

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

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



Magdalena Dostálová

Neurogeneze ve zralém hipokampu a prostorová navigace

Adult neurogenesis in the hippocampus and spatial navigation

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Aleš Stuchlík, Ph.D.

Praha 2013

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, 7.5.2013

Podpis

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli docentu RNDr. Aleši Stuchlíkovi, Ph.D. za čas, který mi věnoval, i za inspirativní rady, bez kterých by tato práce nevznikla. Rovněž bych chtěla poděkovat své rodině za podporu během celého studia.

Abstrakt

V hipokampu se denně tvoří sta až tisíce nových granulárních buněk po celý život. Jejich funkce je, navzdory intenzivnímu výzkumu posledních desítek let, stále nejasná. Předpokládá se jejich podíl na prostorové paměti a schopnosti orientace. Výsledky z behaviorálních úloh jako Morrisovo vodní bludiště, radiální bludiště i z řady dalších přináší často rozporuplný obraz. S velkou pravděpodobností se ale neurogeneze účastní správného fungování separace vzorců a dlouhodobé relační paměti. Pro hlubší objasnění problematiky je třeba dalších prací a zejména spolehlivé metody ablace a stanovení neurogeneze.

Klíčová slova: neurogeneze, prostorová navigace, paměť

Abstract

Hundreds to thousands of new granule neurons are born every day in the hippocampus within the whole life. In spite of intensive research of the last decades, their function remains unclear. Their participation in spatial memory and the ability of orientation is assumed. Results from behavioral tests like the Morris water maze, the radial maze and many other testing tasks, are often contradictory. Nevertheless, it is highly probable that neurogenesis plays a role in pattern separation and long-term relational memory. Further studies and especially reliable methods of ablation and detection are required for deeper insight into this issue.

Key words: neurogenesis, spatial navigation, memory

Seznam použitých zkratek:

APA	aktivní vyhýbání se místu (<i>active place avoidance</i>)
BrdU	bromodeoxyuridin
CFC	kontextuální strachové podmiňování (<i>contextual fear conditioning</i>)
CFD	kontextuální strachové rozlišování (<i>contextual fear discrimination</i>)
CNS	centrální nervová soustava
CR	podmíněná odpověď (<i>conditioned response</i>)
CS	podmíněný stimulus (<i>conditioned stimulus</i>)
DG	gyrus dentatus (<i>dentate gyrus</i>)
DMTS, DMP	<i>delayed-matching-to-sample, delayed-matching-to-place</i>
DNMTS	<i>delayed-non-matching-to-sample</i>
Dox	doxycyklin
GCV	gancyklovir
GFAP	gliální fibrilární kyselý protein (<i>glial fibrillary acidic protein</i>)
HFD	potrava s vysokým obsahem tuků (<i>high-fat diet</i>)
ITI	mezifázový interval (<i>inter-trial interval</i>)
LTP	dlouhodobá potenciace (<i>long-term potentiation</i>)
MAM	metylazoxymetanolacetát
MRI	magnetická rezonance (<i>magnetic resonance imaging</i>)
MRS	magnetická rezonanční spektroskopie (<i>magnetic resonance spectroscopy</i>)
MWM	Morrisovo vodní bludiště (<i>Morris water maze</i>)
NOR	rozeznávání nových objektů (<i>novel object recognition</i>)
PET	pozitronová emisní tomografie
PM	křížové bludiště (<i>plus maze</i>)
RAM	radiální bludiště (<i>radial maze</i>)
SEL	subependymální vrstva (<i>subependymal layer</i>)
SGZ	subgranulární zóna
SSRI	selektivní inhibitor zpětného vychytávání serotoninu (<i>selective serotonin reuptake inhibitor</i>)
SVZ	subventrikulární zóna
TK	tymidinkináza
TMZ	temozolomid
US	nepodmíněný stimulus (<i>unconditioned stimulus</i>)
VCL	jádro vokálního centra (<i>vocal control nucleus</i>)

OBSAH:

1. Úvod.....	6
2. Historie výzkumu neurogeneze v dospělém mozku.....	6
3. Blokáda neurogeneze.....	7
3.1. Chemická blokáda.....	8
3.2. Ozáření.....	8
3.3. Genetické manipulace.....	9
4. Modulace neurogeneze.....	9
4.1. Stres.....	9
4.2. Věk.....	10
4.3. Strava.....	10
4.4. Fyzická a psychická aktivita.....	11
4.5. Antidepresiva.....	11
5. Metody stanovení neurogeneze.....	12
6. Neurogeneze a prostorová navigace.....	13
6.1. Morrisovo vodní bludiště.....	13
6.1.1. MWM a neurogeneze.....	15
6.2. Radiální bludiště.....	16
6.2.1. RAM a neurogeneze.....	17
6.3. Kontextuální strachové rozlišování	18
6.3.1. CFD a neurogeneze.....	18
6.4. Aktivní vyhýbání se místu.....	19
6.4.1. APA a neurogeneze.....	19
6.5. Rozeznávání nových objektů.....	20
6.6. Prostorové rozpoznávání	21
7. Závěr.....	22
8. Seznam použité literatury.....	23

1. Úvod

Jev neurogeneze (tvorby nových neuronů) v dospělosti je u savců znám teprve relativně krátkou dobu. Do šedesátých let dvacátého století, kdy se objevily první práce naznačující její existenci (Altman, 1962), byla obecně uznávaná představa, že se nové neurony během života v mozku netvoří. Od doby svého objevu se postupně neurogeneze v dospělém mozku stala intenzivně zkoumaným fenoménem podněcujícím k bádání vědce po celém světě. Velkou vlnu zájmu zaznamenala hlavně poté, co byla tvorba nových nervových buněk objevena i v mozku lidském. Na převážně savčích modelech byly objeveny dvě hlavní oblasti v mozku, kde neurogeneze prokazatelně probíhá i po narození. Jde o subventrikulární zónu (SVZ) postranních komor koncového mozku, ležící těsně pod vrstvou endymových buněk, a subgranulární zónu (SGZ) *gyrus dentatus* (angl. *dentate gyrus*, DG) v hipokampu. S velkou pravděpodobností jsou obě neurogenní místa pozůstatkem původních prenatálních zárodečných míst. Zůstávají zde progenitorové buňky, které posléze migrují a diferencují se. Ze SVZ putují do čichového laloku tzv. rostrálním migračním proudem (angl. *rostral migratory stream*), kde se podílejí na čichovém rozlišování, uvažuje se i o jejich reparačních schopnostech v oblastech nacházejících se v blízkosti SVZ. Ze SGZ cestují jen na krátkou vzdálenost - do granulární vrstvy DG, kde je předpokládán jejich podíl na schopnostech učení a paměti, přesná úloha nových buněk v hipokampálních funkcích však není ještě zcela jasná. Mimoto je zkoumána i role neurogeneze v neurodegenerativních onemocněních, jako je například Huntingtonova nemoc, Alzheimerova choroba nebo deprese, které by mohly být spojené se změnou hladiny neurogeneze.

V této práci bych se chtěla zaměřit na hipokampální neurogenezi v SGZ a její vliv na prostorové učení a orientaci a shrnout dosavadní poznatky v této oblasti.

2. Historie výzkumu neurogeneze v dospělém mozku

Do roku 1962, kdy Joseph Altman vydal svou práci, byly všechny cytologické záznamy o dělících se buňkách v mozku považovány za prekursorů gliových buněk. Altman použil metodu autoradiografického značení dělících se buněk pomocí thymidinu- H^3 , který se inkorporuje pouze do DNA nově vznikajících buněk. Ve svém pokusu pozoroval kromě označených gliových buněk i menší množství označených neuronů. V následujících letech byly stejným způsobem identifikovány značené granulární buňky v DG a v mozkových komorách byly v endymální i subendymální vrstvě nalezeny buňky s mitotickými figurami (Altman & Das, 1965). Povaha pozorovaných nově vzniklých buněk však nebyla

prokázána jinak než světelně mikroskopickou cestou, a tak myšlenka vzniku nových neuronů v mozku zůstala neprokázána.

K dalšímu posunu došlo až v roce 1983, kdy Nottebohm a Goldman zkoumali příčinu zvětšení jádra vokálního centra (angl. *vocal control nucleus*, VCL) u kanárčích samic, kterým byl podáván testosteron (Goldman & Nottebohm, 1983). Spolu se zvětšením VCL se u těchto samic projevovala změna způsobu zpěvu – ze samičího na samčí. Ve studii bylo zjištěno, že ve VCL vznikají nové buňky a ultrastrukturální analýzou těchto buněk bylo potvrzeno, že se skutečně jedná o neurony. Představa neurogeneze v dospělém mozku byla od té doby všeobecně přijata a postupně byla objevena i u dalších obratlovců jako např. rejsek (Gould et al., 1997), kosman (Gould et al., 1998) či makak (Eckenhoff & Rakic, 1988).

Velký zlom nastal v roce 1998, kdy Eriksson prokázal neurogenezi v dospělém lidském mozku (Eriksson et al., 1998). Pracoval s posmrtně odebranou mozkovou tkání pěti pacientů s rakovinou, kterým byl v rámci léčby aplikován analog thymidinu, bromodeoxyuridin (BrdU), pro diagnostické účely. Imunohistochemicky pak byly BrdU značené neurony nalezeny v SGZ a v oblasti *hilus* v hipokampu, v SVZ byly pozorovány progenitorové buňky neuronů. Curtis posléze prokázal, že nové buňky v subependymální vrstvě (angl. *subependymal layer*, SEL) vykazují fenotyp gliových buněk nebo neuronů (Curtis et al., 2003).

Kromě toho bylo zjištěno, že se tyto buňky v některých funkčních vlastnostech odlišují od ostatních granulárních buněk. Zejména se odlišují sníženým prahem indukce dlouhodobé potenciace (angl. *long-term potentiation*, LTP) a zvýšenou excitabilitou, čímž významně ovlivňují míru synaptické plasticity, protože je předpokládána role těchto nových neuronů v získávání nových paměťových stop (Schmidt-Hieber et al., 2004). Vlastnosti jako snížený práh pro LTP a její vyšší amplituda se však vyskytuje jen v určitém časovém okénku od vzniku nového neuronu (Ge et al., 2007).

3. Blokáda neurogeneze

Výzkum neurogeneze a její funkce v organismu se provádí převážně pomocí jejího blokování a pozorování následků těchto zásahů na hipokampální funkce. K experimentálnímu zablokování neurogeneze se používají dva hlavní přístupy – blokáda chemickou cestou nebo ozářením. K těmto metodám se v poslední době přidala ještě třetí, požívání transgenních modelových organismů, u kterých je neurogeneze potlačena pomocí genové manipulace

(Dupret et al., 2008). Poslední jmenovaná metoda má výhodu větší selektivity a menšího nespecifického poškození mozku.

3.1. Chemická blokáda

Dlouhou dobu bylo k potlačení neurogeneze používáno antimitotické činidlo metylazoxymetanolacetát (MAM) (Shors et al., 2001). MAM působí jako alkylační agens, které má selektivní cytotoxické účinky na dělící se buňky (Johnston & Coyle, 1979). Později však byly prokázány výrazné vedlejší účinky podávání MAM – zvířata trpí kachexií, hypoaktivitou a jsou stížena poruchami rovnováhy (Dupret et al., 2005). Proto začaly být používány alternativní látky jako například temozolomid (TMZ) (Garthe et al., 2009), který má výhodu nižší toxicity. Jde o látku, která se ve fyziologických podmínkách konvertuje na účinné methylační činidlo (Quinn, 2003), jehož působení vede k apoptóze dělících se buněk. TMZ byl původně používán pro terapii nádorů centrální nervové soustavy (CNS) (Lashkari et al., 2011; Vera, 2004).

3.2. Ozáření

Ozařování rentgenovými paprsky bylo použito už Altmanem v počátcích výzkumu neurogeneze (Bayer et al., 1973; Gazzara & Altman 1981). Používá se jak ozařování rentgenovými paprsky, tak paprsky gama (Wang et al., 2005). Vzhledem k tomu, že je používáno k léčbě mozkových nádorů, během kterého dochází k poruše kognitivních funkcí (zejména u dětí) (Ellenberg et al., 1987), je efekt ozařování ionizujícími paprsky intenzivně zkoumán. Zároveň jsou hledány způsoby, jak poškození během terapií minimalizovat. Jako částečná obrana se zdá být vhodné podávání antioxidantů (Motomura et al., 2010; Oh et al., 2012).

Poškození neurogeneze nastává po ozáření na několika úrovních: navození apoptózy (Peissner et al., 2000), snížení buněčné proliferace a snížení diferenciaci neurálních kmenových buněk hipokampu v granulární neurony (Monje et al., 2002). Studie Monjeho a kolektivu ukazuje, že ozářením dochází ke zničení neurogenního mikroprostředí (zahrnující narušení tvorby kapilár nutných pro neurogenezi v dospělém mozku a zvýšení počtu a větší aktivaci mikroglíi), takže ani transplantace neozářených kmenových buněk nestačí k obnově neurogeneze. Metoda ozáření není ideální, neboť, jak uvádí Tada, jsou na ozáření citlivé i neproliferující buňky a po aplikaci paprsků částečně také podléhají apoptóze (Tada et al., 2000).

3.3. Genetické manipulace

Použití genetických manipulací umožňuje, na rozdíl od výše uvedených způsobů ablace, odstranit neurogenezi ve zralém hipokampu úplně. Hojně rozšířenou metodou genetické ablace je například tvorba transgenního organismu, který exprimuje tymidinkinázu (TK) viru *Herpes simplex* pod kontrolou promotoru pro gliální fibrilární kyselý protein (angl. *glial fibrillary acidic protein*, GFAP), který je markerovým proteinem neuronálních prekurzorů. V přítomnosti antivirotického agens gancykloviru (GCV) pak buňky produkující TK podléhají buněčné smrti, neboť metabolizují GCV na toxické nukleotidové analogy (Morshead et al., 2003). Odlišný způsob představuje indukovaná delece genu pro TLX receptor, který je normálně přítomný u neurálních kmenových buněk (Zhang et al., 2008). Další příklady genetické ablace neurogeneze jsou uvedeny níže v textu.

4. Modulace neurogeneze

Neurogeneze ve zralém hipokampu je velmi komplexně regulovaný proces. Na její modulaci se podílí mnoho faktorů, díky čemuž jsou obtížně rozeznatelné rozsahy jejich působení, neboť se často překrývají. Mezi nejvýznamější a nejlépe prozkoumané složky modulace neurogeneze patří fyzická a psychická aktivita, stres, deprese a věk.

4.1. Stres

Jako hlavní negativní regulátor neurogeneze bývá uváděn stres – a to jak akutní, tak chronický (Heine et al., 2004). Nejedná se jen o stres fyzický, ale i psychický. Stresorů vyvolávajících pokles neurogeneze je celá řada. Mimo jiné mezi ně patří stres psychosociální (Gould et al., 1997), který byl testován u rejsků – klece dvou samců byly spojeny, čímž byly navozeny podmínky k ustavení vztahu dominance a podřízenosti. U podřízených rejsků pak byl zaznamenán pokles neurogeneze. Podobné pokusy byly provedeny i s primáty, konkrétně s kočkodany (Gould et al., 1998), ve výsledcích opět stresovaná zvířata vykazovala snížení neurogeneze.

Některé práce naznačují, že citlivost na stres je závislá na pohlaví (Falconer & Galea, 2003). V této studii byli vystaveni pachovému stresoru potkaní jedinci obou pohlaví, u samic však nebyla, na rozdíl od samců, detekována žádná změna neurogeneze. Zatím však není zcela jasné, zda tento efekt není způsoben jen rozdílem v rychlosti reakce na stresor u obou pohlaví.

Další otázkou týkající se vlivu stresu je délka trvání jeho inhibičního působení. Potkani, jejichž matky byly vystaveny stresu během březosti, vykazovali sníženou hladinu neurogeneze až do dospělého věku (Lemaire et al., 2000), zatímco vystavení stresu v pozdějších vývojových stádiích vedlo k pouze přechodnému snížení neurogeneze (Tanapat et al. 2001; Malberg & Duman 2003; Heine et al. 2004).

Ačkoli je jasné, že ovlivnění stresem je komplexní proces probíhající na mnoha úrovních, bývají za jeden z hlavních činitelů považovány stresové hormony – glukokortikoidy, jejichž snížení pomocí adrenalectomie vedlo k vyšší proliferaci neuronů v oblasti gyrus dentatus (zároveň však došlo i k zvýšení buněčné smrti). Naopak podávání kortikosteronu neurogenезi snížilo (Cameron & Gould 1994). Existují ovšem i práce, ve kterých se hladina kortikosteroidů na hodnotě neurogeneze nijak neprojevila. Zdroj těchto rozporů (společně s nejednoznačným rozdílem účinku různých typů stresu) zatím zůstává nejasný (Pham et al., 2003; Van der Borght et al., 2005).

4.2. Věk

Dalším významným faktorem podílejícím se na snížení neurogeneze je stáří organismu. Změny neurogeneze probíhají po celý život. Poté, co dosáhne svého vrcholu několik týdnů po narození, začne úroveň neurogeneze klesat, nejvýrazněji během dospívání (Altman & Das, 1965). Řada studií ukazuje, že snižování neurogeneze probíhá dál i během období senescence (Kempermann et al., 1998; Kuhn & Gage, 1996; Seki & Arai, 1995). Zdá se, že k tomuto poklesu nejvíce přispívá snížení proliferčních schopností progenitorových buněk (Hattiangady & Shetty, 2008; Kuhn & Gage, 1996), který by mohl být způsoben změnou okolního mikroprostředí.

4.3. Strava

Relativně nedávné práce naznačují, že na sílu neurogeneze v hipokampu by mohlo mít vliv i složení stravy. Existuje evidence, která poukazuje na vliv kalorické restrikce, jež snižuje úmrtnost nových granulárních neuronů, čímž zvyšuje jejich výsledný počet (Lee et al., 2000). Mimoto se ukazuje i to, že příjem potravy s vysokým obsahem tuků (angl. *high-fat diet*, HFD) způsobuje snížení neurogeneze u potkanů (Lindqvist et al., 2006). Toto snížení nebylo spojeno s nárůstem tukové tkáně (strava byla navržena tak, aby potkani netloustli), vyskytovalo se ovšem společně se zvýšenou hladinou kortikosteronu. Ze stejné studie rovněž vyplývá, že samice a samci reagují na HFD odlišným způsobem. Zatímco u samců došlo k

signifikantnímu zvýšení hladiny kortikosteronu, u samic k žádné změně nedošlo, přesto byla jejich hladina neurogeneze nižší bez ohledu na stravu. Tyto poznatky by mohly nabývat na důležitosti, vzhledem k rozšířené módě váhu redukujících metod založených na příjmu tuků a proteinů.

Efekt HFD se zdá být určován navíc i stářím živočicha, kterému je tato strava podávána. V práci Boitarda a kolektivu byla popsána závislost poškození některých paměťových funkcí a snížení hipokampální neurogeneze na věku potkanů, kteří byly HFD vystaveni (Boitard et al., 2012). Potkani, kteří byli vystaveni HFD v období adolescence, měli sníženou hladinu neurogeneze, zatímco u dospělých potkanů se již účinek HFD neprojevil.

4.4. Fyzická a psychická aktivita

Pohyb a psychická aktivita (a to jak ve smyslu přímého učení i vystavení komplexnímu prostředí) působí na neurogenezi pozitivně, zvyšují ji (Fan et al., 2007; Gould et al., 1999; Kempermann et al., 1997; van Praag et al., 1999). Jejich mechanismus působení se však liší, a to i v cílových buňkách, které oba jevy ovlivňují. Zatímco fyzická aktivita podporuje proliferaci progenitorových buněk, psychické stimuly působí na nové neurony nacházející se v raných stádiích diferenciaci a prodlužují dobu jejich přežití (Ambrogini et al., 2000; Kronenberg et al., 2003). Oba tyto efekty mají dohromady aditivní vlastnosti (Fabel et al., 2009).

Z těchto poznatků vyvodil Kempermann tzv. hypotézu neurogení rezervy (Kempermann, 2008). V této hypotéze předkládá představu (podporovanou aditivitou fyzické a psychické aktivity), že úroveň neurogeneze je optimalizována dle nároků, které jsou na organismus dlouhodobě kladeny. V těle se podle Kempermanna tvoří „neurogení rezerva“ progenitorových buněk, jejíž velikost je závislá na předchozí aktivitě. Později pak lze kompenzovat nedostatečnost této rezervy pouze částečně (Kempermann et al., 1998). Tento mechanismus by umožnil neplýtvat energií na tvorbu neuronů, které by pak nebyly využity, a přizpůsobit hladinu neurogeneze předpokládané náročnosti podnětů, se kterými se organismus pravděpodobně setká. Pro ověření hypotézy neurogení rezervy je nutný ještě další, rozsáhlejší výzkum této problematiky.

4.5. Antidepresiva

Antidepresiva působící jako selektivní inhibitor zpětného vychytávání serotoninu (angl. *selective serotonin reuptake inhibitor*, SSRI) - jako například fluoxetin - byla rozeznána

jako další prostředek podporující hipokampální neurogenezi (Malberg et al. 2000) a to nejen vlivem na proliferaci progenitorových buněk ale i zvýšením doby přežití nových neuronů . Existují ovšem i studie, které účinky antidepressiv nepotvrzují (Cowen et al., 2008). Navzdory rozporným výsledkům byla rozvinuta tzv. neurogenní hypotéza deprese, mimo jiné právě i na základě účinků antidepressiv na neurogenezi (Sapolsky, 2004).

5. Metody stanovení neurogeneze

Historicky se k určení neurogeneze používala metoda značení dělicích se buněk pomocí tymidinu obsahujícího tritium ($[^3\text{H}]$ -tymidin) a následné autoradiografie. Tímto způsobem byla neurogeneze ve zralém hipokampu vůbec poprvé zaznamenána (Altman & Das, 1965; Altman, 1962). Tento postup byl ovšem relativně zdlouhavý, protože se začal používat jiný analog tymidinu, 5-bromo-2'-deoxyuridin (BrdU), který lze detekovat imunohistochemicky pomocí monoklonálních protilátek a je běžně využíván dodnes (Gratzner, 1982). Použití BrdU má i další výhody – práce bez radioaktivity a možnost detekce v relativně tlustých řezech mozkové tkáně.

Ani BrdU však není úplně bezproblémovým nástrojem výzkumu neurogeneze. BrdU totiž dokáže vizualizovat pouze buňky během S-fáze buněčného cyklu (při nové syntéze DNA) (Cameron & McKay 2001). Mimoto některé výzkumy naznačují, že by BrdU mohl mít negativní účinky na neurogenezi. Ve vyšších koncentracích má totiž BrdU selektivně toxické účinky na neurony v *in vitro* podmínkách v nichž při koncentraci větší než 0,2 μM spouští apoptózu (Caldwell et al., 2005). Cytotoxický efekt ovšem nebyl potvrzen *in vivo*, kde vyšší dávky BrdU nijak nesnižovaly neurogenezi (Hancock et al., 2009). Tento rozpor by mohl být způsoben porušením normálních metabolických pochodů v *in vitro* zkoumaných tkáních, které jsou tak vystavovány vyšším koncentracím BrdU než reálně doputuje k tkáni v systému *in vivo*.

Kromě výše uvedených postupů se pracuje i na vývoji metod pro stanovení neurogeneze *in vivo*, pomocí kerých by bylo možné sledovat neurogenezi jedince v delším časovém úseku. Mezi tyto metody patří například pozitronová emisní tomografie (angl. *positron emission tomography*, PET), při které se jako značící látka využívá tymidinový analog ^{18}F -fluortymidin (^{18}F -FLT) (Rueger et al., 2010). Dále je ke sledování neuronálních prekurzorů užívána metoda magnetické rezonance (angl. *magnetic resonance imaging*, MRI) a magnetická rezonanční spektroskopie (angl. *magnetic resonance spectroscopy*, MRS), kterou lze využít i v lidském živém mozku (Manganas et al., 2007). Výhodu menších nákladů

pak mají metody optického zobrazování – fluorescence, jež je založena na expresi fluorescenčních proteinů ovládané promotorem pro některý markerový protein (například nestin) (Yamaguchi et al., 2000), a bioluminiscence, spočívající v expresi enzymu luciferázy rovněž za použití specifického promotoru (Couillard-Despres et al., 2008).

6. Neurogeneze a prostorová navigace

Předpokládaná role neurogeneze v hipokampálních funkcích učení a paměti se nejčastěji testuje v prostorově-orientačních úlohách. Jedná se zejména o tzv. Morrisovo vodní bludiště (angl. *Morris water maze*, MWM), radiální bludiště (angl. *radial maze* nebo *radial-arm maze*, RAM), kontextuální strachové podmiňování (angl. *contextual fear conditioning*, CFC), úlohu aktivního vyhýbání se místu (angl. *active place avoidance*, APA) a celou řadu dalších. Následující text rozebírá, jaké poznatky z tohoto testování vyplývají a co z nich lze vyvozovat o funkci nově vznikajících neuronů v hipokampu.

6.1. Morrisovo vodní bludiště

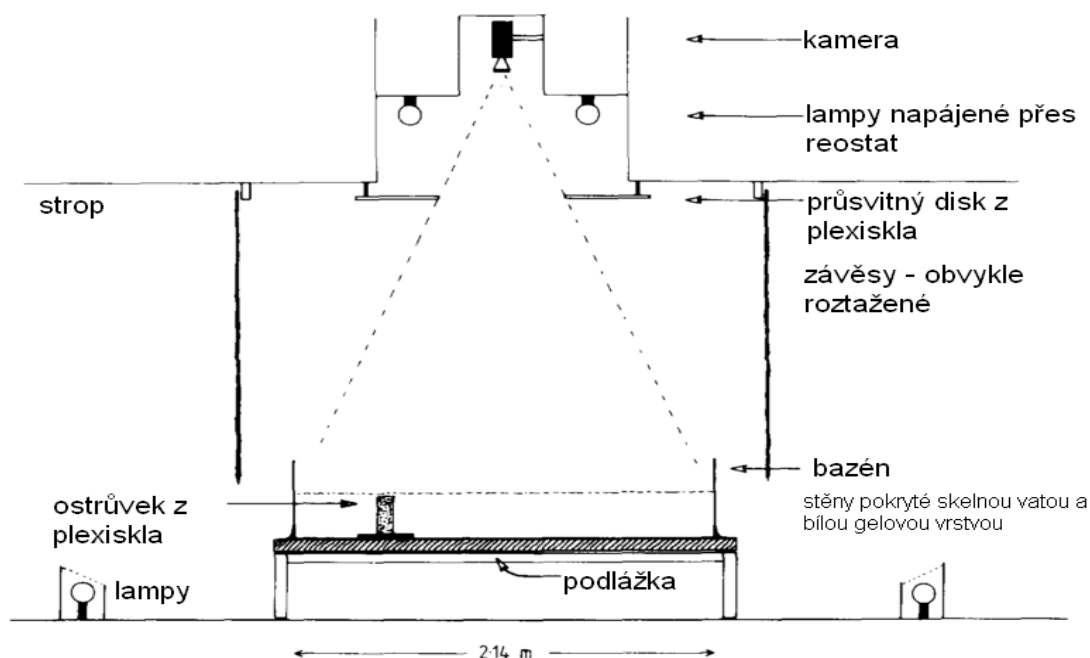
Morrisovo vodní bludiště je v současnosti snad nejpoužívanějším prostředkem k testování prostorové orientace a paměti. Navrženo bylo Richardem Morrisem, který ho využíval ke srovnávání orientace podle proximálních a distálních orientačních bodů (Morris 1981; Morris 1984). Jde o kruhový bazén o průměru kolem 1,5-2 m naplněný vodou, pod jehož hladinou se skrývá malý ostrůvek. Voda je zneprůhledněná (například bílou netoxickou temperou (Winocur et al., 2006)), takže poloha ostrůvku ve vodě není rozeznatelná. Pokusné zvíře (většinou potkan) je vypuštěno do bazénku, kde se snaží najít ostrůvek a doplavat k němu. V bazénku nejsou žádné orientační body, a tak se zvíře musí řídit orientačními body vzdálenými (tzv. alotetická orientace), z nichž si při učení vytvoří „mapu“, podle které se pak může orientovat nezávisle na tom, odkud bylo vypuštěno do vody (okolí bludiště bývá v klasickém postupu pro zvíře viditelné).

V MWM lze testovat jak dlouhodobou tak krátkodobou paměť – v testu dlouhodobé paměti se poloha ostrůvku mezi denními sezeními nemění, naopak při zkoumání paměti krátkodobé se ostrůvek mezi sezeními přemísťuje. Jelikož jsou potkani od přírody dobří plavci, nezpůsobuje jim pobyt v bazénku nadměrný stres.

Při testování lze měřit různé parametry – nejčastěji doba od vypuštění zvířete do vody po nalezení ostrůvku nebo (po odstranění ostrůvku) procento času, kdy se zvíře zdržuje v

kvadrantu bazénu, kde byl ostrůvek původně umístěn (tzv. *probe trial*). Druhý způsob eliminuje zkreslení výsledků, pokud se zvířata naučí používat nějakou strategii hledání (například plavat do kruhu v určité vzdálenosti od okraje bazénku) díky níž si nemusí pamatovat polohu ostrůvku (Spooner et al., 1994).

Při zkoumání pracovní, krátkodobé paměti se používají metody tzv. *delayed-matching-to-sample* (či *place*) (DMTS, DMP) a *delayed-non-matching-to-sample* (DNMTS). Oba postupy jsou založené na dvou fázích. První, informační fáze je po různě dlouhé pauze (angl. *inter-trial interval*, ITI) následována tzv. fází zkušební (*sample phase*), kde zvíře má buď vybrat stejnou možnost jako ve fázi první (při DMS), nebo naopak vybrat možnost odlišnou (při DNMTS). DMTS i DNMTS se používá nejen v MWM ale i v dalších úlohách jako je T-bludiště či bludiště radiální (Koehl & Abrous, 2011). V MWM je nejčastěji používáno DMP, kdy má zvíře za úkol nalézt ostrůvek poté, co ho při předchozí plavbě našlo náhodou či k němu bylo dovedeno experimentátorem. Při DNMTS v MWM je ostrůvek při první plavbě prezentován společně s určitým stimulem naznačujícím jeho polohu. V druhé plavbě je pak představen kromě tohoto stimulu ještě stimulus nový a zvíře musí plavat právě k tomuto novému stimulu, aby ostrůvek našlo (Winocur et al., 2006).



Obr. 1. Nákres MWM, pohled z boku (Podle Morris, 1984)

6.1.1. MWM a neurogeneze

Souvislost neurogeneze a prostorového učení a paměti byla testována pomocí MWM na základě přirozených rozdílů v tvorbě nových neuronů u starších potkanů. V těchto studiích nebyla prokázána žádný pozitivní vliv neurogeneze na učení (Bizon & Gallagher 2003), někdy dokonce vykazovali potkani s nižší hladinou neurogeneze výkony v MWM lepší (Bizon et al., 2004). Existují ovšem i studie s opačnými výsledky (Drapeau et al., 2003), kde kognitivní schopnosti a výkon v MWM kvantitativně korelovaly s počtem nově vznikajících neuronů SGZ. Interpretaci znesnadňuje fakt, že tyto protichůdné výsledky byly získány na odlišných kmenech laboratorních potkanů navíc za použití rozdílných dávek BrdU při značení nových neuronů.

Další výzkum se ubíral cestou blokování neurogeneze a následným sledováním výkonů v MWM. Výsledky však nejsou jednoznačné ani zde. Některé starší práce (Shors et al., 2002) používající blokádu neurogeneze pomocí MAM neprokázaly žádnou korelaci mezi úbytkem neurogeneze a výkonem v MWM a to ani v testu probe trial, který probíhal den po konci tréninku. Novější studie ovšem trochu ukazují jiné výsledky (Goodman et al., 2010). V Goodmanově pokusu se sice myším s MAM poškozenou neurogenézí zkracovala doba k nalezení ostrůvku stejně jako myším kontrolním během tréninku, v úloze probe trial již byly patrné rozdíly. Myši byly poškozené ve vybavování polohy ostrůvku po uplynutí jednoho i třiceti dnů od konce tréninku. Vzhledem k tomu, že redukce neurogeneze se mezi studii liší (ač obě používají k blokování neurogeneze MAM), je tato nesrovnalost obtížně vyložitelná.

Při testování DNMTS postupu v MWM (Winocur et al., 2006), kdy byl ostrůvek vždy umístěn buď pod bílým či černým válcem a potkan měl za úkol ho hledat pod tím válcem, který nebyl prezentován při předchozí plavbě, byl sledován především podíl nových neuronů na epizodické paměti. Zde byly výsledky potkanů s ozářením sníženou neurogenézí horší než u kontrol, ale pouze v případě, že ITI byl delší než jedna minuta.

V jiném pokusu s ozařováním různě časově vzdáleným od tréninku i od pozdějšího testování v MWM bylo znovu potvrzeno, že snížení neurogeneze nemá vliv na zvládnutí tréninku v MWM, ale zřejmě hraje důležitou roli při vybavování prostorových informací po delší době (Snyder et al., 2005). V této práci vykazovali ozářeni potkani výrazně horší výsledky v testu probe trial po dvou a po čtyřech týdnech od tréninku v bludišti, což naznačuje možnou roli nových neuronů v dlouhodobé prostorové paměti. Ozařováním v různých časových vzdálenostech od testování bylo navíc zjištěno, že pro fungování dlouhodobé prostorové paměti jsou významné převážně neurony staré 4-28 dní. Není však jasné, zda jsou podstatné pouze pro vybavování informací nebo i pro jejich získávání.

Přetrvávajícím úskalím těchto prací však stále byla malá specifita blokování neurogeneze a z ní plynoucí obtíže s interpretací výsledků a opakovatelností pokusů. Začalo se tedy využívat vytváření transgenních organismů se specificky blokovanou neurogenézí. Dupret a jeho kolektiv vyvinuli nový způsob blokování neurogeneze pomocí nadměrné exprese proapoptického proteinu Bax specificky lokalizované do neuronálních prekursorů (Dupret et al., 2008). Bax je významný protein zprostředkující smrt nových neuronů, která normálně postihuje až téměř šedesát procent nově vzniklých buněk (Dayer et al., 2003). Následné testování ukázalo, že potkani bez neurogeneze mají výrazně narušenou prostorovou vztahovou paměť, která je pro alotetickou orientaci (a tedy i pro zdárné učení se v MWM) nezbytná.

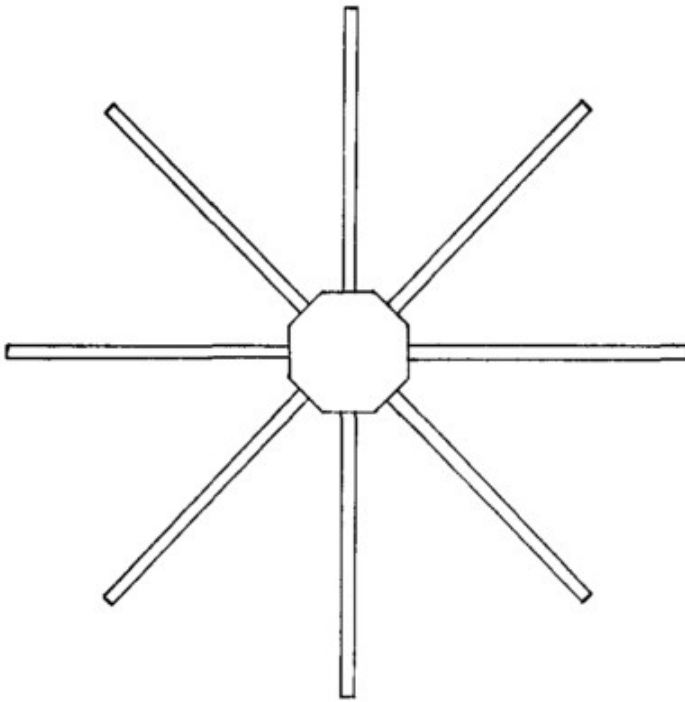
Obdobně vyhlížející výsledky přinesla i další práce s geneticky manipulovanými organismy. Myši, kterým byla urychlena diferenciací progenitorových buněk pomocí nadměrné exprese prodiferenčního genu *PC3* (pročež myši postrádaly „mladé“ neurony a jejich specifické vlastnosti), také vykazovaly zřetelné poruchy při učení v MWM (Farioli-Vecchioli et al., 2008). Výsledky Farioli-Vecchioliho a jeho kolektivu ukazují, že pro nabývání nových prostorových záznamů i pro využití dříve nabytých informací jsou klíčové neurony 3 až 4 týdny staré.

Pokus s blokováním WNT signalizace v DG, které rovněž způsobuje blokování neurogeneze (Lie et al., 2005), opět nepotvrdil rozdíl v učení v MWM u potkanů s poškozenou neurogenézí, ale ukázal jejich zmenšenou schopnost vybavení si prostorové informace po 2-8 týdnech (Jessberger et al., 2009). V této studii však byla neurogeneze opět blokována pouze částečně.

6.2. Radiální bludiště

RAM je další z klasických behaviorálních úloh pro testování prostorové orientace, paměti a učení. Od doby, co bylo představeno Oltonem a Samuelsonem (Olton & Samuelson, 1976), byla vyvinuta řada upravených verzí – mezi nejznámější patří tzv. křížové bludiště (angl. *plus maze*, PM) (Zeldin & Olton, 1986). Klasické RAM je tvořeno centrální platformou kruhového půdorysu, ze které vybíhá osm identických ramen (v PM jsou pouze čtyři), na jejichž konci je umístěna potravinová návnada. Zvíře v bludišti hledá potravu, testuje se kolikrát udělá chybu, tedy kolikrát navštíví jedno rameno více než jednou. RAM je obvykle otevřené, přičemž v okolí je dostatek záchytných orientačních bodů, a zvíře se tedy orientuje především aloteticky.

V bludišti je možné opět testovat jak paměť pracovní (pokud je potrava ve všech ramenech) i paměť dlouhodobou (jestliže je potrava opakovaně jen v určitých ramenech a sleduje se, kolikrát navštíví zvíře prázdné rameno) (Olton & Paras, 1979).



Obr. 2. Nákres RAM, půdorys (Podle Olton a Samuelson, 1976)

6.2.1. RAM a neurogeneze

Separace vzorců (angl. *pattern separation*) zakládá schopnost živočicha rozlišovat dva velmi podobné stimuly, které jsou prezentovány v těsné blízkosti (a to jak prostorové, tak časové), a tvořit jejich jasně oddělenou paměťovou reprezentaci. Z práce Clellanda a kolektivu vyplývá, že tato schopnost závisí právě na neurogenezi ve zralém hipokampu (Clelland et al., 2009). V jeho pokusu byla myším poškozena neurogeneze ozářením, posléze byly testovány v RAM. Zde bylo pozorováno, že ozářené myši mají zachovanou schopnost dobře odlišit dvě ramena, která jsou dostatečně daleko od sebe (oddělená třemi až čtyřmi rameny), ne však pokud jsou ramena blízko sebe (jsou mezi nimi jen dvě další ramena). Existují ale i práce, které dokládají pravý opak (Saxe et al., 2007). Zde měly myši s poškozenou neurogenezí v RAM výsledky srovnatelné s výsledky kontrolních myši, když měly rozlišit dvě ramena těsně vedle sebe. Pokud však byla první, informační fáze oddělena od fáze zkušební pauzou delší než 30 sekund, byl výkon myši bez neurogeneze dokonce lepší. Tyto nesrovnalosti by mohly být způsobeny opět odlišnými způsoby blokování neurogeneze, které zajišťují její pouze částečný úbytek. Ve výše zmíněné práci Farioli-Vecchioliho se

zrychlenou diferenciací progenitorových buněk neuronů, kde by měl být tento problém minimalizován, byly u takto manipulovaných myší výsledky v RAM zřetelně horší než u kontrol (Farioli-Vecchioli et al., 2008).

6.3. Kontextuální strachové rozlišování

Kontextuální strachové rozlišování (angl. *contextual fear discrimination*, CFD) je založeno na kontextuálním strachovém podmiňování (CFC), kde jako podmíněný stimulus (angl. *conditioned stimulus*, CS) funguje samotné prostředí (kontext), je dalším užitečným nástrojem výzkumu chování a prostorové orientace. Podstatou CFD je spárování kontextu s nepodmíněným stimulem (angl. *unconditioned stimulus*, UC) vyvolávajícím strach, typicky se používá například elektrická ranka. Reakce na samotný CS – podmíněná odpověď (angl. *conditioned response*, CR) se posléze měří. U CR se sleduje především velikost tzv. freezingu, tedy ztuhnutí vyvolané strachem (Frankland et al., 1998).

6.3.1. CFD a neurogeneze

Poté, co byl navržena myšlenka, že se hipokampální neurogeneze podílí na procesu separace vzorců (Clelland et al., 2009), byl tento jev zkoumán i pomocí CFD (Tronel et al., 2012). V Tronellově studii byla zablokována neurogeneze pomocí genové manipulace, kdy byly progenitorové buňky specificky ničeny nadměrnou expresí výše zmíněného proapoptického proteinu Bax. Specifické lokalizace do prekurzorů neuronových buněk bylo dosaženo přes transkripční faktor rtTA. Ten je pod kontrolou promotoru aktivovaného tetracyklinovým analogem, doxycyklinem (Dox), což zajišťuje indukovatelnost, a nestinovým intronem II enhancerem/promotorem, který zajišťuje specifitu, neboť je exprimován pouze v neuronálních prekurzorech (Dupret et al., 2008). Myši s takto zablokovanou neurogenézí byly testovány na CFD. Ačkoli zpočátku jevily stejnou schopnost rozlišovat dva kontexty s některými společnými znaky, po intenzivním několikanásobném tréninku se ukázalo, že nejsou schopné se ve svém výkonu zlepšit stejnou měrou jako myši kontrolní, které měli neurogenézi neporušenou, přičemž rozdíl od kontrolních myší se zvětšoval s přibývajícím dnem tréninku. Tyto výsledky naznačují, že neurogeneze není nutná pro samotné rozlišování kontextů, ale že výrazně ovlivňuje možnosti jeho zpřesňování. Podobné výsledky byly zaznamenány i v další studii (Sahay et al., 2011), ve které byl proveden i pokus opačný, tedy zvýšení neurogeneze, která vedla ke zvýšení schopnosti rozlišovat při CFD úloze, přičemž nedošlo ke smazání paměťových stop dříve nabytých.

Další možnou funkcí hipokampální neurogeneze je kromě rozlišování kontextů při CFD i role v samotném CFC (Denny et al., 2012). V této studii bylo pozorováno zhoršení v CFC úloze s nástupem 4-6 týdnů po ozáření za účelem likvidace prekursorů nervových buněk. Z toho lze usuzovat, že nové neurony nabývají specifických vlastností důležitých pro CFC právě po uplynutí této doby. Zároveň není jasné, zda se neurogeneze podílí i na vymazání strachových paměťových stop, neboť existuje jak evidence pro (Feng et al., 2001) i proti (Ko et al., 2009).

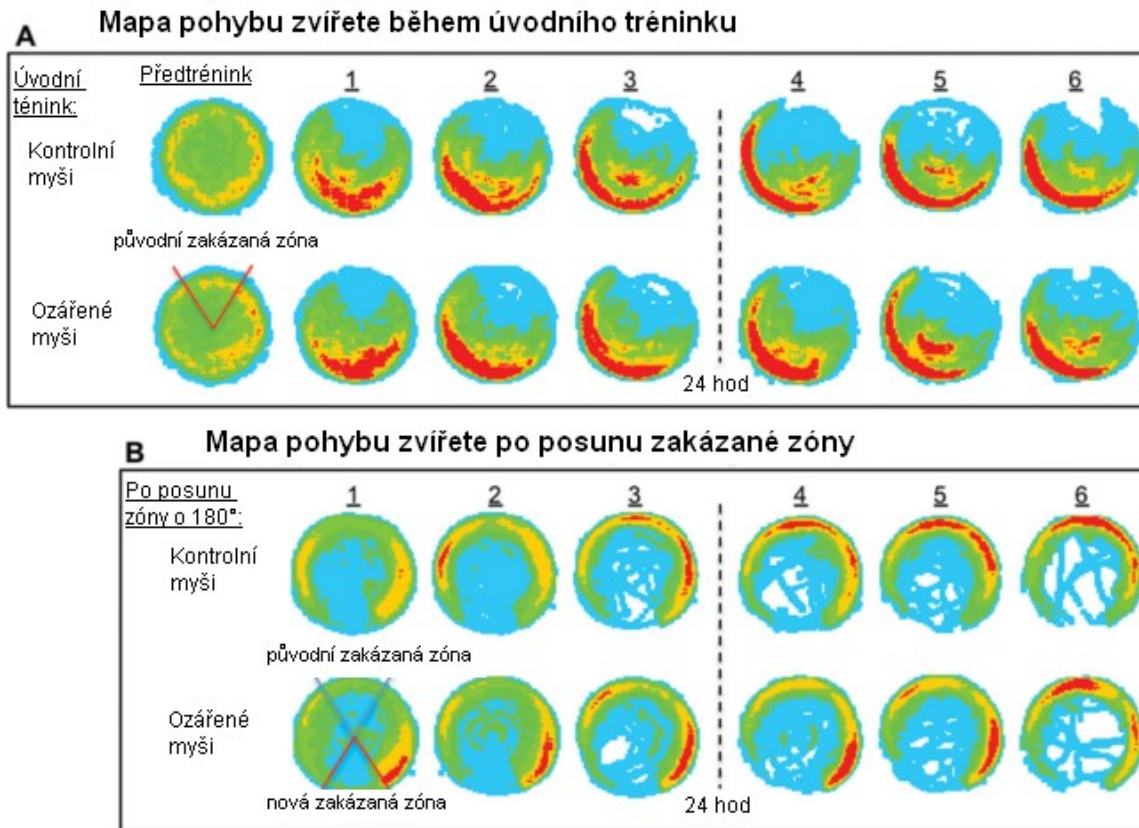
6.4. Aktivní vyhýbání se místu

Úloha APA se používá především k výzkumu vnímání prostoru v různých rámcích, alotetické a idiotetické orientace a jejich vzájemném ovlivňování. Jedná se o kruhovou rotující arénu bez vnitřních orientačních bodů o průměru kolem 80-100 cm, ve které je jisté části vymezený zakázaný úsek. V tomto úseku dostane zvíře, pokud do něj vstoupí, slabou elektrickou ranku. Oblast může být vymezena ve dvou rámcích: v rámci arénky nebo v rámci místnosti, ve které je arénka umístěná. Zvíře tedy, aby se vyhnulo elektrické rance, musí využívat idioteticky nebo aloteticky získané informace a aktivně se pohybovat. Do arénky jsou pravidelně vhazovány potravinové peletky, které zvíře sbírá (je předem vyhladovělé), čímž je zajištěn jeho neustálý pohyb (Bures et al., 1998). V pokusu mohou být přítomny i oba typy zakázaných oblastí najednou (rotující zároveň s arénou i statická vůči místnosti), pak nesahají obě zóny až do středu arény, aby bylo pokusnému objektu možno uniknout bez „potrestání“ (Fenton et al., 1998). APA patří mezi úlohy závislé na hipokampu (Wesierska et al., 2005).

6.4.1. APA a neurogeneze

Při zkoumání funkcí neurogeneze a jejího vlivu na prostorovou orientaci v APA úloze byly testovány myši, kterým byla zablokována neurogeneze pomocí fokálního ozáření a genové manipulace (Burghardt et al., 2012). V této práci byla zkoumána především vztah neurogeneze k tzv. kognitivní flexibilitě – schopnosti operativně měnit využívání dříve nabytých asociací po změně podmínek. Tato schopnost byla u myši s poškozenou neurogenézí viditelně narušena – po úvodním tréninku s jedinou vůči místnosti stabilní zakázanou zónou, ve kterém se tyto myši i kontroly nelišily ve schopnosti učení, byla poloha zakázané oblasti přesunuta o 180°. V dalším testování (conflict trial) pak projevil ozářené a transgenní myši

sníženou kognitivní flexibilitu, neboť se na rozdíl od myši kontrolních vyhýbaly stále oběma zónám, ač v té původní již žádný šok nedostávaly.



Obr. 3. Barevné znázornění rozložení celkového času stráveného v aréně; v modře zbarvených částech strávila pokusná zvířata nejméně času, v červených nejvíce. Horní řádek vždy znázorňuje vždy kontrolní myši, dolní řádek myši ozářené. (A) Úvodní trénink. (B) Testovací fáze se zakázanou zónou posunutou o 180° (conflict trial). (Podle Burghardt et al., 2012)

6.5. Rozeznávání nových objektů

Kromě úloh přímo zaměřených na prostorovou navigaci se zkoumá i problém vztahu neurogeneze na rozeznávání – především rozlišování nových a již dříve prezentovaných podnětů, neboť tato schopnost úzce souvisí se schopností orientovat se v prostoru a tvořit si kognitivní mapu. Úloha rozeznávání nových předmětů (angl. *novel object recognition*, NOR) je založena na přirozeně se vyskytujícím typu chování – prozkoumávání neznámých předmětů. Jedno sezení sestává ze dvou fází. V první fázi je zvířeti v pokusném boxu

prezentována dvojice identických předmětů, které zvíře prozkoumá. Po krátké časové prodlevě následuje nahrazení obou objektů, přičemž jeden je kopií objektů původně prezentovaných a druhý se liší. Nové předměty jsou umístěny stejně jako předměty v předchozí fázi. Sleduje se, kolik času zvíře strávilo prozkoumáváním nového a starého objektu (Ennaceur & Delacour, 1988).

Z testování účinku poškození neurogeneze na výkon v NOR úloze vyplývají opět nejednoznačné výsledky. Ve studii Goodmana byly testovány myši s MAM poškozenou neurogenézí, rozeznávání nového předmětu bylo prováděno jeden den po prezentaci původních předmětů. Nový předmět byl těmito myšmi prozkoumáván ve stejně zvýšené míře jako tomu bylo u myši kontrolních (Goodman et al., 2010). V jiné práci měly dokonce myši se sníženou neurogenézí (ozářením i genetickou ablací) o nový objekt zájem větší než myši kontrolní (Denny et al., 2012). Existuje ovšem i evidence ukazující odlišné výsledky. Ve výše zmíněné Jessbergerově studii s blokováním WNT signalizace se nelišily výsledky potkanů s mírně ani s výrazně poškozenou neurogenézí od kontrol, pokud byl nový objekt prezentován po jedné minutě od první prezentace. Pokud však byl interval mezi oběma fázemi delší (3 hodiny a 4 týdny), byly výkony myši s výrazným poškozením neurogeneze signifikantně horší (Jessberger et al., 2009).

6.6. Prostorové rozpoznávání

Mimo NOR úlohu se k testování rozlišování a zpracování nových podnětů využívá i úloha rozpoznávání prostoru (angl. *spatial recognition*). Tato úloha se provádí v tzv. T-bludišti (angl. *T-maze*). Jde o bludiště se třemi rameny ve tvaru písmene T, ze kterého je vidět do okolí. Na konci jednoho ramene je startovní box oddělený od zbytku bludiště výsuvnou přepážkou. Pokusné zvíře se umístí do startovního boxu, odkud je po jeho prozkoumání vpuštěno do jednoho z postranních ramen T-bludiště. V další fázi se průběh opakuje, ale otevřená jsou obě ramena. Měří se doba prozkoumávání obou ramen. Tato úloha je závislá na hipokampu (Cavoy & Delacour, 1993).

Při testování ozářených potkanů s poškozenou neurogenézí v této úloze byly pozorovány jejich zhoršené výsledky – potkani nedokázali rozlišit nově otevřené rameno. Tuto poruchu ovšem vykazovali pouze relativně krátce, v testu po 42 dnech od ozáření již jejich výsledky odpovídaly výsledkům kontrolních zvířat (Madsen et al., 2003).

7. Závěr

Neurogeneze ve zralém hipokampu je v současné době intenzivně studovaným jevem. V této práci jsou shrnuty dosavadní poznatky o neurogenezi v souvislosti s jejím vlivem na prostorovou paměť a orientaci. Funkce nových neuronů není zdaleka vůbec jasná a evidence získaná z pokusů v prostorových úlohách si často protirečí. Zdá se však, že se neurogeneze podílí na separaci vzorců – tvorbě jasně oddělených paměťových reprezentací z velmi podobných stimulů a prevence jejich interference. Kromě toho by mohly být nové nervové buňky důležité pro dlouhodobou relační paměť a kognitivní flexibilitu – schopnost využívat dřívější vzpomínky podle aktuálních změněných podmínek. Hlavním úskalím výzkumu problematiky úlohy nových neuronů v hipokampu je různorodost používaných pokusných zvířat i pracovních protokolů v úlohách na prostorovou orientaci a především odlišné způsoby ablace, které neurogenezi blokují úplně nebo částečně a s rozdílnou účinností.

8. Seznam použité literatury

- Altman, J. 1962. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*, 135: 1127-8.
- Altman, J., Das, G. D. 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *The Journal of comparative neurology*, 124: 319–35.
- Ambrogini, P., Cuppini, R., Cuppini, C., Ciaroni, S., Cecchini, T., Ferri, P., Sartini, S., Del, P. 2000. Spatial learning affects immature granule cell survival in adult rat dentate gyrus. *Neuroscience letters*, 286: 21–24.
- Bayer, S. A., Brunner, R. L., Hine, R., Altman, J. 1973. Behavioural effects of interference with the postnatal acquisition of hippocampal granule cells. *Nature: New biology*, 242: 222–4.
- Bizon, J. L., Gallagher, M. 2003. Production of new cells in the rat dentate gyrus over the lifespan: relation to cognitive decline. *European Journal of Neuroscience*, 18: 215–219.
- Bizon, J. L., Lee, H. J., Gallagher, M. 2004. Neurogenesis in a rat model of age-related cognitive decline. *Aging cell*, 3: 227–34.
- Boitard, C., Etchamendy, N., Sauvant, J., Aubert, A., Tronel, S., Marighetto, A., Layé, S., Ferreira, G. 2012. Juvenile, but not adult exposure to high-fat diet impairs relational memory and hippocampal neurogenesis in mice. *Hippocampus*, 22: 2095–100.
- Bures, J., Fenton, A. A., Kaminsky, Y. U., Wesierska, M., Zahalka, A. 1998. Rodent navigation after dissociation of the allocentric and idiothetic representations of space. *Neuropharmacology*, 37: 689–99.
- Burghardt, N. S., Park, E. H., Hen, R., Fenton, A. A. 2012. Adult-born hippocampal neurons promote cognitive flexibility in mice. *Hippocampus*, 22: 1795–808.
- Caldwell, M. A., He, X., Svendsen, C. N. 2005. 5-Bromo-2'-deoxyuridine is selectively toxic to neuronal precursors in vitro. *The European journal of neuroscience*, 22: 2965–2970.
- Cameron, H. A., McKay, R. D. 2001. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *The Journal of comparative neurology*, 435: 406–17.
- Cameron, H. A., Gould, E. 1994. Adult neurogenesis is regulated by adrenal steroids in the dentate gyrus. *Neuroscience*, 61: 203–209.
- Cavoy, A., Delacour, J. 1993. Spatial but not object recognition is impaired by aging in rats. *Physiology & Behavior*, 53: 527–30.
- Clelland, C. D., Choi, M., Romberg, C., Clemenson Jr, G. D., Fagniere, A., Tyers, P. 2009. A Functional Role for Adult Hippocampal Neurogenesis in Spatial Pattern Separation. *Science*, 325: 210–213.
- Couillard-Despres, S., Finkl, R., Winner, B., Ploetz, S., Wiedermann, D., Aigner, R., Bogdahn, U., Winkler, J., Hoehn, M., Aigner, L. 2008. In Vivo Optical Imaging of Neurogenesis : Watching New Neurons in the Intact Brain. *Molecular imaging*, 7: 28–34.
- Cowen, D. S., Takase, L. F., Fornal, C. A., Jacobs, B. L. 2008. Age-dependent decline in hippocampal neurogenesis is not altered by chronic treatment with fluoxetine. *Brain research*, 1228: 14–9.
- Curtis, M. A., Penney, E. B., Pearson, A. G., Roon-mom, W. M. C. Van, Butterworth, N. J., Dragunow, M., Connor, B., Faull, R. L. M. 2003. Increased cell proliferation and

- neurogenesis in the adult human Huntington's disease brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100: 9023–9027.
- Dayer, A. G., Ford, A. A., Cleaver, K. M., Yassae, M., Cameron, H. A. 2003. Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *The Journal of comparative neurology*, 460: 563–72.
- Denny, C. A., Burghardt, N. S., Schachter, D. M., Hen, R., Drew, M. R. 2012. 4- To 6-Week-Old Adult-Born Hippocampal Neurons Influence Novelty-Evoked Exploration and Contextual Fear Conditioning. *Hippocampus*, 22: 1188–201.
- Drapeau, E., Mayo, W., Aourousseau, C., Le Moal, M., Piazza, P.V., Abrous, D. N. 2003. Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 14385–90.
- Dupret, D., Montaron, M.F., Drapeau, E., Aourousseau, C., Le Moal, M., Piazza, P.-V., Abrous, D. N. 2005. Methylazoxymethanol acetate does not fully block cell genesis in the young and aged dentate gyrus. *The European journal of neuroscience*, 22: 778–83.
- Dupret, D., Revest, J.-M., Koehl, M., Ichas, F., De Giorgi, F., Costet, P., Abrous, D. N., Piazza, P. V. 2008. Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PloS one*, 3: e1959.
- Eckenhoff, M. F., Rakic, P. 1988. Nature and fate of proliferative cells in the hippocampal dentate gyrus during the life span of the rhesus monkey. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 8: 2729–47.
- Ellenberg, L., McComb, J. G., Siegel, S. E., Stowe, S. 1987. Factors affecting intellectual outcome in pediatric brain tumor patients. *Neurosurgery*, 21: 638–644.
- Ennaceur, A., Delacour, J. 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural brain research*, 31: 47–59.
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A., Gage, F. H. 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature medicine*, 4: 1313–7.
- Fabel, K., Wolf, S. A., Ehninger, D., Babu, H., Leal-Galicia, P., Kempermann, G. 2009. Additive effects of physical exercise and environmental enrichment on adult hippocampal neurogenesis in mice. *Frontiers in neuroscience*, 3: 50.
- Falconer, E. M., Galea, L. A. M. 2003. Sex differences in cell proliferation, cell death and defensive behavior following acute predator odor stress in adult rats. *Brain research*, 975: 22–36.
- Fan, Y., Liu, Z., Weinstein, P. R., Fike, J. R., Liu, J. 2007. Environmental enrichment enhances neurogenesis and improves functional outcome after cranial irradiation. *The European journal of neuroscience*, 25: 38–46.
- Farioli-Vecchioli, S., Saraulli, D., Costanzi, M., Pacioni, S., Cinà, I., Aceti, M., Micheli, L., Bacci, A., Cestari, V., Tirone, F. 2008. The timing of differentiation of adult hippocampal neurons is crucial for spatial memory. *PLoS biology*, 6: e246.
- Feng, R., Rampon, C., Tang, Y. P., Shrom, D., Jin, J., Kyn, M., Sopher, B., Miller, M. W., Ware, C. B., Martin, G. M., Kim, S. H., Langdon, R. B., Sisodia, S. S., Tsien, J. Z. 2001. Deficient neurogenesis in forebrain-specific presenilin-1 knockout mice is associated with reduced clearance of hippocampal memory traces. *Neuron*, 32: 911–26.

- Fenton, A. A., Wesierska, M., Kaminsky, Y., Bures, J. 1998. Both here and there : Simultaneous expression of autonomous spatial memories in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: 11493–11498.
- Frankland, P. W., Cestari, V., Filipkowski, R. K., McDonald, R. J., Silva, A. J. 1998. The dorsal hippocampus is essential for context discrimination but not for contextual conditioning. *Behavioral neuroscience*, 112: 863–74.
- Garthe, A., Behr, J., Kempermann, G. 2009. Adult-Generated Hippocampal Neurons Allow the Flexible Use of Spatially Precise Learning Strategies. *PLoS ONE*, 4: e5464.
- Gazzara, R. A., Altman, J. 1981. Early Postnatal X-irradiation of the Hippocampus and Discrimination Learning in Adult Rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 95: 484–495.
- Ge, S., Yang, C., Hsu, K., Ming, L., Song, H. 2007. A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron*, 54: 559–66.
- Goldman, S. A., Nottebohm, F. 1983. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80: 2390–4.
- Goodman, T., Trouche, S., Massou, I., Verret, L., Zerwas, M., Roulet, P., Rampon, C. 2010. Young hippocampal neurons are critical for recent and remote spatial memory in adult mice. *Neuroscience*, 171: 769–78.
- Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A., Shors, T. J. 1999. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nature neuroscience*, 2: 260–265.
- Gould, E., McEwen, B. S., Tanapat, P., Galea, L. A., Fuchs, E. 1997. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 17: 2492–8.
- Gould, E., Tanapat, P., McEwen, B. S., Flügge, G., Fuchs, E. 1998. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: 3168–3171.
- Gratzner, H. G. 1982. Monoclonal Antibody to 5-Bromo- and 5-Iododeoxyuridine : A New Reagent for Detection of DNA Replication. *Science*, 218: 474–475.
- Hancock, A., Priester, C., Kidder, E., Keith, J. R. 2009. Does 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) disrupt cell proliferation and neuronal maturation in the adult rat hippocampus in vivo? *Behavioural brain research*, 199: 218–21.
- Hattiangady, B., Shetty, A. K. 2008. Aging does not alter the number or phenotype of putative stem/progenitor cells in the neurogenic region of the hippocampus. *Neurobiology of aging*, 29: 129–47.
- Heine, V. M., Maslam, S., Zareno, J., Joels, M., Lucassen, P. J. 2004. Suppressed proliferation and apoptotic changes in the rat dentate gyrus after acute and chronic stress are reversible. *European Journal of Neuroscience*, 19: 131–144.
- Jessberger, S., Clark, R. E., Broadbent, N. J., Clemenson Jr., G. D., Consiglio, A., Lie, D. C., Squire, L. R., Gage, F. H. 2009. Dentate gyrus-specific knockdown of adult neurogenesis impairs spatial and object recognition memory in adult rats. *Learning & Memory*, 16: 147–154.

- Johnston, M. V, Coyle, J. T. 1979. Histological and neurochemical effects of fetal treatment with methylazoxymethanol on rat neocortex in adulthood. *Brain research*, 170: 135–55.
- Kempermann, G. 2008. The neurogenic reserve hypothesis: what is adult hippocampal neurogenesis good for? *Trends in neurosciences*, 31: 163–9.
- Kempermann, G., Kuhn, H. G., Gage, F. H. 1997. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, 386: 493–495.
- Kempermann, G., Kuhn, H. G., Gage, F. H. 1998. Experience-Induced Neurogenesis in the Senescent Dentate Gyrus. *The Journal of Neuroscience*, 18: 3206–3212.
- Ko, H., Jang, D., Son, J., Kwak, C., Choi, J., Ji, Y., Lee, Y., Son, H., Kaang, B. 2009. Effect of ablated hippocampal neurogenesis on the formation and extinction of contextual fear memory. *Molecular brain*, 2: 1.
- Koehl, M., Abrous, D. N. 2011. A new chapter in the field of memory: adult hippocampal neurogenesis. *The European journal of neuroscience*, 33: 1101–14.
- Kronenberg, G., Reuter, K., Steiner, B., Brandt, M. D., Jessberger, S., Yamaguchi, M., Kempermann, G. 2003. Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *The Journal of comparative neurology*, 467: 455–63.
- Kuhn, H. G., Gage, F. H. 1996. Neurogenesis in the Dentate Gyrus of the Adult Rat : Age-Related Decrease of Neuronal Progenitor Proliferation. *The Journal of Neuroscience*, 76: 2027–2033.
- Lashkari, H. P., Saso, S., Moreno, L., Athanasiou, T., Zacharoulis, S. 2011. Using different schedules of Temozolomide to treat low grade gliomas: systematic review of their efficacy and toxicity. *Journal of neuro-oncology*, 105: 135–47.
- Lee, J., Duan, W., Long, J. M., Ingram, D. K., Mattson, M. P. 2000. Dietary restriction increases the number of newly generated neural cells, and induces BDNF expression, in the dentate gyrus of rats. *Journal of molecular neuroscience*, 15: 99–108.
- Lemaire, V., Koehl, M., Le Moal, M., Abrous, D. N. 2000. Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97: 11032–7.
- Lie, D., Colamarino, S. A., Song, H., Désiré, L., Mira, H., Consiglio, A., Lein, E. S., Jessberger, S., Lansford, H., Dearie, A. R., Gage, F. H. 2005. Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature*, 437: 1370–5.
- Lindqvist, A., Mohapel, P., Bouter, B., Frielingsdorf, H., Pizzo, D., Brundin, P., Erlanson-Albertsson, C. 2006. High-fat diet impairs hippocampal neurogenesis in male rats. *European journal of neurology: the official journal of the European Federation of Neurological Societies*, 13: 1385–8.
- Madsen, T. M., Kristjansen, P. E. G., Bolwig, T. G., Wörtwein, G. 2003. Arrested neuronal proliferation and impaired hippocampal function following fractionated brain irradiation in the adult rat. *Neuroscience*, 119: 635–42.
- Malberg, J. E., Duman, R. S. 2003. Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology*, 28: 1562–71.

- Malberg, J. E., Eisch, A. J., Nestler, E. J., Duman, R. S. 2000. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 20: 9104–10.
- Manganas, L. N., Zhang, X., Li, Y., Hazel, R. D., Smith, S. D., Washgul, M. E., Henn, F., Benveniste, H., Djuric, P. M., Enikolopov, G., Maletic-Savatic, M. 2007. Magnetic Resonance Spectroscopy Identifies Neural Progenitor Cells in the Live Human Brain. *Science*, 318: 980–985.
- Monje, M. L., Mizumatsu, S., Fike, J. R., Palmer, T. D. 2002. Irradiation induces neural precursor-cell dysfunction. *Nature medicine*, 8: 955–62.
- Morris, R. G. M. 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of neuroscience methods*, 11: 47–60.
- Morris, R. G. M. 1981. Spatial Localization Does Not Require Local Cues the Presence of. *Learning and Motivation*, 12: 239–260.
- Morshead, C. M., Garcia, A. D., Sofroniew, M. V., Van der Kooy, D. 2003. The ablation of glial fibrillary acidic protein-positive cells from the adult central nervous system results in the loss of forebrain neural stem cells but not retinal stem cells. *European Journal of Neuroscience*, 18: 76–84.
- Motomura, K., Ogura, M., Natsume, A., Yokoyama, H., Wakabayashi, T. 2010. A free-radical scavenger protects the neural progenitor cells in the dentate subgranular zone of the hippocampus from cell death after X-irradiation. *Neuroscience letters*, 485: 65–70.
- Oh, S. B., Park, H. R., Jang, Y. J., Choi, S. Y., Son, T. G., Lee, J. 2012. Baicalein attenuates impaired hippocampal neurogenesis and the neurocognitive deficits induced by γ -ray radiation. *British journal of pharmacology*, 168: 421–431.
- Olton, D. S., Paras, B. C. 1979. Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia*, 17: 669–682.
- Olton, D. S., Samuelson, R. J. 1976. Processes Remembrance of Places Passed : Spatial Memory in Rats. *Journal of Experimental Psychology*, 2: 97-116.
- Peissner, W., Kocher, M., Treuer, H., Gillardon, F. 1999. Ionizing radiation-induced apoptosis of proliferating stem cells in the dentate gyrus of the adult rat hippocampus. *Brain research. Molecular brain research*, 71: 61–8.
- Pham, K., Nacher, J., Hof, P. R., McEwen, B. S. 2003. Repeated restraint stress suppresses neurogenesis and induces biphasic PSA-NCAM expression in the adult rat dentate gyrus. *European Journal of Neuroscience*, 17: 879–886.
- Praag, H. van, Kempermann, G., Gage, F. H. 1999. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature neuroscience*, 2: 266-270.
- Quinn, J. A. 2003. Phase II Trial of Temozolomide in Patients With Progressive Low-Grade Glioma. *Journal of Clinical Oncology*, 21: 646–651.
- Rueger, M. A., Backes, H., Walberer, M., Neumaier, B., Ullrich, R., Simard, M. L., Emig, B., Fink, G. R., Hoehn, M., Graf, R., Schroeter, M. 2010. Noninvasive imaging of endogenous neural stem cell mobilization in vivo using positron emission tomography. *The Journal of neuroscience*, 30: 6454–60.
- Sahay, A., Scobie, K. N., Hill, A. S., O’Carroll, C. M., Kheirbek, M. A., Burghardt, N. S., Fenton, A. A., Dranovsky, A., Hen, R. 2011. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature*, 472: 466–70.

- Sapolsky, R. M. 2004. Is impaired neurogenesis relevant to the affective symptoms of depression? *Biological psychiatry*, 56: 137–9.
- Saxe, M. D., Malleret, G., Vronskaya, S., Mendez, I., Garcia, a D., Sofroniew, M. V, Kandel, E. R., Hen, R. 2007. Paradoxical influence of hippocampal neurogenesis on working memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104: 4642–6.
- Seki, T., Arai, Y. 1995, December 15. Age-related production of new granule cells in the adult dentate gyrus. *Neuroreport*, 6: 2479-82.
- Shors, T. J., Miesegaes, G., Beylin, A., Zhao, M., Rydel, T., Gould, E. 2001. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature*, 410: 372-5.
- Shors, T. J., Townsend, D. a, Zhao, M., Kozorovitskiy, Y., Gould, E. 2002. Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal-dependent learning. *Hippocampus*, 12: 578–84.
- Schmidt-Hieber, C., Jonas, P., Bischofberger, J. 2004. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature*, 429: 184–7.
- Snyder, J. S., Hong, N. S., McDonald, R. J., Wojtowicz, J. M. 2005. A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience*, 130: 843–52.
- Spooner, R. I. W., Thomson, A., Hall, J., Morris, R. G. M., Salter, S. H. 1994. The Atlantis platform : a new design and further developments of Buresova' s on-demand platform for the water maze. *Learning & Memory*, 1: 203–211.
- Tada, E., Parent, J. M., Lowenstein, D. H., Fike, J. R. 2000. X-irradiation causes a prolonged reduction in cell proliferation in the dentate gyrus of adult rats. *Neuroscience*, 99: 33–41.
- Tanapat, P., Hastings, N. B., Rydel, T. A., Galea, L. A., Gould, E. 2001. Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism. *The Journal of comparative neurology*, 437: 496–504.
- Tronel, S., Belnoue, L., Grosjean, N., Revest, J. M., Piazza, P. V., Koehl, M., Abrous, D. N. 2012. Adult-born neurons are necessary for extended contextual discrimination. *Hippocampus*, 22: 292–8.
- Van der Borght, K., Meerlo, P., Luiten, P. G. M., Eggen, B. J. L., Van der Zee, E. A. 2005. Effects of active shock avoidance learning on hippocampal neurogenesis and plasma levels of corticosterone. *Behavioural brain research*, 157: 23–30.
- Vera, K. 2004. Dose-dense regimen of temozolomide given every other week in patients with primary central nervous system tumors. *Annals of Oncology*, 15: 161–171.
- Wang, S., Kee, N., Preston, E., Wojtowicz, J. M. 2005. Electrophysiological correlates of neural plasticity compensating for ischemia-induced damage in the hippocampus. *Experimental brain research*, 165: 250–60.
- Wesierska, M., Dockery, C., Fenton, A. A. 2005. Beyond memory, navigation, and inhibition: behavioral evidence for hippocampus-dependent cognitive coordination in the rat. *The Journal of Neuroscience*, 25: 2413–9.
- Winocur, G., Wojtowicz, J. M., Sekeres, M., Snyder, J. S., Wang, S. 2006. Inhibition of neurogenesis interferes with hippocampus-dependent memory function. *Hippocampus*, 16: 296–304.

- Yamaguchi, M., Saito, H., Suzuki, M., Mori, K. 2000. Visualization of neurogenesis in the central nervous system using nestin promoter-GFP transgenic mice. *Neuroreport*, 11: 1991–6.
- Zeldin, R. K., Olton, D. S. 1986. Rats acquire spatial learning sets. *Journal of experimental psychology: Animal behavior processes*, 12: 412–9.
- Zhang, C., Zou, Y., He, W., Gage, F. H., Evans, R. M. 2008. A role for adult TLX-positive neural stem cells in learning and behaviour. *Nature*, 451: 1004–7.