

**Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze**

Katedra fyziologie živočichů

# **Indukce neurogeneze a gliogeneze po ischemickém poškození CNS**

*Bakalářská práce*



Autor: Marcela Filipová  
Vedoucí práce: Ing. Miroslava Anděrová, PhD.  
Rok: 2010

Prohlašuji na svou čest, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a s použitím uvedené literatury.

Marcela Filipová  
V Praze, dne 26. března 2010

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala vedoucí své bakalářské práce Ing. Miroslavě Anděrové, PhD a v neposlední řadě také Mgr. Ivě Prajerové za ochotu, trpělivost a cenné rady, kterými mi při vypracování této práce pomohly.

## Abstrakt

Ischemické poškození mozku (iktus) patří mezi nejčastější příčiny úmrtí a invalidity u lidí. Objev neurogeneze a možnosti její indukce cytokiny v dospělém centrálním nervovém systému (CNS) poskytl naději na možnou léčbu ischemie. Tato práce se zaměřuje na popis mechanismů neurogeneze na buněčné a molekulární úrovni a čerpá z poznatků získaných během posledních deseti let. První kapitola této práce je zaměřena na popis vzniku nových neuronů v gyru dentatu hippocampu a subventrikulární zóně, hlavních neurogenických oblastech dospělého CNS, za fyziologických podmínek. Další část je zaměřena na stručný popis modelů používaných ke studiu ischemie u potkana a myši a na patofyziologii ischemického poškození mozku, při kterém dochází k aktivaci astrocytů a mikroglálních buněk. Dále je popsána aktivace neurogenze v těchto dvou hlavních neurogenických oblastech. Zmíněna je i úloha NG2 glií, které se vyskytují v celém mozku, a které se podle nejnovějších výzkumů jeví jako potenciální zdroj buněk, jejichž cílenou diferenciací by bylo možné vytvořit specifické typy nervových buněk (oligodendrocyty, astrocyty a pravděpodobně i neurony), které by se daly využít pro reparaci poškozené nervové tkáně. Poslední část práce se zabývá vlivem jednotlivých růstových faktorů, které vytvářejí mikroprostředí vhodné pro neurogenezi. Kromě těchto faktorů je zdůrazněna i úloha důležitých signalizačních drah, jmenovitě Notch1, Sonic hedgehog a Wnt/ $\beta$ -katenin signalizační dráhy, které prostřednictvím vnitřních buněčných signálů ovlivňují buňky v jejich růstu a vývoji.

### Klíčová slova:

Neurogeneze, ischemické poškození mozku, hipocampus, gyrus dentatus, subventrikulární zóna, růstové a neurotrofní faktory

## **Abstract**

Ischemic injury (stroke) is one of the most common causes of death and disability in humans. Discovery of adult neurogenesis and possibilities to induce neurogenesis by cytokines brought new approaches and hopes in treating the ischemic lesion in future. The aim of this thesis is to describe cellular and molecular mechanisms of neurogenesis, mainly those discovered within last ten years. The first part describes generation of new neurons in the brain under physiological conditions, which is localized in the dentate gyrus of the hippocampus and in the subventricular zone of the lateral ventricles (i.e. in principal neurogenic regions). The second part describes animal models used for studying ischemic injury in rodents and moreover, it focuses on pathophysiology of ischemic brain injury, which is accompanied by astrocyte and microglia activation. Further, the ischemia-induced neurogenesis is described in these two major neurogenic regions. Also the important role of NG2 glial cells in central nervous system (CNS) regeneration is pointed out. According to recent findings NG2 glia that are present in all regions of CNS might serve as a potential source of cells for directed differentiation into oligodendrocytes, astrocytes and even neurons during CNS repair/regeneration. In the last part of this work, the effect of specific growth factors that form appropriate microenvironment for neurogenesis is reviewed. In addition the role of important signaling pathways, such as Notch1, Sonic hedgehog and Wnt/ $\beta$ -catenin is depicted. These signaling pathways act via intracellular signaling and specifically influence the cell fate.

## **Keywords**

Neurogenesis, brain ischemia, ischemic stroke, hippocampus, gyrus dentatus, subventricular zone, growth and neurotrophic factors

## Obsah

|   |    |
|---|----|
| 1. Seznam použitých zkratk.....   | 3  |
| 2. Úvod.....  | 5  |
| 3. Neurogeneze a gliogeneze v dospělém CNS.....   | 7  |
| 3.1. Hipokampus.....  | 7  |
| 3.1.1. Oblasti hipokampu.....   | 7  |
| 3.1.2. Uspořádání neurálních buněk v gyru dentatu.....                                  | 7  |
| 3.2. Subventrikulární zóna (SVZ).....   | 10 |
| 3.2.1. Typy buněk v dospělé.....  | 10 |
| 3.2.2. Uspořádání dospělé SVZ.....  | 10 |
| 3.2.3. Původ a tvorba neurálních buněk SVZ.....   | 12 |
| 4. Neurogeze v ischemicky poškozené SVZ a SGZ dospělého mozku.....                      | 13 |
| 4.1. Ischemie.....  | 13 |
| 4.2. Modely pro studium mozkové ischemie.....   | 14 |
| 4.2.1. Globální ischemie.....   | 14 |
| 4.2.2. Fokální ischemie.....  | 14 |
| 4.3. Reakce mozkových buněk na ischemické poškození.....                                | 15 |
| 4.3.1. Změny po ischemickém poranění na buněčné úrovni.....                             | 15 |
| 4.3.1.1. Aktivace astrocytů.....  | 15 |
| 4.3.1.2. Aktivace mikroglií.....  | 16 |
| 4.4. Neurogeneze a gliogeneze po poranění.....  | 16 |
| 4.4.1. Aktivace buněčné proliferace v SVZ.....  | 16 |
| 4.4.2. Aktivace buněčné proliferace v hipokampu.....                                    | 17 |
| 4.4.3. Buňky exprimující proteoglykan NG2 chondroitin sulfát – NG2 gliové<br>buňky..... | 17 |
| 5. Mikroprostředí mozku ovlivňující neurogenezi.....                                    | 19 |
| 5.1. Růstové a neurotrofní faktory.....   | 20 |
| 5.1.1. Mozkový neurotrofní faktor.....  | 20 |
| 5.1.2. Kostní morfogenetický protein a inhibiční faktor leukémie.....                   | 20 |
| 5.1.3. Epidermální růstový faktor a hlavní růstový faktor fibroblastů.....              | 20 |
| 5.1.4. Erytropoetin.....  | 21 |

|   |    |
|---|----|
| 5.1.5. Granulocyty-stimulující faktor.....                        | 22 |
| 5.1.6. Neurotrofní faktor sekretovaný gliální buněčnou linií..... | 22 |
| 5.1.7. Heparin vázající epidermální růstový faktor.....           | 22 |
| 5.1.8. Insulinu podobný růstový faktor-1.....                     | 23 |
| 5.1.9. Oxid dusnatý.....  | 23 |
| 5.1.10. Vaskulární endoteliální růstový faktor.....               | 23 |
| 5.2. Signalizační dráhy ovlivňující neurogenezi a gliogenezi..... | 24 |
| 5.2.1. Notch1 signalizační dráha.....                             | 24 |
| 5.2.2. Sonic hedgehog signalizační dráha.....                     | 24 |
| 5.2.3. Wnt/ $\beta$ -katenin signalizační dráha.....              | 25 |
| 6. Závěr.....   | 27 |
| 7. Seznam použité literatury.....                                 | 28 |

## 1. Seznam použitých zkratek

- ATP** - adenosin trifosfát (adenosine triphosphate)  
**bFGF** – hlavní růstový faktor fibroblastů (basic fibroblast growth factor)  
 **$\beta$ III-Tubulin** –  $\beta$ -tubulin třídy III (podjednotka mikrotubulů, specifický pro neurony)  
**BDNF** – mozkový neurotrofní faktor (brain-derived neurotrophic factor)  
**BLBP** – protein vázající lipid (brain lipid binding protein)  
**BMP** – kostní morfogenetický protein (bone morphogenetic protein)  
**CD24** – glykoprotein exprimovaný neuroblasty (cluster of differentiation 24)  
**cGMP** – cyklický guanosin monofosfát (cyclic guanosine monophosphate)  
**CNS** – centrální nervový systém  
**CXCR4** – chemokinový receptor 4 (CXC chemokine receptor 4)  
**DCX** – protein asociovaný s mikrotubuly (doublecortin)  
**DG** – gyrus dentatus  
**Dkk-1** – transkripční faktor dickkopf 1 (dickkopf-related protein 1)  
**DNA** – deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)  
**EGF** – epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)  
**EGFR** – receptor epidermálního růstového faktoru (epidermal growth factor receptor)  
**EGFR/ErbB1** – receptor heparin-vázajícího epidermálního růstového faktoru (epidermal growth factor receptor/ErbB1)  
**EPO** – erythropoetin (erythropoietin)  
**FGF** – růstový faktor fibroblastů (fibroblast growth factor)  
**FGFR-1** – receptor růstového faktoru fibroblastů 1 (fibroblast growth factor receptor 1)  
**G-CSF** – faktor stimulující kolonie granulocytů (granulocyte colony-stimulating factor)  
**GCL** – vrstva granulórních buněk (granular cell layer)  
**GDNF** – neurotrofní faktor sekretovaný gliální buněčnou linií (glial cell line-derived neurotrophic factor)  
**GD** – gyrus dentatus  
**GFAP** – gliální fibrilární acidický protein (glial fibrillary acidic protein)  
**GFR- $\lambda$ 1** – receptor alfa 1 neurotrofního faktoru sekretovaného gliální buněčnou linií (glial cell line-derived neurotrophic factor receptor alfa 1)  
**GL** – vrstva glomerulárních buněk (glomerular layer)  
**GLAST** – glutamát-aspartátový transportér (glutamate-aspartate transporter)  
**Gli1** – s gliomem spojený onkogenní homolog 1 (glioma-associated oncogene homolog 1)  
**GSK-3 $\beta$**  – glykogen syntáza kináza-3 $\beta$  (glycogen synthase kinase-3 $\beta$ )  
**HB-EGF** – heparin vázající epidermální růstový faktor (heparin-binding epidermal growth factor)  
**HIF-1** – hypoxií-indukovatelný transkripční faktor 1 (hypoxia-inducible factor 1)  
**ChSP-4** – chondroitin sulfát proteoglykan 4 (chondroitin sulphate proteoglycan 4)  
**IGF-1** – insulinu podobný růstový faktor 1 (insulin-like growth factor 1)  
**LIF** – inhibiční faktor leukémie (leukemia inhibitory factor)  
**Mash1** – transkripční faktor (mammalian achaete scute homolog 1)  
**MCAO** – okluze prostředních mozkových arterií (middle cerebral artery occlusion)  
**MCL** – vrstva mitrálních buněk (mitral cell layer)  
**NG2** – chondroitin sulfát proteoglykan 2 (neuron-glia antigen 2 chondroitin sulphate proteoglycan)  
**NO** – oxid dusnatý (nitric oxide)  
**NOS** – syntáza oxidu dusnatého (nitric oxide synthase)



- MT** – metalothionáza (methalothionase)  
**NeuroD** – transkripční faktor regulující neurogenezi  
**NeuN** – neurální jádro (neuronal nuclei)  
**OB** – čichový lalok (olfactory bulb)  
**Olig2** – transkripční faktor oligodendrocytů (oligodendrocyte transcription factor 2)  
**Prox1** – transkripční faktor (prospero homeobox protein 1)  
**PSA-NCAM** – polysialová adhézní molekula neuronu (poly-sialylated-neural cell-adhesion molekule)  
**RMS** – rostrální migrační proud (rostral migratory stream)  
**S100  $\beta$**  – astrogliální  $\text{Ca}^{2+}$  - vázající protein (astroglial-derived  $\text{Ca}^{2+}$ -binding protein)  
**SDF1 $\alpha$**  – faktor 1 $\alpha$  sekretovaný stromálními buňkami (stromal cell-derived factor 1 $\alpha$ )  
**SGZ** – subgranulární zóna (subgranular zone)  
**Shh** – sonic hedgehog homolog  
**Sox2** – SRY-příbuzný transkripční faktor (SRY-related transcription factor)  
**SVZ** – subventrikulární zóna (subventricular zone)  
**TGF** – transformační růstový faktor (transforming growth factor)  
**TH** – tyrosin hydroxyláza (tyrosine hydroxylase)  
**TLX** – orfanový jaderný receptor (orphan nuclear receptor)  
**Tuj-1** – III třída  $\beta$ -tubulinu (neuron-specific class III  $\beta$ -tubulin)  
**VEGF** – vaskulární endoteliální růstový faktor (vascular endothelial growth factor)  
**VZ** - ventrikulární zóna (ventricular zone)

## 2. Úvod

Ischemická cévní mozková příhoda, neboli ischemie, je druhou nejčastější příčinou úmrtí na celém světě. Ročně postihne asi 15 milionů lidí, přičemž třetina z nich umírá a další třetina lidí má trvalé následky (<http://eltex.wgz.cz/mozkova-mrtvice>). Jen v České republice se výskyt tohoto onemocnění pohybuje kolem 250 případů na 100 000 obyvatel, z čehož 12 % umírá (tzn.následkem ischemie umírá každý šestý občan ČR)\*.

Poměrně dlouhou dobu byl obecně přijímán názor, že centrální nervový systém (CNS) nemá žádnou schopnost regenerace. Až v roce 1965 Altman a Das publikovali práci, ve které objevili buněčnou proliferaci v dospělém mozku potkana (inkorporací značeného thymidinu poukazující na syntézu DNA). Ovšem nebylo jednoznačně zjištěno, u kterých buněk k této proliferaci dochází (Altman a Das, 1965), a zda k ní dochází také u lidí. To bylo definitivně prokázáno až v roce 1998, kdy byla popsána neurogeneze (tvorba nových neuronů) u primátů a také v lidském mozku (Eriksson et al., 1998). Od té doby je vědecký výzkum zaměřen na objasnění mechanismů, které se uplatňují jak v neurogenezi za fyziologických podmínek, tak i v neurogenezi v průběhu patologických stavů CNS.

Cílem mé bakalářské práce je shrnout základní poznatky o mechanismech neurogeneze a gliogeneze v CNS, jak za fyziologických podmínek, tak i v ischemicky poškozené nervové tkáni. V první části této práce jsou stručně popsány základní mechanismy neurogeneze, které probíhají v nepoškozeném CNS, a které slouží zejména k nahrazení starých, nebo poškozených buněk.

V další části jsou pak popsány různé formy ischemického poškození mozku a reakce jednotlivých buněčných typů CNS na ischemické poškození mozku se zaměřením na gliové buňky a neurony.

---

\*Převzato z:

[http://www.medicabaze.cz/index.php?sec=term\\_detail&categId=22&cname=Neurologie&letter=C&termId=1205&tname=C%3%A9vn%C3%AD+mozkov%C3%A9+p%C5%99%C3%ADhody+ischemick%C3%A9&h=empty#jump](http://www.medicabaze.cz/index.php?sec=term_detail&categId=22&cname=Neurologie&letter=C&termId=1205&tname=C%3%A9vn%C3%AD+mozkov%C3%A9+p%C5%99%C3%ADhody+ischemick%C3%A9&h=empty#jump) dne 2.4.2010

V poslední části předkládané bakalářské práce jsou pak popsány změny probíhající na molekulární úrovni, které přispívají k vytvoření specifického mikroprostředí, které výrazným způsobem přispívá k nastartování a udržování neurogeneze a gliogeneze v ischemicky poškozené nervové tkáni.

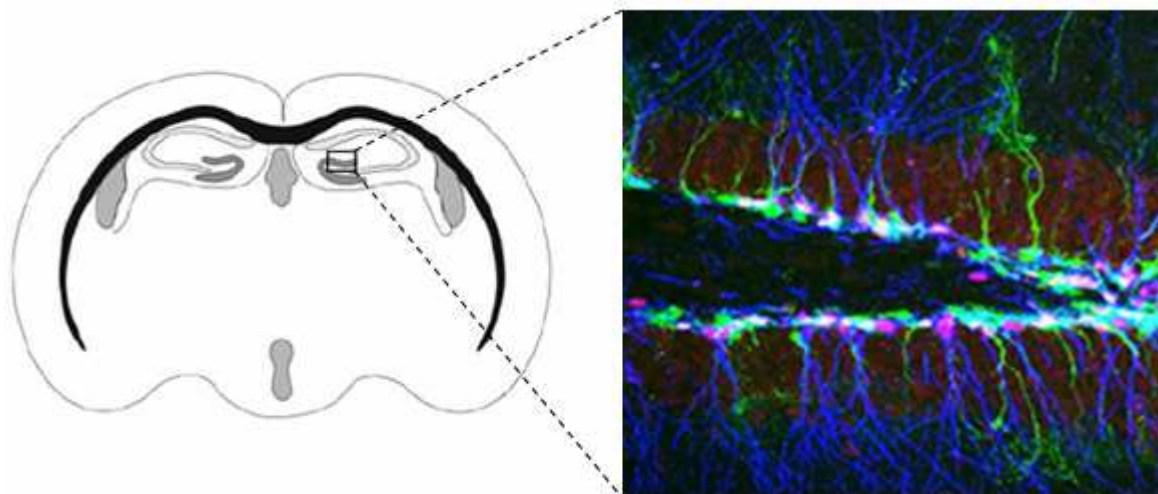
### 3. Neurogeneze a gliogeneze v dospělém CNS

V dospělém mozku probíhá neurogeneze zejména ve dvou neurogenních oblastech, v gyru dentatu (GD) hipokampu a v subventrikulární zóně (SVZ).

#### 3.1. Hipokampus

##### 3.1.1. Oblasti hipokampu

Dospělý hipokampus se dělí na několik oblastí: CA1, CA2, CA3 a GD (Obr. 1). V GD dochází v dospělosti k neurogenezi (Dayer et al., 2003, Seri et al., 2004, Suh et al., 2007), jejíž funkcí je pravděpodobně průběžné nahrazování odumřelých neuronů a zvýšení plasticity dospělého mozku (van Praag et al., 2002) prostřednictvím neustálé tvorby buněk, které pak mohou být zařazeny do již stávajícího nervového systému (Toni et al., 2008).



**Obr.1:** Schéma koronálního řezu mozku (vlevo), ve kterém je zvýrazněna část hipokampu –gyrus dentatus, kde probíhá neurogeneze (Seri et al., 2004). Detail gyru dentatu (vpravo), kde je imunohistochemickým barvením pomocí Doublecortinu (modře) detekována probíhající neurogeneze. Doublecortin (DCX) je marker nově generovaných neuronů. (převzato z <http://www4.utsouthwestern.edu/HsiehLab/index.html>).

##### 3.1.2. Uspořádání neurálních buněk v gyru dentatu

U savců, včetně člověka, vznikají nové neurony v dospělém GD v subgranulární zóně (SGZ = subgranular zone), která leží mezi granulární vrstvou (GCL = granular cell layer) a

hilem hipokampu (Palmer et al., 2000). V SGZ se vyskytují dva typy astrocytů, horizontální a radiální astrocyty. Oba dva typy produkují gliální fibrilární acidický protein (GFAP), který je považován za marker astrocytů. Tyto dvě populace astrocytů se od sebe dají odlišit pomocí dalších markerů (Tabulka 1) jako je nestin, který se nachází pouze u radiálních astrocytů a S100 $\beta$ , který je typický pro horizontální astrocyty. Radiální astrocyty, které jsou považovány za primární progenitory, se dělí za vzniku D buněk, jejichž typickým markerem je DCX (doublecortin) a PSA-NCAM (poly-sialated neural cell adhesion molecule).

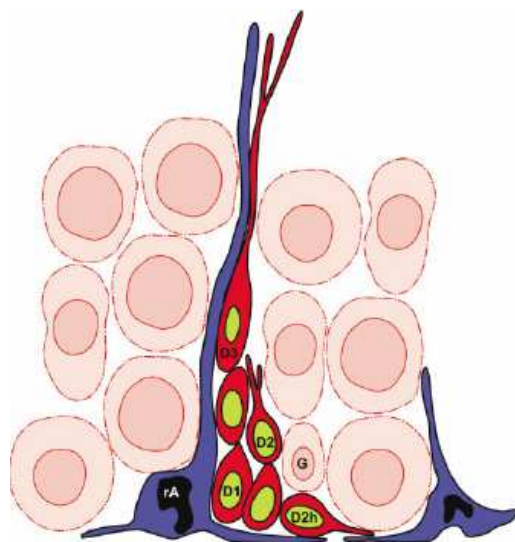
|                                      | A buňky | B buňky | C buňky | D buňky | Neurony | OLIG |
|--------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|------|
| <b>GLAST</b>                         |         | X       |         |         |         |      |
| <b>GFAP</b>                          |         | X       |         |         |         |      |
| <b>S100<math>\beta</math></b>        |         | X       |         |         |         |      |
| <b>Vimentin</b>                      |         | X       |         |         |         |      |
| <b>BLBP</b>                          |         | X       | X       |         |         |      |
| <b>Nestin</b>                        | X       | X       | X       |         |         |      |
| <b>Mash 1</b>                        |         |         | X       |         |         |      |
| <b>PSA-NCAM</b>                      | X       |         |         | X       |         |      |
| <b>DCX</b>                           | X       |         |         | X       |         |      |
| <b>NeuroD</b>                        |         |         |         |         | X       |      |
| <b>NeuN</b>                          |         |         |         |         | X       |      |
| <b>Prox 1</b>                        |         |         |         |         | X       |      |
| <b><math>\beta</math>III-Tubulin</b> |         |         |         |         | X       |      |
| <b>ChSP-4</b>                        |         |         |         |         |         | X    |
| <b>NG2</b>                           |         |         |         |         |         | X    |

**Tabulka 1:** Hlavní markery jednotlivých populací buněk *gyru dentatu* a subventrikulární zóny.

$\beta$ III-Tubulin-  $\beta$ -tubulin třídy III (podjednotka mikrotubulů, specifický pro neurony), BLBP-protein vázající lipid (brain lipid binding protein), DCX-protein spojený s mikrotubuly (doublecortin), GFAP-gliální fibrilární acidický protein (glial fibrillary acidic protein), GLAST-glutamát-aspartátový transportér (glutamate-aspartate transporter), ChSP-4-chondroitin sulfát proteoglykan 4 (chondroitin sulphate proteoglycan 4), NG2-chondroitin sulfát proteoglykan 2 (neuron-glia antigen 2 chondroitin sulphate proteoglycan), PSA-NCAM-polysialová adhézní molekula neuronu (poly-sialylated neural cell adhesion molecule), Mash1-transkripční faktor (mammalian achate schute homolog 1), NeuN-marker neurálního jádra, NeuroD-transkripční faktor regulující neurogenezi, S100 $\beta$ -Ca<sup>2+</sup> vázající protein, Prox1-transkripční faktor (prospero homeobox protein 1).

Nezralé DCX<sup>+</sup> prekursori (D1 buňky) jsou v GCL uspořádány do shluků dvou až čtyř buněk, které sedí v hnízdě tvořeném výběžky astrocytů (Obr. 2). Tím vzniká tzv. neurogenní nika, v níž dochází k diferenciaci D buněk ve zralé granulózní neurony. Diferenciace probíhá tak, že se D1 buňka rozdělí na dvě dceřiné buňky (D2 buňky), z nichž většinou jen jedna pokračuje v dalším vývoji. Tato D2 buňka prodlužuje své výběžky, přičemž jeden z nich roste až k příčnému zesílení GCL. Během tohoto procesu se D2 buňka postupně přemění na D3 buňku, která posléze dospívá v nový granulózní neuron (Seri et al., 2004). Tímto způsobem je obecně popisována tvorba nových buněk v dospělém gyru dentatu hipokampu. Existuje však i studie popisující dvě populace Sox2-pozitivních buněk (Sox2 = SRY-related transcription factor, v této studii používaný jako marker kmenových buněk), tzv. radiální a neradiální buňky, které mohou být považovány za neurální kmenové buňky. Ty se mohou dělit za vzniku jedné neradiální buňky a jednoho DCX<sup>+</sup> prekursoru. Z neradiálních Sox2-pozitivních buněk vznikají astrocyty a z DCX<sup>+</sup> prekursorů neurony (Suh et al., 2007).

Samotné astrocyty, které tvoří neurogenní niku a oddělují D buňky od hilu, se nacházejí v těsném kontaktu s krevním řečištěm (Palmer et al., 2000). Mohou tak pomoci mnoha faktorů ovlivňovat diferenciaci, maturaci a migraci D buněk. Takovéto uspořádání neurogenní niky může být výhodné pro zamezení migrace nových neuronů z GCL, nebo pro oddělení neurogenní niky od faktorů přítomných v hilu (Seri et al., 2004).



**Obr. 2:** Model uspořádání subgranulární zóny (SGZ) v koronální rovině. Astrocyty (modrá cytoplazma a černé jádro) s tangenciálními výběžky na bázi SGZ. D buňky (červená cytoplazma a zelené jádro) vytvářejí shluky, které jsou umístěny v hnízdě tvořeném výběžky astrocytů. D1 buňky v něm dozrávají v D2 a D3 buňky, které se usadí v GCL poblíž starších granulózních neuronů.

D1, D2 (D2h-horizontální D2 buňka) a D3-populace D buněk, G-gliální buňka, rA-radiální astrocyt (Seri et al., 2004).

### 3.2. Subventrikulární zóna (SVZ)

SVZ je zárodečná vrstva, která vzniká během embryonálního vývoje, a která se prostřednictvím řady změn přeměňuje do stavu, ve kterém si udržuje své neurogenní vlastnosti až do dospělosti (Peretto et al., 2005). Tato vrstva je umístěna na laterální stěně postranních komor mozku.

#### 3.2.1. Typy buněk v dospělé SVZ

SVZ je tvořena čtyřmi základními typy buněk (Obr. 3):

**A buňky** – migrující neurální prekursori (neuroblasty);

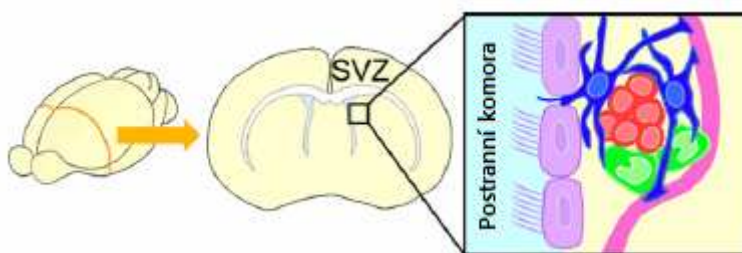
**B buňky** – astrocyty, které oddělují řetězce A buněk od endymální vrstvy a zároveň jsou považovány za neurální kmenové buňky;

**C buňky** – tzv. „transit amplifying cells“, které se velmi rychle dělí a vytvářejí shluky spojené s řetězcem A buněk;

**E1 buňky** – multiciliální endymální buňky;

**E2 buňky** – endymální buňky se dvěma cíli a komplexem bazálních tělísek.

Endymální buňky obecně vystylají povrch komor, ale existují rozdíly v jejich prostorové distribuci. Např. E1 buňky představují méně než 5 % z celkového počtu buněk pokrývajících povrch komor (Mirzadeh et al., 2008).



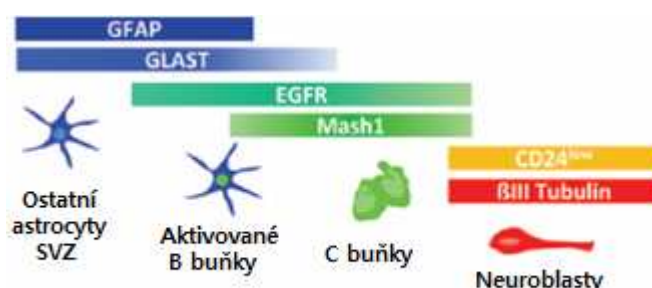
**Obrázek 3:** Umístění a struktura subventrikulární zóny (SVZ). SVZ je umístěna na laterální stěně postranní komory a je tvořena 4 typy buněk: endymálními buňkami (fialové), které vystylají postranní komoru a mají pohyblivá cília; typem B buněk (modré); typem C buněk (světle zelené) a typem A buněk (červené). (viz přehledný článek Kaneko a Sawamoto, 2009).

#### 2.2.2. Uspořádání dospělé SVZ

B buňky, které se nacházejí v SVZ, fungují jako pomalu se dělicí neurální kmenové buňky, které na svém povrchu exprimují EGF receptor (EGF = epidermal growth factor)

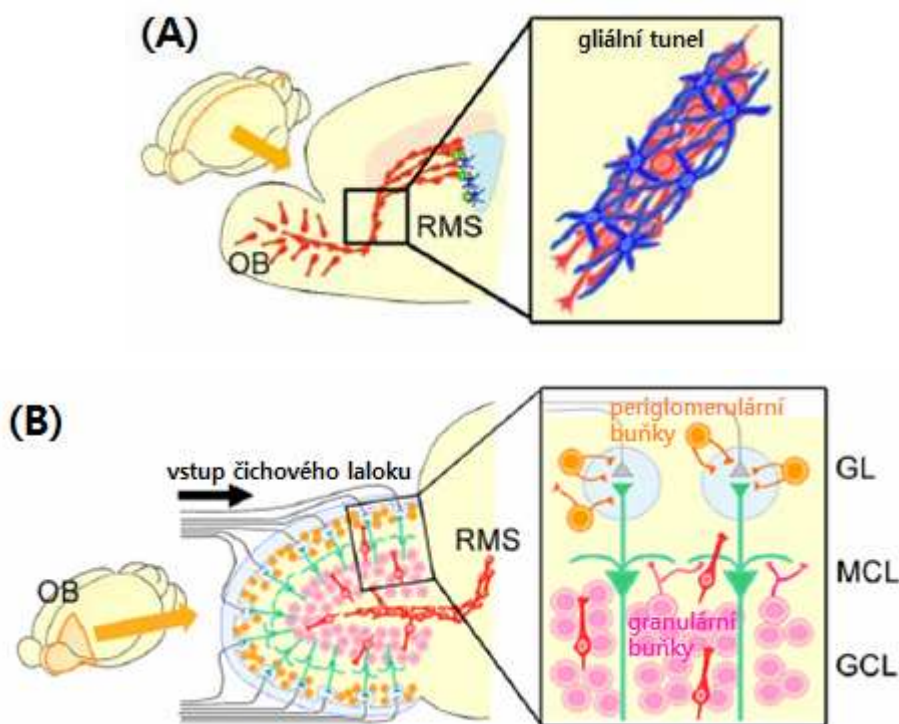
(Obr.4) (Pastrana et al., 2009). Kmenové B buňky produkují intenzivně se dělící C buňky, které generují A buňky. A buňky pak migrují do čichového laloku (OB = olfactory bulb), kam putují ve formě řetězců rostrálním migračním proudem (RMS = rostral migratory stream) (Doetsch et al., 2002). RMS je gliální tunel formovaný výběžky B buněk (Peretto et al., 2005), kterým se řetězce A buněk pohybují ve směru pohybu cerebrospinální tekutiny, a to na základě koncentračního gradientu Slit-proteinů. Ty jsou produkovány choroidálním plexem a podílejí se na navádění A buněk do OB (Sawamoto et al., 2006). V OB z A buněk vznikají periglomerulární a granulární buňky (Obr. 5). Tyto buňky patří mezi interneurony a modulují aktivitu neuronů, které působí na čichovou oblast v mozkové kůře.

Periglomerulární buňky vytvářejí tři populace buněk (buňky, které exprimují kalretinin, kalbindin a tyrosin hydroxylázu- TH). Granulární buňky se pak dělí na hluboké a povrchové a všechny produkují kalretinin (Merkle et al., 2007).



**Obrázek č.4:** Schéma ukazuje vývoj kmenových buněk v SVZ a markery, které tyto buňky exprimují během jednotlivých buněčných stádií. Z aktivovaných kmenových B buněk vznikají intenzivně se dělící C buňky, ze kterých vznikají migrující neuroblasty. Ty nakonec v čichovém laloku dozrávají v dospělé neurony. Důležité je, že žádný marker není specifický pouze pro jeden buněčný typ, ale že přetrvává i do dalšího buněčného stádia.  $\beta$ III-tubulin-  $\beta$ -tubulin třídy III (podjednotka mikrotubulů, specifický pro neurony), CD24-glykoprotein exprimovaný neuroblasty v diferenciálním stádiu (cluster of differentiation 24), EGFR-receptor epidermálního růstového faktoru (epidermal growth factor receptor), GFAP-gliální fibrilární acidický protein (glial fibrillary acidic protein), GLAST-glutamát-aspartátový transportér (glutamate-aspartate transporter), Mash1-transkripční faktor (mammalian achaete schute homolog 1) (Pastrana et al., 2009).





**Obrázek 5:** A) Migrace neuroblastů. Nově vytvořené neuroblasty v subventrikulární zóně putují směrem k čichovému laloku (OB-olfactory bulb) pomocí rostrálního migračního proudu (RMS-rostral migratory stream). Neuroblasty (červené) vytvářejí řetězcům podobné shluky, které jsou obklopeny pochvou z astrocytů (modré). Toto uskupení astrocytů s neuroblasty se nazývá gliální tunel.  
 B) Neurogeneze v OB. V OB se neuroblasty rozšiřují radiálně a mění se ve dva typy čichových interneuronů, granulární buňky a periglomerulární buňky. Tyto buňky se nacházejí ve vrstvě granulórních buněk (GCL-granular cell layer) nebo ve vrstvě glomerulárních buněk (GL-glomerular cell layer).  
 MCL-vrstva mitrálních buněk (mitral cell layer) (viz přehledný článek Kaneko a Sawamoto, 2009).

### 3.2.3. Původ a tvorba neurálních buněk SVZ

V průběhu embryonálního vývoje vzniká tzv. ventrikulární zóna (VZ), která je zdrojem primárních neurálních progenitorů (radiálních glií). V prvních deseti dnech po narození nejsou tyto gliové buňky ještě organizovány do typických struktur, ale už se postupně začínají přeměňovat na B buňky. Během 11. až 21. dne dochází k vytvoření gliálního tunelu a k formování řetězců A buněk, jejichž správné uspořádání do řetězců je závislé na produkci adhezivní molekuly PSA-NCAM na povrchu gliálních buněk, které svými výběžky (tvořícími gliální tunel) tyto řetězce A buněk obklopují (Peretto et al., 2005). Tak dochází během prvních třech týdnů k vytvoření SVZ v její dospělé podobě.

Dospělá SVZ je tvořena tzv. neurogení nikou (podobně jako u hipokampu), která obsahuje A, B a C buňky. B buňky mají dlouhé bazální výběžky, kterými se dotýkají cév a vytvářejí na ní typické zakončení tzv. patku. Dále pak mají apikální výběžky, s jejichž pomocí

se dotýkají povrchu komor. Takto uspořádané buňky jsou v přímém kontaktu s krevním řečištěm, jehož vlivem je regulováno jejich chování (Mirzadeh et al., 2008).

B buňky v takto uspořádané dospělé SVZ nejsou identické, ale liší se v produkci specifických typů buněk. To je způsobeno tím, že během embryonálního vývoje radiální glie produkují různé typy buněk v závislosti na tom, z jaké oblasti VZ pocházejí. Při jejich postnatální přeměně na B buňky pak dochází k přetrvávání těchto vlastností i u B buněk, a ty pak také produkují různé sub-populace buněk (Merkle et al., 2007).

SVZ tak lze rozdělit na několik oblastí, podle toho, z jaké části embryonálního epitelu radiální glie pocházejí. A to na oblast laterálního gangliového výčnělku a embryonální formy kůry. Dospělé B buňky, které vznikly z radiálních glií laterálního gangliového výčnělku i embryonální kůry, produkují A buňky, ze kterých vznikají interneurony v dospělém OB. Každá subpopulace těchto B buněk produkuje jiné množství různých typů interneuronů (tyrosin hydroxyláza (TH)-, kalbindin- a kalretinin-pozitivní interneurony). Zatímco TH interneurony jsou produkovány oběma oblastmi podobně, existují velké rozdíly v produkci kalbindin- a kalretinin-pozitivních interneuronů. Od kůry odvozené B buňky produkují převážně kalretinin-pozitivní interneurony, zatímco od laterálního gangliového výčnělku odvozené B buňky produkují kalbindin-pozitivní interneurony (Young et al., 2007).

## **4. Neurogeneze v ischemicky poškozené SVZ a SGZ dospělého mozku**

### **4.1. Ischemie**

Ischemie mozku je definována jako neurologický deficit způsobený poruchou cévního zásobení mozkové tkáně. Podle průběhu ischemie ji můžeme rozdělit na dva typy, fokální a globální ischemii. Fokální ischemie (častější) je způsobena poklesem krevního průtoku v přírodní mozkové tepně anebo je zapříčiněna protržením mozkové tepny a následným krvácením do parenchymu mozku nebo do subarachnoidálního prostoru\*, zatímco globální ischemie je způsobena zástavou srdeční činnosti.

## 4.2. Modely pro studium mozkové ischemie

Ke studiu mozkové ischemie se nejčastěji používá laboratorní potkan nebo laboratorní myš, a to proto, že tyto organismy mají podobné anatomické a fyziologické uspořádání mozku jako má mozek člověka (Yamori et al., 1976). V laboratorních podmínkách je prováděna buď tzv. globální ischemie, nebo fokální ischemie.

### 4.2.1. Globální ischemie

Globální ischemii lze provést dvěma způsoby. Při prvním z nich se uzavřou obě *arterie carotis* a prostřednictvím látek jako je trimetafan nebo pentolamin se sníží krevní tlak (Smith et al., 1984). Při druhém způsobu se zastaví průtok krve ve čtyřech cévách, které zásobují mozek. Nejdříve trvalým uzavřením vertebrálních cév a po 24 hodinách dočasným uzavřením *arterií carotis*, v nichž je po určité době průtok krve znovu obnoven. Pro globální ischemii je typická tzv. zpožděná buněčná smrt, která se vyznačuje postupným odumíráním nervových buněk během několika dní po ischemii (viz přehledný článek Pulsinelli a Buchan, 1988). Oblasti, ve kterých dochází k odumírání neuronů po globální ischemii jsou zejména hipokampus (oblast CA1 a CA4), striatum a neokortex (Kirino a Sano, 1984).

### 4.2.2. Fokální ischemie

Model fokální mozkové ischemie se dá rozdělit podle formy ischemického poranění na trvalou ischemii a přechodnou ischemii. Během trvalé ischemie dojde k vytvoření tzv. ischemického jádra, které je obklopeno oblastí méně poškozené tkáně (tzv. penumbrou) (viz přehledný článek Hunter et al., 1995).

Nejčastějším modelem fokální ischemie je přechodná ischemie, která se provádí uzavřením střední mozkové artérie a to pomocí filamenta, které se do ní zavede. Právě podle střední mozkové artérie dostal tento model i své jméno MCAO, což je zkratka anglického názvu „middle cerebral artery occlusion“. Fokální ischemie v provedení MCAO vede k infarktu striata a přilehlé temenní kůry (Arvidsson et al., 2002). Dalšími možnostmi jak

---

\*Převzato

z:

[http://www.medicabaze.cz/index.php?sec=term\\_detail&categId=22&cname=Neurologie&letter=C&termId=1205&tname=C%3%A9vn%C3%AD+mozkov%C3%A9+p%C5%99%C3%ADhody+ischemick%C3%A9&h=empty#jump](http://www.medicabaze.cz/index.php?sec=term_detail&categId=22&cname=Neurologie&letter=C&termId=1205&tname=C%3%A9vn%C3%AD+mozkov%C3%A9+p%C5%99%C3%ADhody+ischemick%C3%A9&h=empty#jump) dne 2.4.2010

provést MCAO jsou např.: tromboembolický model (způsobený injekcí krevní sraženiny) (Kudo et al., 1982), model fotochemicky indukované trombózy (u kterého se využívá látek, které při kontaktu se světlem způsobují smrt buněk, např. bengálské červeně, a ischemické poranění se vytvoří jejich následným osvětlením) (Watson et al., 1985) a model endotelinem indukované MCAO, u kterého se využívá přirozené schopnosti endotelinu zužovat cévy (Sharkey a Butcher, 1995).

### **4.3. Reakce mozkových buněk na ischemické poškození**

Dospělý mozek savců reaguje na ischemické poranění několika způsoby, které se uskutečňují prostřednictvím změn jak na buněčné úrovni (změny tvaru a velikosti astrocytů, oddělení poškozené tkáně od zdravé), tak i na úrovni molekulárních změn (uvolňování látek, které způsobují poškození buněk, ale také látek, které se uplatňují při ochraně těchto buněk).

#### *4.3.1. Změny po ischemickém poranění na buněčné úrovni*

Prvotní reakcí mozkové tkáně na ischemické poranění je korová a podkorová reaktivní glióza (Jin-qiao et al., 2009), během které dochází k uzavření poškozené tkáně, jejímu oddělení od tkáně zdravé a také k neurální smrti. Reaktivní glióza vzniká na základě zánětlivého podnětu, který vytvářejí mikroglie, makrofágy a astrocyty, a na základě prozánětlivých cytokinů, které jsou jimi produkovány. Druhým typem reakce je aktivace buněčné proliferace, během které dochází ke zvýšené proliferaci prekursorů oligodendrocytů, mikroglíí a některých astrocytů (Amankulor et al., 2009).

##### *4.3.1.1. Aktivace astrocytů*

Základem reaktivní gliózy jsou astrocyty, které se mění na tzv. reaktivní astrocyty a jsou charakteristické svými zvětšenými těly a výběžky a také zvýšenou expresí progenitorových markerů GFAP a nestinu (Pforte et al., 2005). Tyto astrocyty se také podílejí na tvorbě gliální jizvy, která uzavírá místo poranění (Rudge a Silver, 1990). Po poranění dochází k tzv. dediferenciaci astrocytů, která je doprovázena re-expresí nestinu a vimentinu (markery radiálních glií) a jejich zvýšenou proliferací (Burns et al., 2009a).

#### 4.3.1.2. Aktivace mikroglíí

V nepoškozeném dospělém mozku jsou mikrogliaální buňky v tzv. klidovém stavu, ale i během něho jsou to vysoce dynamické struktury, které jsou zodpovědné za imunitní dozor a pohlcování mrtvých buněk v CNS (Nimmerjahn et al., 2005). Následkem ischemického poranění dochází v místě poškození k uvolnění velkého množství ATP z okolních buněk (astrocytů, oligodendrocytů a endoteliálních buněk), které je zodpovědné za zprostředkování prudké a rozsáhlé mikrogliaální reakce, při níž dochází k tzv. aktivaci mikrogliaálních buněk (Davalos et al., 2005). Během této aktivace se „klidové“ mikrogliaální buňky přeměňují na vysoce aktivní a přímo migrují k poškozeným/mrtvým buňkám, které fagocyticky pohltnou. Při tomto procesu nedochází k aktivaci všech mikroglíí, ale jen jejich určitého množství. Neaktivované mikroglie dále přetrvávají v klidovém stavu a jsou připraveny v případě potřeby na okamžitou aktivaci (například při vyčerpání již aktivovaných mikrogliaálních buněk) (Petersen a Dailey, 2004).

### 4.4. Neurogeneze a gliogeneze po poranění

V dospělém mozku savců dochází vlivem ischemického poranění ke zvýšené proliferaci gliových buněk, ale i k produkci nových neuronů. K tomuto jevu dochází ve dvou hlavních neurogenních oblastech: SVZ (Arvidsson et al., 2001, Zhang et al., 2004) a SGZ gyru dentatu (Jin et al., 2001).

#### 4.4.1. Aktivace buněčné proliferace v SVZ

Důležitým zdrojem nových nervových buněk je SVZ, kde dochází k tvorbě řetězců A buněk, které vypadají stejně jako v nepoškozeném dospělém mozku (Zhang et al., 2004). Tyto řetězce ovšem neputují do OB (jako v případě migrace za fyziologických podmínek), ale jsou naváděny do míst poškození, a to na základě signálů, které jsou vysílány poškozenými nervovými buňkami.

Mezi faktory, které se podílejí na nasměrování řetězců do poškozených oblastí, patří i faktor  $1\alpha$  sekretovaný stromálními buňkami (SDF- $1\alpha$  = stromal cell-derived factor- $1\alpha$ ), který je ve vyšším množství produkován v poraněných oblastech, a jehož prostřednictvím dochází k aktivaci chemokinového receptoru CXCR4 (CXC chemokine receptor 4), který se vyskytuje

v progenitorových buňkách SVZ. Dochází tak k chemickému navedení migrujících A buněk do poškozených oblastí (Thored et al., 2006).

Na zprostředkování neurogení a migrační odpovědi A buněk se podílejí matrix-metaloproteinázy, které poskytují A buňkám signál potřebný k jejich šíření a migraci (Lee et al., 2006). Tato migrace probíhá podél krevních cév (Yamashita et al., 2006), díky kterým jsou migrující A buňky obklopeny vhodným mikroprostředím, které jim umožňuje diferencovat se do dospělých nervových buněk (Arvidsson et al., 2002). Cílovou lokalitou těchto buněk je pak poraněné striatum (v něm se neurogeneze v nepoškozeném mozku nevyskytuje), ve kterém se dospělé neurony integrují do stávajícího systému a vytvářejí synaptické struktury, které přetrvávají i 90 dní po ischemii (Yamashita et al., 2006).

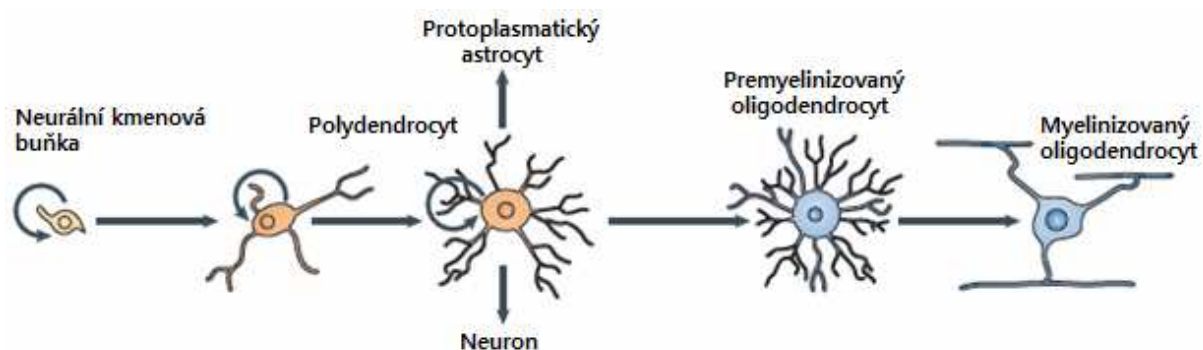
#### 4.4.2. Aktivace buněčné proliferace v hipokampu

Při ischemiích aktivované neurogenezi dochází ke zvýšené tvorbě D buněk v SGZ, ale převážná část z nich nepřežije. Celkové množství nových neuronů, které nahradí mrtvé, tak činí pouze 0,2 % z celkového počtu nově vytvořených neuronů, které vznikly během šesti týdnů po ischemickém poranění. Tato nízká schopnost přežití je pravděpodobně způsobena nepříznivým okolním prostředím (s nedostatkem výživové podpory a s obsahem škodlivých látek) a malým množstvím spojů, které by poskytovaly signály pro přežití (Arvidsson et al., 2002).

#### 4.4.3. Buňky exprimující proteoglykan NG2 chondroitin sulfát – NG2 gliové buňky

V oblasti výzkumu regenerace či reparace poškozené nervové tkáně jsou významným buněčným typem NG2 gliové buňky (neboli polydendrocyty, popř. synantocyty), které mají velký potenciál pro tvorbu oligodendrocytů, astrocytů, ale i nových neuronů po poranění CNS. NG2 buňky dostaly svůj název podle neuron-gliálního antigenu 2 chondroitin sulfát proteoglykanu, který je součástí jejich plasmatické membrány (viz přehledný článek Levine et al., 2001). Po ischemickém poranění dochází ke zvýšené tvorbě NG2-pozitivních buněk v ischemické penumbře (v jádře jejich množství naopak klesá), a to zejména mezi 3. a 7. dnem po obnově přítoku krve do poškozeného mozku. Výrazné snížení celkového počtu buněk v jádře je způsobeno zejména velkým odumíráním oligodendrocytů, které jsou velmi citlivé na nedostatek kyslíku (Ohta et al., 2003).

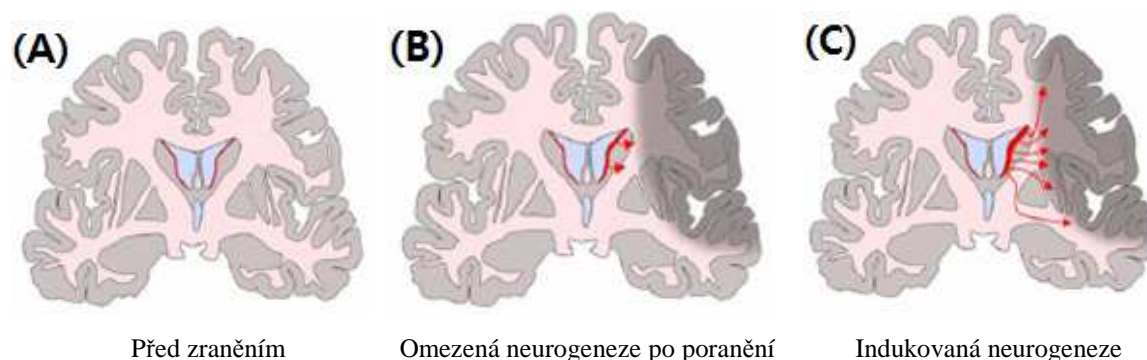
Kromě penumbry, kde se NG2 buňky významně dělí, dochází k produkci astrocytů a oligodendrocytů z NG2 buněk i v gliální jizvě. Zda dojde k diferenciaci NG2 buněk v astrocyty nebo oligodendrocyty záleží na Olig2, což je transkripční faktor oligodendrocytů (oligodendrocyte transcription factor 2) využívaný jako marker těchto buněk. Pokud je Olig2 zadržován v jádře, dojde k diferenciaci buňky v oligodendrocyt, zatímco přesun Olig2 z jádra do cytoplasmy vede k postupnému snížení exprese NG2, a tím k diferenciaci buňky v astrocyt (Zhao et al., 2009). Je prokázáno, že NG2 buňky se mohou diferenciovat jak v oligodendrocyty, které remyelinizují axony po poranění, tak i v protoplasmatické astrocyty (Obr. 6). Oba typy buněk jsou produkovány jak v šedé hmotě, tak i v bílé hmotě (Zhu et al., 2008b). Zda dochází také k tvorbě neuronů z NG2 buněk je předmětem mnoha studií. Ačkoli v některých studiích (Zhu et al., 2008b) nebyla dokázána produkce neuronů, v jiných bylo naopak prokázáno, že například v postnatálním hipokampu (kde dochází v dospělosti k neurogenezi) dokáží NG2 buňky produkovat funkční, elektricky vzrušivé neurony (Belachew et al., 2003).



**Obrázek č. 6:** Schéma ukazující vývoj oligodendrocytů z polydendrocytů neboli NG2 buněk. Polydendrocyt se může kromě oligodendrocytu diferencovat v protoplasmatický astrocyt a pravděpodobně i ve funkční neuron (viz přehledný článek Nishiyama et al., 2009).

## 5. Mikroprostředí mozku ovlivňující neurogenezi

Ischemické poškození mozku indukuje zvýšenou tvorbu faktorů, které přispívají ke vzrůstu aktivity B buněk produkujících nové nervové buňky. Tak dochází ke vzniku určitého mikroprostředí, které obsahuje růstové a neurotrofní faktory, jejichž poměry se liší v závislosti na časovém horizontu po ischemii, a hraje tak podstatnou úlohu v proliferaci, diferenciaci a migraci nových neuronů do místa poškození (Obr. 7), kde se podílí i na jejich integraci do stávajícího nervového systému (Nakatomi et al., 2002). Vzhledem k tomu, že tvorba nových neuronů v dospělém mozku je omezená (Arvidsson et al., 2002), jsou hledána řešení, jak poškozenou nervovou tkáň nahradit, a to jak transplantací neurálních kmenových či progenitorových buněk, tak i indukcí endogenní neurogeneze. Nicméně aplikace velkého množství růstových faktorů, které by zvýšily endogenní neurogenezi, by v nesprávném časovém úseku po ischemii mohla mít negativní dopad (Ninomiya et al., 2006), a proto je prozkoumání mechanismů a funkcí neurotrofních a růstových faktorů, které ovlivňují neurogenezi, nutné pro vytvoření vhodné léčebné strategie u ischemicky poškozené nervové tkáně (Sugiura et al., 2005, Sun et al., 2009).



**Obr. č. 7:** Mobilizace endogenních neurálních kmenových buněk v lidské mozku po ischemickém poškození. A) B buňky přítomné v subventrikulární zóně dospělého člověka (červeně). B) Proliferace B buněk, která vzrůstá po poranění, a umožňuje částečnou náhradu buněk v místech poškození. C) Mobilizace B buněk s pomocí růstových a neurotrofních faktorů, které podporují proliferaci, migraci, diferenciaci a přežití buněk po ischemii (viz přehledný článek Burns et al., 2009b).



## 5.1. Růstové a neurotrofní faktory

### 5.1.1. Mozkový neurotrofní faktor

Po ischemii dochází v mozku k produkci mozkového neurotrofního faktoru (BDNF = brain-derived neurotrophic factor), který obecně působí na zvýšení neurogeneze. V neokortexu ovlivňuje putování progenitorových buněk do míst poranění a stejně tak zajišťuje putování SVZ progenitorových buněk do striata. Jeho největší produkce je však v gyru dentatu hipokampu, kde zvyšuje množství nově vytvořených granulárních buněk, a podílí se na jejich diferenciaci (Schabitz et al., 2007). Dále bylo zjištěno, že zvýšené množství nových buněk v přítomnosti BDNF není zřejmě způsobeno jejich zvýšenou tvorbou, ale tím, že BDNF zvyšuje schopnost jejich přežívání (Choi et al., 2009).

### 5.1.2. Kostní morfogenetický protein a inhibiční faktor leukémie

Kostní morfogenetický protein (BMP = bone morphogenetic protein) a inhibiční faktor leukémie (LIF = leukemia inhibitory factor) se uplatňují v signalizačních drahách, které ovlivňují progenitorové vlastnosti astrocytů. V přítomnosti LIF dochází ke vstupu buňky do buněčného cyklu a k tvorbě GFAP. Tímto způsobem dochází k udržování kmenových (progenitorových) vlastností u GFAP-pozitivních buněk. Proti LIF působí BMP, jehož vlivem GFAP-pozitivní buňky diferencují ve zralé astrocyty. BMP je inhibován proteinem noggin (exprimován v SVZ a SGZ v dospělém mozku), který je produkován *in vivo* v množství, které je nedostatečné pro úplnou inhibici BMP, ale je dostačující pro jeho částečnou inhibici a k udržení progenitorových vlastností u určité sub-populace buněk (Chmielnicki et al., 2004, Bonaguidi et al., 2005).

### 5.1.3. Epidermální růstový faktor a hlavní růstový faktor fibroblastů

Epidermální růstový faktor (EGF = epidermal growth factor) a hlavní růstový faktor fibroblastů (bFGF = basic fibroblast growth factor) jsou cytokiny, které jsou ve vyšší míře produkovány po ischemickém poranění. Oba faktory zvyšují neurogenezi v SVZ a gyru dentatu poraněného mozku (Baldauf a Reymann, 2005). EGF působí prostřednictvím EGF receptoru, který se vyskytuje v SVZ pouze u dvou typů buněk. U B buněk, které slouží jako kmenové buňky a jsou aktivovány po poranění, a dále u C buněk, u kterých je v nepoškozeném mozku oproti B buňkám exprimován ve velkém množství (Pastrana et al.,

2009). Po navázání EGF na EGF receptor dochází ke zvýšené tvorbě C buněk v SVZ, ale jen pokud je EGF přítomen během prvního týdne po ischemii. Pokud přetrvává, dochází k inhibici přeměny C buněk na A buňky (Ninomiya et al., 2006), které by jinak vytvářely řetězce migrující k místům poškození, např. do striata (Baldauf a Reymann, 2005).

Klasickou úlohou bFGF je podílet se na výstavbě organismu během embryonálního vývoje a také na udržování homeostázy tkání. Tento faktor působí prostřednictvím FGFR-1 receptoru, který byl detekován i v neurogenních oblastech, SVZ a gyru dentatu (Sun et al., 2009). Po ischemii dochází jeho vlivem ke zvýšení proliferace B buněk a zároveň k podpoře jejich dalšího dozrávání v neurony a astrocyty. Kromě toho bFGF stimuluje dozrávání B buněk v oligodendrocyty, které po ischemickém poranění nahrazují poškozené oligodendrocyty (Jin-qiao et al., 2009).

Přestože oba faktory podporují neurogenezi, jejich simultánní aplikace anebo nadměrné množství vede k zeslabení neurogeneze. To je způsobeno prostřednictvím snížené proliferace astrocytů, která je zapříčiněna právě kombinací bFGF a EGF (Baldauf a Reymann, 2005).

#### 5.1.4. Erythropoetin

Produkce erythropoetinu (EPO = erythropoietin) je regulována prostřednictvím hypoxií-indukovatelného transkripčního faktoru-1 (HIF-1 = hypoxia-inducible factor 1), který aktivuje expresi EPO po hypoxii (ta je běžnou součástí ischemie, ať již globální nebo fokální). Samotný EPO je produkován astrocyty a působí na EPO receptor, který se nachází na neuronech. Pokud dojde k navázání EPO na jeho receptor, dojde zároveň i k ochraně neuronů před apoptózou a mikrogliaální fagocytózou po ischemii (Liu et al., 2006).

EPO se také zprostředkovaně uplatňuje v ochraně CNS před reaktivními sloučeninami kyslíku a volnými radikály, a to prostřednictvím metalothionáz (MTs = methalothionases), které aktivuje v ischemií poškozeném mozku. MTs pak chrání neurony před poškozením po trvalé MCAO. Tím, že MTs dokáží chránit nervové buňky před volnými radikály a reaktivními sloučeninami kyslíku, přispívají ke zmenšení objemu ischemické penumbry v mozkové kůře (Wakida et al., 2007).

#### 5.1.5. Granulocyty-stimulující faktor

Faktor stimulující kolonie granulocytů (G-CSF = granulocyte colony-stimulating factor) dokáže stimulovat hematopoetické kmenové buňky, které migrují do míst poškozených ischemií. Do těchto oblastí se dostanou i přes hematoencefalickou bariéru, protože při ischemii dochází k jejímu narušení. Takto porušená tkáň produkuje stromální faktor-1 (SDF-1 = stromal cell-derived factor-1), který funguje jako atraktant pro hematopoetické kmenové buňky, které se pak podílejí na zvýšené plasticitě a funkční obnově poškozené tkáně. Samotný G-CSF zmenšuje objem ischemické penumbry a stimuluje buněčné dělení (Shyu et al., 2004).

#### 5.1.6. Neurotrofní faktor sekretovaný gliální buněčnou linií

„Glial cell line-derived neurotrophic factor“ neboli neurotrofní faktor sekretovaný gliální buněčnou linií (GDNF) patří k rodině růstových faktorů (TGF)  $\beta$ . Účinkuje prostřednictvím receptoru, který se nazývá GDNF receptor alfa 1 (GFR- $\alpha$ 1). GDNF podporuje zvýšené přežívání buněk, migraci buněk směrem k poškozené tkáni a uplatňuje se při diferenciaci neuronů. Jeho zvýšená exprese v buňkách určených k transplantaci (C17.2 buňkách) zlepšuje kognitivní funkce a jejich přežívání v tkáni hostitele. GDNF také snižuje apoptickou buněčnou smrt A buněk v buněčných kulturách *in vitro* (Bakshi et al., 2006).

#### 5.1.7. Heparin vázající epidermální růstový faktor

Heparin vázající epidermální růstový faktor (HB-EGF = heparin-binding epidermal growth factor) patří do rodiny EGF růstových faktorů, které zvyšují proliferaci a stimuluji neurogenezi v mozku jak za fyziologických podmínek, tak i v ischemicky poškozené nervové tkáni (Jin et al., 2005, Ninomiya et al., 2006). Další společnou vlastností s EGF je jeho účinek na tvorbu nových cév, tzv. angiogenezi, nicméně HB-EGF vykazuje mnohem silnější účinek na angiogenezi než EGF (Sugiura et al., 2005). Receptorem HB-EGF je EGFR/ErbB1, který pro spuštění buněčné proliferace vyžaduje navázání obou domén HB-EGF (jak HB doménu, tak EGF-podobnou doménu), a to i přesto, že pouze HB doména je zodpovědná za optimální navázání HB-EGF na EGFR (Jin et al., 2005).

#### 5.1.8. Insulinu podobný růstový faktor-1

Mezi další faktory, které mají vliv na ochranu neuronů po ischemii, patří i insulinu podobný růstový faktor-1 (IGF-1 = insuline-like growth factor-1), který se podílí především na tvorbě nových cév v mozku. Po ischemickém poranění vznikají jeho vlivem v periinfarktových oblastech malá krevní řečiště se zesíleným průtokem krve, který zvyšuje přežívání nervových buněk a podporuje neurogenezi (Zhu et al., 2008a). Zrychleným průtokem navíc dochází k přísunu většího množství růstových faktorů a látek potřebných pro náhradu poškozené tkáně. Ke zvýšené produkci IGF-1 dochází bezprostředně po ischemii, ale jeho množství není dostatečné pro přirozenou obnovu poškozené oblasti. To lze ovšem zlepšit jeho exogenní aplikací do jedné hodiny po ischemii. Zvýšené množství IGF-1 pak snižuje odumírání buněk apoptózou a zároveň výrazně zvyšuje tvorbu a zrání neuronů a oligodendrocytů (Lin et al., 2009).

#### 5.1.9. Oxid dusnatý

Oxid dusnatý (NO = nitric oxide) patří v biologických systémech k chemickým posílům a funguje jako neurotransmitter v mozku. Je syntetizován z L-argininu třemi isotypy NO syntáz (NOS): neurální, endoteliální a indukovatelnou NOS. V neurálních progenitorových buňkách se nachází endoteliální a neurální NOS. NO zvyšuje proliferaci buněk v SVZ a v GD, a tím významně podporuje neurologické zotavení. Jeho působením roste množství cGMP v mozkové kůře (jak u ischemických, tak u ne-ischemických zvířat), což poukazuje na možný vliv cGMP na buněčnou proliferaci a neurogenezi. NO může zesilovat vápníkové signály v nervových buňkách, a zvyšovat množství vnitrobuněčného  $Ca^{2+}$ , což může opět vést ke zvýšení proliferace nebo ochraně neuronů před buněčnou smrtí. Díky NO migrují progenitorové buňky do míst poškození (Zhang et al., 2001), kde se uplatňují při náhradě mrtvých buněk. Pokud je v mozku před vznikem ischemie přítomné větší množství NO, dochází k ochraně nervových buněk před poškozením (Nandagopal et al., 2001).

#### 5.1.10. Vaskulární endoteliální růstový faktor

Vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF = vascular endothelial growth factor) je růstový faktor, jehož základními vlastnostmi jsou tvorba nových cév a ochrana neuronů. Mezi jeho další vlastnosti patří zmenšování velikosti poškození po ischemii, a následně i zlepšení

motorických funkcí u dospělých jedinců. Dále se podílí na zvýšené neurogenezi v SVZ, a to tak, že umožňuje migraci řetězců A buněk ze SVZ do korové oblasti okolo místa poškození, a zvyšuje počet nově vytvořených korových neuronů (Wang et al., 2007).

## 5.2. Signalizační dráhy ovlivňující neurogenezi a gliogenezi

Dalším možným terapeutickým přístupem k regeneraci ischemicky poškozené nervové tkáně je aktivace signalizačních drah, která by vedla ke zvýšené proliferaci a diferenciaci endogenních kmenových (progenitorových) buněk *in vivo* (Palma et al., 2005).

### 5.2.1. Notch1 signalizační dráha

Notch1 signalizační dráha hraje důležitou úlohu v proliferaci a zrání buněk v dospělém mozku (Breunig et al., 2007). Základem této dráhy je ligand Jagged 1/2 a nebo Delta 1-4, který se váže na transmembránový receptor Notch1. Po navázání dojde k uvolnění vnitrobuněčné Notch1 domény, která vcestuje do jádra, kde se prostřednictvím dalších faktorů podílí na transkripci genů (viz přehledný článek Artavanis-Tsakonas et al., 1999).

Notch1 receptor je exprimován v nově vytvořených neuronech, zatímco Notch1 ligand (Jagged1) se nachází v astrocytech. Výskyt tohoto receptoru a ligandu poukazuje na vzájemnou spolupráci mezi těmito buňkami (Wang et al., 2009b). Dále bylo zjištěno, že ischemie spouští Notch1 dráhu, která se podílí na zvýšené proliferaci progenitorových buněk, a také na jejich diferenciaci v dospělém mozku (Wang et al., 2009a). Pokud dojde k inhibici této dráhy, dojde zároveň i k zablokování neurogeneze. Kromě těchto důležitých funkcí se Notch1 signalizační dráha uplatňuje i při aktivaci Sonic hedgehog genu (Shh), který je základem pro Shh signalizační dráhu (která je popsána níže) (Wang et al., 2009b).

### 5.2.2. Sonic hedgehog signalizační dráha

Sonic hedgehog (Shh = sonic hedgehog homolog) je důležitý faktor, který se v organismu poprvé vyskytuje během rané embryogeneze, a to při ventralizaci nervové trubice při tvorbě CNS (viz přehledný článek Jessell, 2000). Během pozdní embryogeneze působí na kmenové buňky v SVZ a SGZ, z nichž část (tzv. tiché kmenové buňky) je

prostřednictvím Shh signalizace udržována ve stavu, ve kterém mohou produkovat sami sebe a zároveň další typy buněk (Ahn a Joyner, 2005).

Důležitou součástí Shh signalizační dráhy je Gli1, což je transkripční faktor používaný jako marker efektorových buněk Shh signalizační dráhy. V dospělém mozku byly nalezeny dva typy buněk, které ho exprimují, a to B buňky a C buňky. Shh prostřednictvím Gli1 udržuje v dospělém mozku neurogenní potenciál B buněk (Palma et al., 2005) a zodpovídá za zvýšenou proliferaci C buněk. Dále bylo zjištěno, že v nepřítomnosti Shh nedochází k migraci A buněk do OB, ale naopak k jejich hromadění ve striatokortikálním úhlu, kde podléhají apoptóze. To znamená, že kromě vlivu Shh na A a B buňky dochází jeho působením i ke správné migraci A buněk do čichového laloku (Balordi a Fishell, 2007). Při poranění produkují astrocyty zvýšené množství Shh, které působí na zvýšenou proliferaci Olig2-pozitivních buněk, které následně dozrávají v oligodendrocyty. Samotná aktivace Shh-Gli dráhy je způsobena jak poraněním, které aktivuje buněčné zdroje zánětu (mikroglie, makrofágy a astrocyty), tak i přítomností prozánětlivých cytokinů (Amankulor et al., 2009).

### 5.2.3. *Wnt/β-katenin signalizační dráha*

Wnt signalizační dráha je důležitou součástí molekulárních mechanismů probíhajících uvnitř nervových buněk. Tato dráha se uplatňuje při migraci neuronů, navádění rostoucích axonů, vývoji tvaru dendritů a při vývoji synapsí během neurálního vývoje. Základní součástí této dráhy je β-katenin, který aktivuje neurální progenitory a uplatňuje se při diferenciaci a zrání nově vytvořených neuronů (Lei et al., 2008). β-katenin je ovlivňován prostřednictvím Wnt signálu, který když chybí, dojde k fosforylaci β-kateninu glykogen syntázou kinázou-3β (GSK-3β), a takto fosforylovaný β-katenin je degradován v ubiquitin-proteasomální dráze (viz přehledný článek Wodarz a Nusse, 1998).

Signalizace β-kateninem je spouštěna v B a C buňkách (Adachi et al., 2007). V B buňkách je β-katenin zodpovědný za regulaci jejich proliferace a schopnost sebeobnovy v přítomnosti EGF a FGF, a to prostřednictvím TLX receptoru (což je orfanový jaderný receptor), který aktivuje Wnt/β-katenin signalizační dráhu v dospělé SVZ. TLX je důležitým bodem, který je zodpovědný za udržování rovnováhy mezi sebeobnovou a diferenciací B buněk (Qu et al., 2010). V C buňkách je pak β-katenin příčinou zvýšené proliferace těchto buněk, ale neuplatňuje se při jejich dalším dozrávání na A buňky (Adachi et al., 2007). Součástí Wnt signalizační dráhy jsou i faktory, které ji negativně regulují. Příkladem může

být Dickkopf-1 (Dkk-1 = Dickkopf related protein 1), u kterého bylo zjištěno, že jeho inhibicí (například pomocí oligonukleotidů, které ho blokují) dochází k ochraně neuronů před spuštěním programu, který končí jejich smrtí. Stejného efektu je dosaženo i inhibicí GSK-3 $\beta$  (Cappuccio et al., 2005).

## 6. Závěr

Objasnění mechanismů, které se podílí na regeneraci nervové tkáně, je naprosto nezbytné pro vývoj léčebných strategií ischemicky poškozeného CNS, ale i pro vytvoření způsobů prevence před tímto civilizačním onemocněním. I přesto, že se v této oblasti výzkumu intenzivně bádá a existuje řada publikací na toto téma, získané výsledky jsou zatím nedostatečné pro vývoj vhodných léčebných postupů. Příčinou je poměrně velké množství neprozkoumaných mechanismů na buněčné a molekulární úrovni, ale i to, že většina prací je prováděna na myších a potkanech, jejichž fyziologie se podobá lidské jen v některých aspektech. Kromě toho, zavádění nových terapeutických přístupů do klinické praxe s sebou přináší i etické problémy. Dalším z mnoha problémů je i to, že myši a potkani, na kterých je výzkum prováděn, jsou relativně mladí jedinci. Je sice dokázáno, že se stoupajícím věkem dochází ke zvyšování neurogeneze, ale také, že klesá schopnost nově vytvořených buněk ve starším organismu přežít. Ve výsledku je pak u starších jedinců množství nově vytvořených buněk, které přežily, sedmkrát nižší (viz přehledný článek Lichtenwalner a Parent, 2006).

Po ischemickém poranění CNS dochází u nervových buněk k řadě specifických reakcí, jejichž objasnění je základem pro další výzkum zaměřený na ovlivňování vlastností a chování nervových buněk po ischemii nebo na zvýšení produkce faktorů přispívajících ke zvýšené neurogenezi a gliogenezi v mozku či na transplantaci neurálních kmenových buněk do ischemické léze. V oblasti výzkumu regenerace dospělého CNS bylo v posledních letech dosaženo výrazného pokroku, především v odhalení proliferačního a diferenciačního potenciálu NG2 gliových buněk v poškozeném CNS. Vzhledem k tomu, že NG2 gliové buňky jsou schopné diferenciovat v oligodendrocyty, astrocyty a pravděpodobně i neurony, další výzkum by měl být zaměřen na cílenou diferenciaci NG2 glií do těchto buněčných typů. Přestože vliv růstových faktorů na neurogenezi a gliogenezi je poměrně dobře prozkoumán, jejich úloha v proliferaci a diferenciaci NG2 gliových buněk zůstává neobjasněna.



## 7. Seznam literatury

### Literární zdroje:

- Adachi K, Mirzadeh Z, Sakaguchi M, Yamashita T, Nikolcheva T, Gotoh Y, Peltz G, Gong L, Kawase T, Alvarez-Buylla A, Okano H, Sawamoto K (Beta-catenin signaling promotes proliferation of progenitor cells in the adult mouse subventricular zone. *Stem Cells* 25:2827-2836.2007).
- Ahn S, Joyner AL (In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog. *Nature* 437:894-897.2005).
- Altman J, Das GD (Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124:319-335.1965).
- Amankulor NM, Hambarzumyan D, Pyontek SM, Becher OJ, Joyce JA, Holland EC (Sonic hedgehog pathway activation is induced by acute brain injury and regulated by injury-related inflammation. *J Neurosci* 29:10299-10308.2009).
- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ (Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284:770-776.1999).
- Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O (Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 8:963-970.2002).
- Arvidsson A, Kokaia Z, Lindvall O (N-methyl-D-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke. *Eur J Neurosci* 14:10-18.2001).
- Bakshi A, Shimizu S, Keck CA, Cho S, LeBold DG, Morales D, Arenas E, Snyder EY, Watson DJ, McIntosh TK (Neural progenitor cells engineered to secrete GDNF show enhanced survival, neuronal differentiation and improve cognitive function following traumatic brain injury. *Eur J Neurosci* 23:2119-2134.2006).
- Baldauf K, Reymann KG (Influence of EGF/bFGF treatment on proliferation, early neurogenesis and infarct volume after transient focal ischemia. *Brain Res* 1056:158-167.2005).
- Balordi F, Fishell G (Hedgehog signaling in the subventricular zone is required for both the maintenance of stem cells and the migration of newborn neurons. *J Neurosci* 27:5936-5947.2007).
- Belachew S, Chittajallu R, Aguirre AA, Yuan X, Kirby M, Anderson S, Gallo V (Postnatal NG2 proteoglycan-expressing progenitor cells are intrinsically multipotent and generate functional neurons. *J Cell Biol* 161:169-186.2003).
- Bonaguidi MA, McGuire T, Hu M, Kan L, Samanta J, Kessler JA (LIF and BMP signaling generate separate and discrete types of GFAP-expressing cells. *Development* 132:5503-5514.2005).
- Breunig JJ, Silbereis J, Vaccarino FM, Sestan N, Rakic P (Notch regulates cell fate and dendrite morphology of newborn neurons in the postnatal dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:20558-20563.2007).
- Burns KA, Murphy B, Danzer SC, Kuan CY (Developmental and post-injury cortical gliogenesis: a genetic fate-mapping study with Nestin-CreER mice. *Glia* 57:1115-1129.2009a).
- Burns TC, Verfaillie CM, Low WC (Stem cells for ischemic brain injury: a critical review. *J Comp Neurol* 515:125-144.2009b).
- Cappuccio I, Calderone A, Busceti CL, Biagioni F, Pontarelli F, Bruno V, Storto M, Terstappen GT, Gviraghi G, Fornai F, Battaglia G, Melchiorri D, Zukin RS,

- Nicoletti F, Caricasole A (Induction of Dickkopf-1, a negative modulator of the Wnt pathway, is required for the development of ischemic neuronal death. *J Neurosci* 25:2647-2657.2005).
- Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB (ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 8:752-758.2005).
- Dayer AG, Ford AA, Cleaver KM, Yassaee M, Cameron HA (Short-term and long-term survival of new neurons in the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 460:563-572.2003).
- Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 36:1021-1034.2002).
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4:1313-1317.1998).
- Hunter AJ, Green AR, Cross AJ (Animal models of acute ischaemic stroke: can they predict clinically successful neuroprotective drugs? *Trends Pharmacol Sci* 16:123-128.1995).
- Chmielnicki E, Benraiss A, Economides AN, Goldman SA (Adenovirally expressed noggin and brain-derived neurotrophic factor cooperate to induce new medium spiny neurons from resident progenitor cells in the adult striatal ventricular zone. *J Neurosci* 24:2133-2142.2004).
- Choi SH, Li Y, Parada LF, Sisodia SS (Regulation of hippocampal progenitor cell survival, proliferation and dendritic development by BDNF. *Mol Neurodegener* 4:52.2009).
- Jessell TM (Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* 1:20-29.2000).
- Jin-qiao S, Bin S, Wen-hao Z, Yi Y (Basic fibroblast growth factor stimulates the proliferation and differentiation of neural stem cells in neonatal rats after ischemic brain injury. *Brain Dev* 31:331-340.2009).
- Jin K, Mao XO, Del Rio Guerra G, Jin L, Greenberg DA (Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor stimulates cell proliferation in cerebral cortical cultures through phosphatidylinositol 3'-kinase and mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci Res* 81:497-505.2005).
- Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Bateur S, Simon RP, Greenberg DA (Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4710-4715.2001).
- Kaneko N, Sawamoto K (Adult neurogenesis and its alteration under pathological conditions. *Neurosci Res* 63:155-164.2009).
- Kirino T, Sano K (Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia. *Acta Neuropathol* 62:201-208.1984).
- Kudo M, Aoyama A, Ichimori S, Fukunaga N (An animal model of cerebral infarction. Homologous blood clot emboli in rats. *Stroke* 13:505-508.1982).
- Lee SR, Kim HY, Rogowska J, Zhao BQ, Bhide P, Parent JM, Lo EH (Involvement of matrix metalloproteinase in neuroblast cell migration from the subventricular zone after stroke. *J Neurosci* 26:3491-3495.2006).
- Lei ZN, Zhang LM, Sun FY (Beta-catenin siRNA inhibits ischemia-induced striatal neurogenesis in adult rat brain following a transient middle cerebral artery occlusion. *Neurosci Lett* 435:108-112.2008).
- Levine JM, Reynolds R, Fawcett JW (The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. *Trends Neurosci* 24:39-47.2001).

- Lichtenwalner RJ, Parent JM (Adult neurogenesis and the ischemic forebrain. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:1-20.2006).
- Lin S, Fan LW, Rhodes PG, Cai Z (Intranasal administration of IGF-1 attenuates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Exp Neurol* 217:361-370.2009).
- Liu R, Suzuki A, Guo Z, Mizuno Y, Urabe T (Intrinsic and extrinsic erythropoietin enhances neuroprotection against ischemia and reperfusion injury in vitro. *J Neurochem* 96:1101-1110.2006).
- Merkle FT, Mirzadeh Z, Alvarez-Buylla A (Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science* 317:381-384.2007).
- Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell* 3:265-278.2008).
- Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Tamura A, Kirino T, Nakafuku M (Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 110:429-441.2002).
- Nandagopal K, Dawson TM, Dawson VL (Critical role for nitric oxide signaling in cardiac and neuronal ischemic preconditioning and tolerance. *J Pharmacol Exp Ther* 297:474-478.2001).
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308:1314-1318.2005).
- Ninomiya M, Yamashita T, Araki N, Okano H, Sawamoto K (Enhanced neurogenesis in the ischemic striatum following EGF-induced expansion of transit-amplifying cells in the subventricular zone. *Neurosci Lett* 403:63-67.2006).
- Nishiyama A, Komitova M, Suzuki R, Zhu X (Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nat Rev Neurosci* 10:9-22.2009).
- Ohta K, Iwai M, Sato K, Omori N, Nagano I, Shoji M, Abe K (Dissociative increase of oligodendrocyte progenitor cells between young and aged rats after transient cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 335:159-162.2003).
- Palma V, Lim DA, Dahmane N, Sanchez P, Brionne TC, Herzberg CD, Gitton Y, Carleton A, Alvarez-Buylla A, Ruiz i Altaba A (Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* 132:335-344.2005).
- Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH (Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 425:479-494.2000).
- Pastrana E, Cheng LC, Doetsch F (Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:6387-6392.2009).
- Peretto P, Giachino C, Aimar P, Fasolo A, Bonfanti L (Chain formation and glial tube assembly in the shift from neonatal to adult subventricular zone of the rodent forebrain. *J Comp Neurol* 487:407-427.2005).
- Petersen MA, Dailey ME (Diverse microglial motility behaviors during clearance of dead cells in hippocampal slices. *Glia* 46:195-206.2004).
- Pforte C, Henrich-Noack P, Baldauf K, Reymann KG (Increase in proliferation and gliogenesis but decrease of early neurogenesis in the rat forebrain shortly after transient global ischemia. *Neuroscience* 136:1133-1146.2005).
- Pulsinelli WA, Buchan AM (The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. *Stroke* 19:913-914.1988).

- Qu Q, Sun G, Li W, Yang S, Ye P, Zhao C, Yu RT, Gage FH, Evans RM, Shi Y (Orphan nuclear receptor TLX activates Wnt/beta-catenin signalling to stimulate neural stem cell proliferation and self-renewal. *Nat Cell Biol* 12:31-40; sup pp 31-39.2010).
- Rudge JS, Silver J (Inhibition of neurite outgrowth on astroglial scars in vitro. *J Neurosci* 10:3594-3603.1990).
- Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Perez O, Cholfin JA, Yamada M, Spassky N, Murcia NS, Garcia-Verdugo JM, Marin O, Rubenstein JL, Tessier-Lavigne M, Okano H, Alvarez-Buylla A (New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science* 311:629-632.2006).
- Seri B, Garcia-Verdugo JM, Collado-Morente L, McEwen BS, Alvarez-Buylla A (Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J Comp Neurol* 478:359-378.2004).
- Sharkey J, Butcher SP (Characterisation of an experimental model of stroke produced by intracerebral microinjection of endothelin-1 adjacent to the rat middle cerebral artery. *J Neurosci Methods* 60:125-131.1995).
- Shyu WC, Lin SZ, Yang HI, Tzeng YS, Pang CY, Yen PS, Li H (Functional recovery of stroke rats induced by granulocyte colony-stimulating factor-stimulated stem cells. *Circulation* 110:1847-1854.2004).
- Schabitz WR, Steigleder T, Cooper-Kuhn CM, Schwab S, Sommer C, Schneider A, Kuhn HG (Intravenous brain-derived neurotrophic factor enhances poststroke sensorimotor recovery and stimulates neurogenesis. *Stroke* 38:2165-2172.2007).
- Smith ML, Bendek G, Dahlgren N, Rosen I, Wieloch T, Siesjo BK (Models for studying long-term recovery following forebrain ischemia in the rat. 2. A 2-vessel occlusion model. *Acta Neurol Scand* 69:385-401.1984).
- Sugiura S, Kitagawa K, Tanaka S, Todo K, Omura-Matsuoka E, Sasaki T, Mabuchi T, Matsushita K, Yagita Y, Hori M (Adenovirus-mediated gene transfer of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor enhances neurogenesis and angiogenesis after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 36:859-864.2005).
- Suh H, Consiglio A, Ray J, Sawai T, D'Amour KA, Gage FH (In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 1:515-528.2007).
- Sun D, Bullock MR, McGinn MJ, Zhou Z, Altememi N, Hagood S, Hamm R, Colello RJ (Basic fibroblast growth factor-enhanced neurogenesis contributes to cognitive recovery in rats following traumatic brain injury. *Exp Neurol* 216:56-65.2009).
- Thored P, Arvidsson A, Cacci E, Ahlenius H, Kallur T, Darsalia V, Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O (Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem Cells* 24:739-747.2006).
- Toni N, Laplagne DA, Zhao C, Lombardi G, Ribak CE, Gage FH, Schinder AF (Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nat Neurosci* 11:901-907.2008).
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH (Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415:1030-1034.2002).
- Wakida K, Shimazawa M, Hozumi I, Satoh M, Nagase H, Inuzuka T, Hara H (Neuroprotective effect of erythropoietin, and role of metallothionein-1 and -2, in permanent focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 148:105-114.2007).
- Wang L, Chopp M, Zhang RL, Zhang L, Letourneau Y, Feng YF, Jiang A, Morris DC, Zhang ZG (The Notch pathway mediates expansion of a progenitor pool and neuronal

- differentiation in adult neural progenitor cells after stroke. Neuroscience 158:1356-1363.2009a).*
- Wang X, Mao X, Xie L, Greenberg DA, Jin K (Involvement of Notch1 signaling in neurogenesis in the subventricular zone of normal and ischemic rat brain in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 29:1644-1654.2009b).
- Wang Y, Jin K, Mao XO, Xie L, Banwait S, Marti HH, Greenberg DA (VEGF-overexpressing transgenic mice show enhanced post-ischemic neurogenesis and neuromigration. *J Neurosci Res* 85:740-747.2007).
- Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS, Ginsberg MD (Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol* 17:497-504.1985).
- Wodarz A, Nusse R (Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14:59-88.1998).
- Yamashita T, Ninomiya M, Hernandez Acosta P, Garcia-Verdugo JM, Sunabori T, Sakaguchi M, Adachi K, Kojima T, Hirota Y, Kawase T, Araki N, Abe K, Okano H, Sawamoto K (Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci* 26:6627-6636.2006).
- Yamori Y, Horie R, Handa H, Sato M, Fukase M (Pathogenetic similarity of strokes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats and humans. *Stroke* 7:46-53.1976).
- Young KM, Fogarty M, Kessaris N, Richardson WD (Subventricular zone stem cells are heterogeneous with respect to their embryonic origins and neurogenic fates in the adult olfactory bulb. *J Neurosci* 27:8286-8296.2007).
- Zhang R, Zhang L, Zhang Z, Wang Y, Lu M, Lapointe M, Chopp M (A nitric oxide donor induces neurogenesis and reduces functional deficits after stroke in rats. *Ann Neurol* 50:602-611.2001).
- Zhang R, Zhang Z, Wang L, Wang Y, Gousev A, Zhang L, Ho KL, Morshead C, Chopp M (Activated neural stem cells contribute to stroke-induced neurogenesis and neuroblast migration toward the infarct boundary in adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 24:441-448.2004).
- Zhao JW, Raha-Chowdhury R, Fawcett JW, Watts C (Astrocytes and oligodendrocytes can be generated from NG2+ progenitors after acute brain injury: intracellular localization of oligodendrocyte transcription factor 2 is associated with their fate choice. *Eur J Neurosci* 29:1853-1869.2009).
- Zhu W, Fan Y, Frenzel T, Gasmi M, Bartus RT, Young WL, Yang GY, Chen Y (Insulin growth factor-1 gene transfer enhances neurovascular remodeling and improves long-term stroke outcome in mice. *Stroke* 39:1254-1261.2008a).
- Zhu X, Bergles DE, Nishiyama A (NG2 cells generate both oligodendrocytes and gray matter astrocytes. *Development* 135:145-157.2008b).

**Internetové zdroje:**

<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ab/HippocampalRegions.jpg>  
staženo dne 16.3.2010

<http://eltex.wgz.cz/mozkova-mrtvice>  
staženo dne 2.4.2010

[http://www.medicabaze.cz/index.php?sec=term\\_detail&categId=22&cname=Neurologie&letter=C&termId=1205&tname=C%C3%A9vn%C3%AD+mozkov%C3%A9+p%C5%99%C3%ADhody+ischemick%C3%A9&h=empty#jump](http://www.medicabaze.cz/index.php?sec=term_detail&categId=22&cname=Neurologie&letter=C&termId=1205&tname=C%C3%A9vn%C3%AD+mozkov%C3%A9+p%C5%99%C3%ADhody+ischemick%C3%A9&h=empty#jump)  
staženo dne 2.4. 2010