مجله علوم دانشگاه تهران
جلد بیست و هشتم (۱۳۸۱) شماره ۲ (۲۰۳-۱۹۳)

کشت سلولهای هیپوکامپ
بدون استفاده از فاکتورهای رشد و چسبندگی

معصومه فیروزی[۱] و فرزانه صابونی[۲]
۱ـ آزمایشگاه ترمیم بافت ، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران
۲ـ مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی
(دریافت: ۷۹/۷/۱۵ ؛ پذیرش: ۸۱/۱/۳۱)

چکیده

هیپوکامپ مرکز یادگیری و حافظه می‌باشد که در برخی بیماریهای نورودژنراتیو نظیر آلزایمرتحت تاثیر قرار می‌گیرد. کشت برش‌های نازک و یا سلولهای جدا شده از هیپوکامپ در شرایط آزمایشگاه جهت مطالعات بیولوژی ملکولی، تمایز و تکامل سلولی و بررسی تغییرات‌بیوشیمیایی و ژنتیکی ناشی از تاثیر داروهای مختلف و کمبود اکسیژن در رابطه با بیماریهای‌نورودژنراتیو و پیری بسیار حائز اهمیت می‌باشد. تجزیه سلولها به طرق مختلف از جمله با تاثیر آنزیمهای پروتئازی نظیر تریپسین و یا پاپائین و یا از طریق مکانیکی انجام می‌پذیرد. همچنین‌کشت سلولهای هیپوکامپ بر روی کف چسبنده نظیر کلاژن و یا پلی لایزین و استفاده ازفاکتورهای رشد عصب (NGF) انجام گرفته است. در این مطالعه سلولهای هیپوکامپ از طریق‌تجزیه مکانیکی سلولها، بدون حضور کف چسبنده و در محیط فاقد NGFکشت داده شده است‌و نتایج نشان می‌دهد که حضور کف کلاژن و فاکتور رشد عصب الزامی نیست و تمایز سلولها پس‌از یک هفته کامل می‌گردد. کشت سلولهای هیپوکامپ را می‌توان بمدت طولانی حفظ کرد.

واژه‌های کلیدی: *هیپوکامپ، کشت اولیه سلولی، تجزیه سلولی.*

مقدمه

هیپوکامپ مرکز یادگیری و حافظه در سیستم عصبی می‌باشد که کشت سلولهای آن از سال ۱۹۷۰ آغاز گردیده است. هیپوکامپ شامل سلولهای پیرامیدال، گرانول، اندوتلیال، فیبروبلاستو گلیال می‌باشد. مطالعات مستمری در مورد کشت سلولهای‌هیپوکامپ در شرایط مختلف انجام شده‌است (Banker, 1997, 1998; Goslin, 1989). کشت سلولهای هیپوکامپ بصورت برشهای نازک و یا سلولهای مجزا شده ازهم، برای مطالعات بیولوژی ملکولی و بررسی مکانیسم‌ملکولی کانالها و رسپتورها و همچنین مطالعات تمایز و تکامل سلولی و مطالعه تاثیر داروهای مختلف وکمبود اکسیژن براین‌سلولها و همچنین بررسی‌تغییرات بیوشیمیایی و ژنتیک این‌سلولها دربیماریهای نورودژنراتیو نظیر آلزایمر و پیری حائز اهمیت زیادی‌می‌باشد (Ray, 1993; Audesrik, 1997; Dotti, 1987; Schaftner, 1995; Bekker, 1991; Enokido, 1993; Vogel, 1997; Jar, 1987; Bertollini, 1997).

سلولهای هیپوکامپ بطور معمول از جنین ۱۸ یا ۱۹ روزه موش صحرایی کشت داده می‌شود، دراین صورت میزان سلولهای گلیا در آن حداقل است و تمایز سلولهای عصبی پیرامیدال که از روز۱۵ جنینی آغاز گردیده است به تدریج کامل می‌شود. بعدها از سلولهای هیپوکامپ نوزاد ۱ تا ۸روزه و یا ۱۵ روزه جهت کشت استفاده گردید و امروزه سعی بر کشت سلولهای هیپوکامپ ازموش صحرایی بالغ می‌باشد (Brewer, 1997).

دراین مطالعه، برای اولین بار در ایران سلولهای هیپوکامپ نوزاد موش صحرایی ۲-۱ روزه‌کشت داده شد. در این روش کشت بدون استفاده از آنزیمهای جداکننده سلولی و فقط باجداسازی سلولها به روش مکانیکی انجام شده است. همچنین کوتاه نمودن زمان و عدم استفاده‌از مواد پر هزینه مد نظر بوده است.

مواد و روش کار

طرز تهیه فاکتور رشد عصب: NGF به روش وارون و همکاران و با ایجاد تغییراتی درآن توسط صابونی و همکاران استخراج گردید (Varon *et al.,* 1967; Sabouni, *et al.,* 1998). ۱۰۰ عدد غده تحت فکی موش نر بالغ با وزنی معادل ۱۰ گرم و با استفاده از هموژنایزر برقی در ۲۰۰ml آب مقطر هموژنه گردید و سپس در ۵۰۰۰۰g بمدت ۴۰ دقیقه سانتریفوژ شد محلول‌رویی بوسیله فریز درایر خشک گردید و سپس در۲۰ml از بافر تریس HCL با غلظت ۰/۰۵M و ۷/۴ = pH حل گردید و بر روی دو ستون ژل کروماتوگرافی سفادکس ۱۰۰- G بطول و قطر(۱۲۵×۴cm) قرارداده شد بافر شستشو بافر تریس ۰/۰۵M با ۷/۴ = pH بود سرعت جریان

بمیزان ۱۰۰ml در ساعت بود فراکشن‌های شیری رنگ جدا گردیده و بـر روی دو سـتون آمـاده شده دی‌اتیل آمینو اتیل سلولز (DEAE) تهیه شده از شرکت مـرک بطـول و قطـر (۲/۵ cm × ۱۷) و باسرعت جریان ۳۵۰ میلی‌لیتر درساعت برده شد. ستون DEAE با ۳۰۰ml نمک طعـام ۰/۰۱M و سپس با ۳۵ml از NaCl ۰/۰۸M ، شستشو شد و برای بدست آوردن فراکشن‌هـای دیگر با نمک و غلظت بالاتر ۰/۳M و ۲M شستشو داده‌شد و جذب در ۲۸۰ نانومتر خوانده شد در منحنی حاصله فراکشن‌های مربوط به پیک‌دوم جمـع‌آوری شـده و سـپس دیـالیز بـر علیـه ساکاروز و بمدت۴۸ساعت با استفاده از کیسه دیالیز (Cut off 10 KD) انجام گرفـت و محلـول تغلیظ گردید. سپس محلول حاصل از دیالیز بر روی یک ستون کروماتوگرافی حاوی سـفادکس G-150 به‌طول و قطر (۲/۵ cm × ۹۵) قرار گرفت. سرعت جریان ۲۰ میلی لیتر در ساعت بـود. پس از اندازه‌گیری جـذب در طـول مـوج ۲۸۰ نـانومتر فراکشـن‌هـای بـا جـذب بـالاتر از ۰/۱ جمع‌آوری گردید و بر علیه سـوکروز دیـالیز شـده و حجـم بـه ۷ میلـی لیتـر رسـید و پـس از تعیین‌غلظت پـروتئین بـه روش تسـریع شـده لـوری (Bollag & Edeltein, 1991) محلـول در ویالهای با حجم ۰/۵ml جمع‌آوری‌شده و در درجه حرارت ۷۰°C- نگهداری شد.

طرز تهیه محلول کلاژن

برای تهیه محلول کلاژن از روش میکالوپولوس استفاده شد. به این صورت که۱گرم از فیبرهای کلاژن دم موش صحرایی بالغ (درحدود۲۰۰ گرم) وزن شده و در الکل۷۰ درصد بـه‌مـدت یـک شب استریل گردید و سپس در۳۰۰ml از محلول یک در هزار اسید استیک در آب‌مقطر استریل و درکنار شعله وارد گردید و در حرارت ۴ درجه به مدت ۴۸ ساعت بوسیله همزن‌برقی هـم زده شد و سپس بمدت ۲۴ ساعت اجازه داده شد تا فیبرهـای حـل نشـده تـه‌نشـین شـود وسـپس محلول رویی به ظرف در دار استریل منتقل گردید (Michalopoulos, 1975).

طرز تهیه ژل کلاژن: برای تهیه ژل کلاژن ،از کلاژن و محیط کشت DMEM به نسـبت ۲:۸ به طریقه یانگ استفاده شد (Young, 1980). بدین معنی‌کـه ۸ قسـمت از محلـول کـلاژن و ۲ قسمت از محیط کشت DMEM برداشته و با هم مخلوط گردید. محلـول زرد رنـگ حاصـله بـا استفاده از چند قطره NaOH یک نرمال‌استریل به رنگ قرمز یا صورتی (محیط خنثـی۷ = pH) درمی‌آید.

کشت سلولهای هیپوکامپ: برای اینکار از نـوزاد مـوش صـحرایی۲-۱ روزه اسـتفاده گردیـد. موشها در هر بار کشت به تعداد۲-۱ عدد با اتر بیهوش شدند و سپس در الکل جهت ضـدعفونی غوطه ور گردیدند. در اتاق کشت‌سر موشها با قیچی جـدا شـده و در پلیتهـای ۱۰۰mm حـاوی

بافر هنکس (Hank's)قرار داده شد. پوست سر موشها شکاف داده شده و با قیچی جمجمه غضروفی آنها بریده شد و جدا گردید ومغز آنها در پلیتهایmm ۳۵ حاوی بافر قرار دادهشد. سپس دو نیمکره مغز از یکدیگر جدا شده و هیپوکامپ هر نیمکره با استفاده از استرئومیکروسکوپ و با توجه به شکل و وضعیت بافت دقیقاً جدا می‌شود و به طریق غیر آنزیمی (مکانیکی) به تک سلولی تبدیل گردید (Banker, 1991). برای اینکار هیپو کامپ به قطعات کوچک تقسیم شد و با استفاده از سمپلر و سرتپ‌های زرد به طریقه مکانیکی، بافت به سلولهای تک تجزیه شد. همچنین می‌توان هیپوکامپ را درمحیط کامل DMEM بعلاوه سرم FCS ده درصد (تهیه شده ازشرکت بهار افشان) به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد و ۹۵٪ هوا و ۵٪CO2 قرار داده و بعد براحتی با سمپلر و سرتپ‌های زرد آنرا به سلولهای تک تقسیم نمود. سپس‌به هر پلیت ۳۵ میلی‌متری به تعداد $۱۰^{۶} \times ۵ - ۲$ سلول وارد کرده و در انکوباتور قرار داد (Banker, 1991; Jar, 1987; Fedoroff, 1977).

سلولهای هیپوکامپ شامل سلولهای پیرامیدال ،سلولهای آندوتلیال ،سلولهای فیبروبلاست وسلولهای گلیال می باشد. تمایز این سلولها پس از ۷ روز کامل می‌شود . قدرت حیاتی سلولها۹۵٪ می‌باشد . تعویض محیط هر هفته انجام می گیرد. بدین ترتیب که نیمی از محیط قدیمی‌برداشته شده و به آن از محیط تازه بعلاوه سرم افزوده می‌گردد.

رنگ آمیزی تولوئیدین بلو: محلول استوک ۰/۱درصد رنگ آبی تولوئیدن در آب مقطر تهیه گردید. بدین‌صورت‌که۱۰میلی‌لیتر از محلول رنگی استوک به۱۰۰ میلی‌لیتر از بافر فسفات (pH =۷) اضافه شد. پلیت سلولهای کشت داده شده هیپوکامپ از محیط کشت خالی شده و با بافر فسفات نمکی شستشو داده شده و سپس با الکل۹۶-۷۵ درجه تثبیت می‌گردد. بقدری رنگ بر روی پلیت ریخته می شود تا سطح سلولها رابپوشاند و در پلیت گذاشته می‌شود. پس از۲۰ دقیقه رنگ تخلیه شده وشستشوباآب مقطرصورت می‌گیرد و زیر میکروسکوپ نوری با درشتنمایی ۴۰، سلولها مورد بررسی قرارگرفتند (Clark, 1981).

نتایج و بحث

کشت سلولهای هیپوکامپ از جنین ۱۹-۱۸ روزه یا موش نابالغ صورت می‌گیرد. در این سن‌تشکیل نورونهای پیرامیدال (هرمی) که موش صحرایی حدود روز ۱۵ آغاز شده‌است، کامل می‌شود. اما تشکیل سلولهای گرانولی که بویژه بعد از تولد اتفاق می‌افتد در مرحله جنینی ندرتاً آغاز می‌شود (Banker, 1991; Schlessinger, 1978; Bayer, 1980). در این مرحله بیشتر نورونهای درحال تکامل درناحیه میانی قرار می‌گیرند و از سطح ونتریکولارکم‌کم شروع

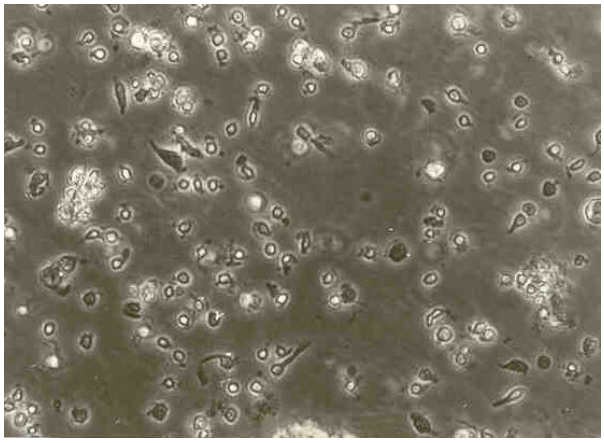
به‌مهاجرت می‌کنند و مقدمه تشکیل لایه سلولهای هرمی را فراهم می‌آورند. البته در بین آنها سلولهایی هستند که بدون اینکه مهاجرتشان کامل شده باشد شروع به طویل شدن آکسون می‌کنند.

بررسیها نشان می‌دهد که برای رشد سلول شرایطی لازم است که در آن شرایط رشد سلولها که دردانسیته پایین صورت گرفته، براحتی دیده می‌شود. چنین شرایطی در حضورNGF برای PNSفراهم می‌شود اما درCNS میزان بقای طولانی مدت در حضور NGF مشخص نیست. سلولهای گلیا منبع خوبی برای فاکتور رشد می‌باشند. در بیشتر روشها رشد نورونهای CNS به‌سرعت تکثیر بالای سلولهای گلیا و ترشح فاکتور رشد درون‌زا بستگی دارد (Davies, 1980 Waliclk *et al.,* 1988; Leibrock, 1989).

Banker و Gosline ابتدا کشت تک لایه‌ای از سلولهای آستروسیت را تهیه کرده و اجازه دادند تا آنها رشد کنند. کشتهای نورونهای هیپوکامپ بطور مجزا آماده شد سپس نورونها وسلولهای گلیا با هم تشکیل بافت بصورت sandwich را دادند. در این روش بقاء طولانی مدت‌سلولهای هیپوکامپ امکان‌پذیر است (Gosline & Banker, 1991). بعدها از سلولهای هیپوکامپ نوزاد ۱ تا ۸ روزه جهت‌کشت استفاده گردید و امروزه سعی بر کشت هیپوکامپ از بزرگسالان می‌باشد (Brewer, 1997).

دراین تحقیق ما از کشت سلولهای هیپوکامپ نوزاد۲-۱ روزه موش‌صحرایی استفاده کردیم . کشت هیپوکامپ یا بصورت برشهای نازک و یا سلولهای جدا شده از هم صورت می‌گیرد. تجزیه‌سلولها به طریقه آنزیمی یا مکانیکی انجام می‌گیرد. روش آنزیمی از جمله کارهای انجام شده در سالهای اخیر می‌باشد(Walz & Juurlink, 1999) که با استفاده از تریپسین و DNase و در محیط حاوی سرم و فاقد عوامل رشد، نمونه را سانتریفوژ کرده‌اند(Boulton *et al.,* 1997). در این تحقیق بااستفاده‌از پیپت و به‌روش مکانیکی جداسازی سلولها انجام گرفته‌است(شکل۱). کف چسبنده سلولها شامل کلاژن و یا پلی لایزین و یا مخلوطی از ایندو ویا پلی‌اورنیتین و فاکتورهای چسبندگی دیگر نظیر لامینین و غیره می‌باشد (Boulton *et al.,* 1997). یا اینکه بصورت Co-Culture یعنی یک‌لایه تغذیه کننده که از سلولهای آستروسیت کشت‌شده می‌باشد که بر روی آن سلولهای‌هیپوکامپ قرار می‌گیرد و از این طریق از فاکتورهای رشدی که آستروسیت‌ها در محیط ترشح می‌کنند و یا از طریق اتصالات، می‌توانند استفاده کنند و یا اینکه از محیط مشروطCondition Medium استفاده می‌گردد. مشخص شده است که سلولهای هیپوکامپ را می‌توان بر روی پلیتهای کشت پلاستیکی(Nunc) بدون اینکه با فاکتورهای اضافی

چسبندگی پوشیده شده‌باشند، کشت داد. در اینصورت نیز تمایز در آنها بخوبی انجام مـی‌شـود (Schaftner *et al.*, 1995; Hindley *et al.*, 1997).



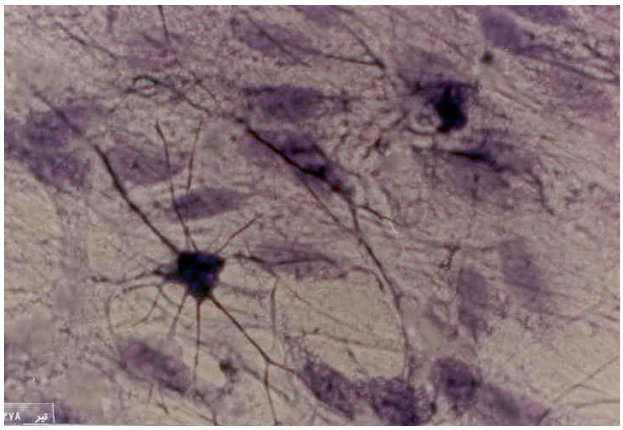
شکل۱ - سلولهای هیپوکامپ پس از جدا شدن بطریق مکانیکی
X32- میکروسکوپ فاز کنتراست

سلولهای هیپوکامپ بعد از۲ساعت‌که ازجداسازی آنها گذشت به اشکال مختلف‌کوچک، گرد، تخم‌مرغی‌کشیده و یا بیضوی با زوایا و طرحهای‌مختلف دیده‌می‌شود(شـکل۱). تمـایز سـلولهای هیپوکامپ کشت شده درطول زمان بررسی گردیده‌است، در۶ ساعت بعد ازکشت سلولها بصورت لاملی پودا دیده‌می‌شود که بعداً زواید سلولی با یک اندازه ایجاد می‌شود و سپس یکـی از زوایـد بلند گردیده و اکسون را ایجاد می‌کند و سپس شاخه‌دار شـدن زوایـد وطـولانی شـدن اکسـون حادث می‌گردد. تمایز سلولهای هیپوکامپ در۷ روز صورت می‌گیرد. سلولهای هیپوکامپ بـدون ارتباط با دیگر سلولها می‌توانند تمایز یابند. همچنین سلولهای عصبی‌پیرامیـدال مـی‌تواننـد بـا سلولهای گلیال نیز ارتباط داشـته باشـند. میـزان پلـی‌ریبـوزوم در اکسـون کـم ولـی درشـبکه اندوپلاسمیک صاف در انتهای اکسون وجود دارد (Banker & Goslin, 1991). فاکتورهای رشد نظیرNGF در غلظتهای ۵ تا ۱۰۰ نانوگرم رشد سلولهای عصبی هیپوکامپ را تشدید نمـی‌کنـد (Banker, 1980) که تجربیات اخیر ما نیز مؤید این مطلب است.

درکشـت هیپوکامـپ۲-۱ روزه مـوش انـواع مختلفـی از سـلولها نظیـر سـلولهای عصـبی پیرامیدال،سلولهای گلیال، سلولهای اندوتلیال و فیبروبلاستها رشد می‌کننـد. هـر کـدام از ایـن سلولها بخصوص‌سلولهای گلیال فاکتورهای رشدی را ترشح می‌کنند که برای رشد استطاله‌های عصبی نظیر اکسون‌و دندریت‌ها و تمایز سلولها لازم است. به همین جهت تعویض کامل محـیط

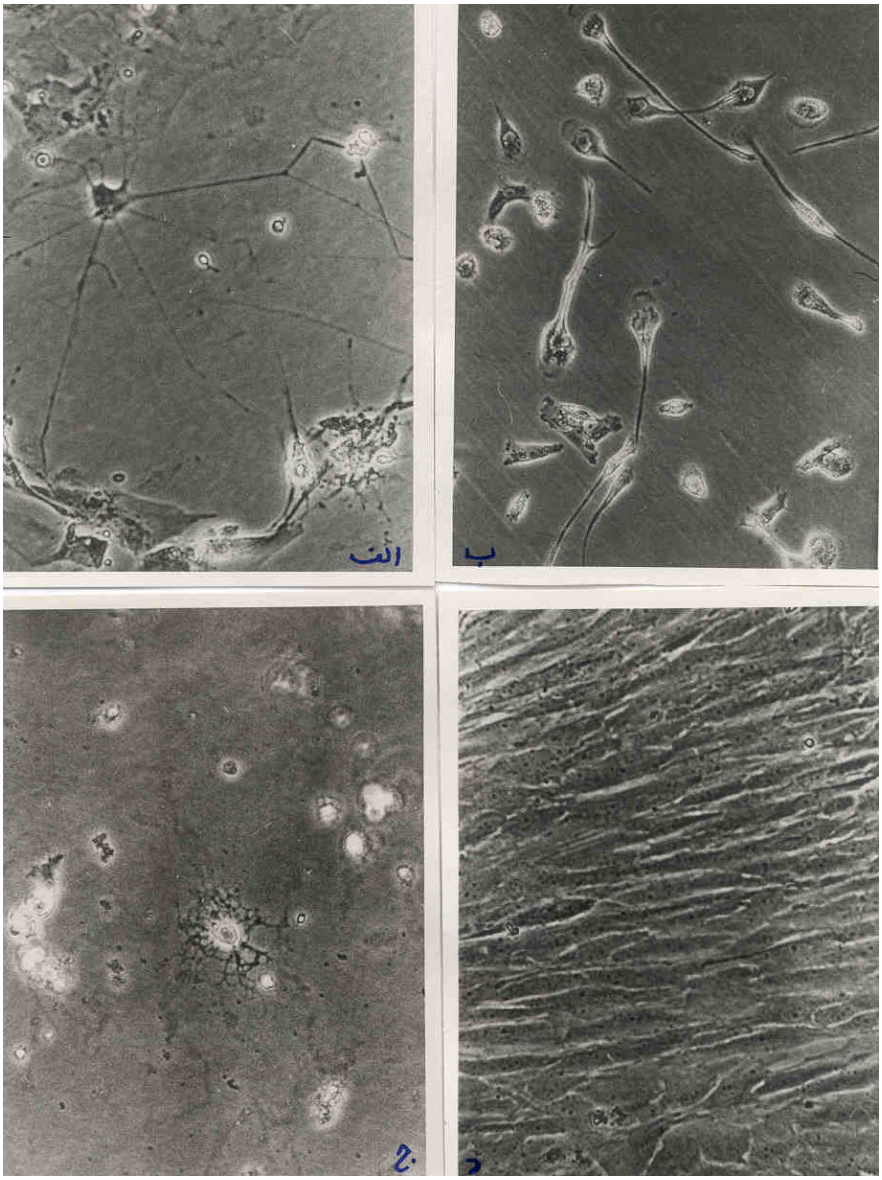
کشت بدلیل حذف این فاکتورها سبب آسیب رسیدن به سلولها می‌گردد. در این شرایط بایستی نیم تا ثلثی از محیط تعویض گردد تا خللی در سازگاری سلولها به محیط کشت وارد نگردد. در بعضی از موارد برای ازبین بردن سلولهای گلیال یا سلولهای فیبروبلاست در کشت از مواد مهار کننده تقسیم نظیرسیتوزین آرابینوزاید استفاده می‌گردد (Banker & Goslin, 1991) درحالیکه در این تحقیق ما از اختلاف در چسبندگی درسلولهای عصبی با سلولهای فیبروبلاست و سلولهای گلیا استفاده کرده و باعث حذف آنها شدیم. دراین طرح از کشت اولیه سلولهای هیپوکامپ از موش صحرایی ۲-۱ روزه استفاده گردید. قدرت‌حیاتی سلولها ۹۵٪ می‌باشد.

سلولهای هیپوکامپ را میتوان بر روی کف پلیتهای۳۵ میلی‌متری و یا باکف‌های چسبنده نظیرکلاژن کشت داد. در این مطالعه هر دو روش امتحان گردید و تفاوت چندانی مشاهده نگردید. همچنین از فاکتور رشد عصب نیز استفاده گردید ولی در مقایسه با کنترل آنها، اختلافی درکشت دیده نشد. برای مشخص کردن سلولهای پیرامیدال از رنگ‌آمیزی تولوئیدن‌بلو و تیونین استفاده‌گردید. تولوئیدن‌بلو باعث رنگ‌آمیزی اجسام نیسل در سلولهای عصبی می‌گردد. در صورتی که‌هسته سلولهای غیر عصبی به رنگ صورتی درمی‌آید (شکل۲).



شکل۲- رنگ‌آمیزی کشت سلولهای هیپوکامپ با تولوئیدین بلو
X40- میکروسکوپ نوری

سلولهای هیپوکامپ درکشت اولیه بعد از یک هفته تمایز می‌یابند. این سلولها شامل سلولهای‌عصبی پیرامیدال(شکل-۳ الف) و سلولهای غیر عصبی یا سلولهای گلیال شامل سلولهای‌میکروگلیا(شکل۳-ب)، سلولهای اولیگودندروسیت (شکل۳-ج) وسلولهای آستروسیت نوع‌اول (شکل۳-د) می‌باشد.



شکل۳- کشت سلولهای هیپوکامپ، (الف- یک سلول عصبی پیرامیدال ب- سلولهای میکروگلیا ج- اولیگودندروسیت تمایز یافته د- سلولهای آستروسیت نوع اول)، X32 ـ میکروسکوپ فازکنتراست

مزیت وجود سلولهای گلیال درکشت مخلوط سلولهای هیپوکامپ سنتزوترشح فاکتورهای رشدلازم برای رشد و تمایزسلولهای عصبی درمحیط‌کشت می‌باشد (Sabouni *et al*., 2000). سلولهای عصبی‌هیپوکامپ براحتی می‌توانند بصورت انفرادی تمایز یابند و همچنین می‌توانند با سایر سلولهای‌عصبی و غیر عصبی ارتباط برقرار نمایند. کشت سلولهای عصبی همانند کشت دراز مدت مغزاستخوان بسیار وابسته به محیط است.

نتیجه‌گیری

۱- کشت سلولهای هیپوکامپ هم در مراحل جنینی و هم در نوزاد و هم در بالغ امکان پذیر است.

۲- در کشت سلولهای هیپوکامپ ،افزودن فاکتورهای رشد اختصاصی نظیر NGF به محیط‌کشت ضروری نیست و این فاکتورها توسط سلولهای موجود در کشت به اندازه نیاز تولیدمی‌گردد.

۳- کشت درازمدت سلولهای هیپوکامپ همانند کشت درازمدت مغز استخوان به محیط وابسته‌است و در تعویض محیط نبایستی تمام محیط را خالی و محیط کاملاً جدید وارد نمود بلکه‌بایستی حداکثر نیمی از محیط با محیط جدید تعویض شود تا محیط کشت از فاکتورهای اساسی‌رشد که در محیط وجود دارد،تهی نگردد.

۴- کف چسبنده کلاژن اثر مثبتی بر کشت سلولهای هیپوکامپ دارد، اگرچه بدون آن هم می‌توان‌کشت را انجام داد.

۵- از کشت سلولهای هیپوکامپ می‌توان برای مطالعات بیولوژی ملکولی و بررسی مکانیسم‌ملکولی کانالها و رسپتورها و نیز بررسی تمایز و تکامل سلولی و از همه مهمتر بررسی تاثیرداروهای مختلف بر روی هیپوکامپ استفاده کرد. همچنین تغییرات بیوشیمیایی ایجاد شده در اثربیماریهای نورودژنراتیو نظیر آلزایمر را مورد مطالعه قرار داد.

در این طرح کشت سلولهای هیپوکامپ بعنوان اولین قدم برای مطالعات بعدی مطرح بوده است.

تشکر و قدردانی

از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه تهران جهت تامین اعتبار طرح پژوهشی و از جناب آقای‌دکتر بهرام گلیایی به خاطر در اختیار گذاشتن آزمایشگاه تشکر می‌شود.

Reference

Audesrik G., Cabell L., Kern M., (1997) *Modulation of neurite branching by protein phosphorilation in cultured rat hippocampal neurons develop*. Brain Res. **102,** 247-260

Banker G., Goslin.k., (1991) *Tissue culture methods for the study of myelination: culturing nerve cells*. A Bradford book the MIT press Cambridge, Massachusetts. pp 68-69 and 337-377

Banker G.A. and Cowan W.M., (1977) *Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture*. Brain Res. **126,** 397-425

Banker G.A., (1980) *Trophic intractions between astroglial cells and hippocampal neurons in culture.* Science **209,** 809-810.

Bayer S.A., (1980) *Development of the hippocampal region of the rat Neurogenesis examined with ^{3}H-thymidine autoradliography*. J.Comp., Neurol. **190,** 87-114

Bekkers J.M., Stevens C.F., (1991) *Excitatory and inhibitory outaptic currents in isolated hippocampal neurons maintained in cell culture*. Proc.Natl. Acad. Sci. **88,** 7834-7838.

Bertollini L., Citotti M.t., Chorubini E., Cattaneo A., (1997) *Neurotrophin-3 promotes the survival of oligodendrocyte precursors in embryonic hippocampal cultures under chemically defined conditions*. Brain Res. **746,** 19-24.

Bollag, D.M., Edelstein S.J., (1991) *Protein methods N.Y.* Wileyliss p.p.556-59, 88-89.

Boulton A.A., Baker G.B and Bateson A.N., (1999) *Cell Neurobiology Techniques*, Humana Press Inc. America, pp.9-91.

Brewer G.J., (1997) *Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons*. J. Neurosci. Methods, **71,** 143-155.

Clark G., (1981).*Staining procedures*, publish for the biological stain commission Williams &Wilkins p.p. 142-143.

Davies A.N., (1988) *Role of neurotrophic factors in development*. Trends Genetics **4,** 139-143

Dotti C.G., Banker G.A., (1987) *Experimentally induced alteration in the polarity of developing neurons*. Nature, **330,** 254-256.

Enokido Y., Hatanaka H., (1993) *Apoptotic cell death occurs in hippocampal neurons cultured in a high oxygen atmosphere*. Neurosci, **57,** 965-9672.

Fedoroff S., Hertz L., (1977) *Cell tissue and organ culture in neurobiology*, Academic press.

Golsin k., Banker G., (1989) *Experimental observation on the development of polarity by hippocampal neuron in culture*. J.Cell.Biol. **108,** 1507-1516

Hindley S., Juurlink B.H.J., Gysbers J.W., Middlemiss P.J., Herman, M.A.R. and Rathbone, M.P., (1997) *Nitric oxide donors enhance neurotrophin-induced*

neurite outgrowth through a cGMP-dependent mechanism. J.Neurosci. Res **47,** 427-439.

Jar C.E., Stevens C.F., (1987) *Glutamate activates multiple single channel conductances in hippocampal neurons*. Nature, **325,** 522-525 .

Leibrock J.F., Lottspeich A., Hohn M., Hofer B., Hengerer P.,Masiakowski H., Thoenen andBarde Y.A., (1989) *Molecular cloning and expresion of brain-derived neurotrophic factor*. Nature **341,**149-152

Michalopoulos G., Pitot H.C., (1975) *Primary culture of paranchymal liver cells on collagen membrane.* Exp. cell. Res. **94,** 70-78

Ray J., Peterson D.A., Schinstin M., Gage F.H., (1993) *Proliferation,differentation and long-term culture of primary hippocampal neurons*, Proc. Natl. Acad. Sci. **90,** 3602-3606.

Sabouni, F., Firouzi, M., Taghikani, M., Ziaee, A.A., Semnanian, S., (1998) *Neurite outgrowth of Dorsal Root Ganglia is Delayed and Arrested by aspirin*. Biochem.Biophys. Res. Commun., **248,** 165-167 .

Sabouni, F., Firouzi, M., Taghikani, M., Ziaee, A.A., Semnanian, S., (2000) *Role of Aspirin in the Neurite Degeneration and Apoptotic Cell Death of Mixed Hippocampal Cell Culture*. Iranian Biomedical Journal, **4,**150 .

Schaftner A.E., Barker J.L., Stenger D.A., Hickman J.J., (1995) *Investigation of the factors necessary for growth of hippocampal neurons in adefined system*. J. Neurosci Methods. **62,** 111-119.

Schlessinger A.R., Gowan W.M and Swanson L.W., (1978) *The time of origin of neurons in Ammons horn and the associated retro hippocampal fields.* Anat. Embryol. **154,** 153-173

Varon S., Nomura G., Shooter E.M., (1967) *The isolation of the mouse nerve growth factor in a high molecular weight form,* Biochemistry, **6,**2202-2209.

Vogel P., Dux E., Wiessner C.F., (1997) *Evidence of apoptosis in primary neural culture after heat shock.* Brain Res. **764,** 205-213

Walicke P.A., Feige J.J and Baird A., (1989) *Characterization of the neuronal receptor for basic fibroblast growth factors and comparison to receptors on mezenchymal cells 92093.* J. Biol. Chem.**264,** 4120-4126

Young J., Richards J., Guzman, Imagawa W., Nandi S., (1980) *Sustained growth in primary culture of normal mammary epithelial cells embedded in collagen gel*. Proc. Natl. Acad. Sci. **77,** 2088-2092