

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Elina Nuriakhmetova

Buněčné terapie navrhované k obnově radiačního poškození mozku
Cell therapies designed to restore radiation-induced brain injury

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Martina Zíková, CSc.

Praha, 2022

Charles University
Faculty of Science

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala své školitelce Mgr. Martine Zíkové, CSc za konzultace, odborné vedení a cenné rady při psaní této bakalařské práce. Vážím si ochoty a času, který mi při psaní práce věnovala.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 23.11.2021

Elina Nuriakhmetova

Buněčné terapie navrhované k obnově radiačního poškození mozku

Cell therapies designed to restore radiation-induced brain injury

Abstrakt:

Neurální kmenové buňky jsou nediferencované buňky, jež jsou definovány svým replikačním potenciálem a svojí schopností diferencovat do různých typů neuronálních a gliových buněk. Dospělý mozek obsahuje dvě neurogení zóny umístěné v subventrikulární zóně laterálního ventrikulu a v dentálním gyru hipokampu. V obou těchto zónách neurální kmenové buňky produkují nové neurony.

Předmětem bakalářské práce je shrnutí současných poznatků o neurálních kmenových buňkách a molekulárních mechanismech ovlivňujících změny v neurogeních zónách mozku po radioterapii. Zároveň jsou popsány buněčné terapie používané k minimalizaci škod souvisejících s radiačním poškozením mozku.

Klíčová slova:

Neurální kmenové buňky, neurogení zóny, radioterapie, radiační poškození mozku

Abstract:

Neural stem cells are undifferentiated cells that are defined by their replication potential and their ability to differentiate into different types of neuronal and glial cells. The adult brain contains two neurogenic zones located in the subventricular zone of the lateral ventricles and in the dentate gyrus of the hippocampus. In both of these zones, neural stem cells produce new neurons. The subject of the bachelor thesis is a summary of current knowledge about neural stem cells and molecular mechanisms underlying changes in neurogenic zones after radiotherapy. At the same time, cell therapies used to minimize damage associated with radiation are discussed.

Key words:

Neural stem cells, neurogenic zones, radiotherapy, brain damage associated with radiation

Obsah

SEZNAM ZKRATEK.....	1
1. ÚVOD.....	3
2. NEURÁLNÍ KMENOVÉ BUŇKY	4
2.1. NEUROGENEZE	4
2.2. NEUROGENNÍ ZÓNY	5
2.3. MECHANISMUS DĚLENÍ NSCs	7
2.4. VLIV STÁRNUTÍ NA NEUROGENEZI.....	8
2.5. TYPY NEURÁLNÍCH KMENOVÝCH BUNĚK.....	8
2.6. VÝVOJ A MIGRACE KMENOVÝCH BUNĚK	11
3. POŠKOZENÍ NEUROGENNÍCH ZÓN PO RADIOTERAPII MOZKU	12
3.1. APOPTÓZA PO RADIOTERAPII.....	13
3.2. VLIV RADIOTERAPIE NA NEUROGENEZI V NEUROGENNÍCH ZÓNÁCH	13
3.3. ÚČINKY IONIZUJÍCÍHO ZÁŘENÍ NA NSCs	15
3.4. VÝZNAM ZMĚN VNĚJŠÍHO PROSTŘEDÍ NSCs PO RADIOTERAPII	17
4. POTENCIÁL BUNĚČNÉ TERAPIE.....	19
4.1. OTÁZKA ETIKY	20
4.2. POTENCIÁL KMENOVÝCH BUNĚK.....	21
4.3. VÝSLEDKY TRANSPLANTACE RŮZNÝCH TYPŮ KMENOVÝCH BUNĚK.....	23
4.4. TRANSPLANTACE MIKROVEZIKULŮ	25
4.5. METODY ZLEPŠUJÍCÍ VÝKON BUNĚČNÉ TERAPIE.....	29
4.6. OMEZENÍ UŽITEČNOSTI TERAPIE KMENOVÝMI BUŇKAMI.....	29
5. DISKUSE A ZÁVĚR	31
6. POUŽITÁ LITERATURA.....	32

Seznam zkratek

3D-CRT	Trojrozměrná konformní radioterapie
aNSCs	Aktivní neurální kmenové buňky
BrdU	Bromodeoxyuridin
CREB	cAMP response element-binding transkripční faktor
CBP	CREB-binding protein
DG	Gyrus dentatus
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorting
EGFL7	Epidermal growth factor-like protein 7
EGFR	Epidermální růstový faktor
GDNF	Glial cell-derived neurotrophic faktor
GFAP	Gliální fibrilární kyselý protein
GKS	Radioterapie gama nožem
hESCs	Lidské embryonální kmenové buňky
hMSCs	Mezenchymální kmenové buňky
hNSCs	Lidské neurální kmenové buňky
hOPC	Prekurzory oligodendrocytů
hPSC	Pluripotentní kmenové buňky
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL-6	Interleukin-6
IMRT	Radioterapie s modulovanou intenzitou svazku
LPS	Bakteriální lipopolysacharid
MV	Mikrovezikuly
NGF	Neurotrofický faktor
NeuN	Neuronal nuclear protein
NPCs	Neurální progenitorové buňky
NSCs	Neurální kmenové buňky
OB	Čichový bulbus
qNSCs	Klidové neurální kmenové buňky
RMS	Rostrální migrační proud
RT-qPCR	Reverzní kvantitativní polymerázová řetězová reakce
SGZ	Subgranulární zóně
SVZ	Subventrikulární zóně
TAPs	Transient amplifying progenitors

TGF- β 1	Transforming growth factor beta 1
TNF- α	Tumor necrosis factor α
TNF- β	Tumor necrosis factor β
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	Vascular endothelial growth factor

1. Úvod

Radiační terapie patří mezi účinné způsoby léčby rakoviny mozku, nicméně kvalita života lidí, kteří ji podstoupili a úspěšně dokončili je výrazně snížena. Ozařování vede ke kognitivní dysfunkci, která zahrnuje deficity v učení, paměti, pozornosti a schopnosti vyjadřování. Rovněž negativně ovlivňuje plánování, koncentraci a schopnost provádění více úkolů najednou. Následky se zhoršují se zvyšující dávkou záření. To platí zejména pro děti, kde jsou důsledky radiační terapie vážnější než při ozáření dospělého mozku.

Radioterapie má multifaktoriální etiologii, která zahrnuje poškození cév, neurozánět, demyelinizaci, ztrátu oligodendrocytů, masivní smrt neuronů a neurálních kmenových buněk (NSCs). Ionizující záření také poškozuje neurogenní oblasti mozku, což ovlivňuje neurogenezi a obnovu mikroprostředí mozku. V neurogenních oblastech mozku existují nediferencované NSCs, které jsou rezervou neurálních buněk a po celý život podporují normální vývoj a obnovu mozku. Proto je tak důležité vyvinout takovou léčbu následků radioterapie, která bude zahrnovat zachování morfologie a funkčnosti NSCs, jakož i obnovu mozkového mikroprostředí.

Z tohoto pohledu má buněčná terapie pomocí NSCs a jimi vylučovanými mikrovezikuly velký potenciál. Terapie kmenovými buňkami řeší problémy způsobené radioterapií mnoha způsoby. Výsledkem transplantace NSCs je obnovení morfologie a funkce neuronů, zlepšení kognitivních schopností a myelinizace, snížení zánětu v mozku a zvýšení průtoku krve mozkiem.

Díky svým jedinečným vlastnostem hrají kmenové buňky důležitou roli v regenerativní medicíně. Mohou se množit a diferencovat do několik typů neuronálních a gliových buněk a obnovovat poškozené buňky nervového systému. Díky těmto schopnostem je možné minimalizovat nepříznivé kognitivní důsledky spojené s radiační terapií, což je povzbudivé a naznačuje, že použití buněčné terapie založené na kmenových buňkách je slibné.

2. Neurální kmenové buňky

Kmenové buňky mají dvě vlastnosti, jednak vysokou schopnost proliferace a jednak schopnost diferenciaci. NSCs patří v dospělém organismu k multipotentním buňkám – mají nižší diferenciací potenciál než totipotentní a pluripotentní buňky; to znamená, že diferencují pouze v omezené množství buněčných typů. NSCs jsou nediferencované buňky v mozku, které mají schopnost diferencovat do jednotlivých buněčných typů neurální soustavy, a to do astrocytů, neuronů a oligodendrocytů.

NSCs vznikají v určitých oblastech mozku – neurogenních zónách a proces vzniku nových buněk nervové soustavy z buněk kmenových se nazývá neurogeneze. Z nediferencovaného stavu do terminální buňky prochází NSC několika fázemi – klidovou, aktivační a progenitorovou. Tento přechod je určen lokalizací buněk v průběhu vývoje, stavem transkripce a metabolismem.

2.1. Neurogeneze

Proces vzniku nových, konečně diferencovaných buněk neurální soustavy se nazývá neurogeneze. Neurogeneze probíhá v embryogenezi, ale dlouhou dobu nebyly přesné důkazy, jestli vznik nových buněk z NSCs pokračuje i během postnatálního vývoje člověka. Během posledních několika dekád bylo provedeno mnoho studií pomocí různých přístupů ve snaze obejít obtížnou překážku ve zkoumání lidské neurogeneze, což je přístup k mozkové tkáni dospělého člověka.

Důležitým důkazem potvrzujícím neurogenezi v dospělém organismu byla práce Erikssona z roku 1998, která ukazuje na to, že proces neurogeneze probíhá v mozku po celý život (Eriksson et al., 1998). Experiment byl proveden metodou zavedení analogu thymidinu, bromodeoxyuridinu (BrdU), při léčbě pacientů s rakovinou mozku. Poté byly studovány posmrtně získané tkáně lidského mozku. BrdU, schopný imunofluorescenčně označit DNA molekuly v průběhu S fáze, byl použit společně s některým z neurálních markerů, jako je například neuronal nuclear protein (NeuN). Tímto experimentem byly v mozku byly detekovány nové neurony, které byly vytvořeny z označených BrdU buněk, což jasně ukazuje jejich schopnost dělení a schopnost generovat nové neurony. Tyto přesvědčivé výsledky poskytují první důkaz neurogeneze během postnatálního vývoje mozku.

Následující důležité zkoumání neurogeneze bylo provedeno Spaldingem et al. v roce 2013. V této práci byly analyzovány stopy ^{14}C které zůstaly v půdě po testování jaderných bomb v atmosféře a které se následně se usadily v genomu rostlin, přijímaných potravou lidmi nebo živočichy. Byly sledovány změny koncentrace ^{14}C v lidském mozku a byla analyzována dynamika obnovy nervových buněk po celý život dospělého. V průběhu studie bylo zjištěno,

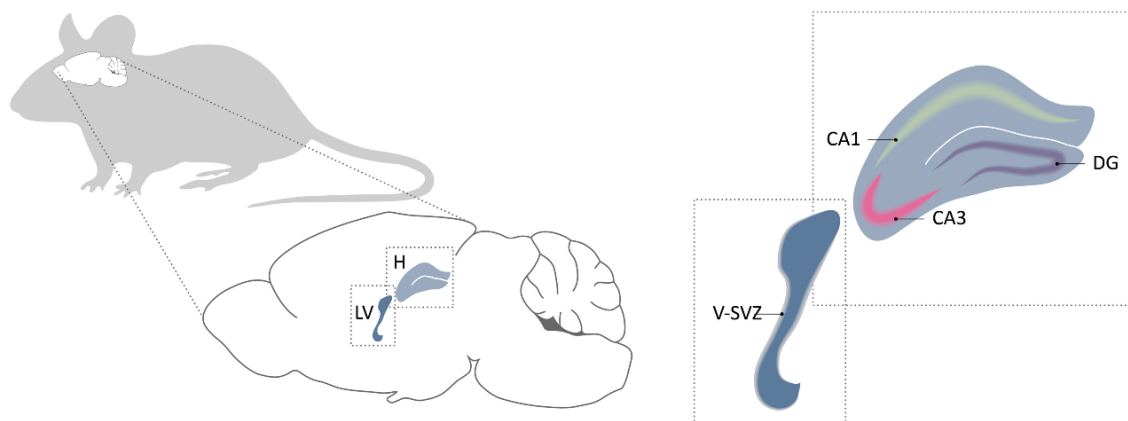
že nejméně 1/3 populace neuronů v hipokampu je náchylná k sebeobnově (Spalding et al., 2013).

Neurální kmenové buňky byly detekovány nejen u dětí a dospělých, ale i u lidí starších 80 let. Ti však měli zásobu NSCs menší. Analýza mozkových tkání ukázala, že neurogeneze pokračuje během celého života člověka, pouze se s věkem snižuje úroveň neuroplasticity a počet NSCs (Boldrini et al., 2018).

Kromě studie Boldrini et al. z roku 2018 se však v tomtéž roce objevil článek s přesně opačným tvrzením, který ukázal, že úroveň neurogeneze se u člověka dramaticky snižuje ihned po narození, a to natolik, že neurogenezi není možné odhalit ve věku po pubertě (Sorrells et al., 2018). Obě práce byly založeny na analýze exprese shodných markerů, které označovaly neuroblasty, prekursorů neuronů. Boldrini ale navíc doložil svoji práci nejen histologickou analýzou, ale i výsledky ze stereologie, trojrozměrné vizualizace tkáně z dvojrozměrných vzorků.

2.2. Neurogenní zóny

Místa, kde vznikají nové buňky nervové soustavy z kmenových buněk se nazývají neurogenní zóny. NSCs se u savců vyskytují ve dvou oblastech, a to v čichovém bulbu a v hipokampu; přesněji v subventrikulární zóně (SVZ) v bočních částech postranních komor předního mozku a v subgranulární zóně (SGZ) gyrus dentatus (DG) hipokampu (Obrázek 1). K pochopení problematiky neurogeneze je také důležité vědět, kde přesně probíhá obnova neurálních buněk. V 2014 byla oblast, kde se odehrává neurogeneze u člověka rozšířena. Kromě hipokampu a čichového bulbu byla identifikována oblast do které se integrují nové neurony – striatum, jež sousedí s postranními komorami předního mozku (Ernst et al., 2014). Neurogenní zóny SVZ a SGZ nejsou identické, existuje rozdíl ve složení buněk, jejich počtu a funkčnosti.



Obrázek 1 Sagitální pohled na mozek dospělé myši se zaměřením na V-SVZ a DG (Michaelidesová et al., 2019); CA1 – Cornu Ammonis 1, CA3 – Cornu Ammonis 3

SVZ je větší oblast než SGZ, zde se generují oligodendrocyty a další gliové buňky a interneurony pro oblast čichového bulbu. SVZ je umístěna podél boční stěny, hraničící se striatem, a se septem. V důsledku použití několika markerů bylo ukázáno, že stěny SVZ se skládají z NSCs, gliových buněk a neuroblastů. NSCs v různých částech SVZ mají odlišnou identitu, takže vytváří populaci neuronů a gliových buněk, které vykazují rysy astrocytů. Díky transkriptomice bylo prokázáno, že složení SVZ se v průběhu času neustále mění, buňky, které se původně nacházely v této oblasti, změnily své umístění a expresi markerů, pomocí kterých mohou být detekovány. Neuronů a oligodendrocytů v SVZ byly také v různých fázích vývoje. Heterogenní složení buněk bylo pozorováno nejen v čase, ale i regionálně. Změny spojené s regulací transkripčních faktorů byly identifikovány v laterálních a septálních stěnách SVZ. Tento výsledek naznačuje diferenciaci NSCs na neuronů a oligodendrocytů, přičemž neurogeneze se převážně vyskytovala v laterální stěně, zatímco gliogeneze ve stěně septální. Nově vznikající mladé neuronů mohou z neurogení zóny migrovat do čichového bulbu (Mizrak et al., 2019).

V SGZ jsou NSCs umístěny blízko krevních cév ve srovnání s umístěním NSCs v SVZ. Hlavní část neurální buněčné populace v SGZ tvoří radiální astrocyty. Buňky v SGZ jsou morfologicky odlišné od buněk v SVZ. Nově vytvořené a vyvinuté neuronů a dendrity migrují a doplňují hipokampus. Proces neurogeneze v oblasti SGZ je důležitý, protože nové neuronů putují do hipokampu a mají důležitou roli v učení, paměti, pozornosti, rychlosti a zpracování informací (Ming and Song, 2011). Bylo zjištěno, že u lidí s kognitivní poruchou je snížen počet vytvořených nových neuronů a synapsí v hipokampu (Tobin et al., 2019).

Tento rozdíl mezi SGZ a SVZ může být způsoben různým stupněm signalizace. Na neurogení zóně působí stimuly, které zajišťují molekulární kontrolu nad lokální specifitou a heterogenitou a působí na NSCs aktivujícími nebo inhibujícími stimuly. Stimuly, které ovlivňují produkci nervových buněk zahrnují molekuly vylučované vzdálenými a lokálními neuronů, neurotransmitery a mozkomíšním mokem (Obernier and Alvarez-Buylla, 2019). V neurogeních zónách je zformováno unikátní prostředí, podporující a regulující proliferaci, diferenciaci a migraci NSCs do určitého místa. Je to způsobeno koordinovanou sekrecí stimulačních faktorů, živin a kyslíku. Kromě toho je stabilita prostředí také podporována rozmanitými kontakty nervových buněk navzájem a kontakty s dalšími buňkami lidského mozku, jako jsou mikroglie, ependymální buňky, pericyty a dále pak krevní cévy (Doetsch et al., 1997).

2.3. Mechanismus dělení NSCs

Schopnost symetrického dělení u kmenových buněk, při kterém vznikají dvě nové kmenové buňky a asymetrického dělení, v důsledku kterého vzniká jedna diferencovaná buňka a jedna buňka kmenová, popisuje teorie neurogeneze. Ta ukazuje, že při vzniku nových neurálních buněk stále existují kmenové buňky s diferenciačním potenciálem. Údaje o tom, v jakém poměru se uskutečňují oba typy dělení a taktéž jaké dělení převládá v různých životních periodách, mohou zodpovědět na otázku, jak dlouho probíhá proces neurogeneze.

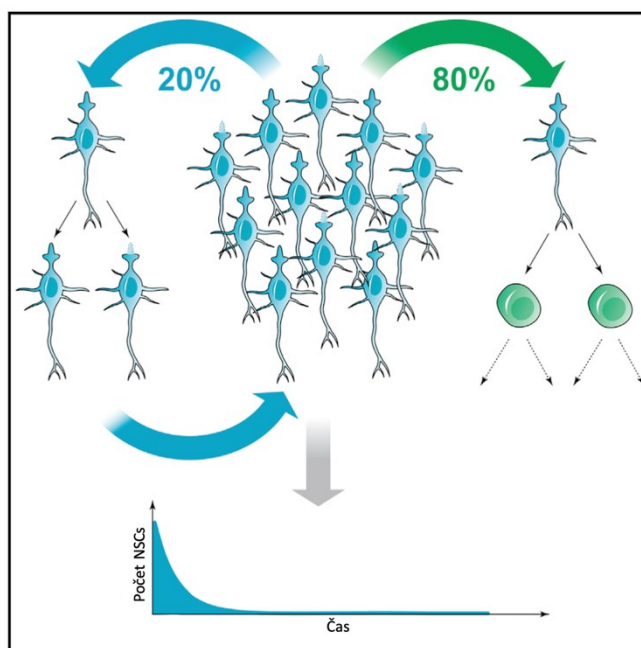
NSCs se v dospělém mozku převážně dělí prostřednictvím symetrických dělení, což znamená, že se postupně zásoba kmenových buněk vyčerpává. Toto ukázala práce, která byla realizována v roce 2018 (Obernier et al.,

2018), výsledky této práce vysvětlují, proč se ve stáří snižuje úroveň neurogeneze. Vznikající buňky zůstávají buď v klidovém stavu nebo se mění na

přechodový stav, který pak může diferencovat do neuroblastů (Obrázek 2). Při vzniku některých neurálních buněk se stává, že buňky ztratí kontakt s povrchem komory mozku, a proto mohou migrovat. Tyto buňky mají odlišnou heterogenitu a funkci v porovnání s buňkami ze kterých vznikají v důsledku dělení. Fungují jako primární prekuzory neuronů a podporují

stabilitu a integritu neurálních buněk. Díky symetrickému dělení se v mozku produkuje a samoobnovuje velké množství neuronů, což dělá populaci neuronů stabilní, a existuje tak možnost doplnit jejich zásobu například po poškození mozku. Zároveň se ale počet a zásoba NSCs postupně vyčerpává.

Další studie pak potvrzuje danou teorii přesnějšími statistickými daty; kolem 20-30 % buněk z celkového počtu NSCs po symetrickém dělení zůstává v klidovém stavu, ostatních 70-80 % buněk generuje populace buněk nervové soustavy. Tím se ale zároveň zásoba NSCs zmenšuje (Katsimpardi and Lledo, 2018).



Obrázek 2 Grafický znázornění symetrického a asymetrického dělení (upraveno podle (Obernier et al., 2018))

2.4. Vliv stárnutí na neurogenezi

Jak se mění proliferační a diferenciací potenciál NSCs během stárnutí člověka je stále otázkou. S jistotou víme, že nejvyšší úroveň neurogeneze ve svém postnatálním vývoji má člověk ihned po narození, dosud ale nevíme, jak rychle se neurogeneze během života snižuje.

S pomocí označení buněk markery neuroblastů byly získány výsledky indikující, že v oblasti hipokampu a čichového bulbu je velký počet neuroblastů. Jejich počet však dramaticky klesá už během prvního roku postnatálního vývoje, a dále se pak snižuje (Wang et al., 2011).

Poslední dvě práce věnované tomuto tématu a publikované v roce 2019 ukazují na to, že proces neurogeneze pokračuje i u lidí ve vyšším věku. V jedné práci byly detekovány tisíce nezralých neuronů v gyrus dentatus v hipokampu i u lidí do devátého desetiletí života, kteří neměli neurodegenerativní onemocnění jako je například Alzheimerova choroba (Moreno-Jiménez et al., 2019). Druhá práce dospěla ke stejnému výsledku, navíc zvýšila věk, ve kterém pokračuje proces neurogeneze až do desátého desetiletí života (Tobin et al., 2019).

Snižování procesu vzniku nových buněk nervové soustavy může být způsobeno i tím, že recyklace odpadních proteinů v mozku se stává každým rokem života méně efektivní. To způsobuje nahromadění nepotřebných proteinů, jež vede k poškozením NSCs. Následně to ovlivní diferenciaci NSCs a snížení účinnosti neurogeneze. Faktorem ovlivňujícím neurogenezi je přítomnost lyzozomů s defektní aktivitou u NSCs nacházejících se v klidové formě. Zvýšená akumulace proteinových agregátů pak brání přechodu klidových buněk do aktivního stavu. Tento jev byl pozorován během stárnutí buněk, což podporuje teorii o snižování neurogeneze během života (Leeman et al., 2018).

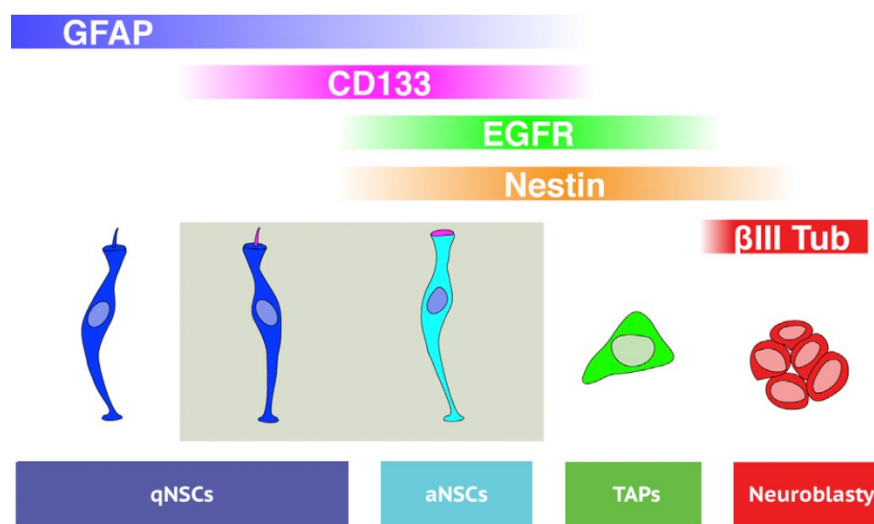
2.5. Typy neurálních kmenových buněk

NSCs nejsou identické, vykazují různé specifické vlastnosti podle toho, kde se nachází a v jaké vývojové fázi se vyskytují. Obecně se neurální kmenové buňky u dospělého člověka rozdělují na základě jejich aktivity: v první fázi jsou buňky v klidovém stavu (qNSCs), dokud nedostanou signál stimulující další vývoj. Po takovém signálu buňky přejdou do stavu aktivního (aNSCs) a začnou se dělit. Poté diferencují na vysoce proliferativní neurální progenitorové buňky (NPCs) a pak na neuroblasty. Hlavní roli ve stimulaci přechodu z klidového stavu do aktivního stavu hraje mikroprostředí, v kterém se NSCs nachází (Morizur et al., 2018).

Purifikace NSCs v oblasti SVZ pomocí průtokové cytometrie (FACS) odhalila 4 typy buněk, které u dospělých savců, konkrétně u myši, koexistují a je možné je různě označit (Obrázek 3) (Codega et al., 2014):

1. spící NSCs;

- klidové NSCs (qNSCs neboli B1q buňky) – většina z NSCs, exprimuje gliální fibrilární kyselý protein (GFAP) spolu s markerem CD133 (Prominin 1);
- aktivní NSCs (aNSCs neboli B1a buňky), které exprimují receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR);
- progenitorové buňky (NPCs neboli C buňky, a také transient amplifying progenitors (TAPs)), z kterých později vznikají neuroblasty (A buňky), exprimující markery časné neuronální diferenciace.



Obrázek 3 Vlastnosti kmenových buněk V-SVZ a jejich potomků (upraveno podle (Codega et al., 2014))

Navíc v roce 2017 byly, díky jednobuněčné transkriptomice, objeveny další tři subpopulace aNSCs v přechodových stavech, které vykazují rozdílnou expresi specifických genů: aNSC-brzké, aNSC-střední a aNSC-pozdní. Kromě toho byly aNSCs rozděleny na buňky, které podléhají další samoobnově, a na buňky, které ztratily astrocytové geny a zároveň získaly pro-neurálních geny, čímž se připravily k další diferenciaci na neuroblasty. Tyto populace exprimují odlišné geny, které určují diferenciaci a aktivaci, a proto lze tyto populace označit různými markery. Při přechodu z aNSC-brzké do aNSC-střední fáze jsou aktivní geny buněčného cyklu, což podporuje samoobnovu NSCs v mozku. Buňky pak mohou následně přecházet do pozdního aNSCs stadia, kde začínají být aktivní geny, které ovlivňují diferenciaci neuronů. Tyto buňky jsou připravené k další diferenciaci (Dulken et al., 2017).

Těchto výsledků bylo dosaženo díky kombinaci purifikace s profilováním genové exprese, metanalýze (srovnání získaných dat s již známými daty) a strojovému učení. Tato metoda je účinná při identifikaci molekulární identity NSCs, není však perfektní, pořád máme mezery v pochopení transkripční dynamiky a heterogenity NSCs.

Kromě toho, díky této metodě bylo zjištěno, jak se mění metabolismus během přechodu z klidové fáze do fáze aktivní. Vysoká syntéza bílkovin aktivuje maturaci buněk, zatímco

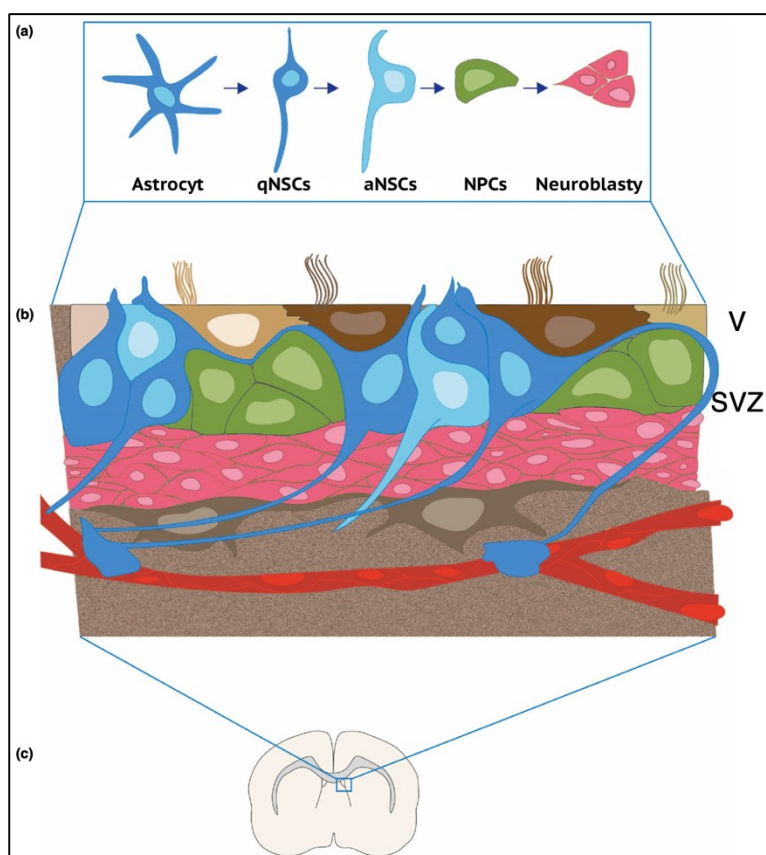
opačný jev byl pozorován při vysoké úrovni glykolýzy a metabolismu mastných kyselin (Llorens-Bobadilla et al., 2015).

Heterogenita buněk je také důležitá z důvodu odlišné reakce buněk na vnější podněty, jako je například ischemické poškození mozku. Buňky reagují podle toho, v jaké vývojové fázi se nacházejí. Skutečnost, že NSCs mají odlišnou molekulární strukturu, podporuje neurogenezi a způsobuje rychlejší obnovu tkáně mozku například po úrazech (Llorens-Bobadilla et al., 2015).

Sekvenování provedené s použitím jednobuněčné transkriptomiky RNA bez purifikace pomocí FACS u kmenových buněk v SVZ ukázalo, že existují rozdíly založené na pohlaví dospělého organismu a také regionální rozdíly mezi laterální a septální stěnou SVZ. Ačkoli obě stěny mohou vést k tvorbě neuronů a glií, septum je více obohaceno o tvorbu glií a boční stěna o neurogenezi (Mizrak et al., 2019).

NSCs byly také rozděleny na základě odlišné morfologie a oblasti svého výskytu na A (neuroblasty), B (aNSCs a qNSCs) a C (NPCs) buňky, které spolu koexistují v mozku (Obrázek 4).

A buňky jsou neuroblasty, jež jsou uspořádány jako řetězce rovnoběžné se stěnami komory mající ultrastrukturu migrujících prekursorů neuronů. Neuroblasty jsou obaleny dvěma různými buňkami – B1 (aNSCs) a B2 (qNSCs) typu. B1 buňky jsou v kontaktu s mozkomíšním mokem



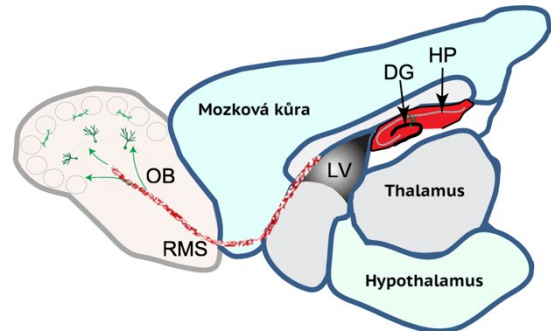
a krevními cévami a přijímají signály, které regulují jejich obnovu a diferenciaci. Produkují kolem 10 000 migrujících interneuronů, které později generují různé typy neuronů. Zaleží na lokalitě, jaké typy neuronů z NSCs vzniknou. NPCs s neaktivnějším dělením jsou úzce spojené s řetězcem neuroblastů (Obernier and Alvarez-Buylla, 2019).

Obrázek 4 Schematické znázornění SVZ: a) podtypy buněk; b) SVZ cytoarchitektura: laterální komora (V) se skládá z ependymálních buněk (tmavě a světle hnědé) a qNSCs (tmavě modré); oblast SVZ obsahuje qNSCs, aNSCs (světle modré), NPCs (zelené) a řetězce migrujících neuroblastů (růžové). NSCs se na apikální straně dotýká mozkomíšního moku a na bazální krevních cév (červené); c) sagitální řez mozku zobrazující oblast SVZ (malý čtverec) (upraveno podle (Katsimpardi and Lledo, 2018))

2.6. Vývoj a migrace kmenových buněk

Kmenové buňky, které jsou založeny v embryonálním stadiu, ve svém postnatálním vývoji zůstávají v klidové fázi, pokud nedojde k jejich reaktivaci. Po aktivaci se regionálně specifikují. Většina těchto buněk je u myši produkována v časovém úseku mezi 13,5 a 15,5 dnem embryonálního vývoje a jsou odvozeny od radiálních glii (Fuentealba et al., 2015).

Vývoj embryonálních kmenových buněk v postnatálním vývoji pokračuje v SVZ a v SGZ. NSCs produkují nové neurony pro oblast hipokampu. V SVZ je část B buněk schopna se dělit symetricky, a tím podporovat populaci kmenových buněk v mozku, druhá část se dělí asymetricky a generuje TAPs buňky, které poté diferencují do stadia neuroblastů (Obernier et al., 2018). Nově vzniklé buňky migrují po specifické cestě zvané rostrální migrační proud (RMS) do čichového bulbu (OB), kde terminálně diferencují do neuronů. Buňky, migrující daným směrem, formují řetězce, které tvoří rozsáhlou síť. Řetězec směřuje z kaudální k rostrální boční stěně boční komory (Doetsch et al., 1997) (Obrázek 5).



Obrázek 5 Pohled na sagitální řez mozem dospělého hlodavce se zvýrazněním dvou omezených oblastí, kde se odehrává neurogeneze u dospělých: DG v hipokampu (HP) a laterální komora (LV) do RMS ve směru OB (upraveno podle (Ming and Song, 2011))

3. Poškození neurogeních zón po radioterapii mozku

Každý rok se u stále většího počtu lidí objevují nádorová onemocnění, a to včetně rakoviny nervové soustavy. Rakovina mozku a nervového systému, která aktivně metastazuje, je u dětí druhou nejčastější neoplázií hned po leukémii.

Radioterapie je, společně s chirurgickou léčbou, jednou z nejefektivnějších metod léčby benigních i maligních nádorů mozku, hlavy a krku, jako je například meduloblastom a glioblastom, a to jak u dětí, tak i u dospělých. Na rozdíl od chemoterapie, která je často neúčinná kvůli hematoencefalické bariéře, může být radioterapie přesně zacílena. Pro omezení poškození mozku existují moderní způsoby ozařování mozku jako je trojrozměrná konformní radioterapie (3D-CRT), radioterapie s modulovanou intenzitou svazku (IMRT) a radioterapie gama nožem (GKS).

Tato standardní léčba nádorů má však mnoho škodlivých důsledků, které vedou k poškození NSCs a k následnému snížení neurogeneze. Kromě toho, v důsledku radioterapie dochází k některým kognitivním problémům, jako je například porucha paměti, učení, pozornosti a rychlosti a zpracování informací. Snížení těchto schopností je vidět zejména u dětí – čím nižší je věk dítěte, tím vyšší bývá úroveň poškození (Monje and Dietrich, 2012). S největší pravděpodobností je tento nevratný neuropsychický deficit způsoben skutečností, že děti nemají konečně vytvořenou nervovou soustavu, po obdržení dávky záření mají redukovaný počet NSCs případně mají jejich NSCs narušenou schopnost se rozmnožovat, a tím produkovat nové buňky. Je také možné předpokládat, že po radioterapii se NSCs zaměřují na obnovu mozkové tkáně a neuronů, čímž ale dojde k vyčerpání zásob kmenových buněk. To lze předpokládat na základě toho, že ionizující záření aktivně ovlivňuje a mění morfologii a fyziologii buněk, zvláště buněk, které se aktivně množí, jako jsou NSCs.

I přes tyto negativní následky, radioterapie mozku celkově zlepšuje kvalitu života osob s rakovinou. K tomu, abychom mohli uvažovat o celkovém zotavení mozkové tkáně u pacientů, kteří se podrobili radioterapii, je nutné objektivně posoudit účinek radioterapie na neurogení zóny hipokampu a subventrikulární oblasti, na kmenové buňky a na mikroprostředí, jako jsou například krevní cévy mozku. Při pochopení mechanismu změn morfologie a fyziologie NSCs pod vlivem ozařování, jež ovlivňuje kognitivní schopnosti po léčbě, budeme schopni zefektivnit zotavení pacientů po radiační terapii, a tak snížit škodlivost samotné procedury.

V následujícím textu budou popsány současné poznatky o tom, jak radioterapie ovlivňuje pacienty, kteří mají rakovinu mozku a jaké jsou důsledky pro další vývoj nervového systému. Bude diskutováno, jak se změní struktura NSCs, případně molekulární mechanismus proliferace a diferenciací buněk, jaká dávka ozáření je škodlivější a jaká limitující a celkově jaký je osud u neurogeneze v subventrikulární zóně a v subgranulární zóně hipokampu.

3.1. Apoptóza po radioterapii

Jednou z hlavních charakteristik kmenových buněk je schopnost aktivně proliferovat. Právě díky této vlastnosti jsou kmenové buňky citlivé k radioterapii, protože záření má obzvláště silný účinek na aktivně se dělící buňky. Volné radikály, které se objevují po působení ionizujícího záření způsobují poškození DNA a proteinů v buňkách. Pokud poškození nelze napravit, je buňka nucena zahájit proces apoptózy.

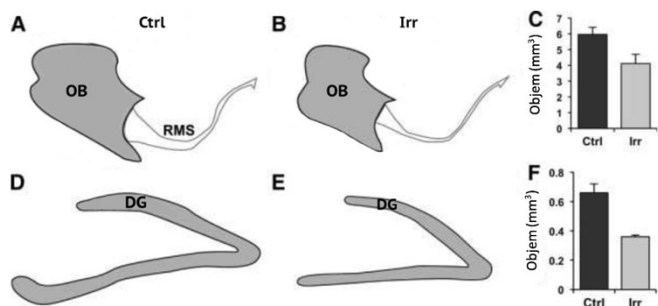
Aby se potvrdilo, že radioterapie vyvolává apoptózu v buňkách, byly provedeny nejrůznější experimenty na myších a potkanech. V jednom z experimentů byly potkani (stáří 2-3 měsíce) vystaveny ozáření v dávce 5 nebo 30 Gy, a poté usmrceni v čase od 0 do 48 hodin po ozáření. Takto bylo možné sledovat změny v mozku v průběhu času a v závislosti na dávce. Kontrolní skupina potkanů nebyla ozářena. K vrcholu apoptózy došlo 6 hodin po ozařování, první příznaky apoptózy byly identifikovány po 3 hodinách. Později, po 48 hodinách žádné příznaky probíhající apoptózy už v mozcích potkanů nebyly přítomny. Apoptóza byla detekována v subependymální zóně (ta je odvozena z embryonální subventrikulární zóny) a v kalózním tělese. Data byla získána pomocí imunohistochemického značení, TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) metody a morfologického hodnocení (Bellinzona et al., 1996).

Podle publikovaných výsledků lze předpokládat, že právě nástup apoptózy, a tedy pokles počtu NSCs, může být rozhodujícím faktorem ve snížení neurogenese a v následném zhoršení kognitivních schopností.

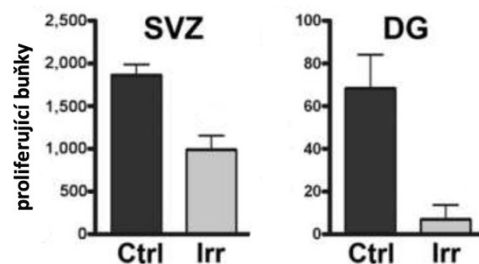
3.2. Vliv radioterapie na neurogenезi v neurogenních zónách

Nové buňky nervového systému se u dospělého jedince tvoří ve dvou zónách: v SVZ a v DG hipokampu. Jejich role v postnatální neurogenезi je důležitá v dalším kognitivním vývoji, a proto je pochopení mechanismu změn těchto zón po radioterapii zásadní pro následné programy rehabilitace. Různé pokusy naznačily, že tyto dvě neurogenní oblasti mají odlišnou reakci na radioterapii. Při ozáření mozku mladých potkanů dávkou 6 Gy se neurogenese významně snížila. Celkový objem jejich neurogenních zón byl zmenšen (Obrázek 6). Jeden den po použití rentgenového záření klesla úroveň tvorby nových buněk na podobně nízké hodnoty jak v SVZ, tak i v DG. Tyto hodnoty byly téměř rovny nule, což nám říká, že citlivost na ozáření je v obou neurogenních zónách podobná. Nicméně dlouhodobá reakce v neurogenních oblastech byla odlišná. Bylo zjištěno, že neurogenese se v SVZ obnovila po 2 měsících, zatímco v hipokampu se vůbec nevrátila do původních hodnot (Obrázek 7) (Hellström et al., 2009). Různé výsledky při použití stejné dávky záření ukazují na to, že proliferující buňky jsou náchylné k ozáření, zatímco kmenové buňky v SVZ zůstávají nepoškozené a později mohou

tuto neurogení oblast znovu osídlit. K tomu však nedochází v oblasti hipokampu. Tyto výsledky potvrzují heterogenitu obou neurogeních zón, vyjádřenou také například větším počtem NSCs v SVZ.



Obrázek 6 Změny objemu dospělého mozku, 9 dní po ozáření. A, B – změny v OB; D, E – změny v DG; C, E – celkový objem v oblasti OB a DG v neozářeném mozku a po radiační terapii; Ctrl – neozářený mozek, Irr – mozek po ozáření (upraveno podle (Hellström et al., 2009))

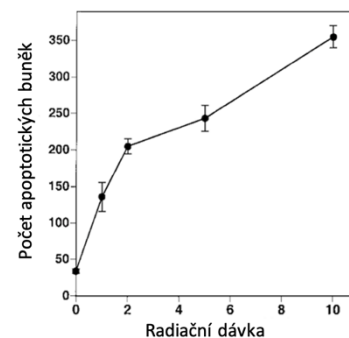


Obrázek 7 Stereologická kvantifikace počtu proliferujících buněk, 9 týdnů po ozáření; Ctrl – neozářený mozek, Irr – mozek po ozáření (upraveno podle (Hellström et al., 2009))

Vzhledem k tomu, že hipokampus je zodpovědný za důležité funkce v učení, paměti a schopnosti analyzovat informace, účinky ionizujícího záření, které jsou spojovány s téměř úplnou eliminací neurogeneze v hipokampu, mohou být hlavním důvodem, proč se po ozařování snižují kognitivní schopnosti, a to zejména u dětí. Navíc v postnatálním vývoji je proces neurogeneze nejintenzivnější právě u dětí, i když některé výsledky naznačují, že neurogeneze pokračuje u člověka po celý život (Spalding et al., 2013). Zachování heterogenity a integrity neurogeních zón má tak velký význam například u onkologických pacientů, kteří absolvovali během své léčby radioterapii.

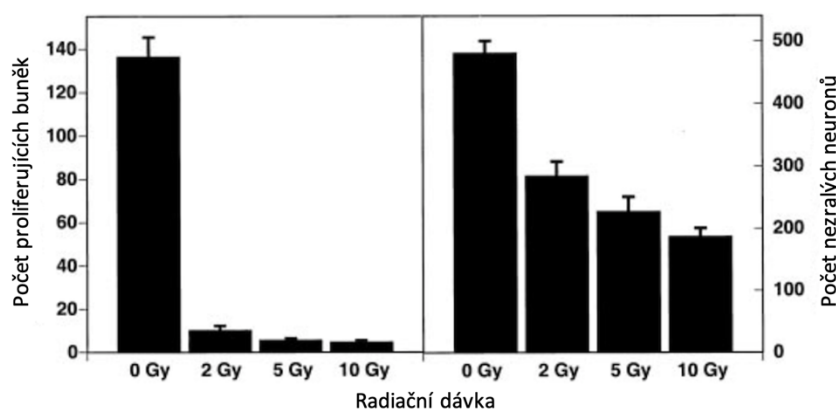
V další studii bylo provedeno přímé ozáření mozku mladých potkanů za účelem analýzy změn v hipokampu v následujících 120 dnech. Apoptóza byla detekována ihned po aplikaci rentgenového záření, což vedlo k poklesu proliferace během následujících 24 hodin. Bylo zjištěno, že se počet apoptotických buněk zvyšuje s rostoucí rentgenovou dávkou. Pokud se dávka rovnala nebo byla více než 3 Gy, byl dosažen plató efekt. Zároveň se zásoba NSCs vyčerpávala v závislosti na dávce a proliferace se z dlouhodobého hlediska téměř neobnovila (Tada et al., 2000).

Ve jiném článku o ozařování hipokampu z roku 2003 se zvýšila doba potřebná k dosažení vrcholu apoptózy. Maximální apoptózy se dosáhlo po 12 hodinách od ozáření, počet apoptotických buněk také závisel na dávce záření (Obrázek 8). Počet nezralých neuronů se 48 hodin po ozáření snížil přibližně na polovinu, počet proliferujících buněk byl v této době téměř roven nule, což naznačuje vysokou citlivost hipokampu na záření (Obrázek 9). Tato studie zkoumala účinky ozařování na nervový systém po dobu dvou měsíců, a to při použití dávek 0, 2, 5 a 10 Gy. Úroveň neurogeneze



Obrázek 8 Závislost počtu apoptotických buněk na radiační dávce (upraveno podle (Mizumatsu et al.))

závisela na velikosti dávky, ale i malá dávka záření vedla ke kognitivní dysfunkci, a to i když morfologie tkáně zůstala prakticky nezměněna. Ozařování poškozuje progenitorové buňky, ze



Obrázek 9 Počet proliferujících buněk (zleva) a nezralých neuronů (zprava) v oblasti SGZ, 48 hodin po ozáření (upraveno podle (Mizumatsu et al.))

kterých se později vytvoří granulární buňky gyrus dentatus. Integrace nových granulárních buněk je důležitá v procesu učení, protože tyto buňky hrají důležitou roli v synaptické plasticitě mozku.

Dlouhodobé sledování ukázalo, že úroveň neurogeneze v hipokampu se s časem neobnovuje, což znamená, že kromě progenitorových buněk mohou být poškozeny i qNSCs, které jsou odpovědné za repopulaci neurálních buněk (Mizumatsu et al.). Pochopení toho, co se přesně děje s NSCs v hipokampu pod vlivem rentgenového záření, může pomoci při vytváření strategie pro vylepšení důsledků radiační terapie.

Experimenty podobného typu byly také provedeny v SVZ. Pomocí počítačové tomografie bylo rentgenové záření lokalizováno v mozku v přesně specifikované oblasti. Díky této lokalizované technice bylo možné studovat vliv rentgenových paprsků na NSCs, jejich proliferaci, diferenciaci a migraci. Po ozáření nebyly identifikovány žádné progenitorové buňky a migrující neuroblasty; qNSCs ztratily svoji schopnost generovat neuroblasty, a to i když byla potvrzena jejich přítomnost v SVZ. Migrace neuroblastů po jejich typické cestě z RMS do OB se úplně zastavila. Takto narušená buněčná organizace se zachovává po jednorázové terapii po několik měsíců a vede ke snížení úrovně neurogeneze (Achanta et al., 2012). Nicméně stále je třeba více údajů, abychom přesně věděli, jak minimalizovat poškození a zlepšit kvalitu života po radiační terapii.

3.3. Účinky ionizujícího záření na NSCs

Rozdíly v možnosti obnovení neurogeneze v SVZ a hipokampu byly důvodem pro buněčnou analýzu NSCs v těchto oblastech. Jsou změny v kmenových buňkách způsobeny různou reakcí na záření, nebo to závisí i na vnějších faktorech? Za tímto účelem byly NSCs izolovány a kultivovány odděleně od vnějšího prostředí mozku, a to ve formě neurosfér po dobu jednoho týdne. Pro experiment byly použity buňky z obou neurogenních zón – ze SVZ a z hipokampu. Neurosféry byly ozářeny dávkou 2,5 Gy a výsledek byl analyzován pomocí reverzní kvantitativní polymerázové řetězové reakce (RT-qPCR). Výsledná exprese genů

zodpovědných za různé procesy v buňce, jako je kontrola buněčného dělení, spuštění apoptózy a dělení, byla analyzována v okamžiku velkého poklesu úrovně proliferace, to je 16 hodin po ozáření. Ukázalo se, že důvodem rozdílné reakce na ozáření mezi SVZ a hipokampem může být odlišná regulace některých genů. Kromě změn v NSCs na molekulární úrovni, může být příčinou snížení neurogeneze redukován počet kmenových buněk. Tato studie také potvrdila korelaci závislou na dávce, čím vyšší je dávka, tím méně kmenových buněk lze v mozku najít. Údaje z této studie pak dále naznačují, že rozhodující roli mohou hrát také vnější faktory prostředí (Hellström et al., 2011).

Aby se zjistilo, které buňky jsou citlivé na ozáření, zda klidové nebo aktivní, a jak se mění po ozáření jejich poměr, ozařoval Daynac et al. tkáň v SVZ mírnou dávkou ionizujícího záření. Stanovil, že záření způsobuje smrt aktivních proliferujících buněk (NPCs a neuroblastů). Po zničení aktivní populace NSCs (aNSCs), se začala dělit klidová populace (qNSCs), čímž se snažila obnovit buňky v neurogení zóně. Tento přechod z klidové fáze do aktivní je založen na zeslabení GABA_AR signalizace, která potlačuje buněčnou proliferaci. Největší počet GABA receptorů najdeme v SVZ u neuroblastů, jejichž počet je po ozáření značně snížen, a proto snížená signalizace GABA_AR stimuluje přechod qNSCs z klidového stavu do stavu aktivního. To vysvětluje skutečnost, že proliferace v SVZ prudce klesá během prvních 1–2 dnů, nicméně později se proces neurogeneze začne zotavovat (Daynac et al., 2013).

Skutečnost, že NSCs jsou schopny obnovit neurogeni v neurogení zóně, dává větší šanci na vytvoření vylepšené rehabilitační terapie pro pacienty, kteří absolvovali radioterapii. Také fakt, že ne všechny NSCs jsou stejně citlivé k ozáření a v různých fázích aktivace mají různou reakci na ionizující záření, je důležitý. Nová populace buněk tak může být vytvořena z radiačně intaktních qNSCs, zatímco poškozené neurální prekurzory (NPCs a neuroblasty) jsou zničeny apoptózou. Tento výsledek byl pozorován při dávce ozáření 2 Gy. Prakticky to znamená, že apoptóza není pouze negativním důsledkem záření, které způsobuje smrt kmenových buněk, ale s největší pravděpodobností se jedná o mechanismus užívaný k čištění poškozených buněk v mozku, čímž se eliminuje další možné poškození, například mutacemi v ozářených NSCs. Kombinace apoptózy buněk poškozených ozářením a stimulace aktivace qNSCs má pozitivní vliv na regeneraci buněk (Barazzuol et al., 2017).

Po radioterapii byla detekována také demyelinizace v důsledku vyčerpání prekurzorů oligodendrocytů, a dále pak byla narušena integrita axonů, což vedlo k kognitivnímu poškození (Mabbott, 2006).

NSCs novorozeného jedince však nereagují na rentgenové záření stejně jako buňky dospělého jedince. Eliminace ozářených progenitorových buněk neonatálních myší není tak účinná jako u dospělých myší. U mladých myší mohou některé z poškozených buněk

nepodléhat apoptóze a rychle diferencovat, takže část nové populace buněk nervového systému se vytváří z buněk pozměněných zářením. Toto vysvětluje, proč je účinek radiace na mozek dětí silnější a proč u dětí, které se podrobily radioterapii, je větší tendence k vytváření tumorů společně s výraznější úrovní poškození kognitivních schopností (Barazzuol et al., 2017).

Další studie z roku 2019 ukazuje, že část aktivních proliferujících NSCs nepodléhá po ozáření apoptóze, ale přestává se množit a začíná diferencovat. Takový mechanismus reakce na ozáření lze považovat za ochranný, protože v aktivních buňkách nedochází ke hromadění různých poškození DNA způsobených zářením, jako jsou jednořetězcové nebo dvouřetězcové zlomy a rozmanité modifikace a přestavby v molekule DNA (Konířová et al., 2019).

Celkově je možné shrnout, že záření významně ovlivňuje změny v NSCs, téměř úplně ničí neuroblasty a NPCs buňky, ale ponechává nedotčené qNSCs, které v budoucnu u dospělého jedince mohou obnovit poškozené neurogenní zóny mozku.

3.4. Význam změn vnějšího prostředí NSCs po radioterapii

Kromě snížení počtu NSCs a jejich změn v regulaci, ovlivňuje ozařování také vnější prostředí v neurogenních zónách. Možná, že hlavně změna prostředí NSCs je příčinou stejné reakce v hipokampu a v SVZ v prvních několika dnech po ozáření. Ve snaze odpovědět na otázku, co je prvořadným důvodem v poruchách neurogeneze po radioterapii, zda změny v NSCs nebo zda hlavní roli hrají vnější faktory, jako je mikroprostředí, byly provedeny různé pokusy.

Jedna ze studií zaměřených na zkoumání účinku ozařování mozku na mikroprostředí naznačuje, že po ozáření byly nalezeny aktivované mikroglie (tyto formy glií jsou považovány za fagocytující a tím, že odstraňují pozůstatky mrtvých buněk mohou pomáhat obnově mozku po ozáření) a byly identifikovány různé cytokiny, například interleukin-6 (IL-6) a stresové hormony (glukokortikoidy). Tyto látky blokují diferenciaci NSCs, čímž zastavují proces neurogeneze. To je způsobeno zánětlivou reakcí, která začíná ihned po působení ionizujícího záření. Aby bylo možné přesně určit, zda zánětlivý proces zpomaluje neurogenezi a jestli je rozhodujícím faktorem, indukovali vědci umělý zánět u myši pomocí injekce bakteriálního lipopolysacharidu (LPS). Aplikace LPS vedla ke zpomalení neurogeneze i bez poškozených NSCs. Aktivované mikroglie po ozáření dále syntetizovaly rozmanité cytokiny a interferony, což také ovlivňovalo neurogenezi. Aby se zjistilo, která ze sekretovaných látek je převládající při inhibici neurogeneze, byly progenitorové buňky jednotlivě kultivovány v přítomnosti každého cytokinu a interferonu. Ve výsledku největší vliv na NSCs měly IL-6 a tumor necrosis factor β (TNF- β). Po kultivaci s těmito cytokiny se neurogeneze snížila o 50 %, a naopak, při

blokování IL-6 pomocí protizánětlivých léků bylo možné proces neurogeneze obnovit (Monje, 2003).

Zvýšení hladin cytokinů po ozařování bylo pozorováno i v mnoha dalších studiích. Stupeň jejich exprese po ozáření se v různých částech mozku liší. Větší množství tumor necrosis factor α (TNF- α) bylo pozorováno v mozkové kůře, v hipokampu převazoval interleukin 1 β (IL-1 β). Takováto regionálně specifická změna v sekreci protizánětlivých mediátorů potlačuje neurogenezi v mozku, a tak se podílí na vzniku a progresi kognitivních dysfunkcí. Kromě cytokinů se v mozku po ozáření uvolnilo také zvýšené množství adhezní molekuly vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), což může vést k zánětu mozkových cév (Lee et al., 2010).

K ověření toho, že ozařování mění mikroprostředí, což má v plné míře vliv na neurogenezi, byly neozářené NSCs získané purifikací, integrovány do ozářené neurogení oblasti mozku. Pozorování ukázalo na zvýšenou produkci transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) buňkami endothelia v ozářených oblastech krevních cév v SVZ. Blokováním syntézy TGF- β 1 se proces neurogeneze v mozku zlepšil. Prostřednictvím TGF- β 1 byla stimulována apoptóza progenitorových buněk a byla prodloužena doba dormance qNSCs. Podobný mechanismus a účinek TGF- β 1 na neurogenezi je pozorován i během stárnutí, kdy endoteliální buňky syntetizují růstové faktory, které mají vliv při zpomalení proliferace a neurogeneze. Tyto výsledky také naznačují důležitou roli modifikace krevních cév v neurogeních zónách (Pineda et al., 2013). Po radioterapii se snižuje počet cév, složitost jejich větvení a zmenšuje se jejich celkový povrch (Boström et al., 2013). Důležité je při regeneraci obnovit krevní cévy mozku do původního stavu, protože ty sekretují různé látky, jež se podílí na regulaci diferenciaci NSCs. Například protein epidermal growth factor-like protein 7 (EGFL7), který vylučují jak endoteliální buňky cév, tak i NSCs, je jedním z modulátorů klidové fáze NSCs (Katsimpardi and Lledo, 2018). Mimo jiné ozařování také zvyšuje hladinu exprese vascular endothelial growth factoru (VEGF), který je zodpovědný za diferenciaci NSCs na endotelové buňky mozkových cév. Proto následná transplantace NSC po radioterapii účinně pomáhá při obnovení průtoku krve mozkem (Joo et al., 2012).

Na základě výše uvedeného lze konstatovat, že zánět je jedním z klíčových a rozhodujících důsledků ozařování mozku, což následně vede k dysfunkcím kognitivních schopností a narušení neurogeneze.

4. Potenciál buněčné terapie

Radiační terapie může účinně zabránit rozvoji primárních i metastatických mozkových nádorů. Radiace však může ovlivnit nejen rakovinné buňky, ale také zdravé oblasti mozku. Vzhledem k tomu, že účinky radiační terapie vedou k vedlejším účinkům, jako je snížení kognitivních schopností, vyvíjí se stále více a více pokročilých technik k minimalizaci následků radiační terapie, například existuje metoda ozařování s modulací intenzity záření. Ale i s těmito moderními přístupy, dochází k významným změnám v morfologii, množství a funkci NSCs. Navíc v léčbě rostoucího počtu pacientů s mozkovými metastázami se běžnou procedurou stává radioterapie celého mozku. Použití této metody nevyhnutelně vede k velkým dávkám ozáření neurogenických zón mozku.

Nicméně pořád díky radioterapii mají lidé možnost zbavit se maligních a benigních novotvarů. S použitím ionizujícího záření v lékařské praxi při léčbě nádorů se prodlužuje průměrná délka života pacientů. Z dlouhodobého hlediska však po ozáření dochází ke zhoršení paměti, pozornosti, koordinace pohybů, snížení úrovně inteligence a učení, a tyto následky jsou často nevratné. Zvláště silně tyto důsledky ovlivňují život dětí s rakovinou mozku. Kromě snížení kognitivních schopností, rentgenové záření také poškozují prostředí mozku s cévami a gliemi, což způsobuje aktivní sekreci prozánětlivých mediátorů.

Následky poškození neurogenických zón mozku zůstávají běžným problémem u pacientů, kteří přežili rakovinu. Vzhledem k tomu, že radioterapie je stále tradiční a efektivní metodou při léčbě maligních novotvarů, je důležitou otázkou, jak zlepšit rehabilitaci nebo minimalizovat úroveň poškození mozku. S každým rokem se význam problému kognitivních poruch po radioterapii pro pacienty stává důležitějším. V tomto ohledu byly provedeny různé výzkumy s cílem vyvinout další postupy regenerace mozkové tkáně, a to za účelem zlepšení kvality života pacientů, kteří přežili rakovinu. Jednou z nejslibnějších metod řešení tohoto problému je buněčná terapie s použitím kmenových buněk. Podstata této terapie je jednoduchá. Kmenové buňky mají velký proliferační a diferenciací potenciál a také mají tendenci migrovat na své funkční místo, takže hypoteticky je možné transplantovat kmenové buňky do poškozeného mozku, což by mělo vést k obnovení funkce a struktury nervového systému. Na základě výsledků výše zmíněných studií věnovaných účinkům radioterapie na mozek lze předpokládat, že právě díky zavedení buněčné terapie a zároveň udržováním normálního prostředí v neurogenických zónách bude možné vyhnout se vedlejším účinkům záření. Tato slibná hypotéza je zvláště důležitá pro obnovení funkce hipokampu, protože právě tato část mozku je zodpovědná za všechny kognitivní funkce, které se po radiační terapii zhoršují. Transplantace lidských neurálních kmenových buněk (hNSCs) má při řešení tohoto problému velký terapeutický potenciál.

V poslední části této bakalářské práce budou popsány hlavní výzkumné práce zaměřené na řešení důsledků ionizačního záření na mozek, jejich výsledky a vývoj buněčné terapie za posledních několik let. A také pokusy o vyřešení problému spojeného s imunitní odpovědí organismu a se způsobem zavedení hNSCs do mozku, což je místo s příznivějšími podmínkami pro transplantaci v porovnání s jinými periferními orgány. I když je mozek považován za privilegovaný orgán, stále má schopnost aktivovat imunitní odpověď. Což se může stát překážkou jak z fyziologického, tak i z etického pohledu. Budou zde také analyzovány hlavní nedávno objevené molekulární mechanismy podílející se na rehabilitaci neurogenických výklenků v mozku. Budou popsány další postupy, které by měly být prováděny v kombinaci s buněčnou terapií ovlivňující regeneraci mozkových tkání a buněk po dávkách záření tak, aby se znásobil pozitivní účinek buněčné terapie.

4.1. Otázka etiky

Používání kmenových buněk patří k regenerativní medicíně, protože kmenové buňky jsou schopny přispívat k obnově buněk. Vzhledem k velkému proliferačnímu a diferenciacímu potenciálu kmenových buněk je možné nahradit poškozenou buňku nebo dokonce vytvořit funkční tkáň nebo orgán. Z tohoto důvodu existují různé etické obavy a právní otázky, které vyžadují přesné odpovědi.

Je nutné vyjasnit, co jsou kmenové buňky, jestli máme právo je uměle pěstovat, nebo provádět experimenty s použitím embryonálních kmenových buněk. Totipotentní a pluripotentní kmenové buňky jsou považovány za nejzajímavější pro regenerativní medicínu, protože mají nejvyšší diferenciací potenciál, a takové buňky se mohou stát jakoukoli jinou buňkou v lidském těle. Kmenové buňky tohoto typu jsou v embryonálním stádiu vývoje. Při manipulaci s embryonálními kmenovými buňkami je nutné dodržovat etické principy, podle kterých je člověk a jeho stav zohledňován především. Pro práci s buňkami embrya je nutný odpovědný a vědomý přístup; všechny manipulace s nimi musí být prováděny v souladu s určitými pravidly pro používání těchto buněk.

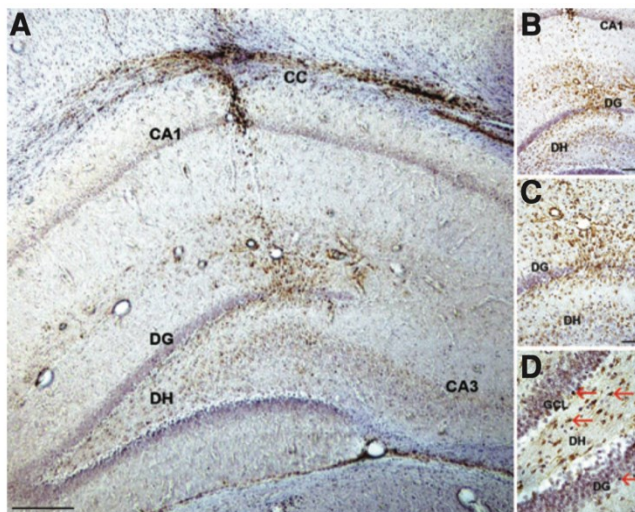
Při použití NSCs byly odhaleny jejich další vlastnosti, jako je například schopnost migrovat do postižené oblasti a přispět k jejímu následnému zotavení; neuroprotektivní funkce, při které NSCs vylučují látky, které přispívají k obnově struktury a funkcí tkání; imunomodulace, která reguluje imunitní podmínky a přispívá k rychlejší regeneraci. V některých případech však po transplantaci NSCs byly pozorovány známky indukované onkogeneze, vzniku teratomu, neadekvátní migrace NSCs a akutního odhojení transplantovaných buněk. Toto odhojení se projevilo silnou imunitní odpovědí vyžadující použití imunosupresivní léčby.

Aby se minimalizovaly možné vedlejší účinky při používání NSCs, je v současné době podporováno použití dospělých kmenových buněk, protože tyto buňky se mohou diferencovat pouze na omezený počet buněčných typů a při jejich použití existuje méně etických dilemat než při použití embryonálních buněk (Ramos-Zúñiga et al., 2012).

Při respektování určitých pravidel a disciplín při práci s NSCs bude možné efektivně vyvinout různé metody léčby jak neurodegenerativních onemocnění, tak i negativních účinků radioterapie na mozek.

4.2. Potenciál kmenových buněk

Ve snaze dokázat potenciál buněčné terapie u radiačního poškození mozku, ozařoval tým vědců v roce 2011 mozek potkanů, a pak transplantoval kmenové buňky (Acharya et al., 2011). Tento experiment byl první důkaz příznivých účinků transplantace kmenových buněk po radioterapii mozku. Dva dny po ozáření byly multipotentní hNSCs transplantovány do hipokampu potkanů. Použití multipotentních, a ne pluripotentních kmenových buněk pomohlo vyhnout se vzniku teratomů. Zároveň byl celý experiment proveden na potkanech s oslabenou imunitou, aby se zabránilo imunoreakci. Buňky transplantované do mozku zůstaly v průběhu zkoumání multipotentní a zachovaly si svoji schopnost proliferace. Transplantované hNSCs aktivně migrovaly podél hipokampu (Obrázek 10) a diferencovaly se na neurony (hlavně v SGZ a DG) a na astrocyty (nejvíce v kalózním tělese). U transplantovaných kmenových buněk byla identifikována exprese proteinu ARC asociovaného s cytoskeletem. Ten je považován za faktor ukazující na schopnost integrace do hipokampu a vytváření nových synapsí. Protein ARC je zásadně důležitý při formování dlouhodobé synaptické plasticity a při konsolidaci paměti. Navíc u potkanů nebyly pozorovány žádné známky ataxie a v průběhu celé studie nebyl nalezen žádný teratom.



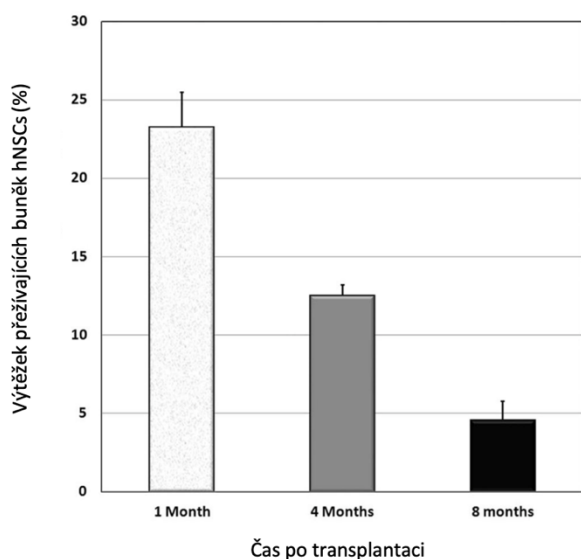
Obrázek 10 Zobrazení hipokampu potkanu po 1 měsíci po transplantaci hNSCs. Transplantované buňky hNSCs jsou označeny na obrázku jako tmavě hnědá jádra, na obr. D navíc označeny označené červenými šipkami (Acharya et al., 2011); CA1 – Cornu Ammonis 1, CA3 – Cornu Ammonis 3; CC – corpus callosum; DH – dentate hilus; GCL – granulózní buňky

Stereologická analýza ukázala, že jeden měsíc po transplantaci v SVZ, hipokampu a blízkých oblastech mozku přežilo 23 % hNSCs z původního počtu transplantovaných buněk, a po 4 měsících pouze 12 %. Přežívající populace sestávala ze zralých a nezralých neuronů, stejně jako ze zralých a nezralých astrocytů. Ale i tak malé procento přeživších kmenových buněk

vedlo ke zlepšení vedlejších účinků radioterapie mozku. Každá hemisféra mozku byla během 4 měsíců po ozáření doplněna asi 7500 neurony a 22 700 astrocyty. U potkanů, kterým byla po ozařování podána dávka hNSCs, byl pozorován významně menší pokles kognitivních funkcí, a to na rozdíl od kontrolní skupiny, která po ozařování nepodstoupila buněčnou terapii. Tento pokus naznačil slibnou strategii pro rehabilitaci a obnovení kognitivních funkcí u lidí, jež podstupují radiační terapii.

V roce 2012 byla u myši testována transplantace NSCs ocasní žilou po 24 hodinách po ozáření celého mozku (Joo et al., 2012). Dané kmenové buňky byly schopné diferenciaci na neurony, oligodendrocyty a astrocyty a nahrazovaly tkáň a buňky poškozené radiací. U skupiny myši, které dostávaly NSCs, byla identifikována přítomnost neurotrofických faktorů (NGF). Sekrece růstového faktoru ukazuje na ochranný neurotrofický účinek kmenových buněk. Navíc NSCs transplantované do mozku myši zahájily vylučování různých cytokinů, což prokazuje parakrinní účinky kmenových buněk. Kromě toho byl obnoven cerebrální krevní oběh, jehož hladina byla po mozkové radioterapii snížena. Takové zlepšení bylo způsobeno skutečností, že některé kmenové buňky byly také schopné diferenciaci na mozkové endoteliální buňky, a tím vykazovaly reparativní účinek. Toto naznačuje vysoký regenerační potenciál buněčné terapie nejen pro obnovu buněk nervového systému, ale také pro regeneraci prostředí mozku. Díky neurální kmenové buněčné terapii byly zachovány kognitivní schopnosti mozku, jako je například krátkodobá paměť. Bylo také zabráněno atrofii mozkové tkáně. Struktura mozku byla, ve srovnání s kontrolní skupinou zvířat, které nedostaly NSCs po radioterapii, poškozena méně. Tato data byla získána po 8 týdnech po transplantaci NSCs na základě analýzy morfologických změn v mozkových strukturách a provedení různých testů na kontrolu kognitivních schopností.

Hipokampus hraje rozhodující roli při formování paměti a synaptické plasticity. Ionizující záření narušuje strukturu hipokampu, která ovlivňuje asociativní, epizodickou a prostorovou funkci rozpoznávací paměti. Další výzkum skupiny Acharya v roce 2015 byl proveden se zaměřením na roli transplantovaných kmenových buněk v neurogenní oblasti hipokampu (Acharya et al., 2015). V průběhu studie bylo zjištěno, že transplantace hNSCs výrazně zvyšuje kognitivní schopnosti potkanů, kteří podstoupili radioterapii celého mozku. Tyto příznivé výsledky byly získány na základě analýzy exprese ARC proteinu v mozku po dlouhé době po transplantaci – po 8 měsících. Exprese proteinu ARC kvůli radioterapii klesá, avšak transplantace hNSCs podporovala aktivaci jeho syntézy. To se projevilo zvýšenou úrovní vytváření nových spojení mezi synapsi neuronů. Co může vysvětlit důvod zlepšení kognitivního výkonu po transplantaci? Po pouhých 8 měsících bylo v hipokampu identifikováno 16 000 nových buněk, což bylo 4,5 % původně transplantovaných buněk



Obrázek 11 Výtěžek přežívajících buněk hNSCs (%) po 1, 4 a 8 měsících po transplantaci (upraveno podle (Acharya et al., 2015))

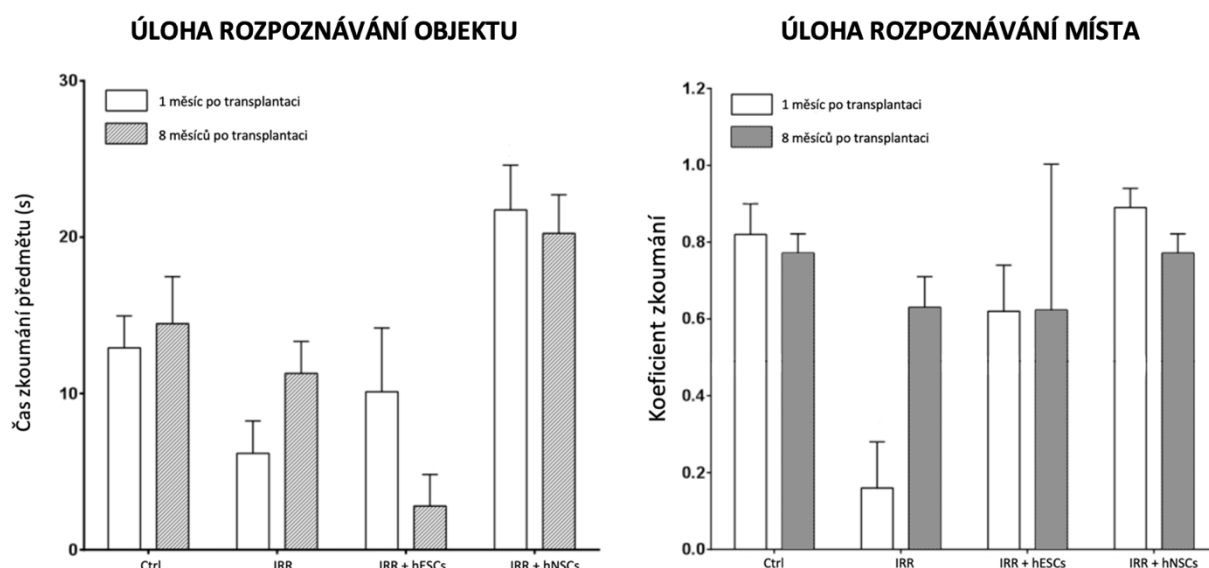
kteřé dostaly hNSCs, avšak 1 měsíc po transplantaci byla jejich úroveň mírně zvýšena ve srovnání s kontrolní skupinou. To může být způsobeno imunologickým odmítnutím, které se časem snižuje. Anebo skutečností, že mikroglie jsou schopné eliminovat zbytky mrtvých buněk, a tím přispívat k obnově neurogenických zón v raných stádiích po transplantaci. Největší množství aktivovaných mikroglíí bylo pozorováno v místě působení kmenových buněk.

4.3. Výsledky transplantace různých typů kmenových buněk

Skupina vědců provedla v roce 2014 podobný experiment s cílem zlepšit kognitivní schopnosti potkanů po absolvované radiační léčbě, a to pomocí buněčné terapie (Acharya et al., 2014) a tím ukázat, jak mohou kmenové buňky dlouhodobě zlepšit účinky radiace. Dva dny po ozáření byly pokusní potkani rozděleny do tří skupin. U první skupiny byly transplantovány lidské embryonální kmenové buňky (hESCs) do oblasti hipokampu, druhá skupina obdržela hNSCs, třetí byla kontrolní skupinou, která po ozařování celého mozku nezískala žádné kmenové buňky. Jak to dlouhodobě ovlivní kognitivní schopnosti bylo analyzováno pomocí testů na rozpoznávání místa po 1 a 8 měsících po ozáření. V tomto testu si potkani s transplantovanými kmenovými buňkami vedly lépe než kontrolní skupina. Při porovnání dvou skupin léčených buněčnou terapií, nevykazovala skupina potkanů s hESCs téměř žádné příznaky zlepšení kognitivních schopností, i když míra přežití transplantovaných buněk u hESCs byla vyšší (35 % po 1 měsíci po transplantaci, 17 % po 4 měsících). Na druhou stranu transplantace hNSCs dlouhodobě zlepšila kognitivní výkon u zvířat (Obrázek 12). Navíc hNSCs vykazovaly větší neuronální diferenciační potenciál oproti hESCs. Tohoto pozitivního účinku bylo dosaženo po jedné transplantaci. Je možné, že transplantace hNSCs dosáhla lepších

(Obrázek 11). V jaké míře přispěly tyto hNSCs, a nikoli nějaké další faktory buněčné terapie ke zlepšení kognitivních schopností, zůstává neznámé. Je rozumné předpokládat, že schopnost transplantovaných buněk k trofické podpoře je nejdůležitější při zlepšování vedlejších účinků radioterapie, která podporuje syntézu určitých proteinů, jako je ARC protein, což pomáhá při vytváření nových synapsí. Současně po 8 měsících také pokleslo množství aktivovaných mikroglíí ve skupině potkanů,

výsledků z dlouhodobého hlediska i díky tomu, že hNSCs stimulují syntézu ARC proteinu, čímž podporují tvorbu nových neuronů a paměti.



Obrázek 12 Výsledky kognitivních testů u 3 skupin + skupiny Ctrl, která nedostala ani radiální dávku, ani kmenové buňky. Informace získané z ((Acharya et al., 2014; Acharya et al. 2009; Acharya et al. 2011). IRR – skupina, která po radioterapii nepodstoupila žádné transplantace; IRR + hESCs – po radioterapii byly transplantovány hESCs; IRR + hNSCs – po radioterapii byly transplantovány hNSCs (upraveno podle (Acharya et al., 2014))

V roce 2019 byl vyzkoušen intranazální způsob podání lidských mezenchymálních kmenových buněk (hMSCs) s cílem otestovat jejich neuroprotektivní funkci (Soria et al., 2019) a také zjistit, zda je možné vyhnout se invazivním metodám implantace kmenových buněk, aniž by došlo ke ztrátě účinnosti při eliminaci následků ozáření mozku. Mezi výhody intranazální transplantace patří také možnost dát více dávek kmenových buněk a neutralizovat překážku hematoencefalické bariéry. Zavedením hMSCs přes nosní dutinu, na cestě k jejich konečnému cíli projdou kmenové buňky dalšími oblastmi mozku, jako jsou například čichové dráhy, čímž se rozšíří jejich terapeutický účinek. Tyto buňky byly izolovány z tukové tkáně, což umožnilo produkci velkého počtu kmenových buněk. Výsledky experimentu ukázaly, že aplikované hMSCs měly příznivý účinek na obnovení kognitivních schopností myši. Příznaky oxidačního poškození v buňkách a neurálního zánětu byly sníženy. Také po transplantaci hMSCs byla ztráta v počtu neuronů menší než je obvyklé po ionizujícím ozáření celého mozku. Na molekulární úrovni se snížila míra signalizace cAMP response element-binding transkripčního faktoru (CREB) reagujícího na poškození. Odlišná exprese genů spojených s regulací imunitní odpovědi byla pozorována ve skupinách myši, které buď dostaly nebo nedostaly hMSCs. Ozařování způsobilo zvýšenou imunoreaktivitu proteinu GFAP a zvýšenou hladinu aktivovaných mikroglíí v mozku. Transkripční faktor CREB byl u ozářených myši aktivní, proto byla aktivována exprese proteinu vázajícího se na CREB, proteinu CREB-binding protein (CBP). Po aplikaci hMSCs byla úroveň sekrece CBP normalizována. Dalším účinkem hMSCs bylo potlačení exprese kaspázy-3 a receptoru formylpeptidu 1, odpovědného

za chemotaxi neutrofilů, což vedlo ke snížení zánětlivé odpovědi. Tento neuroprotektivní mechanismus přispěl ke zlepšení poškození, které bylo způsobeno ozářením dospělých neuronů mozku. Nicméně mladé neurony obnoveny nebyly. Daná studie prokázala neuroprotektivní funkci hMSCs s použitím intranazální metody implantace. Kognitivní testy na myších prokázaly trvalý účinek buněčné terapie, u myší, které obdržely dávku hMSCs, se zlepšila paměť, koordinace pohybů a čich.

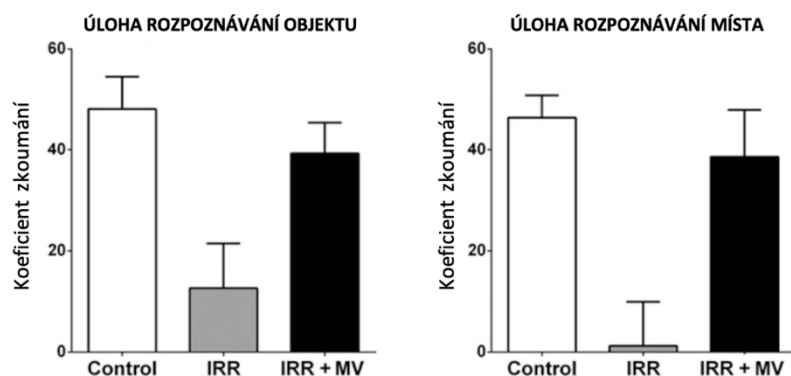
S kmenovými buňkami se provádějí rozmanité experimenty pro různé účely, neboť tyto buňky mají velký diferenciační potenciál a schopnost stát se jakoukoli jinou buňkou. Je to velmi slibná cesta pro získání různých typů buněk a jejich dalšího využití ve vědě a medicíně. Například Piao kultivoval prekurzory oligodendrocytů (hOPC) odvozené z pluripotentních kmenových buněk (hPSC) a transplantoval je do mozku potkanů po ozáření pro výzkum terapeutického účinku kmenových buněk při neutralizaci vedlejších účinků záření jako potenciálního mechanismu při obnově myelinizace (Piao et al., 2015). Když byly buňky jako hPSC transplantovány do předního mozku, byly schopny zlepšit následky ozáření, jako je demyelinizace a zmenšení velikosti kalózního tělesa a takto přispívat k obnově kognitivních schopností. Míra přežití transplantovaných buněk byla dostatečně vysoká, hOPC byly identifikovány v obou hemisférách mozku, nejvyšší koncentrace kmenových buněk byla v kalózním tělese, na stejném místě, kde byly NSCs příjemce. Populace gliových buněk byla obnovena. Po další transplantaci hOPC do mozečku se zvýšila rychlost řešení různých motorických úkolů, což ukazuje na další terapeutickou schopnost kmenových buněk při jejich transplantaci do mozku. Kromě pohybových úkolů podstoupily potkani řadu různých dalších testů, jako je test na preferenci nového objektu a test na rozpoznání jeho polohy. Transplantace hOPC do mozku ozářených potkanů zlepšila výkonnost při behaviorálních úkolech vyžadujících schopnosti učení a paměť. Možnost získání různých buněk nervového systému z lidských embryonálních kmenových buněk, například oligodendrocytů, může pomoci vyřešit problém difúzní demyelinizace, ke které dochází po ozáření mozku. V dané studii byla prokázána schopnost hOPC po transplantaci migrovat, což je také důležitá podmínka pro další použití při účinné léčbě následků radioterapie. Rovněž byl naznačen význam obnovy bílé hmoty po radioterapii mozku.

4.4. Transplantace mikrovezikulů

Transplantace cizích hNSCs musí být doprovázena imunosupresivní léčbou, která může být problematická, zejména u starších osob nebo u lidí se špatným zdravotním stavem, protože dlouhodobé užívání imunosupresiv je toxické (Mollison et al., 1998).

Ve snaze vyřešit tento problém byla v roce 2016 byla zavedena vylepšená metodika

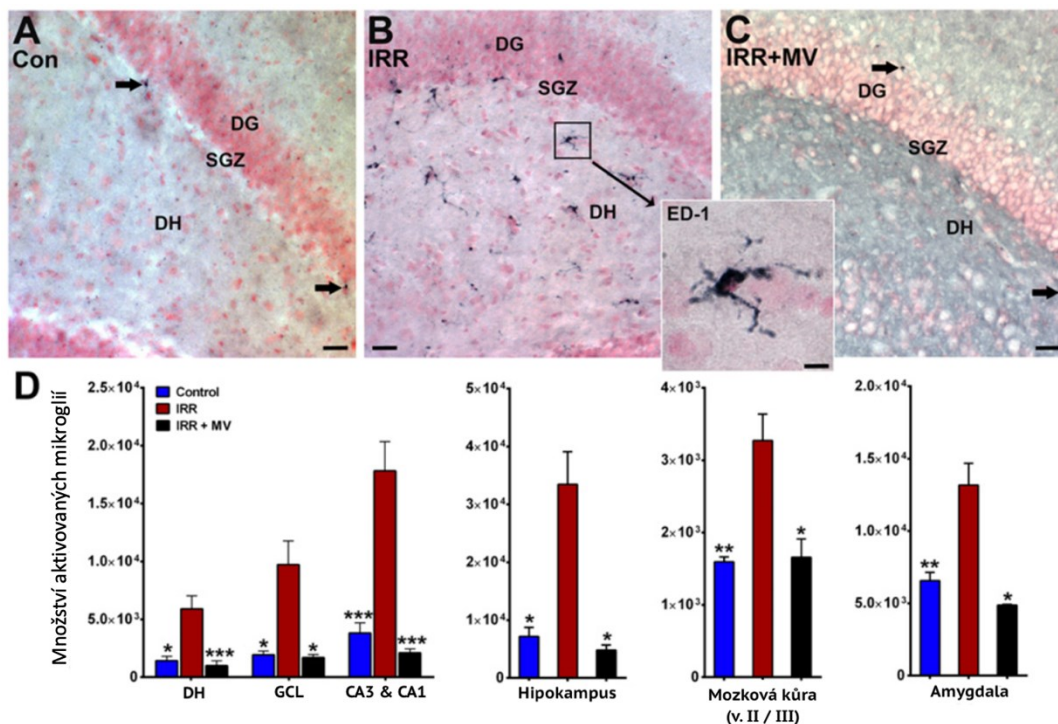
implantace hNSCs (Baulch et al., 2016). Po ozáření celého mozku, byly transplantovány do mozku potkana mikrovezikuly (MV) získané z kmenových buněk. Výsledkem bylo zlepšení



Obrázek 13 Výsledky kognitivních testů u 3 skupin: Control – skupina, která nedostala ani radiální dávku, ani MV; IRR – skupina, která po radioterapii neobdržela žádné MV; IRR + MV – po radioterapii byly transplantovány MV; (upraveno podle (Baulch et al., 2016))

kognitivních schopností pokusných zvířat (Obrázek 13). Tyto závěry byly získány na základě úspěšného absolvování zadaných úkolů a testů, které ověřovaly rychlost rozpoznávání nových míst a objektů. Neuroprotektivní vlastnosti

hNSCs tak působily prostřednictvím MV. Po měsíci po zavedení MV nedošlo k žádnému snížení objemu hipokampu a kortikální vrstvy. Radioterapie vyvolá zánětlivou reakci a zvýšený počet aktivovaných mikroglíí, který se významně snižuje po použití MV. Množství aktivovaných mikroglíí v každé oblasti mozku bylo nižší, zvláště v hipokampu, mozkové kůře (vrstva II / III) a amygdale (Obrázek 14). Navíc zvířata, která dostávala MV, měla více rozvětvených dendritů. MV usnadňují postup buněčné terapie a chrání nás před možnými vedlejšími účinky transplantace kmenových buněk, jako je výskyt teratomů nebo odmítnutí transplantovaných buněk. Navíc lze říct, že transplantace MV zachovává mozkové struktury, eliminuje zánětlivé reakce a vede ke zlepšení neurokognitivních parametrů. MV transportují



Obrázek 14 A-C: Imunohistochemická analýza neurogenní zóny, kde aktivované mikroglie vyznačena černým (ED-1+); Con – skupina, která nedostala ani radiální dávku, ani MV; IRR – skupina, která po radioterapii neobdržela žádné MV; IRR + MV – po radioterapii byly transplantovány MV. D: Stereologická kvantifikace aktivovaných mikroglíí (upraveno podle (Baulch et al., 2016)); DH – dentate hilus, GCL – granulární buňky

rozmanité látky, které působí na různé části a funkce mozku. Například neurotrofní faktory poskytují trofickou podporu mozku, další proteiny, například stimulují růst nových synapsí a proces neurogeneze. Díky imunofluorescenci byly detekovány MV v různých oblastech mozku, nejenom v místě injekce, kde úspěšně působily a zlepšovaly stav mozku, což ukazuje na schopnost migrace. Tato metoda je univerzální a je vhodná nejen pro odstraňování následků radiační terapie, ale také v boji proti různým degenerativním chorobám, jako Alzheimerova nebo Parkinsonova choroba.

Výhodou MV je možnost intranazálního podání do těla. Takové doručení látek podílejících se na zlepšení stavu mozku umožňuje jejich rychlejší a přímější dodání bez chirurgického rizika. Při použití této metody bude možné se vyhnout invazivním postupům a použití imunosuprese. Navíc tato vylepšená metoda umožňuje modifikovat MV změnou, nahrazením nebo přidáním různých látek do bioaktivního nákladu.

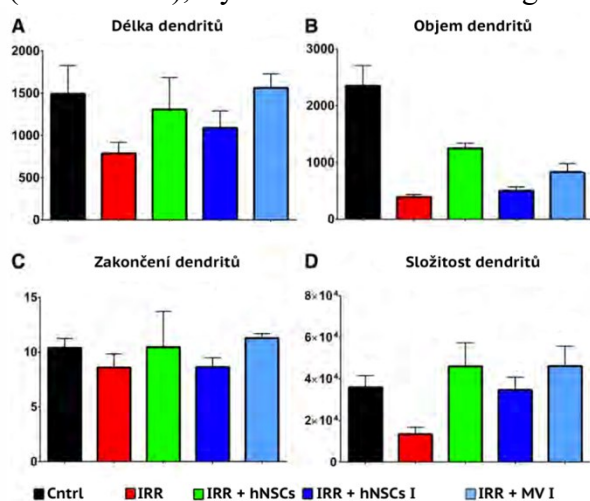
MV plní funkci komunikace mezi buňkami a udržují mikroprostředí. Vznikají oddělením od cytoplazmatické membrány a vytvářejí malé vezikuly, které obsahují různé látky. Jsou to lipidové váčky mající nanovelikost (v rozsahu od 100 nm do 1 μ m), které jsou schopné překonat hematoencefalickou bariéru. Obsahují různé složky, jako jsou lipidy, mitochondrie, bílkoviny a nukleové kyseliny. Použití MV v buněčné terapii znamená příležitost k transportu různých látek vyvolujících rozmanité účinky na mozek díky parakrinní signalizaci (Leavitt et al., 2019).

Byly provedeny pokusy, při kterých byly MV naplněny nějakými látkami a poté byl analyzován jejich účinek na organismus. Například bioaktivní náklad MV byl doplněn katalázou a poté transplantován myším. Výsledkem této studie bylo významné snížení úrovně zánětu nervové soustavy (Haney et al., 2015). Zánět v mozku byl také snížen zavedením MV s kurkuminem, kde byl navíc také pozorován zpomalený růst nádoru (Zhuang et al., 2011). MV mohou navíc transportovat faktory stimulující růst a obnovu krevních cév. Protože mozek je jedním z metabolicky neaktivnějších orgánů, jeho normální fungování závisí na plném zásobení krví, stejně jako životaschopnost nervových buněk závisí na výživě získané od cév.

Jednou ze zajímavých složek bioaktivního nákladu MV pro regenerativní medicínu je miRNA, jež se podílí na regulaci exprese různých genů ve zdravých i poškozených mozcích. Například miR-124 je jednou z nejdůležitějších pro stimulaci neurogeneze (Yang et al., 2017). Jiná miRNA – miR-125a, naopak, přispívá ke snížení úrovně syntézy proteinů odpovědných za synaptickou plasticitu, neurogenezi a tvorbu nových synapsí. Bylo prokázáno, že po ozáření neurogenních zón dochází k zvýšené produkce dané miRNA. Tento vztah naznačuje důležitost analýzy různých typů miRNA a jejich roli v neurogenezi, v zánětlivých reakcích a v procesech obnovy mozkových buněk po radioterapii. Možná že MV mají neuroprotektivní schopnosti

díky přítomnosti miRNA ve svém složení. Při regeneraci se vylučují proteiny, které jsou nezbytné k udržení zrání a růstu nových neuronů a synapsí. Schopnost miRNA regulovat produkci různých proteinů je široce používána pro terapeutické účely.

Výše uvedené studie naznačují, že hlavním mechanismem hNSCs a MV zlepšujícím účinky radioterapie jsou jejich neuroprotektivní vlastnosti, které se projevují po transplantaci. Pro lepší pochopení tohoto mechanismu pro obnovu kognitivních schopností po ozáření celého mozku byly zkoumány změny ve struktuře hipokampu po jednostranné a oboustranné transplantaci hNSCs nebo MV (Smith et al., 2020). Při jednostranné transplantaci byly získány pozitivní výsledky, měsíc po transplantaci bylo pozorováno zvýšené větvení a složitost dendritů (Obrázek 15), byla zachována morfologie neuronů v hipokampu, došlo ke zvýšení sekrece



Obrázek 15 Porovnání délky, objemu, zakončení a složitosti dendritů mezi různými skupinami potkanů: Ctrl – skupina, která nedostala ani radiační dávku, ani MV a hNSCs; IRR – skupina, která po radioterapii neobdržela žádné MV a hNSCs; IRR + hNSCs – po radioterapii byly transplantovány hNSCs; IRR + hNSCs I – po radioterapii byla provedena jednostranná transplantace hNSCs; IRR + MV I – po radioterapii byla provedena jednostranná transplantace MV (upraveno podle (Smith et al., 2020))

nelišily, zatímco složitost a hustota větvení dendritů ve skupině, která dostávala hNSCs, byla nejvyšší ve srovnání se všemi ostatními. U dvoustranné transplantace MV nebylo dosaženo stejně pozitivních výsledků jako u transplantace jednostranné.

Výsledky této práce potvrzují, že transplantace kmenových buněk poskytuje neuroprotektivní podporu, podporuje syntézu nezbytných látek pro proces neurogeneze, která určuje zotavení mozku po ozáření. K tomu také přispívá také neuromodulační role NSCs, což potvrzuje zvýšená exprese glial cell-derived neurotrophic faktoru (GDNF) po transplantaci, který podporuje růst axonů a chrání je. Celkově shrnuto, jak transplantace hNSCs, tak i MV vede k stejně pozitivním výsledkům. Přitom transplantace MV poskytuje příležitost vyhnout se možným teratomům a možnému imunologickému odmítnutí transplantovaných NSCs.

růstových faktorů v gliích a snížení úrovně zánětu a počtu mikroglíí. Kognitivní schopnosti byly také zvýšeny ve srovnání s kontrolní skupinou, která po ozáření nedostala ani dávku hNSCs, ani dávku MV. Těchto výsledku bylo dosaženo nejen v místě transplantace ale i v dalších oblastech mozku, což také hovoří o schopnosti NSCs a MV migrovat a šířit neuroprotektivní funkci. Je zajímavé, že v případě bilaterální transplantace hNSCs se výsledky v některých parametrech nelišily od kontrolní skupiny. V obou těchto skupinách se neurony granulárních buněk v mozku morfologicky

4.5. Metody zlepšující výkon buněčné terapie

Neurální kmenovou buněčnou terapii lze použít jako samostatnou léčbu následků radioterapie po ozařování mozku. Nejlepších výsledků je možné dosáhnout v kombinaci s dalšími metodami. V současnosti pokračuje vývoj mnohých postupů, které také budou přispívat ke zlepšení stavu pacientů po radiační terapii.

Důležité je například snížit zánětlivou reakci, při které se syntetizují prozánětlivé mediátory, které blokují diferenciaci NSCs. Příkladem takového mediátoru, který podporuje zánětlivou reakci a snižuje neurogenezi a kognitivní funkci, jsou interferony typu I (IFN-I). Vyřešením problému vzniku zánětu se může účinnost transplantace NSCs několikrát zvýšit. K dosažení tohoto cíle se testovalo užití některých léků ve spojení s buněčnou terapií, jako je indometacin (Monje, 2003), a různé další inhibitory prozánětlivých mediatorů, které významně snižují hladinu zánětu v mozku po ozáření, čímž zvyšují úroveň neurogeneze. Také terapie založená na inhibici signálů TGF- β měla dobré výsledky v obnově mozkové tkáně. Protein TGF- β se začíná aktivně vylučovat endotelovými buňkami po aplikaci ionizujícího záření a zastavuje proces diferenciaci qNSCs a stimuluje apoptózu NSCs. Po použití inhibitorů TGF- β byla pozorována aktivace proliferace NSCs a vznik nových neuroblastů v SVZ ozářených myší (Pineda et al., 2013).

Heterochronní přenos krve je další metodou ke zlepšení účinků radioterapie (Katsimpardi and Rubin, 2015). Infuze mladé krve nebo plazmy znovu aktivuje funkci NSCs, obnovuje krevní oběh a cévy v mozku.

V neposlední řadě je důležité věnovat se sportovním aktivitám a upravit dietu, protože vysoké dávky záření mění mikroprostředí mozku. Keto dieta s omezeným příjmem sacharidů a sníženým obsahem kalorií zpomaluje rychlost růstu nádorů u pacientů. Tato metabolická terapie může zlepšit stav pacientů a jejich indikátory neurogeneze a zánětu v mozkových tkáních po radioterapii (Seyfried et al., 2015).

4.6. Omezení užitečnosti terapie kmenovými buňkami

Přestože lze omezení spojená s tvorbou teratomů s imunitní reakcí po transplantaci buněk vyřešit pomocí MV, stále existuje několik překážek pro zavedení neurální kmenové buněčné terapie do běžné praxe léčby následků radioterapie.

Kmenové buňky se ukázaly jako vysoce prioritní v rehabilitaci poškozených oblastí mozku. Nicméně mohou hrát nejen pozitivní roli při obnově mozkových buněk a tkání, ale také roli negativní. V neurogenních zónách mozku se vytvářejí nové buňky, které nahrazují staré nebo poškozené buňky nervového systému. Několik studií ukázalo, že vlivem ionizujícího záření na oblast SVZ začíná aktivní diferenciaci kmenových buněk, která vytváří novou

populaci buněk a nahradí ty buňky, které byly poškozeny radiační terapií (Capilla-Gonzalez et al., 2016). Některé z nově produkovaných buněk se však stávají rakovinnými a podporují tak růst nádoru (Chen et al., 2015). Při transplantaci kmenových buněk tak i radioterapií nepoškozené NSCs mohou přispět k tvorbě nádoru. (Sato et al., 2013).

Tento objev snížil úroveň důvěry v kmenové buňky jako mechanismu pro obnovení normálního fungování a struktury mozku. Při zdokonalování technik buněčné terapie a dalších rehabilitačních metod po radioterapii je proto nutné vzít v úvahu skutečnost, že buňky produkované v SVZ mohou přispívat k rozvoji nádoru. Ačkoli tento jev byl pozorován pouze u několika testovaných subjektů, které podstoupily neurální kmenovou buněčnou terapii, pravděpodobnost rychlejšího procesu onkogeneze může v některých případech zabránit použití NSCs jako metody léčby za účelem zlepšení kognitivních schopností. Pravděpodobnost změny NSCs na rakovinné buňky, a nikoli na normální buňky nervového systému, závisí na mnoha faktorech, jako věk příjemce, interval mezi prováděním radioterapie a transplantací a tím, jaké buňky byly transplantovány (zda vlastní nebo z jiného organismu). To naznačuje, že v lékařské praxi bude nutné zvážit všechny rizikové faktory a zohlednit je při použití kmenových buněk při léčbě pacientů. Na druhé straně je takový postup prováděný individuálně efektivnější a je odůvodněn potřebami pacientů trpících oslabenými kognitivními schopnostmi po radiační terapii.

5. Diskuse a závěr

V současné době se radioterapie používá k léčbě rakoviny, nicméně následky této terapie velmi často brání pacientům v normálním životě. Jelikož jedním z hlavních důvodů je vyčerpání zásoby NSCs, je jejich transplantace logickým řešením problémů způsobených radiační léčbou. Po transplantaci dochází ke zlepšení kognitivních schopností, zachování morfologie hostitelských neuronů, potlačení neurozánětu, zlepšení myelinizace a zvýšení průtoku krve mozkem.

Nejzajímavější věcí je, že všech těchto výsledků lze dosáhnout bez chirurgického zákroku díky transplantaci MV. Pokusy ukazují, že jak NSCs, tak MV lze transplantovat do hostitele, a ty poté migrují po celém mozku. Použití MV, a nikoli samotných NSCs, pak minimalizuje odmítnutí transplantátu a výskyt teratomů.

V současné době platí, že není přesně známo, jak bude lidské tělo reagovat na transplantaci NSCs a MV, protože doposud byly experimenty prováděny pouze na myších a potkanech. Výsledky získané ze zvířat však představují slibnou metodu. Proto je nutné přizpůsobit buněčnou terapii lidem tak, aby byla bezpečná a účinná. Zavedení takové metody do klinické praxe by mohlo pomoci vyrovnat se s oslabujícím a progresivním kognitivním poškozením. Tato léčba je obzvláště důležitá pro děti, jejichž vyvíjející se mozek je na záření citlivější.

Přesný mechanismus parakrinní signalizace MV ještě musí být objeven. Stejně jako doba působení, optimální způsoby podávání a dávkování, aby byla zajištěna kvalitní a účinná péče o pacienta.

Tato práce shrnuje doposud získané poznatky z experimentů s buněčnou terapií po radioterapii. Výsledky získané v popsáných experimentech mají potenciál pro regenerativní medicínu. Je zapotřebí dalšího vývoje a výzkumu ke zlepšení buněčné terapie s použitím NSCs, aby ji bylo možné ji zavést do rutinní klinické praxe. Další výzkum využití MV také pomůže při odstraňování problémů se zaváděním buněčné terapie do lékařské praxe. Takový postup pomůže nejen pacientům, kteří podstoupili radiační terapii, ale i lidem s poraněním mozku a trpícími různými degenerativními chorobami.

6. Použitá literatura

- Achanta, P., Capilla-Gonzalez, V., Purger, D., Reyes, J., Sailor, K., Song, H., Garcia-Verdugo, J.M., Gonzalez-Perez, O., Ford, E., and Quinones-Hinojosa, A. (2012). Subventricular Zone Localized Irradiation Affects the Generation of Proliferating Neural Precursor Cells and the Migration of Neuroblasts. *STEM CELLS* 30, 2548–2560.
- Acharya, M.M., Christie, L.-A., Lan, M.L., Giedzinski, E., Fike, J.R., Rosi, S., and Limoli, C.L. (2011). Human Neural Stem Cell Transplantation Ameliorates Radiation-Induced Cognitive Dysfunction. *Cancer Res.* 71, 4834–4845.
- Acharya, M.M., Martirosian, V., Christie, L.-A., and Limoli, C.L. (2014). Long-term cognitive effects of human stem cell transplantation in the irradiated brain. *Int. J. Radiat. Biol.* 90, 816–820.
- Acharya, M.M., Rosi, S., Jopson, T., and Limoli, C.L. (2015). Human Neural Stem Cell Transplantation Provides Long-Term Restoration of Neuronal Plasticity in the Irradiated Hippocampus. *Cell Transplant.* 24, 691–702.
- Barazzuol, L., Ju, L., and Jeggo, P.A. (2017). A coordinated DNA damage response promotes adult quiescent neural stem cell activation. *PLOS Biol.* 15, e2001264.
- Baulch, J.E., Acharya, M.M., Allen, B.D., Ru, N., Chmielewski, N.N., Martirosian, V., Giedzinski, E., Syage, A., Park, A.L., Benke, S.N., et al. (2016). Cranial grafting of stem cell-derived microvesicles improves cognition and reduces neuropathology in the irradiated brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 4836–4841.
- Bellinzona, M., Gobel, G.T., Shinohara, C., and Fike, J.R. (1996). Apoptosis is induced in the subependyma of young adult rats by ionizing irradiation. *Neurosci. Lett.* 208, 163–166.
- Boldrini, M., Fulmore, C.A., Tartt, A.N., Simeon, L.R., Pavlova, I., Poposka, V., Rosoklija, G.B., Stankov, A., Arango, V., Dwork, A.J., et al. (2018). Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell* 22, 589-599.e5.
- Boström, M., Kalm, M., Karlsson, N., Erkenstam, N.H., and Blomgren, K. (2013). Irradiation to the Young Mouse Brain Caused Long-Term, Progressive Depletion of Neurogenesis but did not Disrupt the Neurovascular Niche. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 33, 935–943.
- Capilla-Gonzalez, V., Bonsu, J.M., Redmond, K.J., Garcia-Verdugo, J.M., and Quiñones-Hinojosa, A. (2016). Implications of irradiating the subventricular zone stem cell niche. *Stem Cell Res.* 16, 387–396.
- Codega, P., Silva-Vargas, V., Paul, A., Maldonado-Soto, A.R., DeLeo, A.M., Pastrana, E., and Doetsch, F. (2014). Prospective Identification and Purification of Quiescent Adult Neural Stem Cells from Their In Vivo Niche. *Neuron* 82, 545–559.
- Daynac, M., Chicheportiche, A., Pineda, J.R., Gauthier, L.R., Boussin, F.D., and Mouthon, M.-A. (2013). Quiescent neural stem cells exit dormancy upon alteration of GABAAR signaling following radiation damage. *Stem Cell Res.* 11, 516–528.
- Doetsch, F., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular Composition and Three-Dimensional Organization of the Subventricular Germinal Zone in the Adult

- Mammalian Brain. *J. Neurosci.* *17*, 5046–5061.
- Dulken, B.W., Leeman, D.S., Boutet, S.C., Hebestreit, K., and Brunet, A. (2017). Single-Cell Transcriptomic Analysis Defines Heterogeneity and Transcriptional Dynamics in the Adult Neural Stem Cell Lineage. *Cell Rep.* *18*, 777–790.
- Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.-M., Nordborg, C., Peterson, D.A., and Gage, F.H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* *4*, 1313–1317.
- Ernst, A., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Perl, S., Tisdale, J., Possnert, G., Druid, H., and Frisén, J. (2014). Neurogenesis in the Striatum of the Adult Human Brain. *Cell* *156*, 1072–1083.
- Fuentealba, L.C., Rompani, S.B., Parraguez, J.I., Obernier, K., Romero, R., Cepko, C.L., and Alvarez-Buylla, A. (2015). Embryonic Origin of Postnatal Neural Stem Cells. *Cell* *161*, 1644–1655.
- Haney, M.J., Klyachko, N.L., Zhao, Y., Gupta, R., Plotnikova, E.G., He, Z., Patel, T., Piroyan, A., Sokolsky, M., Kabanov, A.V., et al. (2015). Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson’s disease therapy. *J. Controlled Release* *207*, 18–30.
- Hellström, N.A.K., Björk-Eriksson, T., Blomgren, K., and Kuhn, H.G. (2009). Differential Recovery of Neural Stem Cells in the Subventricular Zone and Dentate Gyrus After Ionizing Radiation. *Stem Cells* *27*, 634–641.
- Hellström, N.A.K., Lindberg, O.R., Ståhlberg, A., Swanpalmer, J., Pekny, M., Blomgren, K., and Kuhn, H.G. (2011). Unique gene expression patterns indicate microglial contribution to neural stem cell recovery following irradiation. *Mol. Cell. Neurosci.* *46*, 710–719.
- Joo, K.M., Jin, J., Kang, B.G., Lee, S.J., Kim, K.H., Yang, H., Lee, Y.-A., Cho, Y.J., Im, Y.-S., Lee, D.-S., et al. (2012). Trans-Differentiation of Neural Stem Cells: A Therapeutic Mechanism Against the Radiation Induced Brain Damage. *PLoS ONE* *7*, e25936.
- Katsimpardi, L., and Lledo, P.-M. (2018). Regulation of neurogenesis in the adult and aging brain. *Curr. Opin. Neurobiol.* *53*, 131–138.
- Katsimpardi, L., and Rubin, L.L. (2015). Young systemic factors as a medicine for age-related neurodegenerative diseases. *Neurogenesis* *2*, e1004971.
- Konířová, J., Cupal, L., Jarošová, Š., Michaelidesová, A., Vachelová, J., Davidková, M., Bartůněk, P., and Ziková, M. (2019). Differentiation Induction as a Response to Irradiation in Neural Stem Cells In Vitro. *Cancers* *11*, 913.
- Leavitt, R.J., Limoli, C.L., and Baulch, J.E. (2019). miRNA-based therapeutic potential of stem cell-derived extracellular vesicles: a safe cell-free treatment to ameliorate radiation-induced brain injury. *Int. J. Radiat. Biol.* *95*, 427–435.
- Lee, W.H., Sonntag, W.E., Mitschelen, M., Yan, H., and Lee, Y.W. (2010). Irradiation induces regionally specific alterations in pro-inflammatory environments in rat brain. *Int. J. Radiat. Biol.* *86*, 132–144.
- Leeman, D.S., Hebestreit, K., Ruetz, T., Webb, A.E., McKay, A., Pollina, E.A., Dulken,

- B.W., Zhao, X., Yeo, R.W., Ho, T.T., et al. (2018). Lysosome activation clears aggregates and enhances quiescent neural stem cell activation during aging. *Science* 359, 1277–1283.
- Llorens-Bobadilla, E., Zhao, S., Baser, A., Saiz-Castro, G., Zwadlo, K., and Martin-Villalba, A. (2015). Single-Cell Transcriptomics Reveals a Population of Dormant Neural Stem Cells that Become Activated upon Brain Injury. *Cell Stem Cell* 17, 329–340.
- Mabbott, D.J. (2006). Diffusion tensor imaging of white matter after cranial radiation in children for medulloblastoma: Correlation with IQ. *Neuro-Oncol.* 8, 244–252.
- Michaelidesová, A., Konířová, J., Bartůněk, P., and Zíková, M. (2019). Effects of Radiation Therapy on Neural Stem Cells. *Genes* 10, 640.
- Ming, G., and Song, H. (2011). Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron* 70, 687–702.
- Mizrak, D., Levitin, H.M., Delgado, A.C., Crotet, V., Yuan, J., Chaker, Z., Silva-Vargas, V., Sims, P.A., and Doetsch, F. (2019). Single-Cell Analysis of Regional Differences in Adult V-SVZ Neural Stem Cell Lineages. *Cell Rep.* 26, 394-406.e5.
- Mizumatsu, S., Monje, M.L., Morhardt, D.R., Rola, R., Palmer, T.D., and Fike, J.R. Extreme Sensitivity of Adult Neurogenesis to Low Doses of X-Irradiation. 8.
- Mollison, K.W., Fey, T.A., Krause, R.A., Andrews, J.M., Bretheim, P.T., Cusick, P.K., Hsieh, G.C., and Luly, J.R. (1998). Nephrotoxicity studies of the immunosuppressants tacrolimus (FK506) and ascomycin in rat models. 13.
- Monje, M.L. (2003). Inflammatory Blockade Restores Adult Hippocampal Neurogenesis. *Science* 302, 1760–1765.
- Monje, M., and Dietrich, J. (2012). Cognitive side effects of cancer therapy demonstrate a functional role for adult neurogenesis. *Behav. Brain Res.* 227, 376–379.
- Moreno-Jiménez, E.P., Flor-García, M., Terreros-Roncal, J., Rábano, A., Cafini, F., Pallas-Bazarra, N., Ávila, J., and Llorens-Martín, M. (2019). Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer’s disease. *Nat. Med.* 25, 554–560.
- Morizur, L., Chicheportiche, A., Gauthier, L.R., Daynac, M., Boussin, F.D., and Mouthon, M.-A. (2018). Distinct Molecular Signatures of Quiescent and Activated Adult Neural Stem Cells Reveal Specific Interactions with Their Microenvironment. *Stem Cell Rep.* 11, 565–577.
- Obernier, K., and Alvarez-Buylla, A. (2019). Neural stem cells: origin, heterogeneity and regulation in the adult mammalian brain. *Development* 146, dev156059.
- Obernier, K., Cebrian-Silla, A., Thomson, M., Parraguez, J.I., Anderson, R., Guinto, C., Rodas Rodriguez, J., Garcia-Verdugo, J.-M., and Alvarez-Buylla, A. (2018). Adult Neurogenesis Is Sustained by Symmetric Self-Renewal and Differentiation. *Cell Stem Cell* 22, 221-234.e8.
- Piao, J., Major, T., Auyeung, G., Policarpio, E., Menon, J., Droms, L., Gutin, P., Uryu, K.,

Tchieu, J., Soulet, D., et al. (2015). Human Embryonic Stem Cell-Derived Oligodendrocyte Progenitors Remyelinate the Brain and Rescue Behavioral Deficits following Radiation. *Cell Stem Cell* 16, 198–210.

Pineda, J.R., Daynac, M., Chicheportiche, A., Cebrian-Silla, A., Sii Felice, K., Garcia-Verdugo, J.M., Boussin, F.D., and Mouthon, M. (2013). Vascular-derived TGF- β increases in the stem cell niche and perturbs neurogenesis during aging and following irradiation in the adult mouse brain. *EMBO Mol. Med.* 5, 548–562.

Ramos-Zúñiga, R., González-Pérez, O., Macías-Ornelas, A., Capilla-González, V., and Quiñones-Hinojosa, A. (2012). Ethical Implications in the Use of Embryonic and Adult Neural Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2012, 1–7.

Sato, Y., Shinjyo, N., Sato, M., Osato, K., Zhu, C., Pekna, M., Kuhn, H.G., and Blomgren, K. (2013). Grafting of neural stem and progenitor cells to the hippocampus of young, irradiated mice causes gliosis and disrupts the granule cell layer. *Cell Death Dis.* 4, e591–e591.

Seyfried, T.N., Flores, R., Poff, A.M., D'Agostino, D.P., and Mukherjee, P. (2015). Metabolic therapy: A new paradigm for managing malignant brain cancer. *Cancer Lett.* 356, 289–300.

Smith, S.M., Giedzinski, E., Angulo, M.C., Lui, T., Lu, C., Park, A.L., Tang, S., Martirosian, V., Ru, N., Chmielewski, N.N., et al. (2020). Functional equivalence of stem cell and stem cell-derived extracellular vesicle transplantation to repair the irradiated brain. *STEM CELLS Transl. Med.* 9, 93–105.

Soria, B., Martin-Montalvo, A., Aguilera, Y., Mellado-Damas, N., López-Beas, J., Herrera-Herrera, I., López, E., Barcia, J.A., Alvarez-Dolado, M., Hmadcha, A., et al. (2019). Human Mesenchymal Stem Cells Prevent Neurological Complications of Radiotherapy. *Front. Cell. Neurosci.* 13, 204.

Sorrells, S.F., Paredes, M.F., Cebrian-Silla, A., Sandoval, K., Qi, D., Kelley, K.W., James, D., Mayer, S., Chang, J., Auguste, K.I., et al. (2018). Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature* 555, 377–381.

Spalding, K.L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H.B., Boström, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, B.A., et al. (2013). Dynamics of Hippocampal Neurogenesis in Adult Humans. *Cell* 153, 1219–1227.

Tada, E., Parent, J.M., Lowenstein, D.H., and Fike, J.R. (2000). X-irradiation causes a prolonged reduction in cell proliferation in the dentate gyrus of adult rats. *Neuroscience* 99, 33–41.

Tobin, M.K., Musaraca, K., Disouky, A., Shetti, A., Bheri, A., Honer, W.G., Kim, N., Dawe, R.J., Bennett, D.A., Arfanakis, K., et al. (2019). Human Hippocampal Neurogenesis Persists in Aged Adults and Alzheimer's Disease Patients. *Cell Stem Cell* 24, 974–982.e3.

Wang, C., Liu, F., Liu, Y.-Y., Zhao, C.-H., You, Y., Wang, L., Zhang, J., Wei, B., Ma, T., Zhang, Q., et al. (2011). Identification and characterization of neuroblasts in the subventricular zone and rostral migratory stream of the adult human brain. *Cell Res.* 21, 1534–1550.

Yang, J., Zhang, X., Chen, X., Wang, L., and Yang, G. (2017). Exosome Mediated Delivery of miR-124 Promotes Neurogenesis after Ischemia. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* 7, 278–287.

Zhuang, X., Xiang, X., Grizzle, W., Sun, D., Zhang, S., Axtell, R.C., Ju, S., Mu, J., Zhang, L., Steinman, L., et al. (2011). Treatment of Brain Inflammatory Diseases by Delivering Exosome Encapsulated Anti-inflammatory Drugs From the Nasal Region to the Brain. *Mol. Ther.* 19, 1769–1779.