

Effekt af ikke-ioniserende stråling på den neurale udvikling og den voksne hjerne

Eksperimentelle studier på organotypiske skivekulturer af hjernevæv og neurale stamceller fra menneske og gnavere

Syddansk Universitet - Anatomi og Neurobiologi, Institut for Medicinsk Biologi

Jens Zimmer Rasmussen, professor, dr. med. (koordinator)

Nedimé Serakinci, adjunkt, PhD

Morten Meyer, lektor, PhD

Nils H. Diemer, prof, dr. med., (gæsteprofessor)

Københavns Universitet, Institut for Medicinsk Fysiologi

Henrik Jahnsen, lektor, dr. med.

Aalborg Universitet, Institut for Fysik og Nanoteknologi (Biostructure and Protein Engeneering)

Steffen B. Petersen, professor, PhD

Eksterne partnere

Volkert Hansen, Professor, Dr.-Ing., Lehrstuhl f. Theoretische Elektrotechnik, Bergische Universität Wuppertal, Deutschland

W. Nicol Keith, professor, PhD, Beatson laboratory, Cancer Research UK, Glasgow

Steen Kølvrå, professor., dr. med., Klinisk Genetik, Vejle Sygehus - Syddansk Universitet

Effekt af ikke-ioniserende stråling på den neurale udvikling og den voksne hjerne

Eksperimentelle studier på organotypiske skivekulturer af hjernevæv og neurale stamceller fra menneske og gnavere

Tidligere studier af ikke-ioniserende stråling indenfor mobiltlf. frekvensområdet:

Effekt på hjerneaktivitet (EEG), gliacelle aktivering, neurokemiske ændringer, tab af nerveceller.

Forskellige testopstillinger, variation i dyreart og celletype, især primære cellekulturer og cellelinier.

Kan resultater overføres til mennesket?

Formål med dette projekt:

Eliminere tekniske uregelmæssigheder/forskelle og reducere problemer med overførsel af resultater fra celle til organ og fra dyr til menneske (the biological gap).

Hvordan?

Anvende ensartet bestrålingsprotokol på alt biologisk materiale (Prof. V. Hansen et al., Wuppertal).

Inkludere menneskeceller og -væv.

Anvende organotypiske skivekulturer af hjernevæv, som i langt højere grad end alm. cellekulturer svarer til forholdene i hjernen.

Effekt af ikke-ioniserende stråling på den neurale udvikling og den voksne hjerne

Eksperimentelle studier på organotypiske skivekulturer af hjernevæv og neurale stamceller fra menneske og gnavere

Organsystem

Hjernen og primært hippocampus, beliggende inderst i tindingelappen, ud for øret.

Hippocampus

- Veldefineret struktur med tydelige cellelag og kendte nerveforbindelser
- Veletablerede funktionelle elektrofysiologiske metoder til monitorering af signaloverførsel mellem celler
- Relevante funktioner (indlæring og hukommelse)
- Kendte reaktioner på beskadigelse, herunder tab af celler ved kredsløbssvigt (iskæmi) og epilepsi;
- Etablerede eksperimentelle modeller for celletab og beskadigelse baseret på organotypiske skivekulturer.
- Nydannelse af nerveceller og gliaceller fra stamceller også i den voksne hippocampus

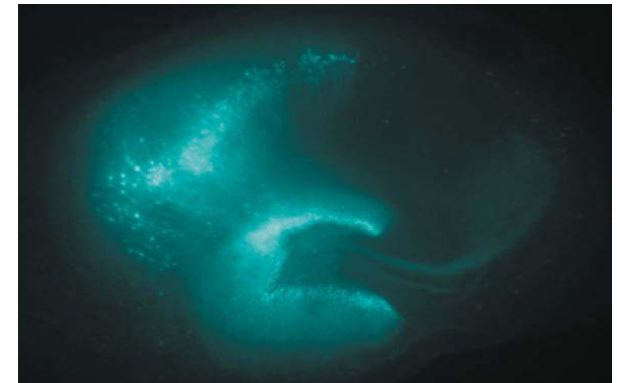
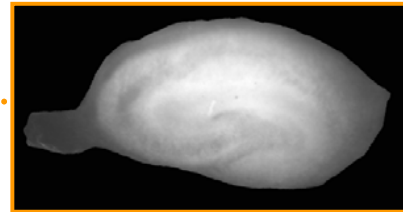
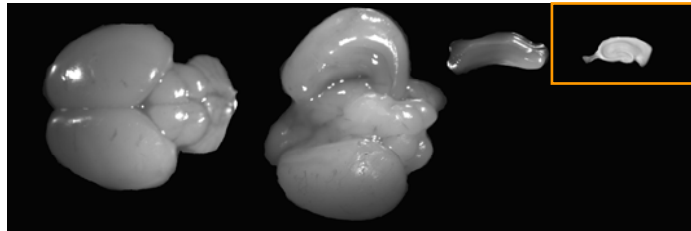
Neurale stamceller

- Neurale stamceller i hippocampale skivekulturer og skivekulturer af umoden hjernebark (neocortex)
- Neurale stamceller fra siderne af hjernens hulrum (den subventrikulære zone), opformeret som celleaggregat- eller neurosfærekulturer

Kilder til væv: Rotter, transgene mus med fluorescerende nerve- og gliaceller

Umødent hjernevæv fra fostre (med tilladelse fra lokal videnskabetisk komité)

Opsætning af organotypiske hippocampale skivekulturer



Der kræves QuickTime™ og et Photo - JPEG-komprimeringsværktøj, for at man kan se dette billede.

Neurosfære-kultur af neurale stamceller

Der kræves QuickTime™ og et Video-komprimeringsværktøj, for at man kan se dette billede.

Effekt af ikke-ioniserende stråling på den neurale udvikling og den voksne hjerne
Eksperimentelle studier på organotypiske skivekulturer af hjernevæv og neurale stamceller
fra menneske og gnavere

Arbejdsopgave 1: Tilpasning af stråleudstyr

Prof. V. Hansen et al. (www.tet.uni-wuppertal.de/eng/index.html) har produceret udstyr til stråling og måling af stråling indenfor mobiltelefon-frekvensområderne (900, 1800 og 2000 MHz med lav og intermitterende høj feltstyrke imiterende sendemaster og mobiltelefoner) til en lang række tyske laboratorier.

Udstyret tilpasses eksponering af skivekulturer af hjernevæv og neurosfærer af stamceller med mulighed for eksponering i op til 3 uger eller længere.

Alle udregninger af eksponeringer, inkl. "specific absorption rates" (SAR værdier) foreståes af prof. V. Hansen og medarbejdere. Data opsamles on-line og sendes til Wuppertal for monitorering af eksponering.

Effekt af ikke-ioniserende stråling på den neurale udvikling og den voksne hjerne
Eksperimentelle studier på organotypiske skivekulturer af hjernevæv og neurale stamceller
fra menneske og gnavere

Arbejdsopgave 2: Strukturelle og molekylære undersøgelser af hippocampale skivekulturer fra mus/rotter og skivekulturer af human hjernebark udsat for stråling.

Endpoints:

Ændringer i glutamat-receptorer (cellulær ekspresion og funktion) og cytoskeleton-, stress- og synapseproteiner, inkl. ændret følsomhed for toksisk påvirkning.

Ændringer i nydannelsen af nerveceller.

Ændringer i den normale dynamik af nervecellers morfologi under udviklingen og ved let beskadigelse, undersøgt ved time-lapse mikroskopi af fluorescerende nerveceller.

Arbejdsopgave 3: Funktionelle elektrofysiologiske studier af stråleeksponerede hippocampale skivekulturer fra mus/rotter og skivekulturer af human hjernebark.

Endpoints:

Ændringer i nervecellers følsomhed for stimulation og dannelse af nerveimpulser ved direkte stimulation og elektrofysiologisk og farmakologisk aktivering af synaptiske forbindelser.

Ændringer i evnen til at styrke den synaptiske overførsel af nerveimpulser ved gentagen stimulation (long-term potentiation), - en cellulær mekanisme koblet til indlæring og hukommelse.

Effekt af ikke-ioniserende stråling på den neurale udvikling og den voksne hjerne
Eksperimentelle studier på organotypiske skivekulturer af hjernevæv og neurale stamceller
fra menneske og gnavere

Arbejdsopgave 4: Undersøgelse af stabilitet i arvemassen (DNA og kromosomer) og ændringer i kernekromatin i bestrålede skivekulturer af hjernevæv, stamcellekulturer (neurosfærer) og neurale cellelinier.

Endpoints:

Forskelle i DNA skader og reparationsevne mellem normale og bestrålede celler.

Ændringer i cellekernens kromation, som er medbestemmende for miljømæssig (epigenetisk) regulering af gen-aktivering, inkl. de eventuelle ændringers effekt på cellernes evne til deling og udvikling.

Arbejdsopgave 5: Virkning af ikke-ioniseret stråling på humane neurale stamcellers evne til deling og udvikling til nerveceller og gliaceller.

Endpoints:

Bestemmelse af base-line for humane neurosfære stamcellers evne til celledeling og udvikling til nerve- og gliaceller, og virkningen af ikke-ioniseret stråling herpå.

Sammenligning af resultaterne vedr. celledeling og -udvikling fra studiet af humane neurale cellelinier og skivekulturer med resultatet af undersøgelserne for DNA skade og reparation mhp en vurdering af de involverede mekanismer og implikationerne heraf.

Effekt af ikke-ioniserende stråling på den neurale udvikling og den voksne hjerne
Eksperimentelle studier på organotypiske skivekulturer af hjernevæv og neurale stamceller
fra menneske og gnavere

Partner ekspertise:

Prof. V. Hansen, Wuppertal: Levering og service af stråleenhed og effektudregninger.

Prof. S. Petersen, Aalborg: Ekstra stråleenhed og bistand vedr. stråleeffekt på biologisk materiale (proteiner).

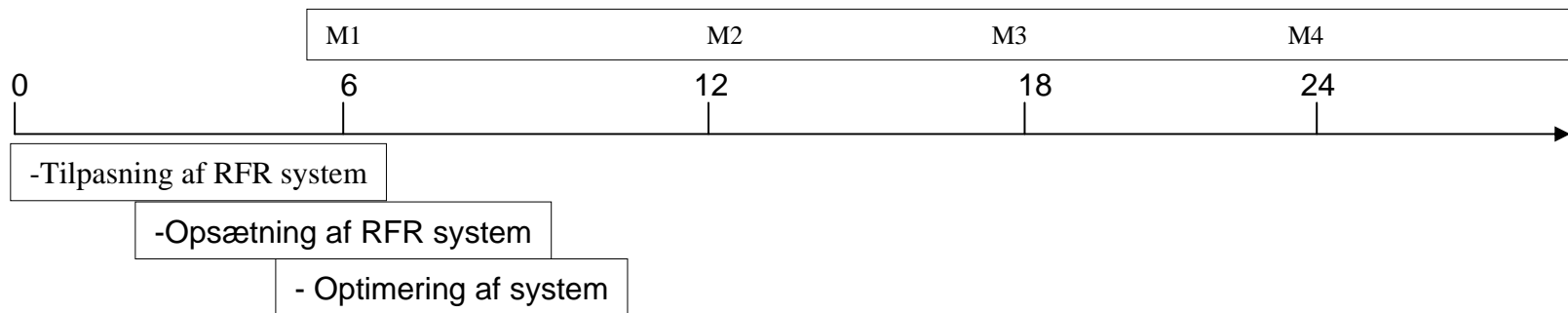
Lektor H. Jahnsen, København: Funktionelle elektrofysiologiske studier.

Prof. N. Diemer, Kbh./Odense: Studiet af glutamatreceptorer og signalstoffer.

Projektkoordinator, prof. J. Zimmer, Odense: Opsætning, time-lapse og strukturel/molekylær analyse af skivekulturer under udvikling og modning.

Lektor M. Meyer, Odense: Frembringelse og analyse af neurale cellelinier og neurosfærer i udviklingsstudier.

Adjunkt N. Serakinci, Odense, prof. S. Kølvrå, Vejle og prof. K. Nicol, Glasgow: Molekylærbiologiske studier af DNA skade og reparation.



WP1 Structural and molecular analyses of RFR exposed, slice cultures	Optimizing the cultures and tools	Opsætning af organotypiske skivekulturer -RFR eksponering af kulturer - Analyse af mindre strukturelle effekter ved mikroskopi - Neuroproliferation studier - Glutame receptor and stress studier	Finalizing the experiments and reporting
WP2 Functional electrophysiological analysis of RFR-exposed, slice cultures.		RFR eksponering af skivekulturer - standardiserede elektrofysiologiske målinger - tærskel for aktionspotentialer -Synaptisk transmission	
WP3 DNA and telomere stability and chromatin modifications in RFR-exposed, slice cultures, neurospheres and neural cell lines		-Long term potentiation (LTP) RFR exposure of the cultures and cells as WP1 - DNA damage/repair assays - Telomere studies - chromatin environment studies	
WP4 RFR-effects on human neural cell proliferation and differentiation		Fremstilling af humane neurosfærer -RFR eksponering - experimentael evaluation af differentiering og proliferatiation	

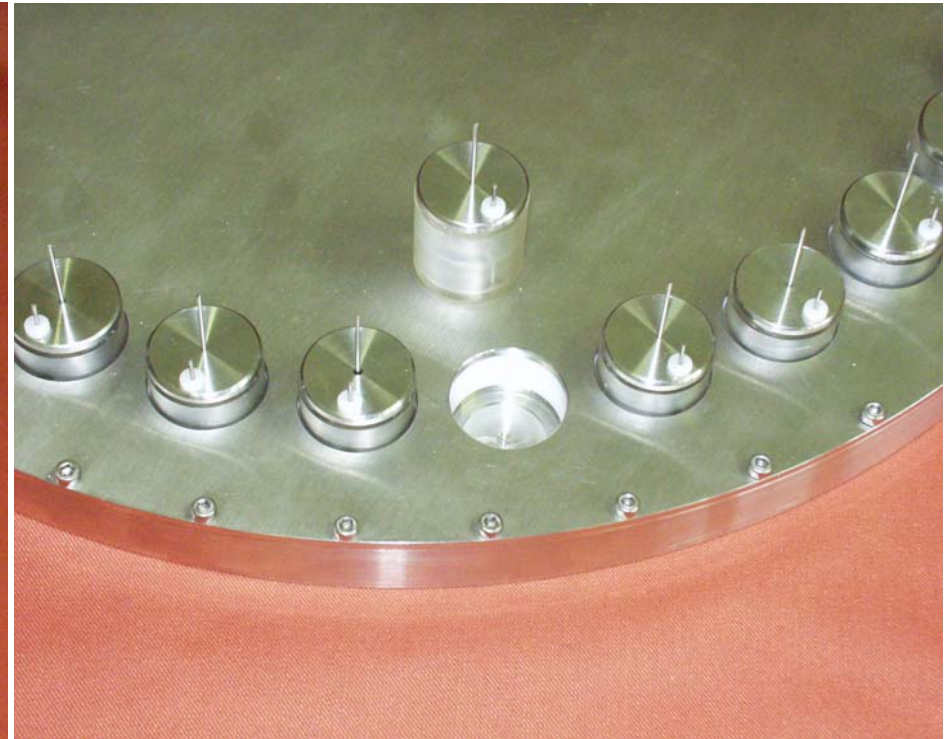
- M1: Establishment of the culture protocols for RFR exposure and the RFR exposure system for UMTS (2000KHz)
- M2: Finalization of the UMTS/RFR exposure and analyse the results, set up new RFR exposure for GSM1(1800KHz)
- M3: Finalization of the GSM1/RFR exposure and analyse the results, set up new RFR exposure for GSM2 (900KHz)
- M4: Finalization of the GSM2/RFR exposure and analyse the results and final report

Implemented radial waveguides

Exposure and sham exposure with 30 vessels each. Total diameter: 40 cm

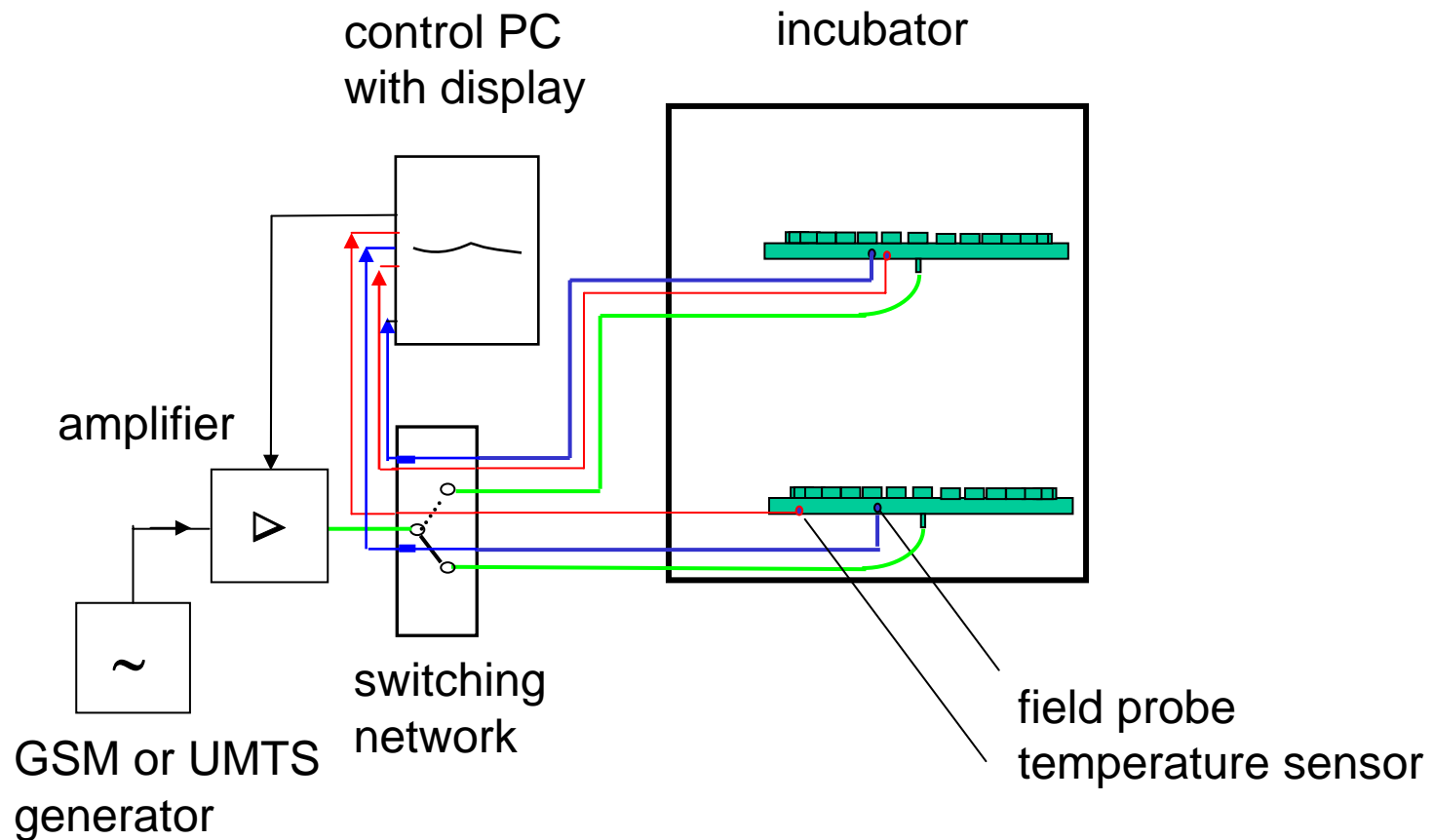


Radial waveguides



Partial view of a radial waveguide

Scheme of the exposure setup



3. okt. 2005

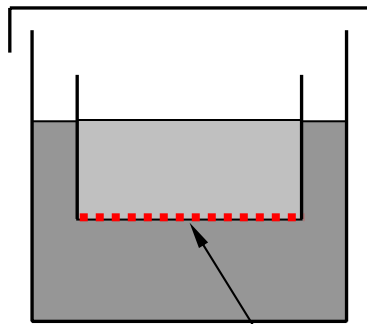
RF exposure system for brain slice cultures to be modified for the requirements of the actual investigations

V. Hansen, J. Streckert, A. Bitz

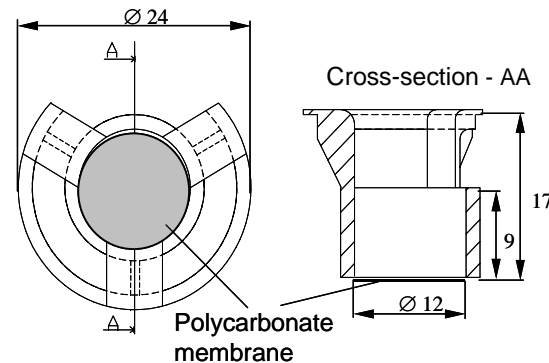
Chair of Electromagnetic Theory, University of Wuppertal, Germany

Culture vessel

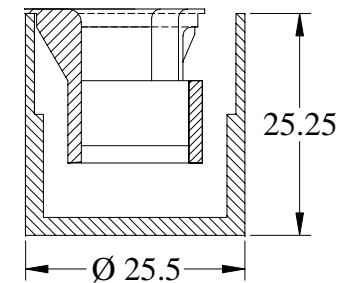
For improvement of exposure quality 5x6 well culture trays must be split into 30 single vessels



Principle:
Insert with polycarbonat membrane and liquid-filled vessel

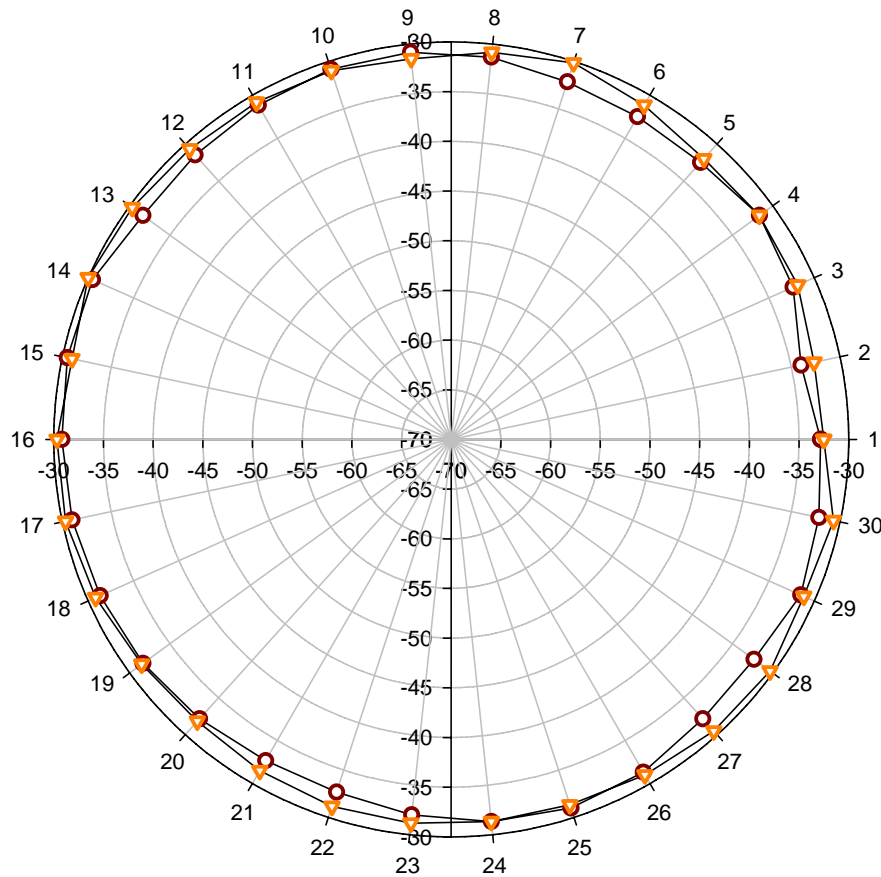


insert + receptacle



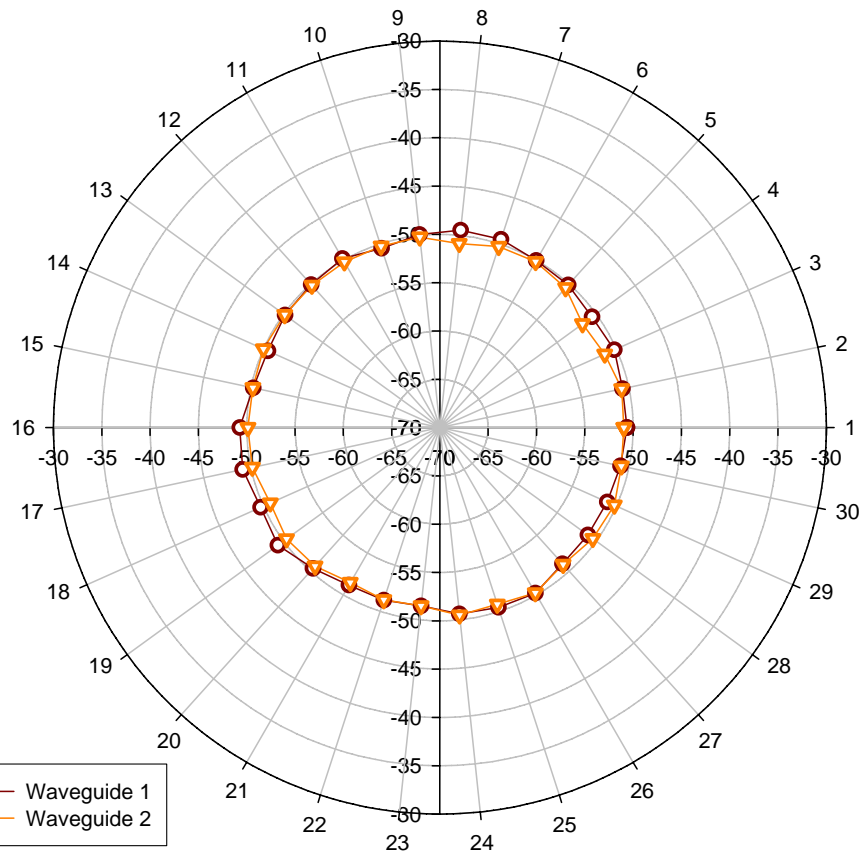
Technical implementation:
Commercially available insert and customised vessel made of polycarbonat (dimensions in mm)

Measured angular field distribution



empty vessels

$$\sigma_E \approx \pm 8\%$$



vessels filled with nutrient solution

$$\sigma_E \approx \pm 6.5\%$$

Modifications for the actual investigations

- 18 vessels per waveguide
- Size and shape of vessels to be decided in discussion with project partners
- Height and diameter of radial waveguides to be changed according to the necessary space for actual vessels
- Numerical dosimetry to be performed on the basis of final waveguide design