

Neurogeneze a gliogeneze po ischemickém poškození mozku

**Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
Katedra buněčné biologie**

Veronika Dlouhá

Bakalářská práce vypracovaná v akademickém roce 2008/2009

Vedoucí práce: Ing. Miroslava Anděrová, PhD.

Ráda bych na tomto místě poděkovala zejména mé školitelce **Ing. Miroslavě Anděrové, PhD.** (Ústav experimentální medicíny AV ČR, laboratoř neurobiologie), za její vstřícnost, ochotu a odborné rady při psaní této práce. Mé poděkování patří také Mgr. Ivě Prajerové a Mgr. Pavlu Honsovi.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma **Neurogeneze a gliogeneze po ischemickém poškození mozku** vypracovala sama, pouze za pomoci citované literatury a konzultací s mojí školitelkou.

Praha 2009



Veronika Dlouhá

Abstrakt

Indukce endogenních reparačních mechanismů je v současnosti považována za velmi nadějný přístup v buněčných terapiích pro celou řadu poškození centrálního nervového systému, jako jsou neurodegenerativní onemocnění, trauma a ischemické poškození mozku. Mozková ischemie je jeden z nejčastějších typů neurálního poškození, ohrožující přežití všech typů mozkových buněk, obzvláště neuronů. Neuronů se mohou obnovovat z multipotentních neurálních kmenových buněk (NSCs), které jsou lokalizovány především v subgranulární zóně gyru dentatu (SGZ) a v subventrikulární zóně (SVZ) dospělého mozku. Po ischemii/reperfúzi se zvyšuje míra proliferace NSCs dávající vznik neurálním progenitorům, které následně migrují až k místu poškození a diferencují v neurony. Důležitou roli v této migraci má také angiogeneze v místě poškození. Kromě NSCs, i ependymové buňky v SVZ, astrocyty a NG2-glie se mohou významně podílet na regeneraci poškozené nervové tkáně. Po mozkové ischemii vznikají reaktivní astrocyty, u kterých dochází k dediferenciaci k ranějším vývojovým stádiím a dokonce některé z nich získávají vlastnosti neurálních kmenových buněk. NG2-glie, známé jako prekurzory oligodendrocytů v dospělém mozku, dávají vznik i protoplasmatickým astrocytům a pravděpodobně i neuronům. Systematická analýza potenciálu ependymových buněk, reaktivních astrocytů a NG2-glií po ischemickém poškození mozku by mohla zásadně přispět k rozvoji nových nebo zlepšení současných terapeutických přístupů.

Klíčová slova: ischemie, neurogeneze, gliogeneze, dospělý mozek, subventrikulární zóna (SVZ), subgranulární zóna (SGZ), neurální kmenové buňky (NSCs), ependymové buňky, NG2-glie, reaktivní astrocyty

Abstract

Induction of endogenous repair mechanisms is considered to be a promising approach in cell therapies for number of neurodegenerative diseases, such as trauma and ischemia. Cerebral ischemia is one of the most frequent type of neuronal injury endangering survival of major cell types in nervous tissue, predominantly neurones. Neurons can be re-newed from multipotent neural stem cells (NSCs) that are localized primarily in subgranular zone (SGZ) and subventricular zone (SVZ) of adult brain. After ischemia/reperfusion the proliferation of NSCs is markedly increased, giving rise to large number of neural progenitor cells. These cells are able to migrate towards the ischemic lesion and to differentiate into neurons. Angiogenesis also plays an important role in migration of neural progenitor cells. In addition to NSCs, also ependymal cells in SVZ, astrocytes and NG2-glia can significantly contribute to regeneration of damaged nervous tissue. Cerebral ischemia results in appearance of reactive astrocytes in the vicinity of ischemic lesion, these cells are able to dedifferentiate to early developmental stages. Moreover, some of them posses properties of neural stem cells. After injury NG2-glia, known as oligodendrocyte progenitors in adult brain, give rise to astrocytes and they might also replace damaged neurons. Systematic analysis of ependymal cells, reactive astrocytes and NG2-glia, and of their potential in CNS repair could contribute to development of new therapeutic approaches or improvement of currently used therapies.

Key words: ischemia, neurogenesis, gliogenesis, adult brain, subventricular zone (SVZ), subgranular zone (SGZ), neural stem cells (NSCs), ependymal cells, NG2-glia, reactive astrocytes

Seznam použitých zkratk

()*- citace ze sekundárních zdrojů jsou označeny hvězdičkou

Ang1 – angiopoietin 1 (angiopoietin 1)

BDNF – neurotrofní faktor (brain derived neurotrophic factor)

BL – bazální lamina (basal lamina)

BLBP – protein vázající lipid (brain lipid binding protein)

BMP – kostní morfogenní protein (bone morphogenetic protein)

BV – krevní řečiště (blood vascular)

CNS – centrální nervová soustava (central nervous system)

CRMP4 – protein 4 spojený s odpovědí na kolaspiny (collapsin response-mediated protein 4)

CTX – mozková kůra (cortex)

DCX – protein spojený s mikrotubuly (doublecortin)

DG – gyrus dentatus

Dlx2 – transkripční faktor

EGF – epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)

EGFR – receptor epidermálního růstového faktoru (epidermal growth factor receptor)

FGF2 – fibrilární růstový faktor 2 (fibrillar growth factor 2)

GABA – γ -aminomáselná kyselina (gamma-aminobutyric acid)

GAT4 – GABA transportér 4 (gamma-aminobutyric acid transporter 4)

GCL – vrstva granulárních buněk (granule cell layer)

GFAP – gliální fibrilární acidický protein (glial fibrillary acidic protein)

GL – vrstva glomerulárních buněk (glomerular layer)

GLAST – glutamát-aspartátový transportér (glutamate-aspartate transporter)

hA – horizontální astrocyty (horizontal astrocytes)

IGF – insulinový růstový faktor (insulin growth factor)

LeX – Lewisův antigen (Lewis X)

LV – postranní komora (lateral ventricle)

MAP-2ab – protein 2, spojený s mikrotubuly (microtubule associated protein-2 a and b isoforms)

MCAO – okluze mozkových arterií (middle cerebral artery occlusion)

MCL – vrstva mitrálních buněk (mitral cell layer)

mGluR – metabotropní receptor glutamátu (metabotropic glutamate receptor)

NeuN – marker neurálního jádra (neuronal nuclei)

NMDA – N-metyl-D-aspartová kyselina (N-methyl-D-aspartic acid)

non-NMDA=AMPA – α -amino-3-hydroxy-5-metyl-4-isoxazol propionová kyselina (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol propionic acid)

NSCs – neurální kmenové buňky (neural stem cells)

NSE – enoláza specifická pro neuron (neuron specific enolase)

OB – čichový lalok (olfactory bulb)

Olig2 – transkripční faktor-2 specifický pro oligodendrocyty (oligodendrocyte lineage transcription factor 2)

OPC – prekurzor oligodendrocytů (oligodendrocyte precursor cell)

PDGF – růstový faktor odvozený z destiček (platelet-derived growth factor)

PPv – zadní periventrikulární zóna (posterior peri-ventricular area)

PSA-NCAM – polysialová adhézní molekula neuronu (poly-sialylated-neural cell-adhesion molecule)

rA – radiální astrocyty (radial astrocytes)

RC2 – marker radiálních glií (radial glia marker)

RMS – rostrální migrační proud (rostral migratory stream)
S100 β – kalcium vázající protein
SCF – faktor kmenových buněk (stem cell factor)
SDF1 – stromal cell-derived factor 1
SGZ – subgranulární zóna (subgranular zone)
Sox2 –transkripční faktor embryonálních kmenových buněk (sex determining region Y-box 2)
ST – striatum
SVZ – subventrikulární zóna (subventricular zone)
TAPs – C-buňky (transit-amplifying progenies)
Tuj-1 – III třída β -tubulinu (neuron-specific class III β -tubulin)
VEGF – cévní endotelový růstový faktor (vascular endothelial growth factor)

Obsah

1. Úvod	8
2. Historie	8
3. Neurogeneze v dospělém mozku	9
3.1. Neurogenní oblasti dospělého mozku	9
3.2. Oblasti konstitutivní neurogeneze	10
3.3. Architektura neurogenních oblastí	11
3.3.1. <i>Subgranulární zóna</i>	11
3.3.2. <i>Subventrikulární zóna</i>	12
3.4. Buněčné typy subventrikulární zóny	15
3.5. Regulace neurogeneze v SVZ	17
3.6. Funkční význam klidové neurogeneze	19
4. Gliogeneze v dospělém mozku	19
4.1. Gliové buňky	19
4.2. NG2-glie	20
5. Identifikace neurálních kmenových/progenitorových buněk	22
6. Patologie neurogenních oblastí	22
7. Mozková ischemie	23
7.1. Patofyziologie mozkové ischemie	24
8. Neurogeneze po ischemickém poškození mozku	26
8.1. Subgranulární zóna.....	27
8.2. Subventrikulární zóna	27
8.2.1. <i>Změna proliferace B-buněk</i>	27
8.2.2. <i>Ependymové buňky</i>	28
8.2.3. <i>Migrace neuroblastů</i>	28
8.2.4. <i>Cévní mikroprostředí</i>	30
9. Gliogeneze po ischemickém poškození mozku	30
9.1. Astrocyty	30
9.2. Oligodendrocyty	31
9.3. Mikroglie	32
10. Závěr	32
11. Seznam použité literatury	33

1. Úvod

Poškození centrálního nervového systému je jednou z nejčastějších příčin úmrtí a invalidity ve vyspělých státech. Mozková ischemie je nejčastěji vyskytujícím se typem nervového poškození. Současná léčba je zaměřena především na zamezení dalšího poškození tkáně. Používají se například antikoagulační preparáty, které přispívají k obnově průchodnosti cévy. Avšak efektivní terapie stále chybí. V současné době probíhá výzkum nových terapií, které jsou založeny na známých molekulárních mechanismech patofyziologie ischemie. Na experimentálních modelech ischemie jsou testovány například inhibitory kyslíkových radikálů, antagonisté excitotoxických aminokyselin, blokátory vápníkových kanálů, trofické faktory s neuroprotektivním účinkem a anti-apoptotické molekuly (Park 2000)*. Tyto experimentální přístupy však vedou pouze k redukci ischemické léze. Skutečnou možnost regenerace nervové tkáně po ischemickém poškození, přináší až výzkum v posledních letech, který využívá neurálních kmenových buněk v dospělém mozku savců včetně člověka, a zvýšení míry neurogeneze po ischemickém poškození. Výzkum v oblasti regenerace nervové tkáně je v současnosti zaměřen na dva základní směry: na regeneraci poškozené nervové tkáně pomocí transplantace embryonálních, neonatálních nebo dospělých kmenových/progenitorových buněk a na indukci endogenních reparačních procesů, s využitím aplikace růstových faktorů, morfogenů a v neposlední řadě, i vnesení vektorů, které vedou k indukci/represi genů, podílejících se na neurogenezi a gliogenezi.

Cílem této práce je shrnout známé poznatky, týkající se vzniku nových neuronů a gliových buněk po mozkové ischemii, především na zvířecích modelech. První část této práce je zaměřena na neurogenezi a gliogenezi nepoškozeného mozku, a v druhé části je diskutován vliv ischemického poškození na regeneraci nervové tkáně.

2. Historie

Poměrně dlouho byl přijímán názor, že se dospělý mozek už dále nevyvíjí, že není schopen vytvářet nové neurony ani gliové buňky, a proto je regenerace poškozené nervové tkáně velmi omezená. V roce 1960 však Altman našel v mozku dospělého potkana neuroblasty (Altman 1962) a na základě tohoto objevu se výzkum v následujících letech zaměřil na mechanismy regenerace centrálního nervového systému (CNS). Avšak existence

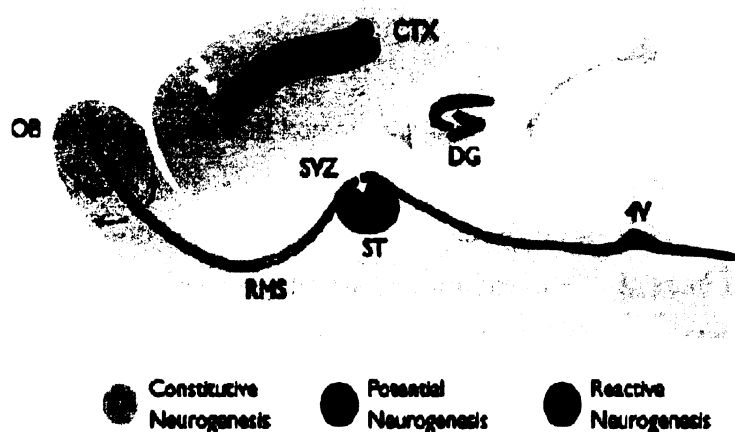
neurogeneze u dospělého jedince byla přijata do povědomí teprve po té, co Fernando Nottebohm v roce 1981 ukázal, že v hipokampu kanárka probíhá neurogeneze ve větší míře v období páření, kdy se každý rok učí nové písně (Nottebohm 1981). Od té doby mnoho studií potvrdilo, že nové neurony jsou kontinuálně tvořeny v neurogenních oblastech dospělého mozku mnoha odlišných druhů včetně člověka. Eriksson v roce 1998 poskytl první důkaz o nově vznikajících neuronech v lidském mozku (Eriksson, Perfilieva et al. 1998). Byla provedena posmrtná analýza mozků pacientů, u kterých byla aplikována metoda značení proliferujících buněk, využívající bromodeoxyuridin (BrdU). V následujících letech bylo ukázáno, že traumatické nebo ischemické poškození dospělého mozku stimuluje neurogenezi. Předmětem současného výzkumu je objasnění mechanismů, které se podílí na neurogenezi a jejich využití v léčbě poškozeného CNS.

3. Neurogeneze v dospělém mozku

3.1. Neurogenní oblasti dospělého mozku

Neurogenní oblast tj. oblast vzniku nových neuronů, má tři základní charakteristiky: (1) přítomnost neurálních kmenových buněk (NSCs = neural stem cells); (2) specifické mikroprostředí na buněčné i molekulární úrovni, které udržuje aktivní kmenové a progenitorové buňky a podporuje diferenciaci v neurony a (3) neurogenní potenciál, který může být testován implantací neurálních prekursorů do této oblasti. Pokud dojde k diferenciaci ve zralé neurony, jedná se o neurogenní oblast. V opačném případě se prekuzory vyvinou v gliové buňky nebo zaniknou (Ortega-Perez, Murray et al. 2007).

Dospělý savčí mozek lze z hlediska schopnosti regenerace rozdělit na oblast *konstitutivní neurogeneze*, kde neurogeneze probíhá kontinuálně, *potenciálně neurogenní* oblast, kde se vyskytují neurální prekuzory, *reaktivně neurogenní* oblast, kde neurogeneze může být vyvolaná experimentálně a nakonec na oblasti, které nevykazují neurogenní vlastnosti (obr. 1) (Ortega-Perez, Murray et al. 2007).



Obr. 1 – Typy dospělé neurogenese (Ortega-Perez, Murray et al. 2007)

Zeleně jsou vyznačeny *oblasti konstitutivní neurogenese* (SVZ/OB a gyrus dentatus hipokampu). Červeně oblast, kde byly identifikovány populace neurálních prekursorů – *potenciálně neurogenní oblast* (subgranulární zóna gyru dentatu a oblast 3. a 4. mozkové komory spolu s centrálním míšním kanálkem). Modře je vyznačena oblast *reaktivní neurogenese*, kde po předchozím zničení buněk (vyznačeno žlutými šipkami), může být v omezené míře experimentálně vyvolána neurogenese (striatum, mozková kůra, CA3 oblast hipokampu).

CTX: kortex; DG: gyrus dentatus hipokampu; OB: čichový lalok; RMS: rostrální migrační proud; ST: striatum; SVZ: subventrikulární zóna; 4v: čtvrtá komora

3.2. Oblasti konstitutivní neurogenese

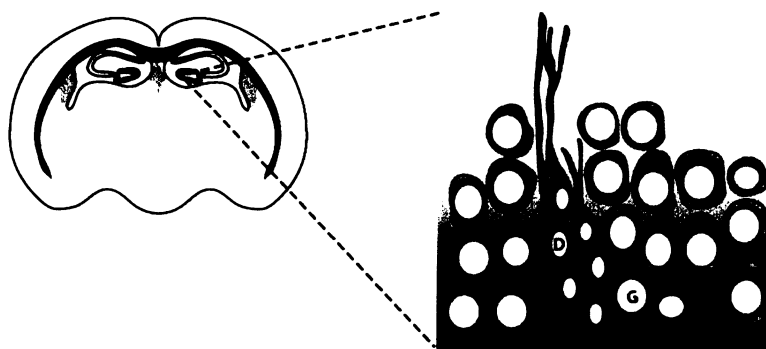
Neurogenese probíhá kontinuálně pouze ve třech oblastech dospělého mozku, přestože progenitorové buňky byly v malém množství objeveny i v míše, mezimozku, mozkové kůře a ve striatu (Wiltrot, Lang et al. 2007)*.

- (1) V hipokampu – v gyru dentatu se neurální progenitory nacházejí v subgranulární zóně (SGZ = subgranular zone), což je tenká buněčná vrstva lokalizovaná mezi vrstvou granulárních buněk (GCL = granule cell layer), která je tvořena především neurony, a hilus dentatus.
- (2) V subventrikulární zóně (SVZ), což je tenká vrstva buněk, která se nachází v bočních částech postranních komor předního mozku.
- (3) V zadní periventrikulární zóně (PPv), NSCs se nachází pod ependymovými buňkami, které obklopují hipokampus.

3.3. Architektura neurogenních oblastí

3.3.1. Subgranulární zóna

SGZ není v kontaktu s postranní komorou, a tudíž ani s cerebrospinální tekutinou, ale leží na rozhraní hilu a GCL v hipokampu. V SGZ můžeme rozlišit dvě základní morfologie astrocytů a to: radiální a horizontální (obr. 2). *Radiální astrocyty* (rAs = radial astrocytes) mají pyramidální tvar těla a hlavní výběžky orientované radiálně, které ční skrz vrstvu granulárních buněk na povrch gyru dentatu a na bázi SGZ mají kratší tangenciálně orientované výběžky. Mnoho proliferujících rAs bylo nalezeno především poblíž krevního řečiště. Tyto astrocyty jsou považovány za primární progenitory SGZ, exprimují nestin a gliální fibrilární acidický protein (GFAP = glial fibrillary acidic protein) a bývají označovány jako progenitory I. typu (Seri, Garcia-Verdugo et al. 2001). Tyto buňky mají na rozdíl od NSCs v SVZ omezenou schopnost sebeobnovy klesající s věkem a jsou proto nazývány neurogenními progenitory. Progenitory II. typu jsou dceřiné buňky radiálních astrocytů, označované též jako D-buňky (Seri, Garcia-Verdugo et al. 2001). D-buňky tvoří těsné shluky, které jsou začleněny mezi výběžky rA, pokračují v dělení a během dozrávání migrují podél radiálních výběžků rAs do GCL, kde diferencují v nové granulární buňky (Seri, Garcia-Verdugo et al. 2004). D-buňky během dozrávání vytvářejí apikální výběžky, které se pak stávají dendrity nových granulárních neuronů (Ihrie and Alvarez-Buylla 2008). *Horizontální astrocyty* (hA = horizontal astrocytes) postrádají radiální výběžky (Seri, Garcia-Verdugo et al. 2004). Bylo ukázáno, že exprimují specifické markery progenitorů Sox2, BLBP a chovají se jako kmenové buňky *in vivo*. Mohou mít vlastnosti progenitorových buněk hipokampu podobně jako radiální astrocyty. Navíc hA mohou během asymetrického buněčného dělení produkovat neurony, a dceřiné buňky hA mohou získat radiální morfologii (Suh, Consiglio et al. 2007).

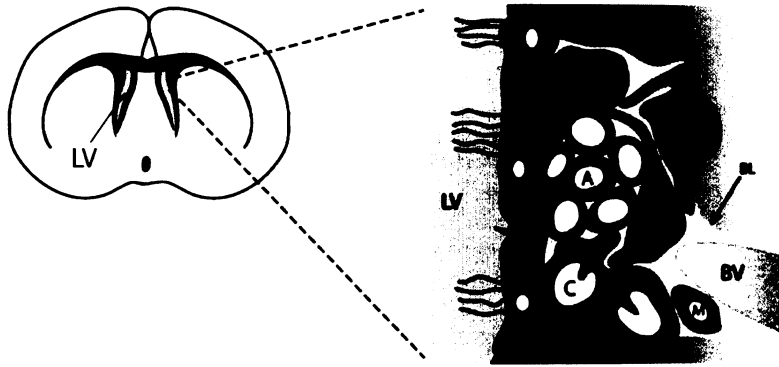


Obr. 2 – Architektura SGZ v mozku myši (Ihrle and Alvarez-Buylla 2008)

Nalevo je na koronálním řezu vyznačena oblast gyru dentatu hipokampu a napravo pak její detail. SGZ obsahuje radiální (rA) a horizontální astrocyty (hA). Z rA vznikají D-buňky (D), které se dále dělí a diferencují v nové granulární buňky (G).

3.3.2. Subventrikulární zóna

V SVZ dochází na rozdíl od SGZ k migraci buněk před tím, než se plně diferencují v neurony. Je hlavním zdrojem dospělé neurogeneze. Obsahuje pomalu se dělicí NSCs, které mají vlastnosti astrocytů a jsou označovány jako *B-buňky*. Můžeme rozlišovat dvě podskupiny: B1-buňky, které tvoří gliální hranici mezi migrujícími neuroblasty a endymovými buňkami, a B2-buňky tvořící rozhraní migrujících neuroblastů a pod nimi ležícím striatem. Z těchto buněk poté vznikají aktivně proliferující TAPs buňky (TAPs = transit-amplifying progenies), též označované jako *C-buňky*, které následně dávají vznik A-buňkám (obr. 3). *A-buňky* jsou neuroblasty neboli prekurzory neuronů, které pokračují v dělení. Tyto A-buňky následně migrují v řetězci do čichového laloku (OB = olfactory bulb), kde diferencují v 5 podtypů čichových interneuronů. Neuroblasty jsou při své migraci obklopeny výběžky B-buněk, čímž tvoří gliální tunel, který separuje neuroblasty od okolního parenchymu. Tato struktura je označována jako rostrální migrační proud (RMS = rostral migratory stream). Nedávno bylo také prokázáno, že B-buňky SVZ jsou schopny produkovat prekurzory oligodendrocytů, které následně migrují do corpus callosum (Menn, Garcia-Verdugo et al. 2006).



Obr. 3 – Architektura SVZ v mozku myši (Ihrie and Alvarez-Buylla 2008)

Nalevo je hnědě vyznačena oblast SVZ, která se nachází vedle stěny postranní mozkové komory (LV). *Napravo* je pak detail stěny LV. Kde jsou modře a s tmavými jádry zobrazeny B-buňky; zeleně aktivně dělící se C-buňky; červeně A-buňky a šedivě jsou vyznačeny endymové buňky (E). SVZ je v rozsáhlém kontaktu s bazální laminou (BL), a mikroglie (M) a nachází se poblíž krevních cév (BV).

Během embryonálního vývoje mozku se NSCs, v této vývojové fázi označované jako radiální glie, nacházejí přímo ve ventrikulární zóně, neboť kontakt apikálních výběžků s komorou je důležitý pro udržení aktivity primárních progenitorů. Krátce po narození se tyto radiální glie transformují do parenchymálních astrocytů a endymových buněk a jen malá část si zachovává původní morfologii a vlastnosti (B-buňky). Endymové buňky, označované jako E-buňky však tyto B-buňky odsunou do SVZ. E-buňky vystylají stěny postranní komory a jsou mitoticky neaktivní. Jsou popsány dva typy (E1, E2). E1-buňky mají mnoho cilií a jsou známy již dlouho, zatímco E2-buňky byly objeveny nedávno a liší se především tím, že jsou mnohem objemnější a mají pouze dvě cilie, které jsou částečně invaginovány. E2-buňky pokrývají pouze 5% povrchu komor (Mirzadeh, Merkle et al. 2008). Zejména E1-buňky svými ciliemi cirkulují cerebrospinální tekutinu. Je dokázáno, že takto tvoří koncentrační gradient rozpustných proteinů v cerebrospinální tekutině, který určuje směr migrace neuroblastů do OB (Sawamoto, Wichterle et al. 2006).

B-buňky mají dlouhý bazální výběžek, který vytváří speciální zakončení na krevní cévě (Mirzadeh, Merkle et al. 2008). Výběžek zřejmě umožňuje B-buňkám reagovat na signály v extracelulární matrix okolo cévy nebo na hormony či přímo na cirkulující růstové faktory. Podobně jako radiální glie během embryonálního vývoje, jsou v přímém kontaktu s komorou pomocí drobného apikálního výběžku, který nese několik nepohyblivých cilií. Tyto apikální výběžky tvoří jádro růžicového uspořádání stěn komory sousedící s neurogení

oblastí, jádro pak obklopují E-buňky (obr. 4) (Mirzadeh, Merkle et al. 2008). Počet B-buněk dotýkajících se komory se zřejmě s věkem snižuje.



Obr. 4 – Model neurogenního mikroprostředí dospělé SVZ (Mirzadeh, Merkle et al. 2008)

Modře jsou zobrazeny B-buňky s dlouhými bazálními výběžky, které končí na krevní cévě (oranžově) a s apikálními výběžky vybíhajícími na povrch komory. C-buňky jsou zelené, A-buňky červené. Růžicové uspořádání je vyznačeno světlou a tmavou hnědou a E2-buňky jsou růžové.

Tato organizace může být zásadní pro dospělou neurogenezi vyžadující B-buňky v centru, a to (1) z důvodu těsného kontaktu s cerebrospinální tekutinou, která může regulovat chování B-buněk; (2) z důvodu sdílení apikálních spojení tzv. "gap junction" a adherentních spojů mezi sebou a s E-buňkami, které jsou pravděpodobně důležité pro symetrické a asymetrické dělení B-buněk; (3) a k aktivní komunikaci B- a E-buněk (Mirzadeh, Merkle et al. 2008)*.

Architektura lidské SVZ se od architektury myší SVZ poněkud liší. Je rozdělena do čtyř morfologicky rozlišitelných vrstev lemujících komory. První vrstvu tvoří endymové buňky, které svými ciliemi zasahují do komory; druhou vrstvu tvoří neurony a v menší míře i astrocyty. Třetí vrstva je tvořena pásem astrocytů, které svými výběžky vybíhají do druhé vrstvy a mohou být v kontaktu i s endymovými buňkami. Tato vrstva obsahuje buňky morfologicky podobné C-buňkám a předpokládá se, že se v této vrstvě nacházejí NSCs. Čtvrtá vrstva obsahuje především myelinizovaná vlákna. U lidského mozku byla také potvrzena existence RMS, avšak důkazy pro řetězovou migraci chybí (Sanai, Tramontin et al. 2004).

3.4. Buněčné typy SVZ

B-buňky

B-buňky jsou dospělé NSCs (aNSCs = adult), které se nacházejí jen v některých částech mozku. NSCs jsou speciálním somatickým buněčným typem, který má schopnost *dlouhotrvající sebeobnovy* tzn. schopnost vytvářet identické kopie sebe sama a *diferenciace*. Tyto buňky mají schopnost dělit se symetricky i asymetricky. Při *symetrickém dělení* vznikají dvě rovnocenné dceřiné buňky s původními vlastnostmi kmenových buněk. Zatímco při *asymetrickém dělení* jsou dceřiné buňky nerovnocenné, kdy si pouze jedna uchovává svoje kmenové vlastnosti a z druhé vzniká C-buňka, která dále sama diferencuje v neuroblasty. B-buňky jsou multipotentní, což znamená, že se z nich mohou diferencovat odlišné linie a to: neurony, astrocyty a oligodendrocyty.

I přes obtížnou identifikaci B-buněk, z důvodu absence specifického markeru, jsou podle morfologických a imunocytochemických charakteristik definovány jako astrocyty, například exprimují GFAP. Ostatní markery jsou shrnuty v tabulce 1 (viz str. 22). Elektronová mikroskopie ukázala, že mají stejnou ultrastrukturu jako astrocyty, zahrnující svazky intermediálních filament, četné výběžky vmezeřující se mezi okolní buňky a komplex proteinů, tvořící "gap junctions" (Seri, Garcia-Verdugo et al. 2001). Nicméně od zralých astrocytů, které nevykazují neurogenní vlastnosti, se pravděpodobně odlišují. Po transplantaci zralých astrocytů do SVZ, se tyto astrocyty neurogenními nestaly a nepřevzaly funkci NSCs (Ihrie and Alvarez-Buylla 2008).

Bylo dokázáno, že většina astrocytů SVZ a radiálních astrocytů SGZ se od ostatních astrocytů liší tím, že neexprimují protein S100 β (Seri, Garcia-Verdugo et al. 2004). Toto může indikovat, že exprese proteinu S100 β značí zralé astrocyty, které nemají vlastnosti kmenových buněk. Nicméně horizontální astrocyty v SGZ se dělí a protein S100 β exprimují (Seri, Garcia-Verdugo et al. 2004). Tyto buňky mohou fungovat v SGZ jako prekurzory oligodendrocytů, protože samotné prekurzory oligodendrocytů tento protein exprimují. Což může být v rozporu s tvrzením, že exprese S100 β odlišuje zralé astrocyty od B-buněk.

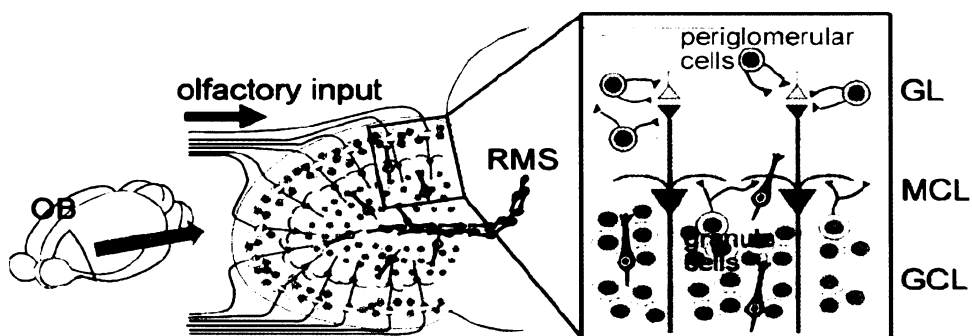
Za další specifický marker B-buněk může být považován povrchový Lewisův antigen (LeX, též znám jako CD15). Subpopulace B-buněk, které byly jak GFAP pozitivní, tak i LeX pozitivní (GFAP⁺/LeX⁺) dávala *in vitro* vznik většině neurosfér tj. mnohobuněčná sféra, která *in vitro* vytváří různé typy buněk. Z astrocytů, které byly GFAP⁺/LeX⁻ vzniklo v porovnání s GFAP⁺/LeX⁺ astrocyty velmi málo neurosfér (Imura, Nakano et al. 2006).

C-buňky

TAPs buňky se na rozdíl od B-buněk dělí velice rychle a nachází se na bázi migračního řetězce A-buněk. Během několika dní po jejich vzniku se diferencují v neuroblasty. Bylo zjištěno, že Wnt- β -catenin signalizace podporuje proliferaci a diferenciaci C-buněk, tím se zvýší jejich množství a následně se zvýší i počet A-buněk a nově vzniklých neuronů v OB (Adachi, Mirzadeh et al. 2007).

A-buňky

Migrující A-buňky jsou bipolární s protáhlým vedoucím a vlečným výběžkem a tvoří prodloužené agregáty neboli řetězce migrující v RMS. Neuroblasty, které dosáhnou OB se od řetězce odpojí a radiálně migrují do vrstvy granulárních buněk (GCL = granule cell layer) a do vrstvy glomerulárních buněk (GL = glomerular layer) (viz obr. 5). V těchto dvou oblastech se následně diferencují do dvou typů čichových interneuronů: granulární interneurony (dva podtypy: povrchové a hluboké) a periglomerulární interneurony (tři podtypy exprimující: tyrosin hydrolázu-TH⁺, kalbindin⁺, kalretinin⁺) (Kohwi, Petryniak et al. 2007). V současné době se ukazuje, že už před opuštěním SVZ je pravděpodobně určeno, kterým směrem budou neuroblasty migrovat a v který typ interneuronu diferencovat.



Obr. 5 – Neurogeneze v čichovém laloku (Kaneko and Sawamoto 2009)

V čichovém laloku (OB) se neuroblasty rozptylují radiálně, a diferencují do dvou typů čichových interneuronů: granulární buňky a periglomerulární buňky, které se usadí v GL respektive v GCL. RMS - rostrální migrační proud, MCL-vrstva mitrálních buněk

Neurony

Zda jsou nově vzniklé neurony řádně zapojeny do již existující neurální sítě a plně funkční není dosud zcela objasněno. Několik studií však dokládá, že v neurogenních oblastech vznikají zralé a funkční neurony: (1) exprimují markery zralých neuronů a to

například enolázu specifickou pro neuron (NSE = neuron specific enolase), kalbindin a NeuN (neuronal nuclei); (2) přijímají signály prostřednictvím synapsí, vyvíjejí se v elektricky aktivní neurony a funkčně se začleňují do neurální sítě; (3) mají axon; (4) v jejich cytoplasmě dochází k reverzibilnímu zvýšení extracelulární koncentrace Ca^{2+} při odpovědi na depolarizaci způsobenou K^+ , což je typické pro napětově závislé Ca^{2+} kanály; (5) v hipokampu se v souvislosti s intenzivním přemýšlením indukuje exprese brzkých genů v nově vzniklých granulárních buňkách (Jin and Galvan 2007)*.

3.5. Regulace neurogeneze

Neurogeneze je regulována celou řadou difúzních signálních molekul. Patří mezi ně cytokiny (např. interleukin-6), růstové faktory, neurotransmitery a také některé morfogeny mají významný vliv na proliferaci neurálních progenitorů.

Mezi nejdůležitější *růstové faktory* ovlivňující buněčnou proliferaci patří: EGF (epidermal growth factor), FGF (fibroblast growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor), PEDF (pigment epithelium-derived factor), PDGF (platelet-derived growth factor), SCF (stem cell factor) a BDNF (brain derived neurotrophic factor). Také oxid dusnatý (NO) a erythropoetin mají významný vliv na regulaci neurogeneze (Wiltrout, Lang et al. 2007).

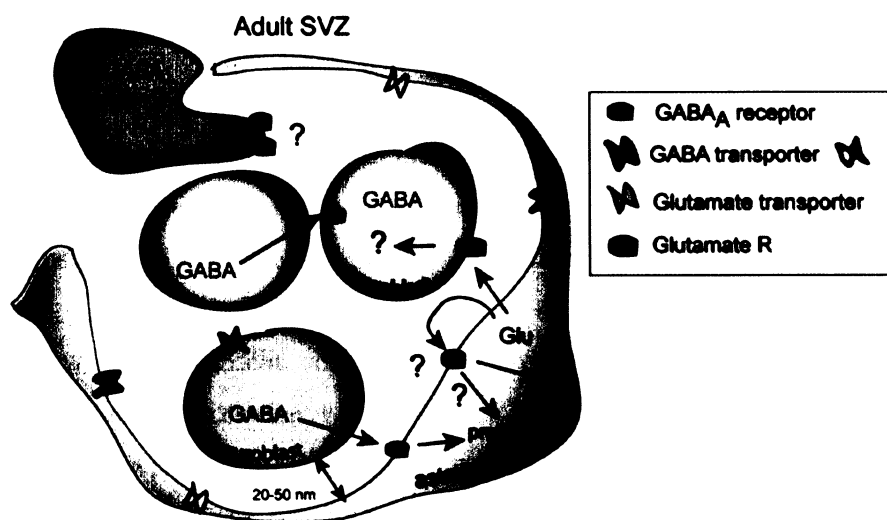
Morfogeny ovlivňující neurogenezi jsou: BMP (bone morphogenetic protein), Wnt proteiny, Notch a Sonic hedgehog. BMP a Wnt-signalizace ovlivňuje, zda z dospělých NSCs bude vznikat neurální nebo gliová linie. Wnt proteiny jsou uvolňovány astrocyty a regulují proliferaci neuroblastů v gyru dentatu, čímž podporují vznik nových neuronů (Lie, Colamarino et al. 2005). Na druhou stranu BMP podporuje diferenciaci NSCs v gliové buňky. BMP a jeho receptor jsou exprimovány buňkami v SVZ, gliogenní efekt je blokován jeho antagonistou Noggin, který je produkován ependymovými buňkami. Noggin tedy podporuje diferenciaci NSCs v neurony (Lim, Tramontin et al. 2000).

Také *neurotransmitery* jako jsou noradrenalin, serotonin a dopamin ovlivňují neurogenezi. Nicméně mezi nejdůležitější regulační neurotransmitery patří GABA, která snižuje proliferaci NSCs a neuroblastů a opačně působící glutamát. Tyto dva neurotransmitery udržují homeostázu produkce nově vzniklých neuronů (viz obr. 6) (Platel, Lacar et al. 2007). Chronické narušení rovnováhy produkce těchto neurotransmiterů může ovlivnit neurogenezi a vést k energetickému vyčerpání NSCs či pozměnit míru jejich proliferace. K porušení rovnováhy dochází například po ischemii, kdy selhává vychytávání glutamátu astrocyty a v extracelulárním prostoru dochází k akumulaci glutamátu, tzv.

glutamátové excitotoxicitě (viz patofyziologie ischemie). Je zajímavé, že u všech typů poškození mozku, které vedou ke glutamátové excitotoxicitě dochází následně ke zvýšení neurogeneze.

GABA (γ -aminomáselná kyselina) je syntetizována a uvolňována neuroblasty a parakrinně zajišťuje signalizaci jak mezi neuroblasty navzájem, tak mezi neuroblasty a astrocyty. GABA aktivuje $GABA_A$ receptor, což následně vyvolá pokles proliferace neuroblastů i astrocytů a snížení rychlosti migrace neuroblastů. Lokální $GABA_A$ ergní signalizace tedy informuje astrocyty o velikosti zásob neuroblastů a funguje jako negativní zpětná vazba. Čím více je tvořeno neuroblastů, tím více GABA je uvolňováno do extracelulárního prostoru a více $GABA_A$ receptorů je aktivováno v B-buňkách (Bordey 2006)*.

Glutamát aktivuje receptory jak ionotropní NMDA a non-NMDA (též nazýván AMPA), tak metabotropní mGluRs receptory, kterých je hned několik podtypů. Glutamát má pozitivní vliv na neurogenezi pomocí aktivace mGluR receptorů. Funkce metabotropních receptorů není zcela objasněna a zda má jejich aktivace také pozitivní vliv na vznik nových neuronů je kontroverzní (Platel, Lacar et al. 2007). Bylo ukázáno, že buňky SVZ exprimují mGlu1 a mGlu5, ale nebylo zjištěno, který buněčný typ je exprimuje. Endogenní aktivace mGlu5 receptoru podporuje přežívání neurálních progenitorů a aktivace mGlu1 receptoru udržuje proliferaci NSCs (Castiglione, Calafiore et al. 2008).



Obr. 6 – homeostatická regulace produkce neuroblastů pomocí GABA a glutamátu (Platel, Lacar et al. 2007)

Neuroblasty exprimují $GABA_A$ a glutamátový receptor v SVZ a v RMS. Neuroblasty uvolňují GABA a tím aktivují $GABA_A$ receptory na sobě a na obklopujících astrocytech. Následně tyto astrocyty uvolňují glutamát, který může aktivovat glutamátový receptor na migrujících neuroblastech. Aktivace

GABA_A receptoru vede ke snížení proliferace astrocytů a neuroblastů, zatímco aktivace mGluR zvýší počet proliferujících buněk v SVZ.

3.6. Funkční význam konstitutivní neurogeneze

V *gyru dentatu* granulórní neurony kontinuálně zanikají, a z tohoto důvodu je udržována proliferace neurálních progenitorů k udržení konstantního počtu neuronů. Pro funkční význam neurogeneze v SGZ je však důležité, že hipokampus je část limbického systému a hraje důležitou roli v učení a v paměťových procesech, a také v regulaci emocí a nálady. Proto mají nově vzniklé neurony v SGZ zřejmě vliv na schopnost se učit a na paměť. Po obohacení prostředí zvířat o různé podněty, se zlepšuje jejich paměť a schopnost učit se. A zároveň se zvyšuje míra neurogeneze v hipokampu (Shors, Miesegaes et al. 2001). Na druhou stranu neurální progenitory mohou tvořit pohotovostní rezervu, která je stimulována k nahrazení mrtvých neuronů po akutním poškození mozku.

V *čichovém laloku* nově vznikající neurony nejspíše nahrazují zaniklé neurony a jsou zodpovědné za plasticitu čichového systému. Neurogeneze v čichovém laloku je pozitivně ovlivněna prostředím bohatém na odoranty, a proto nově vzniklé interneurony zřejmě přispívají k lepšímu rozeznávání odorantů (Gheusi, Cremer et al. 2000).

4. Gliogeneze v dospělém mozku

4.1. Gliové buňky

Čtyři hlavní typy gliových buněk v CNS jsou mikroglie, astrocyty, oligodendrocyty a NG2-glie. *Mikroglie* jsou buňky monocytomakrofágového původu se schopností fagocytovat. Osídlují nervový systém z krevního řečiště před uzavřením hematoencefalické bariéry. V dospělé CNS se dále dělí, migrují do poškozených míst a fagocytují poškozenou tkáň.

Astrocyty lze rozdělit na fibrilární, vyskytující se hlavně v bílé hmotě, a protoplazmatické, lokalizované v šedé hmotě. Mají mnoho výběžků a jsou propojeny s ostatními astrocyty přes těsná spojení, tzv. "gap junction". Astrocyty se podílejí na vytváření podpůrného systému nervové tkáně a na udržování stálosti vnitřního prostředí. Slouží také jako energetická zásobárna pro neurony, protože pouze astrocyty obsahují glykogen. Jejich výběžky pomáhají tvořit hematoencefalickou bariéru. Astrocyty se za fyziologických podmínek dělí jen velmi málo.

Oligodendrocyty tvoří kolem axonů v CNS myelinovou pochvu, která umožňuje rychlejší vedení impulsů axonem. Oligodendrocyty jsou kontinuálně tvořeny v celé dospělé CNS z NG2-glií, které tvoří přibližně 5% populace gliových buněk. NG2-glie jsou velice zajímavé z hlediska jejich schopnosti dávat vznik i protoplazmatickým astrocytům a pravděpodobně i neuronům (viz 4.2.).

Astrocyty a oligodendrocyty mohou také vznikat z neurálních kmenových buněk v SGZ a v SVZ podobně jako neurony. Zda z NSCs bude vznikat neurální nebo gliální progenitor je regulováno celou řadou mechanismů, jako jsou např. morfogeny, viz kapitola 3.5.

4.2. NG2-glie

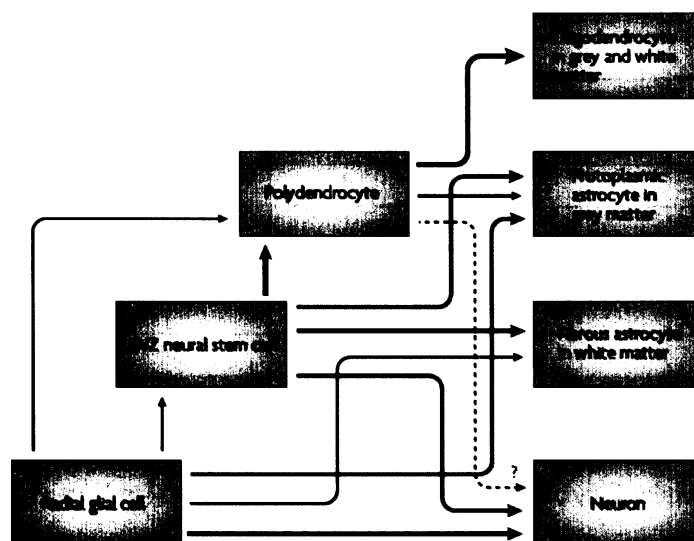
NG2-glie tvoří čtvrtý typ gliových buněk v CNS. Jsou identifikovány pomocí exprese NG2 proteoglykanu chondroitin sulfátu. Bývají též označovány jako polydendrocyty, neboť mají mnoho výběžků. Jsou mitoticky aktivní a nachází se jak v šedé, tak v bílé hmotě. NG2-glie obdržely svůj název Neuron/Glie, protože jsou přechodem mezi typickou neurální a gliovou buňkou. To může naznačovat, že existuje společný prekursor subpopulace neuronů a glií. Byly popsány dvě funkčně odlišné populace NG2-glií. První typ NG2-glií exprimuje napěťově závislé Na⁺ kanály a K⁺ kanály a po depolarizaci tvoří akční potenciály. Tento typ je schopen snímání neurální aktivity tím, že přijímá excitační a inhibiční synaptické impulzy z axonu, zatímco druhý typ akční potenciály netvoří. Je zajímavé, že při ischemii, kdy dochází ke glutamátové excitotoxicitě, je typ tvořící akční potenciály mnohem zranitelnější, protože exprimuje více glutamátových receptorů (Karadottir, Hamilton et al. 2008). NG2-glie mají schopnost sebeobnovy, neboť se dělí symetricky i asymetricky. Zda jsou NG2-glie i multipotentní, a tvoří kromě protoplasmatických astrocytů a oligodendrocytů i neurony, je stále diskutováno.

Diferenciace v oligodendrocyty – během embryonálního vývoje mozku se většina polydendrocytů diferencuje v oligodendrocyty. Polydendrocyty, které přetrvaly až do dospělosti, jsou označovány jako NG2-glie a jsou všeobecně přijímány za progenitorové buňky oligodendrocytů (OPCs = oligodendrocyte precursor cells), které tvoří oligodendrocyty v dospělé CNS. Není však jasné, zda mohou všechny diferencovat v oligodendrocyty, či zda jsou některé již terminálně diferencované polydendrocyty. Během diferenciace ve zralé

oligodendrocyty postupně přestávají exprimovat NG2 proteoglykan a začínají exprimovat antigeny zralých oligodendrocytů a myelinu.

Diferenciace v protoplasmatické astrocyty - v nedávné době bylo dokázáno, že NG2-glie také diferencují v protoplasmatické astrocyty šedé hmoty *in vitro* a *in vivo*, ale nediferencují ve fibrilární astrocyty bílé hmoty (Zhu, Bergles et al. 2008). Avšak není známo, zda jsou polydendrocyty bipotenciální buňky, které jsou schopny tvořit jak oligodendrocyty, tak protoplasmatické astrocyty, nebo jestli tvoří heterogenní populaci.

Diferenciace v neurony - několik studií podporuje myšlenku, že NG2-glie mohou diferencovat také v neurony. Například Kondo v roce 2000 izoloval OPCs z optického nervu dospělého potkana a ukázal, že specifické extracelulární signály jsou schopny tyto buňky navrátit k multipotentním neurálním buňkám, které mají schopnost sebeobnovy a dávají vznik oligodendrocytům, astrocytům, ale i neuronům (Kondo and Raff 2000). Je pravděpodobné, že v této konverzi z OPCs na NSCs hraje roli epigenetický mechanismus (Nishiyama, Komitova et al. 2009)*. Ale vzhledem k tomu, že několik studií naopak zavrhuje potenciální schopnost NG2-glií diferencovat v neurony, je potřeba dalších studií k rozhodnutí, zda jsou endogenní NG2-glie schopny tvorby neuronů *in vivo* a k porozumění mechanismu, jenž inhibuje tvorbu neurální linie z NG2-glií.



Obr. 7 – Hypotetický vztah příbuznosti různých linií CNS (Nishiyama, Komitova et al. 2009)

Na obrázku je schematicky znázorněn buněčný původ všech plně diferencovaných buněk CNS. Síla šipky znázorňuje relativní příspěvek progenitorové populace. Z polydendrocytů se diferencují

oligodendrocyty a subpopulace protoplasmatických astrocytů v šedé hmotě. Tečkovaná čára znázorňuje nejasný vznik neuronů z polydendrocytů.

5. Identifikace neurálních kmenových/progenitorových buněk

Markery neurálních kmenových/progenitorových buněk, neuronů a gliových buněk jsou shrnuty v tab. 1. Z tabulky je zřejmé, že řada markerů je koexprimována několika typy buněk.

Tab. 1 – buněčné markery

	B-buňky	C-buňky	A-buňky	Neurony	Astrocyty	NG2-glie
GAT4	+					
GFAP	+				+	
GLAST	+				+	
BLBP	+	+			+/-	
LeX	+	+				
Nestin	+	+	+		+/-	
Sox2	+	+	+		+/-	
Vimentin	+				+/-	
S100 β	+/-				+	
RC2	+				+/-	
EGFR		+				
Dlx2		+	+			
CRMP4			+			
DCX			+			
PSA-NCAM			+			
Tuj-1			+			
Kalbindin				+		
MAP-2ab				+		
NeuN				+		
NSE				+		
Olig2						+
NG2						+

Označení +/- znamená, že marker je exprimován pouze některými buněčnými subpopulacemi.

6. Patologie neurogenických oblastí

Míra neurogeneze může být ovlivněna řadou faktorů. Na *snížení* míry neurogeneze se podílí například negativní životní zkušenosti zahrnující stres, separaci od matky, chronický alkoholismus, deprese, užívání drog, ozáření, tučná strava, cukrovka atd. Naopak *zvýšit* ji

mohou pozitivní životní zkušenosti jako je: učení, prostředí bohaté na podněty a nízkokalorická strava (Wiltrout, Lang et al. 2007)*. Nejvíce ji však ovlivní patologické stavy.

Neurogenní změny v *hipokampu* jsou spojeny s neuropatologií několika psychiatrických onemocnění, které zahrnují: depresi, pocity úzkosti a schizofrenii. Všechny tyto nemoci jsou doprovázeny poklesem míry dospělé neurogeneze v hipokampu (Kaneko and Sawamoto 2009)*. Neurogenní změny v *subventrikulární zóně* jsou ovlivněny mnoha typy poškození mozku, např.: ischemií, traumatem a neurodegenerativními chorobami jako je Huntingtonova, Parkinsonova a Alzheimerova choroba. Tyto poruchy jsou charakterizovány zánikem specifických populací neuronů, nicméně v blízkosti poškozené nervové tkáně se objevují nové neurony, což nasvědčuje tomu, že potenciální možnost regenerace v savčím mozku existuje, ačkoliv je tato spontánní regenerace nedostačující k zlepšení neurogenních funkcí (Kaneko and Sawamoto 2009)*.

7. Mozková ischemie

Ischemie je definována jako nedostatečné zásobení tkání nebo orgánů kyslíkem a glukózou. Po ischemické chorobě srdeční je cévní mozková příhoda (CMP) druhou nejčastější příčinou úmrtí v České republice. CMP je v 80% případů způsobena mozkovou ischemií, ke které nejčastěji dochází po ucpání mozkové nebo krční cévy krevní sraženinou. V roce 2003 činil výskyt 300 nových případů na 100 000 obyvatel (Centrum neurologické péče v Rychnově nad Kněžnou, 2009, viz Seznam použité literatury). Přibližně 30% pacientů s mozkovou ischemií umírá a u ostatních dochází k trvalému poškození mozku. Četnost výskytu ischemie není pevně svázaná s vysokým věkem, ale může se vyskytnout i v dětství. Rozlišujeme dva typy mozkové ischemie: fokální a globální.

Fokální ischemie nastává po přechodně zastaveném nebo trvale redukovaném průtoku krve mozkovou artérií. Snížení nebo zastavení průtoku krve může být způsobeno aterosklerózou, postižením endotelu, traumatem, trombózou nebo tukovou embolií, popřípadě vniknutím cizího tělesa nebo vzduchu do cévy. Následně dojde k lokálnímu přerušení přísunu kyslíku a glukózy, což má za následek vznik nekrotického jádra, kde odumírají všechny buněčné typy a to: neurony, astrocyty, oligodendrocyty a endotelové buňky cév. Nekrotické jádro je obklopeno ischemickou hraniční zónou tzv. penumbrou, kde mohou buňky po určitou dobu přežívat. Penumbra je na rozdíl od jádra částečně prokrvována okolními cévami a prokrvení dosahuje 20-40% normální hodnoty (Hertz 2008)*. Osud ischemické penumbry je

určen během několika dní po okluzi arterie. Závisí na cévní oblasti, míře redukce průtoku krve, reperfúzi a na ostatních faktorech. Buď všechny buňky v penumbře zaniknou a jsou spojeny s ischemickým jádrem nebo může penumbra zůstat strukturně nedotčena a vykazovat jenom izolované neurální postižení. V mnoha případech je od buněčné smrti zachráněn pouze okraj penumbry. Nejčastějším modelem fokální ischemie u hlodavců je přechodná a trvalá okluze mozkových arterií (MCAO = middle cerebral artery occlusion), která vede k ischemické lézi ve striatu a v temenní oblasti kortexu.

Globální ischemie nastává po přechodném selhání krevního oběhu, hypotenzi, při šokových stavech a arytmiích, či po úrazech. V důsledku toho přestane celým mozkiem proudit krev a během deseti sekund dojde ke ztrátě vědomí. Po několika minutách dochází k ireverzibilní smrti buněk a smrt nastává přibližně po deseti minutách. Rozsah postižení se může lišit v závislosti na délce trvání ischemie, stavu cév, věku postiženého nebo jeho tělesné teplotě. Od fokální ischemie se liší absencí penumbry a tím, že dochází k náhlé obnově krevního oběhu. Po 5-10 minutách globální ischemie obvykle dochází ke smrti pyramidálních neuronů v CA1 oblasti hipokampu a také je poškozena mozková kůra, především Purkyňovy buňky (Hertz 2008)*.

7.1. Patofyziologie mozkové ischemie

Při ischemii je ohroženo přežití všech typů buněk. Patogenní mechanismus fokální ischemie je tvořen kaskádou dějů, které jsou navzájem propojeny a různě se překrývají v čase. Mezi tyto děje patří excitotoxicita vyvolaná glutamátem, snížení pH, tvorba volných radikálů a střídání depolarizace a repolarizace v penumbře, které následně vedou k apoptóze buněk penumbry. Také zánětlivé procesy, které jsou aktivovány ischemií, nejspíše přispívají k poškození mozku.

Glutamátová excitotoxicita – k udržení iontových gradientů na membráně je potřeba energie. Po jejím spotřebování dojde k rozvrácení membránového potenciálu a k depolarizaci neuronů a gliových buněk. Touto depolarizací jsou aktivovány napětově závislé vápníkové kanály na presynaptických i somato-dendritických zakončeních, které vedou k uvolnění glutamátu do extracelulárního prostoru. Vychytávání glutamátu pomocí astrocytů je však zastaveno, neboť je také závislé na přísunu energie. Dojde k výraznému zvýšení koncentrace glutamátu v extracelulárním prostoru a k aktivaci NMDA, AMPA a mGlu receptorů. NMDA receptor propouští Ca^{2+} , Na^+ a K^+ ionty a AMPA receptor Na^+ a K^+ ionty. Tok Na^+ iontů dovnitř

buňky vyvolá depolarizaci, čímž nepřímo zvýší vtok Ca^{2+} iontů do cytoplasmy (Dirnagl, Iadecola et al. 1999)*.

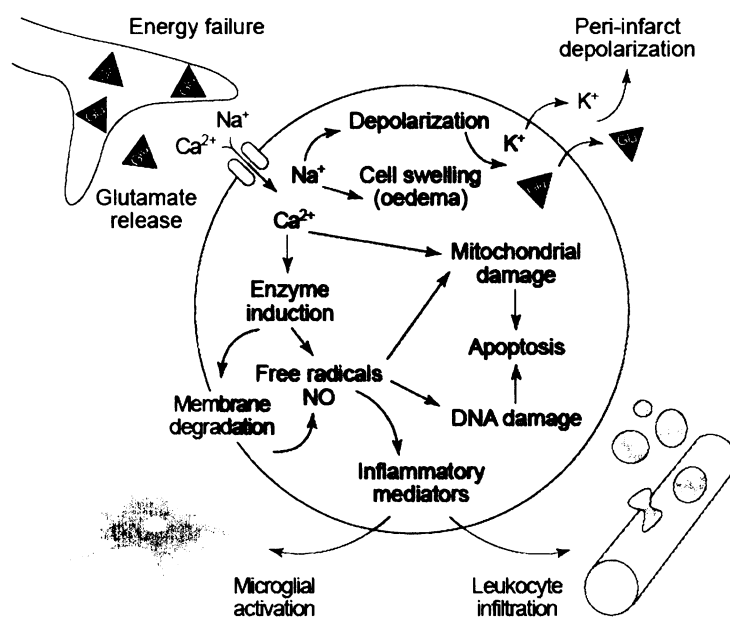
Snížení pH – v cytoplasmě buněk klesá pH, v důsledku akumulace laktátu a zvýšení koncentrace rozpustných fosfátových skupin, vzniklé po přeměně ATP na ADP a AMP. Odpovědí buňky na vysokou intracelulární aciditu je zvýšení aktivity Na^+/H^+ transportéru na plasmatické membráně, který čerpá H^+ ionty ven a Na^+ ionty do cytoplasmy. Současně je aktivovaný i $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ kotransporter. Oba tyto mechanismy vedou k velkému zvýšení intracelulární koncentrace Na^+ a následně k akumulaci Ca^{2+} v cytoplasmě činností $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiporteru. Zvýšení cytoplasmatické koncentrace Ca^{2+} iontů, které jsou univerzálním druhým poslem, vede k aktivaci mnoha cytoplasmatických a jaderných destruktivních procesů. Jako je aktivace proteolytických enzymů, které degradují cytoskeletální proteiny aktin, spektrin a extracelulární laminin (Hertz 2008)*.

Vznik volných radikálů – zvýšená intracelulární koncentrace Ca^{2+} iontů vede k jejich čerpání do mitochondrie, což je doprovázeno zvýšenou tvorbou volných radikálů. Volné radikály poškozují vnitřní mitochondriální membránu a oxidací poškozují proteiny účastnící se transportu elektronů, pumpování H^+ iontu do mezimembránového prostoru a tvorby ATP. Mitochondriální membrána se nakonec stane porézní, přestane se tvořit ATP a volné radikály se uvolní do cytoplasmy a začnou poškozovat DNA. Navíc se uvolní cytochrom C, který aktivuje apoptický proces. Vápník aktivuje enzym syntetizující oxid dusnatý, který reaguje se superoxidovým aniontem a tvoří vysoce reaktivní volné radikály, které se významně podílí na destrukci tkáně. Volné kyslíkové radikály také slouží jako důležitá signální molekula aktivující zánětlivé procesy a apoptózu.

Vznik edému – tok Na^+ a Cl^- do buňky je mnohem větší než tok K^+ iontů z buňky, což má za následek zvýšení osmolarity cytoplasmy. Proto jsou Na^+ a Cl^- ionty vstupující do cytoplasmy pasivně doprovázeny vodou a buňky zvětšují svůj objem. Dochází ke vzniku edému, který obklopuje nekrotické jádro a znesnadňuje pozdější reperfúzi, zvyšuje tlak uvnitř lebky a stlačuje cévy. Velikost edému je jeden z nejdůležitějších faktorů určujících, zda pacient přežije několik prvních hodin po fokální ischemii.

Depolarizace penumbry – neurony a gliové buňky podléhají depolarizaci. Buňky, které prodělaly anoxidativní depolarizaci v nekrotickém jádře se nikdy nerepolarizují. V penumbře, kde je průtok krve alespoň částečně zachován, může dojít k repolarizaci buněk. Stejně buňky

se však mohou znovu depolarizovat, kvůli zvýšené extracelulární koncentraci glutamátu a K^+ iontů. Dochází k sérii depolarizačních vln a jejich počet má vliv na velikost poškozené oblasti (Dirnagl, Iadecola et al. 1999)*.



Obr. 8 – Zjednodušený souhrn patofyziologických dějů po fokální mozkové ischemii (Dirnagl, Iadecola et al. 1999)

Nedostatek energie vede k depolarizaci neuronů. Po aktivaci specifických glutamátových receptorů dojde k výraznému zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} , Na^+ , Cl^- iontů. K^+ ionty jsou naopak uvolňovány do extracelulárního prostoru. Zvýšená extracelulární koncentrace K^+ iontů a glutamátu vede k sérii depolarizačních vln. Voda po osmotickém gradientu vstupuje do buňky a vyvolá mozkový edém. Ca^{2+} ionty aktivují mnoho enzymů, např.: proteázy, lipázy a endonukleázy. Volné radikály poškozují membránu, mitochondrie a DNA. Poté je aktivována apoptóza. Volné radikály také indukují tvorbu zánětlivých mediátorů, které aktivují mikroglie a vedou k invazi leukocytů z cévního řečiště.

8. Neurogeneze po ischemickém poškození mozku

Po ischemii je všeobecně stimulována proliferace progenitorových buněk a nově vzniklé buňky migrují směrem k poškozené oblasti. Zvýšenou proliferací se dospělý mozek snaží regenerovat, avšak žádné zlepšení mozkových funkcí nebylo dosud pozorováno. Hlavním problémem je, že velmi málo nově vzniklých neuroblastů přežívá v ischemickém prostředí. Po ischemii je především ovlivněna neurogeneze v SGZ a SVZ.

8.1. Subgranulární zóna

Po přechodné *globální ischemii* je asi desetkrát zvýšena míra proliferace progenitorů v SGZ. U myši začne navyšování proliferace asi 3-4 dny po ischemii, po 7-10 dnech je nejvyšší a po 3-5 týdnech se vrátí zpět na původní míru (Takagi, Nozaki et al. 1999). Míra proliferace je ovlivněna délkou trvání ischemie. Zatímco 2 minutová okluze nemá žádný vliv, 4 a 10-ti minutová okluze způsobí podobné zvýšení proliferace progenitorů (Liu, Bartels et al. 2001; Wiltrout, Lang et al. 2007). Nové buňky migrují do GCL, kde diferencují v neurony. Při globální mozkové ischemii jsou nejvíce poškozeny pyramidální neurony v CA1 oblasti hipokampu. Nakatomi v roce 2002 na potkanovi ukázal, že po intraventrikulární infúzy EGF a FGF-2, se za 28 dní po indukci ischemie objevily nové pyramidální neurony v CA1 oblasti. Tyto neurony vznikly z neurálních progenitorů PPv nebo SGZ a migrovaly do poškozené oblasti hipokampu (Nakatomi, Kuriu et al. 2002).

Po *fokální ischemii* indukované MCAO se zvýší neurogeneze v SGZ oboustranně. Proliferace neurálních progenitorů se po 7 dnech zvýší asi šestkrát, a již po 28 dnech poklesne skoro až na původní hodnotu (Takasawa, Kitagawa et al. 2002). Po prvním týdnu reperfúze začnou nově vzniklé buňky exprimovat DCX, marker C-buněk nebo migrujících A-buněk. A-buňky buď zaniknou, nebo migrují do GCL a do hilu. Po 3-4 týdnech většina nově vzniklých buněk začne exprimovat markery zralých neuronů, jako je NeuN a kalbindin. Přibližně 10-20% nově vzniklých buněk diferencuje do GFAP⁺ astrocytů v GCL a v hilu (Komitova, Perfilieva et al. 2002).

8.2. Subventrikulární zóna

Po *globální ischemii* je také v SVZ míra neurogeneze zvýšena, a následně větší počet neuroblastů migruje podél RMS do čichového laloku (Nakatomi, Kuriu et al. 2002).

Po *fokální ischemii*, která je indukovaná MCAO, dochází k postižení ve striatu a v temenní oblasti mozkové kůry, na stejné straně jako je okludovaná arterie. Ve výsledku vede okluze ke zvýšení neurogeneze v SVZ a A-buňky začnou migrovat k oblastem postižených ischemií, hlavně do striata a v malé míře i do mozkové kůry.

8.2.1. Změna proliferace B-buněk

Dva hlavní cytotkinetické parametry jsou poměr proliferujících buněk populace SVZ a délka buněčného cyklu. V dospělém potkanovi se 15-21% buněk SVZ aktivně dělí a jejich

průměrná délka buněčného cyklu je 18-21h, která zůstává relativně konstantní po celý život (Zhang, Zhang et al. 2006). Ischemie přispívá k neurogenezi tím, že zkrátí délku buněčného cyklu, pravděpodobně změnou G1 fáze a procentuálně zvyšuje počet proliferujících buněk. Dva dny po ischemii se zvýší procento proliferujících buněk na 24% a maxima 31% dosahuje po 7 dnech, po 14 dnech reperfúze je počet proliferujících buněk ~ 24%. Současně, dva dny po ischemii se zkrátí délka buněčného cyklu na 11 hodin a po čtyřech dnech se začne cyklus zase prodlužovat na původních 19 hodin (Zhang, Zhang et al. 2006). Z toho vyplývá, že ischemie aktivuje změnu délky G1 fáze buněčného cyklu B-buněk, která vede ke zvýšení počtu C-buněk a tím i k zvýšení míry neurogeneze.

8.2.2. Ependymové buňky

E-buňky jsou za fyziologických podmínek mitoticky neaktivní a nepřispívají k dospělé neurogenezi, přestože v klidu exprimují mnoho markerů B-buněk jako je *Nestin*, *Sox* geny, *Musashi-1* a *2*, *Prominin-1*(CD133) a *Notch1*(Carlen, Meletis et al. 2009)*.

Nicméně po ischemii se E-buňky oddělí do SVZ, ztratí charakteristiku ependymových buněk a začnou se dělit v astrocyty a neuroblasty (Carlen, Meletis et al. 2009). Po tomto dělení začnou dokonce exprimovat některé markery radiálních glií, GLAST a BLBP, a převezmou jejich morfologii (Zhang, Zhang et al. 2008)*. Vzhledem k tomu, že E-buňky tvoří jak neurony, tak gliové buňky, dají se považovat za NSCs. Nicméně po ischemii postrádají schopnost sebeobnovy a jejich počet klesá. Tím plně nesplňují kritéria pro NSCs (Carlen, Meletis et al. 2009). E-buňky jsou v klidovém stavu aktivně udržovány kontinuální Notch signalizací, exprimují Notch receptory. Po inhibici této signalizace v intaktním mozku se ependymové buňky začnou dělit a produkovat interneurony čichového laloku (Carlen, Meletis et al. 2009).

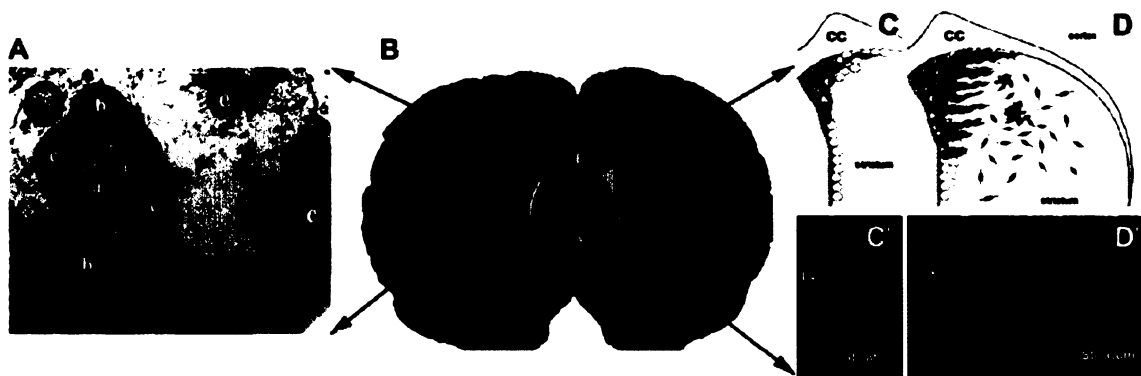
8.2.3. Migrace neuroblastů

Ischemie může vyvolat migraci tisíců neuroblastů až na 4 mm dlouhou vzdálenost napříč mozkiem, ze SVZ přes striatum, corpus callosum až do poškozené mozkové kůry (Jin, Sun et al. 2003), kde jsou v těsném kontaktu s cévami, které se "přestavují" v okolí poškození. Angiogeneze tj. vývoj a růst nových cév, je spojena s ischemií a nejspíš pozitivně ovlivňuje neurogenezi po ischemii.

Avšak mnohem častěji migrují neuroblasty na kratší vzdálenost, ze SVZ směrem k hranicím poškození ve striatu. Neuroblasty migrují v řetězcích podél krevních cév, které

hrají důležitou roli při migraci a v přežívání neuroblastů (Yamashita, Ninomiya et al. 2006). Ačkoliv tyto řetězce nejsou přímo obaleny astrocyty, jsou v kontaktu s jejich výběžky. Směr jejich migrace je určen silnými chemokiny, které jsou produkovány cévními endotelovými buňkami a to: SDF1 (stromal cell-derived factor 1) a Ang1 (Angiopoietin 1). Neuroblasty exprimují jejich receptory a jsou jimi přitahovány (Ohab, Fleming et al. 2006). Po dosažení poškozeného místa se shluknou a následně se rozptýlí a vytvoří četné a rozvětvené výběžky (viz obr. 8) (Zhang, Zhang et al. 2004).

Proč neuroblasty změni směr migrace, není dosud objasněno, ale předpokládá se, že B2-buňky ležící na rozhraní striata a migrujících neuroblastů, mohou tvořit fyzickou bariéru proti migraci neuroblastů mimo SVZ, ischemie však může tuto bariéru porušit a tím povolit migraci ke striatu (Zhang, Zhang et al. 2005). Další možností je, že po ischemii dojde ke změně exprese navigujících molekul, jako jsou Slit molekuly, které určují směr migrace neuroblastů v SVZ jako repelent (Sawamoto, Wichterle et al. 2006).



Obr. 8 – Neurogeneze v nepoškozeném a ischemickém mozku dospělého hlodavce (Zhang, Zhang et al. 2008). Na obrázku (A) je zobrazena struktura SVZ (A, B, C-buňky), (B) obrázek je koronární řez mozku, (C) a (D) zobrazuje SVZ pravé postranní komory, přičemž C je z nepoškozené a D z ischemické hemisféry, stejně tak příslušné (C') a (D'), kde jsou neuroblasty značeny fluorescenčně pomocí DCX. Neurální progenitory jsou žluté a neuroblasty červené. CC=corpus callosum, LV=postranní komora

Tyto neuroblasty jsou zřejmě schopny tvořit zralé funkční neurony, neboť bylo zjištěno, že exprimují NeuN a tvoří synaptické spoje s okolními neurony (Yamashita, Ninomiya et al. 2006). Nicméně většina neuroblastů zanikne, především apoptickým mechanismem, a jen velmi malá část přežívá 6 týdnů po ischemii (Zhang, Zhang et al. 2004). Proč je apoptóza v těchto buňkách aktivována, není známo. Nicméně je jisté, že k přežití nově namigrovaných buněk je zapotřebí správné mikroprostředí, které poskytne trofickou výživu a případně vede k začlenění do tkáně (Zhang, Zhang et al. 2005). Proto je přežití nově vzniklých buněk spojeno hlavně s jejich správnou lokalizací. Ischemie stimuluje jak

neurogenezi, tak angiogenezi, které jsou navzájem propojeny. Toto cévní mikroprostředí zřejmě přispívá k přežití a k začlenění neuroblastů do tkáně a je nejdůležitější složkou neurogenního mikroprostředí.

8.2.4. Cévní mikroprostředí

Angiogeneze v oblastech poškozených ischemií předchází zvýšení neurogeneze. Ihned po ischemii se v poškozené oblasti významně zvýší exprese genů spojených s angiogenezí, jako je BDNF, VEGF, FGF2 a EGF (Kaneko and Sawamoto 2009)*. Tyto faktory, kromě toho, že jsou angiogenní, podporují tvorbu neuronů. BDNF a VEGF, uvolňované endoteliálními buňkami, podporují sebeobnovu aNSCs tím, že inhibují jejich diferenciaci.

9. Gliogeneze po ischemickém poškození mozku

Reaktivní glióza je univerzální odpovědí na jakékoliv poškození mozku. Na reaktivní glióze se především podílejí astrocyty a NG2-glie vytvořením gliální jizvy, která zlepšuje soudržnost tkáně, snižuje zánětlivou reakci, ale na druhou stranu vytváří bariéru pro migrující neuroblasty, pro prorůstání axonů a difúzi signálních molekul (Mabuchi, Kitagawa et al. 2000; Kato, Takahashi et al. 2003). Reaktivní glióza je provázána zvýšenou proliferací gliových buněk.

9.1. Astrocyty

Astrocyty mají během ischemie a následné reperfúze rozdílný vliv na přežívání neuronů a to v závislosti na rozsahu ischemie a na časové fázi reperfúze. Za fyziologických podmínek astrocyty zajišťují vychytávání glutamátu, udržují správnou extracelulární koncentraci K^+ iontů a eliminují volné radikály. Po ischemii nervové tkáně může však být tato činnost redukována, či dokonce převrácena a astrocyty tímto mechanismem mohou přispívat ke smrti neuronů (Parpura, Scemes et al. 2004).

Astrocyty reagují na poškození mozku zvětšením objemu těla i výbežků, tento jev je znám jako "reaktivní astroglióza". Zároveň tyto reaktivní astrocyty začnou ve větší míře syntetizovat GFAP, vimentin, znovu exprimovat nestin (Eddleston and Mucke 1993) a dělit se. Dlouho bylo diskutováno, zda reaktivní astrocyty vznikají z endogenních gliálních progenitorů či z plně diferenciovaných astrocytů, které začaly po poškození proliferovat. V současné době však bylo vypořádáno, že se po poranění klidové astrocyty pocházející

z mozkové kůry začnou dělit, a tím produkovat reaktivní astrocyty (Buffo, Rite et al. 2008). Reaktivní astrocyty poté pokračují v dělení, což může znamenat určitý stupeň dediferenciace, zpět k liniím ranějšího vývoje. Takže na rozdíl od plně diferencovaných oligodendrocytů a neuronů, si astrocyty udržují schopnost reaktivní proliferace a dediferenciace. Reaktivní astrocyty získávají některé vlastnosti kmenových buněk, jako je tvorba neurosfér *in vitro*. To poukazuje na nový zdroj multipotentních buněk v mozkové kůře po zranění.

9.2. Oligodendrocyty

Oligodendrocyty jsou podobně jako neurony citlivé ke glutamátové excitotoxicitě, protože exprimují ionotropní NMDA a non-NMDA receptory, které vyvolávají excitaci vazbou glutamátu, jehož extracelulární koncentrace je po ischemii zvýšena. Navíc jsou citlivé na oxidativní stres, nedostatek energie a na aktivaci apoptotické dráhy. Smrt oligodendrocytů po mozkové ischemii, může vést k dlouhodobé ztrátě myelinu na axonech a tím i k omezení skákavého přenosu akčního potenciálu a ke zpomalení či dokonce k úplnému selhání vedení vzruchu. Excitotoxická smrt oligodendrocytů tedy přispívá k sekundárnímu poškození axonů neuronů v prostředí s nedostatkem kyslíku.

Přítomnost NG2-glií v dospělém mozku naznačuje možnost obnovy počtu oligodendrocytů po poškození. Mabuchi v roce 2000 ukázal, že týden po fokální ischemii potkana byly NG2-glie společně s reaktivními astrocyty naakumulovány v nepoškozené oblasti sousedící s oblastí, která byla po ischemii poškozená (Mabuchi, Kitagawa et al. 2000). NG2-glie společně s astrocyty tedy mohou přispět k regeneraci tkáně. Další studie dokládá, že 2 týdny po reperfúzy mají NG2-glie zvětšený objem a zbytnělé výběžky. Tyto morfologické změny, byly doprovázeny zvýšením počtu NG2-glií, ke kterému došlo po 1-2 týdnech po reperfúzi, zatímco v ischemickém jádře naopak jejich počet poklesl (Tanaka, Nogawa et al. 2001). NG2-glie se v odpovědi na demyelinizaci začnou dělit a mohou diferencovat do oligodendrocytů, což může hrát důležitou roli při remyelinizaci mozkové tkáně, která byla poškozena ischemií. Později bylo dokonce ukázáno, že se obnovuje původní počet oligodendrocytů v ischemické penumbře, což po dvou týdnech vede až k téměř kompletní obnově myelinové denzity. NG2-glie obklopující demyelinizované místo vykazují charakteristické změny pro aktivně proliferující buňky, následně migrují do penumbry, kde diferencují v oligodendrocyty (Tanaka, Nogawa et al. 2003).

9.3. Mikroglie

Velkou většinu nově vzniklých buněk po mozkové ischemii však tvoří mikroglie, které se nachází v morfoloicky poškozených i nepoškozených oblastech (Pforte, Henrich-Noack et al. 2005). Mikroglie stáhnou své výběžky a převezmou améboidní tvar těla, což je typické pro aktivované mikroglie. Tato aktivace je důležitá pro vykonávání fagocytózy a může přispět k sekundárnímu poškození mozkové tkáně např. redukcí počtu DCX pozitivních buněk, neboť 3 dny po globální ischemii bylo pozorováno významné snížení počtu těchto buněk v hipokamu (Pforte, Henrich-Noack et al. 2005).

10. Závěr

V nepoškozeném mozku probíhá neurogeneze kontinuálně z neurálních kmenových buněk pouze ve dvou oblastech v subventrikulární a subgranulární zóně. Toto prostorové omezení může být dáno tím, že v ostatních oblastech mozku chybí správné neurogenní mikroprostředí, zatímco gliogeneze probíhá v celém mozku. Zvýšená míra neurogeneze i gliogeneze po mozkové ischemii, svědčí o reparativním potenciálu mozkové tkáně, avšak tento reparativní mechanismus není dostatečný. Řada endogenních a exogenních faktorů podporuje post-ischemické reparační procesy.

Na základě poznatků, které jsou shrnuty v této práci, existují již dva hlavní postupy, vedoucí k funkčnímu obnovení mozkové tkáně. První z nich je založen na stimulaci přirozených reparačních mechanismů CNS a druhým přístupem je transplantace embryonálních/fetálních kmenových buněk do místa poškození. Další možností je implantace dospělých kmenových buněk jiného než neurálního původu, jako jsou kmenové buňky kostní dřeně a nebo geneticky modifikované fibroblasty. Pochopením přesné funkce signálních molekul, podporujících neurogenesi a také gliogenesi, by se v budoucnu mohly otevřít cesty, jak cíleně stimulovat proliferaci a diferenciaci NSCs, migraci neuroblastů do poškozené oblasti, usnadnit přežívání nově vzniklých buněk a správně propojit nově vzniklé buňky s již existující neurální sítí. K využití NG2-glií a případně reaktivních astrocytů, jako zdroje neurálních kmenových/progenitorových buněk je potřeba dalšího rozsáhlého výzkumu. NG2-glie, které mají potenciál dávat vznik oligodendrocytům a protoplasmatickým astrocytům, by za určitých okolností mohly být zdrojem i neuronům. Jejich velkou výhodou je, že jsou rovnoměrně distribuovány v nervové tkáni a mohly by tak nahradit poškozené buňky v kterékoliv oblasti CNS.

11. Seznam použité literatury

- Adachi, K., Z. Mirzadeh, et al. (2007). "Beta-catenin signaling promotes proliferation of progenitor cells in the adult mouse subventricular zone." Stem Cells **25**(11): 2827-36.
- Altman, J. (1962). "Are new neurons formed in the brains of adult mammals?" Science **135**: 1127-8.
- Bordey, A. (2006). "Adult neurogenesis: basic concepts of signaling." Cell Cycle **5**(7): 722-8.
- Buffo, A., I. Rite, et al. (2008). "Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(9): 3581-6.
- Carlen, M., K. Meletis, et al. (2009). "Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke." Nat Neurosci **12**(3): 259-67.
- Castiglione, M., M. Calafiore, et al. (2008). "Group I metabotropic glutamate receptors control proliferation, survival and differentiation of cultured neural progenitor cells isolated from the subventricular zone of adult mice." Neuropharmacology **55**(4): 560-7.
- Dirnagl, U., C. Iadecola, et al. (1999). "Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view." Trends Neurosci **22**(9): 391-7.
- Eddleston, M. and L. Mucke (1993). "Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease." Neuroscience **54**(1): 15-36.
- Eriksson, P. S., E. Perfilieva, et al. (1998). "Neurogenesis in the adult human hippocampus." Nat Med **4**(11): 1313-7.
- Gheusi, G., H. Cremer, et al. (2000). "Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(4): 1823-8.
- Hertz, L. (2008). "Bioenergetics of cerebral ischemia: a cellular perspective." Neuropharmacology **55**(3): 289-309.
- Ihrie, R. A. and A. Alvarez-Buylla (2008). "Cells in the astroglial lineage are neural stem cells." Cell Tissue Res **331**(1): 179-91.
- Imura, T., I. Nakano, et al. (2006). "Phenotypic and functional heterogeneity of GFAP-expressing cells in vitro: differential expression of LeX/CD15 by GFAP-expressing multipotent neural stem cells and non-neurogenic astrocytes." Glia **53**(3): 277-93.
- Jin, K. and V. Galvan (2007). "Endogenous neural stem cells in the adult brain." J Neuroimmune Pharmacol **2**(3): 236-42.
- Jin, K., Y. Sun, et al. (2003). "Directed migration of neuronal precursors into the ischemic cerebral cortex and striatum." Mol Cell Neurosci **24**(1): 171-89.

- Kaneko, N. and K. Sawamoto (2009). "Adult neurogenesis and its alteration under pathological conditions." Neurosci Res **63**(3): 155-64.
- Karadottir, R., N. B. Hamilton, et al. (2008). "Spiking and nonspiking classes of oligodendrocyte precursor glia in CNS white matter." Nat Neurosci **11**(4): 450-6.
- Kato, H., A. Takahashi, et al. (2003). "Cell cycle protein expression in proliferating microglia and astrocytes following transient global cerebral ischemia in the rat." Brain Res Bull **60**(3): 215-21.
- Kohwi, M., M. A. Petryniak, et al. (2007). "A subpopulation of olfactory bulb GABAergic interneurons is derived from Emx1- and Dlx5/6-expressing progenitors." J Neurosci **27**(26): 6878-91.
- Komitova, M., E. Perfilieva, et al. (2002). "Effects of cortical ischemia and postischemic environmental enrichment on hippocampal cell genesis and differentiation in the adult rat." J Cereb Blood Flow Metab **22**(7): 852-60.
- Kondo, T. and M. Raff (2000). "Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells." Science **289**(5485): 1754-7.
- Lie, D. C., S. A. Colamarino, et al. (2005). "Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis." Nature **437**(7063): 1370-5.
- Lim, D. A., A. D. Tramontin, et al. (2000). "Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis." Neuron **28**(3): 713-26.
- Liu, J., M. Bartels, et al. (2001). "Microglia/macrophages proliferate in striatum and neocortex but not in hippocampus after brief global ischemia that produces ischemic tolerance in gerbil brain." J Cereb Blood Flow Metab **21**(4): 361-73.
- Mabuchi, T., K. Kitagawa, et al. (2000). "Contribution of microglia/macrophages to expansion of infarction and response of oligodendrocytes after focal cerebral ischemia in rats." Stroke **31**(7): 1735-43.
- Menn, B., J. M. Garcia-Verdugo, et al. (2006). "Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain." J Neurosci **26**(30): 7907-18.
- Mirzadeh, Z., F. T. Merkle, et al. (2008). "Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain." Cell Stem Cell **3**(3): 265-78.
- Nakatomi, H., T. Kuriu, et al. (2002). "Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors." Cell **110**(4): 429-41.
- Nishiyama, A., M. Komitova, et al. (2009). "Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity." Nat Rev Neurosci **10**(1): 9-22.

- Nottebohm, F. (1981). "A brain for all seasons: cyclical anatomical changes in song control nuclei of the canary brain." Science **214**(4527): 1368-70.
- Ohab, J. J., S. Fleming, et al. (2006). "A neurovascular niche for neurogenesis after stroke." J Neurosci **26**(50): 13007-16.
- Ortega-Perez, I., K. Murray, et al. (2007). "The how and why of adult neurogenesis." J Mol Histol **38**(6): 555-62.
- Park, K. I. (2000). "Transplantation of neural stem cells: cellular & gene therapy for hypoxic-ischemic brain injury." Yonsei Med J **41**(6): 825-35.
- Parpura, V., E. Scemes, et al. (2004). "Mechanisms of glutamate release from astrocytes: gap junction "hemichannels", purinergic receptors and exocytotic release." Neurochem Int **45**(2-3): 259-64.
- Pforte, C., P. Henrich-Noack, et al. (2005). "Increase in proliferation and gliogenesis but decrease of early neurogenesis in the rat forebrain shortly after transient global ischemia." Neuroscience **136**(4): 1133-46.
- Platel, J. C., B. Lacar, et al. (2007). "GABA and glutamate signaling: homeostatic control of adult forebrain neurogenesis." J Mol Histol **38**(6): 602-10.
- Sanai, N., A. D. Tramontin, et al. (2004). "Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration." Nature **427**(6976): 740-4.
- Sawamoto, K., H. Wichterle, et al. (2006). "New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain." Science **311**(5761): 629-32.
- Seri, B., J. M. Garcia-Verdugo, et al. (2004). "Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus." J Comp Neurol **478**(4): 359-78.
- Seri, B., J. M. Garcia-Verdugo, et al. (2001). "Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus." J Neurosci **21**(18): 7153-60.
- Shors, T. J., G. Miesegae, et al. (2001). "Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories." Nature **410**(6826): 372-6.
- Suh, H., A. Consiglio, et al. (2007). "In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus." Cell Stem Cell **1**(5): 515-28.
- Takagi, Y., K. Nozaki, et al. (1999). "Proliferation of neuronal precursor cells in the dentate gyrus is accelerated after transient forebrain ischemia in mice." Brain Res **831**(1-2): 283-7.
- Takasawa, K., K. Kitagawa, et al. (2002). "Increased proliferation of neural progenitor cells but reduced survival of newborn cells in the contralateral hippocampus after focal cerebral ischemia in rats." J Cereb Blood Flow Metab **22**(3): 299-307.

- Tanaka, K., S. Nogawa, et al. (2001). "Activation of NG2-positive oligodendrocyte progenitor cells during post-ischemic reperfusion in the rat brain." Neuroreport **12**(10): 2169-74.
- Tanaka, K., S. Nogawa, et al. (2003). "Upregulation of oligodendrocyte progenitor cells associated with restoration of mature oligodendrocytes and myelination in peri-infarct area in the rat brain." Brain Res **989**(2): 172-9.
- Wiltout, C., B. Lang, et al. (2007). "Repairing brain after stroke: a review on post-ischemic neurogenesis." Neurochem Int **50**(7-8): 1028-41.
- Yamashita, T., M. Ninomiya, et al. (2006). "Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum." J Neurosci **26**(24): 6627-36.
- Zhang, R., Z. Zhang, et al. (2004). "Activated neural stem cells contribute to stroke-induced neurogenesis and neuroblast migration toward the infarct boundary in adult rats." J Cereb Blood Flow Metab **24**(4): 441-8.
- Zhang, R. L., Z. G. Zhang, et al. (2005). "Neurogenesis in the adult ischemic brain: generation, migration, survival, and restorative therapy." Neuroscientist **11**(5): 408-16.
- Zhang, R. L., Z. G. Zhang, et al. (2008). "Ischemic stroke and neurogenesis in the subventricular zone." Neuropharmacology **55**(3): 345-52.
- Zhang, R. L., Z. G. Zhang, et al. (2006). "Reduction of the cell cycle length by decreasing G1 phase and cell cycle reentry expand neuronal progenitor cells in the subventricular zone of adult rat after stroke." J Cereb Blood Flow Metab **26**(6): 857-63.
- Zhu, X., D. E. Bergles, et al. (2008). "NG2 cells generate both oligodendrocytes and gray matter astrocytes." Development **135**(1): 145-57.
- Centrum neurologické péče v Rychnově nad Kněžnou, 2009, online: <http://www.neurol.cz/info/cmppaccz.htm>, cit. 19. 4. 2009.