zmodyfikowanej neurotoksycznej postaci białka, które jest gromadzone w komórkach nerwowych prądkowia będącego częścią kresomózgowia. Neurony prądkowia są odpowiedzialne za hamowanie pobudzenia w obszarach ruchowych kory mózgowej. Ich obumieranie prowadzi do nadmiernej stymulacji kory, wskutek czego występują mimowolne ruchy, określane jako ruchy płasawicze. Ponieważ dokładna patogeneta płasawicy Huntingтона nie została jeszcze w pełni poznana, nie opracowano także skutecznej metody jej leczenia [3,5].

Innym przykładem choroby zwyrodnieniowej układu nerwowego jest stwardnienie zanikowe boczne (ALS). Jest to postępująca choroba spowodowana obumieraniem neuronów motorycznych rdzenia kręgowego i kory mózgowej, prowadząca do śmierci chorego. Patogeneza ALS jest prawdopodobnie wieloczynnikowa i nie do końca poznana. Proces degeneracyjny wywołuje mutacja w genie *SOD-1* kodującym dysmutazę ponadtlenkową, w wyniku której dochodzi do zmiany w aktywności i toksyczności enzymu. W patogenecie ALS uczestniczą również inne mechanizmy, takie jak stres oksydacyjny, toksyczność kwasu glutaminowego, uszkodzenia mitochondriów, reakcje zapalne aktywowane przez astrocyty i mikrogleju, tworzenie agregatów białek czy apoptoza prowadząca do śmierci uszkodzonych neuronów motorycznych [28].

Poznanie mechanizmów leżących u podłoża chorób neurodegeneracyjnych jest podstawowe dla opracowania skutecznych metod ich leczenia. Stąd też wiele badań poświęconych temu problemowi jest prowadzonych na modelach komórkowych, z wykorzystaniem komórek nerwowych hodowanych w warunkach *in vitro*.

HODOWLE KOMÓREK NERWOWYCH *IN VITRO* WYKORZYSTYWANE W BADANIACH CHOROÓB NEURODEGENERACYJNYCH

Komórki nerwowe mogą być hodowane w warunkach *in vitro*. Pierwsze doniesienia dotyczące hodowania komórek nerwowych wyizolowanych ze zwojów współczulnych, rdzenia kręgowego i mózdzku pochodzą z lat 70 ub.w. [18,33,37]. W 1977 r. Banker i Cowan po raz pierwszy uzyskali pierwotną hodowlę komórek nerwowych pochodzącą z hipokampa szczura, która stała się „złotym standardem” hodowli neuronalnych [1]. Obecnie hodowle komórek nerwowych *in vitro* są powszechnie wykorzystywane w neurobiologii, m.in. w badaniach dotyczących farmakoterapii chorób układu nerwowego (np. leków przeciwpadaczkowych), patogenezy chorób zakaźnych (neuwirulencji) czy chorób neurodegeneracyjnych [7,10,11,12,13,51,52]. Ze względu na to, że pierwotne komórki nerwowe są trudne do uzyskania, zwłaszcza ludzkie neurony, szerokie zastosowanie w badaniach *in vitro* znalazły:

- komórki macierzyste
- linie komórkowe, które można różnicować w komórki o charakterze neuronów, astrocytów i oligodendrocytów.

Komórki macierzyste

Komórki macierzyste (stem cells, SCs) to niedojrzałe komórki organizmu, zdolne do samoodnowy, dzielenia się i różnicowania w dojrzałe komórki organizmu. Ze względu na zdolność do różnicowania komórki macierzyste dzieli się na takie, które mogą różnicować się do każdego typu komórek (totipotencjalne) oraz takie, które wykazują różny stopień ograniczenia potencjału do dalszego różnicowania (pluri-, multi- oraz unipotencjalne) [26]. Natomiast ze względu na pochodzenie

wyróżnia się embrionalne komórki macierzyste (embryonic stem cells, ESCs) oraz somatyczne komórki macierzyste (somatic stem cells, SSCs).

Neuronalne komórki macierzyste (neural stem cells, NSCs) są obecne w ośrodkowym układzie nerwowym ssaków, w strefach neurogennych mózgu: w strefie okołokomorowej komór bocznych mózgu (periventricular zone, PVZ) oraz w strefie podziarnistej zwoju zębatego hipokampa (subgranular zone, SGZ). Charakteryzują się nieograniczoną zdolnością do samoodnawiania oraz do różnicowania w kierunku wszystkich komórek układu nerwowego (multipotencja), dzięki czemu odgrywają główną rolę w procesie regeneracji tkanki nerwowej [14]. Liczba NSCs w mózgu jest niewielka i mimo tej rezerwy, ośrodkowy układ nerwowy ma ograniczoną zdolność regeneracji tkanek utraconych w wyniku postępujących chorób neurodegeneracyjnych. Stąd też duże nadzieje pokłada się w indukowanych pluripotencjalnych komórkach macierzystych (induced pluripotent stem cells, iPSCs), które mogą być różnicowane do komórek neuronalnych (iPSCs-N) [23,32,38,39,59].

Po raz pierwszy iPSCs otrzymano przez wprowadzenie do mysich fibroblastów czterech genów: *Oct4*, *Klf4*, *Sox2* oraz *c-Myc* za pomocą wektora retrowirusowego. Uzyskane z iPSCs komórki nerwowe nie tylko wytwarzają funkcjonalne połączenia synaptyczne, ale również mogą zintegrować się z siecią neuronalną po transplantacji do mózgu gryzoni [56]. Metoda z powodzeniem znalazła zastosowanie w wytwarzaniu różnych typów ludzkich neuronów z fibroblastów uzyskanych od pacjentów dotkniętych chorobą neurodegeneracyjną. Umożliwiło to znaczący postęp w opracowywaniu modeli *in vitro*, zwłaszcza do badania mechanizmów komórkowych powodujących schorzenia neurodegeneracyjne oraz opracowywania nowych terapii chorób układu nerwowego [14,26,30,32,34].

Linie komórkowe

W badaniach dotyczących chorób neurodegeneracyjnych wykorzystuje się również linie komórkowe, dzięki

Tabela 1. Linie komórkowe wykorzystywane w badaniach *in vitro* wybranych chorób neurodegeneracyjnych (opracowanie własne wg. 26, 47, 48)

	Choroba Parkinsona	Choroba Alzheimer	Choroba Huntingtona	Stwardnienie zanikowe boczne
Neuronalne linie komórkowe	SH-SY5Y NT2 H4 LUHMES	SH-SY5Y	SH-SY5Y N2a NG108-15 HN33	MN-1 NSC-34
Nieneuronalne linie komórkowe	HEK293	HEK293 PC12 HL-60 THP-1	HEK293 PC-12 COS-7 HeLa	

opracowanie własne wg [26,47,48]

którym możliwe jest obserwowanie bardzo wielu elementów procesu chorobowego. Modele są oparte na neuronopodobnych liniach komórkowych (neuroblastoma (SH-SY5Y) czy teratokarcinoma (NT2), sztucznie różnicowane do komórek nerwowych. Procesy zachodzące w wyniku schorzeń neurodegeneracyjnych mogą być badane z użyciem nieneuronalnych linii komórkowych (non-neuronal cell lines), do których należą: ludzkie embrionalne komórki nerki HEK293 (w badaniach PD, AD i HD), guza chromochłonnego nadnercza szczura PC-12 (w badaniach AD i HD), mysie komórki nerki COS-7 (w badaniach HD) czy ludzka linia komórek białaczki THP-1 (w badaniach AD). Inne linie komórkowe wykorzystywane w badaniach wybranych chorób neurodegeneracyjnych przedstawiono w tabeli 1 [46].

Linia komórkowa SH-SY5Y otrzymana w latach 70 ub. w. ze szpiku kostnego pacjenta chorującego na nerwiaka jest najczęściej stosowanym modelem *in vitro* do badania choroby Parkinsona, Alzheimerera i Huntingtona. Komórki mają biochemiczne i funkcjonalne cechy charakterystyczne dla neuronów, do których należą: aktywność neuronalnych markerów enzymatycznych (hydrolazy tyrozyny i β -dopaminy), swoiste wchłanianie noradrenaliny, ekspresja białek neurofilamentów, opioidów oraz nerwowego czynnika wzrostu. Ponadto, w wyniku użycia różnych substancji, takich jak kwas retinowy, ester forbolu, staurosporyna czy neurotrofowy czynnik pochodzenia mózgowego (brain derived neurotrophic factor, BDNF) możliwe jest różnicowanie komórek SH-SY5Y w celu uzyskania różnych fenotypów neuronów. Zastosowanie kwasu retinowego umożliwia uzyskanie neuronów cholinergicznym, a użycie dodatkowo estru forbolu pozwala otrzymać neurony dopaminergiczne [58].

Należy jednak pamiętać, że ustalone linie komórkowe są wyprowadzone z komórek nowotworowych lub komórek prawidłowych, które w wyniku wielokrotnego pasażowania uległy transformacji nowotworowej. Są to przeważnie komórki heteroploidalne (mające nieprawidłową liczbę chromosomów), charakteryzujące się zdolnością do nieograniczonej liczby podziałów. Ze względu na niestabilność genetyczną, komórki mogą zmienić pierwotną funkcję i charakterystykę wzrostu. Komórki SH-SY5Y wykazują znacznie mniejszą wrażliwość na neurotoksyny czy substancje neuroprotektoryjne niż pierwotne neurony śródmózgowia. Co więcej, w hodowli *in vitro* komórki nie są zsynchronizowane i nie wszystkie mają markery charakterystyczne dla dojrzałych neuronów. Mimo aktywności hydrolazy tyrozyny i β -dopaminy, synteza dopaminy i noradrenaliny może być ograniczona z powodu niedoboru karboksylazy dihydroksyfenyloanaliny. Czynniki te sprawiają, że mimo iż linia SH-SY5Y jest powszechnie wykorzystywana jako model *in vitro* w badaniach schorzeń układu nerwowego, mogą się pojawić pewne wątpliwości przy interpretacji otrzymanych wyników [15,27,43].

TRÓJWYMIAROWE HODOWLE KOMÓREK NERWOWYCH W BADANIU CHOROBY NEURODEGENERACYJNYCH

Jednym z największych osiągnięć w technikach hodowli komórek było wprowadzenie trójwymiarowych układów hodowlanych. Dwuwymiarowe (2D) hodowle komórkowe są rutynowo wykorzystywane w laboratoriach na całym świecie, jednak należy uwzględnić to, że są to modele prymitywne, które nie odzwierciedlają w pełni anatomii i fizjologii tkanek. Podstawowe różnice między dwu- i trójwymiarowymi hodowlami wynikają z różnic w sposobie adhezji komórek do podłoża, ich rozprzestrzeniania, wzrostu, polarności, ekspresji genów i białek, żywotności, ruchliwości, różnicowania, metabolizmu czy odpowiedzi na bodźce. Jednak podstawową różnicą między komórkami hodowanymi w systemie 2D i 3D jest odmienność w ich morfologii, ponieważ w płaskich hodowlach 2D przyleganie komórek następuje jedynie z jednej strony komórki (w miejscu kontaktu z podłożem), podczas gdy w hodowlach 3D komórki przylegają do podłoża całą swoją powierzchnią. Dzieje się tak, gdyż w hodowlach trójwymiarowych są wykorzystywane specjalne podłoża imitujące macierz zewnątrzkomórkową (extracellular matrix – ECM), która w warunkach *in vivo* tworzy rusztowanie zapewniające właściwą strukturę komórek i tkanek oraz miejsce magazynowania cytokin i czynników wzrostu. ECM kontroluje także ich funkcjonowanie przez regulację oddziaływań komórka-komórka oraz komórka-macierz, a także przez modulację zewnątrzkomórkowych sygnałów [25,50]. W warunkach *in vitro*, w celu otrzymania hodowli trójwymiarowej wykorzystywane jest zazwyczaj komercyjne podłoże hodowlane Matrigel, które wspiera rozwój morfologiczny, proliferację i wzrost komórek. Jego głównymi składnikami są lamininy, kolagen typu IV, proteoglikan, entaktyna oraz czynniki wzrostu, wyekstrahowane z mięsaka Englebreth-Holm-Swarm (EHS) [9,45]. Hodowle trójwymiarowe znacznie wiernej odzwierciedlają fizjologiczne warunki panujące *in vivo* niż hodowle 2D i w związku z tym znalazły szerokie zastosowanie w badaniach dotyczących różnicowania komórek, w farmakologii, onkologii czy neurobiologii [7,19,45].

Najwięcej doniesień o zastosowaniu trójwymiarowych hodowli komórkowych *in vitro* w badaniach schorzeń neurodegeneracyjnych dotyczy choroby Alzheimerera. W modelach tych wykorzystywano zarówno linie komórkowe, głównie SH-SY5Y, indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste, jak i pierwotne hodowle neuronów.

Jak już wspomniano, jedną z cech wspólnych schorzeń neurodegeneracyjnych jest gromadzenie się w komórkach nieprawidłowych białek. W AD, oprócz patologii białka β -amyloidu, stwierdzono również patologię białka tau, które odpowiada za stabilizację mikrotubul w neuronach. W wyniku agregacji ufosforylowanej postaci białka tau dochodzi do zwyrodnienia włókienkowego i tworzenia spletków neurofibrilarnych (NFTs) w neuronach w obrębie kory kojarzeniowej i śródwęchowej, hipokampa, zakrętu przyhipokampowego oraz ciała migdałowatego [17].

Trójwymiarowy model komórek ludzkiej linii neuroblastoma SH-SY5Y do badania mechanizmów agregacji białka tau podczas AD został przedstawiony przez Seidela i wsp. [47]. Opracowali technikę hodowania komórek neuroblastomy w postaci sferycznych agregatów komórkowych (sferoid) i różnicowania ich do neuronów bez konieczności stosowania kwasu retinowego, staurosporyny czy neurotropowych czynników pochodzenia mózgowego (NGF czy BDNF), które mogłyby wpłynąć na indukcję taupatii w komórkach. Użycie linii komórkowej SH-SY5Y zamiast pierwotnych hodowli komórek czy komórek macierzystych pozwoliło na uniknięcie ograniczeń wynikających z trudności w dostępności i hodowli tego typu komórek. Hodowanie komórek SH-SY5Y w systemie 3D znacząco przyspieszyło ich różnicowanie do neuronów w porównaniu do hodowli dwuwymiarowej.

Seidel i wsp. wykorzystali trzy warianty linii SH-SY5Y wykazujące nadekspresję genu białka tau (ON4R) znakowanego EGFP (enhanced green fluorescent protein):

- typ dziki (WT),
- wariant z pojedynczą mutacją w genie białka tau (P301L),
- wariant qK280 z poczwórną mutacją w genie białka tau (Δ K280, P301L, V337M, R406W).

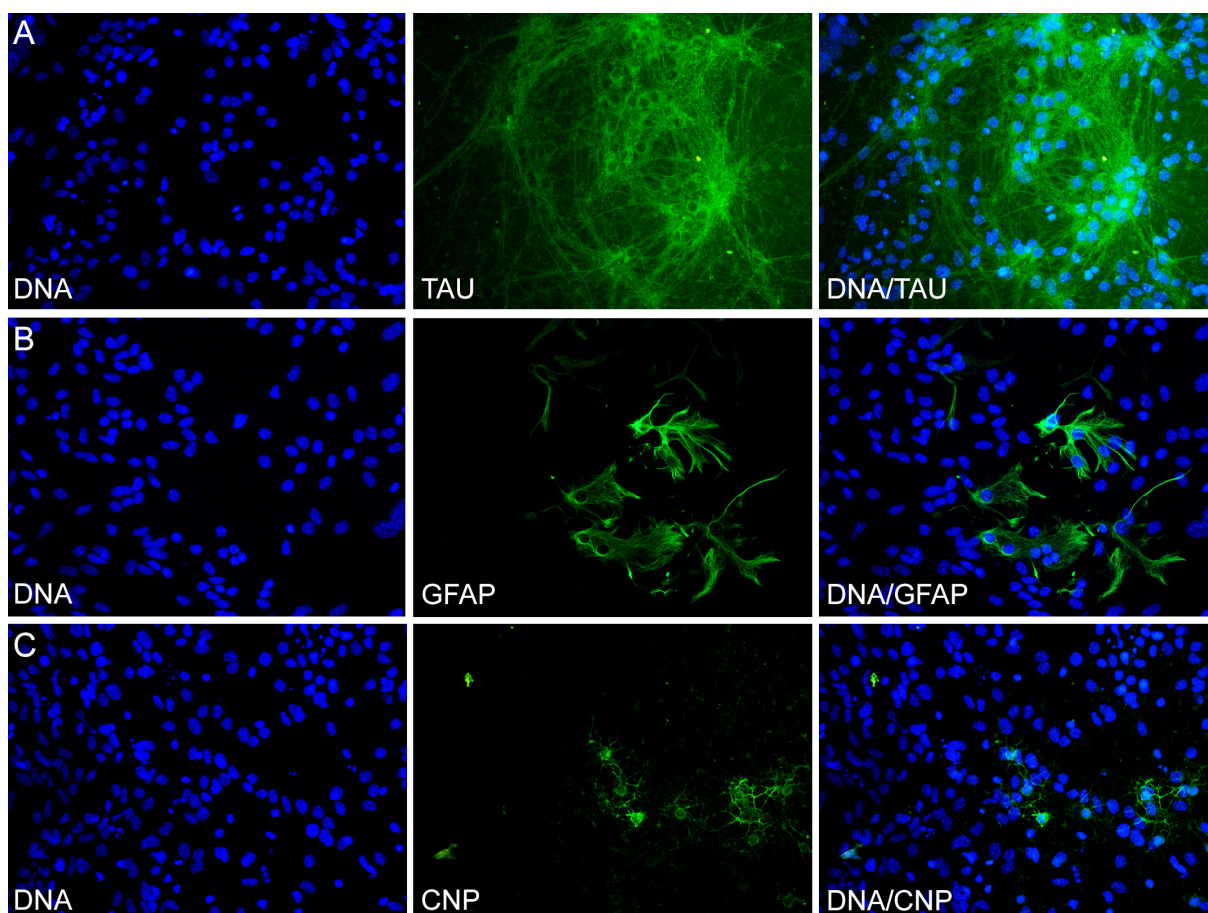
W wyniku mutacji Δ K280 i R406W dochodzi do przyspieszenia agregacji patologicznej postaci białka tau, a mutacje P301L i V337M powodują nagromadzenie NFT w neuronach występujących w obrębie kory, pnia mózgu, rdzenia kręgowego i hipokampa. W celu indukowania hiperfosforylacji białka tau w warunkach *in vitro* badacze zastosowali selektywny inhibitor białkowej fosfatazy 2A – kwas okasaikowy (OA), natomiast poczwórna mutacja w genie białka tau wygenerowana została w celu wzmocnienia taupatii, w porównaniu z wariantem dzikim komórek linii SH-SY5Y. Sferoidy otrzymywano na płytkach z mikropróbkami w kształcie piramid, wyposażonych w 4 elektrody umożliwiające pomiar impedancji elektrycznej (Z) w czasie rzeczywistym. Zastosowanie trzech wariantów hodowli SH-SY5Y umożliwiło uzyskanie szczegółowej ilościowej analizy porównawczej dotyczącej procesów neurodegeneracyjnych zależnych od mutacji w genie białka tau [47]. Należy jednak pamiętać, że taupatia nie jest swoista dla AD, a wymienione mutacje występują również w innych postaciach otępień, stąd też opisany model mógłby znaleźć także zastosowanie w badaniach dotyczących choroby Picka, postępującego porażenia nadjądrowego, otępienia czołowo-skroniowego czy taupatii związanej z parkinsonizmem sprzężonym z chromosomem 17 (FTDP-17) [21].

Trójwymiarowe hodowle sferyczne neuronów zostały również wykorzystane w badaniach dotyczących neurotoksyczności β -amyloidu. Choi i wsp. opracowali metodę hodowli neurosfer składających się z pierwotnych szczupłych neuronów korowych, które architekturą przypominają korę mózgową – region mózgu najbardziej

narażony na agregację nieprawidłowego β -amyloidu [8]. Neuronalne komórki progenitorowe były hodowane na płytkach z mikrostudzienkami, w których dochodziło do ich agregacji i tworzenia neurosfer – sferycznych struktur złożonych z sześciu warstw komórek. Po 10 dniach od założenia hodowli neurony były w pełni zróżnicowane i łączyły się ze sobą siecią wypustek neuronalnych. Następnie, neurosfery inkubowane były w 5 μ M roztworze β -amyloidu, dzięki czemu możliwe było zaobserwowanie niektórych patofizjologicznych cech charakterystycznych dla przebiegu AD. Za pomocą różnych testów ilościowych oraz nowoczesnych metod wizualizacji (m.in. TEM, SEM), badacze określali jego wpływ na żywotność, proliferację, morfologię i degenerację neuronów [8]. Dzięki nim możliwe było lepsze zrozumienie neurotoksycznego wpływu złogów β -amyloidu na neurony, który objawia się głównie uszkodzeniami synaps, zaburzeniami homeostazy jonów wapnia, stresem oksydacyjnym oraz indukcją apoptozy [22].

W badaniach dotyczących mechanizmów agregacji złogów β -amyloidu i białka tau wykorzystano również linię ludzkich komórek progenitorowych ReNcell VM zdolnych do różnicowania w neurony i komórki glejowe. W celu uzyskania modelu 3D komórki były hodowane na komercyjnym podłożu Matrigel, zawierającym duże stężenia białek macierzy zewnątrzkomórkowej mózgu. Choi i wsp. [7] przyjęli hipotezę, że skoro w hodowli 2D nagromadzony β -amyloid intensywnie dyfunduje z komórek do płyny hodowlanego, to w hodowli 3D, ze względu na ograniczoną dyfuzję, dochodzić będzie do jego wzmożonej agregacji w komórkach. Zaobserwowali również gwałtowny wzrost stężenia izoformy 4R białka tau w hodowli 3D w porównaniu z 2D. Izoforma 4R oraz jej stosunek do izoformy 3R, pełni ważną rolę w zachowaniu prawidłowego funkcjonowania białka tau. Wszelkie zmiany w tym stosunku zaburzą prawidłowe funkcjonowanie białka tau, a tym samym do powstania taupatii [53]. Choi i wsp. wykazali, że molekularne mechanizmy związane z hiperfosforylacją białka tau są indukowane w wyniku nagromadzenia toksycznych form β -amyloidu. Potwierdza to hipotezę, że neurodegeneracja w AD jest procesem kaskadowym, w którym pierwotnym zdarzeniem jest odkładanie się β -amyloidu w postaci blaszek starczych, natomiast hiperfosforylacja i wewnątrzkomórkowa agregacja białka tau ma charakter wtórny [7]. Dane te wskazują, że hodowanie komórek w warunkach 3D nie tylko przyspiesza ich różnicowanie do neuronów, ale również umożliwia badanie mechanizmów patogenyzy nie tylko AD, ale również innych chorób neurodegeneracyjnych.

Model trójwymiarowej hodowli neuronów do badania mechanizmów AD przedstawili Zhang i wsp. [62]. W badaniach wykorzystali wyprowadzone z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC) neuroepitelialne komórki macierzyste (It-NES), z których następnie uzyskano populację komórek nerwowych z wysokim procentowym udziałem neuronów i niską liczbą komórek glejowych (<10%). W celu otrzymania



Ryc. 1. Pierwotna hodowla neuronów wyizolowanych z mózgów płodów myszy BALB/c. Poszczególne typy komórek nerwowych występujących w hodowli identyfikowano na podstawie specyficznych białek stanowiących swoje markery komórkowe: A – neurony (TAU), B – astrocyty (GFAP), C – oligodendrocyty (CNP). Preparaty wybarwione zostały immunofluorescencyjnie z użyciem mysich przeciwciał: anti-Tau-5, anti-GFAP i anti-CNP. Do wizualizacji reakcji użyto przeciwciał drugorzędowych anti-mysich IgG-FITC (kolor zielony), a jądra komórkowe wyznakowane zostały barwnikiem Hoechst 33258 (kolor niebieski). Zdjęcia wykonano z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego Olympus BX60. Powiększenie 200x (badania własne)

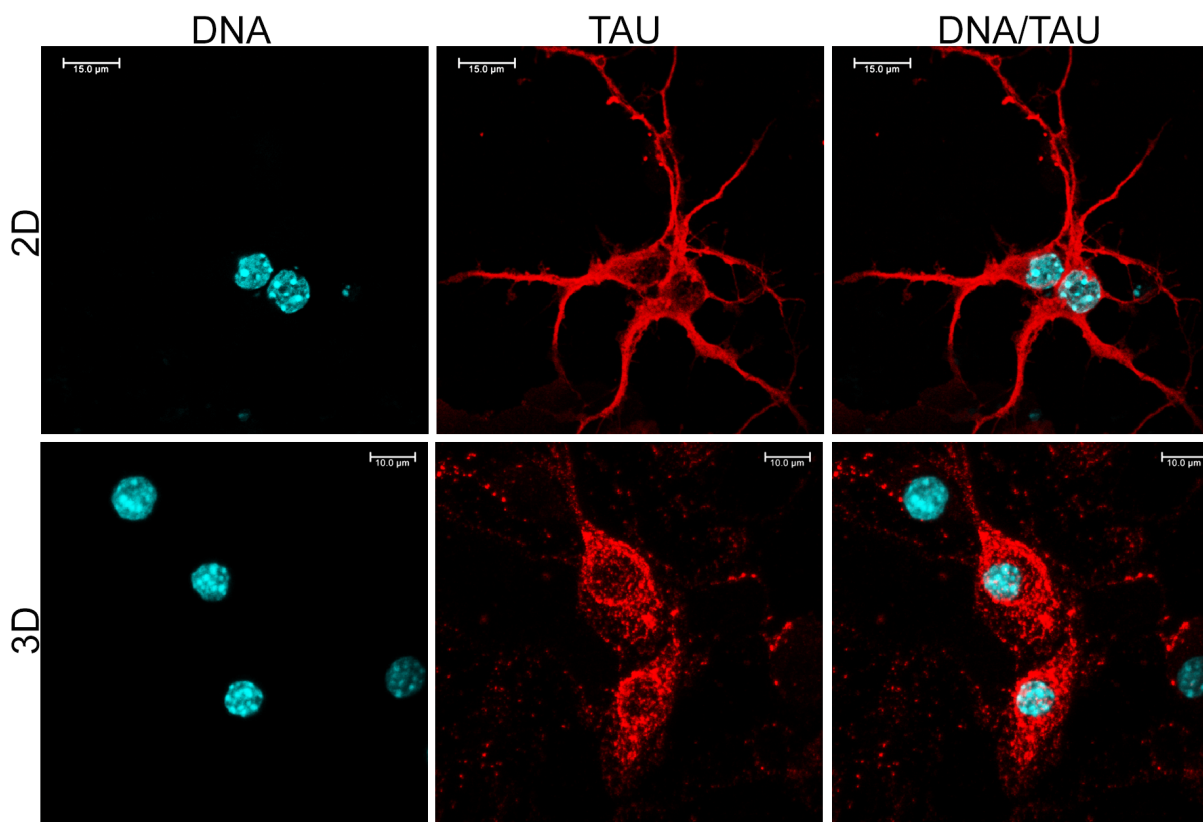
hodowli 3D komórki hodowano na peptydowym hydrożelu, który zapewnia odpowiednią sztywność i umożliwia długoterminową hodowlę komórek nerwowych [61]. Prezentowany model znalazł zastosowanie w badaniach dotyczących wpływu β -amyloidu na kinazę aktywowaną białkiem p21 (PAK), która pełni istotne funkcje w regulacji procesów związanych z ruchliwością, dynamiką cytoskieletu aktynowego oraz morfologią i przeżywaniem neuronów.

Reorganizacja cytoskieletu komórkowego jest jedną ze zmian morfologicznych neuronów charakterystyczną dla procesów apoptotycznych towarzyszących AD. Wcześniejsze badania wykazały, że poziom kinaz PAK1 i PAK3, które wpływają również na rozwój przodomózgowia, znacząco spada u pacjentów w późnym stadium AD [35]. W przebiegu AD stwierdzono również powstawanie krótkich eozynowych filamentów o grubości 7 nm, zbudowanych głównie z aktyny i kofiliny, określanych jako ciała Hirano, a także polimeryzację aktyny indukowaną obecnością β -amyloidu [41].

Zhang i wsp. wykazali, że stymulowanie neuronów oligomerem β -amyloidu spowodowało translokację aktywowanej kinazy PAK (pPAK) z cytoplazmy do błony komórkowej oraz spadek stężenia drebryny (białka stabilizującego aktynę), co było możliwe do zaobserwowania jedynie w komórkach hodowanych w systemie 3D. W dwuwymiarowej hodowli nie stwierdzono by oligomery β -amyloidu wpłynęły na dystrybucję pPAK czy drebryny [62]. Wskazuje to, że pewne mechanizmy związane z chorobami neurodegeneracyjnymi można zbadać w warunkach *in vitro* jedynie z użyciem modeli trójwymiarowych, które wykazują znacznie większe podobieństwo do tkanki pod względem kontaktów międzykomórkowych, ścieżek sygnałowych i ekspresji genów niż hodowle dwuwymiarowe.

PERSPEKTYWY

Poznanie mechanizmów leżących u podłoża chorób neurodegeneracyjnych ma podstawowe znaczenie dla opracowania skutecznych metod ich leczenia. Dlatego też



Ryc. 2. Dwuwymiarowa (2D) i trójwymiarowa (3D) pierwotna hodowla neuronów wyizolowanych z mózgów płodów myszy BALB/c. W celu uzyskania hodowli 3D neurony hodowano na podłożu Matrigel. Preparaty wybarwione zostały immunofluorescencyjnie z użyciem przeciwciał: mysich anti-Tau-5 i anti-mysich Texas Red-X (kolor czerwony). Jądra komórkowe wyznakowane zostały barwnikiem Hoechst 33258 (kolor niebieski). Zdjęcia wykonano z użyciem mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP8 WLL (KAWA.SKA). Do analizy obrazów 3D wykorzystano oprogramowanie LAS AF (badania własne)

ważne jest stworzenie takiego modelu komórkowego, który najwierniej odwzoruje fizjologiczne warunki panujące w mózgu. W tym celu wykorzystano trójwymiarowe hodowle komórek nerwowych, otrzymane w procesie różnicowania komórek macierzystych lub nowotworowych linii komórkowych. Jednak dużo bardziej odpowiednim modelem badawczym mogłyby być pierwotne hodowle komórkowe, które powstają w wyniku pobrania bezpośrednio z organizmu tkanki lub narządu, dzięki czemu komórki zachowują morfologiczne i fizjologiczne podobieństwo do tkanki macierzystej. Mimo że pierwotne hodowle komórek są trudne do utrzymania i zwykle wymagają bardziej złożonych pożywek, z fizjologicznego punktu widzenia, mogą zapewnić lepsze odzwierciedlenie warunków panujących *in vivo* niż linie komórkowe.

Pierwotne hodowle komórek nerwowych zwykle są prowadzone na materiale pobranym z 17–19-dniowych płodów szczurzych lub mysich [10,29]. Oczywiście w przypadku zarodków szczura, które są znacznie większe niż zarodki mysie, hipokamp jest łatwiejszy do odróżnienia od innych struktur mózgu. Zakładając pierwotną hodowlę neuronów należy wziąć pod uwagę, że w zawiesinie komórek mogą się znaleźć również liczne komórki glejowe czy też inne elementy tkanki nerwowej. Ich wyeliminowa-

nie jest możliwe dzięki zastosowaniu specjalnych płynów hodowlanych oraz czynników wzrostowych czy selekcyjnych. Do hodowli neuronów zwykle jest stosowany płyn Neurobasal wzbogacony suplementem B27, który zapobiega niepożądanemu wzrostowi komórek glejowych w kulturze – hodowle w nim prowadzone zawierają mniej niż 5% komórek glejowych [4]. Natomiast astrocyty są znacznie mniej wymagające niż neurony i rosną w płynie MEM (minimal essential medium), który jest standardowo stosowany w hodowli innych typów komórek [29].

We wczesnym etapie rozwoju neurony hodowane *in vitro* mają krótkie wypustki, przez co trudno je odróżnić od komórek gleju. W późniejszym etapie, gdy neurony osiągną dojrzałość, ich włókna nerwowe (dendryty i aksony) stają się znacznie dłuższe i rozgałęzione. Komórki gleju cechuje duża różnorodność morfologiczna. Astrocyty to komórki o gwiaździstym kształcie (glej gwiaździsty) mające liczne rozgałęzione wypustki rozchodzące się we wszystkich kierunkach, oligodendrocyty, określane również jako glej skąpowypustkowy, mają nieliczne i znacznie cieńsze wypustki, a mikroglej to komórki z jedną lub dwiema bardzo długimi wypustkami. Poszczególne typy komórek nerwowych można identyfikować immunofluorescencyjnie na podstawie występujących w nich swo-

istych białek stanowiących swoiste markery komórkowe. Dla neuronów są to białka tau i MAP2 (białka towarzyszące mikrotubulom), dla astrocytów – GFAP (glejowe kwaśne białko włóknkowe), dla oligodendrocytów – CNP (fosfodiesteraza-2',3'-cyklicznych nukleotydów) (ryc. 1) [31]. Można je również hodować na podłożu Matrigel [16], w celu uzyskania hodowli 3D, dzięki czemu mogłyby się stać dobrym modelem do badania przebiegu procesu neurodegeneracji (ryc. 2).

PODSUMOWANIE

Ze względu na wzrost populacji osób w podeszłym wieku wzrasta liczba chorych na schorzenia neurodegeneracyjne, co jest bardzo ważnym problemem zdrowia publicznego. Mimo stale dokonującego się postępu w badaniach dotyczących mechanizmów prowadzą-

cych do zmian neurodegeneracyjnych, wiedza na ich temat nie jest nadal kompletna, a z powodu braku skutecznych metod leczenia pozostają chorobami nieuleczalnymi i śmiertelnymi. Dotychczasowe doniesienia dotyczące badania przebiegu procesu neurodegeneracji prowadzone na różnorodnych modelach *in vitro*, chociaż często bardzo obiecujące, nie przyniosły znaczącego postępu klinicznego. Z tego względu stale są poszukiwane najodpowiedniejsze modele badawcze, dzięki którym odpowiedź na pytanie - jak przebiega proces neurodegeneracji stanie się zrozumiałą. Dlatego też dobrym narzędziem służącym do poznania mechanizmów powstawania chorób układu nerwowego oraz do testowania nowych leków mogą się stać doświadczalne prowadzone na żywej tkance nerwowej w postaci trójwymiarowej pierwotnej hodowli komórek nerwowych.

PIŚMIENICTWO

- [1] Banker G.A., Cowan W.M.: Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res.*, 1977; 126: 397-425
- [2] Barnes J.: *Neurons, neurotransmission and communication*. W: *Essential Biological Psychology*, Sage Publication, London, 2013: 2-25
- [3] Bates G.P., Dorsey R., Gusella J.F., Hayden M.R., Kay C., Leavitt B.R., Nance M., Ross C.A., Scahill R.I., Wetzel R., Wild E.J., Tabrizi S.J.: Huntington disease. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 2015; 1: 15005
- [4] Brewer G.J., Torricelli J.R., Evege E.K., Price P.J.: Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J. Neurosci. Res.*, 1993; 35: 567-576
- [5] Cattaneo E., Rigamonti D., Zuccato C.: Zagadka płasawicy Huntingtona. *Świat Nauki*, 2003; 2: 42-47
- [6] Cheng F., Vivacqua G., Yu S.: The role of α -synuclein in neurotransmission and synaptic plasticity. *J. Chem. Neuroanat.*, 2011; 42: 242-248
- [7] Choi S.H., Kim Y.H., Hebisch M., Sliwinski C., Lee S., D'Avanzo C., Chen H., Hooli B., Asselin C., Muffat J., Klee J.B., Zhang C., Wainger B.J., Peitz M., Kovacs D.M., Woolf C.J., Wagner S.L., Tanzi R.E., Kim D.Y.: A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer's disease. *Nature*, 2014; 515: 274-278
- [8] Choi Y.J., Park J., Lee S.H.: Size-controllable networked neurospheres as a 3D neuronal tissue model for Alzheimer's disease studies. *Biomaterials*, 2013; 34: 2938-2946
- [9] Cukierman E., Pankov R., Stevens D.R., Yamada K.M.: Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*, 2001; 294: 1708-1712
- [10] Cymerys J., Dzieciatkowski T., Golke A., Słońska A., Majewska A., Krzyżowska M., Bańbura M.W.: Primary cultures of murine neurons for studying herpes simplex virus 1 infection and its inhibition by antivirals. *Acta Virol.*, 2013; 57: 339-345
- [11] Cymerys J., Dzieciatkowski T., Słońska A., Bierła J., Tucholska A., Chmielewska A., Golke A., Bańbura M.W.: Equine herpesvirus type 1 (EHV-1) replication in primary murine neurons culture. *Pol. J. Vet. Sci.*, 2010; 13: 701-708
- [12] Cymerys J., Miszczak D., Słońska A., Golke A., Bańbura M.W.: Autophagy in cultured murine neurons infected with equid herpesvirus 1. *Acta Virol.*, 2014; 58: 292-295
- [13] Cymerys J., Słońska A., Godlewski M.M., Golke A., Tucholska A., Chmielewska A., Bańbura M.W.: Apoptotic and necrotic changes in cultured murine neurons infected with equid herpesvirus 1. *Acta Virol.*, 2012; 56: 39-48
- [14] Dantuma E., Merchant S., Sugaya K.: Stem cells for the treatment of neurodegenerative diseases. *Stem Cell Res. Ther.*, 2010; 1: 37
- [15] Datki Z., Juhász A., Gálfi M., Soós K., Papp R., Zádori D., Penke B.: Method for measuring neurotoxicity of aggregating polypeptides with the MTT assay on differentiated neuroblastoma cells. *Brain Res. Bull.*, 2003; 62: 223-229
- [16] Dewitt D.D., Kaszuba S.N., Thompson D.M., Stegemann J.P.: Collagen I-matrigel scaffolds for enhanced Schwann cell survival and control of three-dimensional cell morphology. *Tiss. Engineer. Part A*, 2009; 15: 2785-2793
- [17] Eriksen J.L., Janus C.G.: Plaques, tangles, and memory loss in mouse models of neurodegeneration. *Behav. Genet.*, 2007; 37: 79-100
- [18] 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
- [19] Gajewska M., Kozłowski M., Motyl T.: Trójwymiarowe hodowle komórek nabłonka gruczołu sutkowego jako model badawczy procesu różnicowania. *Post. Biol. Kom.*, 2010; 37: 121-136
- [20] Gaweł M., Potulska-Chromik A.: Choroby neurodegeneracyjne: choroba Alzheimer'a i Parkinsona. *Post. N. Med.*, 2015; 28: 468-476
- [21] Gotz J., Gladbach A., Pennanen L., van Eersel J., Schild A., David D., Ittner L.M.: Animal models reveal role for tau phosphorylation in human disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 2010; 1802: 860-871
- [22] Hampel H., Shen Y., Walsh D.M., Aisen P., Shaw L.M., Zetterberg H., Trojanowski J.Q., Blennow K.: Biological markers of amyloid β -related mechanisms in Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.*, 2010; 223: 334-346
- [23] Han S.S., Williams L.A., Eggan K.C.: Constructing and deconstructing stem cell models of neurological disease. *Neuron*, 2011; 70: 626-644
- [24] Haydon P.G.: Neuroglial networks: neurons and glia talk to each other. *Curr. Biol.*, 2000; 10: R712-R714
- [25] Hoffman R.M.: To do tissue culture in two or three dimensions? That is the question. *Stem Cells*, 1993; 11: 105-111
- [26] Hou L., Hong T.: Stem cells and neurodegenerative diseases. *Sci. China C - Life Sci.*, 2008; 51: 287-294
- [27] Ikeda H., Pastuszko A., Ikegaki N., Kennett R.H., Wilson D.F.: 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) metabolism and retinoic acid induced differentiation in human neuroblastoma. *Neurochem. Res.*,

1994; 19: 1487-1494

[28] Ilzecka J.: Mechanizmy patogenetyczne stwardnienia bocznego zanikowego. *Aktualn. Neurol.*, 2012; 12: 222-235

[29] Jones E.V., Cook D., Murai K.K.: A neuron-astrocyte co-culture system to investigate astrocyte-secreted factors in mouse neuronal development. *Methods Mol. Biol.*, 2012; 814: 341-352

[30] Jung Y.W., Hysolli E., Kim K.Y., Tanaka Y., Park I.H.: Human induced pluripotent stem cells and neurodegenerative disease: prospects for novel therapies. *Curr. Opin. Neurol.*, 2012; 25: 125-130

[31] Kajta M.: Hodowle pierwotne komórek nerkowych. W: *Hodowla komórek i tkanek*, red.: S. Sokołowska. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2006, 277-290

[32] Kim S.U., Lee H.J., Kim Y.B.: Neural stem cell-based treatment for neurodegenerative diseases. *Neuropathology*, 2013; 33: 491-504

[33] Lasher R.S.: The uptake of [³H] GABA and differentiation of stellate neurons in cultures of dissociated postnatal rat cerebellum. *Brain Res.*, 1974; 69: 235-254

[34] Liszewska E., Jaworski J.: Po co neurobiologom indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste? *Postępy Biochem.*, 2013; 59: 164-174

[35] Ma Q.L., Yang F., Calon F., Ubieda O.J., Hansen J.E., Weisbart R.H., Beech W., Frautschy S.A., Cole G.M.: p21-activated kinase-aberrant activation and translocation in Alzheimer disease pathogenesis. *J. Biol. Chem.*, 2008; 283: 14132-14143

[36] Magistretti P.J., Ransom B.R.: Astrocytes. W: *Neuropsychopharmacology - 5th Generation of Progress*, red. K.L. Davis, D. Charney, J.T. Coyle, C. Nemeroff. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, 2002, 133-146

[37] 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

[38] Marchetto M.C., Brennand K.J., Boyer L.F., Gage F.H.: Induced pluripotent stem cells (iPSCs) and neurological disease modeling: progress and promises. *Hum. Mol. Genet.*, 2011; 20: R109-R115

[39] Marchetto M.C., Winner B., Gage F.H.: Pluripotent stem cells in neurodegenerative and neurodevelopmental diseases. *Hum. Mol. Genet.*, 2010; 19: R71-R76

[40] Moran L.B., Croisier E., Duke D.C., Kalaitzakis M.E., Roncaroli F., Deprez M., Dexter D.T., Pearce R.K., Graeber M.B.: Analysis of α -synuclein, dopamine and parkin pathways in neuropathologically confirmed parkinsonian nigra. *Acta Neuropathol.*, 2007; 113: 253-263

[41] Ostrowski M., Grzanka A., Izdebska M.: Rola aktywny w chorobie Alzheimer. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2005; 59: 224-228

[42] Perez R.G., Hastings T.G.: Could a loss of α -synuclein function put dopaminergic neurons at risk? *J. Neurochem.*, 2004; 89: 1318-1324

[43] Presgraves S.P., Ahmed T., Borwege S., Joyce J.N.: Terminally differentiated SH-SY5Y cells provide a model system for studying neuroprotective effects of dopamine agonists. *Neurotox. Res.*, 2004; 5: 579-598

[44] Ramanan V.K., Saykin A.J.: Pathways to neurodegeneration: mechanistic insights from GWAS in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and related disorders. *Am. J. Neurodegener. Dis.*, 2013; 2: 145-175

[45] Ravi M., Paramesh V., Kaviya S.R., Anuradha E., Paul Solomon F.D.: 3D cell culture systems: advantages and applications. *J. Cell. Physiol.*, 2015; 230: 16-26

[46] Schlachetzki J.C., Saliba S.W., de Oliveira A.C.: Studying neurodegenerative diseases in culture models. *Rev. Brasil. Psiquiatr.*, 2013; 35: S92-S100

[47] Seidel D., Krinke D., Jahnke H.G., Hirche A., Kloß D., Mack T.G., Striggow F., Robitzki A.: Induced tauopathy in a novel 3D-culture model mediates neurodegenerative processes: a real-time study on biochips. *PLoS One*, 2012; 7: e49150

[48] Selkoe D.J.: Alzheimer disease: mechanistic understanding predicts novel therapies. *Ann. Intern. Med.*, 2004; 140: 627-638

[49] Shaham S.: Glia-neuron interactions in nervous system function and development. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 2005; 69: 39-66

[50] Sivakumar P., Czirok A., Rongish B.J., Divakara V.P., Wang Y.P., Dallas S.L.: New insights into extracellular matrix assembly and reorganization from dynamic imaging of extracellular matrix proteins in living osteoblasts. *J. Cell Sci.*, 2006; 119: 1350-1360

[51] Słońska A., Cymerys J., Godlewski M.M., Dzieciatkowski T., Tucholska A., Chmielewska A., Golke A., Bańbura M.W.: Equine herpesvirus type 1 (EHV-1)-induced rearrangements of actin filaments in productively infected primary murine neurons. *Arch. Virol.*, 2014; 159: 1341-1349

[52] Słońska A., Cymerys J., Skwarska J., Golke A., Bańbura M.W.: Influence of importin α/β and exportin 1 on equine herpesvirus type 1 (EHV-1) replication in primary murine neurons. *Pol. J. Vet. Sci.*, 2013; 16: 749-751

[53] Spires-Jones T.L., Stoothoff W.H., de Calignon A., Jones P.B., Hyman B.T.: Tau pathophysiology in neurodegeneration: a tangled issue. *Trends Neurosci.*, 2009; 32: 150-159

[54] Stahl S.M.: Structure and function of neurons. W: *Stahl's Essential Psychopharmacology: Neuroscientific Basis and Practical Applications*, Third Edition, Cambridge University Press, New York, 2008, 1-21

[55] Szwed A., Miłowska K.: Rola białek w chorobach neurodegeneracyjnych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2012; 66: 187-195

[56] Takahashi K., Yamanaka S.: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006; 126: 663-676

[57] Uzun S., Kozumplik O., Folnegovic-Smalc V.: Alzheimer's dementia: current data review. *Coll. Antropol.*, 2011; 35: 1333-1337

[58] Xie H.R., Hu L.S., Li G.Y.: SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin. Med. J.*, 2010; 123: 1086-1092

[59] Xie Y.Z., Zhang R.X.: Neurodegenerative diseases in a dish: the promise of iPSC technology in disease modeling and therapeutic discovery. *Neurol. Sci.*, 2015; 36: 21-27

[60] Yanker Y.A., Lu T.: Amyloid β -protein toxicity and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 4755-4759

[61] Ylä-Outinen L., Joki T., Varjola M., Skottman H., Narkilahti S.: Three-dimensional growth matrix for human embryonic stem cell-derived neuronal cells. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 2014; 8: 186-194

[62] Zhang D., Pekkanen-Mattila M., Shahsavani M., Falk A., Teixeira A.I., Herland A.: A 3D Alzheimer's disease culture model and the induction of P21-activated kinase mediated sensing in iPSC derived neurons. *Biomaterials*, 2014; 35: 1420-1428

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.