

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Veronika Dlouhá

Neurogeneze a gliogeneze po ischemickém poškození mozku u EGFP/GFAP myši

Neurogenesis and gliogenesis after ischemic brain injury in EGFP/GFAP mice

Diplomová práce

Školitel: Ing. Miroslava Anděrová Ph.D.

Praha, 2011

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

Podpis

Tato práce byla vypracována na Oddělení buněčné neurofyziologie - Laboratoř neurobiologie, v Ústavu experimentální medicíny AV ČR v Praze s podporou grantu č. GA ČR 305/09/0717.

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce Ing. Miroslavě Anděrové Ph.D., za podnětné připomínky a pečlivé pročtení rukopisu, dále za její vstřícnost a ochotu předat své zkušenosti a dovednosti, bez kterých by tato práce nemohla být sepsána.

Mé poděkování patří i kolektivu Laboratoře neurobiologie Ústavu experimentální medicíny AV ČR v Praze, a to zejména Mgr. Ivě Prajerové Ph.D. a Mgr. Pavlu Honsovi za odbornou pomoc během mé práce v laboratoři.

Obsah

Seznam použitých zkratk	6
Abstrakt	8
Abstract	10
1. Úvod	12
2. Literární úvod	13
2.1. Historie	13
2.2. Neurogeneze v dospělém mozku	13
2.2.1. Architektura a charakterizace buněk v subgranulární zóně.....	14
2.2.2. Architektura a charakterizace buněk v subventrikulární zóně	16
2.3. Gliogeneze v dospělém mozku	20
2.3.1. Astrocyty	20
2.3.2. Oligodendrocyty	20
2.3.1. NG2 gliové buňky	22
2.3.1. Mikroglie	23
2.4. Mozková ischemie	24
2.4.1. Patofyziologie mozkové ischemie	25
2.5. Změny v neurogenезi a gliogenезi po ischemickém poškození mozku	28
2.5.1. Změny v SGZ hipokampu	29
2.5.2. Změny v SVZ postranních komor	29
2.5.2.1. Změna proliferace neurálních kmenových buněk (B-buňky).....	29
2.5.2.2. Změna proliferace a migrace neuroblastů	30
2.5.2.3. Indukce proliferace ependymových buněk.....	32
2.5.3. Aktivace astrocytů	33
2.5.4. Reakce NG2 gliových buněk	33
2.5.6. Aktivace mikroglíí	33
2.6. Identifikace a funkční charakterizace buněk	34
2.6.1. Specifické markery progenitorových, neurálních a gliálních buněk	34
2.6.2. Elektrofyziologické vlastnosti buněk	37
2.6.2.1. Metoda terčíkového zámku (patch clamp)	38
2.6.2.2. Membránové vlastnosti buněk nervového systému	39
3. Cíle diplomové práce	43

4. Metody	44
4.1. Původ buněk - GFAP/EGFP transgenní myši	44
4.2. MCAO – model fokální mozkové ischemie	45
4.3. Příprava mozkových řezů pro imunohistochemické barvení	46
4.4. Izolace a kultivace progenitorových buněk	47
4.5. Elektrofyziologie	48
4.6. Imunohisto/cytochemie.....	50
4.7. Statistické analýzy.....	51
5. Výsledky	52
5.1. Imunohistochemická analýza změn po MCAO.....	52
5.1.1. Změna neurogenese v subventrikulární zóně	52
5.1.2. Změna gliogenese v mozkové kůře	56
5.1.3. Zvýšení proliferace 3 dny po MCAO	58
5.2. Charakterizace neurosfér	60
5.2.1. Imunocytochemická analýza neurosfér získaných z buněk izolovaných ze SVZ .	60
5.2.2. Imunocytochemie neurosfér z buněk izolovaných z oblasti reaktivní gliózy	61
5.2.3. Změna procentuálního zastoupení EGFP pozitivních neurosfér po MCAO	63
5.2.4. Změna velikosti neurosfér po MCAO	64
5.3. Imunocytochemická analýza diferencovaných buněk v kultuře	65
5.4. Vliv ischemie na membránové vlastnosti diferencovaných buněk	67
5.4.1. Ovlivnění membránových vlastností pasivního typu buněk po ischemii	68
5.4.2. Ovlivnění membránových vlastností komplexního typu buněk po ischemii	70
5.4.3. Ovlivnění membránových vlastností neurálního typu buněk po ischemii	72
6. Diskuze	76
6.1. Zvýšená neurogenese a gliogenese po fokální ischemii.....	76
6.2. Schopnost neurálních kmenových/progenitorových buněk tvořit neurosféry	77
6.3. Diferencované buňky jsou z imunocytochemického hlediska shodné	78
6.4. Membránové vlastnosti <i>in vitro</i> diferencovaných buněk po ischemii	78
6.4.1. GFAP/EGFP neurální kmenové buňky vykazují zvýšené K_{IR}	78
6.4.2. Přechodně se dělicí progenitory vykazují nižší K_A proudy	79
6.4.3. Membránové vlastnosti nerurálního buněčného typu jsou významně ovlivněny ...	80
7. Závěry	81
8. Přehled použité literatury	82

Seznam použitých zkratk

Ang1	angiopoientin 1 (angiopoientin 1)
Ara-C	cytarabin
BDNF	neurotrofni faktor (brain derived neurotrophic factor)
bFGF	fibroblastový rústový faktor (basic fibroblast growth factor)
BMP	kostní morfogenni protein (bone morphogenetic protein)
BLBP	protein vázající lipid (brain lipid binding ptotein)
BrdU	bromdeoxyuridin
C_m	memránová kapacita (membrane capacitance)
CMP	cévní mozková příhoda
CNS	centrální nervová soustava (central nervous system)
CRMP4	protein odpovídající na kolaspiny (collaspin response-mediated protein 4)
CXC4	CXC chemokinový receptor 4 (CXC chemokine receptor 4)
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenylindol
DCX	protein asociovaný s mikrotubuly (doublecortin)
Dlx2	transkripční faktor (Distal less 2)
EGF	epidermální rústový faktor (epidermal growth factor)
EGFP	zelený fluorescenční protein (enhanced green fluorescent protein)
EGFR	receptor epidermálního rústového faktoru (epidermal growth factor receptor)
FGF2	fibrilární rústový faktor 2 (fibrilar growth factor 2)
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	glomerulární vrstva (glomerular layer)
GLAST	glutamát-aspartátový transportér (glutamate-aspartate transporter)
IR	membránový odpor (input resistance)
K_A	rychle se aktivující/inaktivující vně usměrněné napět'ově závislé K ⁺ proudy
K_{DR}	zpožděné vně usměrněné napět'ově závislé K ⁺ proudy
K_{IR}	dovnitř usměrněné napět'ově závislé K ⁺ proudy
LeX	Lewisův antigen (Lewis X)
MAP2	protein 2, asociovaný s mikrotubuly (microtubule associated protein-2)
Mash1	(Mammalian achaete scute homolog 1)

MCAO	okluze středních mozkových arterií (middle cerebral artery occlusion)
MCL	vrstva mitrálních buněk (mitral cell layer)
ML	molekulární vrstva (molecular layer)
NeuN	marker neurálního jádra (neuronal nuclei)
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)
oIPCs	přechodný progenitor oligodendrocytů (oligodendrocytic intermediate progenitor cells)
OPC	prekurzor oligodendrocytů (oligodendrocyte precursor cell)
Pax6	(paired box 6)
PBS	fosfátový pufr (phosphate-buffered saline)
PCs	progenitorové buňky (progenitor cells)
PDGFα	růstový faktor odvozený z destiček (platelet-derived growth factor α)
PSA-NCAM	polysialová adhézní molekula neuronu (poly-sialylated-neural cell-adhesion molecule)
RC2	marker radiálních glií (radial glia marker)
RMS	rostrální migrační proud (rostral migratory stream)
SDF-1α	faktor stromálních buněk 1 α (stromal cell-derived factor 1 α)
S.E.M.	standardní chyba průměru (standard error of the mean)
SGZ	subgranulární zóna (subgranular zone)
Sox2	oblast 2 chromozomu Y určující pohlaví (sex determining region Y-box 2)
SVZ	subventrikulární zóna (subventricular zone)
TAPs	přechodně dělicí se progenitory (transit-amplifying progenitors)
VEGF	cévní endotelový růstový faktor (vascular endothelial growth factor)
V_m	membránový potenciál (membrane potential)

Abstrakt

Fokální ischemické poškození mozku zvyšuje neurogenezi/gliogenezi v subventrikulární zóně (SVZ) postranních komor a také vede k tvorbě gliální jizvy v blízkosti ischemické léze. Na tvorbě gliální jizvy se podílejí zejména reaktivní astrocyty exprimující gliální fibrilární acidický protein (GFAP), který je exprimován i v dospělých multipotentních neurálních kmenových buňkách (NSCs). Z tohoto důvodu jsme použili GFAP/EGFP transgenní myši, ve kterých je zelený fluorescenční protein (EGFP) exprimován pod kontrolou lidského promotoru GFAP, jak v astrocytech, tak v NSCs což nám umožnilo jejich okamžitou vizualizaci a sledování vlivu ischemického poškození na jejich diferenciační a proliferační potenciál *in vitro*. Fokální ischemické poškození bylo navozeno okluzí střední mozkové artérie (MCAO) a po třech dnech byla provedena imunohistochemická analýza mozku. Navíc byla provedena izolace buněk ze SVZ a z oblasti gliální jizvy, následovaná jejich kultivací v proliferačních podmínkách ve formě neurosfér, a jejich následnou diferenciací po dobu 7-10 dnů. Diferenciační potenciál těchto buněk byl studován imunocytochemickými analýzami a metodou terčíkového zámku byl sledován vliv na jejich membránové vlastnosti.

Na základě zvýšené proliferace a změně exprese specifických neurálních/gliálních markerů, jsme potvrdili že, po mozkové ischemii je zvýšena míra neurogeneze v SVZ postranních mozkových komor a gliogeneze v gliální jizvě vznikající v mozkové kůře. Dále jsme ukázali, že je v neurosférách významně zvýšena proliferace NSCs a progenitorových buněk (PCs) izolovaných ze SVZ ischemických zvířat. Průměrná velikost těchto neurosfér z myši po “sham” operaci (kontrola) byla 176,8 μm , zatímco z ischemických zvířat dosáhly signifikantně větší velikosti (222,1 μm). Navíc počet EGFP pozitivních (EGFP⁺) neurosfér byl také signifikantně větší; 17,9 % EGFP⁺ neurosfér bylo nalezeno u kontroly, zatímco po MCAO jich bylo napočítáno 32,5 %. To znamená zvýšení počtu proliferačních NSCs po ischemii. Na druhou stranu z oblasti gliální jizvy jsme získali jen velmi malý počet neurosfér, žádná z nich neexprimovala EGFP, ale exprimovaly NG2 proteoglykan. To naznačuje, že reaktivní astrocyty přítomné v gliální jizvě, nemají vlastnosti neurálních gliových buněk, ačkoliv exprimují specifické markery jako je vimentin, RC2 nebo nestin. Dále jsme po disociaci neurosfér a vysetí buněk na poly-L-lysinem potažená skla, studovali membránové vlastnosti diferencovaných buněk pomocí imunocytochemie a metody terčíkového zámku v konfiguraci „whole-cell“. Buněčná kultura ze SVZ po ischemii

obsahovala vyšší počet NSCs/astrocytů (64.2 %) a nižší počet neurálních prekursorů (20,9 %), ve srovnání s kulturou ze SVZ kontrolních myší (42.7 % NSCs/astrocytů a 40.9 % neurálních prekursorů). Navíc v odpovědi na ischemii byla v NSCs/astrocytech signifikantně zvýšena proudová hustota dovnitř usměrněných K^+ kanálů z 0.4 pA/pF u kontroly, na 2 pA/pF, zatímco v PCs a neurálních prekuzorech byla signifikantně snížena proudová hustota rychle se aktivujících/inaktivujících vně usměrněných K^+ (K_A) kanálů. V kontrole byla K_A průměrná proudová hustota v PCs 26.2 pA/pF, zatímco v kultuře z ischemické SVZ byla 3.8 pA/pF. Podobně neurální prekuzory měly v kontrole K_A proudovou hustotu 88.1 pA/pF, a po ischemii pouze 9.4 pA/pF. Ve shrnutí lze tedy říci, že ischemické poškození ovlivňuje proliferační potenciál NSCs/PCs, a zároveň má vliv i na diferenciační potenciál buněk ze SVZ, jmenovitě na jejich membránové vlastnosti.

Abstract

Focal ischemia induces enhancement of neurogenesis/gliogenesis in the subventricular zone (SVZ) of the lateral ventricle and it also leads to glial scar formation in the vicinity of the ischemic lesion. The gliotic scar is mainly formed by reactive astrocytes that express glial fibrillary acidic protein (GFAP), nevertheless this protein is also expressed in adult multipotent neural stem cells (NSCs). Therefore, we have used the strain of transgenic mice (GFAP/EGFP mice), in which the enhanced green fluorescent protein (EGFP) is expressed under human GFAP promoter in astrocytes as well as in NSCs, thus allowing us an immediate visualization of these cells, and to estimate the effect of ischemic injury on their fate during proliferation and differentiation *in vitro*. Focal ischemia was induced by the occlusion of the middle cerebral artery (MCAO) and 3 days post injury, an immunohistochemical analysis was carried out. Furthermore, the cell isolation from SVZ and the region of gliotic scar was performed, followed by their cultivation under proliferative conditions (as neurospheres) and their differentiation for 7-10 days. The differentiation potential of these cells was studied using immunocytochemical analyses and patch clamp technique was employed to estimate their membrane properties.

Based on increased proliferation and changes in the expression of specific neuronal/glia markers we have confirmed that a marked enhancement in SVZ neurogenesis and an increase in gliogenesis in the region of cortical lesion occur in response to MCAO. Furthermore, we have showed that in neurospheres, the proliferation of NSCs and progenitor cells (PCs) isolated from SVZ of ischemic animals is markedly increased. The average diameter of neurospheres obtained from sham-operated (control) mice was 176.8 μm , while in those obtained from SVZ of ischemic mice was significantly higher (222,1 μm). Moreover, the number of EGFP-positive (EGFP⁺) neurospheres also significantly increased; 17.9% of EGFP⁺ neurospheres were found in controls, while 32.5 % neurospheres was EGFP positive in those obtained after MCAO. This suggests an increase in the number of proliferative NSCs in response to ischemia. On the other hand, the number of neurospheres that were obtained from the region of gliotic scar was very low, none of the neurospheres expressed EGFP and they expressed NG2 proteoglycan. This suggests that reactive astrocytes in gliotic scar do not have the properties of NSCs, despite the fact that they express their specific markers, such as vimentin, RC2 or nestin. Furthermore, after neurosphere dissociation and cell plating onto poly-lysine coated coverslips we have

studied the membrane properties of differentiated cells using immunocytochemistry and the patch-clamp method in the whole-cell configuration. The cell culture obtained from SVZ after ischemia contained higher number of NSCs/ astrocytes (64.2 %) and lower number of neural precursors (20.9 %), when compared to that obtained from SVZ of control mice (42.7 % NSCs/astrocytes and 40.9 % neural precursors). Additionally, in response to ischemia the current densities of inwardly rectifying K^+ channels were significantly increased in NSCs/astrocytes, from 0.4 pA/pF in controls to 2 pA/pF, while in PCs and the neural precursors the current densities of fast activating/inactivating outwardly rectifying K^+ (K_A) channels were significantly lowered. In controls the average K_A current density of PCs was 26.2 pA/pF, while in the culture obtained from ischemic SVZ the K_A current density was 3.8 pA/pF. Similarly, neural precursors of controls had the K_A current density of 88.1 pA/pF and after ischemia only 9.4 pA/pF. In summary, the ischemic injury affects proliferative potential of NSCs/PCs, however it affects also the differentiation potential of cells isolated from SVZ, namely their membrane properties.

1. Úvod

Každý rok je mnoho lidí postiženo mozkovou mrtvicí, neurodegenerativními chorobami či traumatickým poškozením mozku, které vedou k úmrtí či minimálně k doživotním následkům. V současné době neexistuje žádná efektivní terapie, která by dokázala obnovit funkčnost poškozené mozkové tkáně. Proto se regenerativní medicína a výzkum neurálních kmenových buněk nyní zaměřuje na hledání nových přístupů, které by obnovily funkci neurální tkáně a umožnily pacientům vrátit se do normálního života.

Neurální kmenové/progenitorové buňky reprezentují slibný nástroj pro regenerativní medicínu. Přirozeně se vyskytují i v dospělém mozku a jsou schopny produkovat všechny buněčné typy nervového systému tj. neurony, astrocyty a oligodendrocyty. Výzkum se proto zaměřuje na zkoumání vlastností neurálních kmenových buněk, jako je proliferace, diferenciací a jejich potenciál dávat vznik funkčním buňkám v *in vitro* a v *in vivo* podmínkách, po jejich transplantaci do nervové tkáně.

Neurogeneze v dospělém mozku probíhá ve dvou oblastech: v subventrikulární zóně postranních komor a v gyru dentatu hipokampu. Po neurálním poškození mozku je míra neurogeneze v těchto oblastech přechodně zvýšena. Proto je dalším přístupem snaha o pozitivní ovlivnění endogenních reparačních mechanismů mozku, použitím různých molekul regulujících neurogenezi. Mezi tyto molekuly patří morfogeny, růstové faktory, cytokiny a různé komponenty signálních drah. Je proto důležité sledovat ovlivnění proliferace a diferenciací těmito molekulami.

Mezi nepostradatelnou součást výzkumu reparačního potenciálu, patří studování membránových vlastností neurálních kmenových buněk a buněk z nich odvozených. Zkoumá se funkční exprese membránových receptorů, iontových kanálů a jejich funkční vlastnosti.

2. Literární úvod

2.1. Historie

Do nedávné doby byl přijímán názor, že v dospělém mozku nemohou vznikat nové neurony ani gliové buňky. Předpokládalo se, že pokud byly v průběhu neurodegenerativní choroby nebo po poškození už jednou ztraceny, nemůže již dojít k jejich nahrazení novými buňkami a k regeneraci mozkové tkáně. Tuto domněnku potvrzovala histologická a anatomická studie z počátku 20. století, která ukázala, že se struktura mozkové tkáně od narození nemění (Cajal 1913). Avšak v sedmdesátých letech 20. století již bylo zjištěno, že i v dospělém mozku mohou vznikat nové buňky. První důkaz objevil Altman v roce 1960, poté co objevil v mozku dospělého potkana neuroblasty (Altman 1962). Na základě tohoto objevu se výzkum v následujících letech zaměřil na studii reparačního potenciálu centrálního nervového systému (CNS).

Teprve v roce 1981 byla prokázána tvorba nových neuronů i v dospělém jedinci, poté co v hipokampu kanárka byla pozorována větší míra neurogeneze v období páření, kdy se učí nové písně (Nottebohm 1981). Od té doby mnoho studií potvrdilo existenci kontinuální neurogeneze v určitých oblastech dospělého mozku u mnoha živočišných druhů. První důkaz o existenci neurogeneze i v lidském mozku byl proveden Erikssonem v roce 1998. Použil bromdeoxyuridin (BrdU) na označení proliferujících buněk v mozku pacientů, těsně po jejich smrti (Eriksson, Perfilieva et al. 1998). 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 gliogenezi a jejich následném využití v léčbě poškozeného CNS.

2.2. Neurogeneze v dospělém mozku

Po ukončení embryonálního vývoje pokračuje neurogeneze ve dvou hlavních oblastech mozku, a to i v dospělosti: v subgranulární zóně (SGZ; subgranular zone) gyru dentatu hipokampu a v subventrikulární zóně (SVZ; subventricular zone) postraních komor předního mozku. Buňky přítomné v těchto neurogenních oblastech vykazují vlastnosti neurálních kmenových buněk (NSCs; neural stem cells), a to jak v podmínkách *in vitro*, tak, *in vivo*. NSCs se projevují tím, že mají schopnost dlouhotrvající sebeobnovy a jsou

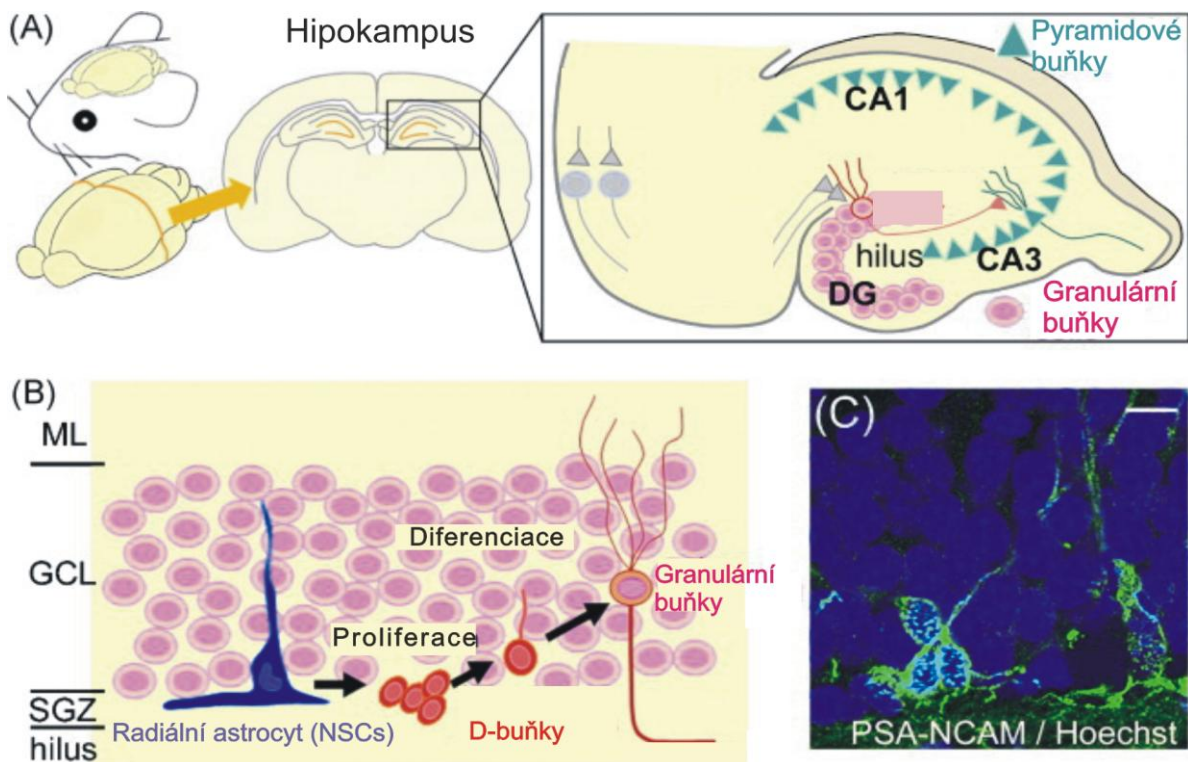
multipotentní tj. mohou diferencovat v různé buněčné linie: neurony, astrocyty a oligodendrocyty. Dělí se symetricky a asymetricky. Při symetrickém dělení vznikají dvě rovnocenné dceřiné buňky s původními vlastnostmi kmenových buněk, zatímco při asymetrickém, si pouze jedna uchovává svoje kmenové vlastnosti a z druhé vzniká přechodně se dělící progenitor (TAPs; transit-amplifying progenitors).

Podle morfologických i imunocytochemických charakteristik jsou dospělé NSCs definovány jako astrocyty. Například exprimují GFAP (glial fibrillary acidic protein), což je protein specifický pro astrocyty. Navíc podle studie pod elektronovým mikroskopem mají stejné svazky intermediálních filament, výběžky vmezeřující se mezi okolní buňky a tvoří "gap junctions" (Seri, Garcia-Verdugo et al. 2001). Nicméně bylo ukázáno, že se od zralých astrocytů, které nevykazují neurogenní vlastnosti odlišují. Pastrana v roce 2009 ukázal, že zatímco aktivní NSCs exprimují receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR; epidermal growth factor receptor), tak ostatní astrocyty v SVZ nikoliv (Pastrana, Cheng et al. 2009).

Současné studie ukazují, že i z oblastí, které nejsou primárně neurogenní jako je mozeček a mícha, mohou být izolovány buňky s kmenovým potenciálem. Tyto buňky jsou schopny tvořit v *in vitro* podmínkách mnohobuněčné neurosféry a diferencovat do neuronů, astrocytů a oligodendrocytů (Jiao and Chen 2008). Avšak pouze v SVZ a SGZ probíhá neurogeneze kontinuálně i v dospělosti.

2.2.1. Architektura a charakterizace buněk v subgranulární zóně

V této neurogenní oblasti se neurální progenitory nacházejí v subgranulární zóně, což je tenká vrstva buněk lokalizovaná mezi vrstvou granulárních buněk (GCL; granule cell layer), tvořené především neurony a hilus dentatus. Axony granulárních buněk zasahují do CA3 oblasti, kde tvoří synapse s pyramidálními neurony (**obr. 1**) (Kaneko and Sawamoto 2009).



Obr. 1 – Neurogeneze v hipokampu dospělého potkana (Kaneko and Sawamoto 2009)

(A) Axon každé granulórní buňky (růžově) zasahuje do CA3 oblasti, kde tvoří synapse s pyramidálními buňkami (tyrkysově). (B) NSCs (modře) v SGZ proliferaují a tvoří přechodné progenitory, z kterých vznikají nezralé granulórní buňky (červeně). Tyto buňky migrují do GCL, kde diferencují do zralých granulórních buněk (růžově). (C) Imunohistochemie ukazující PSA-NCAM⁺ nezralé granulórní buňky s krátkými výběžky, umístěné na rozhraní mezi SGZ a GCL (PSA-NCAM – zeleně, Hoechst – modře, měřítko je 10 μ m). **DG** – gyrus dentatus, **GCL** – vrstva granulórních buněk (granule cell layer), **SGZ** – subgranulórní zóna, **ML** – molekulární vrstva (molecular layer).

V SGZ můžeme rozlišit dvě odlišné populace NSCs, které se liší svou morfologií a to: radiální astrocyty a horizontální astrocyty. Obě populace exprimují Sox2 (sex determining region Y-box 2), Mushashi 1 (Suh, Consiglio et al. 2007) a vimentin (Seri, Garcia-Verdugo et al. 2004).

Radiální astrocyty mají velké tělo pyramidálního tvaru a hlavní radiální výběžek, který prochází skrz GCL do molekulární vrstvy (ML; molecular layer). Jejich výběžky často končí ve stěně krevních cév. Byly identifikovány jako populace NSCs v SGZ gyru dentatu hipokampu (Seri, Garcia-Verdugo et al. 2001). Exprimují nestin a markery radiálních glií tj. BLBP (brain lipid binding protein) a GFAP (Anthony, Mason et al. 2005; Suh, Consiglio et al. 2007). Několik studií ukázalo, že i Sox2 pozitivní *horizontální astrocyty*, které postrádají radiální výběžek, vykazují vlastnosti NSCs. Suh a spoluautoři v roce 2007 prokázali, že tyto astrocyty v gyru dentatu symetricky proliferaují a tak tvoří zásobu

neproliferujících buněk, jež se mohou později začít dělit. Horizontální Sox2⁺ NSCs, které proliferují *in vivo* produkují při asymetrickém dělení zejména neurony a malou část astrocytů. Zatímco během proliferace *in vitro* podmínkách jsou schopny dávat vznik neuronům, astrocytům i oligodendrocytům (Suh, Consiglio et al. 2007).

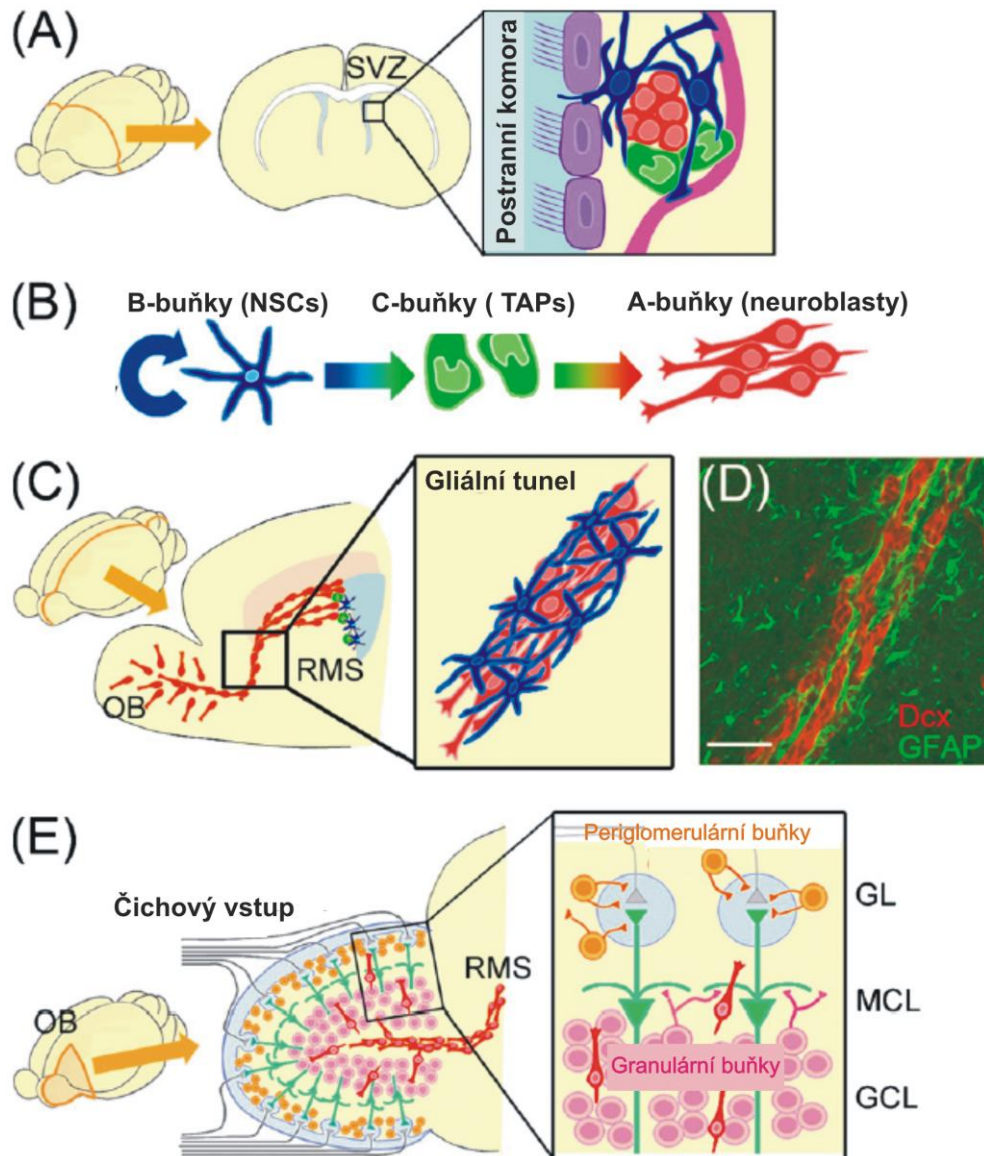
Neurogeneze probíhá přes TAPs buňky, jsou to dceřiné buňky NSCs označovány jako D-buňky (Seri, Garcia-Verdugo et al. 2001). D-buňky exprimují PSA-NCAM (poly-sialyted neural cell adhesion molecule) a tvoří těsné shluky, které jsou začleněny mezi výběžky NSCs. Během dozrávání migrují na krátkou vzdálenost do GCL, kde terminálně diferencují v nové granulární neurony. Tyto neurony vysílají dendrity do molekulární vrstvy a axony do CA3 oblasti (Seri, Garcia-Verdugo et al. 2004).

Granulární neurony kontinuálně zanikají, z tohoto důvodu je jejich konstantní počet udržován proliferací neurálních progenitorů v SGZ. Vzniklé neurony mají také zřejmě vliv na schopnost učit se a na paměť. Bylo ukázáno, že nově vzniklé neurony v hipokampu myši jsou preferenčně začleňovány do neurálních sítí, které podporují prostorovou paměť (Kee, Teixeira et al. 2007) a že zastavení neurogeneze v hipokampu vede k negativnímu ovlivnění prostorové paměti (Imayoshi, Sakamoto et al. 2008).

2.2.2. Architektura a charakterizace buněk v subventrikulární zóně

SVZ je hlavním zdrojem dospělé neurogeneze. Tvoří ji tenká vrstva buněk lokalizovaná v laterální stěně postranních komor předního mozku, směřující ke striatu (obr. 2). Mediální strana postrádá SVZ až na roh v anteriorní oblasti. U hlodavců zůstává SVZ v kontaktu s komorou a tudíž s mozkomíšním mokem pouze ve střední a posteriorní části. Anteriorní část se po narození uzavírá a tvoří rostrální migrační proud (RMS; rostral migratory stream). V RMS migrují neuroblasty do čichového laloku (OB; olfactory bulb), kde diferencují do interneuronů (Peretto, Giachino et al. 2005).

V SVZ potkana a myši se nachází 4 buněčné typy: NSCs označované jako B-buňky, přechodně se dělící progenitory (TAPs buňky) označované jako C-buňky, migrující nově vzniklé neurony (A-buňky, neuroblasty) a ependymové buňky (E-buňky, obr. 2 A-B).



Obr. 2 – Neurogeneze v dospělé SVZ (Kaneko and Sawamoto 2009)

(A) SVZ je lokalizována v postranní komoře předního mozku. Nachází se v ní 4 typy buněk: Ependymové buňky (fialově), NSCs neboli B-buňky (modře), C-buňky (zeleně) a neuroblasty (A-buňky, červeně). Růžově jsou znázorněny cévy, s kterými jsou NSCs v kontaktu. (B) NSCs při asymetrickém dělení produkují C-buňky, které proliferují a tvoří A-buňky. (C) Nově generované A-buňky v řetězcích migrují rostrálním migračním proudem (RMS) směrem k čichovému laloku (OB). Modře zbarvené NSCs je při této migraci obalují a tvoří gliální tunel. (D) Imunohistochemické barvení RMS; uvnitř jsou DCX pozitivní A-buňky migrující v řetězcích, obklopené GFAP pozitivními NSCs (měřítko je 50 μ m). (E) V OB A-buňky radiálně migrují a diferencují do granulárních a periglomerulárních buněk v GCL nebo GL. **SVZ** – subventrikulární zóna, **RMS** – rostrální migrační proud, **GCL** – vrstva granulárních buněk, **MCL** – vrstva mitrálních buněk, **GL** – glomerulární vrstva.

B-buňky jsou NSCs, které můžeme v SVZ rozdělit na dva podtypy: B1 a B2-buňky. Oba podtypy se nacházejí za tenkou vrstvou ependymových buněk, která je odděluje od komory. Exprimují markery astrocytů jako je nestin, GFAP, BLBP a GLAST (glutamate-aspartate transporter) (Pastrana, Cheng et al. 2009; Platel, Gordon et al. 2009)

a navíc povrchový Lewisův antigen X (LeX; též znám jako CD15), který je markerem embryonálních i dospělých NSCs (Capela and Temple 2006).

Podtypy se liší lokalizací a proliferační aktivitou. B1-buňky tvoří hranici mezi migrujícími neuroblasty a ependymovými buňkami, zatímco B2-buňky je oddělují od striata (**obr. 2 A**). B1-buňky jsou propojeny přes apikální výběžek, který nese několik nepohyblivých cilií s komorou a dlouhým bazálním výběžkem s krevní cévou, což jim zřejmě umožňuje reagovat na signály v extracelulární matrix nebo na signály šířené krví. Tento podtyp pomalu proliferuje a kontinuálně tvoří TAPs buňky. V přítomnosti epidermálního růstového faktoru (EGF; epidermal growth factor) tvoří *in vitro* neurosféry, které dávají vznik neuronům, astrocytům a oligodendrocytům (Haskell and LaMantia 2005). Naproti tomu B2-buňky neproliferují (Mirzadeh, Merkle et al. 2008) a nejsou schopny tvořit neurosféry a to ani v přítomnosti mnoha rozličných faktorů (Pastrana, Cheng et al. 2009).

C-buňky tj. TAPs buňky vznikají při asymetrickém dělení B-buněk. Jsou to nejvíce proliferující buňky v SVZ (Adachi, Mirzadeh et al. 2007). Tvoří malé shluky na bázi RMS a během několika dní diferencují do neuroblastů, od kterých mohou být imunocytochemicky rozeznány pomocí dvojitého barvení: C-buňky jsou Dlx2⁺/PSA-NCAM⁻ a neuroblasty Dlx2⁺/PSA-NCAM⁺ (Doetsch, Petreanu et al. 2002). V *in vivo* podmínkách odpovídají na EGF zvýšenou proliferací a sníženou tvorbou neuroblastů. V přítomnosti EGF *in vitro* jsou schopny tvořit neurosféry, které po diferenciaci dávají vznik všem třem buněčným typům (Doetsch, Petreanu et al. 2002; Haskell and LaMantia 2005).

B1-buňky a C-buňky se nachází v těsné blízkosti krevních cév, což je důležité pro jejich proliferační aktivitu. Tavazoie ukázal, že po zastavení proliferace buněk aplikací Ara-C (cytarabin), se jako první začaly dělit B-buňky, které se nacházely u cév a díky tomu, byly nově vzniklé C-buňky v kontaktu s cévním řečištěm (Tavazoie, Van der Veken et al. 2008). Kontakt s cévami je zprostředkován přes $\alpha 6 \beta 1$ integrin a je důležitý pro všechny proliferující buňky v SVZ. Pokud je tato adheze narušena a buňky se od krevních cév uvolní, dojde ke snížení jejich proliferační aktivity (Shen, Wang et al. 2008).

A-buňky mají bipolární morfologii a byly identifikovány jako neuroblasty. Exprimují PSA-NCAM, DCX (doublecortin), Dlx2 (transkripční faktor Distal less 2), β III tubulin (Pastrana, Cheng et al. 2009) a jsou také nestin pozitivní (Platel, Gordon et al. 2009). Začaly se objevovat důkazy, že také proliferují (Platel, Gordon et al. 2009) a že tato proliferace může být regulována (Ikeda, Hirota et al. 2010). A-buňky migrují v řetězcích skrz RMS do OB (**obr. 2 C**). Zde se neuroblasty odpojí a radiálně migrují do vrstvy granulárních buněk (GCL)

a glomerulárních buněk (GL; glomerular layer). V těchto dvou oblastech následně diferencují do dvou typů čichových interneuronů: granulární a periglomerulární interneurony. Populace neuroblastů není uniformní a už před opuštěním SVZ je určeno, v jaký typ čichového interneuronu budou diferencovat (**obr. 2 D**) (Merkle, Mirzadeh et al. 2007).

Nově vznikající neurony v OB nejspíš nahrazují zaniklé neurony, jsou zodpovědné za plasticitu čichového laloku a přispívají k lepšímu rozeznávání odorantů. Moreno s kolektivem prokázal, že pokud je myš vystavena prostředí, které je obohaceno odoranty, tak se zvyšuje počet interneuronů, které přežívají a preferenčně se začleňují do sítí přispívajících k rozeznávání dalších pachů (Moreno, Linster et al. 2009).

SVZ je oddělena od komory vrstvou endymových buněk (E-buňky), které jsou mitoticky neaktivní. Jsou GFAP negativní a S100 β a vimentin pozitivní. Většina endymových buněk má mnoho cilií (E1-buňky), zatímco pouze 5% má jen dvě cíle a jsou mnohem objemnější (E2-buňky). Zatímco E1-buňky přispívají k cirkulaci mozkomíšního moku v komoře, tak funkce E2-buněk není zatím známa. Koncentrační gradient proteinů vytvořený endymovými buňkami v mozkomíšním moku, zřejmě určuje směr migrace neuroblastů do OB (Sawamoto, Wichterle et al. 2006). Ve stěně komory jsou endymové buňky růžicově uspořádány. Jádro tohoto uspořádání tvoří apikální výběžky B1-buněk, nesoucí několik nepohyblivých cilií (Mirzadeh, Merkle et al. 2008). Toto uspořádání je zřejmě důležité pro komunikaci B- a E-buněk. Bylo ukázáno, že faktory uvolněné endymovými buňkami regulují počet NSCs (Kazanis and French-Constant 2011) a jsou proto důležité pro formaci a funkci SVZ. E1-buňky nesoucí mnoho cilií exprimují CD133 stejně jako B-buňky, proto se předpokládalo, že tyto buňky mohou být NSCs v G0 fázi (Coskun, Wu et al. 2008). Jiná studie ukázala, že v *in vitro* podmínkách endymové buňky prolifерují a tvoří struktury podobné sférám, nicméně tyto sféry po disociaci nedávaly vznik sekundárním neurosférám. V diferenciačních podmínkách preferenčně tvořily GFAP pozitivní buňky a nikdy neurony (Doetsch, Petreanu et al. 2002). Nicméně současné studie ukazují, že za jistých podmínek např. po ischemii, mohou prolifерovat a diferencovat v odlišné buněčné typy stejně jako NSCs. V SVZ probíhá i gliogeneze, při které vznikají jak astrocyty, tak i oligodendrocyty.

2.3. Gliogeneze v dospělém mozku

Gliové buňky plní v CNS nezastupitelnou úlohu během fyziologických i patologických stavů. Jejich důležitost je zřejmá i z faktu, že na jeden neuron připadá deset gliových buněk. Mají nejen strukturální, ale i různé specializované funkce. Jako je vyživovací funkce, zajištění homeostázy především K^+ a glutamátu, a dokonce se aktivně účastní přenosu signálů v nervové tkáni. Existují čtyři hlavní typy gliových buněk: Astrocyty, NG2-glie, oligodendrocyty a mikroglie.

2.3.1. Astrocyty

Astrocyty představují nejpočetnější typ gliových buněk, pro které je specifická exprese GFAP. U savců se vyskytují tři základní typy. *Radiální astrocyty* se nacházejí v bílé hmotě. Své výběžky vysílají k axolemě Ranvierových zářezů, výběžky obsahují četné buněčné organely a podílejí se na udržování funkčního stavu membrány axonu (Sims, Gilmore et al. 1991). Nejvíce se značí GFAP. V bílé hmotě se také nacházejí *fibrilární astrocyty*. Po imunohistochemickém barvení na GFAP mají hvězdicovitou morfologii s výběžky, které mají nepravidelný tvar i tloušťku, místy jsou "uzlíkaté". *Protoplazmatické astrocyty* jsou posledním typem a nachází v šedé hmotě. Jejich morfologie je keříčkovitá s četnými krátkými výběžky.

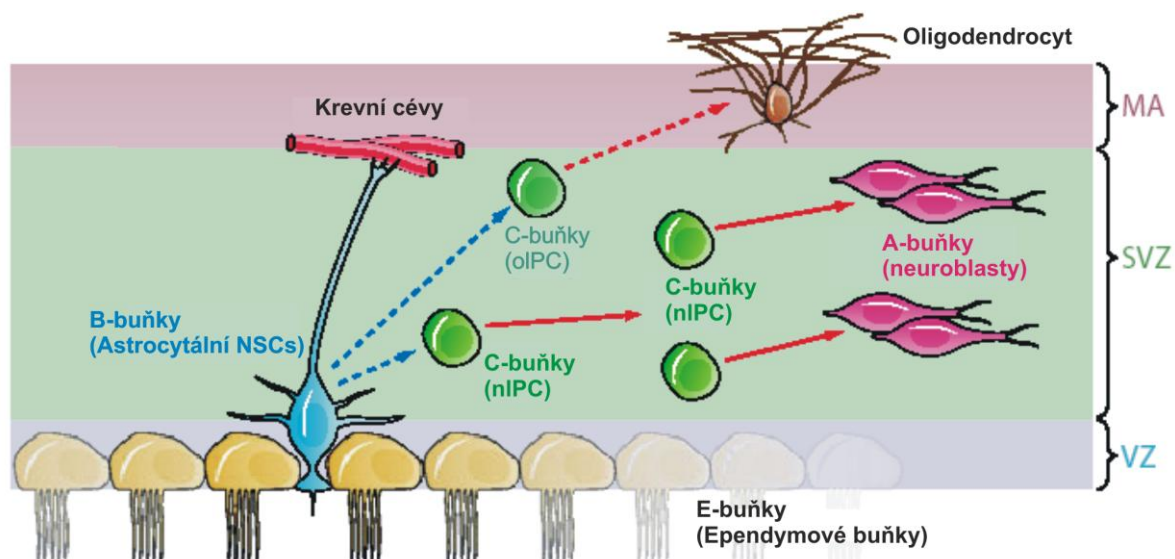
Astrocyty tvoří trojrozměrnou síť buněk, které jsou propojeny pomocí vodivých spojení "gap junction". Jejich funkcí je zajištění stálého extracelulárního prostředí, zejména prostorové pufování K^+ , Na^+ , Cl^- , Ca^{2+} , H^+ , HCO_3^- iontů a vychytávání glutamátu. Slouží jako energetická zásobárna pro neurony, protože pouze astrocyty obsahují glykogen. Jejich výběžky se podílejí na vzniku a udržení hematoencefalické bariéry. Astrocyty za fyziologických podmínek téměř neproliferují.

2.3.2. Oligodendrocyty

Jsou střední velikosti s malým počtem krátkých výběžků. Rotací výběžků kolem axonů neuronů vzniká myelinová pochva, která umožňuje rychlejší vedení impulsů axonem. Oligodendrocyt může vytvářet myelin až pro 35 axonů. Kromě toho při zvýšené neurální činnosti se mohou podílet i na zajištění metabolismu neuronů. Oligodendrocyty v dospělém organismu kontinuálně vznikají dvěma způsoby: ze subpopulace C-buněk v SVZ (viz níže)

a z NG2-glií, které tvoří přibližně 5% populace gliových buněk. Zajímavé je, že z NG2-glií mohou vznikat i protoplazmatické astrocyty a zřejmě i neurony (viz kapitola 2.3.3.).

Při asymetrickém dělení B-buněk v SVZ vznikají dvě odlišné subpopulace přechodných progenitorů (C-buňky; **obr. 3**). Liší se expresí transkripčních faktorů, které určují zda budou diferencovat v neurony nebo v oligodendrocyty. Subpopulace exprimující proneurální faktor Pax6 (Paired box 6), dává vznik A-buňkám a posléze čichovým interneuronům. C-buňky exprimující Olig2 (oligodendrocyte lineage transkription factor 2) jsou přechodné progenitorové buňky (oIPCs; oligodendrocytic intermediate progenitor cells), které migrují do corpus callosum, striata a mozkové kůry, kde terminálně diferencují v oligodendrocyty tvořící i netvořící myelinový obal. Při své migraci nejsou obklopeny astrocyty a jsou asociovány s axony (Menn, Garcia-Verdugo et al. 2006). Exprimují NG2-proteoglykan stejně jako OPCs (oligodendrocyte precursor cells). Na rozdíl od oIPCs, které aktivně proliferují pouze v SVZ, se OPCs, nazývané také NG2-glie, nachází v celém mozku v šedé i v bílé hmotě. V hipokampu zřejmě žádné oligodendrocyty nevznikají.



Obr. 3 – Schéma typů progenitorů v SVZ (Kriegstein and Alvarez-Buylla 2009)

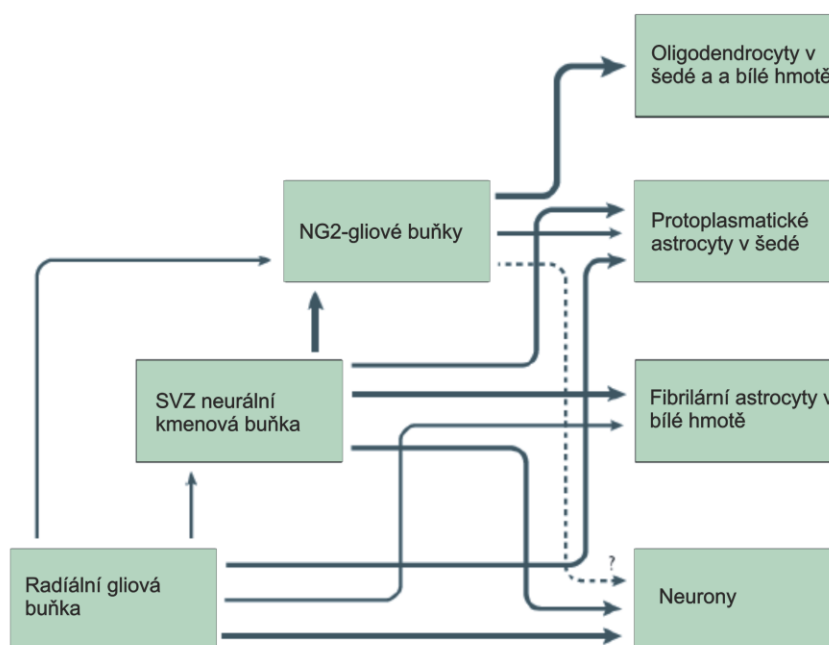
B-buňky jsou neurální kmenové buňky, které při asymetrickém dělení (vyznačeno šipkami modré barvy) dávají vznik dvěma odlišným populacím přechodných progenitorových buněk, které diferencují buď v oligodendrocyty nebo v neuroblasty. Červené šipky naznačují předpokládané symetrické dělení, avšak kolikrát se C-buňky dělí dosud není známo. **MA** – okraj (mantle), **SVZ** – subventrikulární zóna, **VZ** – ventrikulární zóna, **oIPCs** – oligodendrocytické přechodné progenitory (oligodendrocytic intermediate progenitor cells), **nIPCs** – neurální přechodné progenitory (neurogenic intermediate progenitor cells).

2.3.3. NG2 gliové buňky

NG2-glie bývají též označovány jako OPCs a nebo polydendrocyty, díky jejich morfologii s četnými výběžky. Nicméně tento typ gliových buněk je identifikován pomocí exprese NG2 proteoglykanu, který je součástí jejich plasmatické membrány. NG2 protein byl původně definován protilátkou proti buňkám, které byly typickým přechodem mezi neurální a gliovou buňkou, proto obdržel svůj název: neuron-gliální antigen 2 chondroitin sulfát proteoglykan. NG2-glie jsou heterogenní populací. Doposud byly popsány dvě populace s odlišnými elektrofyziologickými vlastnostmi. Subpopulace v šedé hmotě po depolarizaci tvoří hroty, podobné nezralým akčním potenciálům (Chittajallu, Aguirre et al. 2004). Zatímco druhá subpopulace nacházející se v bílé hmotě, má napěťově závislé Na⁺ a K⁺ kanály a po depolarizaci tvoří akční potenciály (Karadottir, Hamilton et al. 2008; Ge, Zhou et al. 2009). Tento typ se účastní synaptického vedení vzruchu a je schopen snímat synaptické impulzy neuronu. Synapse neuronů jsou z gliových buněk asociovány výlučně s NG2-gliemi, které jsou mezi sebou propojeny a tvoří unikátní gliální síť. Je pravděpodobné, že NG2-glie uvolňují modulační látky působící na synapse, jako je neurotrofní faktor BDNF (Brain derived neurotrophic factor) (Tanaka, Tozuka et al. 2009). NG2-glie mají schopnost sebeobnovy, kontinuálně proliferují i dospělém mozku a jsou studiem zájmů z hlediska tvorby nových oligodendrocytů, astrocytů a možná i neuronů.

NG2-glie tvoří oligodendrocyty v šedé i v bílé hmotě. Dále tvoří subpopulaci protoplasmatických astrocytů v šedé hmotě předního mozku a v míše (obr. 4). Avšak je překvapivé, že za fyziologických podmínek žádné astrocyty exprimující GFAP nevznikají z NG2-glií, což naznačuje, že i astrocyty jsou heterogenní populací (Zhu, Bergles et al. 2008). Zda dojde k diferenciaci v oligodendrocyty nebo v protoplasmatické astrocyty určuje transkripční faktor oligodendrocytů Olig2. Pokud je Olig2 zadržován v jádře, dojde k diferenciaci buňky v oligodendrocyt, zatímco přesun z jádra do cytoplazmy vede k diferenciaci v astrocyt (Zhao, Raha-Chowdhury et al. 2009). Nishiyama aktuálně ukázala, že diferenciaci NG2-glie je závislá i na stádium vývoje a věku organismu. V embryonálním mozku myši produkují všechny tři typy: protoplasmatické astrocyty, oligodendrocyty i NG2-glie. Zatímco v postnatálním stadiu produkují pouze NG2-glie a oligodendrocyty. Dva dny od narození se NG2-glie dělí nejdřív symetricky a po 2-3 dnech většina diferencuje v oligodendrocyty. U dospělé myši NG2-glie vzniklé symetrickým dělením jen zřídka diferencují v oligodendrocyty (Zhu, Hill et al. 2011).

Je stále předmětem studií, zda jsou NG2-glie multipotentní a vznikají z nich i neurony. Pro jejich multipotentní charakteristiky jsou minimálně dvě studie. Kondo v roce 2000 izoloval NG2-glie z optického nervu dospělého potkana a ukázal, že specifické extracelulární signály jsou schopny indukovat multipotenci u těchto buněk, které potom dávají vznik nejen oligodendrocytům a astrocytům, ale i neuronům. V druhé bylo prokázáno, že v postnatálním hipokampu dokážou NG2-glie produkovat funkční, elektricky vzrušivé neurony (Belachew, Chittajallu et al. 2003). Naopak Zhu potenciální schopnost diferencovat v neurony zavrhuje (Zhu, Bergles et al. 2008).



Obr. 4 – Hypotetický vztah příbuznosti různých linií CNS (Nishiyama, Komitova et al. 2009)

Schematické znázornění původu diferencovaných buněk v centrálním nervovém systému. Z NG2-glií diferencují oligodendrocyty a protoplasmatické astrocyty. Síla šipek znázorňuje relativní příspěvek progenitorové populace. Tečkovaná možný vznik neuronů z NG2-glií.

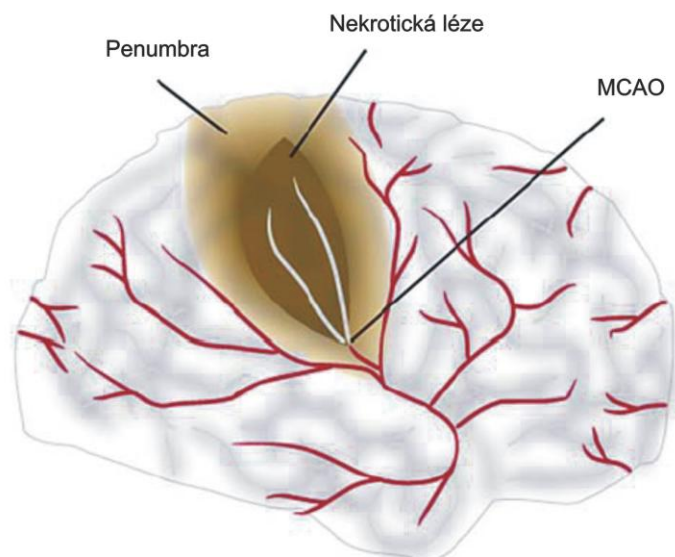
2.3.4. Mikroglie

Jsou to malé protáhlé buňky s nepravidelnými výběžky monocytomakrofágového původu. Vznikají z kmenových buněk v kostní dřeni a posléze migrují krevním řečištěm do mozku před uzavřením hematoencefalické bariéry. Účastní se imunitních dějů v nervové soustavě a vylučují množství cytokinů podporující zánětlivé procesy. Proliferují a migrují do poškozených míst, kde fagocytují poškozenou tkáň.

2.4. Mozková ischemie

Ischemie je definována jako nedostatečné zásobení tkání či orgánů kyslíkem a glukózou. Cévní mozková příhoda (CMP), je v 80% případů způsobena mozkovou ischemií. Každý rok na toto onemocnění umírá mnoho lidí. Po ischemické chorobě srdeční a zhoubných nádorech se řadí na třetí místo jako nejčastější příčina úmrtí v České republice. Ročně se u přibližně 30 000 obyvatel vyskytne CMP a asi 40% z nich na ní do jednoho roku umírá. V roce 2005 zemřelo na CMP 5 885 pacientů ([Demografický informační portál 2007](#)). Její výskyt neustále roste, ačkoliv byl v posledních 10-20 letech ve vyspělých státech zaznamenán výrazný pokles úmrtnosti, tak z těch co přežijí, má téměř polovina těžké trvalé následky. Podle průběhu mozkové ischemie ji můžeme rozlišit na fokální a globální.

Častější *fokální ischemie* je způsobena redukováním nebo zastavením průtoku krve mozkovou artérií nebo jejím protržením a následným krvácením do parenchymu mozku. Může být způsobena trombózou, tukovou embolií, aterosklerózou, traumatickým poškozením nebo vniknutím cizího tělesa či vzduchu do cévy. Po lokálním zastavení přítoku krve, která zásobuje tkáň kyslíkem a glukózou, dochází ke vzniku nekrotického jádra, kde odumírají všechny buněčné typy mozkové tkáně (**obr. 5**). V okolí nekrotického jádra se nachází ischemická hraniční zóna tzv. penumbra, která je částečně prokrvována okolními cévami. Zde mohou buňky po určitou dobu přežít. Osud penumbry závisí na mnoha faktorech jako je: cévní oblast, míra redukce průtoku krve a reperfúze. Buď penumbra zůstane strukturálně nedotčena, nebo se spojí s nekrotickým jádrem a všechny buňky v ní zahynou. Nejčastěji je zachován pouze okraj penumbry. Pro experimentální pokusy se používá model s anglickým názvem „middle cerebral artery occlusion“ MCAO neboli okluze střední mozkové artérie. Nejčastěji se k uzavření střední mozkové artérie používá filament, který se do ní zavede. Dalšími možnostmi jak provést MCAO jsou např.: injikování krevní sraženiny tzv. tromboembolický model ([Kudo, Aoyama et al. 1982](#)) nebo použitím endotelinu, který zužuje cévy ([Sharkey and Butcher 1995](#)). MCAO vede k poškození striata a přilehlé mozkové kůry v oblasti temene ([Arvidsson, Collin et al. 2002](#)).



Obr. 5 – Fokální ischemie (Mitsios, Gaffney et al. 2006)

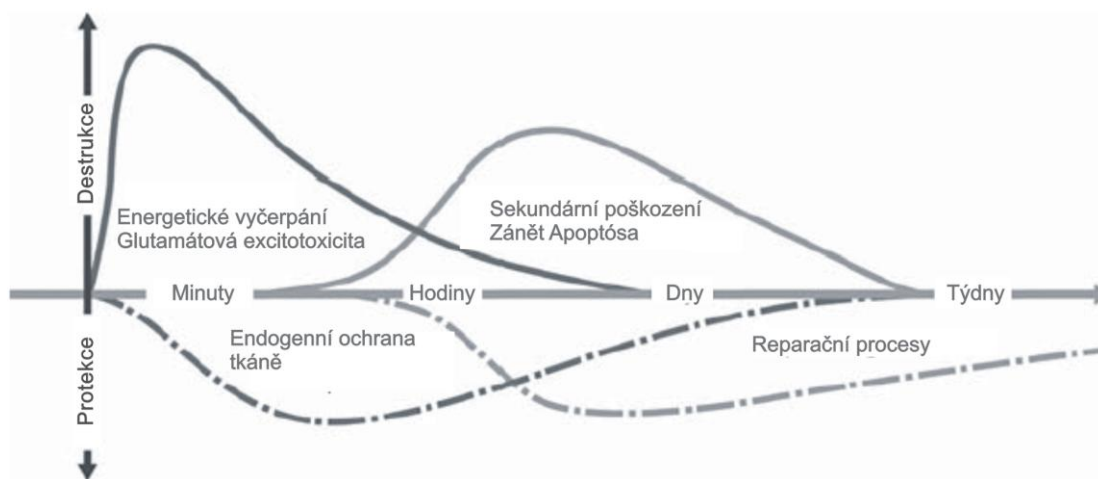
Okluze střední mozkové artérie (MCAO) vede ke vzniku nekrotické léze v přilehlé tkáni. Ta je obklopena hraniční zónou penumbrou, kde buňky většinou do několika hodin také odumírají.

Globální ischemie je způsobena přechodným selháním krevního oběhu. K takovému selhání dochází při arytmiích, šokových stavech, hypotenzi či po úrazech. Po zástavě srdeční činnosti přestává mozkem proudit krev a během deseti sekund dochází ke ztrátě vědomí. Průběh je velmi rychlý, po několika minutách začínají postupně umírat mozkové buňky a asi po deseti minutách nastává smrt. Záleží na délce trvání ischemie, stavu cév, věku postiženého a tělesné teplotě, jak velké bude poškození mozku po obnovení cévního oběhu. Od fokální ischemie se odlišuje absencí penumbry. V laboratorních podmínkách se globální ischemie provádí dvěma způsoby. V prvním případě se zastaví průtok krve oběma karotidami a současně se sníží krevní tlak prostřednictvím látky trimetafanu (Smith, Bendek et al. 1984). V druhém případě se uzavřou všechny cévy zásobující mozek. Nejprve se trvale uzavřou vertebrální cévy a po 24 hodinách se na určitou dobu uzavřou i karotidy. Mozkové buňky začínají odumírat až po několika dnech po ischemii, tato tzv. zpožděná buněčná smrt je typická pro globální ischemii. K poškození neuronů dochází zejména v hipokampu, striatu a v kortexu (Kirino and Sano 1984).

2.4.1. Patofyziologie fokální ischemie

Po fokální ischemii je ohroženo přežití všech typů buněk. Zastavení přítoku krve do mozku spouští kaskádu buněčných a molekulárních dějů, které jsou různě propojeny a překrývají se v čase. Po několika minutách od ischemie vzniká v důsledku vyčerpání energie glutamátová excitotoxicita (**viz obr. 6**), jež je doprovázená snížením pH v buňkách a vznikem volných radikálů. Tato akutní fáze trvá maximálně několik hodin, než buňky

odumřou a vznikne nekrotická léze. Avšak procesy v akutní fázi ve výsledku vedou k spuštění rozsáhlé apoptózy a zánětlivých procesů. Díky těmto mechanismům se nekrotická léze zvětšuje ještě několik dní po ischemii a dochází k dalšímu sekundárnímu poškození.

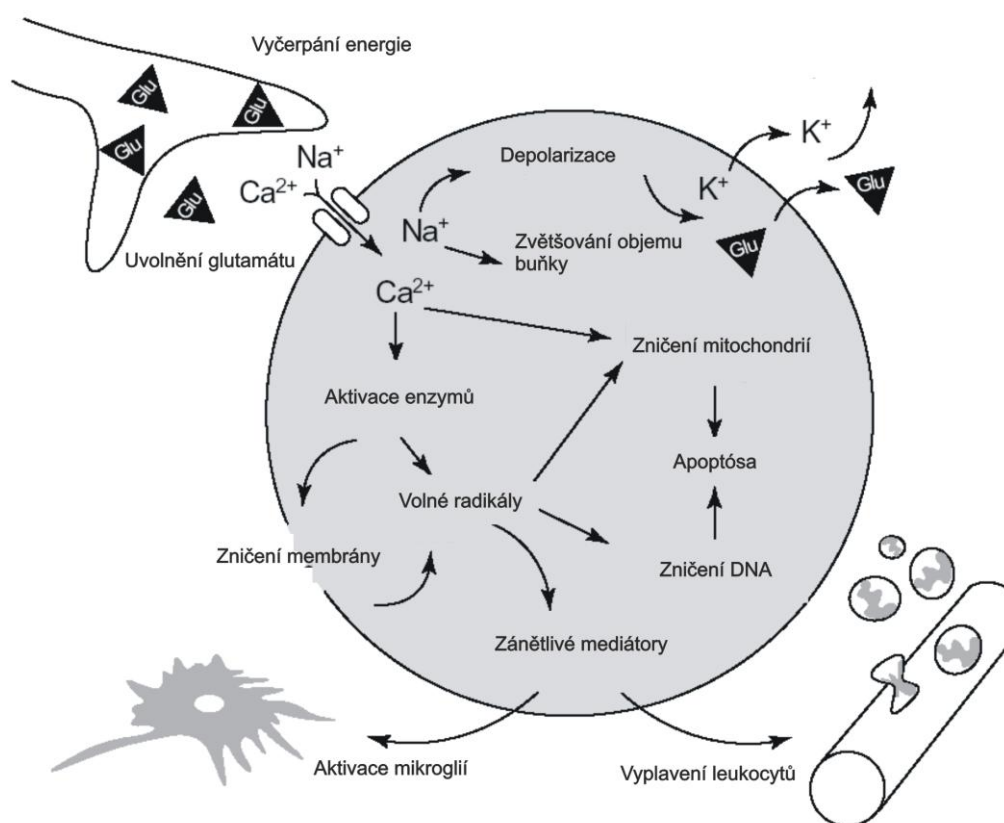


Obr. 6 – Schematický průběh patofyziologie po mozkové fokální ischemii (Endres, Engelhardt et al. 2008)

Na schématu je znázorněn časový průběh destruktivních a protektivních procesů. Akutní fáze probíhá v řádech minut po začátku ischemie a zahrnuje vyčerpání energie vedoucí ke glutamátové excitotoxicitě a další děje spouštějící apoptické a zánětlivé procesy, které často způsobí ještě větší škody než samotná akutní fáze. Toto sekundární poškození tkáně přetrvává i několik dnů. Již několik hodin po ischemii jsou spuštěny také reparační mechanismy mozku.

Akutní fáze začíná vyčerpáním energie, díky nedostatečnému zásobení tkáně glukózou a kyslíkem tj. ischemií. Energie je potřeba k udržení iontových gradientů na membráně. Po rozvrácení membránového potenciálu dochází k depolarizaci neuronů a gliových buněk. Tato depolarizace způsobí uvolnění glutamátu do extracelulárního prostoru. Vychytávání glutamátu pomocí astrocytů je však pozastaveno, neboť je také závislé na přísunu energie. Zvýšená koncentrace glutamátu v extracelulárním prostoru způsobí excitotoxicitu přes dlouhodobou aktivaci receptorů, která ve výsledku vede k uvolnění K^+ iontů z buněk a ke zvýšené koncentraci Ca^{2+} iontů v cytoplazmě buňky. K zvýšené koncentraci Ca^{2+} iontů v cytoplazmě přispívá i snížené pH v cytoplazmě buněk, které vzniká akumulací laktátu a uvolněných fosfátových skupin z přeměny ATP. Buňka zvýší aktivitu Na^+/H^+ transportéru na plasmatické membráně, který čerpá přebytečné H^+ ionty ven z buňky a naopak Na^+ ionty do cytoplazmy. Zvýšení intracelulární koncentrace Na^+ iontů aktivuje Na^+/Ca^{2+} antiporter. Ca^{2+} ionty jsou univerzálním druhým poslem a extrémní zvýšení koncentrace v cytoplazmě,

které nastává právě po ischemii, vede k aktivaci mnoha cytoplazmatických a jaderných destruktivních procesů. Dochází k aktivaci proteolytických enzymů a spuštění různých kaskád vedoucí mimo jiné k apoptóze. Odpovědí buňky na vysokou koncentraci Ca^{2+} iontů v cytoplasmě je vychytávání Ca^{2+} iontů do mitochondrií, což je doprovázeno zvýšenou tvorbou volných radikálů. Volné radikály poškozují vnitřní mitochondriální membránu, až se stane porézní. Spolu s cytochromem C, který aktivuje apoptický proces, unikají i volné radikály do cytoplazmy, začnou poškozovat DNA a ostatní struktury. Navíc i volné kyslíkové radiály slouží jako důležitá signální molekula aktivující zánětlivé procesy a apoptózu, způsobující sekundární poškození tkáně (**obr. 7**).



Obr. 7 – Souhrn patofyziologických dějů po fokální mozkové ischemii (Dirnagl, Iadecola et al. 1999)

Nedostatek energie vede ke zvýšenému množství glutamátu v extracelulárním prostoru. Díky aktivaci specifických glutamátových receptorů se zvýší intracelulární koncentrace Na^+ a Ca^{2+} , K^+ ionty jsou naopak uvolňovány do extracelulárního prostoru. Ca^{2+} ionty aktivují mnoho štěpících enzymů. Volné radikály poškozují membránu, DNA a mitochondrie což aktivuje apoptózu. Zánětlivé mediátory aktivují mikroglie, ty vylučují cytokiny, které vedou k invazi leukocytů z krevního řečiště.

Dalším negativním procesem probíhající v mozku po ischemii je vznik edému. Tok Na^+ a Cl^- iontů do buňky je větší než tok K^+ iontů z buňky, proto je v cytoplazmě vyšší osmolarita a ionty vstupující do buňky jsou pasivně doprovázené vodou. Větší objem buněk způsobuje edém obklopující nekrotické jádro a znesnadňuje pozdější reperfúzi, zvyšuje tlak uvnitř lebky a stlačuje cévy.

I přes nevratné poškození mozku, způsobené těmito destruktivními procesy, jsou už po několika dnech spuštěny reparační mechanismy mozku. Tyto mechanismy jsou zajištěné zejména zvýšením proliferace buněk a jejich diferenciací v různé buněčné typy.

2.5. Změny v neurogenezi a gliogenezi po ischemickém poškození mozku

Dospělý mozek savců už po několika hodinách po ischemickém poranění zahajuje regenerační mechanismy. Regenerace se uskutečňuje jak na buněčné úrovni, tak i na úrovni molekulární, kdy se uvolňují různé faktory a látky, které podporují buňky. Změny na buněčné úrovni zahrnují zejména: zvýšenou proliferaci progenitorů, změnu jejich diferenciačního potenciálu, změnu velikosti a tvaru gliových buněk.

Prvotní reakcí mozkové tkáně na ischemické poranění je reaktivní glióza. Vytvořením gliální jizvy se poškozená tkáň oddělí od zdravé, zlepší se soudržnost tkáně a sníží se zánětlivá reakce. Negativním důsledkem je vytvoření bariéry pro migrující neuroblasty, prorůstání axonů a difúzi signálních molekul (Mabuchi, Kitagawa et al. 2000). Reaktivní glióza je spuštěna prozánětlivými cytokiny, které jsou uvolněny z mikroglíí, makrofágů a astrocytů. Je provázena zvýšenou proliferací astrocytů, NG2-glií a mikroglíí (Amankulor, Hambardzumyan et al. 2009). Astrocyty a NG2-glie vykazují odlišné progenitorové vlastnosti v mozku za fyziologických podmínek a po poranění. V experimentálních podmínkách se ukazuje, že po poranění mají oba typy parenchymálních gliových buněk potenciál multipotentních progenitorových buněk. To naznačuje, že z nich mohou po poranění vznikat nové buňky i mimo neurogenní oblasti. Ischemie pozitivně ovlivňuje i endogenní neurogenezi v SVZ a SGZ vedoucí ke zvýšené produkci neuronů.

2.5.1. Změny v SGZ hipokampu

Po fokální mozkové ischemii indukované MCAO je míra neurogeneze v SGZ zvýšena v obou hemisférách. Neurální progenitory tj. radiální astrocyty dosahují nejvyšší míry proliferace po 7 dnech od ischemie, kdy je jejich proliferace asi šestkrát vyšší než v mozku za fyziologických podmínek a na původní hodnotu proliferace se vrací již po 28 dnech (Takasawa, Kitagawa et al. 2002). Nově vzniklé buňky mají rozličný osud. Většina buněk zahyne těsně po vzniku. Přibližně 10 – 20% z nově vzniklých buněk diferencuje v GCL a v hilu do GFAP pozitivních astrocytů (Komitova, Perfilieva et al. 2002). Po prvním týdnu reperfúze se objevují nové buňky exprimující DCX, což je marker nezralých neuronů neboli D-buněk. Migrují do GCL a do hilu a asi po 3-4 týdnech začínají exprimovat markery zralých neuronů jako NeuN (neuronal nuclei) a kalbindin (Komitova, Perfilieva et al. 2002).

2.5.2. Změny v SVZ postranních komor

Po provedení MCAO, což je experimentální model fokální ischemie, dochází ke zvýšení proliferace a neurogeneze v SVZ obou komor. Předpokládalo se, že toto zvýšení přetrvává jen krátkou dobu. Thored ve své práci z roku 2006 však ukázal, že zvýšená míra proliferace přetrvává minimálně po čtyři měsíce od ischemie (Thored, Arvidsson et al. 2006).

Začínají se zkoumat molekulární látky, které ovlivňují zvýšení proliferace v SVZ po ischemii. Doposud se stimulační vliv na neurogenezi objevil u Notch1 signalizace (Wang, Mao et al. 2009) a u velkého počtu růstových faktorů, mezi které patří mimo jiné EGF (Teramoto, Qiu et al. 2003) a VEGF (vascular endothelial growth factor) (Sun, Jin et al. 2003). Také další signalizační dráhy mají vliv na zvýšení proliferace např.: kostní morfogenní protein (Chou, Kuo et al. 2006) a Sonic hedgehog (Sims, Lee et al. 2009). V SVZ dochází po fokální ischemii ke změnám v proliferaci NSCs, neuroblastů a ependymových buněk. Také je pozměněna migrace buněk.

2.5.2.1. Změna proliferace neurálních kmenových buněk (B-buňky)

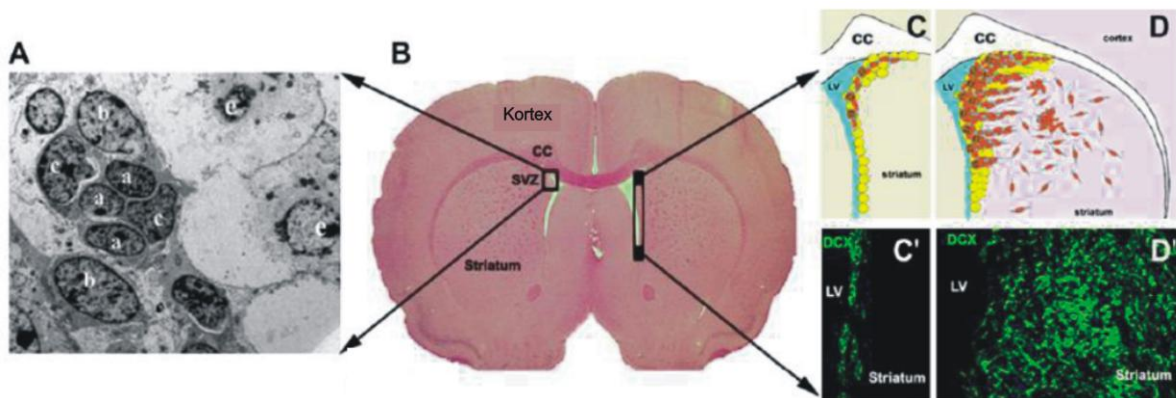
Po ischemii se mění dva cytotkinetické parametry: počet proliferujících buněk a délka trvání buněčného cyklu. Za fyziologických podmínek se v SVZ dospělého potkana aktivně dělí 15-21 % buněk. Průměrná délka buněčného cyklu je 18-21 hodin, která zůstává konstantní po celou délku života (Zhang, Zhang et al. 2006). Po ischemii dochází ke zkrácení

G1-fáze buněčného cyklu a procentuálně se zvýší zastoupení proliferujících buněk v SVZ. Dva dny po reperfúzi se zkrátí buněčný cyklus na pouhých 11 hodin, avšak toto zkrácení trvá jen velmi krátce, neboť už po čtyřech dnech se cyklus zase prodlouží na původní hodnotu. Zvýšení poměru aktivně proliferujících buněk na 24 % je dosaženo po 2 dnech od ischemie a maxima 31 % proliferujících buněk dosahuje po 7 dnech. Po 14 dnech se vrací na lehce zvýšenou hodnotu 24 %, která zůstává po určitou dobu konstantní (Zhang, Zhang et al. 2006).

2.5.2.2. Změna proliferace a migrace neuroblastů

Neuroblasty neboli A-buňky v nepoškozeném mozku migrují do OB ve formě řetězců v RMS. Po fokální ischemii však mnoho A-buněk změni směr migrace a začne migrovat směrem k poškozené oblasti. V řetězcích tak migrují do striata a do poškozené mozkové kůry. Během migrace do mozkové kůry musí neuroblasty překonat až 4 mm dlouhou vzdálenost, ze SVZ do striata a přes corpus callosum mozkové kůry (Jin, Sun et al. 2003).

Mnohem častěji buňky migrují do striata. A-buňky jsou směrem k poškozené oblasti naváděny v řetězcích a to na základě signálů zahrnující chemokiny a metaloproteázy. Signály jsou vysílány poškozenými nervovými buňkami a endotelovými buňkami při angiogenezi tj. růst a vývoj nových cév stimulovaný ischemií. Mezi faktory podílející se na směřování migrace A-buněk do poškozené oblasti, patří faktor 1α sekretovaný stromálními buňkami (SDF- 1α ; stroma cell-derived factor-1 α). Ve vyšším množství je produkován poškozenými neurony ve striatu. Faktor aktivuje chemokinový receptor CXCR4 (CXC chemokine receptor 4), který se vyskytuje v A-buňkách SVZ (Thored, Arvidsson et al. 2006). Cévní endotelové buňky vylučují silný chemokin Angiopoietin 1 (Ang1), který také udává směr migrace A-buněk (Ohab, Fleming et al. 2006). Po dosažení poškozeného místa se shluknou a následně rozptýlí, vytvoří četné výběžky a začnou diferencovat do zralých neuronů (obr. 8) (Zhang, Zhang et al. 2004).



Obr. 8 – Změna migrace A-buněk v SVZ po ischemickém poškození (Zhang, Zhang et al. 2008)

(A) Zobrazení buněčné struktury SVZ, obsahuje A-, B- a C-buňky. (B) Koronární řez mozkiem. (C) zobrazuje SVZ pravé postranní komory v nepoškozeném mozku a (D) v ischemickém mozku. Žlutě jsou znázorněny B-buňky a červeně A-buňky. Stejně tak příslušné (C') a (D'), kde jsou neuroblasty značeny fluorescenčně na DCX. CC – corpus callosum, LV – postranní komora (lateral ventricle)

A-buňky jsou při migraci v těsném spojení s cévami, což jim zajišťuje vhodné mikroprostředí, které jim umožňuje diferencovat do zralých neuronů (Arvidsson, Collin et al. 2002). Kromě směřování buněk do poškozené oblasti, se angiogeneze pozitivně podílí i na zvýšení neurogeneze po ischemii. Endotelové buňky vylučují faktory podporující tvorbu neuronů. Po ischemii se zvýší exprese FGF2 (fibrilar growth factor 2) a EGF, BDNF a VEGF (Hayashi, Noshita et al. 2003). BDNF a VEGF inhibují diferenciaci NSCs a tím podporují symetrické dělení, aby se zvětšila zásoba těchto buněk.

Je stále otázkou, z jakého důvodu změni A-buňky směr migrace. V současné době se předpokládá, že ischemie může porušit fyzickou bariéru tvořenou B2-buňkami. Ty leží na rozhraní striata a migrujících A-buněk a po porušení mohou buňky vymigrovat do striata (Zhang, Zhang et al. 2005). Další možností je zvýšení exprese Slit molekul v SVZ, které působí jako repelent na A-buňky (Sawamoto, Wichterle et al. 2006). Navíc bylo prokázáno, že se po ischemii zvýší exprese metaloproteázy 9, která narušuje strukturu extracelulární hmoty a umožňuje migraci. Po inhibování této proteázy se výrazně sníží schopnost migrace A-buněk (Lee, Kim et al. 2006).

Bohužel jen velmi malé množství nově vzniklých neuronů ve striatu přežívá, většina zanikne a pouze 0,2 % z celkového množství nových neuronů vzniklé během šesti týdnů po reperfúzy přežije a nahradí zaniklé neurony (Arvidsson, Collin et al. 2002). Nově vzniklé buňky exprimují NeuN a tvoří synaptické spoje s okolními neurony (Yamashita, Ninomiya et al. 2006). Za nízkou schopnost přežití nově vzniklých neuronů může pravděpodobně nepříznivé okolní prostředí, ve kterém jsou po ischemii škodlivé látky a je omezen přísun

výživových látek. Důležité jsou též signály pro přežití od jiných buněk neurální sítě, které jsou taktéž nedostačující (Arvidsson, Collin et al. 2002).

Ischemie ovlivňuje i míru proliferace A-buněk. Současná studie ukázala, že migrující neuroblasty exprimují cyklin dependentní inhibitor p27kip1, který indukuje výstup z buněčného cyklu (Li, Tang et al. 2009). Ischemie zapříčiní zkrácení buněčného cyklu a zvýšení četnosti zahájení buněčného cyklu. Tím se zvýší proliferace neuroblastů v SVZ (Zhang, Wang et al. 2008). Proliferace neuroblastů je zřejmě kontrolována mnoha mechanismy, které regulují vznik nových neuronů za fyziologických i patologickým podmínek.

2.5.2.3. Indukce proliferace ependymových buněk

E-buňky lemující stěny postranních komor předního mozku jsou za fyziologických podmínek mitoticky neaktivní. Současné studie ukazují, že za jistých podmínek by mohli nabýt vlastností NSCs. V klidu exprimují mnoho faktorů, které exprimují B-buňky jako je Nestin (Johansson, Momma et al. 1999), Sox geny (Ferri, Cavallaro et al. 2004), Mushashi-1 a 2 (Sakakibara, Nakamura et al. 2002), Prominin-1 (Weigmann, Corbeil et al. 1997) a Notch1 (Johansson, Momma et al. 1999).

Kontinuální kanonická Notch signalizační dráha udržuje tyto buňky v klidovém stavu. Nicméně po ischemii je tato dráha inhibována. E-buňky se posléze uvolní ze stěny komory a migrují do SVZ, kde proliferují a diferencují v astrocyty a neuroblasty (Carlen, Meletis et al. 2009). Navíc se svou morfologií začnou podobat B-buňkám a dokonce spustí expresi dalších markerů B-buněk GLAST (glutamate-aspartate transporter) a BLBP (Zhang, Zhang et al. 2007). Další studie ukázala, že po vytvoření nekrotické léze a následné infúzi transformujícího růstového faktoru α (Gleason, Fallon et al. 2008), začaly E-buňky v ependymové vrstvě proliferovat symetricky i asymetricky. Progenitor vzniklý z asymetrického dělení následně migroval do SVZ, kde se dál mitoticky dělil a produkoval nové neurony. Přestože jsou ependymové buňky schopny tvořit gliové buňky i neurony, nedají se považovat za plnohodnotné NSCs, protože mají po ischemii omezenou schopnost sebeobnovy a jejich počet postupně klesá.

2.5.3. Aktivace astrocytů

Astrocyty jsou základní složkou reaktivní gliózy a podílejí se na tvorbě gliální jizvy. Po ischemickém poškození zvětší svůj objem a ve větší míře exprimují GFAP (Pforte, Henrich-Noack et al. 2005). Tyto reaktivní astrocyty aktivně proliferují, což může znamenat jistý stupeň dediferenciace zpět k ranějším liniím. Tato teorie je potvrzena zjištěním, že reaktivní astrocyty začnou znovu exprimovat nestin, vimentin a BLBP, což jsou markery B-buněk (Burns, Murphy et al. 2009). A také mají schopnost tvořit neurosféry *in vitro*. Dlouho bylo diskutováno, zda reaktivní astrocyty vznikají z plně diferencovaných astrocytů či z endogenní zásoby gliálních progenitorů. Nyní je již známo, že se klidové astrocyty z mozkové kůry začnou po ischemii dělit a produkovat reaktivní astrocyty (Buffo, Rite et al. 2008). To poukazuje na nový zdroj progenitorových buněk v mozkové kůře po poranění.

2.5.4. Reakce NG2 gliových buněk

Oligodendrocyty jsou velice náchylné na oxidativní stres. Přítomnost NG2-glií neboli prekurzorů oligodendrocytů naznačuje možnost obnovy počtu oligodendrocytů po poškození. V ischemickém mozku mění NG2-glie svou morfolonii. Mají zvětšený objem a zbytnělé výběžky. NG2-glie se po ischemii akumulují na rozhraní poškozené a nepoškozené tkáně tj. v penumbře, zatímco v nekrotické lézi naopak jejich počet klesá. Nárůst počtu NG2-glií v penumbře je nejvyšší mezi 3. a 7. dnem po ischemii (Ohta, Iwai et al. 2003). NG2-glie reagují na demyelinizaci tkáně, začnou se dělit a produkovat nové oligodendrocyty. Tato schopnost může být důležitá pro remyelinizaci poškozené tkáně ischemií. Dále bylo ukázáno, že po dvou týdnech dochází k téměř kompletní obnově myelinové denzity v ischemické penumbře (Tanaka, Nogawa et al. 2003). Kromě penumbry se NG2-glie aktivně dělí a produkují astrocyty a oligodendrocyty i v gliální jizvě v mozkové kůře. NG2-glie společně s astrocyty tedy mohou přispět k regeneraci mozkové tkáně.

2.5.5. Aktivace mikroglíí

Mikroglie tvoří většinu nově vzniklých buněk po mozkové ischemii. Vyskytují se v poškozených i v nepoškozených oblastech mozku (Pforte, Henrich-Noack et al. 2005). Prudká mikroglíální reakce na poškození tkáně je doprovázená aktivací mikroglíí. Aktivované mikroglie stáhnou výběžky a zaujmou améboidní tvar těla a migrují k poškozené oblasti,

kde fagocytují mrtvou tkáň. Fagocytóza zprostředkovaná mikroglie však může přispět k sekundárnímu poškození tkáně. Jen některé mikroglie jsou aktivovány, ostatní dále přetrvávají v klidovém stavu a jsou připraveny pro případnou aktivaci.

2.6. Identifikace a funkční charakterizace buněk

Řada markerů používaných pro identifikaci jednotlivých typů progenitorových buněk jsou exprimovány několika typy buněk (**tab. 1; 2**). Proto je jejich jednoznačná identifikace komplikovaná. Nicméně i pokud se jednoznačná identifikace povede, tak stále nic nevíme o jejich funkčních vlastnostech. Proto je nezbytné zjistit i jejich elektrofyziologické vlastnosti (kap. 2.6.2.).

2.6.1. Specifické markery progenitorových, neurálních a gliálních buněk

GFAP (gliální fibrilární acidický protein) je díky své specifitě a hojnému množství nejpoužívanějším markerem astrocytů. Jedná se o protein intermediálních filament typu III. Tvoří homodimery nebo heterodimery s dalšími proteiny typu III nebo s neurofilamenty. Je exprimován zejména v astrocytech, ale také v menší míře v periferním nervovém systému ve Schwannových buňkách ([Jessen and Mirsky 1985](#)). Existuje velké množství izoforem, které vznikají alternativním sestřihem mRNA. Expze jednotlivých izoforem je vázána na určité druhy buněk ([Hol, Roelofs et al. 2003](#)). Jeho přítomnost zajišťuje astrocytům mechanickou odolnost, udržuje jejich tvar a tím funkčnost hematoencefalické bariéry. Množství GFAP v buňce je regulováno mnoha procesy např. změnou hladin hormonů a cytokinů. Ke zvýšené expresi tohoto proteinu dochází při aktivaci astrocytů během reaktivní astrogliózi. Během vývoje je v nezralých gliových buňkách, stejně tak jako v gliomech s GFAP kolokalizován vimentin, ale ve zralých astrocytech se již nenachází ([Reeves, Helman et al. 1989](#)). To může indukovat, že dimery složené z vimentinu a GFAP, mají jinou funkci než GFAP nebo vimentin jednotlivě.

Vimentin je marker NSCs ([Seri, Garcia-Verdugo et al. 2004](#)). Je to protein intermediálních filament typu III. V dospělém jedinci se vyskytuje spíše jako kopolymer s jinými proteiny intermediálních filament hlavně III. a IV. typu. Je charakteristický pro

leukocyty, endotheliální buňky cév a některé epitheliálních buňky a pro buňky mesenchymálního původu jako jsou fibroblasty.

RC2 (radial glial cell marker 2) je protein asociovaný s intermediálními filamenty. Tento protein je specificky exprimován v radiálních gliích, které během embryonálního vývoje CNS pomáhají migraci neuronů. Radiální glie se během vývoje nacházejí ve ventrikulární zóně a krátce po narození diferencují do parenchymálních astrocytů a ependymových buněk. Jen malá část je odsunuta za vrstvu ependymových buněk a zachovává si původní vlastnosti včetně exprese tohoto proteinu: NSCs/B-buňky (Hartfuss, Galli et al. 2001).

BLBP (Brain lipid binding protein) je malý cytoplazmatický protein vázající dlouhé řetězce mastných kyselin a dalších hydrofobních ligandů. Během embryonálního vývoje CNS je exprimován v radiálních galiích a je nezbytný pro migraci nezralých neuronů. Používá se jako marker radiálních glií v embryonální CNS (Hartfuss, Galli et al. 2001) či neurálních progenitorů v dospělé CNS (Anthony, Mason et al. 2005; Platel, Gordon et al. 2009).

Nestin se používá zejména jako marker proliferujících a migrujících buněk. Jedná se o protein intermediálních filamentů typu IV. Tvoří homodimery a také heterodimery s vimentinem. Je exprimován mnoha buněčnými typy v průběhu vývoje, ale jen po přechodnou dobu. V dospělém organismu se exprimuje jen na několika místech, zahrnujících SVZ a SGZ. Exprimují ho reaktivní astrocyty, NSCs, TAPs buňky a neuroblasty, u kterých se účastní růstu axonů (Mignone, Kukekov et al. 2004).

DCX (doublecortin) patří mezi proteiny asociované s mikrotubuly. Je exprimován v tělech a ve vedoucích výběžcích nezralých neuronů, můžeme ho nalézt i v axonech diferencujících neuronů (Platel, Gordon et al. 2009). Jeho exprese přetrvává po dobu asi 14 dnů, dokud neuron terminálně nedozraje. DCX je nezbytný pro neurální migraci, udržuje jejich bipolární tvar a zvyšuje rychlost migrace. Existují minimálně tři sestřihové izoformy tohoto genu.

MAP2 (microtubule associated protein 2) je také protein asociovaný s mikrotubuly. Jedná se o velký protein s hmotností kolem 250 kDa. Jeho funkcí je stabilizace mikrotubulů bráněním jejich depolymerizaci. MAP2 je specifickým markerem plně diferencovaných neuronů. Vyskytuje se v jejich dendritech, které pomáhá stabilizovat. Doposud byly popsány tři isoformy (Dehmelt and Halpain 2005).

NG2 je zkratka neuron-gliálního antigenu 2 chondroitin sulfátu proteoglykanu. Se svojí hmotností 252 kDa patří mezi největší proteiny tohoto typu. Je lokalizován na

buněčné membráně NG2-glií v celé CNS. Kromě NG2-glií se také může vyskytovat na povrchu chondroblastů, proliferujících endotelových buněk kapilár (Belachew, Chittajallu et al. 2003). NG2 proteoglykan je schopen vázat kolagen v extracelulární hmotě a tím stabilizovat buňku. Následující tabulka shrnuje expresi nejpoužívanějších markerů progenitorových, neurálních a gliálních buněk.

Tab. 1 – Nejpoužívanější buněčné markery

Marker	B-buňky	Astrocyty	C-buňky	A-buňky	Neurony	E-buňky	NG2-glie
GFAP	+	+					
Vimentin	+	+/-				+	
RC2	+	+/-					
BLBP	+	+/-	+				
Nestin	+	+/-	+	+			
DCX			+				
MAP2					+		
NG2							+

Tab. 2 – Ostatní používané markery

Marker	B-buňky	Astrocyty	C-buňky	A-buňky	Neurony	E-buňky	NG2-glie
GAT4	+						
GLAST	+	+					
BLBP	+	+/-	+				
LeX	+	+					
Mash1	+	+				+	
CD133	+					+	
Sox2	+	+/-	+	+			+
EGFR	+	?	+				+/-
Dlx2			+	+			
CRMP4				+			
PSAN-CAM				+			
Kalbindin					+		
NeuN					+		
NSE					+		
NG2							+
Olig2							+
PDGF α							+

2.6.2. Elektrofyziologické vlastnosti buněk

Cytoplazmatická membrána tvoří tenký buněčný obal z dvojité vrstvy fosfolipidů a v ní ukotvených bílkovin. Její základní funkcí je zprostředkování informací mezi buňkou a okolím a zajištění selektivního přesunu látek, který je zajištěn její semipermeabilitou tj. je propustná jen pro některé molekuly či ionty. Velmi malé molekuly a nepolární látky volně prostupují membránou např.: O₂, CO₂, NO a alkohol. Naopak nabitě molekuly a ionty neprocházejí membránou samy, ale jejich přenos je usnadněn proteinovými přenašeči, které zajišťují selektivní transport. Nejvýznamnější skupinou přenašečů jsou iontové kanály, které v závislosti na změně vnějších podmínek specificky transportují ionty dovnitř nebo vně buňky. Druh a počet iontových kanálů v dané buňce určuje, jakým způsobem bude buňka reagovat na signály zvenčí a jaké má aktivní membránové vlastnosti. Mezi pasivní membránové vlastnosti patří zejména membránový potenciál, kapacita membrány a vstupní odpor membrány.

Membránový potenciál (V_m)

Je elektrický potenciál vnitřní strany buněčné membrány vztažený k vnějšímu povrchu buňky, který je pokládán za místo s nulovým potenciálem. Vzniká díky selektivní propustnosti membrány pro ionty, zejména pro Na⁺, K⁺, Cl⁻. V důsledku této vlastnosti membrány je koncentrace jednotlivých iontů vně a uvnitř buňky rozdílná a vzniká tak potenciálový rozdíl. Ačkoliv je uvnitř buňky mírná převaha kladných iontů K⁺, pro které je membrána volně propustná, je uvnitř buňky záporný potenciál. Rozhodující jsou záporné náboje pocházející z nabitých skupin buněčných proteinů, které díky své velikosti nemohou pronikat přes plazmatickou membránu. Jednotkou výsledného membránového potenciálu jsou milivolty (mV). Klidový membránový potenciál se obvykle pohybuje v rozmezí -50 až -90 mV v závislosti na buněčném typu.

Kapacita membrány (C_m)

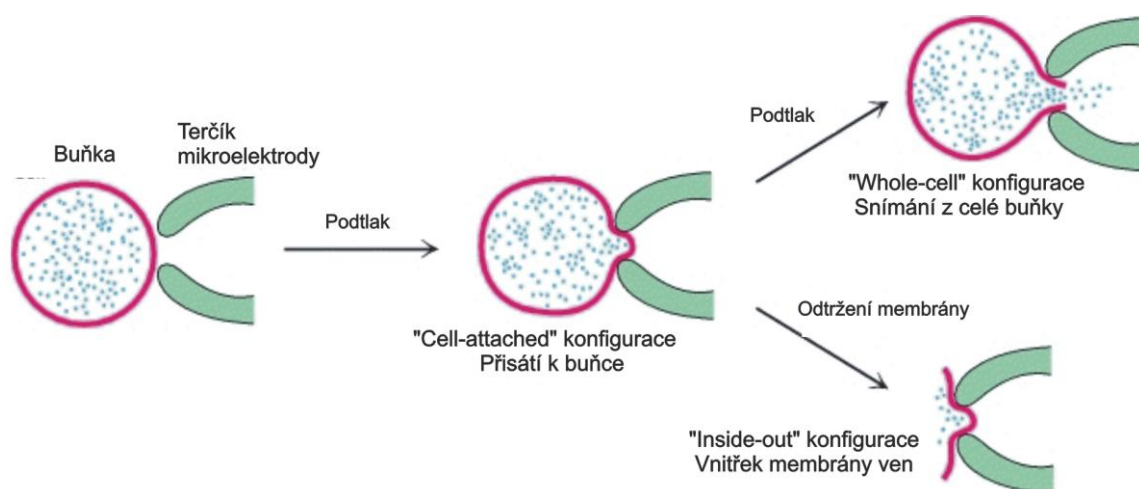
Buněčná membrána se chová jako kondenzátor. Během aplikace elektrického pulzu je schopna vázat určitý náboj, který buď vybíjí nebo nabíjí. Kapacita membrány je přímo úměrná velikosti povrchu buňky. Jednotkou této veličiny jsou farady (F), buňky mají kapacitu membrány v řádech pikofaradů (pF).

Odpor membrány (IR)

Vstupní odpor charakterizuje membránu z hlediska permeability pro ionty. Membrána je pro elektricky nabitě částice neprostupná, pohybem iontů vzniká elektrický odpor membrány, který musí být ionty při průchodu přes membránu překonán. Odpor membrány je přímo úměrný množství, stavu a seskupení proteinových kanálů a ostatních přenašečů v membráně. Jeho jednotkou jsou ohmy. Všeobecně u neuronů dosahuje vysoké hodnoty (250-1500 MΩ) a u gliových buněk je poměrně nízký (30-100 MΩ).

2.6.2.1. Metoda terčíkového zámku (patch clamp)

Aktivní i pasivní membránové vlastnosti jsou měřitelné metodou terčíkového zámku, častěji označovaného jako metoda patch clamp. Buňky je možné se dotknout skleněnou mikroelektrodou o průměru přibližně 1 μm, která je připojena k citlivému měřicímu zařízení, kam jsou vedeny změny elektrického proudu procházející membránou po aplikaci elektrických impulsů různé intenzity. Mikroelektroda je naplněna roztokem, který imituje intracelulární tekutinu, nebo může navíc obsahovat ligandy schopné interakce s iontovými kanály a další látky ovlivňující funkci membrány. Takto lze zkoumat vlastnosti celé buněčné membrány nebo i jednotlivých iontových kanálů podle použité variace techniky patch clamp. Při variaci „*cell-attached*“ neboli přisátí k buňce je za použití mírného podtlaku vtažena část membrány do ústí mikroelektrody (**viz obr. 9**). Při této konfiguraci může být snímána aktivita jednotlivých kanálů v přirozeném membránovém potenciálu. Při snímání z celé buňky „*whole-cell*“ je použitím dalšího podtlaku terčík protrhnut a membrána se přilepí na vnitřní povrch mikroelektrody. Pokud je po protrhnutí aplikován mikroelektrodou stejný potenciál jako je membránový potenciál buňky a v roztoku je nízká koncentrace Ca²⁺, tak dochází ke snímání souhrnného proudu z činnosti všech kanálů v buněčné membráně. Při snímání pouze z terčíku tj. konfigurace „*inside-out*“, při které je intracelulární strana membrány obrácena do roztoku a „*outside-out*“, kdy je do roztoku obrácena extracelulární strana, je kus membrány odtrhnut a měří se pak proudy procházející pouze tímto malým kouskem membrány.



Obr. 9 – Konfigurace terčikového zámku (Berg et al. 2002)

Vyobrazení různých variací napojení mikroelektrody na buněčnou membránu při použití metody patch clamp.

Buňky můžeme měřit jak *in vitro* podmínkách na buněčné kultuře, tak i *in situ* na mozkových řezech. Stanovení membránových vlastností touto metodou, umožňuje kromě zjišťování vlastností jednotlivých iontových kanálů a přenašečů i charakterizaci funkčních vlastností měřených buněk. Navíc po porovnání získaných membránových vlastností s již známými typickými hodnotami membránových vlastností jednotlivých typů buněk např. v nervovém systému, můžeme určit, zda se jedná o astrocyt, oligodendrocyt, mikroglia či neuron. V případě vzniku nových buněk a jejich diferenciaci z kmenových buněk, můžeme metodou terčikové zámku charakterizovat průběh této diferenciaci a buňky přesně identifikovat.

2.6.2.2. Membránové vlastnosti buněk nervového systému

Rozličné membránové vlastnosti vykazují buňky nervového systému *in situ*: dospělé neurální kmenové buňky, TAPs – buňky, neuroblasty, neurony, astrocyty, oligodendrocyty a NG2-glie. Při použití metody terčikového zámku můžeme na jejich membránách rozeznat čtyři typy proudů, jejichž výskyt v různých buněčných typech je shrnut v tabulce č. 3. Mezi tyto proudy patří: K_A - rychle se aktivující a inaktivující vně usměrněné napětově závislé K^+ proudy; K_{DR} - zpožděné vně usměrněné napětově závislé K^+ proudy; K_{IR} - dovnitř usměrněné napětově závislé K^+ proudy a Na^+ proudy.

Neurální kmenové buňky (NSCs; B-buňky)

Jejich membránové vlastnosti odpovídají schopnosti symetricky i asymetricky proliferovat a produkovat C-buňky. Vykazují časově a napětově nezávislé K^+ proudy a zpožděné vně usměrněné napětově závislé K^+ proudy (K_{DR}) s malou proudovou hustotou. Mají velký membránový potenciál udržovaný na hodnotě -80 až -90 mV a nízký membránový odpor přibližně 30 M Ω (Jelitai, Anderova et al. 2007).

Přechodně se dělicí progenitory (TAPs buňky; C-buňky)

Vznikají při asymetrickém dělení z NSCs. Jsou to nejproliferující buňky v SVZ. Kromě dovnitř směřovaných K_{IR} proudů a K_{DR} proudů, mají navíc i rychle se aktivující K_A proudy. Jejich membránový potenciál se pohybuje kolem -70 až -80 mV a odpor kolem 250 M Ω (Jelitai, Anderova et al. 2007).

Neuroblasty (A-buňky)

Jsou produkovány C-buňkami a následně v řetězcích migrují do OB. Mají zpožděné vně usměrněné napětově závislé K^+ kanály (K_{DR}), ale nemají K_{IR} . Velká část má navíc Na^+ kanály, ale nejsou schopné tvořit akční potenciály (Wang, Krueger et al. 2003). Mají nízký membránový potenciál o hodnotě kolem -50mV a velice vysoký membránový odpor přibližně 4 G Ω .

Neurony

Mají velmi charakteristické membránové vlastnosti, neboť jsou to buňky specializované pro přenos signálů (**obr. 10**). V membráně mají velké množství napětově závislých Na^+ kanálů, které hrají významnou roli při vzniku akčního potenciálu. Po depolarizaci membrány neuronu dojde k jejich otevření a Na^+ ionty vtečou do buňky, což vede k další depolarizaci membrány, při které membránový potenciál dosahuje až kladných hodnot. Díky samovolné deaktivaci Na^+ kanálu se vzruch může šířit pouze jedním směrem. Repolarizace neuronu je zajištěna přítomností napětově závislých K^+ kanálů tj. K_A a K_{DR} , které umožní rychlý únik K^+ iontů z buňky, což způsobí navrácení k původnímu klidovému membránovému potenciálu. Membrána neuronů má odpor kolem 300 M Ω a její potenciál se pohybuje kolem -60 mV (Bean 2007).

Astrocyty

Pufřejí koncentraci K^+ v okolí neuronů, proto je pro ně charakteristická vysoká propustnost membrány pro K^+ ionty. Astrocyty vykazují pasivní vodivost pro K^+ ionty po aplikaci depolarizačních a hyperpolarizačních pulsů a mají K_{IR} proudy. V nervovém systému můžeme najít i prekurzory astrocytů, které mají napětově závislé K^+ kanály (K_{IR} , K_{DR} a K_A) (**obr. 10**). Často u nich můžeme nalézt i napětově závislé Na^+ kanály (Chvatal, Anderova et al. 1999). Membránový odpor astrocytů se pohybuje v rozmezí 20-100 $M\Omega$ a membránový potenciál mezi -30 a -100 mV.

NG2-glie (OPCs)

NG-glie jsou přechodem mezi neurální a gliovou buňkou. Od toho se odvíjí i jejich membránové vlastnosti. Po depolarizačních pulsech se aktivují jejich napětově závislé K_A a K_{DR} kanály. Naopak hyperpolarizační impulsy otevírají K_{IR} proudy. U některých NG2-glií byly nalezeny i Na^+ kanály (**obr. 10**). Jejich membránový odpor je v průměrných hodnotách mezi 200 až 500 $M\Omega$ a membránový potenciál – 70 mV (Lin and Bergles 2002).

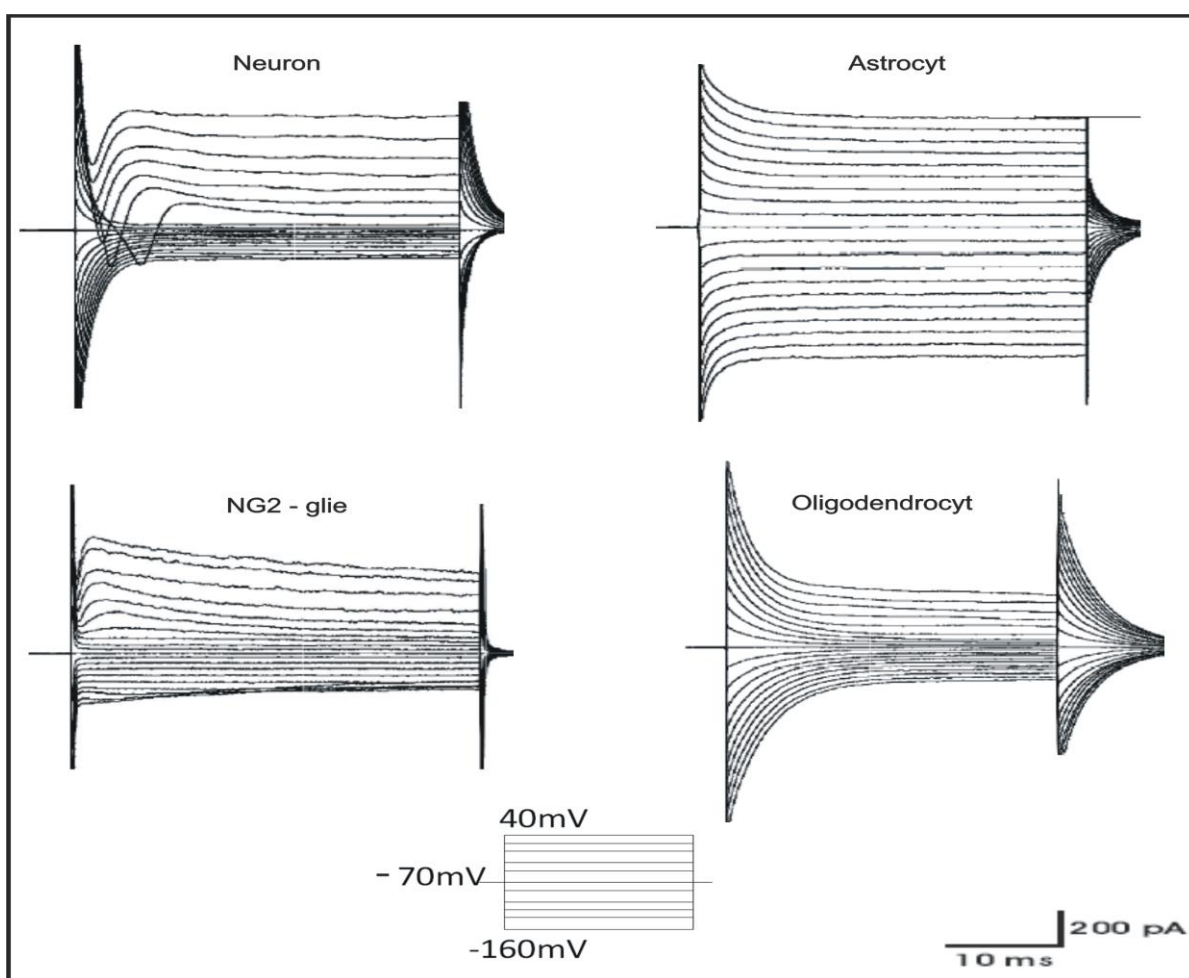
Tab. 3 – Membránové vlastnosti buněk nervového systému

	NSCs	C-buňky	A-buňky	Neurony	Astrocyty	NG2-glie	Oligodend.
V_K [mV]	-85	-75	-50	-60	-30-100	-70	-60
IR [$M\Omega$]	30	250	4000	300-500	20-100	200-500	200-350
K_A	-	+	+	+	-	+	-
K_{DR}	+	+	+	+	-	+	-
K_{IR}	-	+	-	-	+	+	-
Na^+	-	-	+/-	+	+/-	+/-	-

V_K - klidový membránový potenciál; IR – membránový odpor; K_A - rychle se aktivující a inaktivující vně usměrněné napětově závislé K^+ proudy; K_{DR} - zpožděné vně usměrněné napětově závislé K^+ proudy; K_{IR} - dovnitř usměrněný napětově závislý K^+ proudy. +/- značí, že se tyto proudy nacházejí jen u některých buněk.

Oligodendrocyty

Jejich hlavní funkcí je izolovat svými výběžky axony neuronů od okolního prostředí a urychlovat tím šíření akčního potenciálu. Jejich membrána je vysoce propustná pro K^+ ionty. Tímto způsobem navracejí membránový potenciál do původních hodnot. Z K^+ proudů jsou pro ně charakteristické pasivně klesající K^+ proudy po depolarizačních i hyperpolarizačních pulsech (obr. 10). Jejich membránový odpor je 200-350 $M\Omega$ a membránový potenciál dosahuje hodnoty -60 mV. Prekurzory oligodendrocytů mají stejně jako prekurzory astrocytů napěťově závislé K^+ kanály, ale nikdy nemají Na^+ proudy (Chvatal, Anderova et al. 1999).



Obr. 10 – Proudů zaznamenané metodou terčíkového zámku *in situ* různých typů buněk
Výchozím napětí bylo -70mV, a dále byl zaznamenáván proud po 10 mV krocích. Vlevo nahoře neuron, vpravo nahoře astrocyt, vlevo dole NG2-glie, vpravo dole oligodendrocyt.

3. Cíle diplomové práce

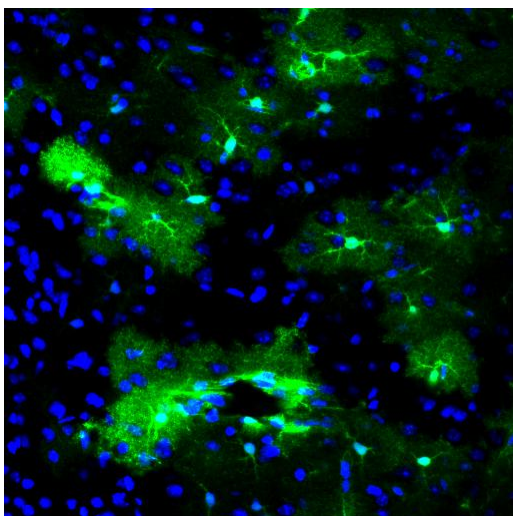
Cílem této diplomové práce bylo charakterizovat diferenciační potenciál neurálních kmenových buněk (NSCs) a progenitorových buněk (PCs), izolovaných ze dvou oblastí mozku dospělé myši 3 dny po fokální ischemii indukované MCAO. První oblastí byla subventrikulární zóna postranních mozkových komor, kde v dospělém mozku probíhá neurogeneze nejintenzivněji. Druhou oblastí pak mozková kůra na přechodu ischemií poškozené tkáně a nepoškozené tkáně, kde probíhá mohutná glióza. K dosažení tohoto cíle byly vytyčeny čtyři postupné kroky.

- Provést imunohistochemickou analýzu mozku po ischemickém poškození indukované MCAO
- Charakterizovat neurosféry, tj. proliferující NSCs/PCs izolované ze SVZ a oblasti gliální jizvy
- Objasnit diferenciační potenciál NSC/PCs v *in vitro* podmínkách
- Charakterizovat membránové vlastnosti *in vitro* diferencovaných buněk

4. Metody

4.1. Původ buněk - GFAP/EGFP transgenní myši

Pro experimenty byly použity transgenní GFAP/EGFP myši (Nolte, Matyash et al. 2001), ve kterých je zelený fluorescenční protein (EGFP; enhanced green fluorescent protein) exprimován pod lidským promotorem, gliálního fibrilárního acidického proteinu (GFAP; glial fibrillary acidic protein). Takto je možné vizualizovat živé astrocyty v tkáňových řezech a okamžitě detekovat, kde probíhá astroglióza (**obr. 11**). Na pokusy byly použity dospělí samci i samice ve věku 60 – 90 dní. Zvířata pocházela z interního chovu Ústavu experimentální medicíny AV ČR a byla chována v plastových akváriích se standardní dietou. Byla chována při teplotě 20-22 °C se světelným režimem LD 12:12.



Obr. 11 – Astrocyty v mozkové kůře

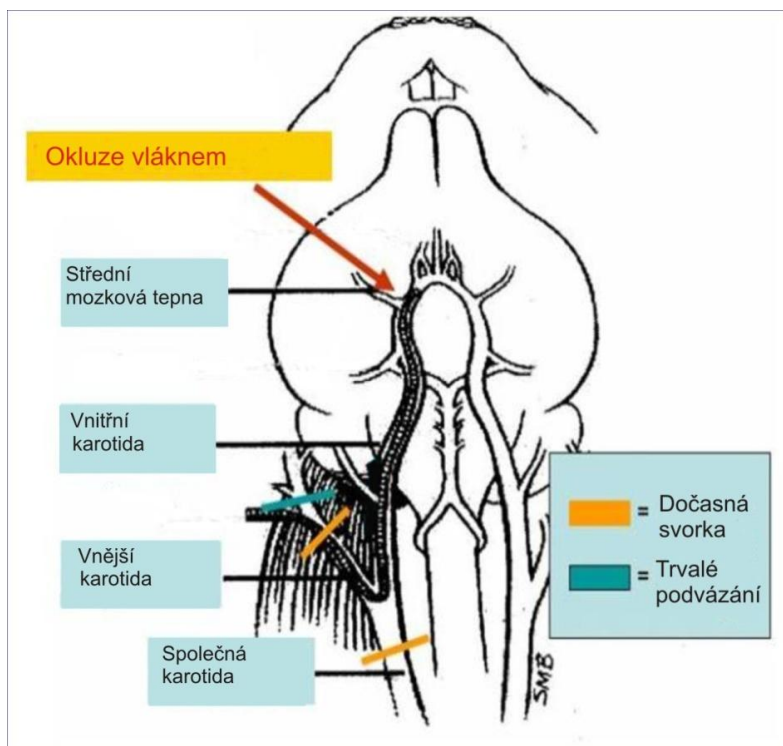
Astrocyty jsou značeny pomocí zeleného fluorescenčního proteinu (EGFP), který je umístěn za promotorem proteinu GFAP. Modře DAPI, zeleně EGFP.

Transgenní myš byla připravena tak, že fragment DNA nesoucí GFAP promotorovou sekvenci (Brenner, Kisseberth et al. 1994) odvozený z pCAT/GFAP plasmidu, byl začleněn do klonovacího místa na pEGFP-1 (Clontech, Heidelberg, Německo). Zda je exprese takto připraveného transgenů funkční bylo testováno v buňkách pocházející z gliomu (linie U343 MG). Oocyty s transgenem byly injikovány do myši pomocí mikroinjekce (technologie Eurogentec, Seraing, Belgie). První myš linie byla zkřížena s netransgenními myšmi. Jejich heterozygotní potomstvo již vykazovalo mohutnou expresi EGFP v astrocytech v celé mozkové tkáni.

4.2. MCAO – model fokální mozkové ischemie

MCAO (MCAO; middle cerebral artery occlusion) byla provedena v hluboké anestézii, která byla po dobu zákroku udržována kontinuálním přísunem 2% isofluoranu (Abbott, Queenborough, Velká Británie). Myš byla upevněna na vyhřívací destičku (36,5 °C). Na pravé straně krku byl po dezinfekci proveden cca. 15 mm dlouhý rostrokaudální řez a byla vypreparována společná karotida (*arteria carotis communis*) a bifurkace vnitřní a vnější karotidy (*a. carotis interna*; *a. carotis externa*). Rostrálně byla permanentně podvázána vnější karotida hedvábnou nití (USP 7/0, Chirmax, Praha, Česká republika), kaudálně byla zasvorkována společná karotida a dorzálně vnitřní karotida (**viz obr. 12**). Následně byl ve vnější karotidě prostřihnout otvor, do kterého byl zasunut filament - silonové vlákno o šířce 150µm (USP 7/0, Chirmax), konec byl oble rozšířen polakováním na 220-250 µm. Po celé délce byl filament potažen poly-L-lysinem (5 mg/ml, Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA). Potom byla odstraněna svorka z vnitřní karotidy a filament byl skrz společnou karotidu zasunut do vnitřní karotidy, 10 mm hluboko od bifurkace. Při této hloubce zasunutí je blokován průtok krve do střední mozkové tepny (*middle cerebral artery*), což vede k fokální ischemii pravé části mozku. Filament byl zafixován nití, svorka ze společné karotidy odstraněna, řez zašit. Druhý a třetí den po operaci byl myším dvakrát denně intraperitoneálně aplikován 1 ml Ringerova roztoku (B. Braun, Mesulgen, Německo) který obsahoval v 1 ml: 1,5 mg ampicilinu (Biotika, Praha, Česká republika) a 0,9 mg glukózy (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Pro kontrolu, zda námi zjištěná data byla výsledkem MCAO a ne pouze důsledkem samotného chirurgického zákroku, byla provedena “sham” operace. Operace byla provedena stejným postupem jako u MCAO. Avšak filament nebyl zasunut do vnitřní karotidy, ale pouze byla přerušena vnější karotida. Myši byly tři dny po zákroku usmrceny, dekapitovány a jejich mozek dále analyzován.



Obr. 12 – Provedení MCAO

Modrou čarou je vyznačeno místo trvalého podvázání cévy. Žlutou čarou oblasti, kde byla umístěna svorka až do zasunutí a zafixování filamentu (na obrázku znázorněn vyšrafováním cévy) ve vnitřní karotidě.

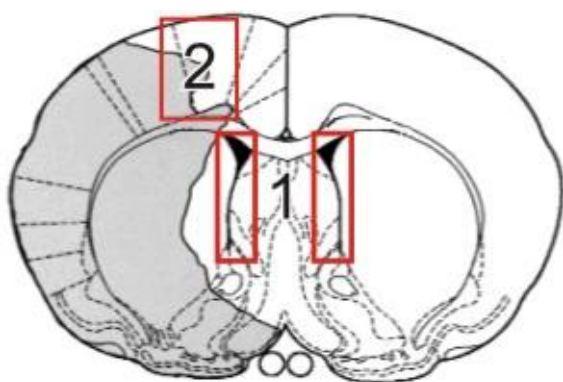
4.3. Příprava mozkových řezů pro imunohistochemické barvení

Tři dny po MCAO byla provedena transkardiální perfúze v hluboké anestézii 1% pentobarbitalem (intraperitoneálně 15 μ l/g, Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA) v infúzním roztoku (Fresenius Kabi, Verona, Itálie). Pravá síň byla prostříhnuta a injekční stříkačkou se přes srdeční hrot protlačilo cévním řečištěm myši 10 ml fosfátového pufru PBS (phosphate buffer saline: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,76 mM KH_2PO_4 , pH 7,4) a pak 20 ml 4% paraformaldehydu (v 0.2 M fosfátového pufru - PB, pH 7,4, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Po perfúzi byla myš dekapitována a mozek vypreparován.

Vypreparovaný a již částečně fixovaný mozek paraformaldehydem se nařezal na vibratomu (Microm HM 650V, Thermo Fisher Scientific, Waldorf, Německo) v PBS. Řezy silné 1,2 mm se dále fixovaly 2 hodiny v 4 % paraformaldehydu. Poté byly syceny 30% sacharózou po dobu 3 dnů. Na mikrotonovém kryostatu HYRAX C50 (Zeiss, Oberkochen, Germany), jehož komora byla chlazená na -24°C a vzorek na -18°C , byly nařezány 35 μ m široké řezy, které byly okamžitě přeneseny na podložní sklíčko a následně použity pro imunohistochemické analýzy.

4.4. Izolace a kultivace progenitorových buněk

Tři dny po MCAO byla provedena transkardiální perfúze GFAP/EGFP myši 20 ml vychlazeného roztoku NMDG (110 mM N-metyl-D-glutamin, 24,5 mM NaHCO₃, 2,5 mM KCl, 1,25 mM Na₂HPO₄, 20 mM glukosa, 0,5 mM CaCl₂, 7 mM MgCl₂). Na vibratomu byl mozek nařezán na 800 µm silné řezy v NMDG, z kterých byly v chladu (6°C) izolovány dvě oblasti mozkové tkáně (**viz obr. 13**): postranní komory, kde se nachází subventrikulární zóna (SVZ) a oblast kůry na rozhraní poškozené tkáně. Izolovaná tkáň byla mechanicky homogenizována použitím žiletky a následně se nechal 3 minuty působit trypsin (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA), jehož účinek byl zablokován přidáním fetálního hovězího séra (Gibco = invitrogen Carlsbad, CA, USA). Zbylé kousky tkáně byly zachyceny při filtraci přes sítko se 70 µm póry (BD Biosciences, Bedford, USA) do proliferačního média. Základem tohoto média bylo Neurobasal-A medium (Gibco = invitrogen Carlsbad, CA, USA), doplněné B27 suplementem (2%, Gibco), 2 mM glutaminem (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA) a směsí antibiotik penicilinu (10 000 U/ml) a streptomycinu (10 000 mg/ml, Gibco), byl přidán fibroblastový růstový faktor (bFGF, R&D Systems, Minneapolis, USA) v koncentraci 20 ng/ml a pro podporu dělení epidermální růstový faktor (EGF, R&D Systems) v koncentraci 40 ng/ml. Neurosféry byly pěstovány a množeny při 37°C a 5% CO₂ v inkubátoru. Po 11 dnech byly neurosféry buď fixovány 10 minut 4% paraformaldehydem a následně byla provedena imunocytochemická analýza, a nebo byly dále kultivovány za účelem diferenciac viz níže.



Obr. 13 - Oblasti izolace (Paxinos and Watson 1997)

Buňky byly izolovány ze dvou oblastí:

1. obě komory; 2. oblast kůry na rozhraní poškození.

Pro zahájení diferenciac byly neurosféry trypsinizovány a přeneseny do diferenačního média v hustotě 120 x 10³/ml buněk. Medium obsahovalo Neurobasal-A medium, 2% B27 suplement, směs antibiotik (10 000 U/ml), 2 nM glutamax (L-Alanyl glutamin) a zvýšenou koncentraci tj. 40 ng/ml bFGF. Na krycí skla rozmístěná

v 24 jamkové destičce bylo napipetováno 0,5 ml této suspenze. Povrchy těchto krycích skel byly potaženy poly-L-lysinem (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA). Médium bylo dále měněno každé 2-3 dny a buňky byly po 7-10 dnech diferenciaci elektrofyziologicky analyzovány na přítomnost K^+ a Na^+ kanálů a po fixaci analyzovány na expresi gliálních a neurálních markerů.

4.5. Elektrofyziologie

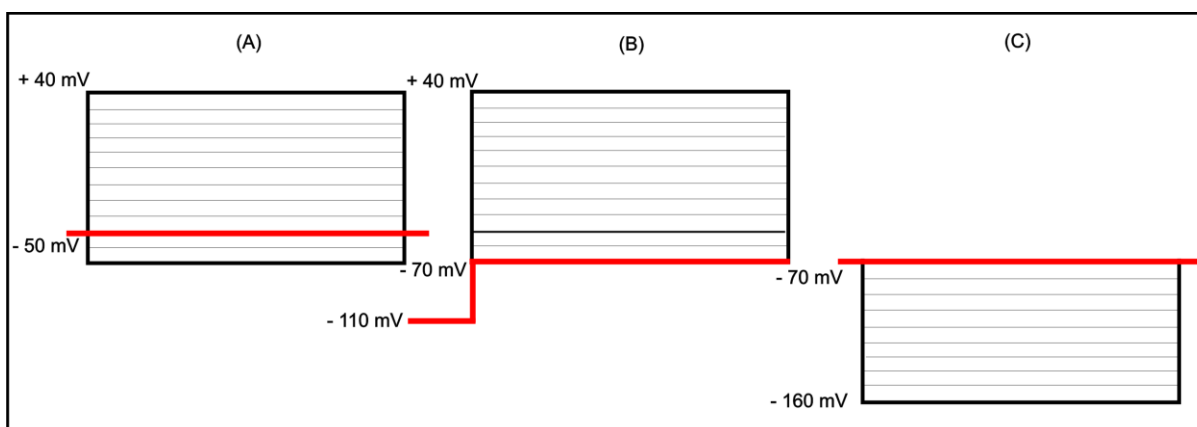
Přítomnost K^+ a Na^+ kanálů byla testována technikou patch clamp v konfiguraci „whole cell“ (Hamill, Marty et al. 1981), při které se zjišťují proudy protékající membránou celé buňky. Pro měření se použili elektrody z borosilikátových kapilár s filamentem (0.86 ID, Sutter Instruments Company, Novato, CA, USA) s výsledným odporem 8-14 $M\Omega$, které byly zhotoveny na Brown-Flamingově tahači (P-97, Sutter Instruments Company). Elektrody byly plněny roztokem obsahujícím: 130 mM KCl, 0,5 mM $CaCl_2$, 2 mM $MgCl_2$, 5 mM EGTa (ethylen glykol tetraacetylová kyselina), 10 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazilethanylsulfonová kyselina). Použitím KOH bylo upraveno pH na hodnotu 7,2. Pro následnou imunocytochemickou identifikaci změřených buněk, byla do tohoto roztoku přidána Lucifer Yellow (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA), která pronikne do buněk během měření. Skla s buňkami, které byly 7-10 dnů diferencovány byly umístěny do komůrky upevněné na fluorescenčním mikroskopu (Axioskop 2 FS plus, Zeiss). Komůrka byla promývána roztokem o pokojové teplotě (21°C), syceným směsí plynů 95% O_2 a 5% CO_2 , který nahrazoval cerebrospinální tekutinu: 122 mM NaCl, 3 mM KCl, 28 mM $NaHCO_3$, 1,25 mM Na_2HPO_4 , 10 mM glukóza, 1,5 mM $CaCl_2$, 1,3 mM $MgCl_2$. Buňky i měřicí elektroda byly sledovány pomocí digitální kamery (AxioCam HRc, Zeiss). Proudové signály byly zesíleny zesilovačem EPC-10 (HEKA Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Germany), a filtrovány na 3 kHz. Analýza a ukládání dat byly prováděny pomocí softwaru Patchmaster/Fitmaster (HEKA Elektronik).

Klidový membránový potenciál (V_m) se měřil po přepnutí zesilovače do proudového zámku a jeho hodnota je uváděna v mV. Membránová kapacita (C_m) byla vypočítána automaticky během měření programem Patchmaster a je uváděna v pF. Odpor (IR) byl automaticky kompenzován použitým softwarem. Vstupní odpor (IR) byl stanoven z proudu vyvolaného 10 mV impulsem 40 ms po začátku depolarizačního impulsu, který depolarizoval

buněčnou membránu z -70 mV, na kterém byly buňky udržovány po celou dobu měření, na -60 mV. Proudové charakteristiky byly měřeny při napěťovém zámku.

Pro analýzu typů proudů byly použity tři typy protokolů. Ty vycházely z napětí -70 , -50 a -110 mV. Poté byly proudové odpovědi buňky měřeny po napěťových pulzech, které se každých 50 ms zvyšovaly o 10 mV napěťových krocích od -160 mV do $+40$ mV. Pro analýzu napěťově závislých proudů se odečítaly pasivní proudy. Pasivní proudy jsou časově a napěťově nezávislé. Jejich hodnota byla získána změřením proudové amplitudy prvního napěťového kroku z -70 na -60 mV, a jejich příslušný násobek byl poté odečten od proudové amplitudy analyzovaného napěťového kroku. Velikosti proudů jsou uváděny v pA.

Prvním typem napěťově závislých proudů jsou *zpožděné ven usměrněné napěťově závislé K^+ proudy (K_{DR})*, pro aktivaci pouze tohoto proudu, byly buňky drženy na výchozím napětí -70 mV, od něhož pulzy pokračovaly od -50 do $+40$ mV (**obr. 14 A**). Dalším jsou *rychle se aktivující a inaktivující ven usměrněné napěťově závislé K^+ proudy (K_A)*. V tomto případě byl nejprve aplikován hyperpolarizační pulz -110 mV a pak následovalo proměření od -70 do $+40$ mV (**obr. 14 B**). Posledním typem jsou *dovnitř usměrněné napěťově závislé K^+ proudy (K_{IR})*, které byly získány aplikací napěťových pulzů od -160 do -70 mV. Pulzy začínaly na výchozím napětí -70 mV (**obr. 14 C**).



Obr. 14 – Schéma aplikace elektrických pulzů

Pro měření byly použity tři typy protokolů. **(A)** Protokol pro měření K_{DR} nejprve buňku depolarizoval na -50 mV (červená čára) a následně byly aplikovány pulzy až do $+40$ mV. Ostatní dva protokoly vycházely z -70 mV (červená čára). **(B)** Pro měření K_A proudů byla buňka nejprve hyperpolarizována na -110 mV a následně z -70 mV proměřena až do $+40$ mV. **(C)** Poslední protokol buňku nejprve hyperpolarizoval až na -160 mV, což umožnilo snímání K_{IR} proudů.

Proudové hustoty byly vypočítány pomocí podílu maximální amplitudy příslušného proudu membránovou kapacitancí. Výsledné hodnoty jsou vyjadřovány v pA/pF. Výsledné K_{DR} a K_{IR} proudy byly vypočítány odečtením pasivních proudů od maximální amplitudy proudu získané při +40/-160 mV, ve 40 ms po začátku pulsu, zatímco amplituda K_A proudu byla získána odečtením proudu (B) od proudu (A) (**viz obr. 14**).

4.6. Imunohisto/cytochemie

Řezy byly imunohistochemicky barveny přímo na sklech, aby se co nejvíce omezila manipulace s nimi a možný rozpad poškozené tkáně. Nejprve byly promyty 15 minut v PBS a následně byly 2 hodiny blokovány nespecifické vazby a permeabilizovány membrány v blokovacím roztoku, který obsahuje 5% Chemiblocker, 2% aktivované kozí sérum (Goat serum, Millipore, Billerica, MA, USA), 1% BSA (Gibco = invitrogen Carlsbad, CA, USA) a 0,5% Triton (Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, USA) v PBS. Poté byly řezy inkubovány s primární protilátkou naředěnou v blokovacím roztoku přes noc v chladu (6°C). Po promytí 3x 10 min v PBS se na 2 hodiny přidala sekundární protilátka v blokovacím roztoku bez séra a následovalo odmytí přebytečné sekundární protilátky 2x 15 min v PBS. Na montování řezů bylo použito montovací médium Vecta Shield s DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). DAPI sloužilo k vizualizaci jader. Pro analýzu obarvených řezů byl použit konfokální mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Germany).

Buňky kultivované na sklech potažených poly-L-lysinem a neurosféry byly 15 minut fixovány v 4% paraformaldehydu, následovalo blokování nespecifických vazeb, přidání primární a sekundární protilátky (viz výše popsáno pro řezy). Po odmytí sekundární protilátky bylo ke sklům a neurosférám přidáno na 5 minut DAPI (0,001 mg/ml) v PBS a na montování bylo použito montovací médium Aqua Poly/Mount (Polysciences, Inc., Washington, PA, USA).

Tab. 4 - Primární a sekundární protilátky použité pro imunohistochemii a imunocytochemii

Primární protilátka	Ředění	Isotyp	Výrobce	Sekundární protil.
GFAP – Cy3	1:800	myší IgG	Sigma-Aldrich (C-9205)	
Nestin	1:800	myší IgG	Chemicon (MAB353)	GAM 594
Vimentin	1:1000	myší IgG	Abcam (8978)	GAM 594
RC2	1:100	myší IgM	Millipore	GAM 594
DCX	1:500	králičí IgG	Abcam (ab 18723-100)	GAR 594
MAP2	1:800	mouse IgG	Millipore (MAB3418)	GAM 594
NG2	1:400	králičí IgG	Chemicon (AB5320)	GAR 660
CD11b	1:200	mouse IgG	Chemicon (CBL1512)	GAM 594

GAR 594/660: kozí anti-králičí IgG (goat anti-rabbit IgG) konjugovaný s Alexa Fluor 594 nebo 660; **GAM 594/660:** kozí anti-myší IgG (goat anti-mouse IgG) konjugovaný s Alexa Fluor 594 nebo 660; **DAG 594/660:** oslí anti-kozí IgG (donkey anti-goat IgG) konjugovaný s Alexa Fluor 594 nebo 660 (všechny od Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) **IgM Cy3:** kozí anti-myší IgM (goat anti-mouse IgM) konjugovaný s Cy3 (Millipore, Billerica, MA, USA). **GFAP:** glial fibrillary acidic protein; **RC2:** radial glial cell marker 2; **DCX:** doublecortin; **MAP-2:** microtubule associated protein 2; **NG2:** neuron-glia antigen 2.

4.7. Statistické analýzy

Výsledky jsou prezentovány jako aritmetické průměry hodnot se standardní chybou průměru (S.E.M.). Analýza signifikance rozdílů mezi skupinami byla provedena pomocí aplikace GraphPad InStat 3 (Trial verze). Hodnoty s $p < 0,05$ byly považovány za signifikantní a v tabulkách a grafech jsou označeny (*). Jako velmi signifikantní označeny hodnoty s $p < 0,01$ označeny (**) a hodnota $p < 0,001$ ukazovala na extrémní signifikanci rozdílu dvou skupin (***).

5. Výsledky

5.1. Imunohistochemická analýza změn po MCAO

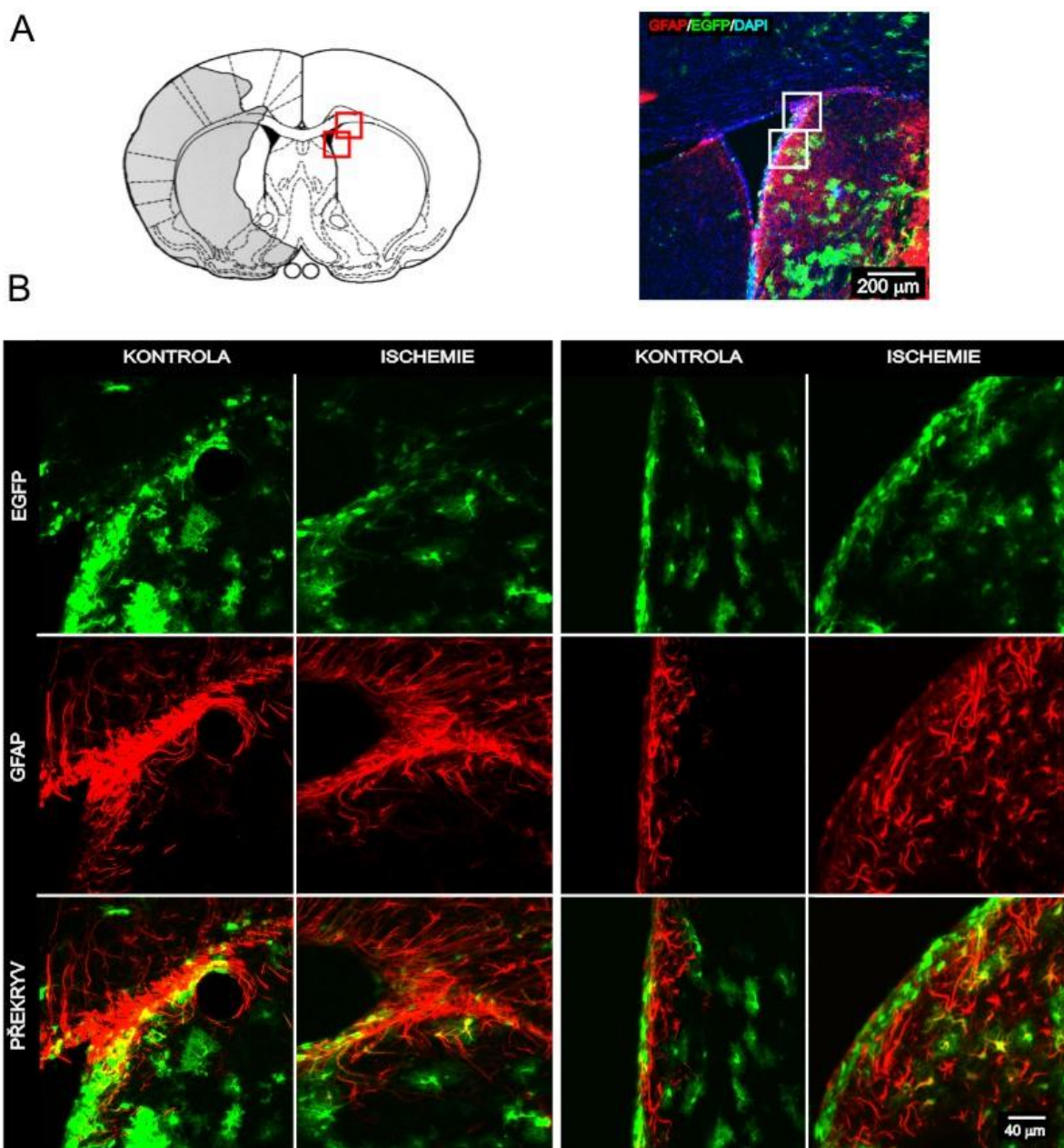
Změny po fokálním ischemickém poškození mozku (vyvolané MCAO) u dospělé myši, byly analyzovány imunohistochemicky, s použitím specifických markerů astrocytů. Gliální fibrilární acidický protein (GFAP) je exprimován jak v astrocytech, tak i v NSCs. Dále Vimentin a RC2, protilátky proti radiálním gliím, které nejsou na rozdíl od GFAP exprimovány ve zralých astrocytech, ale pouze v NSCs (B-buňky v SVZ) a v reaktivních astrocytech. Pro sledování neurálních prekursorů a neuronů bylo použito barvení na DCX a MAP2. Protilátka proti NG2 proteoglykanu byla použita jako marker NG2-glií. Mikroglie byly vizualizovány použitím markeru CD11b. Pro sledování změn v proliferaci buněk byly použity dva markery: nestin a Ki67.

MCAO byla provedena u dospělé GFAP/EGFP transgenní myši. V mozkové tkáni této myši exprimují především astrocyty a některé NG2-glie zelený fluorescenční protein EGFP, díky kterému jsou snadno detekovatelné pomocí fluorescence. Myš byla po třech dnech usmrcena a mozkové řezy byly imunohistochemicky barveny. Konfokálním mikroskopem byly snímány a sledovány dvě mozkové oblasti: 1) subventrikulární zóna a 2) oblast reaktivní gliózy tj. kůra na rozhraní poškozené a nepoškozené tkáně.

5.1.1. Změna neurogeneze v subventrikulární zóně

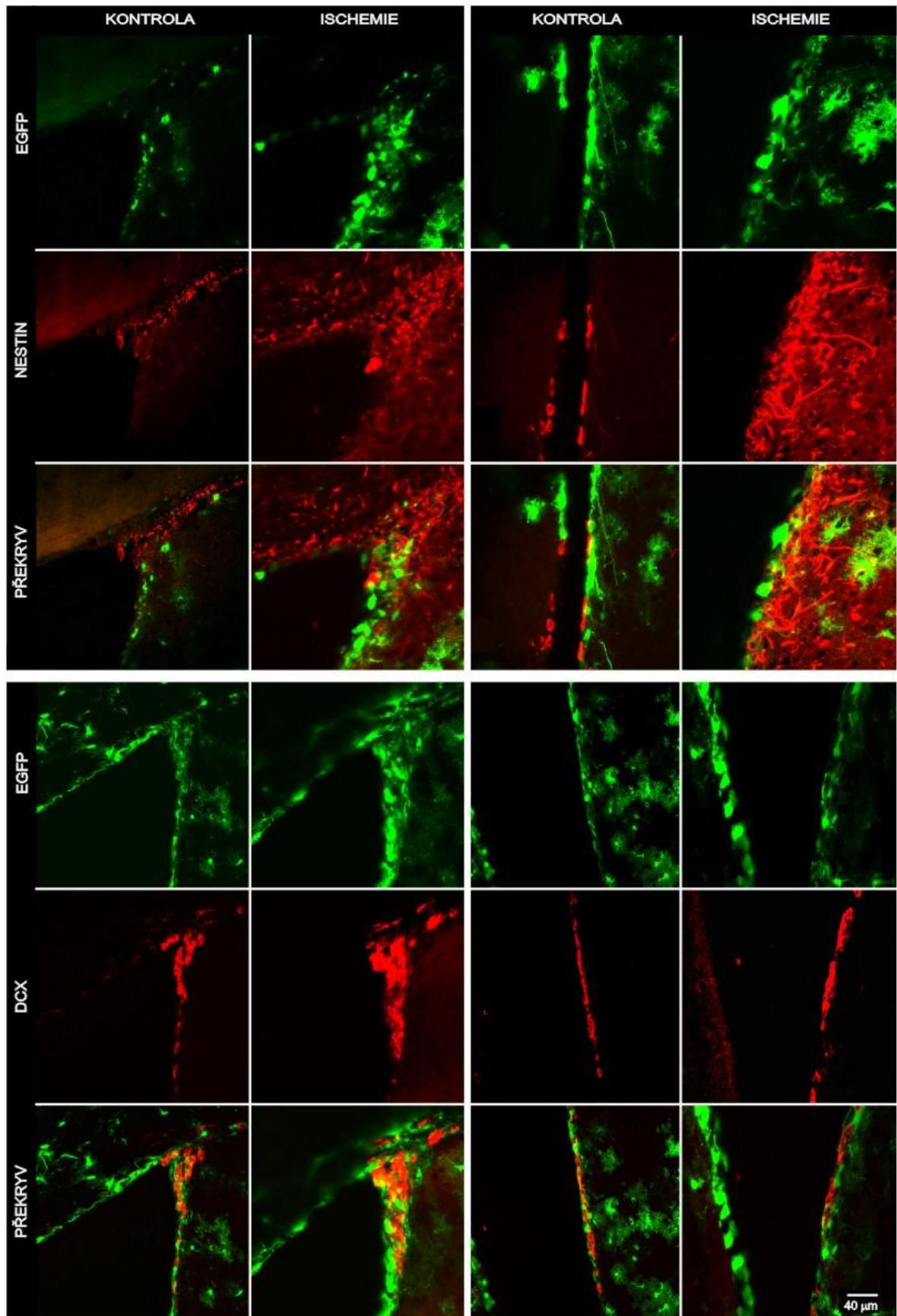
Subventrikulární zóna je největším zdrojem neurogeneze v dospělém mozku. Po MCAO dochází v této oblasti k mnoha změnám, které zahrnují zvýšenou proliferaci, diferenciaci a migraci přítomných buněk. Tři dny po MCAO jsou tyto změny značné. Vzhledem k tomu, že ischemické poškození postihuje i postranní komoru ipsilaterální hemisféry, byla sledována SVZ komory v kontralaterální hemisféře, a to ve dvou oblastech: roh komory, kde začíná RMS a SVZ na laterální straně postranní komory (**viz obr. 15 A**). Imunohistochemická analýza ukázala, že ve srovnání s nepoškozenou mozkovou tkání ("sham"- operace), u MCAO dochází ke zvýšení exprese GFAP, nestinu a DCX v SVZ (**obr. 15 B, 16**). Dále je zvýšena exprese markerů radiálních glií: vimentinu a RC2 (**obr. 17**). Naopak exprese NG2 proteoglykanu zůstává nezměněna (**obr. 18**).

Na základě této analýzy lze říci, že po MCAO dochází k neurogenезi v SVZ ve zvýšené míře. Je zde více exprimován GFAP protein v astrocytech i v B-buňkách a zvýšená exprese Vimentinu a RC2 naznačuje více B-buněk, vzniklých po symetrickém dělení. Zvýšená exprese nestinu ukazuje, že více buněk proliferuje či migruje. Po MCAO vzniká i více DCX pozitivních neuroblastů (A-buněk), které migrují směrem k RMS. Naopak NG2-gliové buňky v kontralaterální SVZ na MCAO nereagují.



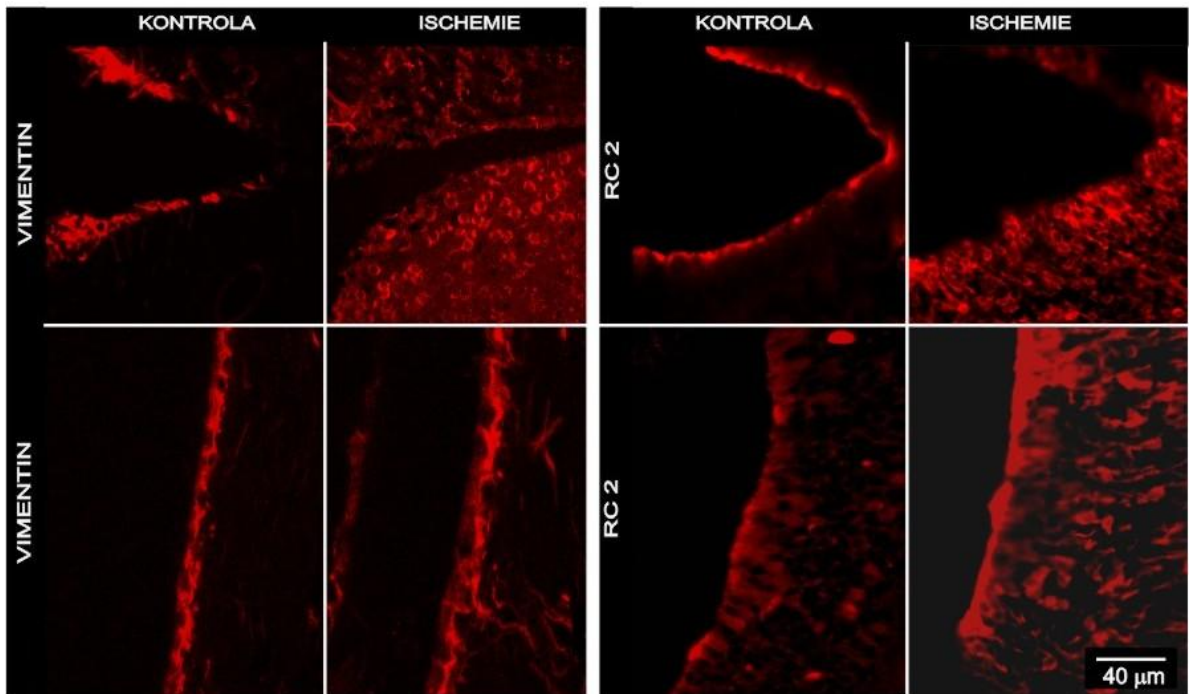
Obr. 15 – Změna exprese GFAP v SVZ tři dny po MCAO

(A) Koronární řez mozkiem, na kterém jsou červeně znázorněny oblasti, kde byla provedena imunohistochemická analýza (vlevo). Vpravo je při menším zvětšení ukázána postranní komora s barvením na GFAP a DAPI. (B) Zvýšená exprese GFAP v rohu postranní komory (vlevo) a v laterální SVZ (vpravo). Nahoře jsou EGFP – pozitivní buňky, uprostřed GFAP a dole je překryv barvení. Žlutá barva značí buňky EGFP i GFAP pozitivní.



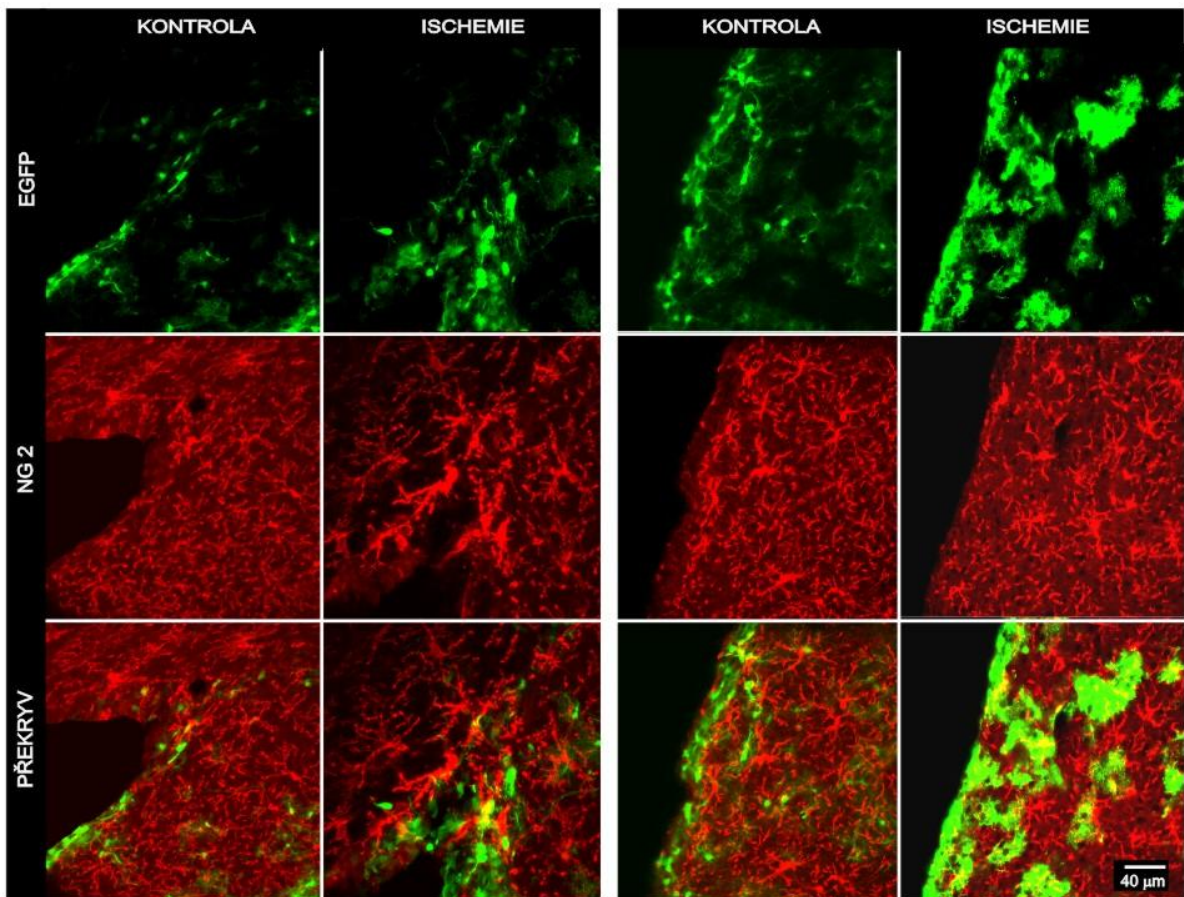
Obr. 16 – Zvýšení exprese nestinu a DCX v SVZ tři dny po MCAO

Imunohistochemická analýza rohu postranní komory (vlevo) a laterální strany komory (vpravo), ukazující zvýšení exprese nestinu (nahore) a DCX (dole)



Obr. 17 – Zvýšení exprese markerů radiálních glií tři dny po MCAO

Po MCAO je zvýšena exprese vimentinu (vlevo) i RC2 (vpravo) v rohu postranní komory (horní řada) i v laterální SVZ (dolní řada).

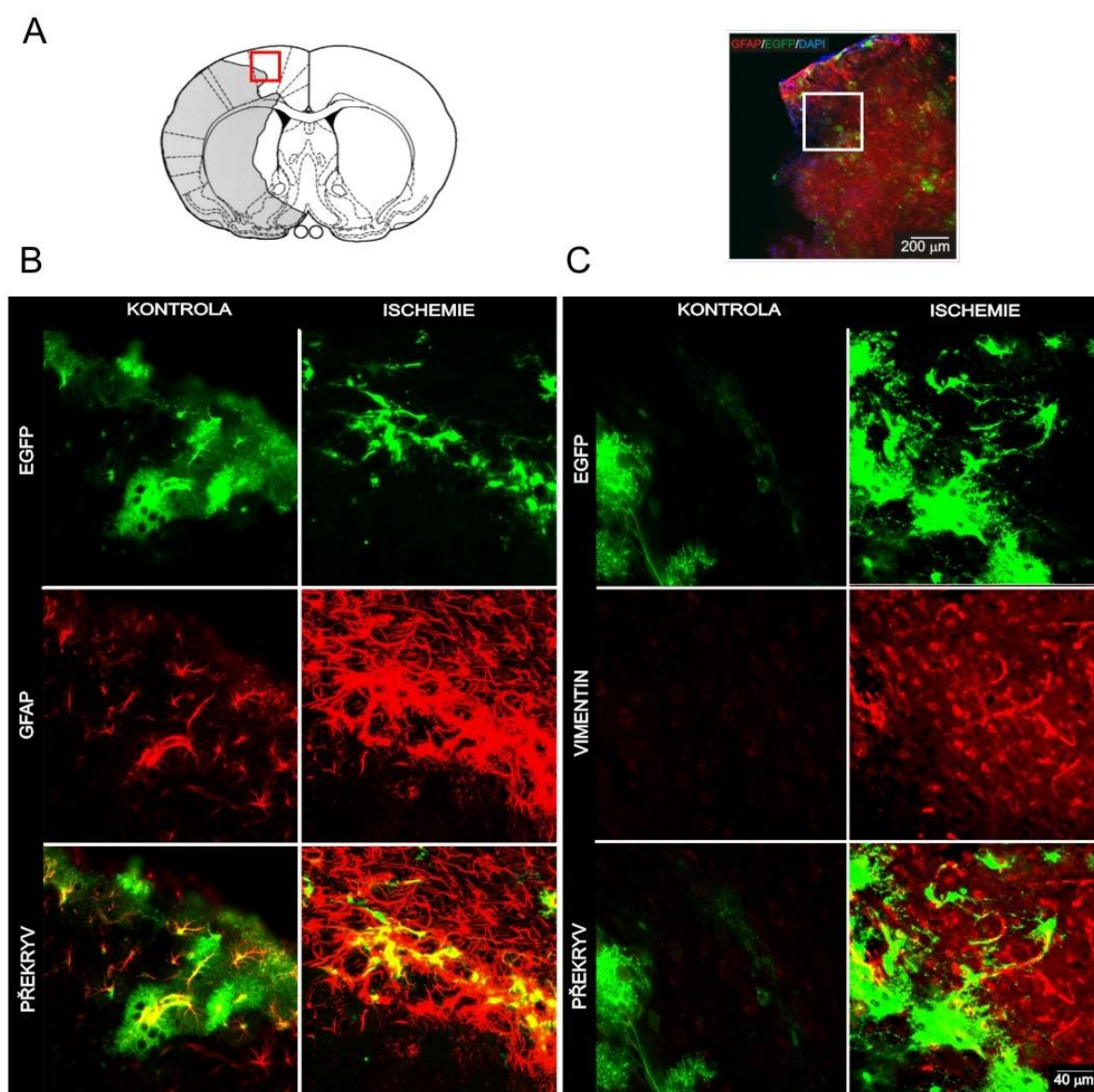


Obr. 18 – Expresa NG2 proteoglykanu v SVZ zůstává beze změny

Expresa NG2 proteoglykanu je srovnatelná jak v rohu postranní komory (vlevo), tak u její laterální strany (vpravo).

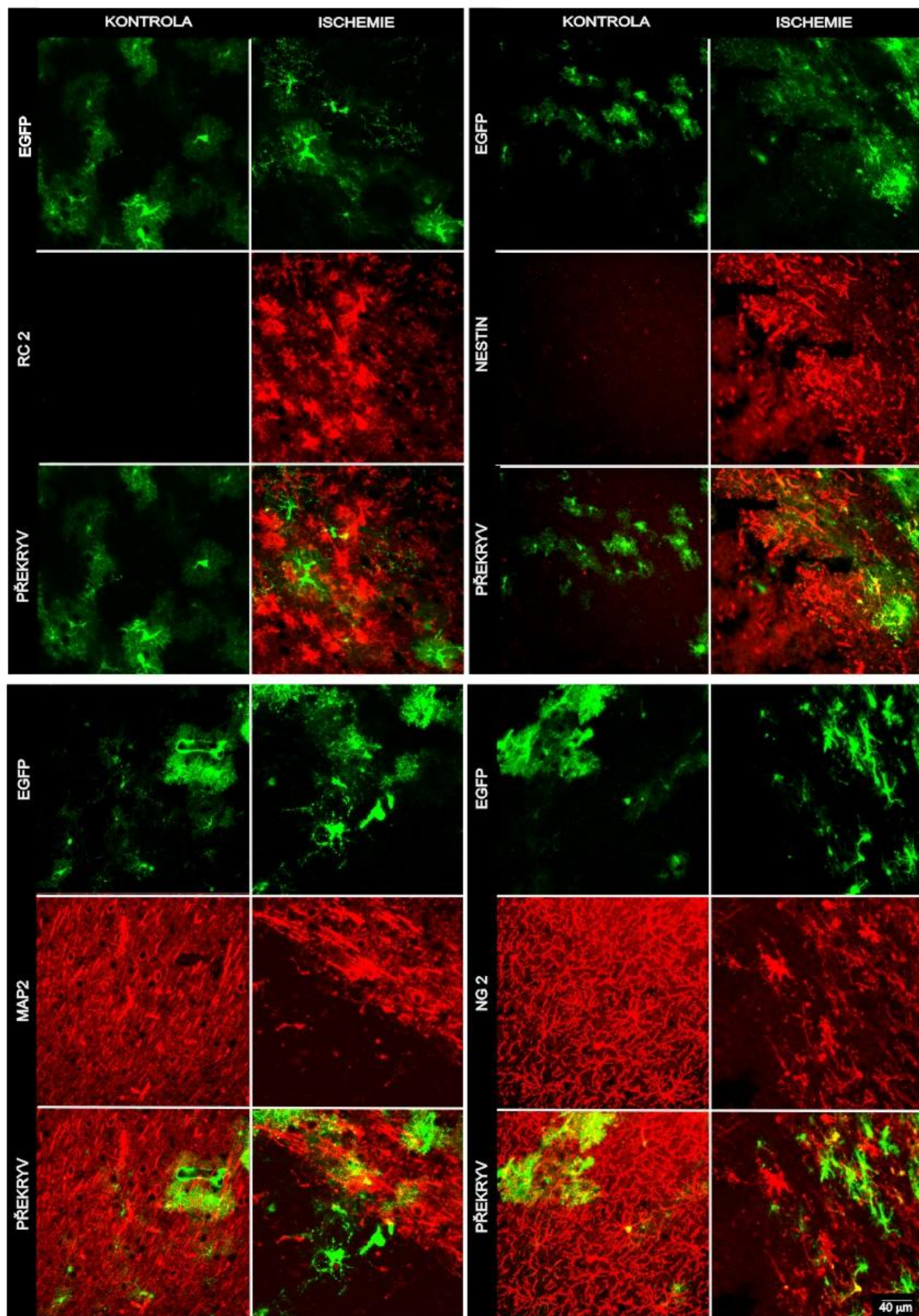
5.1.2. Změna gliogeneze v mozkové kůře

Další oblast, která byla imunohistologicky analyzována je mozková kůra na rozhraní ischemické léze a nepoškozené tkáně (**viz obr. 19 A**). V této oblasti probíhá reaktivní glióza, která se podílí na vzniku gliální jizvy. Tři dny po MCAO imunohistochemická analýza ukázala, že exprese GFAP je na rozhraní léze výrazně zvýšena (**obr. 19 B**) a začal se zde exprimovat vimentin, RC2 a nestin, které se v nepoškozené kůře neexprimují (**obr. 19 C, 20 - nahoře**). To dokumentuje, že se na reaktivní glióze výrazně podílí astrocyty, které po aktivaci začnou exprimovat markery radiálních glií a proliferovat, což je doprovázeno expresí nestinu.



Obr. 19 – Zvýšená exprese GFAP a vimentinu v oblasti reaktivní gliózy po MCAO

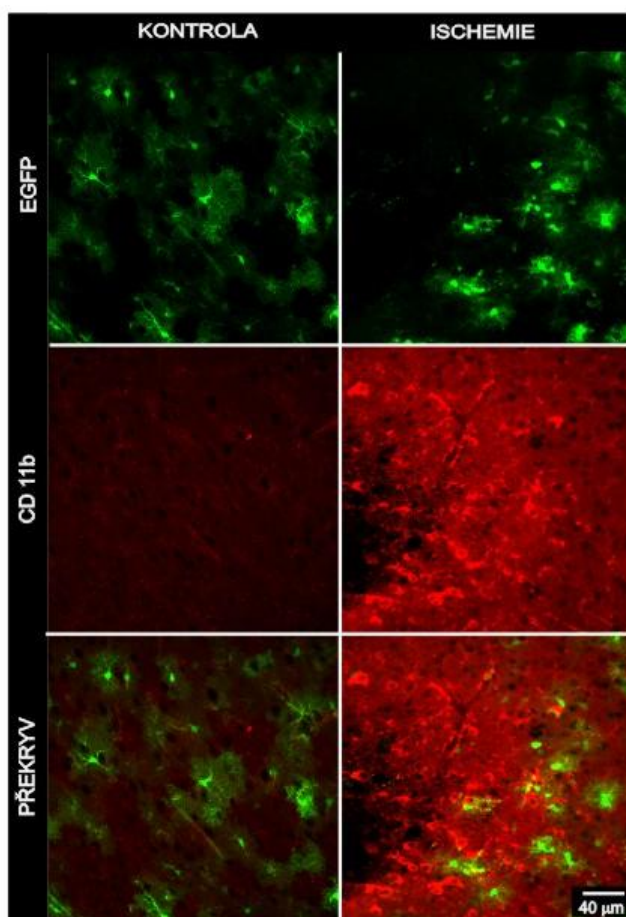
(A) Koronární řez mozkem, na kterém je červeně znázorněna oblast, kde byla provedena imunohistochemická analýza (vlevo). Vpravo je snímek mozkové kůry, na kterém je vidět vznik gliální jizvy v oblasti ischemického poškození, barveno na GFAP a DAPI. (B) Detail zvýšené exprese GFAP. (C) Po MCAO je v mozkové kůře exprimován de novo vimentin.



Obr. 20 – Imunohistochemické změny v mozkové kůře na rozhraní léze po MCAO

Na rozhraní ischemické léze se začne exprimovat RC2 (vlevo nahoře) a nestin (vpravo nahoře). Snížená intenzita MAP2 barvení ukazuje na odumřelé neurony v ischemické lézi (vlevo dole). NG2-glie významně změnily morfologii, tj. mají zvětšený objem buněčného těla a zkrácené výběžky.

Na vzniku reaktivní gliózy se dále podílejí NG2-glie, které změni svoji morfologii (**obr. 20 – vpravo dole**), což je charakteristické pro jejich aktivaci, po které se dělí a diferencují v oligodendrocyty a protoplazmatické astrocyty a tak přispívají k tvorbě gliální jizvy (Belachew, Chittajallu et al. 2003). Barvení na specifický marker neuronů MAP2 ukazuje, že se v ischemické lézi žádné neurony již nenachází (**obr. 20 – vlevo dole**), spolu s oligodendrocyty jsou totiž velmi citlivé k ischemickému stresu a nepřežívají. Mrtvé a poškozené buňky fagocytují CD11b pozitivní mikroglie (**obr. 21**), které se aktivují a migrují do místa poškození.

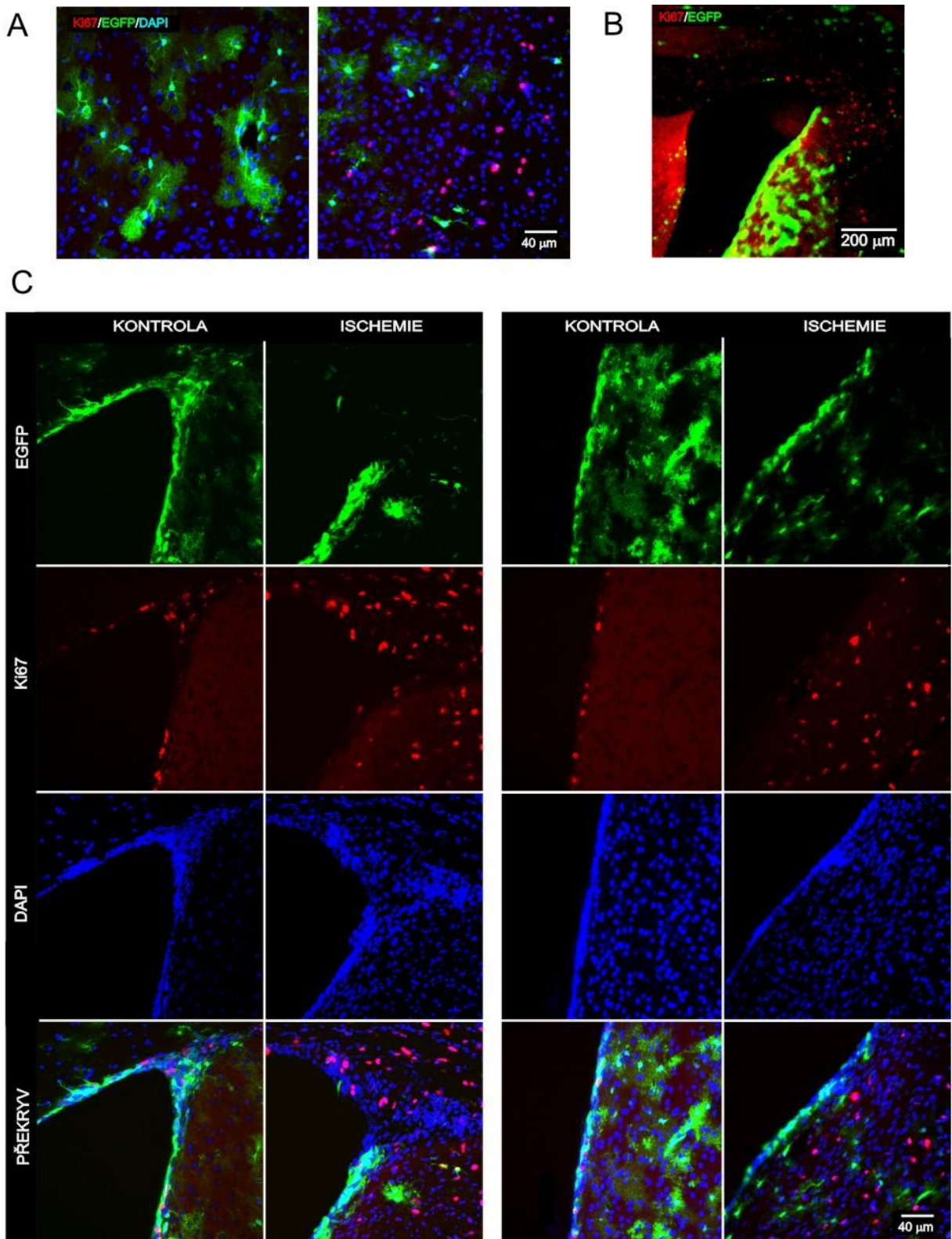


Obr. 21 – Aktivace a migrace mikroglíí

Mikroglie specificky značené CD11b migrují v kortexu směrem k poškozené oblasti a mění se z klidové mikroglie na aktivovanou.

5.1.3. Zvýšení proliferace 3 dny po MCAO

Proliferace buněk byla sledována pomocí protilátky proti jadernému proteinu Ki67. Jeho exprese probíhá zejména v pozdní G1 fázi, S, G2 a M fázi, zatímco v G0 fázi Ki67 exprese neprobíhá. Imunohistochemie ukázala, že po MCAO se v mozkové kůře na rozhraní poškozené a nepoškozené oblasti objevují proliferující buňky (**obr. 22 A**). Současně v SVZ je zvýšen počet proliferujících buněk, které se nevyskytují pouze v těsné blízkosti komory, jak je tomu u kontroly (**obr. 22 C**).



Obr. 22 – Zvýšená proliferace v kortexu a v SVZ 3 dny po MCAO

(A) Zvýšená proliferace buněk na rozhraní ischemické a nepoškozené oblasti v kortexu po MCAO (vpravo) a kontrola ze stejné oblasti, kde proliferace neprobíhá (vlevo). Červeně jsou obarveny jádra s expresí Ki67. (B) Přehledný snímek kontralaterální komory po MCAO, na kterém jsou vidět proliferující buňky, značené červeně markerem Ki67. (C) Detailnější pohled na roh postranní komory (vlevo) a laterální stranu postranní komory (vpravo). Je zde patrné zvýšení počtu Ki67 pozitivních proliferujících buněk. DAPI (modře) barví všechna jádra buněk.

V kortexu vzniká po MCAO gliální jizva, v které marker proliferujících buněk Ki67 barví proliferující reaktivní astrocyty a NG2-glie, jež v nepoškozené kůře téměř neproliferují. V SVZ je pozitivně ovlivněna především proliferace B-buněk, C-buněk, A-buněk a ependymových buněk (Zhang, Wang et al. 2008; Zhang, Zhang et al. 2006; Carlen, Meletis et al. 2009).

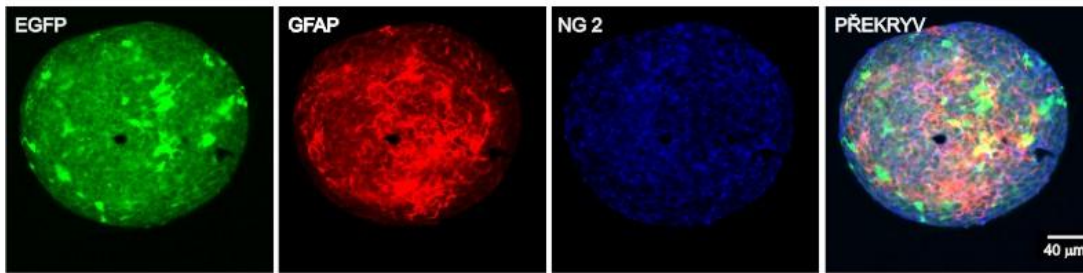
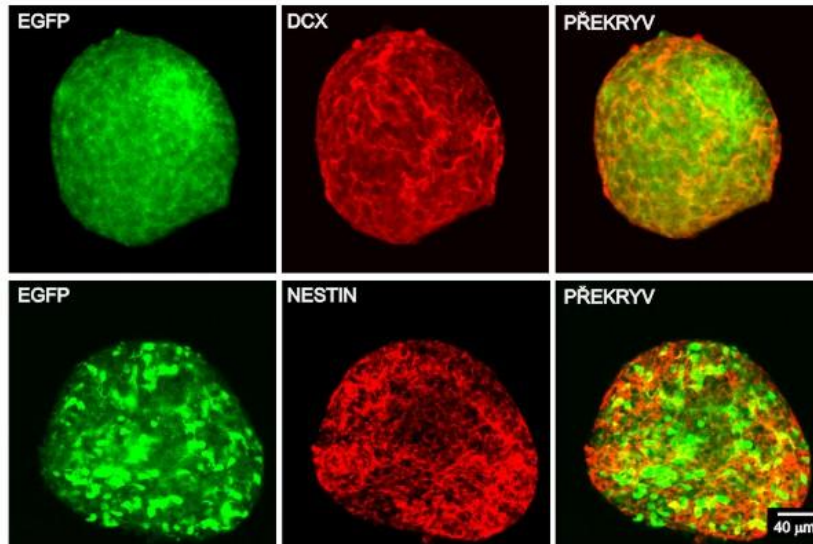
5.2. Charakterizace neurosfér

V proliferačním médiu byly kultivovány buňky izolované 3 dny po provedení MCAO. Izolace byla provedena ze stejných oblastí, jako byla prováděna imunohistologická analýza: ze SVZ a z mozkové kůry na přechodu poškozené a nepoškozené oblasti, kde probíhá reaktivní glióza. Pro kontrolu byly izolovány buňky z myši po "sham" operaci také z mozkové kůry a SVZ. Neurosféry byly imunocytochemicky obarveny protilátkami proti GFAP, DCX, NG2 a nestinu.

5.2.1. Imunocytochemická analýza neurosfér získaných z buněk izolovaných ze SVZ

Buňky izolované ze SVZ myši po MCAO a po "sham" operaci, byly kultivovány v proliferačním médiu. Po 11 dnech byly neurosféry z fixovány a imunocytochemicky analyzovány. Ukázalo se, že imunocytochemické barvení neurosfér narostlých z myši po "sham" a MCAO operaci, je srovnatelné. V EGFP pozitivních neurosférách byl exprimován GFAP a NG2 proteoglykan, jejichž exprese se nepřekrývala (**obr. 23 A**). Taktéž DCX pozitivní buňky se nacházely na povrchu neurosfér (**obr. 23 B – horní řada**) a současně byl ve všech neurosférách exprimován nestin (**obr. 23 B – dolní řada**).

Tyto data ukazují, že GFAP/EGFP buňky jsou schopny tvořit neurosféry, které jsou GFAP, NG2, DCX a nestin pozitivní. EGFP pozitivní buňky se nacházejí spíše uvnitř buněčné masy. Astrocyty barvené na GFAP, NG2-glie a nestin pozitivní buňky jsou rovnoměrně distribuovány v celé neurosféře. Naopak marker neuroblastů DCX, se nacházel především na povrchu neurosféry. To naznačuje, že aktivně proliferující buňky se nachází uvnitř neurosféry a nově vzniklé již částečně diferencované buňky se dostávají na povrch.

A**B**

Obr. 23 – Imunocytochemická charakterizace neurosfér kultivovaných ze SVZ

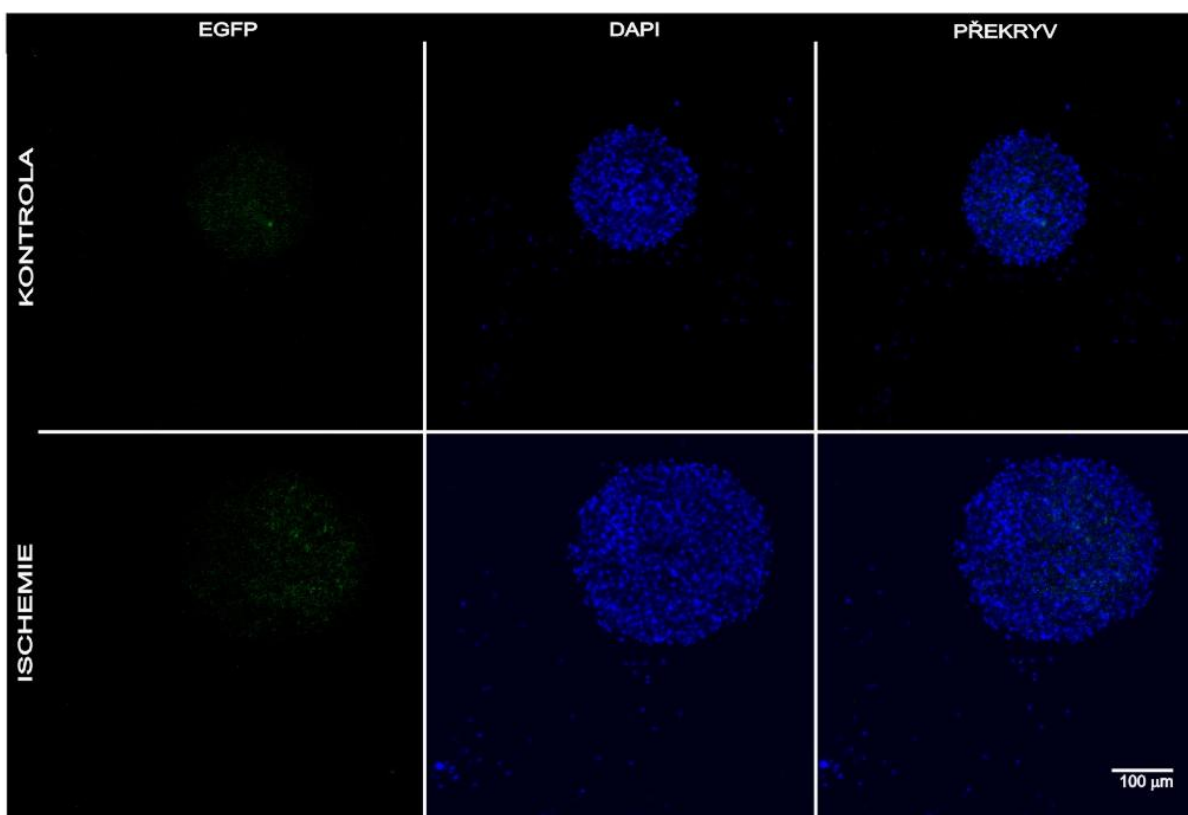
(A) Dvojité barvení neurosféry na GFAP (červeně) a NG2 (modře). Překryvný obrázek ukazuje, že se barvení nepřekrývá. (B) DCX pozitivní buňky se nachází na povrchu neurosféry (horní řada). Nestin je distribuován v celé neurosféře (dolní řada).

5.2.2. Imunocytochemie neurosfér z buněk izolovaných z oblasti reaktivní gliózy

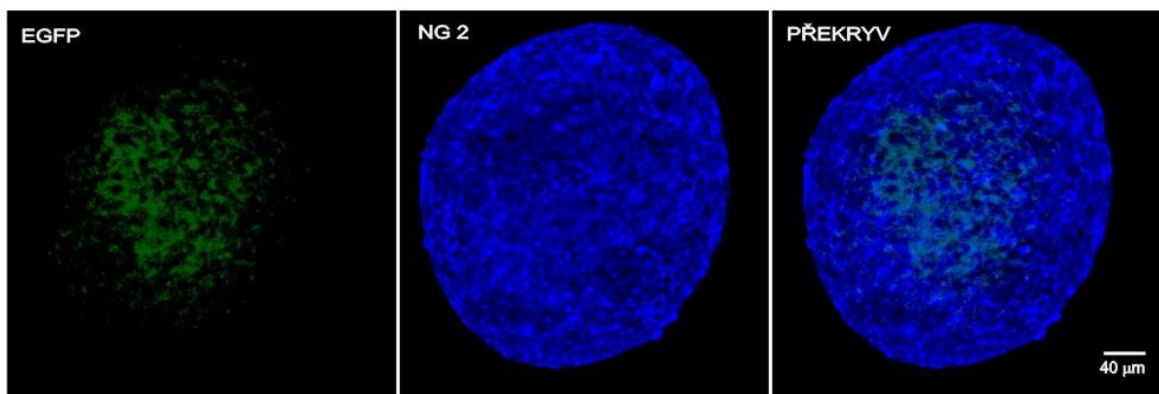
Z této oblasti jak po "sham" operaci, tak i po MCAO narostlo malé množství neurosfér. Proliferace buněk v neurosféře byla pomalejší, proto byly z fixovány až po 22 dnech kultivace v proliferačním médiu. Ukázalo se, že žádná neurosféra po MCAO ani z kontroly nebyla EGFP pozitivní (**obr. 24 A**). Vzhledem k malému množství neurosfér, bylo provedeno pouze imunocytochemické barvení na NG2 proteoglykan, které potvrdilo domněnku, že bude ve všech neurosférách exprimován (**obr. 24 B**). Dále se s těmito neurosférami v experimentu již nepokračovalo.

V porovnání se SVZ se v mozkové kůře nepoškozené myši i v oblasti reaktivní gliózy po MCAO nachází menší množství buněk, které jsou schopny proliferovat v neurosféře v *in vitro* podmínkách. Pouze NG2-glie z této oblasti jsou schopny tvorby neurosfér tři dny po MCAO.

A



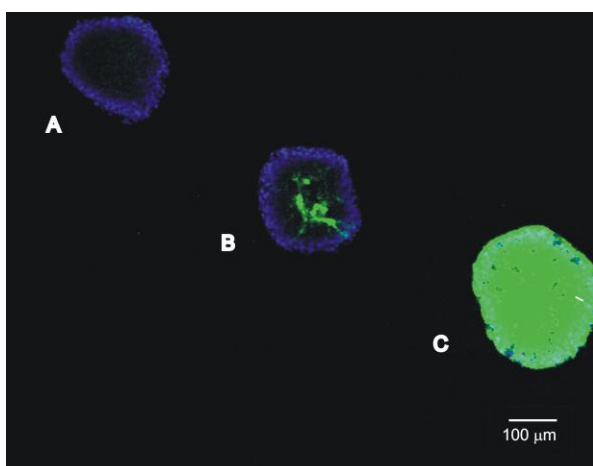
B



Obr. 24 – Neurosféry z buněk izolovaných z kortexu a z oblasti reaktivní gliózy
 (A) Neurosféry barvené na DAPI (modře) nebyly EGFP pozitivní v kontrole (horní řada) ani po MCAO (spodní řada). (B) Všechny neurosféry z této oblasti byly NG2 pozitivní (modře).

5.2.3. Změna procentuálního zastoupení EGFP pozitivních neurosfér po MCAO

Dále bylo zjišťováno, zda MCAO ovlivňuje schopnost EGFP pozitivních buněk v SVZ tvořit neurosféry v *in vitro* podmínkách. Neurosféry narostlé z buněk izolovaných z kontrolních myšiček a z myšiček po MCAO, byly po 11 dnech z fixovány a jádra buněk byly vizualizovány použitím DAPI. Neurosféry byly pro kvantifikaci rozděleny do tří skupin (**obr. 25**) a manuálně spočítány. První skupinou byly EGFP negativní neurosféry, další skupinou byly částečně EGFP pozitivní neurosféry a poslední skupinu tvořily neurosféry, které byly z více jak 80% pozitivní.

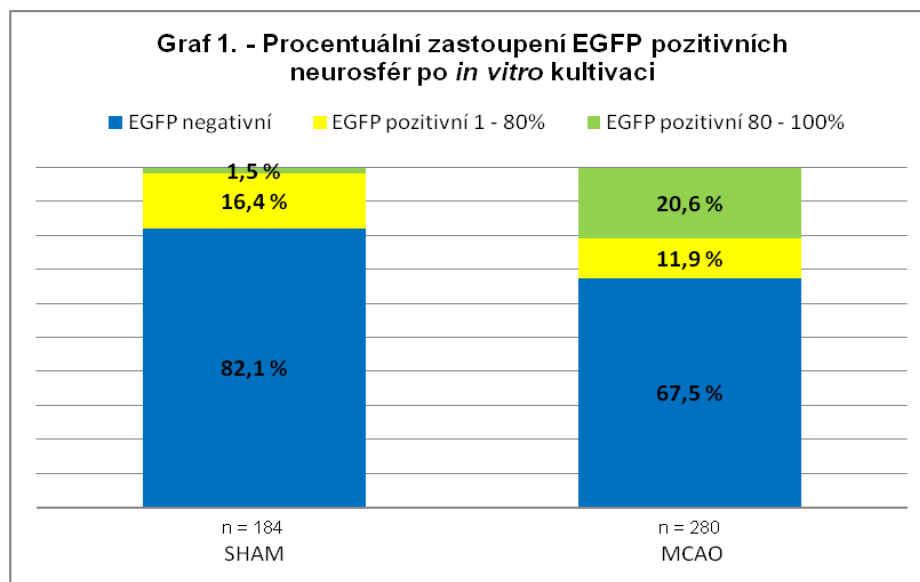


Obr. 25 – Skupiny neurosfér

- (A) EGFP negativní neurosféry.
- (B) Částečně EGFP pozitivní neurosféry.
- (C) Neurosféry z 80 – 100% EGFP pozitivní. Modře DAPI, zeleně EGFP.

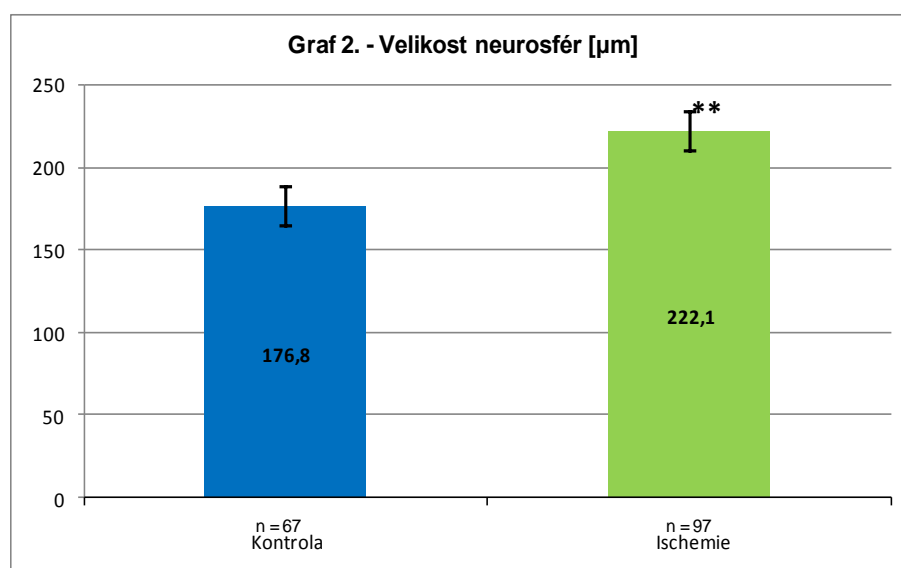
Z celkového počtu 184 neurosfér z kontrolních myšiček bylo 82,1% neurosfér EGFP negativní, 16,4% tvořily neurosféry částečně EGFP pozitivní a pouze 1,5% neurosfér zcela pozitivní (**viz graf 1.**). Po MCAO došlo k procentuálnímu zvýšení počtu EGFP pozitivních neurosfér a to zejména skupiny, která je z 80 – 100% pozitivní. Po MCAO analýza 280 neurosfér ukázala následující poměr: 67,5% tvořily EGFP negativní neurosféry, 11,9 % částečně EGFP pozitivní neurosféry a 20,6% neurosfér bylo zcela EGFP pozitivních.

Z analýzy procentuálního zastoupení jednotlivých skupin vyplývá, že po MCAO více EGFP pozitivních buněk SVZ proliferuje a tvoří neurosféry *in vitro*, a zároveň v průběhu této proliferace méně ztrácejí EGFP pozitivitu tzn. déle si udržují vlastnosti NSCs.



5.2.4. Změna velikosti neurosfér po MCAO

Pro zjištění vlivu MCAO na velikost neurosfér byly použity neurosféry z předchozího experimentu tj. buňky izolované ze SVZ proliferovaly po dobu 11 dní v médiu a následně byly zfixovány a obarveny na DAPI. Při malém zvětšení (10x) byly neurosféry nasnímány konfokálním mikroskopem (Zeiss) a jejich průměr byl změřen použitím nástroje "LSM Image Browser Tools" (Zeiss, Oberkochen, Germany).

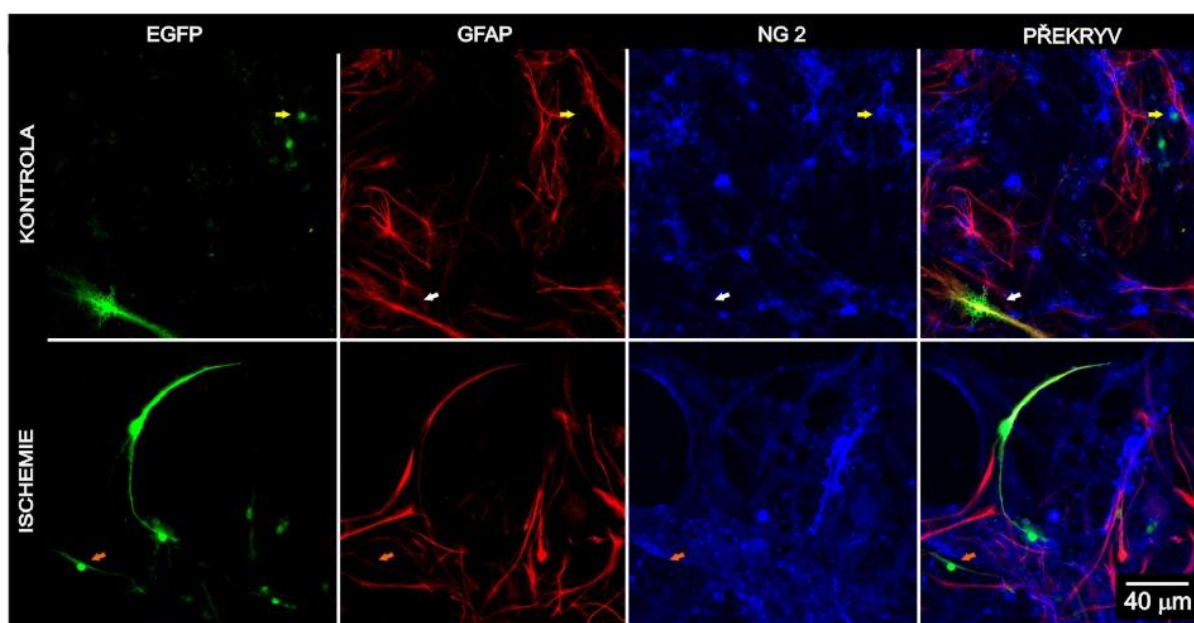


Ukázalo se, že neurosféry po MCAO narostly do signifikantně ($p = 0.0033$) větší velikosti než u kontroly (**viz graf 2.**). Průměrná velikost kontrolních neurosfér byla $176,8 \pm 11,8 \mu\text{m}$ ($n=67$), zatímco neurosféry po MCAO narostly do průměrné velikosti

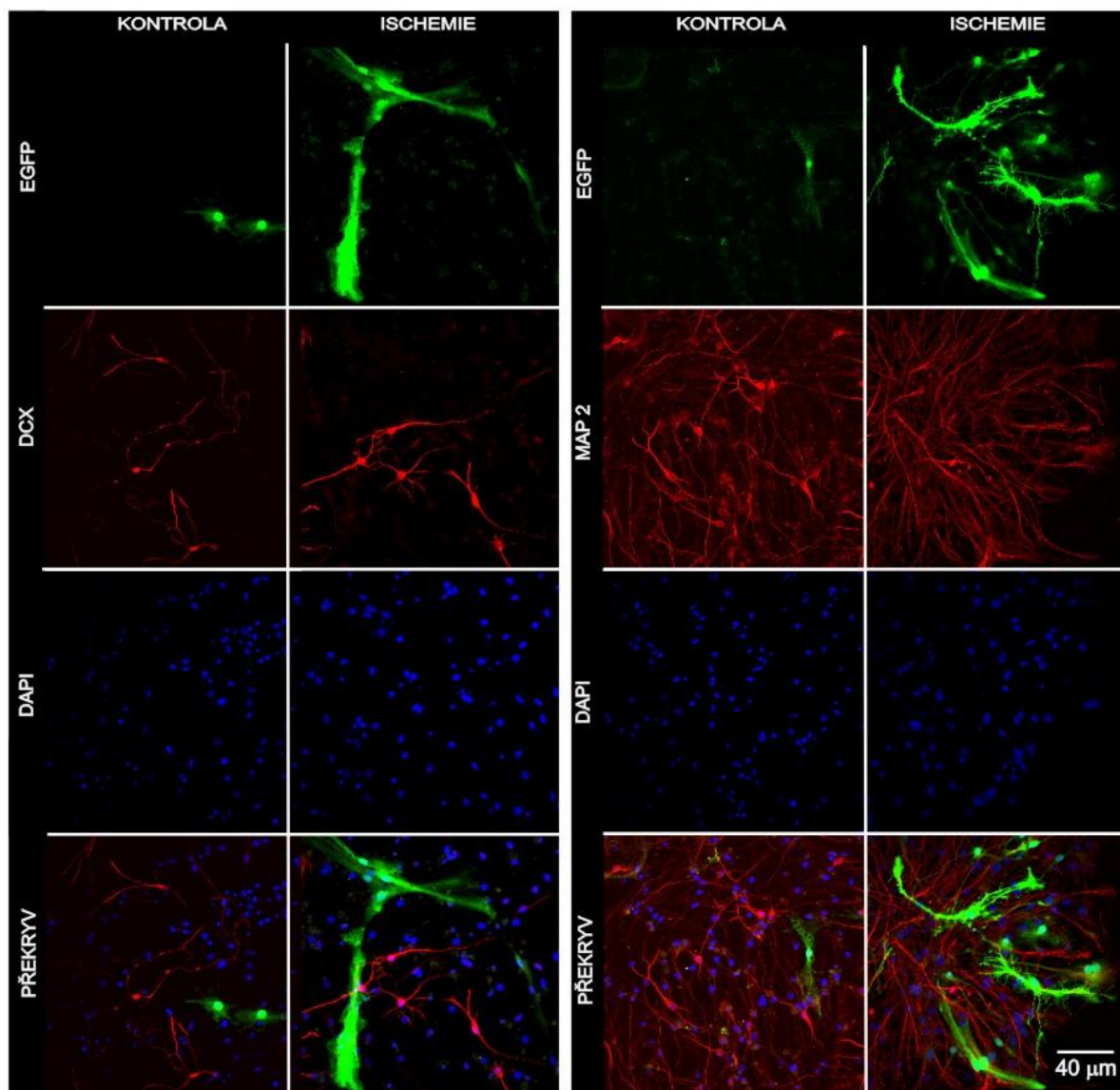
222,1 ± 11.5 μm (n=97). Velikost neurosfér je ovlivněna zejména rychlostí proliferace. Vzhledem k tomu, že neurosféry byly po MCAO větší, dá se předpokládat, že ve srovnání s kontrolními neurosférami rychleji proliferovaly.

5.3. Imunocytochemická analýza diferencovaných buněk v kultuře

Neurosféry pocházející z buněk SVZ byly disociovány a přeneseny do proliferačního média na skla potažená poly-L-lysinem. Po jednom týdnu byly diferencované buňky zfixovány a imunocytochemicky analyzovány. Současné použití dvou protilátek GFAP/NG2 ukázalo, že EGFP pozitivní buňky nemusí být vždy GFAP pozitivní (**viz. obr. 26**), ale mohou být naopak i NG2 pozitivní. Žádné pozorovatelné změny oproti kontrolním buňkám nebyly zaznamenány. Také při použití markerů neuronů a jejich prekurzorů: DCX a MAP2 nebyl viditelný žádný rozdíl v porovnání s kontrolní kulturou (**obr. 27**). Z toho vyplývá, že neurosféry z myši po MCAO a z kontrolních myši diferencují v buňky stejných typů a se srovnatelnou morfologií. Jednoznačný rozdíl byl však zaznamenán v morfologii EGFP pozitivních buněk a buněk pozitivních na DCX a MAP2 (**obr. 27**). Zatímco EGFP⁺ buňky jsou ploché a velké, tak DCX⁺ a MAP2⁺ buňky vykazují neurální morfologii tj. malá kulatá těla s jedním nebo několika dlouhými výběžky.



Obr. 26 – Imunocytochemická charakterizace kultury diferencovaných buněk
Dvojitě barvení na GFAP/NG2 dokumentuje tři typy EGFP⁺ buněk. Prvním jsou GFAP⁺/EGFP⁺ buňky (bílá šipka). Oranžová šipka ukazuje na GFAP⁻/EGFP⁺ buňky, a NG2⁺/EGFP⁺ buňky jsou označeny žlutou šipkou.



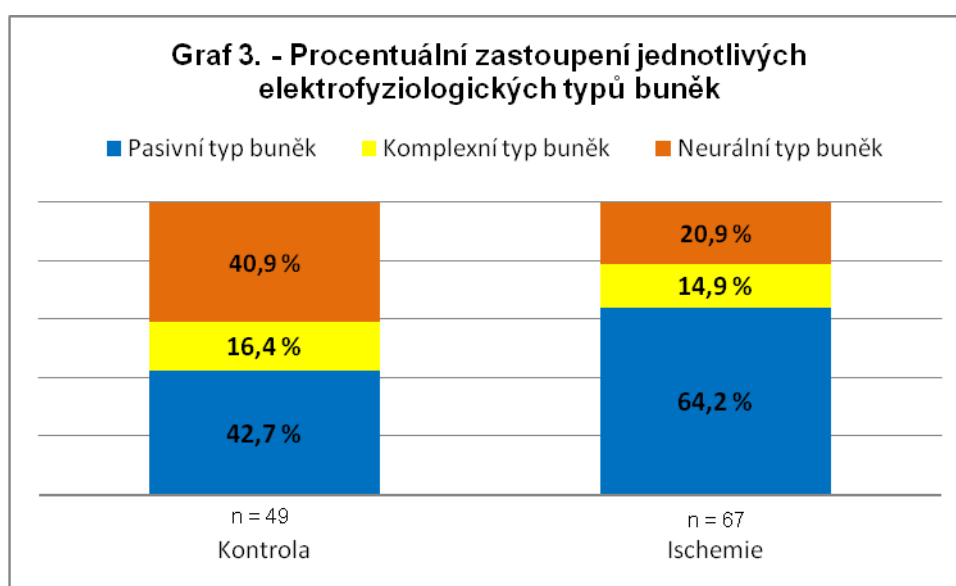
Obr. 27 – Srovnatelná diferenciacce buněk po MCAO

Nově vzniklé neurony pozitivní na DCX (vlevo) a zralejší neurony značené protilátkou proti MAP2 (vpravo) se ve srovnání s kontrolou neliší svou morfologií. EGFP pozitivní buňky jsou ve srovnání s DCX⁺ a MAP2⁺ buňkami mnohem větší a jsou ploché.

5.4. Vliv ischemie na membránové vlastnosti diferencovaných buněk

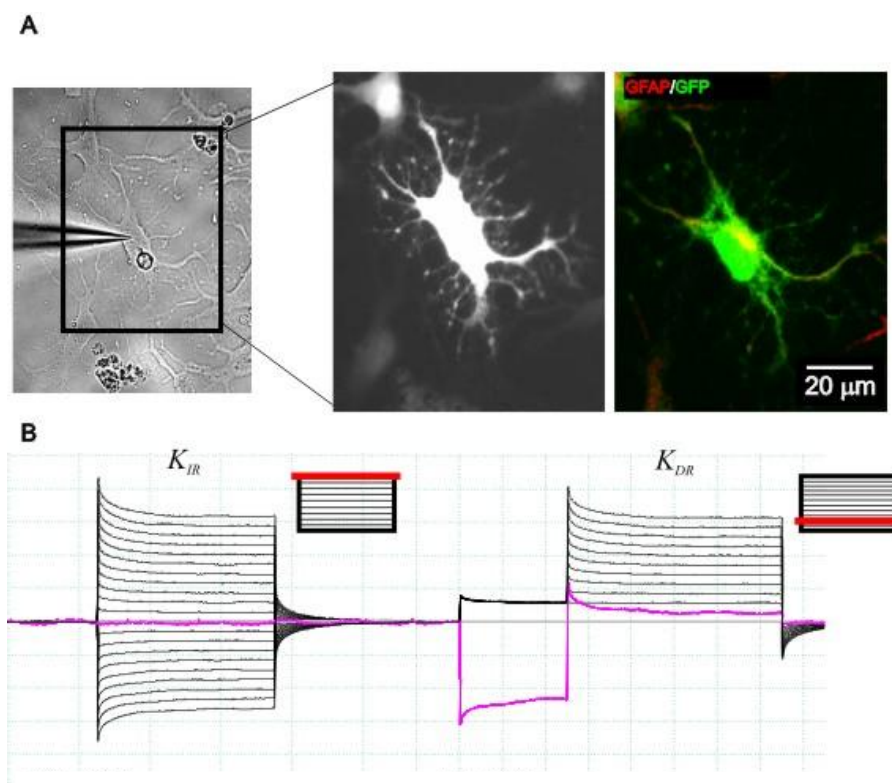
Pomocí metody terčíkového zámku ("patch clamp"), kdy byly proudy snímány z celé buňky („whole-cell“ konfigurace) byl sledován vliv fokální ischemie na membránové vlastnosti buněk, izolovaných ze SVZ. Sledováním pasivních (V_m , IR, C_m) a aktivních (proudové hustoty napěťově závislých proudů) membránových vlastností lze určit, jak se buňky vyvíjejí. Buňky izolované ze SVZ byly měřeny v rozmezí 7 – 10 dnů od indukce diferenciaci *in vitro*. Z každé oblasti snímané digitální kamerou byly naměřeny proudy ze 4 – 10 buněk. Výsledky mohou být ovlivněny skutečností, že některé buňky (zejména ploché) jsou obtížněji měřitelné.

Buňky byly rozděleny do tří skupin podle proudových charakteristik. Jako pasivní typ buněk byly označovány buňky, které vykazovaly symetrické časově a napěťově nezávislé proudy. Komplexní typ buněk se vyznačoval přítomností vně i dovnitř usměrněných draselných proudů. Buňky s vně usměrněnými draselnými proudy a s dovnitř usměrněnými Na^+ proudy byly označovány jako neurální. Po ischemii se změnilo poměrové zastoupení jednotlivých typů buněk ve srovnání s kontrolou (**graf 3.**). Zvýšilo se zastoupení pasivních typů buněk z 42,7% na 64,2% a snížilo se zastoupení neurálních typů buněk z 40,9% na 20,9%. Naproti tomu procentuální poměr komplexních buněk zůstává nezměněn (16,4% versus 14,9%).



5.4.1. Ovlivnění membránových vlastností pasivního typu buněk po ischemii

Buňky pasivního typu mají obvykle velké ploché buněčné tělo (20 – 30 μm) s mnoha krátkými výběžky, které jsou silně adherované k poly-L-lysinem potaženým sklíčkům. Imunocytochemické barvení prokázalo v pasivních buňkách přítomnost GFAP (**obr. 28 A**) a ukázalo se, že GFAP/EGFP buňky vykazují především pasivní proudy.



Obr. 28 – Charakterizace pasivního typu buněk

(A) Morfologická a imunocytochemická charakterizace pasivních buněk. Vlevo je snímek z digitální kamery v průběhu měření metodou terčíkového zámku. Uprostřed buňka po označení pomocí fluorescenční barvy Lucifer Yellow. Napravo stejná buňka po imunocytochemickém barvení protilátkou proti GFAP (červeně), zelený kanál je fluorescenční barva z měření (GFP). Žlutá barva značí překryv GFAP/GFP. (B) Typické pasivní proudy GFAP^+ buněk. Tyto buňky vykazují velmi nízké amplitudy K_{IR} (vlevo) a K_{DR} (vpravo) proudů. Růžová barva demonstruje napěťově závislé K^+ proudy po odečtení pasivních proudů.

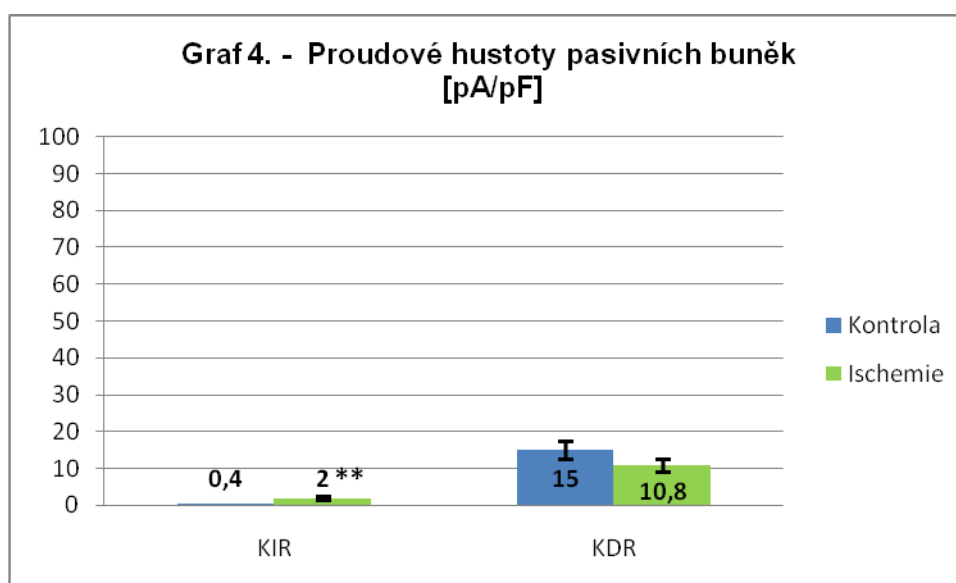
Ve srovnání s ostatními buněčnými typy nacházejí se v kultuře, mají největší membránovou kapacitu, která v kontrolních buňkách dosahovala hodnoty $C_m = 21,5 \pm 3,3 \text{ pF}$ a nejvíce hyperpolarizovaný klidový membránový potenciál ($V_m = -78,5 \pm 2,3 \text{ mV}$). Na druhou stranu mají nejnižší membránový odpor ($IR = 87,5 \pm 7,3 \text{ M}\Omega$; viz **tab. 5.**).

Tab. 5. – Elektrofyziologické vlastnosti pasivních buněk po ischemii

	Kontrola		Ischemie	
V _m [mV]	-78,5	2,3	-75,2	1,9
IR [MΩ]	87,5	7,3	85,0	7,0
C _m [pF]	21,5	3,3	20,1	2,7
K _{IR} /C _m [pA/pF]	0,4	0,3	2,0 **	0,4
K _{DR} /C _m [pA/pF]	15,0	2,5	10,8	1,7
K _A /C _m [pA/pF]	-	-	-	-
Na ⁺ /C _m [pA/pF]	-	-	-	-
N	21		43	
	průměr	S.E.M. [±]	průměr	S.E.M. [±]

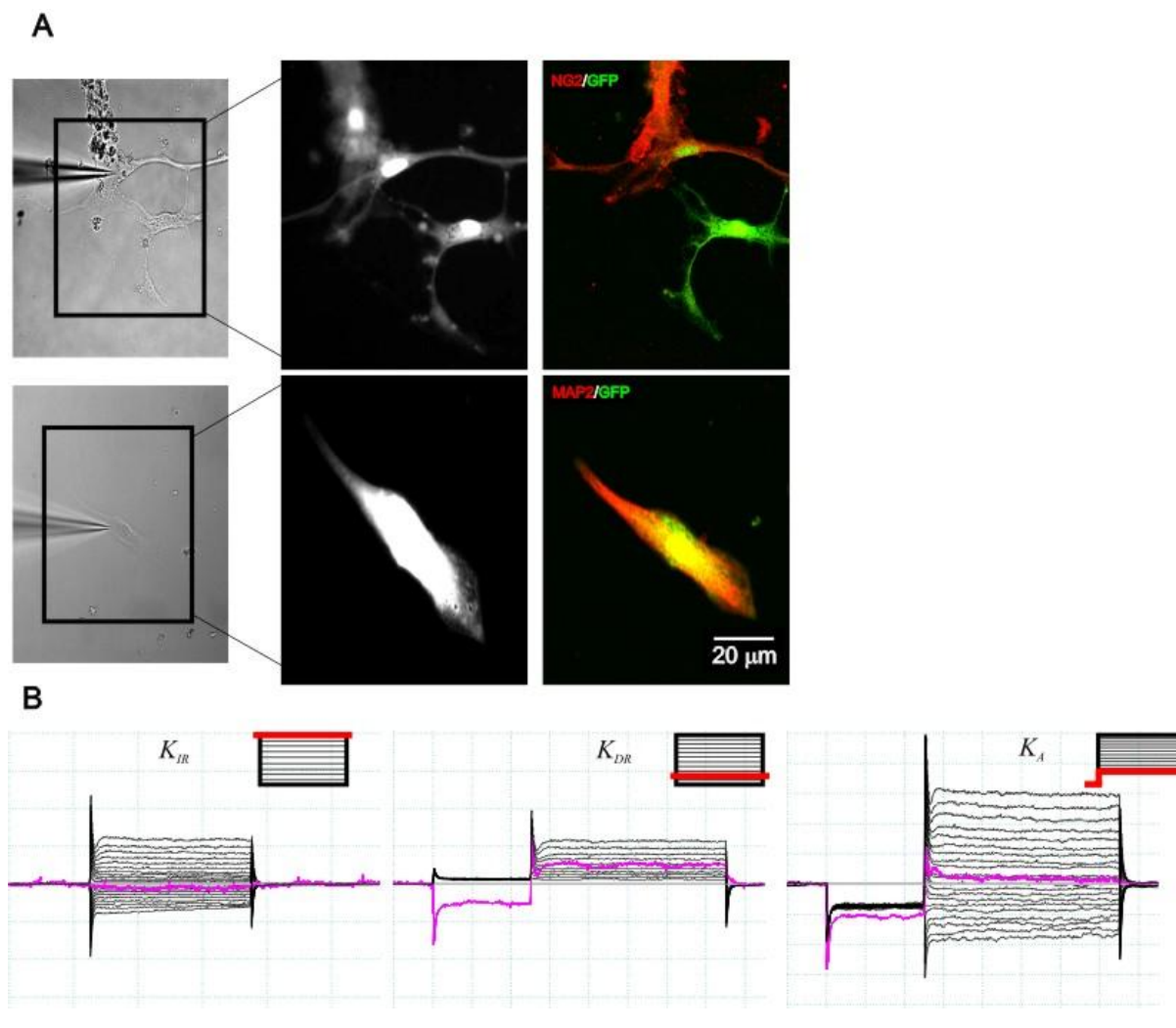
Jejich proudové hustoty napěťově závislých dovnitř usměrněných proudů K_{IR} byly téměř nulové (K_{IR}/C_m = 0,4 ± 0,3 pA/pF), také proudové hustoty vně usměrněných K⁺ proudů dosahovaly nízkých hodnot (K_{DR}/C_m = 15,0 ± 2,5 pA/pF; **obr. 28 B**). Ischemie neovlivnila pasivní membránové vlastnosti tohoto buněčného typu (**graf 7.; 8.; 9.**), pouze K_{IR} proudové hustoty dosahovaly signifikantně vyšších hodnot (K_{IR}/C_m = 2 ± 0,4 pA/pF; **viz graf 4.**).

Tyto výsledky dokumentují, že v kultuře diferencovaných buněk pocházejících ze SVZ myši po MCAO, se nachází více pasivních GFAP a GFAP/EGFP pozitivních buněk, tj. astrocytů a NSCs (**graf 3.**). Dále tyto buňky vykazují vyšší K_{IR} proudy.



5.4.2. Ovlivnění membránových vlastností komplexního typu buněk po ischemii

Menší buňky (10 - 20 μm v průměru) s jedním nebo s několika výběžky vykazovaly komplexní typ proudů. Imunocytochemické barvení provedené po měření těchto buněk odhalilo, že tyto buňky byly NG2 a MAP2 pozitivní (obr. 29 A).



Obr. 29 – Charakterizace komplexního typu buněk

(A) Morfologická a imunocytochemická charakterizace komplexních buněk. Vlevo je snímek z digitální kamery v průběhu měření. Uprostřed buňka po označení pomocí fluorescenční barvy. Napravo stejná buňka po imunocytochemickém barvení protilátkou proti NG2 (horní řada) a MAP2 (dolní řada), zelený kanál je fluorescenční barva pocházející z měření (GFP). (B) Typické proudy komplexních typů buněk. Vlevo K_{IR} , uprostřed K_{DR} a vpravo amplituda K_A . Růžová barva demonstruje napětově závislé K^+ proudy po odečtení pasivních proudů.

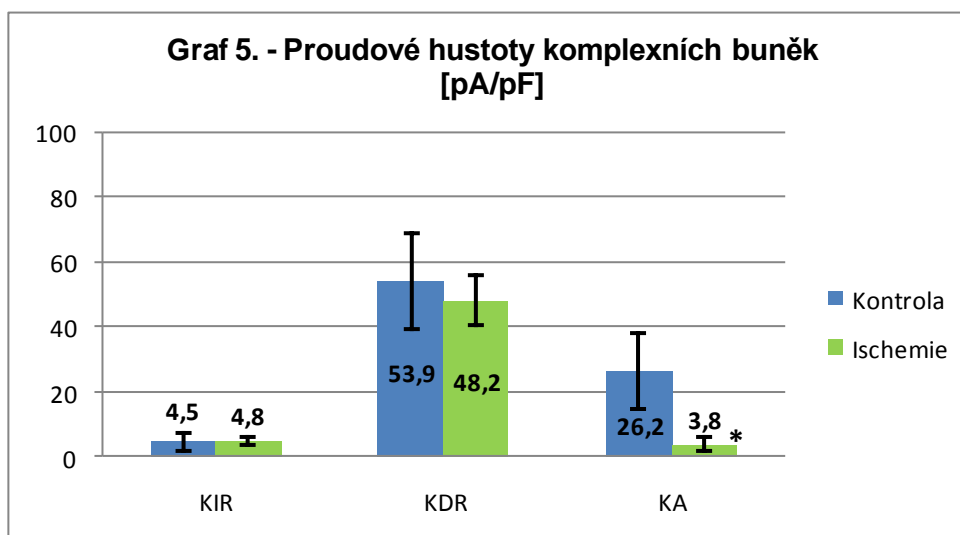
Buňky komplexního typu měly ve srovnání s pasivními buňkami v kultuře depolarizovanější hodnoty membránového potenciálu ($V_m = -68,4 \pm 8,3$ mV), nižší membránovou kapacitu ($C_m = 17,0 \pm 3,6$ pF) a větší membránový odpor ($I_R = 369,1 \pm 118,7$ M Ω ; **tab. 6.**). Pasivní membránové vlastnosti komplexních buněk naměřených v kultuře izolované z kontrolních zvířat se významně nelišily od komplexních buněk z MCAO myši (**graf 7.; 8.; 9.**).

Tab. 6. – Elektrofyziologické vlastnosti komplexních buněk po ischemii

	Kontrola		Ischemie	
V_m [mV]	-68,4	8,3	-69,4	5,9
I_R [M Ω]	369,1	118,7	198,6	32,2
C_m [pF]	17,0	3,6	11,0	1,1
K_{IR}/C_m [pA/pF]	4,5	2,6	4,8	1,4
K_{DR}/C_m [pA/pF]	53,9	14,7	48,2	7,9
K_A/C_m [pA/pF]	26,2	11,6	3,8 *	2,0
Na^+/C_m [pA/pF]	-	-	-	-
n	8		10	
	průměr	S.E.M. [\pm]	průměr	S.E.M. [\pm]

Komplexní buňky mají všechny tři typy napětově závislých K^+ proudů (**obr. 29 B**). Proudové hustoty K_{IR}/C_m v kontrolních buňkách komplexního typu byly vyšší než v případě pasivních buněk ($K_{IR}/C_m = 4,5 \pm 2,6$ pA/pF). To samé platí i pro K_{DR} proudy ($K_{DR}/C_m = 53,9 \pm 14,7$ pA/pF). Navíc tyto buňky vykazovaly i rychle se aktivující a inaktivující vně usměrněné napětově závislé K^+ proudy ($K_A/C_m = 26,2 \pm 11,6$ pA/pF). U komplexních buněk v kultuře z buněk izolovaných po ischemii byla signifikantně ($p = 0,0494$) snížena proudová hustota $K_A/C_m = 3,8 \pm 2,0$ pA/pF (**graf 5.**).

Vlivem ischemie nedochází ke změně procentuálního zastoupení komplexních buněk (**graf 3.**) tj. NG2-glií a neurálních prekurzorů (TAPs buňky). Jediné co se u tohoto typu buněk mění, je proudová hustota K_A proudů, jejíž hodnota je signifikantně snížena.

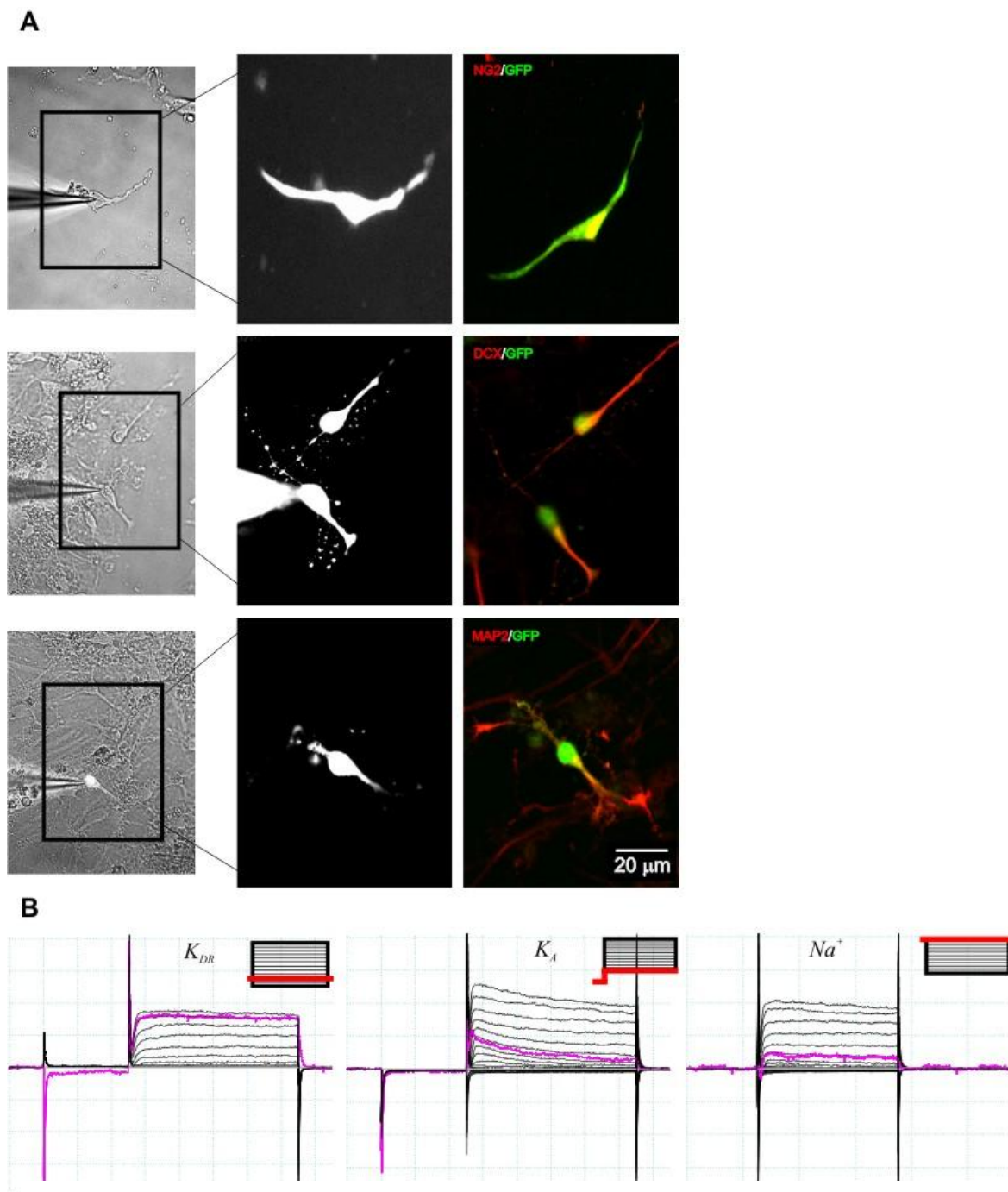


5.4.3. Ovlivnění membránových vlastností neurálního typu buněk po ischemii

Buňky neurálního typu měly většinou malá kulatá těla s průměrem 10-15 μm a s jedním nebo dvěma výběžky. Tyto buňky byly identifikovány jako NG2, DCX a MAP2 pozitivní (**obr. 30 A**).

Buňky neurálního typu naměřené v kultuře izolované z kontrolních myši měly membránový potenciál ($V_m = -67,1 \pm 2,6 \text{ mV}$). Ze všech typů buněk měly nejmenší membránovou kapacitu ($C_m = 8,7 \pm 0,7 \text{ pF}$) a zároveň největší membránový odpor ($IR = 1725,6 \pm 158,6 \text{ M}\Omega$; **viz tab. 7**). Po ischemii byla signifikantně ($p = 0,0056$) zvýšena membránová kapacita na $C_m = 15,1 \pm 2,1 \text{ pF}$ (**graf 8.**) a zároveň byl u těchto buněk signifikantně ($p < 0,0001$) snížen membránový odpor na $IR = 747,6 \pm 133,2 \text{ M}\Omega$ (**graf 9.**).

Buňky neurálního typu již nevykazovali žádné K_{IR} proudy. Zároveň však měly kromě K_{DR} a K_A proudů i Na^+ proudy (**obr. 30 B**), které v kontrolních buňkách dosahovaly hodnoty $\text{Na}^+ / C_m = 4,1 \pm 1,9 \text{ pA/pF}$. Ze všech ostatních buněčných typů měly nejvyšší K_{DR} proudy ($K_{DR} / C_m = 91,8 \pm 6,9 \text{ pA/pF}$) i K_A proudy ($K_A / C_m = 81,8 \pm 9,1 \text{ pA/pF}$; **viz tab. 7**). Vlivem ischemie došlo v buňkách neurálního typu k signifikantnímu ($p < 0,0001$) snížení proudové hustoty K_A proudu na hodnotu $K_A / C_m = 9,4 \pm 3,2 \text{ pA/pF}$ (**graf 6.**).



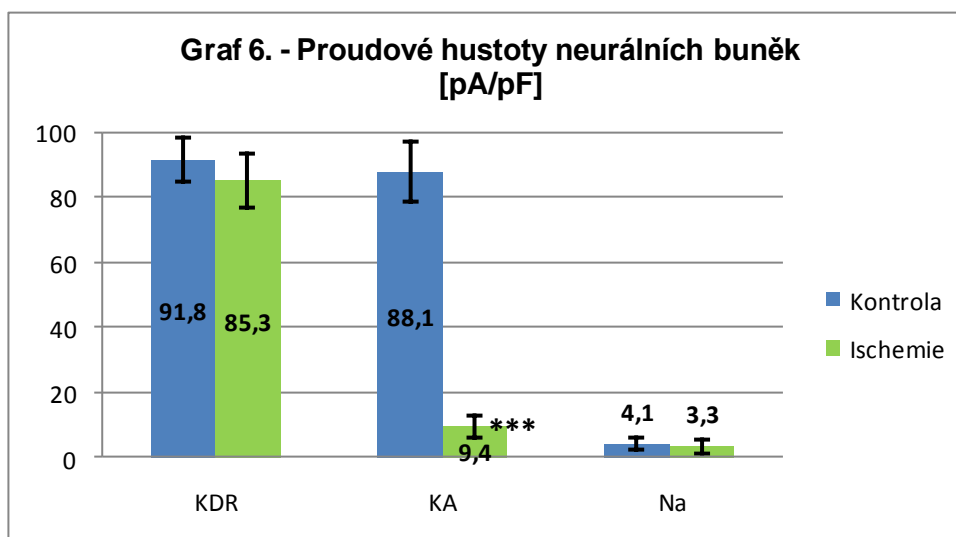
Obr. 30 – Charakterizace neurálního typu buněk

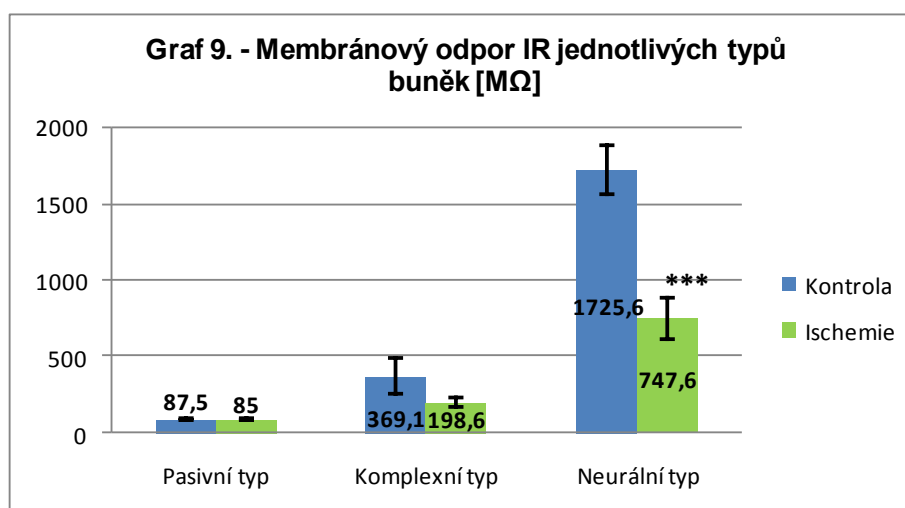
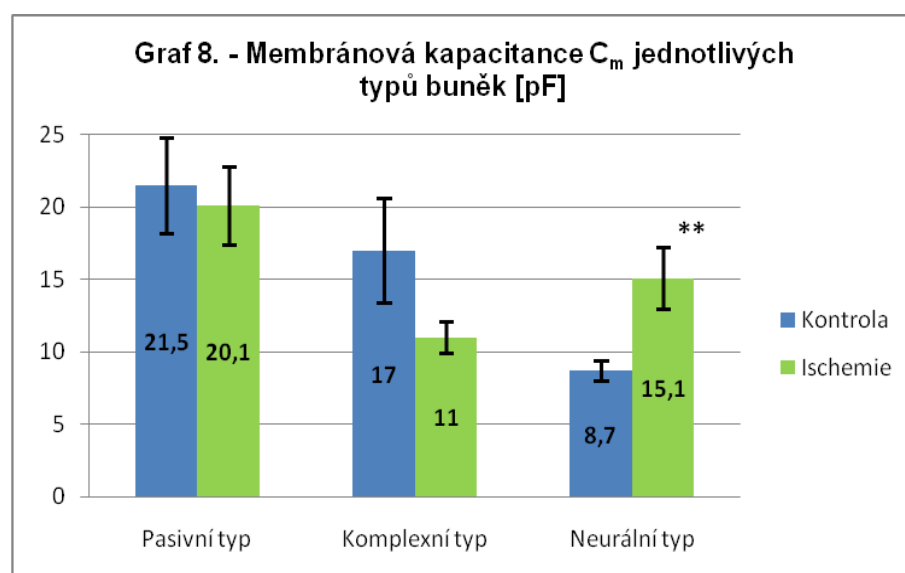
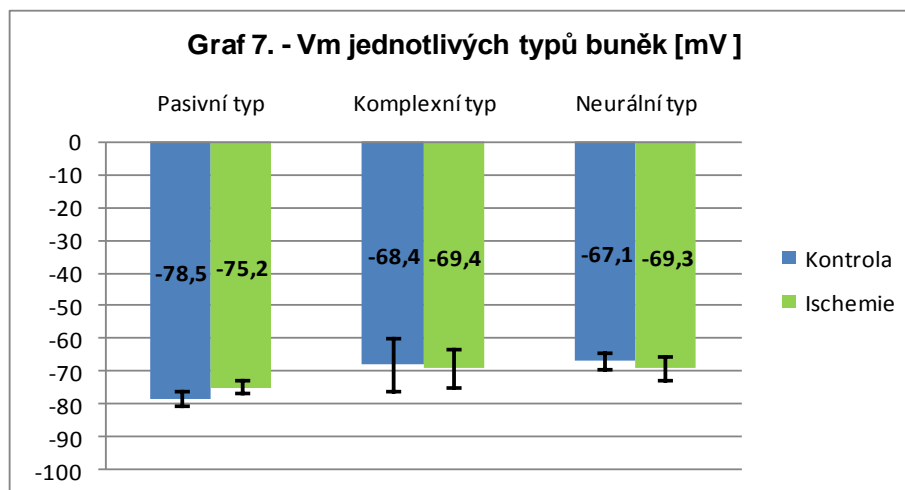
(A) Morfologická a imunocytochemická charakterizace komplexních buněk. Vlevo je snímek z digitální kamery v průběhu měření. Uprostřed buňka po označení fluorescenční barvou. Napravo stejná buňka po imunocytochemickém barvení na NG2 (horní řada), DCX (prostřední řada) a MAP2 (dolní řada). (B) Typické proudy neurálních typů buněk. Vlevo K_{DR} , uprostřed K_A a vpravo Na^+ . Růžová barva demonstruje napěťově závislé K^+ proudy po odečtení pasivních proudů.

Tab. 7. – Elektrofyziologické vlastnosti neurálních buněk po ischemii

	Kontrola		Ischemie	
	průměr	S.E.M. [±]	průměr	S.E.M. [±]
V_m [mV]	-67,1	2,6	-69,3	3,7
IR [MΩ]	1725,6	158,5	747,6 ***	133,2
C_m [pF]	8,7	0,7	15,1 **	2,1
K_{IR}/C_m [pA/pF]	-	-	-	-
K_{DR}/C_m [pA/pF]	91,8	6,9	85,3	8,5
K_A/C_m [pA/pF]	88,1	9,1	9,4 ***	3,2
Na^+/C_m [pA/pF]	4,1	1,9	3,3	2,3
n	20		14	

Ve shrnutí lze říci, že MCAO, model fokální ischemie ovlivňuje elektrofyziologické vlastnosti neurálních buněk i jejich procentuální zastoupení, které z hodnoty 40,9% klesly na 20,9%. Zároveň se zvýšila jejich membránová kapacita tj. velikost buněčného těla. Extrémní snížení membránového odporu bylo doprovázeno taktéž extrémním snížením proudových hustot K_A proudů, což naznačuje jejich nižší maturaci.





6. Diskuze

6.1. Zvýšená neurogeneze a gliogeneze po fokální ischemii

Fokální ischemické poškození způsobené MCAO indukuje proliferaci buněk a změnu exprese proteinů v SVZ postranních komor i v oblasti reaktivní gliózy, která probíhá na rozhraní poškozené a nepoškozené oblasti. Bylo ukázáno, že ischemie v jedné hemisféře ovlivňuje i v kontralaterální SVZ proliferaci, diferenciaci a migraci (Tzeng and Wu 1999). To je ve shodě s našimi výsledky, které dokumentují zvýšenou míru neurogeneze v SVZ postranní komory v kontralaterální hemisféře. Zvýšení neurogeneze se projevilo upregulací exprese GFAP, vimentinu, RC2, DCX a nestinu, jak bylo již dříve ukázáno v mnoha studiích (Zhang, Zhang et al. 2004; Zhang, Zhang et al. 2005; Thored, Arvidsson et al. 2006; Zhang, Zhang et al. 2008).

Ukázali jsme, že oblast mozkové kůry, na rozhraní poškozené a nepoškozené oblasti, se vyznačovala zejména markantním zvýšením exprese GFAP proteinu (Pforte, Henrich-Noack et al. 2005), dokumentující, že zde probíhá rozsáhlá reaktivní glióza, která je typická pro různá poranění (Herrmann, Imura et al. 2008; Colangelo, Cirillo et al. 2011). Na rozdíl od Nolte a spoluautorů (2001), kteří 4 dny po poškození mozkové kůry řeznou ranou popsali kromě zvýšení exprese GFAP i zvýšení exprese EGFP (Nolte, Matyash et al. 2001), jsme po MCAO nedetekovali významnou upregulaci EGFP. Tento rozdíl může být způsoben především použitím jiného modelu poškození. Z našich výsledků je zřejmé, že reaktivní astrocyty po ischemii proliferují (zvýšena exprese Ki67 v mozkové kůře), ale i dediferenciuji; tj. exprimují markery radiálních glií: vimentin, RC2 a nestin, jak již bylo ukázáno v předcházející studii (Burns, Murphy et al. 2009). NG2 pozitivní buňky v této oblasti změnily morfologii zvětšením buněčného těla a zbytněním výběžků, což je typické pro aktivované proliferující NG2 glie (Ohta, Iwai et al. 2003; Pivonkova, Benesova et al. 2010). Kromě toho, také aktivované mikroglie přispívají k populaci proliferujících buněk detekovaných expresí Ki67 v této oblasti (Anderova, Vorisek et al. 2011).

6.2. Schopnost neurálních kmenových/progenitorových buněk tvořit neurosféry

Neurosféry, získané z buněk izolovaných ze SVZ, exprimovaly tyto proteiny: nestin, DCX NG2 a GFAP. Přítomnost nestinu ve všech neurosférách dokumentuje, že obsahují buňky, které aktivně proliferují (Mignone, Kukekov et al. 2004). Marker migrujících neuroblastů DCX (Tanaka, Serneo et al. 2004), který se nacházel na povrchu neurosfér, ukazuje na přítomnost buněk směřující k neurální linii. Exprese NG2 proteoglykanu není specifická pouze pro NG2-glie jak bylo již ukázáno (Belachew, Chittajallu et al. 2003). Dromard s kolektivem autorů v roce 2007 pozoroval, že NG2 pozitivní buňky v neurosférách dávají během diferenciací vznik buňkám, které současně exprimují NG2 proteoglykan a neurální markery (Dromard, Bartolami et al. 2007). GFAP, marker NSCs, byl exprimován ve všech neurosférách, nicméně jen malé procento neurosfér exprimovalo EGFP. Vlivem ischemie došlo v neurosférách získaných ze SVZ jak ke zvýšení procentuálního zastoupení EGFP pozitivních neurosfér, tak i k intenzivnější expresi tohoto proteinu v jednotlivých neurosférách (viz graf 1.). Vzhledem k tomu, že EGFP pozitivní buňky SVZ jsou NSCs nebo astrocyty (Nolte, Matyash et al. 2001), lze se domnívat, že po MCAO větší procento EGFP pozitivních NSCs/astrocytů tvoří *in vitro* neurosféry, v kterých si udržují svoje proliferativní vlastnosti. Tuto domněnku potvrzuje i fakt, že současně došlo k velmi významnému zvětšení neurosfér (graf 2.), které je zapříčiněno podpořením proliferace NSCs v jednotlivých neurosférách.

Z oblasti mozkové kůry, ať již z oblasti reaktivní gliózy či z nepoškozené kůry, vznikl *in vitro* jen malý počet GFAP/EGFP negativních neurosfér. Vzhledem k tomu, že ani z oblasti reaktivní gliózy nenarostly žádné EGFP pozitivní neurosféry, dá se říci, že reaktivní astrocyty tři dny od MCAO nebyly schopny tvorby neurosfér, ačkoliv u nich tato schopnost byla prokázána (Burns, Murphy et al. 2009). Jediným dalším buněčným typem v mozkové kůře, který je schopen tvorby neurosfér jsou NG2-glie (Belachew, Chittajallu et al. 2003). Pro ověření hypotézy, že se jedná o neurosféry původem z NG2-glií, bylo provedeno imunocytochemické barvení na NG2-proteoglykan, které ukázalo, že jsou skutečně všechny neurosféry NG2 pozitivní.

6.3. Diferencované buňky jsou z imunocytochemického hlediska shodné

U obou kultur diferencovaných buněk, získaných ze SVZ nepoškozeného a ischemického mozku, bylo pozorováno široké spektrum markerů: GFAP, NG2, DCX a MAP2. Z morfologického a imunocytochemického hlediska byly obě kultury diferencovaných buněk srovnatelné. Při současném použití dvou protilátek GFAP/NG2, byly odhaleny různé skupiny EGFP pozitivních buněk (**obr. 26**). První jsou GFAP⁺/EGFP⁺ buňky, které představují klasické NSCs či astrocyty (Nolte, Matyash et al. 2001). Druhou skupinu tvoří buňky, které jsou GFAP⁻/EGFP⁺. Tyto buňky pravděpodobně mají ve své cytoplazmě mRNA pro GFAP, nicméně v důsledku nízké hladiny GFAP proteinu se nám nepodařilo jej detekovat. Další skupinu tvoří NG2⁺/EGFP⁺ buňky. Pravděpodobně se jedná o NG2-glie, některé také přepisují GFAP do mRNA, jak již bylo ukázáno dříve (Benesova, Hock et al. 2009). V kultuře je zároveň evidentní, že mnoho buněk exprimující GFAP není EGFP pozitivní. Nolte a spoluautoři ukázali, že je to způsobeno náhodnou inkorporací transgenu do chromozonu (Nolte, Matyash et al. 2001).

6.4. Membránové vlastnosti *in vitro* diferencovaných buněk po ischemii

Elektrofyzilogická analýza *in vitro* diferencovaných buněk izolovaných ze SVZ postranních komor, odhalila po 7-10 dnech diferenciaci tři buněčné typy. Pasivní, komplexní a neurální buněčné typy, které se odlišují jak morfologií, imunocytochemií, tak i elektrofyzilogickými vlastnostmi. Všechny 3 typy byly detekovány v kontrolní kultuře i v kultuře buněk po ischemii.

6.4.1. EGFP/GFAP neurální kmenové buňky vykazují zvýšené K_{IR}

Pasivní typ buněk vykazoval membránové vlastnosti charakteristické pro neurální kmenové buňky, ale i pro astrocyty. Membránové charakteristiky NSCs a jejich podobnost s astrocyty byly detailně popsány *in situ* (Liu, Bolteus et al. 2006) i *in vitro* (Jelitali, Anderova et al. 2007). Současně imunocytochemická analýza ukázala, že exprimují GFAP, tedy typický protein pro NSCs v SVZ myši (Ihrle and Alvarez-Buylla 2008) a pro astrocyty (Jessen and Mirsky 1985). Buňky s pasivními membránovými vlastnostmi jsou tedy zřejmě pravými

neurálními kmenovými buňkami, které přetrvávají v diferencované kultuře či nově generované astrocyty. Pasivní buňky po MCAO byly morfologicky i imunocytochemicky podobné buňkám z kontrolní kultury, ale zvýšilo se zastoupení těchto buněk v diferencovaných buňkách (**viz graf 3.**). Ve srovnání s kontrolou se jejich elektrofyziologické vlastnosti nelišily, až na signifikantně zvýšenou proudovou hustotu K_{IR} proudů (**graf 4.**). Bylo popsáno, že kanál Kir4.1 je exprimován neurálními progenitorovými buňkami v dospělé SVZ a není exprimován v migrujících neuroblastech (Yasuda, Bartlett et al. 2008). Je možné, že zvýšení počtu Kir4.1 kanálů koreluje s potlačením diferenciace NSCs u buněk po ischemii. Na druhé straně, exprese těchto kanálů je typická pro zralé astrocyty, u kterých se podílí na udržování negativního membránového potenciálu a vychytávání K^+ iontů (Olsen, Higashimori et al. 2006).

6.4.2. Přejídně dělicí se progenitory vykazují nižší K_A proudy

Další typ buněk se dá svými elektrofyziologickými i imunocytochemickými vlastnostmi zařadit jako přejídný typ mezi pasivní a neurální buňky. Tyto buňky byly po imunocytochemickém barvení NG2 a MAP2 pozitivní. Buňky exprimující jenom NG2 proteoglykan a vykazující komplexní proudy, mohou být populací neaktivních progenitorů v dospělém mozku. Buffo v roce 2008 ukázal, že takovéto buňky nejsou schopny tvorby neurosfér *in vitro* a to ani po poškození (Buffo, Rite et al. 2008). Na druhou stranu buňky, které současně exprimují NG2 a neurální marker pouze v buněčném těle a vykazují komplexní proudy, mohou představovat rané stadium buňky směřující k neurální linii, jako jsou přejídně se dělicí buňky (TAPs – buňky, C – buňky) (Prajero, Honsa et al. 2010).

Po MCAO byla u komplexních buněk signifikantně snížena proudová hustota K_A (**graf 5.**). TAPs – buňky, které vykazují komplexní proudy, se několikrát rozdělí před tím než diferencují v neuroblast nebo v oligodendrocyt. Vzhledem k tomu, že se amplituda K_A proudů zvyšuje s pokračující diferenciací v neurony, dá se předpokládat, že vlivem ischemie jsou TAPs – buňky udržované v proliferativním stavu, více v přehledném článku (Yasuda and Adams 2010).

6.4.3. Membránové vlastnosti nerurálního buněčného typu jsou významně ovlivněny

Neurální buněčný typ se vyznačoval malým buněčným tělem s jedním nebo dvěma výběžky a byl pozitivní na imunocytochemické barvení pro NG2 proteoglykan, DCX a MAP2 (**obr. 30 A**). Po měření metodou terčíkového zámku vykazovaly tyto buňky vně usměrněné K^+ proudy (K_A , K_{DR}) a Na^+ proudy s nízkou proudovou hustotou, bez schopnosti tvorby akčních potenciálů (Jelitai, Anderova et al. 2007; Goffredo, Conti et al. 2008; Leng, Jiang et al. 2009). Bylo ukázáno, že buňky vykazují neurální proudy a současně exprimující NG2 proteoglykan s neurálními markery, které se včetně buněčných těl nachází i ve výběžcích, představují populaci neuroblastů či neuronů na začátku diferenciaci (Jelitai, Anderova et al. 2007).

Buňky tohoto typu tj. neuroblasty (A-buňky) a nezralé neurony byly nejvíce ovlivněné ischemií. Jednak byl tento typ výrazně potlačen (**graf 3.**) a zároveň byla signifikantně zvýšena kapacita (**graf 8.**) membrány tj. velikost buněčného těla a extrémně signifikantně snížen membránový odpor IR (**graf 9.**) a proudová hustota K_A (**graf 6.**). Neurální typ buněk po MCAO je ve srovnání s neurony, které mají vysoké hodnoty IR, proudových hustot vně usměrněných K^+ proudů a mají Na^+ proudy (Zhou and Hablitz 1996), v méně maturovaném stádiu. Ischemie tedy zřejmě potlačuje diferenciaci v plně funkční neurony.

7. Závěry

- Ukázali jsme, že fokální ischemie *in vivo*, vede ke zvýšení proliferace a neurogeneze v SVZ postranní komory.
- V oblasti mozkové kůry dochází k tvorbě gliální jizvy, na které se podílí astrocyty a NG2 gliové buňky, v této oblasti dochází také ke zvýšení proliferace.
- Ukázali jsme, že v SVZ po ischemickém poškození je zvýšen počet NSCs/PCs schopných tvořit neurosféry; NSCs/PCs také vykazují zvýšenou proliferační aktivitu.
- Neurosféry, získané z oblasti reaktivní gliózy neobsahují GFAP/EGFP pozitivní buňky, což znamená, že reaktivní astrocyty v gliální jizvě nemají 3 dny po ischemii vlastnosti NSCs.
- Z morfologického a imunocytochemického hlediska jsou kultury diferencovaných buněk, které byly získány ze SVZ ischemických a nepoškozených myší, srovnatelné.
- Na základě elektrofyziologických vlastností diferencovaných buněk jsme identifikovali 3 buněčné typy, pasivní, komplexní a neurální typ. Po ischemickém poškození byl v diferencované kultuře větší počet buněk, které vykazovaly pasivní proudy, zatímco počet buněk s neurálními proudy byl významně snížen.
- Ischemické poškození ovlivnilo především aktivní membránové vlastnosti diferencovaných buněk, tj. zvýšení proudových hustot dovnitř usměrněných napět'ově závislých K^+ proudů (K_{IR}) u pasivních buněk, a snížení vně usměrněných rychle se aktivujících/inaktivujících K^+ proudů (K_A) u neurálních a komplexních buněk.

V závěru můžeme shrnout, že fokální ischemie zvyšuje schopnost NSCs/PCs proliferovat a tvořit neurosféry. Ačkoliv je z imunocytochemického hlediska jejich schopnost diferenciaci v neurony po ischemickém poškození srovnatelná s NSCs/PCs, které byly izolovány z nepoškozené SVZ, snížené exprese K_A kanálů naznačují, že nově generované buňky neurálního typu jsou méně zralé.

8. Přehled 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): 2827-2836.
- Altman, J. (1962). "Are new neurons formed in the brains of adult mammals?" Science **135**: 1127-1128.
- Amankulor, N. M., D. Hambardzumyan, et al. (2009). "Sonic hedgehog pathway activation is induced by acute brain injury and regulated by injury-related inflammation." J Neurosci **29**(33): 10299-10308.
- Anderova, M., I. Vorisek, et al. (2011). "Cell death/proliferation and alterations in glial morphology contribute to changes in diffusivity in the rat hippocampus after hypoxia-ischemia." J Cereb Blood Flow Metab **31**(3): 894-907.
- Anthony, T. E., H. A. Mason, et al. (2005). "Brain lipid-binding protein is a direct target of Notch signaling in radial glial cells." Genes Dev **19**(9): 1028-1033.
- Arvidsson, A., T. Collin, et al. (2002). "Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke." Nat Med **8**(9): 963-970.
- Bean, B. P. (2007). "The action potential in mammalian central neurons." Nat Rev Neurosci **8**(6): 451-465.
- Belachew, S., R. Chittajallu, et al. (2003). "Postnatal NG2 proteoglycan-expressing progenitor cells are intrinsically multipotent and generate functional neurons." J Cell Biol **161**(1): 169-186.
- Benesova, J., M. Hock, et al. (2009). "Quantification of astrocyte volume changes during ischemia in situ reveals two populations of astrocytes in the cortex of GFAP/EGFP mice." J Neurosci Res **87**(1): 96-111.
- Brenner, M., W. C. Kisseberth, et al. (1994). "GFAP promoter directs astrocyte-specific expression in transgenic mice." J Neurosci **14**(3 Pt 1): 1030-1037.
- 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): 3581-3586.
- Burns, K. A., B. Murphy, et al. (2009). "Developmental and post-injury cortical gliogenesis: a genetic fate-mapping study with Nestin-CreER mice." Glia **57**(10): 1115-1129.
- Capela, A. and S. Temple (2006). "LeX is expressed by principle progenitor cells in the embryonic nervous system, is secreted into their environment and binds Wnt-1." Dev Biol **291**(2): 300-313.

- Carlen, M., K. Meletis, et al. (2009). "Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke." Nat Neurosci **12**(3): 259-267.
- Colangelo, A. M., G. Cirillo, et al. (2011). "Targeting reactive astrogliosis by novel biotechnological strategies." Biotechnol Adv.
- Coskun, V., H. Wu, et al. (2008). "CD133+ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(3): 1026-1031.
- Dehmelt, L. and S. Halpain (2005). "The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins." Genome Biol **6**(1): 204.
- Dirnagl, U., C. Iadecola, et al. (1999). "Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view." Trends Neurosci **22**(9): 391-397.
- Doetsch, F., L. Petreanu, et al. (2002). "EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells." Neuron **36**(6): 1021-1034.
- Dromard, C., S. Bartolami, et al. (2007). "NG2 and Olig2 expression provides evidence for phenotypic deregulation of cultured central nervous system and peripheral nervous system neural precursor cells." Stem Cells **25**(2): 340-353.
- Endres, M., B. Engelhardt, et al. (2008). "Improving outcome after stroke: overcoming the translational roadblock." Cerebrovasc Dis **25**(3): 268-278.
- Eriksson, P. S., E. Perfilieva, et al. (1998). "Neurogenesis in the adult human hippocampus." Nat Med **4**(11): 1313-1317.
- Ferri, A. L., M. Cavallaro, et al. (2004). "Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain." Development **131**(15): 3805-3819.
- Ge, W. P., W. Zhou, et al. (2009). "Dividing glial cells maintain differentiated properties including complex morphology and functional synapses." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(1): 328-333.
- Gleason, D., J. H. Fallon, et al. (2008). "Ependymal stem cells divide asymmetrically and transfer progeny into the subventricular zone when activated by injury." Neuroscience **156**(1): 81-88.
- Goffredo, D., L. Conti, et al. (2008). "Setting the conditions for efficient, robust and reproducible generation of functionally active neurons from adult subventricular zone-derived neural stem cells." Cell Death Differ **15**(12): 1847-1856.
- Hamill, O. P., A. Marty, et al. (1981). "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches." Pflugers Arch **391**(2): 85-100.
- Hartfuss, E., R. Galli, et al. (2001). "Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia." Dev Biol **229**(1): 15-30.

- Haskell, G. T. and A. S. LaMantia (2005). "Retinoic acid signaling identifies a distinct precursor population in the developing and adult forebrain." J Neurosci **25**(33): 7636-7647.
- Hayashi, T., N. Noshita, et al. (2003). "Temporal profile of angiogenesis and expression of related genes in the brain after ischemia." J Cereb Blood Flow Metab **23**(2): 166-180.
- Herrmann, J. E., T. Imura, et al. (2008). "STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury." J Neurosci **28**(28): 7231-7243.
- Hol, E. M., R. F. Roelofs, et al. (2003). "Neuronal expression of GFAP in patients with Alzheimer pathology and identification of novel GFAP splice forms." Mol Psychiatry **8**(9): 786-796.
- Chittajallu, R., A. Aguirre, et al. (2004). "NG2-positive cells in the mouse white and grey matter display distinct physiological properties." J Physiol **561**(Pt 1): 109-122.
- Chou, S. H., T. K. Kuo, et al. (2006). "In utero transplantation of human bone marrow-derived multipotent mesenchymal stem cells in mice." J Orthop Res **24**(3): 301-312.
- Chvatal, A., M. Anderova, et al. (1999). "Glial depolarization evokes a larger potassium accumulation around oligodendrocytes than around astrocytes in gray matter of rat spinal cord slices." J Neurosci Res **56**(5): 493-505.
- Ihrle, R. A. and A. Alvarez-Buylla (2008). "Cells in the astroglial lineage are neural stem cells." Cell Tissue Res **331**(1): 179-191.
- Ikeda, M., Y. Hirota, et al. (2010). "Expression and proliferation-promoting role of Diversin in the neuronally committed precursor cells migrating in the adult mouse brain." Stem Cells **28**(11): 2017-2026.
- Imayoshi, I., M. Sakamoto, et al. (2008). "Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain." Nat Neurosci **11**(10): 1153-1161.
- Jelitai, M., M. Anderova, et al. (2007). "Electrophysiological characterization of neural stem/progenitor cells during in vitro differentiation: study with an immortalized neuroectodermal cell line." J Neurosci Res **85**(8): 1606-1617.
- Jessen, K. R. and R. Mirsky (1985). "Glial fibrillary acidic polypeptides in peripheral glia. Molecular weight, heterogeneity and distribution." J Neuroimmunol **8**(4-6): 377-393.
- Jiao, J. and D. F. Chen (2008). "Induction of neurogenesis in nonconventional neurogenic regions of the adult central nervous system by niche astrocyte-produced signals." Stem Cells **26**(5): 1221-1230.
- Jin, K., Y. Sun, et al. (2003). "Directed migration of neuronal precursors into the ischemic cerebral cortex and striatum." Mol Cell Neurosci **24**(1): 171-189.
- Johansson, C. B., S. Momma, et al. (1999). "Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system." Cell **96**(1): 25-34.

- Kaneko, N. and K. Sawamoto (2009). "Adult neurogenesis and its alteration under pathological conditions." Neurosci Res **63**(3): 155-164.
- Karadottir, R., N. B. Hamilton, et al. (2008). "Spiking and nonspiking classes of oligodendrocyte precursor glia in CNS white matter." Nat Neurosci **11**(4): 450-456.
- Kazanis, I. and C. Ffrench-Constant (2011). "The number of stem cells in the subependymal zone of the adult rodent brain is correlated with the number of ependymal cells and not with the volume of the niche." Stem Cells Dev.
- Kee, N., C. M. Teixeira, et al. (2007). "Preferential incorporation of adult-generated granule cells into spatial memory networks in the dentate gyrus." Nat Neurosci **10**(3): 355-362.
- Kirino, T. and K. Sano (1984). "Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia." Acta Neuropathol **62**(3): 201-208.
- 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): 852-860.
- Kriegstein, A. and A. Alvarez-Buylla (2009). "The glial nature of embryonic and adult neural stem cells." Annu Rev Neurosci **32**: 149-184.
- Kudo, M., A. Aoyama, et al. (1982). "An animal model of cerebral infarction. Homologous blood clot emboli in rats." Stroke **13**(4): 505-508.
- Lee, S. R., H. Y. Kim, et al. (2006). "Involvement of matrix metalloproteinase in neuroblast cell migration from the subventricular zone after stroke." J Neurosci **26**(13): 3491-3495.
- Leng, J., L. Jiang, et al. (2009). "Brain-derived neurotrophic factor and electrophysiological properties of voltage-gated ion channels during neuronal stem cell development." Brain Res **1272**: 14-24.
- Li, X., X. Tang, et al. (2009). "p27(KIP1) regulates neurogenesis in the rostral migratory stream and olfactory bulb of the postnatal mouse." J Neurosci **29**(9): 2902-2914.
- Lin, S. C. and D. E. Bergles (2002). "Physiological characteristics of NG2-expressing glial cells." J Neurocytol **31**(6-7): 537-549.
- Liu, X., A. J. Bolteus, et al. (2006). "GFAP-expressing cells in the postnatal subventricular zone display a unique glial phenotype intermediate between radial glia and astrocytes." Glia **54**(5): 394-410.
- 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): 1735-1743.

- Menn, B., J. M. Garcia-Verdugo, et al. (2006). "Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain." J Neurosci **26**(30): 7907-7918.
- Merkle, F. T., Z. Mirzadeh, et al. (2007). "Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain." Science **317**(5836): 381-384.
- Mignone, J. L., V. Kukekov, et al. (2004). "Neural stem and progenitor cells in nestin-GFP transgenic mice." J Comp Neurol **469**(3): 311-324.
- 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): 265-278.
- Mitsios, N., J. Gaffney, et al. (2006). "Pathophysiology of acute ischaemic stroke: an analysis of common signalling mechanisms and identification of new molecular targets." Pathobiology **73**(4): 159-175.
- Moreno, M. M., C. Linster, et al. (2009). "Olfactory perceptual learning requires adult neurogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(42): 17980-17985.
- Nishiyama, A., M. Komitova, et al. (2009). "Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity." Nat Rev Neurosci **10**(1): 9-22.
- Nolte, C., M. Matyash, et al. (2001). "GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: a tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue." Glia **33**(1): 72-86.
- Nottebohm, F. (1981). "A brain for all seasons: cyclical anatomical changes in song control nuclei of the canary brain." Science **214**(4527): 1368-1370.
- Ohab, J. J., S. Fleming, et al. (2006). "A neurovascular niche for neurogenesis after stroke." J Neurosci **26**(50): 13007-13016.
- Ohta, K., M. Iwai, et al. (2003). "Dissociative increase of oligodendrocyte progenitor cells between young and aged rats after transient cerebral ischemia." Neurosci Lett **335**(3): 159-162.
- Olsen, M. L., H. Higashimori, et al. (2006). "Functional expression of Kir4.1 channels in spinal cord astrocytes." Glia **53**(5): 516-528.
- Pastrana, E., L. C. Cheng, et al. (2009). "Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(15): 6387-6392.
- Peretto, P., C. Giachino, et al. (2005). "Chain formation and glial tube assembly in the shift from neonatal to adult subventricular zone of the rodent forebrain." J Comp Neurol **487**(4): 407-427.

- 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): 1133-1146.
- Pivonkova, H., J. Benesova, et al. (2010). "Impact of global cerebral ischemia on K⁺ channel expression and membrane properties of glial cells in the rat hippocampus." Neurochem Int **57**(7): 783-794.
- Platel, J. C., V. Gordon, et al. (2009). "GFAP-GFP neural progenitors are antigenically homogeneous and anchored in their enclosed mosaic niche." Glia **57**(1): 66-78.
- Prajerova, I., P. Honsa, et al. (2010). "Distinct effects of sonic hedgehog and Wnt-7a on differentiation of neonatal neural stem/progenitor cells in vitro." Neuroscience **171**(3): 693-711.
- Reeves, S. A., L. J. Helman, et al. (1989). "Molecular cloning and primary structure of human glial fibrillary acidic protein." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(13): 5178-5182.
- Sakakibara, S., Y. Nakamura, et al. (2002). "RNA-binding protein Musashi family: roles for CNS stem cells and a subpopulation of ependymal cells revealed by targeted disruption and antisense ablation." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(23): 15194-15199.
- Sawamoto, K., H. Wichterle, et al. (2006). "New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain." Science **311**(5761): 629-632.
- 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): 359-378.
- Seri, B., J. M. Garcia-Verdugo, et al. (2001). "Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus." J Neurosci **21**(18): 7153-7160.
- Sharkey, J. and S. P. Butcher (1995). "Characterisation of an experimental model of stroke produced by intracerebral microinjection of endothelin-1 adjacent to the rat middle cerebral artery." J Neurosci Methods **60**(1-2): 125-131.
- Shen, Q., Y. Wang, et al. (2008). "Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions." Cell Stem Cell **3**(3): 289-300.
- Sims, J. R., S. W. Lee, et al. (2009). "Sonic hedgehog regulates ischemia/hypoxia-induced neural progenitor proliferation." Stroke **40**(11): 3618-3626.
- Sims, T. J., S. A. Gilmore, et al. (1991). "Radial glia give rise to perinodal processes." Brain Res **549**(1): 25-35.
- Smith, M. L., G. Bendek, et al. (1984). "Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model." Acta Neurol Scand **69**(6): 385-401.

- 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): 515-528.
- Sun, Y., K. Jin, et al. (2003). "VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia." J Clin Invest **111**(12): 1843-1851.
- 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. (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): 172-179.
- Tanaka, T., F. F. Serneo, et al. (2004). "Cdk5 phosphorylation of doublecortin ser297 regulates its effect on neuronal migration." Neuron **41**(2): 215-227.
- Tanaka, Y., Y. Tozuka, et al. (2009). "Excitatory GABAergic activation of cortical dividing glial cells." Cereb Cortex **19**(9): 2181-2195.
- Tavazoie, M., L. Van der Veken, et al. (2008). "A specialized vascular niche for adult neural stem cells." Cell Stem Cell **3**(3): 279-288.
- Teramoto, T., J. Qiu, et al. (2003). "EGF amplifies the replacement of parvalbumin-expressing striatal interneurons after ischemia." J Clin Invest **111**(8): 1125-1132.
- Thored, P., A. Arvidsson, et al. (2006). "Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke." Stem Cells **24**(3): 739-747.
- Tzeng, S. F. and J. P. Wu (1999). "Responses of microglia and neural progenitors to mechanical brain injury." Neuroreport **10**(11): 2287-2292.
- Wang, D. D., D. D. Krueger, et al. (2003). "Biophysical properties and ionic signature of neuronal progenitors of the postnatal subventricular zone in situ." J Neurophysiol **90**(4): 2291-2302.
- Wang, X., X. Mao, et al. (2009). "Involvement of Notch1 signaling in neurogenesis in the subventricular zone of normal and ischemic rat brain in vivo." J Cereb Blood Flow Metab **29**(10): 1644-1654.
- Weigmann, A., D. Corbeil, et al. (1997). "Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(23): 12425-12430.
- 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): 6627-6636.

- Yasuda, T. and D. J. Adams (2010). "Physiological roles of ion channels in adult neural stem cells and their progeny." J Neurochem **114**(4): 946-959.
- Yasuda, T., P. F. Bartlett, et al. (2008). "K(ir) and K(v) channels regulate electrical properties and proliferation of adult neural precursor cells." Mol Cell Neurosci **37**(2): 284-297.
- Zhang, Q. G., R. Wang, et al. (2008). "Role of Dickkopf-1, an antagonist of the Wnt/beta-catenin signaling pathway, in estrogen-induced neuroprotection and attenuation of tau phosphorylation." J Neurosci **28**(34): 8430-8441.
- 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): 441-448.
- Zhang, R. L., Z. G. Zhang, et al. (2005). "Neurogenesis in the adult ischemic brain: generation, migration, survival, and restorative therapy." Neuroscientist **11**(5): 408-416.
- Zhang, R. L., Z. G. Zhang, et al. (2008). "Ischemic stroke and neurogenesis in the subventricular zone." Neuropharmacology **55**(3): 345-352.
- 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): 857-863.
- Zhang, R. L., Z. G. Zhang, et al. (2007). "Stroke induces ependymal cell transformation into radial glia in the subventricular zone of the adult rodent brain." J Cereb Blood Flow Metab **27**(6): 1201-1212.
- Zhao, J. W., R. Raha-Chowdhury, et al. (2009). "Astrocytes and oligodendrocytes can be generated from NG2+ progenitors after acute brain injury: intracellular localization of oligodendrocyte transcription factor 2 is associated with their fate choice." Eur J Neurosci **29**(9): 1853-1869.
- Zhou, F. M. and J. J. Hablitz (1996). "Postnatal development of membrane properties of layer I neurons in rat neocortex." J Neurosci **16**(3): 1131-1139.
- Zhu, X., D. E. Bergles, et al. (2008). "NG2 cells generate both oligodendrocytes and gray matter astrocytes." Development **135**(1): 145-157.
- Zhu, X., R. A. Hill, et al. (2011). "Age-dependent fate and lineage restriction of single NG2 cells." Development **138**(4): 745-753.