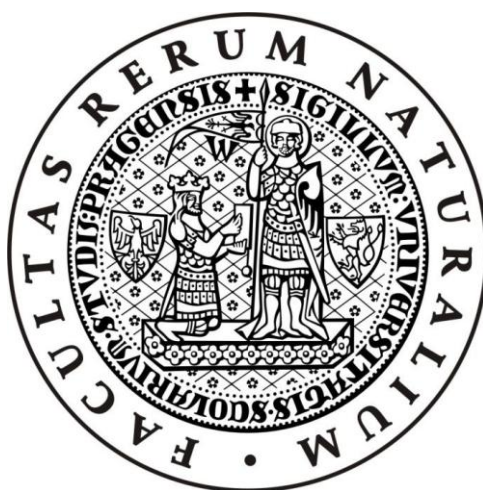


Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Adéla Piščíková

Optimalizace dávky temozolomidu pro redukci neurogeneze u laboratorního potkana

Optimization of a dose of temozolomide for efficient reduction of adult neurogenesis in the laboratory rat

Diplomová práce

Školitel: Doc. RNDr. Aleš Stuchlík Ph.D.

Praha 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Tato práce byla podpořena grantem GAČR 14-03627S a dále projekty IGA MZ ČR NT13386, projektem AV ČR M200111204 a GAČR P304/12/G069 a MŠMT LH14053. Institucionální podpora byla poskytnuta projektem RVO:67985823.

V Praze, 14. 8. 2014

Podpis:

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Doc. RNDr. Alešovi Stuchlíkovi Ph.D. za vedení diplomové práce, podnětné připomínky a za čas, který mi věnoval. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Haně Hatalové za konzultace a pomoc se statistickým vyhodnocením. Závěrem bych ráda poděkovala své rodině a blízkým přátelům za jejich podporu během psaní této práce.

Abstrakt

Cílem této diplomové práce je zjistit optimální dávku cytostatika temozolomidu (TMZ) u potkanů kmene Long-Evans, která účinně redukuje neurogenezi v dospělém mozku a má minimální vedlejší účinky. Temozolomid se nově používá na snížení hladiny neurogeneze a jako každé cytostatikum má negativní účinky na všechny dělící se buňky v organismu, proto může mít vliv na zdravotní stav zvířete. Na rozdíl od myši u potkanů prozatím nebyla zjišťována minimální dávka, která účinně zastaví tvorbu nových neuronů a zároveň nemá vliv na zdravotní stav zvířete. Potkani byli rozděleni do čtyř skupin, jedna kontrolní a tři experimentální s různou dávkou cytostatika (10, 25 a 40 mg/kg TMZ). Pro zjištění hladiny neurogeneze bylo použito značení dělících se buněk pomocí bromodeoxyuridinu (BrdU). Během experimentu byly opakovaně stanovovány počty krevních elementů, testovány senzomotorické funkce a probíhal váhový monitoring. Výsledkem je, že dávka 10 mg/kg TMZ je dostačující pro redukcii neurogeneze o 64 % oproti kontrolní skupině a není signifikantně odlišná od vyšších dávek. U této skupiny také jako jediné nedochází k trvalému váhovému úbytku, i když tato dávka má srovnatelný efekt na myelosupresi jako vyšší dávky. U žádné z dávek, ale nebyl pozorovaný vliv na senzomotorické dovednosti.

Klíčová slova: hipokampus, neurogeneze, temozolomid, separace vzorců,

Abstract

The goal of this study is to find an optimal dose of cytostatic Temozolomide (TMZ) for Long-Evans strain of rats. This dose should reduce neurogenesis while having a minimal pernicious health side-effects. Temozolomide is newly used to suppress neurogenesis but similarly to any other cytostatic has an effect on all dividing cells in an organism. This can affect health of an animal. Contrary to the mice, there was no systematic attempt to establish optimal dose. In our experiment rats were divided into four groups – one control group and three treatment groups which received different doses of temozolomide (10, 25, 40 mg/kg of TMZ). To detect level of neurogenesis cells were labeled by bromodeoxyuridine. During the experiment blood element counts were assessed, sensorimotoric tests were conducted, and weight increment was monitored. The results indicate that dose of 10mg/kg is adequate as it reduces neurogenesis by 64% compared to the control group and does not significantly differ from higher doses. In this group weight increment is comparable with the control group, while in the higher doses of TMZ weight increment is significantly lower. Effect of myelosuppression is same for all treatment groups.

Key words: hippocampus, neurogenesis, temozolomide, pattern separation,

Obsah

Abstrakt.....	1
Abstract.....	2
Seznam zkratek.....	5
Úvod.....	6
Literární přehled.....	7
Historie objevu neurogeneze.....	7
Hipokampální neurogeneze.....	8
Hipokampus- anatomie a funkční zapojení.....	8
Gyrus dentatus.....	9
Subgranulární zóna.....	9
Od zárodečné buňky k neuronu.....	10
Buněčný typ 1.....	10
Buněčný typ 2.....	11
Buněčný typ 3.....	11
Nezralý granulární neuron.....	12
Funkční význam hipokampu.....	14
Funkční význam GD.....	16
Předpokládané funkce neurogeneze v dospělém mozku.....	17
Separace vzorců.....	17
Prevence interference mezi paměťovými stopami.....	21
Metody ablace a redukce neurogeneze.....	24
Ozáření.....	24
Genetické ablace.....	25
Cytostatika.....	25
Metylayoxymetanolacetát.....	25
Temozolomid.....	26
Detekce neurogeneze pomocí BrdU.....	26
Toxicita BrdU.....	27

Cíle diplomové práce.....	28
Metody a materiál.....	29
Experimentální subjekty.....	29
Redukce neurogeneze pomocí Temozolomidu.....	30
Kontrolní testy.....	30
Histologie a příprava mozku.....	31
Statistická analýza dat.....	33
Výsledky.....	35
Vyhodnocení počtu BrdU pozitivních buněk.....	35
Vyhodnocení monitoringu váhy.....	36
Vyhodnocení testu beam walking.....	38
Vyhodnocení krevních testů.....	40
Počet leukocytů.....	40
Počet erytrocytů.....	42
Počet trombocytů.....	43
Diskuze.....	45
Závěr.....	49
Seznam použité literatury.....	50

Seznam zkratek

ANOVA	analýza rozptylu
BLBP	mozkový lipidy-vázající protein
BrdU	bromodeoxyuridin
CA	Ammonův roh (<i>cornu Ammonis</i>)
CNS	centrální nervová soustava
DCX	doublecortin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
GABA	kyselina gama amino-máselná
GD	<i>gyrus dentatus</i>
GFPA	gliální fibrilární kyselý protein
Glu	glutamát
hA	horizontální astrocyt
HEB	hematoencefalická bariéra
MAM	metylazoxymetanolacetát
MTIC	methyl-triazenyl imidazol carboxamid
MWM	Morrisovo vodní bludiště
NeuN	neuronálně specifický nukleární protein
NSCs	neurální kmenové buňky (<i>neural stem cells</i>)
PSA-CAM	<i>poly-sialylated neural cell adhesion molecule</i>
rA	radiální astrocyt
SGZ	subgranulární zóna
SVZ	subventrikulární zóna
TMZ	temozolomid
TTX	tetrodoxin
VEGH	vaskulární endoteliální růstový faktor

Úvod

Přínosem této diplomové práce je zjištění optimální dávky cytostatika TMZ, která účinně redukuje neurogenezi v dospělém mozku u laboratorního potkana. Přestože, fenomén neurogeneze v dospělém mozku je v posledních letech intenzivně zkoumán, její funkce nejsou plně objasněny. Jedna z hlavních neurogenních oblastí dospělého mozku leží v subgranulární zóně (SGZ) *gyrus dentatus* (GD) hipokampu. Nové neurony, které zde vznikají, se postupně integrují a funkčně zapojují do stávající hipokampální sítě. Jejich konkrétní funkce není známa, ale byl prokázán vliv na určité hipokampální funkce jako například separaci vzorců a prevence interference mezi paměťovými stopami.

Hlavním způsobem zkoumání je redukce neurogeneze a pozorování efektu v behaviorálních úlohách. Tyto metody redukce neurogeneze mají různou míru vedlejších účinků pro organismus, které se liší také druh od druhu. Srovnatelný fyziologický stav zvířat s kontrolními zvířaty je nezbytný předpoklad pro každou kvalitní vědeckou studii, protože je potřeba limitovat všechny rozdíly mezi skupinami kromě proměnné, kterou studujeme. V tomto případě by studium efektu neurogeneze mohl velmi lehko zkreslit vliv fyziologického stavu zvířata na performance v behaviorálních úlohách. Je proto nesmírně důležité minimalizovat tyto vedlejší efekty metod, které se používají, aby nedocházelo k mylné interpretaci výsledků.

Nejčastěji se na redukcii neurogeneze používají systémové metody, které mohou mít negativní účinek na celý organismus. Protože odpověď na každou látku se liší druh od druhu, nové metody, které se začínají používat na redukcii neurogeneze musí být přizpůsobené pro každý druh. Temozolomid je jednou z nových látek která se používá na redukcii neurogeneze. Původem je to cytostatikum, které se používá k léčbě mozkových nádorů. Tak jako u pacientů i u zvířat, kterým je tato látka podávána, působí i mimo centrální nervový systém (CNS). Tato metoda je již ověřena u myši, kde byly monitorovány i fyziologické parametry mimo CNS. U potkanů se TMZ také začalo používat, ale prozatím vhodnost zvolených dávek vzhledem k fyziologickým parametrům nebyla hodnocena.

Literární přehled

Historie objevu neurogeneze

První zmínky o buněčné proliferaci v centrálním nervovém systému dospělého laboratorního potkana se začaly objevovat až po roce 1960, do této doby bylo všeobecně přijímán názor, že v dospělém mozku nevznikají nové neurony. Toto dogma bylo vyvráceno v roce 1965 badatelem Josephem Altmanem, který v tomto roce publikoval první práci potvrzující vznik nových neuronů v *gyrus dentatus* (GD) hipokampu dospělého potkana (Altman a Das 1965). O čtyři roky později byla objevena neurogeneze v subventrikulární zóně (SVZ), která leží v laterálních částech komor předního mozku (Altman 1969). Ze SVZ směřují nové neurony tzv. rostrálním migračním proudem do *bulbus olfactorius*, kde se pravděpodobně uplatňují v čichové diskriminaci (Gheusi et al. 2000) a paměti (Rochefort et al. 2002). V roce 1998 bylo prokázáno, že i lidský hipokampus generuje nové neurony během celého života (Eriksson et al. 1998). Tvorba nových neuronů v dospělosti je konzervována v evolučním vývoji a objevuje se u většiny živočišných druhů od korýšů (Beltz a Sandeman 2003) a hmyzu (Cayre et al. 2007) po obratlovce zahrnující ryby (Kizil et al. 2012), plazy (Font et al. 2001), ptáky (Goldman a Nottebohm 1983) i různé druhy savců. U savců byla neurogeneze experimentálně potvrzena u králíka (Fasolo et al. 2002), morčete (Guidi et al. 2005), myši (Lois a Alvarez-Buylla 1994), potkana (Altman a Das 1965), kočky (Das a Altman 1971), psa (Blakemore a Jolly 1972), ovce (Hawken et al. 2009), opice (Gould et al. 1999) a člověka (Eriksson et al. 1998). Recentní studie naznačují, objev neurogeneze v lidském *corpus striatum*, kde vznikají nové interneurony (Ernst et al. 2014). Tato práce se bude výhradně zabývat neurogenezí v GD hipokampu.

Hipokampální neurogeneze

Hipokampus je jedním, ze dvou míst, kde v dospělosti probíhá neurogeneze konkrétněji v subgranulární zóně GD. Do granulární vrstvy GD se inkorporují a funkčně zapojují nové neurony.

Hipokampus - anatomie a funkční zapojení

Hipokampus je párová třívrstvá kortikální struktura, která se nachází ve spánkovém laloku koncového mozku. Spolu s dalšími kortikálními a subkortikálními oblastmi je součástí limbického systému. Hipokampus v širším slova smyslu neboli hipokampální formace se skládá z několika oddílů: GD, *hippocampus proper* (oblasti *Cornu Ammonis* 1-4 (CA 1-4)), entorhinální kůry a subikula (Knowles 1992) .

Hipokampus je struktura s výraznou laminací. GD je rozdělen do tří vrstev. Oblasti CA 1-4 se skládají ze sedmi vrstev a jejich popis není z hlediska zaměření této práce nutný. Subikulum je rozděleno do dvou vrstev pyramidální, která obsahuje těla pyramidálních neuronů a molekulární, kterou tvoří dendrity těchto neuronů (Amaral a Witter 1989; Knowles 1992).

Základní excitační drahou hipokampu je tzv. trisynaptická smyčka, která začíná vstupy z entorhinální kůry perforující drahou do granulárních neuronů GD. Z GD vedou mechová vlákna do pyramidových buněk CA3. Z oblasti CA3 vedou Schafferovy kolaterály do pyramidových buněk oblasti CA1. Z pyramidální oblasti neurony CA1 projikují axony do subikula a zpět do entorhinální kůry (Amaral a Witter 1989). Ve skutečnosti je propojení těchto oblastí poněkud složitější, kdy existují různé okruhy s vynecháním některé struktury např. entorhinální kůra je spojena přímo s oblastmi CA2 a CA3 a z oblasti CA3 projikují vlákna zpět do GD (Scharfman 2007). Dále je hipokampus propojen s kortikálními a subkortikálními oblastmi např. thalamem, hypotalamem, septálním jádrem a amygdalou. Většina neokortikálních vstupů přichází z perirhinální a parahipokampální kůry přes entorhinální kůru do hipokampu a většina výstupů směřuje přes subikulum do entorhinální kůry a dále do asociačních oblastí v mozkové kůře (Bird a Burgess 2008).

Gyrus dentatus

GD je rozdělen do tří vrstev: hilus neboli polymorfní vrstva, granulární a molekulární (Amaral & Witter 1989). Na rozhraní vrstvy polymorfní a granulární se nachází vrstva subgranulární, kde probíhá neurogeneze. V rostrálním koronárním řezu se GD jeví jako ležící písmeno V, mezi nimi leží oblast CA3, nad ní leží suprapyramidální a pod ní infrapyramidální oblast GD (Cutsuridis et al. 2010). Z funkčního hlediska je zajímavější rozdělení celého hipokampu, kdy dorsální (septální) hipokampus hraje primární roli v učení a paměti (Moser et al. 1993) a ventrální (temporální), který se účastní regulace emocionality (Trivedi a Coover 2004; Czemiawski et al. 2009).

Subgranulární zóna

SGZ je jedním z míst, kde v dospělosti probíhá neurogeneze. SGZ je obvykle definovaná jako zóna o šířce dvou buněk mezi granulární a polymorfní vrstvou GD (Fuchs et al. 2006). V dospělosti zde probíhá vznik nových nervových buněk. Více než 250 000 nových granulárních buněk vznikne každý měsíc, to je asi 6% z celkového počtu buněk v GD (Cameron a Mckay 2001).

SGZ poskytuje unikátní neurogení mikroprostředí též známé jako neurogení nika, které přetrvává po celý život. Neurogení nika obsahuje několik typů buněk převážně neurálních kmenových buněk (NSCs) v různých stádiích vývoje, méně je mikroglíí a astrocytů, které jsou v těsném spojení s krevními kapilárami a NSCs (Doetsch 2003; Riquelme et al. 2008). Spojení neurogení niky s krevními cévami je nezbytné pro správný vývoj a regulaci NSCs a kolem cév se tvoří klastry dělicích se buněk (Palmer et al. 2000; Palmer 2002). Indukce proliferace nových neuronů pomocí elektrických pulsů je následována zvýšením počtu endotelových buněk (Hellsten et al. 2004). Endoteliální buňky uvolňují neurogení faktory a podporují neuronální vývoj a diferenciaci (Shen et al. 2004), tato hypotéza je podpořena objevem, že vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) má silný efekt na neurogenezi v *in vitro* i *in vivo* podmínkách (Jin et al. 2002) (Cao et al. 2004). Inhibice VEGF blokuje pozitivní efekt fyzické aktivity na neurogenezi (Fabel et al. 2003). V neurogení nicy se také objevuje malé množství mikroglíí. Mikroglie mohou na probíhající neurogenezi působit pozitivně i negativně. Akutní aktivace mikroglíí za patofyziologických i fyziologických podmínek narušuje proces neurogeneze (Monje et al. 2003). Mikroglie také inhibují neuronální diferenciaci v podmínkách *in-vitro*, ale mechanismus tohoto účinku není znám (Cacci et al. 2005). Na druhé straně mohou

mikroglie také secernovat faktory pro podporu přežití neuronů (Bessis et al. 2007). Neurogenní nika umožňuje regulaci proliferace a diferenciaci NSCs. Progenitorové buňky se pomalu diferencují a zrají v nové neurony a postupnou radiální migrací se přesouvají do granulární vrstvy (Stanfield & Trice 1988; Markakis & Gage 1999).

Od zárodečné buňky k neuronu

V SGZ z NSCs vznikají dva typy buněk astrocytické povahy. Tyto buňky byly identifikovány pomocí exprese gliálního fibrilárního kyselého proteinu (GFAP). V SGZ jsou dva typy, které můžeme rozdělit podle jejich orientace na radiální astrocyty (rA), neboli radiálním gliím podobné progenitorové buňky a horizontální astrocyty (hA), z kterých vznikají nové astrocyty. Nové neurony vznikají z rA, u hA není dokázáno, že bych z nich vznikaly nové neurony. Oba typy prekurzorů se od sebe dají odlišit pomocí různých molekulárních markerů. Pro rA je typický nestin, pro hA je to S100 β (Seri et al. 2004; Steiner et al. 2004).

Typ 1- radiálním gliím podobné progenitorové buňky

Tyto buňky vykazují charakteristickou morfologii podobnou radiálním gliím a mají podobné vlastnosti jako astrocyty, světlou cytoplazmu, málo ribozomů a výběžky, které se vmezeňují mezi sousední buňky (Seri et al. 2001; Filippov et al. 2003). Tyto buňky mají nízkou proliferační aktivitu a jejich počet se během života významně nezvyšuje (Filippov et al. 2003), ale jejich proliferace může být zvýšena v důsledku hypoxie (Kunze et al. 2006) nebo záchvatů vyvolaných kainátem (Hüttmann et al., 2003). Radiálním gliím podobné progenitorové buňky mají trojúhelníkový tvar a větší tělo než granulární buňky. Jejich podoba s radiální glií spočívá v dlouhém apikálním výběžku, který sahá až do granulární vrstvy, kde se řídce rozvětňuje (Fukuda et al. 2003). Jednou z dalších funkcí těchto buněk během vývoje hipokampu je tvorba lešení pro ostatní buňky a prostorové formování GD (Tielsch et al. 2002). Mezi hlavní molekulární markery tohoto stádia patří Nestin, GFAP. Typ 1 je také negativní pro s β 100, který je typickým markerem pro zralé astrocyty (Seri et al. 2001; Kronenberg et al. 2003; Steiner et al. 2004). Mezi další markery patří lipidy vázající mozkový protein (BLBP) a transkripční faktor Sox2 (Steiner et al. 2006).

Typ 2 - přechodně amplifikující progenitorové buňky

Buňky typu 2 vznikají dělením buněk typu 1. Jsou vysoce proliferačně aktivní a vytvářejí buněčnou zásobu pro vývoj nových neuronů, je jich největší podíl ze všech typů progenitorových buněk v SGZ (Steiner et al. 2006). Tyto buňky se vyznačují malým tělem, nepravidelným tvarem jádra a krátkými horizontálně orientovanými výběžky; nemají dlouhý apikální výběžek (Fukuda et al. 2003; Filippov et al. 2003). Buněčné dělení v SGZ se objevuje v klastrech, které obklopují krevní cévy. V průběhu několika dní po počátečním dělení jsou nově generované buňky rozprostřeny podél SGZ (Kuhn et al., 1996). V pozdějším stádiu maturace tohoto typu buněk, když se objevují první známky neuronální diferenciace a buňky postupně migrují granulární vrstvou, stále zůstávají v kontaktu s radiálním lešením buňkami typu 1 (Song et al., 2002). V tomto období také buňky dostávají první synaptické vstupy zprostředkované neurotransmiterem GABA (Wang et al., 2005), jehož působení díky odlišnému membránovému potenciálu vede k excitační depolarizaci na místo inhibiční, která je typická pro zralé neurony (Ben-Ari 2002). Typ 2 můžeme také na základě molekulárních markerů rozdělit na podtypy 2a a 2b. Oba podtypy jsou nestin pozitivní, ale jeden je negativní a druhý pozitivní pro marker nezralých neuronů doublecortin (DCX) (Kempermann et al., 2004).

Typ 3 - migrující neuroblasty

Jádra těchto buněk jsou oválná a u některých se objevují první apikální dendrity (Plümpe et al. 2006). Tato fáze je spojena s velkými morfologickými změnami a rychleji také postupuje radiální migrace do granulární vrstvy. Vzdálenost této migrace je limitována (50-100 μm) a většina buněk zůstává v těsné blízkosti SGZ, maximální vzdálenost migrace je do první třetiny granulární vrstvy, pouze malý počet buněk migruje do větší vzdálenosti. Během této fáze jsou buňky umístěny na svoje definitivní místo a jejich distribuce se už podstatně nemění (Kempermann 2003). Buňky typu 3 mají nízkou proliferační aktivitu, ale ta se může zvyšovat podobně jako u buněk typu 1 v důsledku patologických stavů např. záchvatů (Jessberger et al., 2005). Toto stádium zahrnuje přechod z proliferačního stádia do post-mitotického stádia nezralého neuronu. Hlavní neuronální markery pro toto stádium jsou DCX a *poly-sialylated neural cell adhesion molecule* (PSA-NCAM) (Seri et al., 2004).

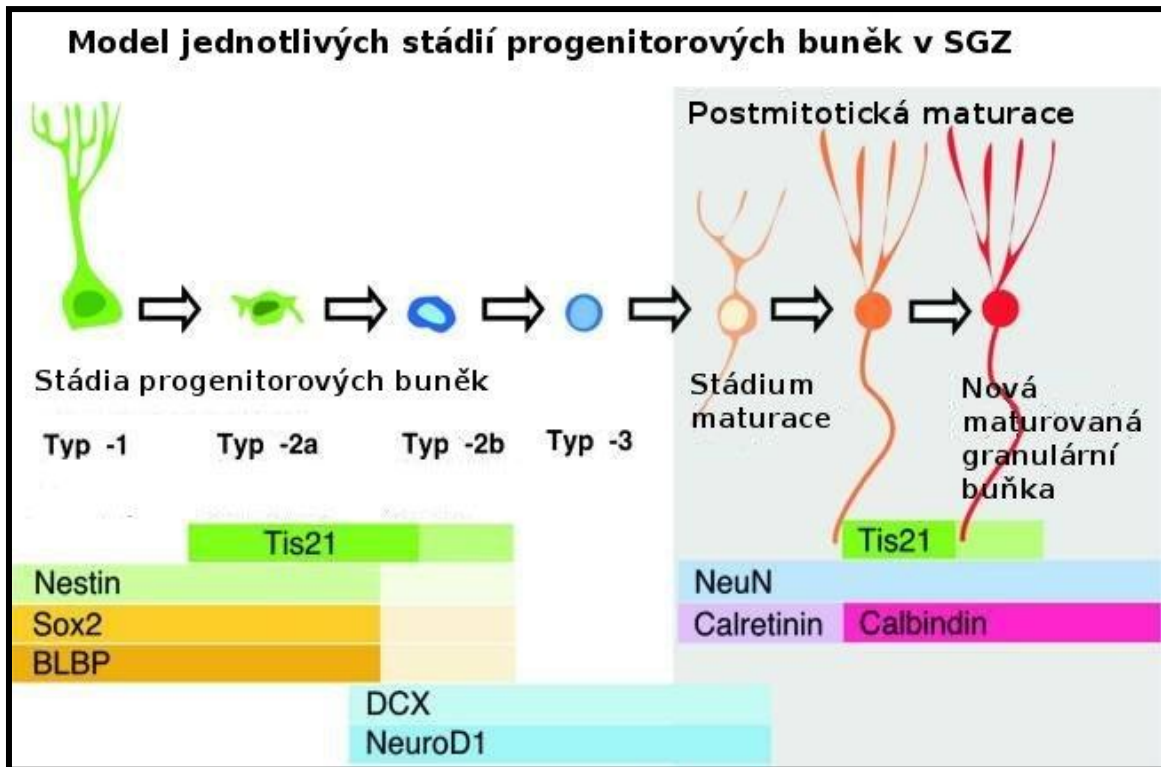
Nezralý granulární neuron

Buňky typu 3 vystupují z buněčného cyklu a nastává fáze jejich postmitotické diferenciaci v granulární neuron. V této fázi dochází k expresi DCX a calretininu, k dalšímu růstu axonů a dendritů a k funkční maturaci; je vybudována největší část dendritického stromu (Brandt et al. 2003; Plümpe et al. 2006). Během této fáze se také objevují první dendritické trny (Zhao et al. 2006).

Po třech týdnech dochází k přepnutí z exprese calretininu na calbindin, který je markerem pro zralé neurony (Brandt et al. 2003), a dendrity i axony dosahují svého konečného cíle – dendrity do molekulární vrstvy GD a axony do oblasti CA3 hipokampu (Hastings a Gould 1999).

V prvních dvou až třech týdnech postmitotického vývoje neurony přijímají pouze vstupy kyseliny gama aminomáselné (GABA), které jsou excitační, poté se změni na vstupy inhibiční a excitační vstupy zajišťuje glutamát (Glu). GABAergní vstupy řídí neuronální maturaci a integraci nových neuronů (Ge et al. 2006). Období první detekce glutamátergních vstupů se shoduje s obdobím zvýšené synaptické plasticity a zvýšením prahem pro indukci dlouhodobé potenciace (LTP), toto období nastává kolem třetího týdne po jejich vzniku (Schmidt-Hieber et al. 2004). Nové neurony se stávají zralými po 7-8 týdnech od jejich narození (van Praag et al. 2002).

Názorný přehled molekulárních markerů pro vývojová stádia nového neuronu je znázorněn na Obr. 1.



Obr. 1: Vývojová stádia nového neuronu v SGZ. Upraveno podle (Attardo et al. 2010).

Nestin	protein intermediárního filamenta
Sox2	transkripční faktor zárodečných buněk
BLBP	mozkový lipidy-vázající protein (brain lipid-binding protein)
Tis21	transkripční faktor neuronálního dělení
DCX	protein neuronální migrace
NeuroD1	transkripční faktor neurogení diferenciace
NeuN	neuronální specifický nukleární protein
Calretinin	vápník vázající protein
Calbindin	vápník vázající protein

Nové neurony, které nejsou během třetího a čtvrtého týdne zapojeny do funkčního okruhu podléhají apoptóze (Biebl et al. 2000; Kuhn et al. 2005). Inhibice kaspázové aktivity v GD je spojena s větším počtem nových neuronů (Ekdahl et al. 2001; Gemma et al. 2007). Studie s podobným výsledkem ukázala, že myši se zvýšenou expresí protiaoptického genu Bcl2 měly dramaticky zvýšen počet nových neuronů (Kuhn et al. 2005). Absolutní počet nových neuronů výrazně koreluje s věkem a se stárnutím organismu dochází k poklesu neurogeneze (Kuhn et al. 1996). Úbytek nových neuronů je nejvyšší v prvním a druhém týdnu po ukončení posledního buněčného dělení tzn. v postmitotické fázi nezralého neuronu, poté už je úbytek minimální (Seki 2002).

Přežívání nových neuronů může být zvýšeno několika různými faktory např. vystavením obohacenému prostředí, fyzickou aktivitou a různými formami hipokampálně

závislého učení (Kempermann et al. 1997; van Praag et al. 1999; Gould, Tanapat, et al. 1999). Nové granulární neurony jsou plně integrovány do stávající hipokampální neuronální sítě (van Praag et al. 2002). Jejich integrace a kumulativní charakter neurogeneze (Imayoshi et al. 2008) mají dopad na teorie o funkčním významu neurogeneze v GD hipokampu.

Funkční význam hipokampu

Hipokampus je někdy nazýván bránou do vědomí, přes kterou musejí vzpomínky projít, aby byly uloženy. Široce přijímanou teorií je, že hipokampus hraje zásadní roli pro prostorovou, kontextuální a deklarativní paměť (Eichenbaum 2004; O'Keefe a Nadel 1978; Squire 2004).

První práce o funkci hipokampu se objevily v souvislosti s pacientem Henry Molaisonem, který trpěl těžkou epilepsií a po lokalizaci epileptických ložisek ve střední části temporálního laloku podstoupil jejich chirurgickou resekci. Po této operaci trpěl závažnou anterográdní amnézií a lehčí retrográdní amnézií, ale jeho pracovní a procedurální paměť zůstala neporušena (Scoville a Milner 1957). Bylo zkoumáno i několik dalších pacientů, u kterých poškození hipokampu způsobila encefalitida (Eichenbaum a Cohen 2004) nebo ischemie (Zola-Morgan et al. 1986), všechny tyto studie a mnoho dalších přispěly k objasnění hipokampálních funkcí. Tyto studie vedly k závěrům, že hipokampus je struktura nezbytná pro deklarativní paměť a je zodpovědný za konsolidaci paměťových stop. O 20 let později vyšla přelomová kniha s názvem *Hippocampus as a cognitive map* (O'Keefe a Nadel 1978), která postulovala klíčovou roli hipokampu v navigaci a poznávání prostoru.

Deklarativní paměť uchovává vzpomínky a faktické znalosti. Můžeme ji rozdělit do dvou podtypů na sémantickou a epizodickou. Sémantická paměť obsahuje obecná fakta, bez vztahu k místu a času (např. znalost matematických vzorců, znalost hlavních měst). Epizodická paměť uchovává informace o událostech, zahrnující rozměr časový, prostorový a emoční (Kdy? Kde? Co?), jejím podtypem je paměť autobiografická, která obsahuje vzpomínky na vlastní život.

Pro dosažení paměťové konsolidace hipokampus poskytuje prostředek k propojení informací do kontextu a jejich umístění do asociačních oblastí mozkové kůry. Informace zpracované hipokampem se ukládají v kůře a stávají se nezávislými na hipokampu. Tento

proces tzv. systémové konsolidace trvá několik dní až týdnů a během této doby mohou být vzpomínky modifikovány. Hipokampus se také účastní vyvolávání uložených informací, které mohou být tímto procesem také narušeny nebo změněny (Dudai 2004). Proces systémové konsolidace probíhá patrně pouze u některých typů paměťových stop.

Hipokampus může také propojovat podobné souvislosti napříč mnoha informacemi, a tím napomáhat vzniku následným asociacím (Wirth et al. 2003). Další z funkcí hipokampu je učení na základě jedné zkušenosti, které je důležité z hlediska neustále se měnícího prostředí, kde se spoustu událostí objeví pouze jednou (Nakazawa 2003).

Recentní studie také naznačují jeho význam v tzv. kognitivní koordinaci. Jako kognitivní koordinaci označujeme „management“ mnohočetných proudů informací přicházejících do hipokampu (Wesierska 2005). Tato funkce kromě účasti prefrontálních exekutivních oblastí (Phillips & Silverstein 2003) kriticky závisí na hipokampu, protože je významně narušena inaktivací buňky jen jednoho hipokampu (unilaterálně) mikroinjekcí tetrodotoxinu (TTX), blokátoru sodíkových kanálů zodpovědných za šíření vzruchů (Cimadevilla et al. 2001).

V dnešní době je prostorová paměť hlodavců za model lidské deklarativní paměti (Manns a Eichenbaum 2006). Principiální neurony v hipokampu a přilehlých oblastech vykazují různé typy prostorově-specifické aktivity. Pyramidové neurony v hipokampu se chovají jako buňky místa (angl. *place cells*), tj. významně zvyšují vzruchovou aktivitu, pokud se subjekt nachází v definované a omezené části prostoru, označovaného anglickým termínem aktivní pole (angl. *firing field*) (O'Keefe a Dostrovsky 1971). Ostatní funkčně specializované buněčné typy jsou buňky směru hlavy (angl. *head direction cells*; Taube et al. 1990) v subikulu, RSC a předním thalamu, mřížkové buňky (angl. *grid cells*) v mediální entorhinální kůře (Fyhn et al. 2004; Hafting et al. 2005) a buňky se smíšenými preferencemi na směr hlavy a zároveň polohu. Buňky směru hlavy reagují, když zvíře natočí hlavu v určitém směru nezávisle na jeho poloze, zatímco mřížkové buňky vytvářejí vzruchy na mnoha místech, která pravidelně pokrývají celý prostor hexagonální rhombickou mřížkou. Jiné typy buněk reagují na prostorové hranice (angl. *border cells*; Solstad et al. 2008) nebo na kombinace prostorových proměnných, jako je místo, směr hlavy, a rychlost pohybu (Cho a Sharp 2001).

Funkční význam GD

V trisynaptické smyčce je patrné konvergence i divergence nervových vláken. Entorhinální kůra obsahuje 675 000 neuronů, ale pouze 112 000 pyramidálních neuronů se propojuje s GD. GD samotný pak obsahuje cca 1 200 000 granulárních buněk, v CA3 je cca 250 000 pyramidálních neuronů a v oblasti CA1 najdeme zhruba 400 000 pyramidálních neuronů (Amaral & Witter 1989; Mulders et al. 1997). Z oblasti CA1 vede proud informací přes subikulum zpátky do entorhinální kůry a z ní do kortikálních asociačních oblastí (Bird a Burgess 2008). Neurogeneze v dospělém mozku se objevuje pouze v GD a má vliv na počet granulárních neuronů a tím pádem i na počet mechových vláken, které spojují GD s oblastí CA3. Na základě zjištěného počtu buněk v hipokampálních oblastech můžeme vidět, že v hipokampu vzniká tzv. efekt hrdla láhve (angl. *bottleneck effect*) při zpracování přicházejících proudů informací. Nejdříve jsou informace divergovány a následně konvergovány (Obr. 2). Zatímco divergence v počtu neuronů je mezi entorhinální kůrou a GD, silná konvergence je mezi GD a oblastí CA3. To naznačuje efekt GD na kompresi přicházejících informací. Aktivní pole neuronů jsou řídká, což je v rozporu s masivním tokem informací skrz tuto strukturu a s velkým počtem buněk oproti entorhinální kůře (Jung a McNaughton 1993). To by mohlo naznačovat funkci GD ve stabilizaci informací přicházejících do hipokampu. Mezi další z předpokládaných funkcí GD patří: separace a doplňování vzorců (jak prostorových tak časových i kontextuálních), prevence interference mezi paměťovými stopami a společné kódování mnohočetných sensorických vstupů (Kesner 2013; Nakashiba et al. 2012; Wiskott et al. 2006). Neurogeneze se v dospělém mozku objevuje pouze v GD, proto je pravděpodobné, že bude její funkce souviset s touto strukturou.

Předpokládané funkce neurogeneze v dospělém mozku

Neuronová síť v GD se neustále dynamicky mění přidáváním nových neuronů a jejich funkčním zapojováním do stávající neuronální sítě. I přesto, že je neurogeneze známá již od 70. let 20. století, její přesná funkce není v současnosti stále plně objasněna. Existuje několik přístupů k objasnění jejího významu, jako je počítačové modelování, elektrofyziologická měření a behaviorální testování zahrnující různé metody ablace nebo redukce neurogeneze. K behaviorálnímu testování se používá několik základních testů, některé z nich mají dvě formy: hipokampálně závislou a hipokampálně nezávislou. Mezi

nejčastěji prováděné behaviorální testy, používané na řešení této problematiky patří Morrisovo vodní bludiště (MWM), kontextuální strachové podmiňování, radiální bludiště a rozlišování vzorů na dotykovém monitoru. Výstupem těchto studií je několik předpokládaných funkcí stručně shrnutých v následujícím textu.

Separace vzorců

Existuje stále více důkazů, že kontinuální vznik nových neuronů významně přispívá k separaci vzorců. Separace vzorců je schopnost rozlišení mezi podobnými vstupy, které přicházejí do hipokampu. Tento termín pochází z počítačového modelování neuronálních sítí, kde byly separace vzorců predikovány jako funkce GD (Leutgeb et al. 2007; O'Reilly a McClelland 1994). Na behaviorální úrovni tyto vstupy odrážejí vnější smyslové vjemy a vnitřně generované reprezentace založené na předešlých událostech a vstupech z prostředí. Díky možnosti manipulovat s mírou neurogeneze několik studií prokázalo, že nově vytvořené neurony se účastní jemných rozlišení mezi sousedními prostorovými lokacemi a podobnými prostředími.

Separaci vzorců je možné rozlišit do několika podskupin či konceptů, které spolu úzce souvisejí. Nejznámější je prostorové pojetí, kdy dochází k rozlišování podobných podnětů na základě jejich lokalizace v prostoru. Dalším je kontextuální rozlišování, kdy je nutné rozlišit např. dvě podobné místnosti, které se liší pouze nepatrně. Poslední je časové rozlišení, při kterém dochází k uspořádání jednotlivých vstupů do časové osy.

Ablace nebo redukce neurogeneze zhoršuje výkon v úkolech, které vyžadují rozlišení mezi podobnými podněty. V nedávné studii (Clelland et al. 2009) byly použity myši, kterým byla neurogeneze blokována ozářením a genetickou manipulací (ozáření redukce o více jak 90 %, genetická manipulace redukce o 50%). Myši byly testovány ve dvou odlišných behaviorálních testech zaměřených na prostorové odlišení; v radiálním bludišti a v dotýkání se správných obrazců na dotykovém monitoru. V radiálním bludišti myši vykazovaly deficit, pouze v případě, kdy musely rozlišovat mezi sousedními rameny, ale pokud byla ramena oddělena dalšími, nelišily se jejich rozlišovací schopnosti od kontrolní skupiny. Výsledek druhého testu, kdy se myši dotýkaly obrazců na monitoru, přinesl podobné závěry. Při těsné blízkosti dvou obrazců bylo rozlišení u experimentální skupiny narušeno a při jejich větší vzdálenosti se výsledky nelišily od kontrolní skupiny. Z této studie vyplývá vliv neurogeneze na schopnost prostorové separace podobných podnětů, které jsou v těsné blízkosti.

V další studii bylo prokázáno, že specifická ablace neurogeneze narušuje rozlišování kontextu v úloze kontextuálního strachového podmiňování (tzv. kontextuální strachovou diskriminaci), což je další z podtypů separace vzorců. Myši byly vystaveny dvou podobným kontextům (2 boxy, odlišné stěny a osvětlení), ale pouze v jednom boxu dostávaly malý elektrický šok. Z této studie vyplývá vliv neurogeneze na rozlišování kontextů, které se v určitých vlastnostech překrývají (Tronel et al. 2012).

Garthe a kolegové (2009) prokázali deficit ve formování prostorových strategií v uspořádání přeučení (angl. *reversal*) Morrisova vodního bludiště (MWM). Myšim byla redukována neurogeneze pomocí cytostatika temozolomidu a poté byly testovány v MWM, při změně polohy skrytého ostrůvku docházelo u experimentální skupiny k výraznému nárůstu času, který potřebovaly k nalezení ostrůvku, také docházelo k narušení formování prostorových strategií a perseveraci.

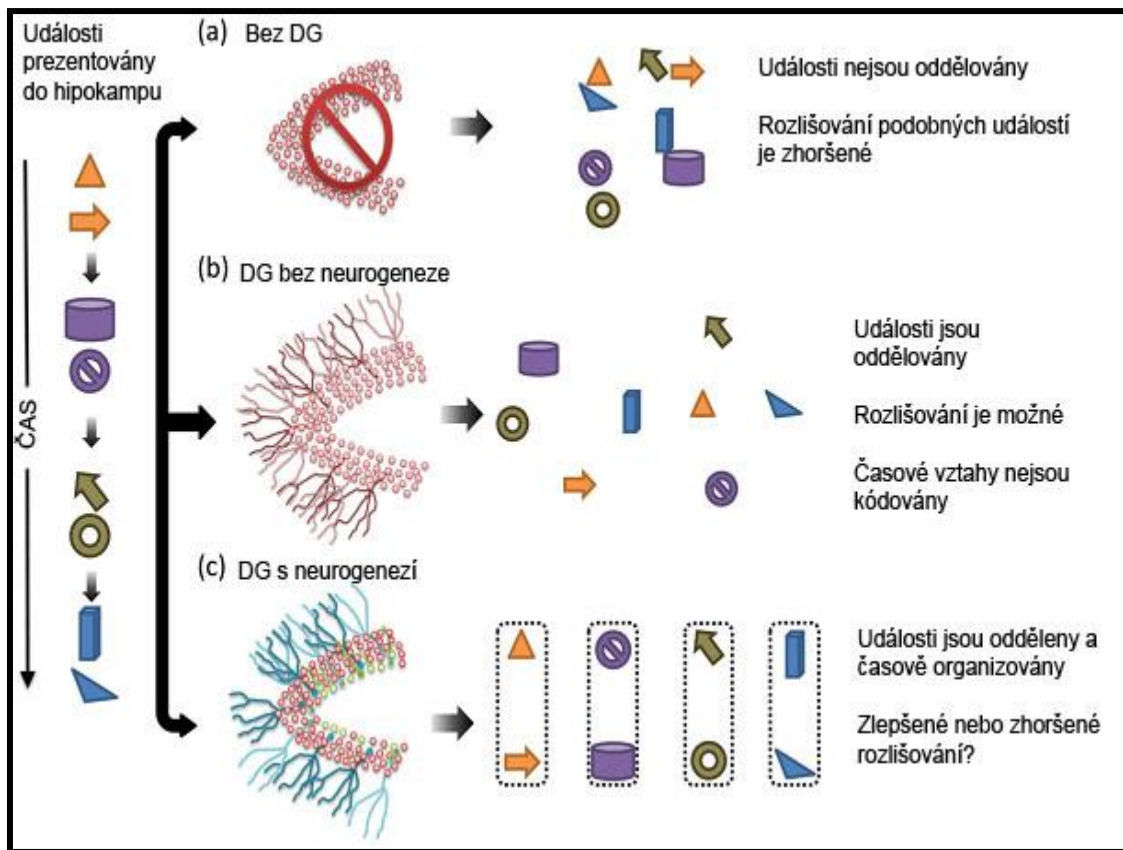
Také existují důkazy, že zvýšená tvorba nových neuronů, způsobená genetickými manipulacemi nebo fyzickou aktivitou, zlepšuje prostorové rozlišování dvou podobných podnětů. Ve studii podle Creera (2010) měly myši k dispozici běhací kolečko a byly testovány na dotykovém monitoru. Sahay a kolegové (2011) použili transgenní myši, které měly zablokovaný pro-apoptický gen Bax. Zablokováním tohoto genu se zvýšilo přežívání nových neuronů. Myši se zvýšenou neurogenézí měly lepší schopnost odlišení dvou podobných kontextů při strachovém kontextuálním podmiňování, tato schopnost se rozvinula až v průběhu několika dní po začátku tréninku.

Rangel a kol. (2014) pomocí komplikované studie potvrdili hypotézu o účasti neurogeneze na časovém rozlišení událostí. Pomocí *in vivo* elektrofyziologického záznamu a identifikace buněk v granulórní vrstvě GD, které byly aktivní v určitém čase a kontextu. Potkani byli vystaveni třem různým behaviorálním kontextům, buďto všem najednou (bez časové separace) nebo postupně (časová separace). Experimentální skupina měla redukovanou neurogenézi pomocí cytostatika temozolomidu (TMZ). Výsledky potvrdily, že kontinuální přidávání nových neuronů, je důležité pro časové odlišení jednotlivých událostí.

Výsledky těchto experimentů potvrzují hypotézu, že se nové neurony účastní separace vzorců mezi podobnými podněty. Příspěvek dospělé neurogeneze se týká pouze složitějších případů rozlišování, pokud dojde ke zjednodušení (např. větší vzdálenost mezi

podněty v prostorovém nebo časovém uspořádání) nebo výraznému odlišení dvou kontextů, tak jsou výsledky mezi experimentálními a kontrolními skupinou srovnatelné.

V několika studiích se ale objevují informace, které tyto výsledky vyvracejí (Saxe et al. 2006; Zhang et al. 2008; Hernández-Rabaza et al. 2009; Wojtowicz et al. 2008). Tato různorodost je pravděpodobně způsobena heterogenitou v designech experimentů. Také redukce neurogeneze může být způsobena odlišnou metodou: ozářením, genetickou ablací a chemickou cestou působením cytostatik, tyto postupy způsobují různou míru snížení neurogeneze a mají rozdílné vedlejší účinky (Jessberger et al. 2009; Dupret et al. 2005; Monje et al. 2002) .



Obr. 2: Model efektu nových neuronů na separaci vzorců.

Levá část představuje odlišné a časově oddělené vstupy událostí do GD. Pravá část představuje jednotlivé zpracování vstupů v různých případech uspořádání.

A) Události kódované hipokampem bez DG nebudou odpovídajícím způsobem odděleny, což vede k možnému sdružování událostí podle obsahu.

B) Události kódované hipokampem s DG bez neurogeneze budou vysoce odlišeny, ale nebude zachován časový sled.

C) Události kódované hipokampem s neurogenezí v DG budou vysoce odlišeny a měla by být zachována jejich časová složka. Toto časové rozdělení by měly poskytnout nové neurony.

Upraveno podle (Aimone et al. 2010).

Prevence interference mezi paměťovými vstupy

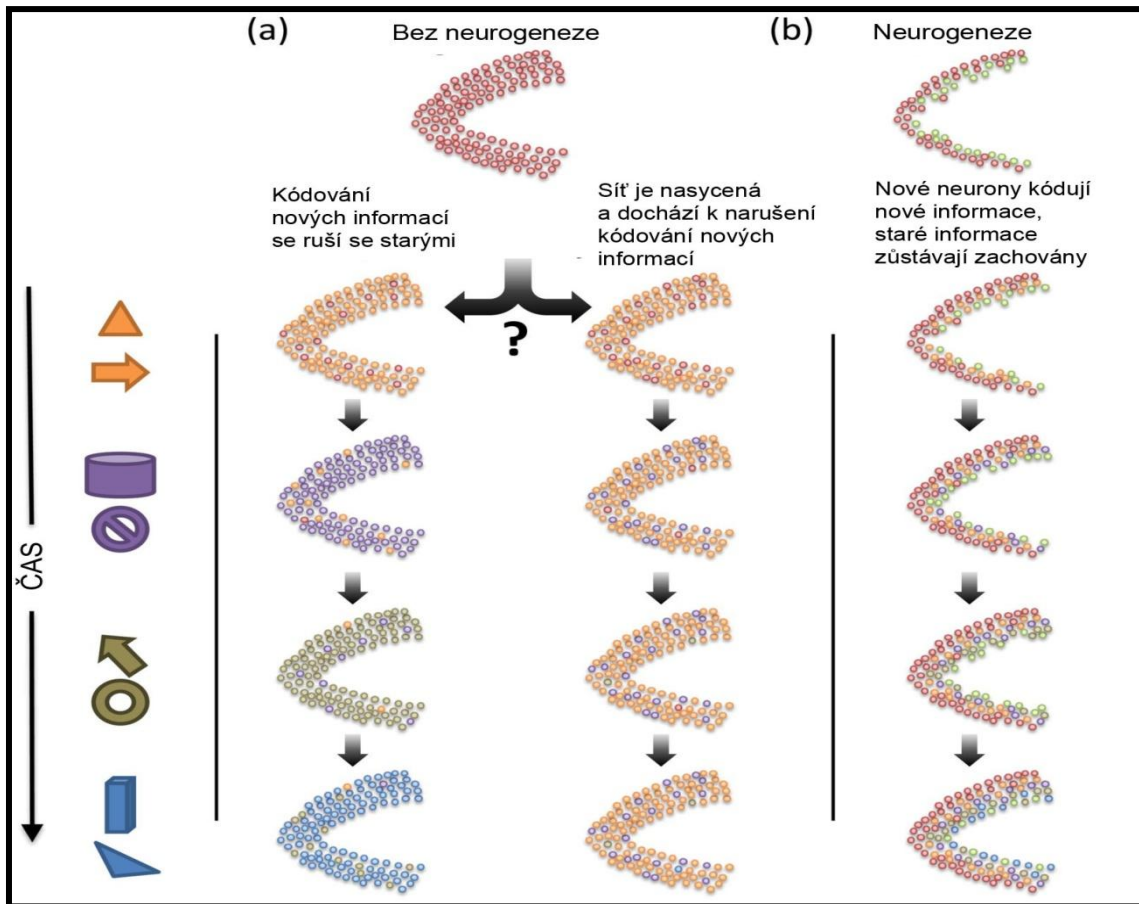
Další z předpokládaných funkcí DG je vyhnout se interferenci, neboli rušení mezi paměťovými stopami při vzniku nových vzpomínek. Optimální kódování závisí na distribuci vstupních vzorů - tedy na okolním prostředí, kde se zvíře nachází. Předpokládá se, že když se změní okolní prostředí, tak se změní i proces kódování. V důsledku interference by mohly být předešlé informace ztraceny, protože stále přicházejí nové. Vzorec, který byl kódován a uložen dříve, nemusí být rozpoznán a vyvolán, protože reprezentace stejného vzorce vypadá při vstupu do oblasti CA3 odlišně (Wiskott et al., 2006).

Treves a Rolls (1994) navrhli možnost provádění rozpoznání a vyhledávání vzorců skrz perforující dráhu vedoucí z EC do CA3. Toto řešení by mohlo snížit problém interference, ale ne vyřešit. Perforující dráhy by pravděpodobně nebyly schopné pojmout všechna odlišná kódování přicházející z DG, ale pouze omezený počet.

Další hypotéza předpokládá prevenci interference v důsledku přidávání nových neuronů, a tím rozšíření kódování přicházejících vzorců. Staré neurony a jejich synaptické váhy jejich spojů jsou fixovány a zachovávají staré vzorce, zatímco nové neurony jsou plastické a vytvářejí nové možnosti kódování. Pro pochopení toho, jak je možné, že malé množství buněk má zásadní vliv na prevenci interference, je důležitá anatomická lokace neurogeneze, kdy obrovské množství informací musí projít relativně malou sítí hipokampu, která nemá kapacitu na kódování každé informace zvlášť. A z tohoto důvodu musíme dále rozlišovat stimuly, které jsou sice nové, ale složeny z jednotlivých známých částí do nového celku, například nové slovo složené ze známých písmen. Druhý typ stimulů naproti tomu obsahuje i zcela nová písmena a proto vyžaduje zapojení nových neuronů (Wiskott et al., 2006). Starší neurony jsou optimalizovány pro známé prostředí, zatímco nové neurony jsou plastické pro adaptaci v novém prostředí. Přidávání nových neuronů je tedy pravděpodobně významné pro úspěšnou prevenci interference.

Ve studii Gordona Winocura a kolegů (2012) byli potkani rozděleni do dvou základních skupin: jedna skupina měla neurogenezi redukovanou ozářením blokovanou a druhá byla intaktní. Polovina potkanů z každé skupiny měla k dispozici volný přístup k běhacímu kolečku. Testování probíhalo ve vodním bludišti, které mělo čtyři otevřená ramena. V první fázi probíhal vizuálně diskriminační test, dvě ramena byla označena a v jednom z nich byl pod vodou umístěn ostrůvek, potkan vždy začínal svoji plavbu

v neutrálním rameni. V druhé fázi probíhalo testování pod podmínkami nízkého nebo vysokého rušení předešlé naučené vizuální diskriminace. V podmínkách nízkého rušení byla dvě ramena zaslepena a potkan mohl plavat pouze rovně, přímo směrem k ostrůvku. Při vysokém rušení byla otevřena všechna ramena a dvě ramena naproti sobě byla označena stejně, ale vždy pouze v jednom byl ostrůvek, tím se úloha stala neřešitelná. Ve třetí fázi úloha probíhala stejně jako v první. V případě ozářené skupiny bez fyzické aktivity nedošlo v podmínkách nízkého rušení k žádnému efektu na učení a vyvolání předešlých vzpomínek, ale v podmínkách vysokého narušení došlo ke zhoršené schopnosti vyvolání předešlé naučené diskriminace. U ozářené skupiny s fyzickou aktivitou, kde probíhal vznik nových neuronů, byly výsledky srovnatelné s kontrolní neozářenou. Tyto výsledky potvrzují hypotézu vycházející z počítačového modelování, na vliv neurogeneze na prevenci interference mezi paměťovými stopami.



Obr. 3: Modelový efekt nových neuronů na prevenci interference mezi paměťovými stopami.

Levá část představuje odlišné a časově oddělené vstupy událostí do GD. Pravá část představuje jednotlivé zpracování vstupů v různých případech uspořádání.

A) DG bez neurogeneze jsou dvě možnosti:

Levý sloupec: Nově přicházející informace přepisují ty starší a dochází k interferenci mezi vzpomínkami.

Pravý sloupec: Další možnost předpokládá nasycení sítě DG a proto všechny dále přicházející informace budou kódovány stávající sítí. To způsobí rozrušení nových informací a jejich rozptýlené kódování.

B) DG s neurogenézí předpokládá plasticitu nových neuronů, což umožňuje kódování nových informací a souběžně zachování starých informací beze změn.

Upraveno podle (Aimone et al. 2010).

Metody redukce a ablace neurogeneze

Neurogenezi je možné blokovat nebo redukovat několika různými způsoby. Nejdříve se vyvinula metoda redukce pomocí ozáření rentgenovými nebo gama paprsky. Největší nevýhodou této metody je okolní poškození tkáně a vznik zánětu. Další z metod je redukce neurogeneze pomocí cytostatik, jako první se používalo cytostatikum MAM, které má ale mnoho vedlejších účinků, proto je v současnosti nahrazeno temozolomidem, který se používá k léčbě mozkových nádorů a je vůči organismu šetrnější. Jako poslední se používají genetické ablace, které mají výhodu v jejich vysoké specifitě.

Ozáření

Ozáření je jednou z prvních metod, která se používala k redukci neurogeneze. Prekursorové buňky v SVZ a SGZ jsou senzitivnější k ozáření, než ostatní typy buněk v mozku. Gama záření v dělicích se buňkách vede ke zničení deoxyribonukleové kyseliny (DNA), na jejíž opravu nestačí endogenní reparační mechanismy. V důsledku toho dojde k indukci apoptózy (Limoli et al. 2004).

Mizumatsu a kolegové (2003) provedli studii, ve které byl mladým myším ozářen celý mozek různě vysokými dávkami a po 6-46 hodinách byla pomocí imunohistochemie detekována probíhající apoptóza a množství proliferujících buněk. Vrchol v počtu apoptických buněk nastal po 12 hodinách a byl přímo úměrně závislý dávce ozáření. Po 48 hodinách se snížilo množství progenitorových buněk o 93-96 % a počet nezralých neuronů o 40-60 %. Pro zjištění jestli efekt ozáření přetrvává dlouhodobě, byly mozky myši ozářeny různými dávkami a po třech týdnech byl zjišťován počet BrdU pozitivních buněk. Počet BrdU pozitivních buněk byl redukován v závislosti na dávce, a u nejvyšší dávky 10 Gy byl snížen přibližně o 75 %. V místě ozáření vzniká silná zánětlivá odpověď, ale při podávání protizánětlivých medikamentů nedochází k tak dramatickému snížení neurogeneze. Zánětlivá reakce tedy pravděpodobně sekundárně snižuje počet buněk (Monje et al. 2003). Ozáření také narušuje neurogenní niku, kde dochází k rozrušení krevních cév a glióze. Regenerace po ozáření závisí na dávce a na tom, zda byly zničeny i NSCs, záření primárně zasahuje dělicí se buňky typu 2 (přechodně amplifikující), které mají nejvyšší proliferační aktivitu a efekt ozáření na buňky s nízkou proliferační aktivitou je výrazně menší (Mizumatsu et al. 2003b; Limoli et al. 2004). Ozáření celého mozku nebo pouze hipokampu rentgenovými paprsky nebo paprsky gama je častou experimentální

metodou používanou pro ablaci neurogeneze (Parent et al. 1999; Santarelli et al. 2003; Winocur et al. 2006; Ko et al. 2009).

Vzhledem k tomu, že se terapeutické ozáření mozku používá jako protinádorová léčba, jsou známy její vedlejší účinky. Terapeutické ozáření může být asociováno i při nižších dávkách s kognitivní dysfunkcí a v případě vysokých dávek způsobuje závažné funkční a morfologické poškození mozkových struktur (Hopewell 1979; Kramer et al. 1992; Welzel et al. 2008). Kognitivní deficity se často projeví ve zhoršeném učení, paměti a prostorového zpracování informací (Roman a Sperduto 1995). Je možné, že z tohoto důvodu není ozáření ideální metodou k redukci neurogeneze.

Genetické ablace

Genetické ablace mají výhodu v jejich specifickém působení a úplném blokování tvorby nových neuronů; také je vyloučeno nescifické poškození jako u ostatních metod. Jedna z možností transgenní manipulace je vložení tzv. sebevražedného genu pod specifický promotor neuronálních progenitorových buněk. Konkrétněji se vkládá gen pro virový enzym (např. thymidinkinázu), který je vložen pod promotor pro nestin nebo GFAP (molekulární markery). Poté buňky exprimují virový enzym a při podání antivirotického agens dojde během replikace k poškození DNA a následné apoptóze (Saxe et al. 2006; Garcia et al. 2004). Dalším způsobem může být indukce delece určitého genu (Zhang et al. 2008). Transgenních organismů pro ablaci neurogeneze je v dnešní době celá řada, a díky intenzivnímu rozvoji této oblasti budou stále přibývat další.

Cytostatika

K blokování neurogeneze se používají dvě hlavní cytostatika metylazoxymetanolacetát (MAM) a temozolomid (TMZ).

Metylazoxymetanolacetát (MAM)

Jako první chemická sloučenina pro snížení neurogeneze se používalo methylační činidlo MAM, který má cytotoxické účinky na dělicí se buňky (Johnston a Coyle 1979; Shors et al. 2001). Aplikace MAM má mnoho vedlejších účinků: např. vyvolává hypoaktivitu, narušuje motorickou rovnováhu, způsobuje kachexii a také má karcinogenní účinky (Matsushima et al. 1979; Dupret et al. 2005). Kvůli velkému množství vedlejších účinků

a pouze částečné redukci neurogeneze i při vyšších dávkách se MAM přestal pro tyto experimenty používat (Dupret et al. 2005). V poslední době se pro chemickou blokádu neurogeneze používá temozolomid.

Temozolomid (TMZ)

Temozolomid (Temodal, Schering Plough, Německo; TMZ) je cytostatikum, které se běžně používá k léčbě mozkových nádorů zahrnující anaplastický astrocytom, multiformní glioblastom, a také se používá k léčbě metastatizujících melanomů (O'Reilly et al. 1993; Newlands et al. 1996; Bower et al. 1997). TMZ byl poprvé syntetizován Stevensonem a jeho spolupracovníky v roce 1984, a oni také prokázali jeho protinádorovou aktivitu (Stevens et al. 1984). TMZ je malá lipofilní molekula (194 kDa), která se dobře absorbuje v trávicím traktu a prostupuje hematoencefalickou bariérou (Patel et al. 2003). V kyselém prostředí žaludku je sloučenina stabilní, ale po prostupu do krve a tkání se při fyziologickém pH spontánně hydrolyzuje na aktivní metabolit methyl-triazenyl imidazolkarboxamid (MTIC), který se rychle rozkládá na methyldiazoniový iont. Methyldiazoniový iont methyluje guaninové a adeninové zbytky v DNA za tvorby O6-methylguaninu, N7-methylguaninu a O3-methyladeninu. Hlavní roli pro cytotoxický efekt TMZ má O6-methylguanin, díky působení reparačních DNA enzymů dojde ke vzniku jednovláknových a dvouvláknových zlomů v DNA, které způsobí spuštění apoptické dráhy (Newlands et al. 1997; Agarwala a Kirkwood 2000). Vedlejší účinky jsou mírnější než u MAM a patří k nim mírné nekumulativní potlačení myelosuprese (Agarwala a Kirkwood 2000).

Detekce neurogeneze pomocí bromodeoxyuridunu (BrdU)

BrdU je analog thymidinu, který se inkorporuje do DNA dělících buněk během S- fáze buněčného cyklu. BrdU se používá pro detekci buněčné proliferace v nervovém systému (Nowakowski et al. 1989).

BrdU byl původně vyvinut pro determinaci proliferačního indexu tumorů a jako antivirové a antineoplastické agens (Freese et al. 1994; Hoshino et al. 1986; Begg et al. 2000). Oproti dříve používanému radioaktivně značenému thymidinu přinesl několik výhod, jako je práce bez radioaktivity a detekci značených buněk v poměrně tenkých řezech. Tyto aspekty vedly k rozšířenému používání BrdU pro studium neurogeneze v dospělém mozku *in situ*. V dnešní době je BrdU značení nejpoužívanější technika pro

detekci neurogeneze (Taupin 2007). BrdU může být imunohistochemicky detekován s použitím monoklonální protilátky proti jednořetězcové DNA obsahující BrdU (Gratzner 1982).

BrdU prochází hematoencefalickou bariérou a může být podáváno různými způsoby např. intraperitoneálně, intravenózně i perorálně. BrdU se metabolizuje z části už v krevní plazmě, a proto se do mozku nedostane celá podávaná dávka. Přes hematoencefalickou bariéru (HEB) přechází pomocí nukleosidového transportéru, a eliminován je mozkomíšním mokem, jako thymidin. Farmakokinetika BrdU není objasněna, ale je odhadováno, že je v mozku přístupný pro značení asi 2 hodiny po systémovém podání (Lynch et al. 1977; Thomas a Segal 1997; Hayes a Nowakowski 2000; Taupin 2007).

Toxicita BrdU

Používání BrdU pro detekci proliferace je přínosná metoda, ale má i svá úskalí. Jeho toxicita je podložena několika experimentálními důkazy. Při podávání březím samicím myši, došlo u potomků k malformacím a kognitivním změnám a zvýšené mortalitě (Bannigan 1985; Kolb et al. 1999). Při postnatálním podání může BrdU způsobit na změny ve vývoji mozečku (Yu 1976). Po vývoji HEB se toxicita BrdU snižuje, vývoj HEB u potkana nastává kolem 10. dne po porodu (Ribatti et al. 2006).

Pro detekci neurogeneze se nejčastěji používá dávka 50-100 mg/kg (Corotto et al. 1993; Kuhn et al. 1996), ale i při dávkách až 300 mg/kg se u dospělých jedinců neprokázaly žádné vedlejší účinky (Cameron & McKay 2001). Přesto, že nebyl prokázán toxický efekt BrdU při těchto dávkách, není vyloučen. Při inkorporaci do DNA může BrdU narušovat její stabilitu a způsobovat mutace a zlomy (Morris 1991).

Cíle diplomové práce

Cílem této práce bylo zjistit optimální dávku TMZ u laboratorního potkana, která:

- 1) Účinně blokuje neurogenezi v GD hipokampu.**
- 2) Má minimální negativní účinky na zdravotní stav potkanů.**

Metody a materiál

Experimentální subjekty

Během této studie bylo použito 40 samců potkanů kmene Long-Evans z chovu Fyziologického ústavu AV ČR. Potkani byli rozděleni do 4 skupin. Potkani byli přivezeni ve věku pěti týdnů, jeden týden po odstavu (28 dní) a rozděleni do klecí po třech. Potkanům byla podávána potrava a voda *ad libitum*, a byli v režimu 12/12 světlo/tma. Ve zvěřinci byla udržována konstantní teplota 21°C a 50% vzdušná vlhkost. Potkani prošli dvoutýdenním přivykáním s každodenním dvouminutovým handlingem. K identifikaci potkanů jsme použili permanentní lihový popisovač, kterým byli označeni na ocasu.

Experiment začal, když zvířata dosáhla sedmého týdne věku. Potkani byli rozděleni do tří experimentálních skupin a jedné kontrolní, která nedostávala TMZ, ale pouze okyselený roztok. Nejdříve byl potkanům intragastrickou sondou aplikován TMZ každý týden tři po sobě následující dny, aplikace probíhala čtyři týdny. Na konci čtvrtého týdne byly dělicí se buňky označeny intraperitoneální aplikací BrdU. Po zotavovací periodě v délce trvání tři týdnů byli potkani usmrceni. Byl vypreparován mozek, na kryostatu byly vytvořeny koronární řezy a BrdU pozitivní buňky byly zviditelněny pomocí reakce křenové peroxidázy a diaminobenzidinu. BrdU pozitivní buňky byly spočítány pod světelným mikroskopem. Kontrolní testy byly prováděny třikrát - před aplikací TMZ, po aplikaci a po zotavovací periodě před usmrcením. Chronologie jednotlivých úkonů je graficky znázorněna na obr. 4. Pro tento experiment je použita podobná metodika jako ve studii podle Gartheho (2009), která byla prováděna na myších.

týden 1	týden 2	týden 3	týden 4	týden 5	týden 6	týden 7	týden 8	týden 9
habituační	TMZ	TMZ	TMZ	TMZ	zotavování	zotavování	zotavování	
				BrdU				perfuze
odběr				odběr			odběr	
beam walking				beam walking			beam walking	
vážení	vážení	vážení	vážení	vážení	vážení	vážení	vážení	vážení

Obr. 4: Časová osa experimentu.

Redukce neurogeneze pomocí temozolomidu (TMZ)

K redukci neurogeneze byla použita čtyřtýdenní léčba cytostatikem TMZ. TMZ bylo podáváno intragastrickou sondou, tři po sobě následující dny (úterý-čtvrtek) každý týden. Tento typ aplikace je podobný dávkovacímu režimu používanému v humánní medicíně (Agarwala a Kirkwood 2000). Aplikace probíhala vždy v poledne. Suspenze TMZ byla připravena vždy čerstvá z kapslí (Temozolomide Sandoz®20mg a 100mg, Sandoz Pharmaceuticals GmbH) před každou aplikací. Prášek z kapslí byl vysypán do fyziologického roztoku, který byl okyselen na *ph* 3,5 pomocí 37,5 % HCl. Poté byla suspenze po dobu jedné minuty vortexována na nejvyšší obrátky a po dobu dalších 30 minut byla na ledu umístěna na orbitální třepačku (50 rpm). Před aplikací byla suspenze TMZ přefiltrována přes 0,45- μ m filtr pro odstranění větších zbytků a poté byla hned aplikována. Finální koncentrace TMZ byla 2,4 mg/ml. Potkanům byl podáván různý objem TMZ suspenze podle zařazení do skupiny (10, 25, 40mg/kg). Kontrolním potkanům byl podáván okyselený fyziologický roztok, ve stejném množství jako pro skupinu 40mg/kg. Poslední den aplikace TMZ, byl potkanům podán intraperitoneální injekcí BrdU v dávce 50mg/kg. Tato dávka se v předešlých protokolech ukázala být jako dostatečná pro označení dělicích se buněk (Garthe et al. 2009). Po označení buněk byla zvířata ponechána v klidu po dobu tří týdnů zotavovací periody.

Následně byla zvířata usmrcena a po transkardiální perfúzi byly vypreparovány mozky, které byly následně zmrazeny na -80°C. Poté byla stanovena hladina neurogeneze u kontrolní skupiny a skupin s různou dávkou TMZ.

Kontrolní testy

K monitorování fyziologického stavu zvířat a zjištění účinnosti TMZ byly třikrát prováděny kontrolní testy: test chůze po laťce (angl. *beam walking*) a stanovení počtu krevních elementů. Tyto testy byly prováděny před začátkem aplikace TMZ, po aplikaci TMZ a za tři týdny na konci zotavovací periody. Váha, jako další indikátor fyziologického stavu zvířat, byla monitorována jednou týdně.

Beam walking je behaviorální test, testující senzorický a motorický systém. Potkani musí přecházet vyvýšenou laťku, aby se dostali do své klece. Dřevěná laťka je dlouhá dva metry a je umístěná asi jeden metr nad zemí. Jeden z konců je zabezpečen kovovou deskou

a druhý konec vede do klece. Nejdříve byli potkani trénováni na široké části laťky (5 cm), nejdříve ze středu laťky museli dojít do své klece (potkani byli ponecháni na laťce, dokud se nedostali do své klece). Po takto provedených třech kolech, následovaly další tři s tím rozdílem, že potkani byli umístěni na konec laťky ke kovové desce. Potom se laťka otočila na užší část (2 cm) a následoval trénink ve stejném schématu. Po tréninku následovalo samotné testování, potkani byli umístěni na konec laťky a měřil se čas, za jaký dosáhli své klece, počet uklouznutí a počet pádů z laťky. Data byla zaznamenána pro tři následující kola. Potkani z jedné klece se střídali po jednotlivých tréninkových nebo testovacích stádiích.

Krevní testy byly prováděny po testu *beam walking* ve stejný den. Krev v množství 200-450 μ L byla odebírána jehlou (40 μ m) ze srdce. Krevní vzorky byly posílány na strojové vyhodnocení (hematologický analyzátor Abacus Junior Vet 5) do veterinární laboratoře Freston v Praze. Byly zaznamenávány počty lymfocytů, erytrocytů a trombocytů. TMZ blokuje buněčné dělení, a proto jsme předpokládali efekt na snížení počtu krevních elementů. Krevní testy byly prováděny ke zjištění fyziologického stavu a také jako indikátor účinnosti TMZ.

Váha, která odráží apetit a přirozený růst, je důležitým ukazatelem zdravotního stavu zvířat. Potkani byli váženi každý týden v úterý.

Histologie a příprava mozků

Po zotavovací periodě byla zvířata předávkována anestezií ketaminem a xylazinem. Pomocí pinzety byl proveden test citlivosti na bolest, jestli je potkan plně v narkóze a necítí bolest. Transkardiální perfúze byla provedena podle zavedeného protokolu naší laboratoře. Nejdříve byl krevní oběh nahrazen 0,2M fosfátovým pufrům a poté roztokem 4% formaldehydu. Oba roztoky byly umístěny v ledu, aby došlo ke konstrikcí cév. Po perfúzi byly potkanům vyjmuty mozky a dány pro další fixaci do 50ml 4% formaldehydu na 24 hodin. Následně byly mozky kryoprotektivně ošetřeny v 50 ml 10%, 20%, 30% roztoku sacharózy v 0,1M fosfátovém pufru (mozky byly přemístěny do vyšší koncentrace, když ve stávající koncentraci klesly na dno). Po kryoprotekci byly mozky osušeny a zmrazeny na suchém ledu a uloženy do mrazáku pro další zpracování (teplota -80°C).

Mozky byly krájeny na kryostatu Leica 1850 při -20°C na 40 μ m koronární řezy, a dány do kryoprotektivního roztoku (25% ethylenglykol a 25% glycerol v 50% 0,2M

fosfátovém pufru). Každý šestý řez byl následně použit na počítání BrdU pozitivních buněk.

Pro BrdU značení, byl z řezů nejprve pomocí Tris pufru (TBS) vymyt kryoprotektivní roztok. Endogenní peroxidáza byla deaktivována působením roztoku - 3% peroxid vodíku a 10% metanolu v TBS. Po omytí řezu v TBS a 0,9% NaCl, byla DNA denaturována pomocí 2,5N HCl při 37°C; lepší přístup k místům, kde je navázáno BrdU. Řezy byly omyty ve fosfátovém pufru (PBS) a inkubovány v roztoku - 10% oslí séra a 3% tritonu X 100 v PBS. Tento krok je důležitý pro perforaci membrány a blokování volných formalinových míst. Po dalším omytí v PBS byly řezy inkubovány dva dny v chladové místnosti při teplotě 4°C v primární protilátce ředěné 1:500 (clone BU1/75, Serotec OBT0030) v PBS s 10% oslího séra a 3% tritonu X100. Po této inkubaci byly řezy vymyty PBS a následně inkubovány 2,5 hodiny v pokojové teplotě s biotinylovanou sekundární protilátkou ředěnou 1:500 (Jackson/Dianova 712-065-153) v PBS s 3% oslího séra a 3% tritonu X100 následovalo další vymývání v PBS. Avidin a biotin konjugovaly s křenovou peroxidázou (ABC elite kit standard, PK6100, Vector laboratories) po dobu jedné hodiny v koncentraci 9µl/1ml roztoku A i B (v PBS). Následně byl použit diaminobenzidin jako chromogen v koncentraci 0,25 mg/ml v PBS s 0,01% peroxidu vodíku a 0,04% chloridu niklu. Po vymytí byly řezy nataženy na sklíčka potažená želatinou. Vymývání mezi jednotlivými kroky vždy probíhalo 5x, aby došlo k důkladnému vymytí. Po uschnutí byly dány do roztoku Neoclear (Merck, 1098435000) dvakrát na 30 minut a pak na ně bylo pomocí Neomountu (Merck, 1090160500) přilepeno krycí sklíčko.

BrdU pozitivní buňky byly počítány pod světelným mikroskopem (zvětšení 40x). Buňky, které protínaly horní rovinu a měly seřízlý povrch, nebyly počítány, aby se předešlo nadhodnocení počtu. V každém šestém řezu byly počítány označené buňky v SGZ a granulární vrstvě. Byl počítán levý a pravý GD, a výsledný počet byl násoben šesti k odhadu celkového počtu BrdU pozitivních buněk v GD.

Všechny použité chemikálie, pokud není uvedeno jinak, byly z firmy Sigma-Aldrich.

Analýza dat

Data byla analyzována pomocí statistického softwaru SPSS (SPSS Statistics for Windows, Version 17.0. Chicago: SPSS Inc.). Data byla analyzována pomocí vhodných parametrických testů, konkrétně jednocestnou nebo dvoucestnou analýzou rozptylu (ANOVA) s opakovaným měřením. Když data nesplňovaly podmínky pro použití parametrického testu (normalita testována pomocí Kolmogorov-Smirnov testu; homogenita rozptylů testována pomocí Leveneho testu), proběhla kontrola na odlehlé hodnoty. Odlehlé hodnoty, byly identifikovány v *boxplot* grafech v statistickém softwaru. Když byl předpoklad, že tyto hodnoty patří do souboru dat, byly nahrazeny hodnotou, která se rovnala dvounásobku směrodatné odchylky od průměru ve stejném směru jako tato hodnota. Když odlehlá hodnota vznikla chybou, byla tato hodnota odstraněna. V případě absence odlehlých hodnot, kdy data nebyla normálně rozložena, byla nalezena vhodná transformace. Pokud se žádnou transformací nepodařilo dosáhnout normální distribuce, byl použit neparametrický přístup. Vzhledem k tomu že nám neparametrický ekvivalent pro ANOVu s opakovanými měřeními není známý, použili jsme opakovaný Kruskal-Wallisův test s Bonferroniho korekcí hladiny signifikance.

Po hlavní analýze byly použity *post hoc* testy, plánované kontrasty a v případě signifikantní interakce analýza jednoduchých efektů. Jako *post hoc* test byl použitý Hochberg GT2 test, protože velikost výběrových souborů v experimentálních skupinách byla odlišná a tento test je robustní v případě různě velkých skupin (a také v případě, že homogenita rozptylů byla signifikantně různá). V případě použití neparametrického Kruskal-Wallisova testu byl jako *post hoc* test použitý opakovaný Mann-Whitney test (neparametrický ekvivalent t-testu) na apriorní hypotézy, aby nedošlo k příliš velkému snížení úrovně Bonferroniho signifikance.

V testech, které obsahovaly opakovaná měření a data nesplnila podmínky sféricity podle Mauchlyho testu, musely být stupně volnosti opraveny podle Greenhouse-Geisserovy korekce.

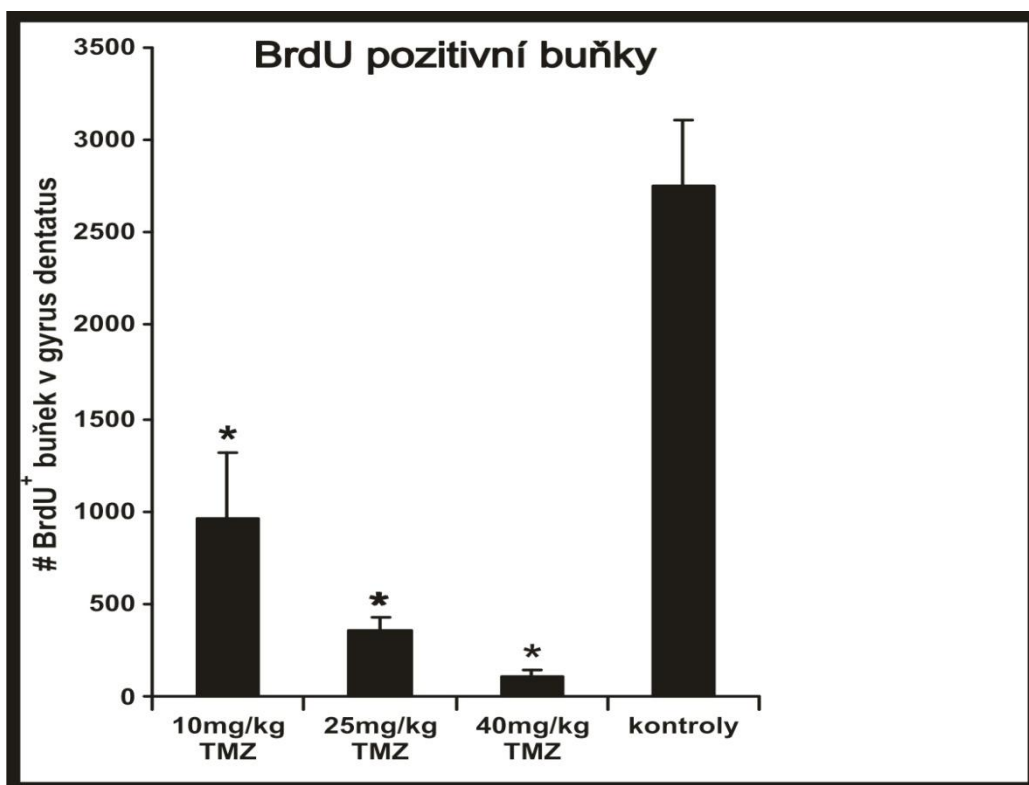
Data z odběrů krve, která nespadała do fyziologického rozmezí u potkana (fyziologické rozmezí hodnot z Laboratoře Freston), nebyla zahrnuta v analýze. To se týkalo především počtu trombocytů. Když se počet trombocytů pohyboval výrazně nad horní fyziologickou hodnotou, je pravděpodobné, že se do přístroje dostala ze vzorku sraženina. V opačném případě, když byl počet pod dolní fyziologickou hodnotou, byla

sraženina pravděpodobně ve vzorku, ale nebyla nasáta přístrojem. V případě potenciální sraženiny bylo zkontrolováno, jestli je hematokrit v jeho fyziologickém rozmezí, protože sraženina mohla kromě trombocytů obsahovat další krevní elementy. V případě, že hodnoty hematokritu byly výrazně pod fyziologickou hranicí, byla tato data odstraněna z celé analýzy krevních testů. V tomto souboru dat byl hematokrit stále ve fyziologickém rozmezí.

Výsledky

Vyhodnocení počtu BrdU-pozitivních buněk

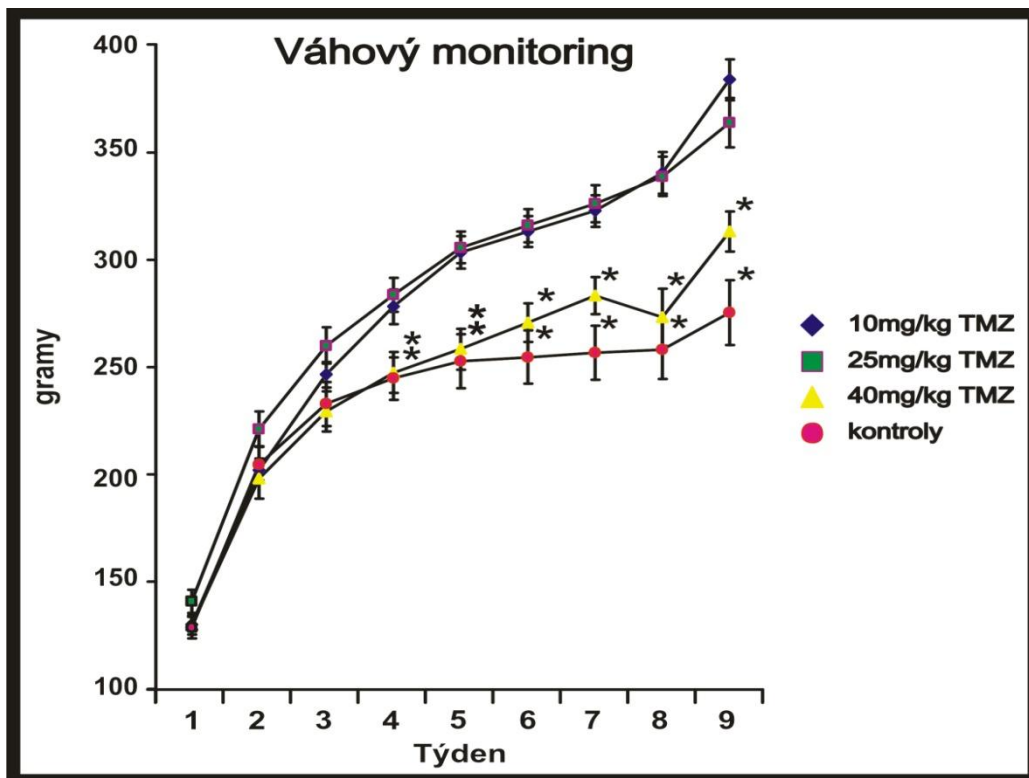
Po transformaci odmocněním data splňovala kritéria pro parametrický test s ohledem na normální rozdělení a homogenost rozptylů. Pro srovnání průměru mezi skupinami byla použita jednofaktorová ANOVA. Celkový test byl signifikantní ($F(3, 24) = 22,969$, $p < 0,001$). Hochbergovým GT2 *post hoc* testem bylo zjištěno, že je signifikantní rozdíl mezi kontrolní skupinou a všemi skupinami, kterým byl podáván TMZ (vše $p < 0,001$), a mezi 10mg/kg a 40mg/kg TMZ skupinou ($p < 0,05$). Rozdíl mezi 10mg/kg a 25 mg/kg TMZ skupinou nebyl signifikantní ($p = 0,297$) stejně jako rozdíl mezi 25mg/kg a 40mg/kg TMZ skupinou ($p = 0,622$). Grafické znázornění počtu BrdU pozitivních buněk v GD je v grafu č. 1.



Graf č. 1: Počet BrdU pozitivních buněk v GD. Hvězdičkou jsou označeny signifikantní rozdíly mezi experimentální a kontrolní skupinou.

Vyhodnocení monitorování váhy

Váha byla monitorována každý týden v stejný den. Tato data byly analyzovány pomocí dvoufaktorové ANOVY s opakovaným měřením. Během kontroly dat byla nalezena odlehlá hodnota v kontrolní skupině, kde váha zvířete byla 6.5x vyšší než směrodatná odchylka od průměru. Tato hodnota splňovala kritéria pro odlehlou hodnotu a toto zvíře bylo vyloučeno z následné váhové analýzy. Zvířata ve stejném věku mají velmi podobnou váhu, a v tomto případě došlo pravděpodobně k chybnému umístění staršího zvířete do skupiny. Po vyloučení tohoto zvířete měla data normální rozložení, a rozptyly mezi skupinami byly stejné. ANOVOu byl zjištěn signifikantní rozdíl mezi skupinami ($F(3,25) = 9,695, p < 0,001$). Efekt jednotlivých vážení byl signifikantní ($F(2,652, 66,297) = 1389,734, p < 0,001$), stejně jako interakce mezi váženími a skupinou ($F(7,956, 66,297) = 25,042, p < 0,001$). Plánovaný kontrast pro efekt času ukázal signifikantní rozdíl mezi po sobě jdoucími váženími pro všechny skupiny, což je v souladu s rychlým nárůstem hmotnosti u mladých zvířat. Plánované kontrasty na odhalení rozdílů po signifikantní interakci mezi skupinou a časem odhalily signifikantní rozdíly mezi všemi po sobě jdoucími váženími, mimo rozdílů mezi prvním a druhým týdnem. To je jednoduše vysvětlitelné tím, že potkani v prvních dvou týdnech nedostávali TMZ a proto nebyl důvod, aby se váhy mezi skupinami lišily. Signifikantní interakce v následujících týdnech odrážely stagnaci váhového přírůstku u skupin 25 a 40 mg/kg, a kontinuální nárůst váhy u skupiny 10 mg/kg a kontrolní skupiny. Analýza jednoduchých efektů odhalila, že do třetího týdne nebyl mezi skupinami rozdíl (druhý týden podávání TMZ). V čtvrtém týdnu se ale skupiny 25mg/kg a 40mg/kg signifikantně liší od kontrolní skupiny, a skupiny 10mg/kg (obě $p < 0.05$). Tento vzorec je stejný až do osmého týdne pokusu. V devátém týdnu se také signifikantně liší skupiny 25mg/kg a 40mg/kg mezi sebou ($p < 0.05$). Grafické znázornění hmotností v závislosti na čase je v grafu č. 2.



Graf č. 2: Znázornění závislosti váhové přírůstku na čase. Hvězdičkou jsou označeny signifikantní rozdíly mezi experimentální a kontrolní skupinou.

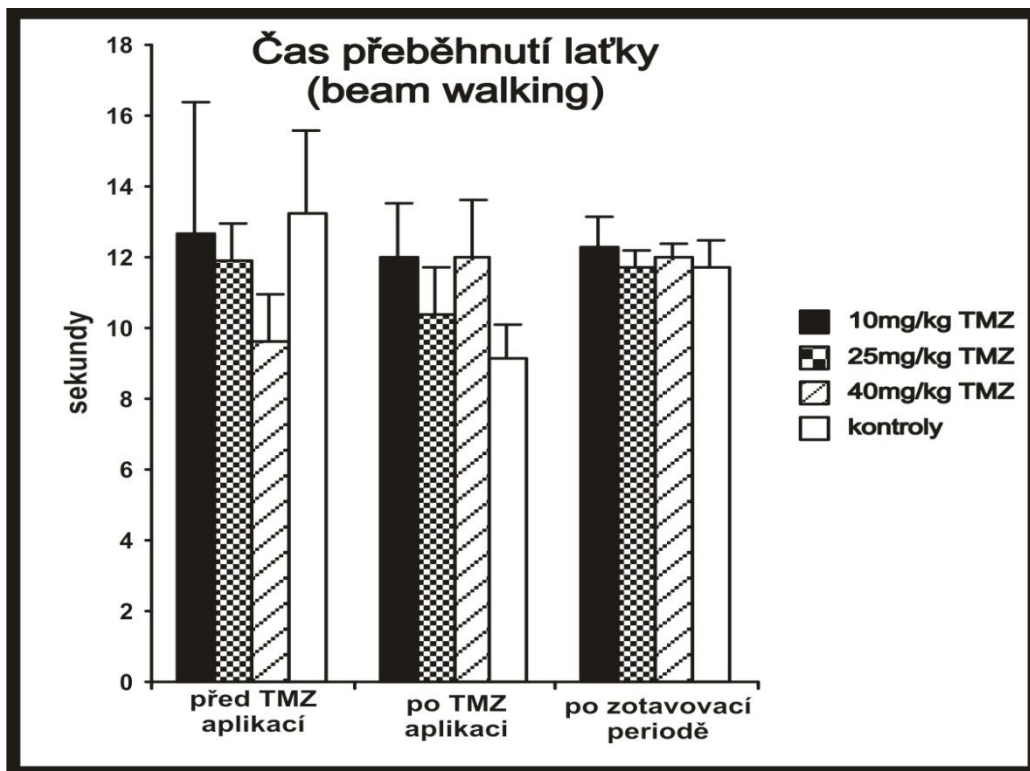
Vyhodnocení testu beam walking

V testu *beam walking* byl analyzován čas dosažení klece, počet sklouznutí z laťky a počet pádů. Data byla zprůměrována ze všech tří kol v průběhu jednoho sezení. Během experimentu byla provedena tři sezení, před aplikací TMZ, po aplikaci a po zotavovací periodě. Počty pádů z laťky nebyly analyzovány, protože k nim ani jednou nedošlo.

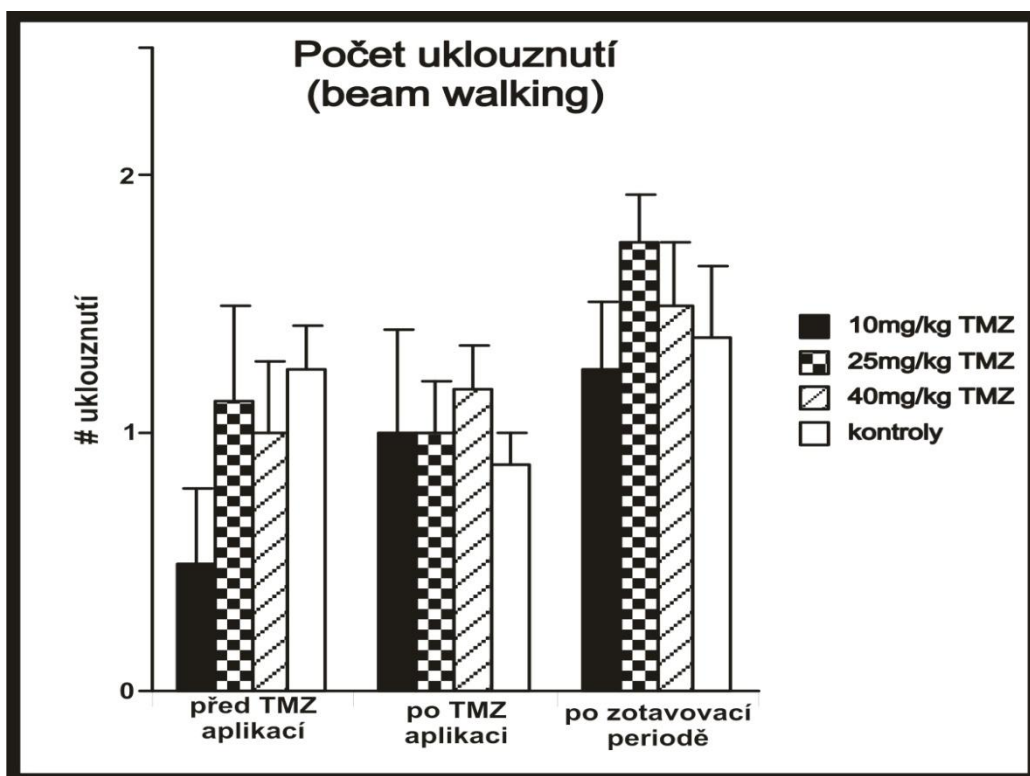
Pro analýzu času dosažení klece a počtu sklouznutí byla použita dvoufaktorová ANOVA s opakovaným měřením.

Data času dosažení klece byla recipročně transformována pro dosažení normálního rozložení. Předpoklad homogenity rozptylu nebyl splněn v sezení po zotavovací periodě, kde skupina 10 mg/kg měla vyšší rozptyl, než ostatní skupiny. Vzhledem k tomu, že velikosti skupin nebyli až tak rozdílné, předpokládali jsme, že ANOVA bude robustní i při nesplnění této podmínky. Dvoufaktorová ANOVA neodhalila žádný signifikantní efekt skupiny ($F(3,26) = 0,071$, $p = 0,975$), signifikantní efekt sezení $F(2,52) = 3,096$, $p = 0,54$, ani signifikantní efekt pro interakci mezi skupinou a sezením ($F(6,52) = 1,752$, $p = 0,128$). Tato data jsou graficky znázorněna na grafu č. 3.

Data z počtu sklouznutí neměla normální rozložení, a proto byl k jejich vyhodnocení použit jiný přístup. Data z každého sezení byla porovnána pomocí Kruskal-Wallisova neparametrického testu. Hladina signifikance byla upravena pomocí Boniferroniho korekce. Z Boniferroniho korekce vyplynula nová hladina významnosti 0.017 (0.05/3). Opakované použití neparametrického jednofaktorového testu má nevýhodu v tom, že nemáme k dispozici srovnání s opakovaným měřením. Pro analýzu rozdílů v senzomotorických schopnostech mezi skupinami to ale není zásadní. Výsledky ukázaly, že v sezeních není žádný signifikantní rozdíl mezi skupinami (sezení 1: $H(3) = 6,949$, $p = 0,074$; sezení 2: $H(3) = 3,580$, $p = 0,310$; sezení 3: $H(3) = 4,988$, $p = 0,173$). Tato data jsou graficky znázorněna v grafu č. 4.



Graf č. 3: Znárodnění času přeběhnutí laťky v testu beam walking.

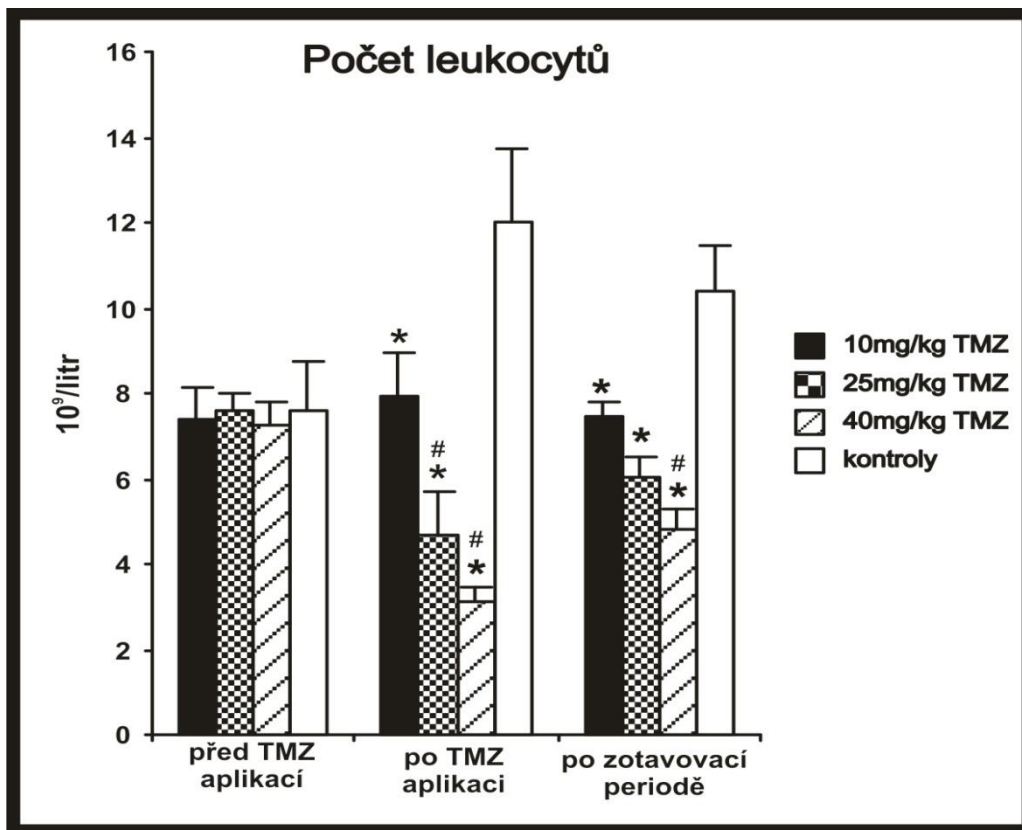


Graf č. 4: Znárodnění počtu uklouznutí na laťce v testu beam walking.

Vyhodnocení krevních testů

Počet leukocytů

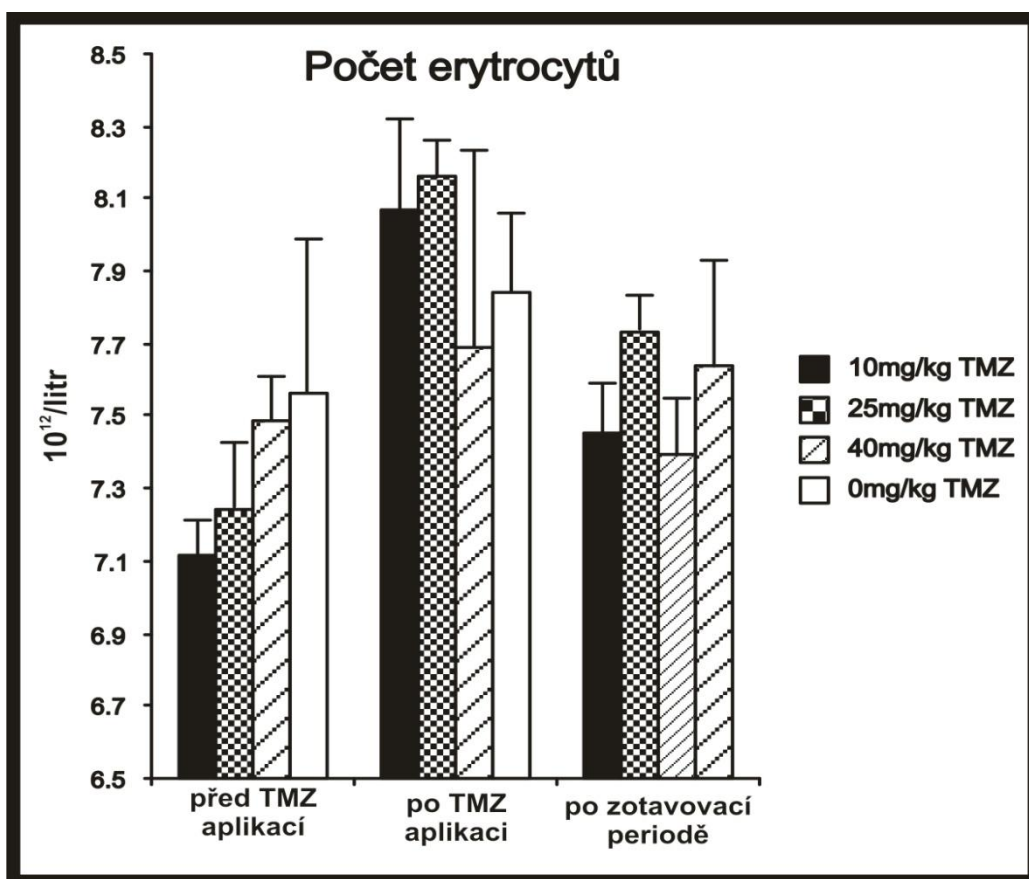
Počet leukocytů byl transformován odmocněním, aby splňoval kritérium homogenního rozptylu. dvoufaktorová ANOVA s opakovaným měřením odhalila signifikantní efekt skupiny ($F(3,23) = 16,085$, $p < 0,001$). Hochbergův GT2 post hoc test ukázal signifikantní rozdíl mezi kontrolní a 25mg/kg TMZ ($p < 0,05$); kontrolní skupinou a 40mg/kg TMZ skupinou ($p < 0,001$) a mezi skupinami 10mg/kg a 40mg/kg TMZ ($p < 0,05$). Na druhou stranu zde nebyl signifikantní rozdíl mezi kontrolní a 25mg/kg TMZ skupinou ($p < 0,05$); kontrolní a 40mg/kg TMZ ($p < 0,001$) a mezi skupinami 10mg/kg a 40mg/kg TMZ ($p < 0,05$). ANOVA neukázala signifikantní efekt odběrů ($F(2,46) = 1,263$, $p = 0,293$) ale ukázala signifikantní interakci mezi odběrem a skupinou ($F(6,46) = 6,852$, $p < 0,001$). Konkrétně plánované kontrasty pro interakci ukázaly signifikantní rozdíl mezi prvním a druhým odběrem ($p < 0,001$) a mezi prvním a třetím ($p < 0,001$). Analýza jednoduchých efektů ukázala, že mezi skupinami nebyl rozdíl před aplikací TMZ. Po aplikaci TMZ byl signifikantní rozdíl mezi kontrolní skupinou a všemi skupinami, kterým bylo podávané TMZ (pro všechny $p < 0,001$), a také mezi dávkou 10mg/kg a vyššími dávkami (obě $p < 0,05$). Rozdíl mezi skupinami 25mg/kg a 40mg/kg v počte leukocytů nebyl ($p = 0,307$). Tyto rozdíly zůstali nezměněné i po zotavovací periodě, kromě toho že zanikl rozdíl mezi skupinami 10mg/kg a 25mg/kg ($p = 0,110$). Průměry skupin ale naznačují (viz. Graf č. 5) že tyto rozdíly, zejména bezprostředně po aplikaci TMZ, mohli být způsobené spíš zvýšením leukocytů u kontrolní skupiny oproti ostatním skupinám. Je možné, že ve zvířinci proběhla slabá nedetekovatelná infekce, nebo zvířata měli zvýšenou imunitní odpověď na krmení intragastrickou sondou. Je teda možné, že reální hodnoty leukocytů u zvířat, kterým byl podáván TMZ, by byly ještě nižší. Grafické znázornění počtu leukocytů je v grafu č. 5.



Graf č. 5: Znárodnění počtu leukocytu ve třech časových bodech. Hvězdičkou jsou označeny signifikantní rozdíly mezi experimentální a kontrolní skupinou. Křížkem jsou označeny signifikantní rozdíly mezi skupinou 10 mg/kg a vyššími dávkami 25 a 40 mg/kg.

Počet erytrocytů

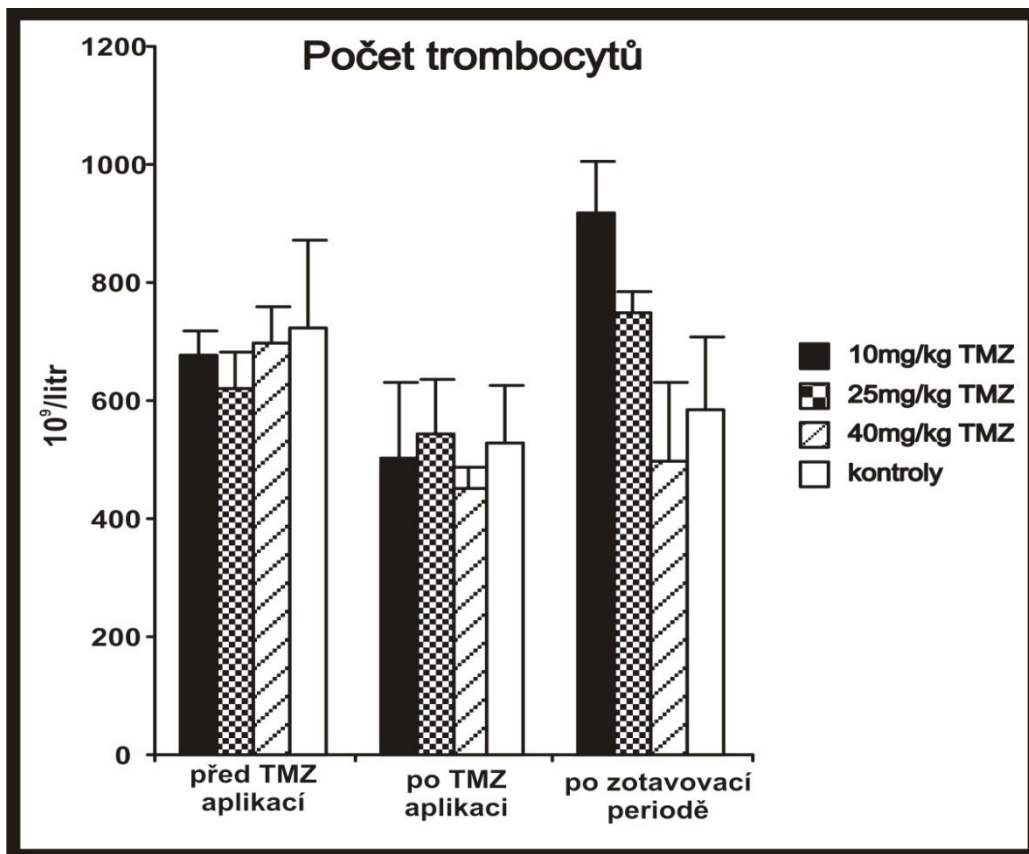
Počty erytrocytů byly analyzovány dvoufaktorovou ANOVOU s opakovaným měřením. Dvě odlehlé hodnoty: jedna z druhého odběru u skupiny 25 mg/kg TMZ a druhá ze stejné skupiny u třetího odběru, byly nahrazeny hodnotou vzdálenou dvě směrodatné odchylky od průměru (původně tyto hodnoty byly vzdáleny 5 a 7 směrodatných odchylek od průměru). Data byla normálně rozložena, ale žádnou transformací nebylo možné opravit nehomogenní rozptyly mezi skupinami v odběrech před TMZ a po podání TMZ. Analýza rozptylu ukázala signifikantní efekt odběru $F(2, 46) = 8,942$, $p < 0,001$, ale žádný efekt skupiny ($p = 0,881$) nebo interakci mezi odběrem a skupinou ($p = 0,246$). Grafické znázornění počtu leukocytů je v grafu č. 5.



Graf č. 6: Znázornění počtu erytrocytů ve třech časových bodech. Nebyly zde žádné signifikantní rozdíly.

Počet trombocytů

Počty trombocytů nemohly být opraveny žádnou transformací, tak aby vykazovaly normální rozložení nebo homogenní rozptyl. Ke zjištění rozdílu mezi skupinami byl proto použit neparametrický Kruskal-Wallisův test. Z Boniferroniho korekce nám vyplynula nová hladina významnosti 0,017. Test ukázal, že zde není žádný rozdíl mezi počty trombocytů u prvního ($H(3) = 1,151$, $p = 0,765$), nebo u druhého odběru ($H(3) = 3,484$, $p = 0,323$). Rozdíl mezi skupinami byl signifikantní u třetího odběru ($H(3) = 8,011$, $p < 0,05$). Opakovaný Mann-Whitneyho test byl použit pro detekci rozdílů jako *post hoc* test. Znovu zde byla použita Boniferroniho korekce, takže výsledky byly hodnoceny na hladině významnosti 0.017 (aby snížená hladina významnosti nebyla příliš striktní byly testovány pouze tři *a priori* vytvořené hypotézy – jestli se skupiny, kterým bylo podávané TMZ liší od kontrolní skupiny). Nebyl zde nalezen žádný signifikantní rozdíl mezi kontrolní a 10mg/kg TMZ skupinou ($p = 0,064$), mezi kontrolní a 25mg/kg TMZ skupinou ($p = 0,401$) a také ne mezi kontrolní a 40 mg/kg TMZ skupinou ($p = 0,662$). Pravděpodobně, Boniferroniho kritérium bylo stále příliš striktní, aby odhalilo signifikantní efekt v *post hoc* testu, který byl indikován signifikantním Kruskal-Wallisovým testem. Nicméně, jak je patrné z grafu tyto rozdíly v počte trombocytů by bylo obtížné vysvětlit pomocí měnící se dávky TMZ. Počet trombocytů je graficky znázorněn v grafu č. 7.



Graf č. 6: Znázornění počtu trombocytů ve třech časových bodech. Nebyly zde žádné signifikantní rozdíly.

Diskuze

Temozolomid je cytostatikum, které se nově používá k experimentálním redukcí neurogeneze. Tak jako jiné cytostatika má vedlejší účinky, které mohou ovlivnit celkový zdravotní stav zvířat. Vzhledem k tomu, že nejčastěji je neurogeneze testována v souvislosti s vlivem na behaviorální úlohy, nelze opomenout vliv cytostatika na zdravotní stav zvířat. Temozolomid byl poprvé použit na redukcí neurogeneze u myši, kde byl také monitorován efekt TMZ na zdravotní stav zvířat (Garthe et al. 2009). U potkanů se TMZ také používá na redukcí neurogeneze ale zatím nebyla zjišťována optimální dávka vzhledem k vedlejším účinkům na fyziologický stav. V jedné studii byl použit stejný protokol jako u myši (Nokia et al. 2012), a v druhé studii (Rangel et al. 2014), byla použita nižší dávka (12,5mg/kg) která signifikantně redukovala neurogenezi (40%); ale v této studii byla z kontrolních testů monitorována pouze explorační aktivita.

Naše dávková studie ukázala i u nejnižší dávky signifikantní snížení počtu BrdU pozitivních buněk o 64% (u vyšších dávek to bylo pro 25mg/kg 75% a u 40 mg/kg 90%) tyto výsledky se shodují s mírou redukce neurogeneze u myši (Garthe et al. 2009; Martinez-Canabal et al. 2013). I když s vyššími dávkami je vidět další pokles BrdU pozitivních buněk tento trend není statisticky významný. Námi používaná nejnižší dávka (10mg/kg) je nejbližší dávce 12,5 mg/kg, kde byl zaznamenán pokles nových buněk o 40% (Rangel et al. 2014). Námi zaznamenán procentuální úbytek nových neuronů je vyšší jako v jejich studii, což mohlo být způsobeno odlišnou aplikací TMZ. V našem případě byla aplikace TMZ prováděna intragastrickou sondou, v druhém případě bylo TMZ aplikováno intraperitoneální injekcí. Aplikace intragastrickou sondou nám byla doporučena spolupracujícím pracovištěm (*Center for Regenerative Therapies*; prof.Kempermann) jako efektivnější a šetrnější vůči organismu. Také při perorálním podání dochází ke 100% vstřebání přes trávicí trakt do krevního oběhu a následně přes HEB do nervové tkáně (Agarwala a Kirkwood 2000). V naší studii byl TMZ rozpuštěn v okyseleném fyziologickém roztoku, abychom zabránili jeho konverzi na aktivní formu MTIC, která efektivně neprostupuje přes HEB a má krátký poločas rozpadu (Agarwala a Kirkwood 2000). V studii Rangala (2014) a v ostatních studiích byl TMZ rozpouštěn v neutrálním pH, což mohlo způsobit jeho konverzi na aktivní metabolit MTIC ještě před samotnou aplikací a v důsledku toho docházelo pouze k částečnému prostupu přes HEB. To by mohlo být důvodem proč v druhé studii na potkanech i při použití vyšší dávky 25mg/kg TMZ došlo k nižší redukcí neurogeneze (34%) (Nokia et al. 2012). Jak již bylo zmíněno,

redukce neurogeneze v naší studii u dávky 25mg/kg byla srovnatelná se studii u myši (Martinez-Canabal et al. 2013; Garthe et al. 2009) to mohlo být způsobeno právě efektivnějším podáním TMZ.

V souladu s předešlými studii jsme nepozorovali žádné narušení senzomotorických schopností u žádné z použitých dávek. Senzomotorické funkce byly testovány pomocí testu *beam walking*. Naopak u monitorování váhy, kde byla hmotnost signifikantně snížena u dávek 25 a 40 mg/kg oproti kontrolní skupině dochází k rozporu s předešlými studii, kde není u myši při dávce 25 mg/kg pozorován žádný váhový úbytek (Garthe et al. 2009; Niibori et al. 2012). V ostatních studiích, kde byl TMZ používán k redukcí neurogeneze, nebylo uvedeno měření hmotnosti.

Podobně jako Garthe (2009) u myši jsme prováděli stanovení počtu krevních elementů. Stanovovali jsme počet lymfocytů, erytrocytů a trombocytů jako indikátor hematopoézy pro zjištění účinnosti cytostatika a zdravotního stavu zvířat. Krevní testy byly prováděny ve třech důležitých časových bodech. Poprvé před aplikací TMZ, kdy byla zvířata habituována a handlována, podruhé hned po skončení aplikace TMZ, kdy jsme očekávaly snížení počtu krevních elementů v důsledku působení cytostatika. Poslední krevní testy byly provedeny po zotavovací periodě, která trvala tři týdny. V tomto čase je důležité začít s behaviorálními testy, protože nové neurony, které začnou vznikat po ukončení aplikace TMZ, ještě nejsou funkčně zralé a neinkorporují se do stávající neuronální sítě (k tomu dochází po čtyřech týdnech od jejich narození (Schmidt-Hieber et al. 2004). Ve všech skupinách s TMZ jsme našli signifikantně nižší počty leukocytů oproti kontrolní skupině hned po podání TMZ, a zůstali nižší i po zotavovací periodě. Ve studii Gartheho (2009) se u myši počet leukocytů strmě snížil, avšak po čtyřech týdnech došlo k návratu na původní hodnoty. Tento trend jsme pozorovaly i v našem experimentu avšak po kratší zotavovací periodě se naše hodnoty nevrátily na původní. Je možné, že kdybychom zotavovací periodu prodloužili o týden, došli bychom k podobnému výsledku.

Počet erytrocytů zůstával stabilní po celou dobu experimentu, co naznačuje, že aplikace TMZ pravděpodobně nemá efekt na jejich počet. Toto zjištění je v souladu se studii (Garthe et al. 2009).

Závěrem můžeme říci, že počty leukocytů u každé experimentální skupiny byli nižší jako u kontrolních zvířat po třítydenní zotavovací periodě. Při zohlednění možné probíhající infekce nebo zvýšené imunitní odpovědi po aplikaci TMZ intragastrickou

sondou je možné, že počty leukocytů byly ve skupinách, kterým bylo podávané TMZ, zkreslené. Vzhledem k randomizovanému designu studie předpokládáme, že kdyby zůstali hodnoty leukocytů u kontrolní skupiny neměnné, jako je tomu ve studii Gartheho (2009), byli by hodnoty leukocytů ve skupinách, kterým bylo podávané TMZ ještě nižší. V počtu trombocytů a erytrocytů nebyl pozorován žádný signifikantní rozdíl mezi skupinami.

Limitacemi této studie je malá velikost testovaného souboru - v případě měření většího množství parametrů by bylo vhodnější použít skupiny o větším počtu zvířat. Zajímavé by mohlo být měření více parametrů odrážejících zdravotní stav zvířat, např. lokomoční aktivita, explorativní chování, nebo aktivace mikroglíí. Další limitací studie je, že se uprostřed experimentu objevila mírná infekce pravděpodobně způsobená nedetekovanou nákazou ve zvěřinci nebo imunitní reakci po krmení intagastrickou sondou a došlo k ovlivnění výsledků počtu leukocytů. Kdyby počet leukocytů nebyl zkreslen touto komplikací tak by pravděpodobně nedošlo ke zvýšení leukocytů u kontrolních zvířat. Také v samotném měření krevních elementů se občas mohly objevit krevní sraženiny, které mohou ovlivnit počty krevních elementů.

Základním předpokladem pro experimentální použití zvířat na behaviorální testy je jejich stejný fyziologický stav jako u kontrolní skupiny. Proto je důležité, aby podávaná látka nenarušovala jejich zdravotní stav, který by se mohl projevit jako deficit v behaviorálních úlohách a tím pádem by mohlo dojít k nesprávné interpretaci výsledků. V případě zkoumání neurogeneze, kdy je nejčastěji zkoumán její vliv na určité hipokampální funkce, které se projevují na behaviorální úrovni, je tento předpoklad nezbytný. Jednoduše řečeno: když se zvířata necítí dobře, nebudou podávat dobré výkony. Z našeho experimentu vyplývá, že nejspolehlivějším důkazem o zdravotním stavu zvířat je jejich váhový přírůstek, nebo úbytek. Naproti tomu použití krevních testů se v našem případě neukázalo být šťastným řešením. Výsledky krevních testů měly velký rozptyl a pravděpodobně byly narušeny vedlejšími faktory, jako je mírný stres a infekce.

Podle tohoto experimentu můžeme říci, že jako optimální dávka pro redukcii neurogeneze u potkanů kmene Long-Evans se jeví dávka 10 mg/kg TMZ. Za prvé, tato dávka signifikantně snížila neurogenezi oproti kontrolní skupině a zároveň žádná z vyšších dávek nebyla signifikantně rozdílná od této dávky. Za druhé, tato dávka jako jediná nezpůsobila signifikantní snížení váhy. Také dávka 10mg/kg způsobila nejnižší snížení počtu leukocytů (i když ne signifikantně). Na druhou stranu ani u vyšších dávek nebyl

podle *testu beam walking* nalezen senzomotorický deficit. V závěru, dávka 10mg/kg měla nejmenší dopad na fyziologický stav zvířat, a přesto redukce neurogeneze, minimálně podle statistických kritérií, byla stejná jako u vyšších, více toxických dávek.

Závěr

Tato diplomová práce měla za cíl, zjistit optimální dávku cytostatika TMZ. Tato dávka by měla účinně redukovat neurogenezi v dospělém mozku potkana a mít minimální dopad na zdravotní stav zvířat. TMZ bylo aplikováno ve třech různých dávkách (10, 25, 40 mg/kg). Zdravotní stav a účinnost TMZ byly v průběhu experimentu kontrolovány pomocí krevních testů, senzomotorického testu (beam walking) a sledováním váhy. Buněčná proliferace v GD byla snížena u skupin s TMZ 10 mg/kg o 64%, u 25 mg/kg o 75% a u 40 mg/kg o 90%. Výsledky testu beam walking neprokázaly žádný senzomotorický deficit u žádné z testovaných skupin. Krevní odběry byly provedeny třikrát před aplikací TMZ, po aplikaci TMZ a za další tři týdny po tzv. zotavovací periodě. Výsledky krevních testů neukázaly žádný rozdíl v počtu trombocytů a erytrocytů mezi kontrolní skupinou a skupinami s aplikací TMZ. Pouze u leukocytů byl snížen jejich počet mezi kontrolní skupinou a všemi experimentálními u odběru po aplikaci TMZ a u odběru po zotavovací periodě. U těchto odběrů byl také snížen počet leukocytů u skupin 25 a 40 mg/kg TMZ oproti 10 mg/kg TMZ. Sledování váhy ukázalo na stagnaci váhové přírůstku u skupin 25 a 40 mg/kg TMZ oproti kontrolní skupině a skupině s 10 mg/kg TMZ.

Z těchto výsledků nám jako optimální vplynula dávka 10 mg/kg, která signifikantně snižuje neurogenezi o 64% oproti kontrolní skupině. Také váhový přírůstek u této skupiny je srovnatelný s kontrolní skupinou a nedochází k jeho stagnaci jako u skupin s vyšší dávkou.

Zavedení této metody, může pomoci k objasnění funkcí neurogeneze v dospělém mozku, které je možné testovat na behaviorální úrovni. Studium na potkanech má v behaviorálních experimentech zásadní místo, a proto je důležité jim věnovat stejnou pozornost jako myším. Aby zvířata mohla být srovnávána v behaviorálních testech měl by být jejich zdravotní stav srovnatelný, pokud by dávka TMZ byla zbytečně vysoká mohla by se přes zhoršený zdravotní stav projevit jako kognitivní deficit. Na druhou stranu ani vyšší dávky 25 mg/kg a 40 mg/kg nezpůsobily deficit v senzomotorických funkcích, a proto by teoreticky mohly být použity v jednodušších behaviorálních úlohách.

Seznam použité literatury:

- Agarwala, S. & Kirkwood, J., 2000. Temozolomide, a Novel Alkylating Agent with Activity in the Central Nervous System, May Improve the Treatment of Advanced Metastatic Melanoma. *The Oncologist*, 5(2), pp.144–151.
- Aimone, J., Deng, W. & Gage, F., 2010. Adult neurogenesis: integrating theories and separating functions. *Trends in cognitive sciences*, 14(7), pp.325–337.
- Altman, J., 1969. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology*, 137(4), pp.433–457.
- Altman, J. & Das, G.D., 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *The Journal of comparative neurology*, 124(3), pp.319–35.
- Amaral, D.G. & Witter, M.P., 1989. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, 31(3), pp.571–591.
- Attardo, A. et al., 2010. Tis21 expression marks not only populations of neurogenic precursor cells but also new postmitotic neurons in adult hippocampal neurogenesis. *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 20(2), pp.304–14.
- Bannigan, J.G., 1985. The effects of 5-bromodeoxyuridine on fusion of the cranial neural folds in the mouse embryo. *Teratology*, 32(2), pp.229–39.
- Begg, A.C. et al., 2000. Use of thymidine analogues to indicate vascular perfusion in tumours. *British journal of cancer*, 83(7), pp.899–905.
- Beltz, B.S. & Sandeman, D.C., 2003. Regulation of life-long neurogenesis in the decapod crustacean brain. *Arthropod Structure and Development*, 32(1), pp.39–60.
- Ben-Ari, Y., 2002. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nature reviews. Neuroscience*, 3(9), pp.728–739.
- Bessis, A. et al., 2007. Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *GLIA*, 55(3), pp.233–238.
- Biebl, M. et al., 2000. Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neuroscience letters*, 291(1), pp.17–20.
- Bird, C.M. & Burgess, N., 2008. The hippocampus and memory: insights from spatial processing. *Nature reviews. Neuroscience*, 9(3), pp.182–94.
- Blakemore, W.F. & Jolly, R.D., 1972. The subependymal plate and associated ependyma in the dog. An ultrastructural study. *Journal of neurocytology*, 1(1), pp.69–84.

- Bower, M. et al., 1997. Multicentre CRC phase II trial of temozolomide in recurrent or progressive high-grade glioma. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 40(6), pp.484–488.
- Brandt, M.D. et al., 2003. Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 24(3), pp.603–613.
- Cacci, E., Claassen, J.H. & Kokaia, Z., 2005. Microglia-derived tumor necrosis factor-?? exaggerates death of newborn hippocampal progenitor cells in vitro. *Journal of Neuroscience Research*, 80(6), pp.789–797.
- Cameron, H.A. & McKay, R.D.G., 2001. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *Journal of Comparative Neurology*, 435(4), pp.406–417.
- Cao, L. et al., 2004. VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. *Nature genetics*, 36(8), pp.827–835.
- Cayre, M. et al., 2007. Understanding the regulation and function of adult neurogenesis: Contribution from an insect model, the house cricket. In *Chemical Senses*. pp. 385–395.
- Cimadevilla, J.M. et al., 2001. Inactivating one hippocampus impairs avoidance of a stable room-defined place during dissociation of arena cues from room cues by rotation of the arena. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(6), pp.3531–6.
- Clelland, C.D. et al., 2009. A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science (New York, N.Y.)*, 325(5937), pp.210–3.
- Corotto, F.S., Henegar, J.A. & Maruniak, J.A., 1993. Neurogenesis persists in the subependymal layer of the adult mouse brain. *Neuroscience letters*, 149(2), pp.111–4.
- Creer, D.J. et al., 2010. Running enhances spatial pattern separation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(5), pp.2367–72.
- Cutsuridis, V. et al., 2010. *Hippocampal Microcircuits: A Computational Modelers' Resource Book*, Springer.
- Czemirawski, J., Yoon, T. & Otto, T., 2009. Dissociating space and trace in dorsal and ventral hippocampus. *Hippocampus*, 19(1), pp.20–32.
- Das, G.D. & Altman, J., 1971. Postnatal neurogenesis in the cerebellum of the cat and tritiated thymidine autoradiography. *Brain research*, 30(2), pp.323–30.
- Doetsch, F., 2003. A niche for adult neural stem cells. *Current Opinion in Genetics Development*, 13(5), pp.543–550.
- Dudai, Y., 2004. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annual review of psychology*, 55, pp.51–86.

- Dupret, D. et al., 2005. Methylazoxymethanol acetate does not fully block cell genesis in the young and aged dentate gyrus. *The European journal of neuroscience*, 22(3), pp.778–83.
- Eichenbaum, H., 2004. Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron*, 44(1), pp.109–20.
- Eichenbaum, H. & Cohen, N.J., 2004. *From Conditioning to Conscious Recollection: Memory systems of the brain*, New York: Oxford University Press.
- Ekdahl, C.T. et al., 2001. Caspase inhibitors increase short-term survival of progenitor-cell progeny in the adult rat dentate gyrus following status epilepticus. *European Journal of Neuroscience*, 14(6), pp.937–945.
- Eriksson, P.S. et al., 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature medicine*, 4(11), pp.1313–7.
- Ernst, A. et al., 2014. Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell*, 156(5), pp.1072–83.
- Fabel, K. et al., 2003. VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*, 18(10), pp.2803–2812.
- Fasolo, A., Peretto, P. & Bonfanti, L., 2002. Cell migration in the rostral migratory stream. *Chemical senses*, 27(6), pp.581–582.
- Filippov, V. et al., 2003. Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 23(3), pp.373–382.
- Font, E. et al., 2001. Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult reptilian brain. *Brain, behavior and evolution*, 58(5), pp.276–95.
- Freese, A. et al., 1994. The application of 5-bromodeoxyuridine in the management of CNS tumors. *Journal of neuro-oncology*, 20(1), pp.81–95.
- Fuchs, E., Flugge, G. & Czeh, B., 2006. Remodeling of neuronal networks by stress. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 11, pp.2746–2758.
- Fukuda, S. et al., 2003. Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(28), pp.9357–66.
- Fyhn, M. et al., 2004. Spatial representation in the entorhinal cortex. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5688), pp.1258–64.
- Garcia, a D.R. et al., 2004. GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nature neuroscience*, 7(11), pp.1233–41.

- Garthe, A., Behr, J. & Kempermann, G., 2009. Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PloS one*, 4(5), p.e5464.
- Ge, S. et al., 2006. GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature*, 439(7076), pp.589–593.
- Gemma, C. et al., 2007. Blockade of caspase-1 increases neurogenesis in the aged hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, 26(10), pp.2795–2803.
- Gheusi, G. et al., 2000. Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(4), pp.1823–1828.
- Goldman, S. a & Nottebohm, F., 1983. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(8), pp.2390–4.
- Gould, E., Reeves, a J., et al., 1999. Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(9), pp.5263–7.
- Gould, E., Tanapat, P., et al., 1999. Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning. *Trends in cognitive sciences*, 3(5), pp.186–192.
- Gratzner, H.G., 1982. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science (New York, N.Y.)*, 218(4571), pp.474–475.
- Guidi, S. et al., 2005. Postnatal neurogenesis in the dentate gyrus of the guinea pig. *Hippocampus*, 15(3), pp.285–301.
- Hafting, T. et al., 2005. Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature*, 436(7052), pp.801–6.
- Hastings, N.B. & Gould, E., 1999. Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *Journal of Comparative Neurology*, 413(1), pp.146–154.
- Hawken, P.A.R. et al., 2009. Rapid induction of cell proliferation in the adult female ungulate brain (*Ovis aries*) associated with activation of the reproductive axis by exposure to unfamiliar males. *Biology of reproduction*, 80(6), pp.1146–51.
- Hayes, N.L. & Nowakowski, R.S., 2000. Exploiting the dynamics of S-phase tracers in developing brain: interkinetic nuclear migration for cells entering versus leaving the S-phase. *Developmental neuroscience*, 22(1-2), pp.44–55.
- Hellsten, J. et al., 2004. Electroconvulsive seizures induce endothelial cell proliferation in adult rat hippocampus. *Biological Psychiatry*, 55(4), pp.420–427.

- Hernández-Rabaza, V. et al., 2009. Inhibition of adult hippocampal neurogenesis disrupts contextual learning but spares spatial working memory, long-term conditional rule retention and spatial reversal. *Neuroscience*, 159(1), pp.59–68.
- Hopewell, J.W., 1979. Late radiation damage to the central nervous system: a radiobiological interpretation. *Neuropathology and applied neurobiology*, 5(5), pp.329–43.
- Hoshino, T. et al., 1986. S-phase fraction of human brain tumors in situ measured by uptake of bromodeoxyuridine. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 38(3), pp.369–374.
- Hüttmann, K. & Sadgrove, M., 2003. Seizures preferentially stimulate proliferation of radial glia-like astrocytes in the adult dentate gyrus: functional and immunocytochemical analysis. *European Journal of Neuroscience*, 18(10), 2769–2778.
- Cho, J. & Sharp, P.E., 2001. Head direction, place, and movement correlates for cells in the rat retrosplenial cortex. *Behavioral neuroscience*, 115(1), pp.3–25.
- Imayoshi, I. et al., 2008. Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nature Neuroscience*, 11(10), pp.1153–1161.
- Jessberger, S. et al., 2009. Dentate gyrus-specific knockdown of adult neurogenesis impairs spatial and object recognition memory in adult rats. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 16(2), pp.147–54.
- Jessberger, S. et al., 2005. Seizures induce proliferation and dispersion of doublecortin-positive hippocampal progenitor cells. *Experimental Neurology*, 196(2), pp.342–351.
- Jin, K. et al., 2002. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(18), pp.11946–11950.
- Johnston, M. V & Coyle, J.T., 1979. Histological and neurochemical effects of fetal treatment with methylazoxymethanol on rat neocortex in adulthood. *Brain research*, 170(1), pp.135–155.
- Jung, M.W. & McNaughton, B.L., 1993. Spatial selectivity of unit activity in the hippocampal granular layer. *Hippocampus*, 3(2), pp.165–182.
- Kempermann, G., 2003. Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development*, 130(2), pp.391–399.
- Kempermann, G. et al., 2004. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends in neurosciences*, 27(8), pp.447–52.
- Kempermann, G., Kuhn, H.G. & Gage, F.H., 1997. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, 386(6624), pp.493–495.
- Kesner, R.P., 2013. An analysis of the dentate gyrus function. *Behavioural brain research*, 254, pp.1–7.

- Kizil, C. et al., 2012. Adult neurogenesis and brain regeneration in zebrafish. *Developmental Neurobiology*, 72(3), pp.429–461.
- Knowles, W.D., 1992. Normal anatomy and neurophysiology of the hippocampal formation. *Journal of Clinical Neurophysiology*, 9(2), pp.252–263.
- Ko, H.-G. et al., 2009. Effect of ablated hippocampal neurogenesis on the formation and extinction of contextual fear memory. *Molecular brain*, 2, p.1.
- Kolb, B. et al., 1999. Embryonic and postnatal injections of bromodeoxyuridine produce age-dependent morphological and behavioral abnormalities. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(6), pp.2337–46.
- Kramer, J.H. et al., 1992. A prospective study of cognitive functioning following low-dose cranial radiation for bone marrow transplantation. *Pediatrics*, 90(3), pp.447–450.
- Kronenberg, G. et al., 2003. Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *The Journal of comparative neurology*, 467(4), pp.455–63.
- Kuhn, H.G. et al., 2005. Increased generation of granule cells in adult Bcl-2-overexpressing mice: A role for cell death during continued hippocampal neurogenesis. *European Journal of Neuroscience*, 22(8), pp.1907–1915.
- Kuhn, H.G., Dickinson-Anson, H. & Gage, F.H., 1996. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *Journal of Neuroscience*, 16(6), pp.2027–2033.
- Kunze, A. et al., 2006. Proliferative response of distinct hippocampal progenitor cell populations after cortical infarcts in the adult brain. *Neurobiology of disease*, 21(2), pp.324–32.
- Leutgeb, J.K. et al., 2007. Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5814), pp.961–6.
- Limoli, C.L. et al., 2004. Radiation response of neural precursor cells: linking cellular sensitivity to cell cycle checkpoints, apoptosis and oxidative stress. *Radiation research*, 161(1), pp.17–27.
- Lois, C. & Alvarez-Buylla, a, 1994. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5162), pp.1145–8.
- Lynch, T.P., Cass, C.E. & Paterson, A.R., 1977. Defective transport of thymidine by cultured cells resistant to 5-bromodeoxyuridine. *Journal of supramolecular structure*, 6(3), pp.363–374.
- Manns, J.R. & Eichenbaum, H., 2006. Evolution of declarative memory. *Hippocampus*, 16(9), pp.795–808.

- Markakis, E.A. & Gage, F.H., 1999. Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. *The Journal of comparative neurology*, 406(4), pp.449–60.
- Martinez-Canabal, A. et al., 2013. Age-dependent effects of hippocampal neurogenesis suppression on spatial learning. *Hippocampus*, 23(1), pp.66–74.
- Matsushima, T. et al., 1979. Mutagenicity of the naturally occurring carcinogen cycasin and synthetic methylazoxymethanol conjugates in *Salmonella typhimurium*. *Cancer research*, 39(9), pp.3780–3782.
- Mizumatsu, S. et al., 2003a. Extreme Sensitivity of Adult Neurogenesis to Low Doses of Extreme Sensitivity of Adult Neurogenesis to Low Doses of X-Irradiation 1. , pp.4021–4027.
- Mizumatsu, S. et al., 2003b. Extreme sensitivity of adult neurogenesis to low doses of X-irradiation. *Cancer research*, 63(14), pp.4021–7.
- Monje, M.L. et al., 2002. Irradiation induces neural precursor-cell dysfunction. *Nature medicine*, 8(9), pp.955–962.
- Monje, M.L., Toda, H. & Palmer, T.D., 2003. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5651), pp.1760–1765.
- Morris, S.M., 1991. The genetic toxicology of 5-bromodeoxyuridine in mammalian cells. *Mutation research*, 258(2), pp.161–88.
- Moser, E., Moser, M.B. & Andersen, P., 1993. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 13(9), pp.3916–3925.
- Mulders, W.H., West, M.J. & Slomianka, L., 1997. Neuron numbers in the presubiculum, parasubiculum, and entorhinal area of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 385(1), pp.83–94.
- Nakashiba, T. et al., 2012. Young dentate granule cells mediate pattern separation, whereas old granule cells facilitate pattern completion. *Cell*, 149(1), pp.188–201.
- Newlands, E.S. et al., 1997. Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer treatment reviews*, 23(1), pp.35–61.
- Newlands, E.S. et al., 1996. The Charing Cross Hospital experience with temozolomide in patients with gliomas. *European Journal of Cancer Part A*, 32(13), pp.2236–2241.
- Niibori, Y. et al., 2012. Suppression of adult neurogenesis impairs population coding of similar contexts in hippocampal CA3 region. *Nature communications*, 3, p.1253.

- Nokia, M.S., Anderson, M.L. & Shors, T.J., 2012. Chemotherapy disrupts learning, neurogenesis and theta activity in the adult brain. *The European journal of neuroscience*, 36(11), pp.3521–30.
- Nowakowski, R.S., Lewin, S.B. & Miller, M.W., 1989. Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *Journal of neurocytology*, 18(3), pp.311–318.
- O'Keefe, J. & Nadel, L., 1978. *Hippocampus as a cognitive map*, London: Clarendon press.
- O'Keefe, J. & Dostrovsky, J., 1971. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain research*, 34(1), pp.171–5.
- O'Reilly, R.C. & McClelland, J.L., 1994. Hippocampal conjunctive encoding, storage, and recall: avoiding a trade-off. *Hippocampus*, 4(6), pp.661–82.
- O'Reilly, S.M. et al., 1993. "Temozolomide: a new oral cytotoxic chemotherapeutic agent with promising activity against primary brain tumours." *European Journal of Cancer* 29.7 (1993): 940-942.
- Palmer, T.D., 2002. Adult neurogenesis and the vascular niche. *Neuron*, 34(6), pp.856–858.
- Palmer, T.D., Willhoite, A.R. & Gage, F.H., 2000. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *Journal of Comparative Neurology*, 425(4), pp.479–494.
- Parent, J.M. et al., 1999. Inhibition of dentate granule cell neurogenesis with brain irradiation does not prevent seizure-induced mossy fiber synaptic reorganization in the rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(11), pp.4508–4519.
- Patel, M. et al., 2003. Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of intravenous temozolomide in non-human primates. *Journal of neuro-oncology*, 61(3), pp.203–7.
- Phillips, W.A. & Silverstein, S.M., 2003. Convergence of biological and psychological perspectives on cognitive coordination in schizophrenia. *The Behavioral and brain sciences*, 26(1), pp.65–82; discussion 82–137.
- Plümpe, T. et al., 2006. Variability of doublecortin-associated dendrite maturation in adult hippocampal neurogenesis is independent of the regulation of precursor cell proliferation. *BMC neuroscience*, 7, p.77.
- Van Praag, H. et al., 2002. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, 415(6875), pp.1030–4.
- Van Praag, H., Kempermann, G. & Gage, F.H., 1999. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nature neuroscience*, 2(3), pp.266–70.

- Rangel, L.M. et al., 2014. Temporally selective contextual encoding in the dentate gyrus of the hippocampus - ncomms4181.pdf. *Nature communications*, 5, p.3181.
- Ribatti, D. et al., 2006. Development of the blood-brain barrier: a historical point of view. *Anatomical record. Part B, New anatomist*, 289(1), pp.3–8.
- Riquelme, P.A., Drapeau, E. & Doetsch, F., 2008. Brain micro-ecologies: neural stem cell niches in the adult mammalian brain. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences*, 363(1489), pp.123–137.
- Rocheffort, C. et al., 2002. Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *Journal of Neuroscience*, 22(7), pp.2679–2689.
- Roman, D.D. & Sperduto, P.W., 1995. Neuropsychological effects of cranial radiation: current knowledge and future directions. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 31(4), pp.983–98.
- Sahay, A. et al., 2011. Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature*, 472(7344), pp.466–470.
- Santarelli, L. et al., 2003. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science (New York, N.Y.)*, 301(5634), pp.805–809.
- Saxe, M.D. et al., 2006. Ablation of hippocampal neurogenesis impairs contextual fear conditioning and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(46), pp.17501–6.
- Scoville, W.B. & Milner, B., 1957. LOSS OF RECENT MEMORY AFTER BILATERAL HIPPOCAMPAL LESIONS. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 20(1), pp.11–21.
- Seki, T., 2002. Expression patterns of immature neuronal markers PSA-NCAM, CRMP-4 and NeuroD in the hippocampus of young adult and aged rodents. *Journal of Neuroscience Research*, 70(3), pp.327–334.
- Seri, B. et al., 2001. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(18), pp.7153–60.
- Seri, B. et al., 2004. Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *The Journal of comparative neurology*, 478(4), pp.359–78.
- Shen, Q. et al., 2004. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5675), pp.1338–1340.
- Shors, T.J. et al., 2001. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature*, 410(6826), pp.372–6.

- Scharfman, H.E., 2007. The CA3 “backprojection” to the dentate gyrus. *Progress in brain research*, 163, pp.627–37.
- Schmidt-Hieber, C., Jonas, P. & Bischofberger, J., 2004. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature*, 429(6988), pp.184–187.
- Solstad, T. et al., 2008. Representation of geometric borders in the entorhinal cortex. *Science (New York, N.Y.)*, 322(5909), pp.1865–8.
- Song, H., Stevens, C.F. & Gage, F.H., 2002. Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature*, 417(6884), pp.39–44.
- Squire, L.R., 2004. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiology of learning and memory*, 82(3), pp.171–7.
- Stanfield, B.B. & Trice, J.E., 1988. Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation cerebrale*, 72(2), pp.399–406.
- Steiner, B. et al., 2004. Differential Regulation of Gliogenesis in the Context of Adult Hippocampal Neurogenesis in Mice. *GLIA*, 46(1), pp.41–52.
- Steiner, B. et al., 2006. Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis. *GLIA*, 54(8), pp.805–814.
- Stevens, M.F. et al., 1984. Antitumor imidazotetrazines. 1. Synthesis and chemistry of 8-carbamoyl-3-(2-chloroethyl)imidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3 H)-one, a novel broad-spectrum antitumor agent. *Journal of medicinal chemistry*, 27(2), pp.196–201.
- Taube, J.S., Muller, R.U. & Ranck, J.B., 1990. Head-direction cells recorded from the postsubiculum in freely moving rats. I. Description and quantitative analysis. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 10(2), pp.420–435.
- Taupin, P., 2007. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain research reviews*, 53(1), pp.198–214.
- Thomas, S.A. & Segal, M.B., 1997. Saturation kinetics, specificity and NBMPR sensitivity of thymidine entry into the central nervous system. *Brain Research*, 760(1-2), pp.59–67.
- Tielsch, A. et al., 2002. "Reelin, Disabled 1, and β 1 integrins are required for the formation of the radial glial scaffold in the hippocampus." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99.20 (2002): 13178-13183.
- Treves, A. & Rolls, E.T., 1994. Computational analysis of the role of the hippocampus in memory. *Hippocampus*, 4(3), pp.374–391.
- Trivedi, M.A. & Coover, G.D., 2004. Lesions of the ventral hippocampus, but not the dorsal hippocampus, impair conditioned fear expression and inhibitory avoidance on the elevated T-maze. *Neurobiology of Learning and Memory*, 81(3), pp.172–184.

- Tronel, S. et al., 2012. Adult-born neurons are necessary for extended contextual discrimination. *Hippocampus*, 22(2), pp.292–8.
- Wang, L.P., Kempermann, G. & Kettenmann, H., 2005. A subpopulation of precursor cells in the mouse dentate gyrus receives synaptic GABAergic input. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 29(2), pp.181–189.
- Welzel, G. et al., 2008. Memory Function Before and After Whole Brain Radiotherapy in Patients With and Without Brain Metastases. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 72(5), pp.1311–1318.
- Wesierska, M., 2005. Beyond Memory, Navigation, and Inhibition: Behavioral Evidence for Hippocampus-Dependent Cognitive Coordination in the Rat. *Journal of Neuroscience*, 25(9), pp.2413–2419.
- Winocur, G. et al., 2012. Adult hippocampal neurogenesis and memory interference. *Behavioural brain research*, 227(2), pp.464–9.
- Winocur, G. et al., 2006. Inhibition of neurogenesis interferes with hippocampus-dependent memory function. *Hippocampus*, 16(3), pp.296–304.
- Wirth, S. et al., 2003. Single neurons in the monkey hippocampus and learning of new associations. *Science (New York, N.Y.)*, 300(5625), pp.1578–81.
- Wiskott, L., Rasch, M.J. & Kempermann, G., 2006. A functional hypothesis for adult hippocampal neurogenesis: avoidance of catastrophic interference in the dentate gyrus. *Hippocampus*, 16(3), pp.329–43.
- Wojtowicz, J.M., Askew, M.L. & Winocur, G., 2008. The effects of running and of inhibiting adult neurogenesis on learning and memory in rats. *The European journal of neuroscience*, 27(6), pp.1494–502.
- Yu, W.H., 1976. The effect of 5-bromodeoxyuridine on the postnatal development of the rat cerebellum: a biochemical study. *Brain research*, 118(2), pp.281–91.
- Zhang, C.-L. et al., 2008. A role for adult TLX-positive neural stem cells in learning and behaviour. *Nature*, 451(7181), pp.1004–1007.
- Zhao, C. et al., 2006. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 26(1), pp.3–11.
- Zola-Morgan, S., Squire, L.R. & Amaral, D.G., 1986. Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 6(10), pp.2950–67.