

## 소염진통제 약물에 대한 *In vitro* 피부자극 시험연구

이종권\* · 김대병 · 이은희 · 이선희 · 류승렬 · 최기환 · 김윤정 · 김부영  
식품의약품안전청 국립독성연구소 독성부

### *In Vitro* Skin Irritation Test of Anti-inflammatory Drugs

Jong Kwon Lee\*, Dai Byung Kim, Eun Hee Lee, Sun Hee Lee, Seung Rel Ryu,  
Ki Hwan Choi, Yoon Jeong Kim and Pu Young Kim

Department of Toxicology, National Institute of Toxicological Research, Korea Food and  
Drug Administration 5 Nokbun-Dong, Eunpyung-Gu, Seoul, 122-704, Korea

(Received May 20, 1998)

(Accepted September 1, 1998)

**ABSTRACT:** *In vitro* skin irritation of anti-inflammatory drugs was investigated in terms of the cytotoxicity method to human skin fibroblast cells. Five anti-inflammatory drugs (Diclofenac, Naproxen, Meclofenamic acid, Ibuprofen and Fenoprofen) which are commercially available as oral preparations or injections were tested. The cytotoxicity of 5 chemicals was evaluated by using MTT[tetrazolium salt 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay, NRU (neutral red uptake) assay and Alamar Blue assay after fibroblast cells had been exposed to the chemicals for 24 hours or 48 hours. The  $IC_{50}$  values of the chemicals showed the comparative strength of cytotoxicity as following order of Meclofenamic acid > Diclofenac > Fenoprofen > Ibuprofen > Naproxen. The values of  $IC_{50}$  determined by Alamar Blue assay were lower than those of MTT and NRU assay. These data suggest Alamar Blue assay can be useful method for assessing *in vitro* skin irritation potential of anti-inflammatory drugs.

**Key Words:** Anti-inflammatory drugs, MTT, NRU, Alamar Blue, Cytotoxicity

### I. 서 론

신약개발에는 상당한 비용이 소모되기 때문에 근래에는 투여경로를 달리하는 제형개발을 통하여 약효를 상승시키고 독성을 줄이는 연구가 활발하다. 소염진통제 약물은 류마티스 관절염, 골관절염 등에 주로 경구 제제로 많이 사용되고 있으나 대부분이 심각한 위장장애를 유발하기 때문에 경구투여의 팹취제나 연고제 등으로의 신제형개발에 대한 관심이 집중되고 있으며 이미 국내 제약업계에서도 상품화하여 성공한 바도 있다.

피부자극시험이나 안자극시험과 같은 국소독성시험은 1944년 Draize가 소개한 이래 토끼를 대상으로 하는 시험방법이 유용되고 있으나(Draize 등, 1944; Daston and Freeberg, 1991; Olson, 1991), 최근 유럽을 중심으로 *in vitro* 대체시험법 연구가 광범위하게 진행되고 있으며 안점막자극시험법에 대해서는 어느 정도 validation이 이루어지고 있다(Ponec, 1992; Osborne

and Perkins, 1994; Annette 등, 1997). 피부자극시험에 대한 *in vitro* 시험방법은 사람의 섬유모세포(fibroblast)나 각질세포(keratinocyte)에 대해 세포독성 측정방법으로 NRU(neutral red uptake) assay, MTT[tetrazolium salt 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay, LDH(lactate dehydrogenase) assay, kenacid blue assay 등으로 실시되고 있다. 최근에는 Page 등(1993)에 의해 Alamar Blue 방법(assay)이 소개되어 세포성장 측정에 이용되고 있으나 피부자극시험이나 안자극시험에 사용한 예는 거의없다.

소염진통제 약물중에서 경구제나 주사제로 이용되고 있는 것은 Ketoprofen, Ibuprofen, Diclofenac, Indomethacin, Fenoprofen, Aspirin, Meclofenamic acid, Naproxen 등이 있는데 이중에서 물에 용해도가 있는 Ibuprofen, Diclofenac, Fenoprofen, Meclofenamic acid, Naproxen을 선정하여 본 시험에 사용하였다.

본 실험은 현재 시판되고 있는 소염진통제들에 대한 피부자극정도를 *in vitro* 시험으로 실시함으로써 경피 투여제제로의 신제형 개발시 기초자료를 제공하고 피

\*To whom correspondence should be addressed.

부자극시험에 대한 *in vitro* 대체시험법 개발의 자료축적의 목적으로 5종의 소염진통제에 대한 *in vitro* 피부 자극시험을 실시하였으며, 아울러 최근에 소개된 Alamar Blue 방법과 기존의 NRU 방법, MTT 방법과 비교하기 위하여 실시하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시험물질

시험에 사용한 소염진통제 Diclofenac sodium salt, Ibuprofen sodium salt, Meclofenamic acid sodium salt, Fenoprofen calcium salt, Naproxen sodium salt는 Sigma (U.S.A.)에서 구입하여 DMEM(Dulbecco's modified eagle medium)에 용해하여 사용하였으며, MTT[tetrazolium salt 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide]와 NR(neutral red)은 Sigma(U.S.A.), Alamar Blue는 Biosource(U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다. 섬유모세포의 분리에 사용된 collagenase, dispase 및 trypsin은 Gibco BRL(M.D. USA)로부터 구입하였다. 그 외 다른 시약들은 표준시약 제조회사로부터 reagent grade급의 시약을 구입하여 사용하였다.

### 2. 세포배양

시험세포는 신생아의 포피(foreskin)에서 분리한 사람의 섬유모세포를 이용하였다. 사람의 포피조직을 잘게 잘라낸 다음 배양접시에 넣고 PBS(phosphate buffered saline)로 세척한 후 collagenase(1 mg/ml)와 dispase (2 mg/ml) 용액을 넣어준 후 37°C에서 20분 배양시킨 후 입체현미경하에서 진피(dermis)와 표피(epidermis)를 분리하였다. 분리된 진피를 칼로 세절한 다음 0.25% trypsin 용액에 넣어 30분간 배양하여 1500 rpm으로 10분간 원심분리하여 조직에서 유리된 세포를 모아 분리하였다. 분리된 섬유모세포를 1% penicillin-streptomycin, 1% L-glutamine, 10% FBS(fetal bovine serum)가 첨가된 DMEM에 1차 배양한 다음 수차례 계대배양한 세포를 본 실험에 사용하였다(Shin 등, 1996).

### 3. 세포독성시험

#### 1) MTT assay

Mosmann(1983)의 방법을 변형하여 96 well pate에 각 well당  $2 \times 10^4$ 개의 섬유모세포를 24시간 동안 37°C,

5% CO<sub>2</sub>의 조건하에서 배양하였다. 배지를 교환한 다음 각 시험물질을 예비실험을 통하여 정해진 농도(0.1~10 mM)로 24시간 또는 48시간 처리한 다음 2 mg/ml MTT 20  $\mu$ l를 각 well에 넣어 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건하에서 3시간 동안 배양한 후 상층액을 제거하고 dimethylsulfoxide 150  $\mu$ l를 넣은 다음 10분간 잘 혼합하여 침전물을 용해시킨후 microplate reader(E-max, Molecular Device, U.S.A.)를 사용하여 540 nm에서 O.D.를 측정하였다.

#### 2) NRU(neutral red uptake) assay

Borefreund와 Puerner(1985)의 방법을 변형하여 96 well pate에 각 well당  $2 \times 10^4$ 개의 섬유모세포를 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건하에서 배양하였다. 배지를 교환한 다음 각 시험물질을 예비실험을 통하여 정해진 농도(0.1~10 mM)로 24시간 또는 48시간 처리한 다음 neutral red 200  $\mu$ l를 각 well에 넣어 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건하에서 3시간 반응시킨 후 제거하였다. Formal-calcium 용액(1% formalin과 1% CaCl<sub>2</sub>)으로 세척한 후 1% glacial acetic acid-50% ethanol 용액으로 10분간 추출한 후 microplate reader를 사용하여 540 nm에서 O.D.를 측정하였다.

#### 3) Alamar Blue assay

Page 등(1983)의 방법을 변형하여 96 well pate에 각 well당  $2 \times 10^4$ 개의 섬유모세포를 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건하에서 배양하였다. 배지를 교환한 다음 각 시험물질을 예비실험을 통하여 정해진 농도(0.1~10 mM)로 24시간 또는 48시간 처리한 다음 HBSS(Hank's balanced salt solution)으로 세척한 후 HBSS로 희석된 Alamar Blue 200  $\mu$ l를 첨가한 후 3시간 반응시켰다. 3시간 반응시킨 후 microplate reader를 사용하여 환원형태(reduced form)를 570 nm( $\lambda_{ex}$ =570 nm)에서 산화형태(oxidized form)를 630 nm( $\lambda_{em}$ =630 nm)에서 O.D. 값을 측정하여 환원율(reduction rate)을 계산하여 세포의 생존율을 계산하였다.

#### 4) 통계처리

세포의 성장을 50%(10%, 20%, 80%) 감소시키는 농도인 IC<sub>50</sub>(IC<sub>10</sub>, IC<sub>20</sub>, IC<sub>80</sub>) 값은 Litchfield & Wilcoxon (1949)의 방법에 의하여 산출하였다.

## III. 결 과

### 1. MTT assay 결과

5종의 소염진통제를 사람의 섬유모세포에 24시간 및 48시간 노출시킨 후 MTT 시험결과는 Table 1에 제시하였다. 24시간 노출시의 IC<sub>50</sub>을 산출한 결과 Naproxen은 38.67 mM, Ibuprofen이 6.70 mM, Fenoprofen이 3.80 mM, Diclofenac이 2.91 mM, Meclofenamic acid가 0.91 mM로 나타났으며 48시간 노출시킨 후 IC<sub>50</sub>을 산출한 결과 Naproxen이 7.76 mM, Ibuprofen이 2.89 mM, Fenoprofen이 1.59 mM, Diclofenac이 1.54 mM, Meclofenamic acid가 0.33 mM로 나타났다.

## 2. NRU assay 결과

5종의 소염진통제를 사람의 섬유모세포에 24시간 및 48시간 노출시킨 후 neutral red uptake 시험결과는 Table 2에 제시하였다. 24시간 노출시 IC<sub>50</sub>을 산출한 결과 Naproxen은 14.77 mM, Ibuprofen이 6.54 mM, Diclofenac이 21.18 mM, Meclofenamic acid가 13.30 mM로 나타났으며 48시간 노출시킨 후 IC<sub>50</sub>을 산출한 결과 Naproxen이 12.17 mM, Ibuprofen이 6.39 mM, Fenoprofen이

2.64 mM, Diclofenac이 2.80 mM, Meclofenamic acid가 0.79 mM로 나타났다.

## 3. Alamar Blue assay 결과

5종의 소염진통제를 섬유모세포에 24시간 노출시킨 후 Alamar Blue 시험결과는 Table 3과 같으며, IC<sub>50</sub>을 산출한 결과 Naproxen은 9.84 mM, Ibuprofen이 4.73 mM, Fenoprofen이 7.93 mM, Diclofenac이 1.36 mM, Meclofenamic acid가 0.31 mM로 나타났다. 48시간 노출시킨 후 시험결과는 Table 3과 같으며, IC<sub>50</sub>을 산출한 결과 Naproxen이 4.82 mM, Ibuprofen이 2.83 mM, Fenoprofen이 1.50 mM, Diclofenac이 0.96 mM, Meclofenamic acid가 0.09 mM로 나타났다(Table 1).

## 4. IC<sub>50</sub>에 의한 세포독성의 비교

IC<sub>50</sub>에 의한 세포독성의 비교는 Table 4와 같다. Naproxen의 경우 24시간노출시 MTT에 의한 IC<sub>50</sub>은

**Table 1.** *In vitro* cytotoxicities (mM)<sup>a)</sup> of 5 anti-inflammatory drugs exposed for 24 hrs or 48 hrs by the MTT method with human fibroblast cells

Anti-inflammatory Drugs	IC <sub>10</sub>		IC <sub>20</sub>		IC <sub>50</sub>		IC <sub>80</sub>		M.W.
	24 hrs	48 hrs	24 hrs	48 hrs	24 hrs	48 hrs	24 hrs	48 hrs	
Meclofenamic acid	0.15	0.05	0.28	0.10	0.91	0.33	2.95	1.08	318.1
Diclofenac	0.98	0.43	1.43	0.67	2.91	1.54	5.91	3.52	318.1
Fenoprofen	0.82	0.50	1.38	0.74	3.80	1.59	10.43	3.41	522.6
Ibuprofen	3.68	0.82	4.52	1.26	6.70	2.89	9.92	6.59	228.3
Naproxen	0.34	3.42	1.72	4.53	37.67	7.76	868.84	13.28	252.6

<sup>a)</sup>IC<sub>10(20, 50, 80)</sub> values are the concentrations producing 10 (20, 50, 80)% inhibition of cell growth compared to the control in mM (n=6).

**Table 2.** *In vitro* cytotoxicities (mM)<sup>a)</sup> of 5 anti-inflammatory drugs exposed for 24 hrs or 48 hrs by the NRU method with human fibroblast cells

Anti-inflammatory Drugs	IC <sub>10</sub>		IC <sub>20</sub>		IC <sub>50</sub>		IC <sub>80</sub>		M.W.
	24 hrs	48 hrs	24 hrs	48 hrs	24 hrs	48 hrs	24 hrs	48 hrs	
Meclofenamic acid	0.06	0.03	0.37	0.10	13.03	0.79	455.93	6.10	318.1
Diclofenac	1.01	0.88	2.88	1.31	21.18	2.80	155.80	5.97	318.1
Fenoprofen	-	0.52	-	0.91	-	2.64	-	7.69	522.6
Ibuprofen	3.34	-	4.21	-	6.54	-	10.18	-	228.3
Naproxen	5.04	5.25	7.29	7.01	14.77	12.17	29.89	21.13	252.6

<sup>a)</sup>IC<sub>10(20, 50, 80)</sub> values are the concentrations producing 10 (20, 50, 80)% inhibition of cell growth compared to the control in mM (n=6).

- : not determined.

**Table 3.** *In vitro* cytotoxicities (mM)<sup>a)</sup> of 5 anti-inflammatory drugs exposed for 24 hrs or 48 hrs by the Alamar Blue method with human fibroblast cells

Anti-inflammatory Drugs	IC <sub>10</sub>		IC <sub>20</sub>		IC <sub>50</sub>		IC <sub>80</sub>		M.W.
	24 hrs	48 hrs	24 hrs	48 hrs	24 hrs	48 hrs	24 hrs	48 hrs	
Meclofenamic acid	0.01	0.01	0.03	0.02	0.31	0.09	3.18	0.31	318.1
Diclofenac	0.61	0.46	0.81	0.60	1.36	0.96	2.30	1.56	318.1
Fenoprofen	1.32	0.05	2.44	0.16	7.93	1.50	25.77	14.04	522.6
Ibuprofen	2.67	1.41	3.25	1.79	4.73	2.83	6.89	4.48	228.3
Naproxen	2.94	1.57	4.45	2.30	9.84	4.82	21.74	10.07	252.6

<sup>a)</sup>IC<sub>10(20, 50, 80)</sub> values are the concentrations producing 10 (20, 50, 80)% inhibition of cell growth compared to the control in mM (n=6).

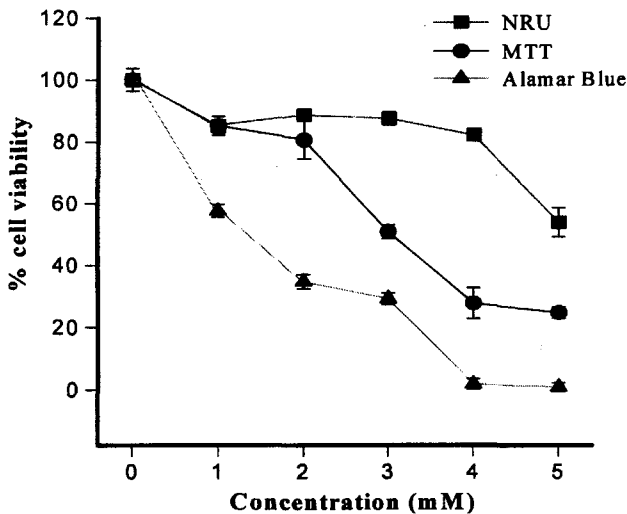
**Table 4.** Comparison of IC<sub>50</sub> values<sup>a)</sup> for 5 anti-inflammation drugs by MTT assay, NRU assay and Alamar Blue assay

	Meclofenamic acid		Diclofenac		Fenoprofen		Ibuprofen		Naproxen	
	24 hrs	48 hrs	24 hrs	48 hrs	24 hrs	48 hrs	24 hrs	48 hrs	24 hrs	48 hrs
MTT	0.91	0.33	2.91	1.54	3.80	1.59	6.70	2.89	38.67	7.76
NRU	13.03	0.79	21.18	2.80	-	2.64	6.54	-	14.77	12.17
Alamar blue	0.31	0.09	1.36	0.96	7.93	1.50	4.73	2.83	9.84	4.82

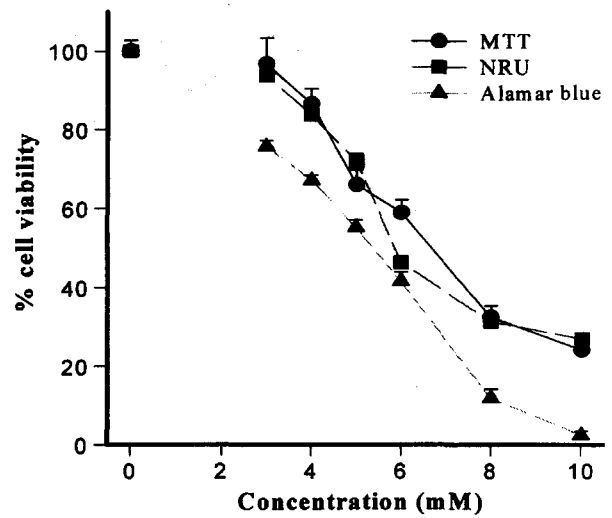
<sup>a)</sup>IC<sub>50</sub> values are the concentrations producing 50% inhibition of cell growth compared to the control in mM (n=6).  
 -: not determined.

38.67 mM, NRU는 14.77 mM, Alamar Blue는 9.84 mM로 나타났으며, Ibuprofen은 MTT가 6.70 mM, NRU는 6.54 mM, Alamar Blue는 4.73 mM로 나타났으며 Fenoprofen은 3.80 mM, Alamar Blue는 7.93 mM으로 나타났으며 Meclofenamic acid는 24시간 노출시 MTT

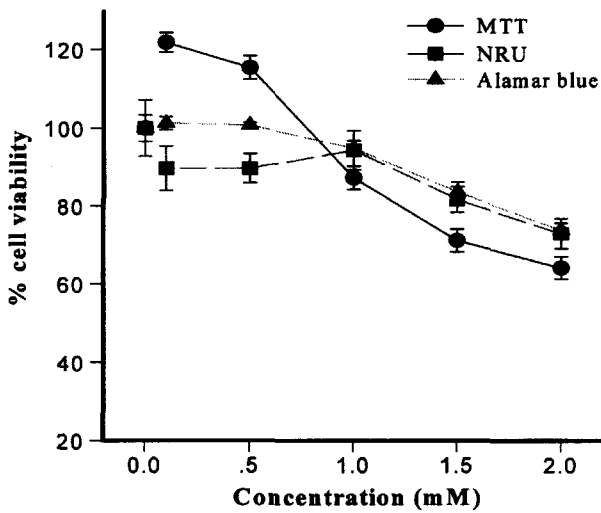
0.91 mM, NRU는 4.30 mM, Alamar Blue는 0.31 mM로 나타났으며 Diclofenac의 결과는 Fig. 1에, Fenoprofen은 Fig. 2에, Ibuprofen은 Fig. 3에, Meclofenamic acid는 Fig. 4에, Naproxen은 Fig. 5에 각각 제시하였다.



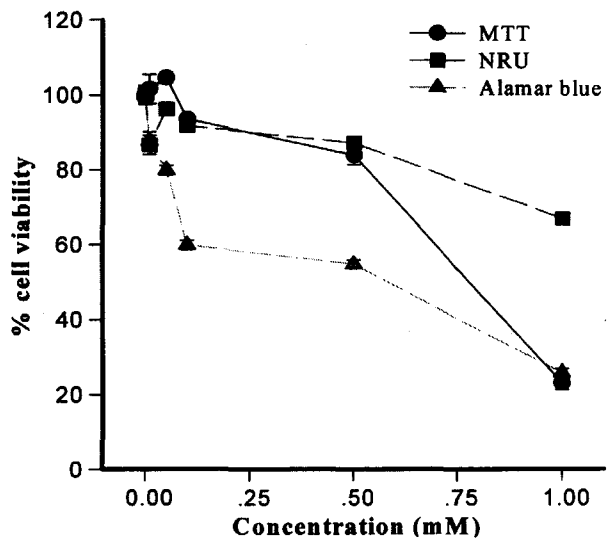
**Fig. 1.** In vitro cytotoxicity of Diclofenac for 24 hr exposure in human fibroblasts using the NRU, MTT and Alamar blue assay. Each value represents the mean ± S.E. (n=6).



**Fig. 3.** In vitro cytotoxicity of Ibuprofen for 24 hr exposure in human fibroblasts using the NRU, MTT and Alamar blue assay. Each value represents the mean ± S.E. (n=6).



**Fig. 2.** In vitro cytotoxicity of Fenoprofen for 24 hr exposure in human fibroblasts using the NRU, MTT and Alamar blue assay. Each value represents the mean ± S.E. (n=6).



**Fig. 4.** In vitro cytotoxicity of Meclofenamic acid for 24 hr exposure in human fibroblasts using the NRU, MTT and Alamar blue assay. Each value represents the mean × S.E. (n=6).

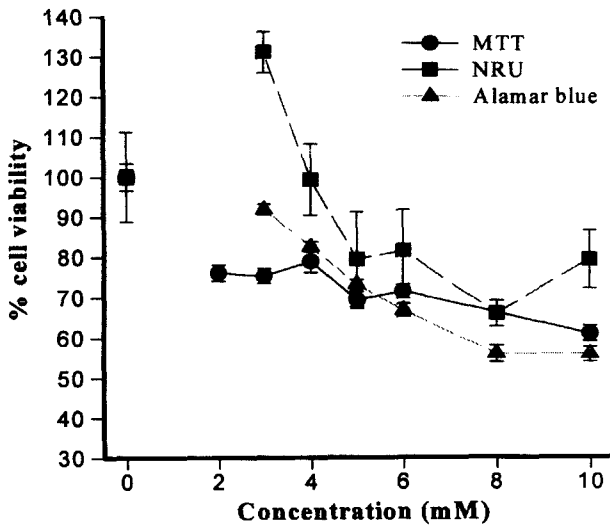


Fig. 5. In vitro cytotoxicity of Naproxen for 24 hr exposure in human fibroblasts using the NRU, MTT and Alamar blue assay. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. (n=6).

#### IV. 고 찰

신제형개발시 기초자료를 제공하고자 5종의 소염진통제에 대하여 사람의 섬유모세포를 이용하여 3가지 방법으로 세포독성을 비교한 결과 Meclofenamic acid > Diclofenac > Fenoprofen > Ibuprofen > Naproxen 순으로 나타났으며 세포의 성장을 50% 감소시키는 농도인 IC<sub>50</sub>을 기준으로 환산해 볼 때 Alamar Blue 방법이 5종의 소염진통제에 대하여 NRU 방법이나 MTT 방법보다 민감하게 나타났다.

Alamar Blue는 새로운 tetrazolium dye로 세포내 환원효소(reductase)에 의해 분홍빛 발색단(chromophore)으로 되어 형광계방법(fluorimetric)이나 분광광도계(spectrophotometric) 방법으로 측정될 수 있어 비교적 그 시험방법이 간단하며 그 자체가 무독하기 때문에 최근에 연구가 많이 되고 있다(Page 등, 1993; Goegan 등, 1995). White 등(1996)은 신경원세포 세포활성도(neuronal viability) 측정에 Alamar Blue를 이용하였으며, Nakayama 등(1997)은 Alamar Blue 시험시 몇가지 세포주에 대하여 최적의 Alamar Blue 희석 배수와 배양시간에 대하여 보고하였다. 본 시험에서는 Alamar Blue 흡광도 측정을 형광계 방법이 아니고 분광광도계에 의한 방법을 사용하였으며 측정하는 파장도 microplate reader에 적합하게 excitation 파장을 570 nm ( $\lambda_{ex}=570$  nm)에서 그리고 emission 파장을 630 nm ( $\lambda_{em}=630$  nm)로 하여 측정하였다.

*In vitro* 대체시험법은 유럽의 FRAME(Fund for the replacement of animals in medical experiments), COLIPA

(European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association) 과 미국의 CTFA(Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association)에서 여러가지 화학물질을 대상으로 validation 연구를 실시하고 있다(Annte 등, 1997). 국소 자극시험 중 안자극시험은 EYTEX, HET-CAM(hen's egg test-chorioallantoic membrane), NRU, kenacid blue 등에 대하여 시험되고 있으며, 피부자극시험은 NRU, kenacid blue, LDH, MTT 등에 대하여 연구되고 있다(Osborne과 Perkins, 1994; Clothier 등, 1995; Shin 등, 1996). NRU 방법은 *in vitro* 안자극시험시 알콜류에 대하여 *in vivo* 시험결과와 많은 상관성이 있다고 하며(Gettings 등, 1991), MTT 방법과 LDH 방법은 피부자극시험시 계면활성제에 대해 *in vivo* 시험과 상관관계가 있다고 한다(Shin 등, 1996). 본 실험에서는 기존의 피부자극시험의 대체시험법으로 시도된 MTT 방법이나 NRU 방법보다 Alamar Blue 방법이 *in vitro* 세포독성 측정에 소염진통제 약물에 대하여 더 민감하게 반응하는 것으로 나타났는데 *in vivo*와의 상관관계를 파악하여 비교하는 것이 좀 더 정확한 지표로 파악될 것이다. 따라서 향후 이에 대한 추가 실험이 필요하다.

#### 참고문헌

- Annette, J., Margot, D.O., Krysz, B., Barbara, G., David, C.A. (1997): Current status and future developments of databases on alternative methods. *ATLA*, **25**, 411-422.
- Borengreund, E. and Puermer, J.A. (1985): Toxicity determined *in vitro* by Morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.*, **24**, 119-124.
- Clothier, R.H., Atkinson, K.A., Garle, M.J., Ward, R.K. and Willshaw, A. (1995): The development and evaluation of *in vitro* tests by the frame alternatives laboratory. *ATLA*, **23**, 75-90.
- Daston, G.P. and Freeberg, F.E. (1991): Ocular Irritation Testing. In: *Dermal and Ocular Toxicology Fundamentals and Methods*, CRC Press, Boston, pp. 509-540.
- Draize, J.H. et al. (1944): Methods for study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J. Pharm. Exp. Ther.*, **83**: 377-390.
- Gettings, S.D., Teal Janice, J., Bagley, D.M., Demetrulias, J.L., Dipasquale Louis, C. (1991): The CTFA evaluation of alternatives program: An evaluation of *In vitro* alternatives to the draize primary eye irritation test (phase 1) hydro-alcoholic formulations; (part 2) data analysis and biological

- significance. *J. Mol. Cell Toxicol.*, **4**(4), 247-288.
- Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949): A simplified method of evaluating dose effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **96**, 99-113.
- Mosmann, T. (1983): Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Method.*, **65**, 55-63.
- Nakayama, G.R., Caton, M.C., Nova, M.P. and Parandoosh, Z. (1997): Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *J. Immunol. Method.*, **204**, 205-208.
- Olson, C.T. (1991): Evaluation of the Dermal Irritancy of Chemicals. In: *Dermal and ocular toxicology fundamentals and methods*, CRC Press, Boston, pp. 125-152.
- Osborne, R. and Perkins, M.A. (1994): An approach for development of alternative test methods based on mechanisms of skin irritation. *Fd Chem. Toxic.*, **32**(2), 133-142.
- Page, B., Page, M. and Noel, C. (1993): A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in vitro. *Int. J. Oncol.*, **3**, 473-476.
- Ponec, M. (1992): In vitro cultured human skin cells as alternatives to animals for skin irritancy screening. *Int. J. Cosmet. Sci.*, **14**, 245-264.
- Shin, D.S., Kim, D.B., Ryu, S.R., Lee, S.H., Kim, P.Y. Koh, J.S. and Park, W.J. (1996): In vitro alternatives to skin-irritation tests. *Cosmetics & Toiletries*, **111**, 61-64.
- White Melissa, J., Didaprio Michael, J. and Greenberg David, A. (1996): Assessment of neuronal viability with Alamar Blue in cortical and granule cell cultures. *J. Neurosci. Method.*, **70**, 195-200.