

Nydannelse av hjerneceller - en målestokk for miljøpåvirkning?

Telling av nydannede hjerneceller under gitte miljøforhold kan være et nytt, følsomt og effektivt verktøy for å måle miljøpåvirkning på dyr.

Gro og Terje van der Meeren, Forskningsstasjonen Austevoll, p.t. ved Beltz Laboratory, Wellesley College, Massachusetts, USA

Miljøeffekter på marine organismer er et stort og meget viktig forskningsfelt. Mål på dødelighet og vekst, produksjon av avkom, feildannelser og atferd benyttes ofte for å se på miljøeffekter, både i naturen og i oppdrett. Død er et klart, men uopprettelig resultat av et skadelig miljø. Et mål på skadelig grensenivå har vært 50 % dødelighet, men dette vil for mange også være uakseptabelt. Effekter på produktivitet, vekst og feilutvikling tar tid å se. En uønsket miljøpåvirkning på et tidlig tidspunkt kan lett oversees før det uopprettelige resultatet kan måles. Atferdsendringer kan skje raskt men er ofte vanskelig å tolke. Hjernen, det mest energikrevende og følsomme organet i kroppen, påvirkes trolig meget raskt av selv lave verdier av ytre stimuli, det være seg lukt, syn, temperatur, næring, aktivitet eller giftstoffer.

Det er med hjernen som indikator vi ønsker å kunne gjennomføre forskning relatert til miljø, oppdrett og velferd. Håpet er å kunne undersøke om selv små og tilsynelatende ufarlige endringer i det ytre miljøet vil ha noen effekter på nydannelse av hjerneceller.

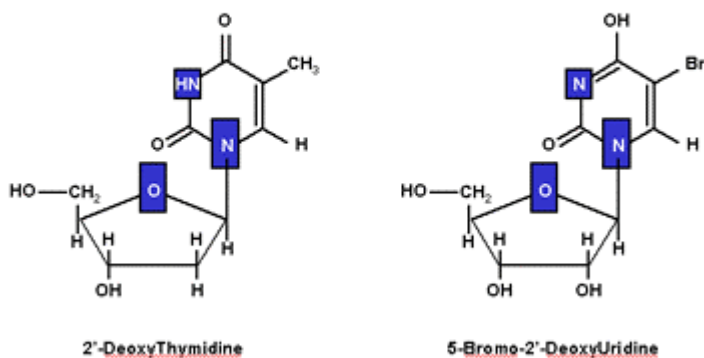
Bakgrunn for utenlandsoppholdet

Gro og Terje van der Meeren, fra Havforskningsinstituttet, er i gang med å læres opp i en rask, pålitelig og enkel undersøkelse som direkte måler hjernens evne til å danne nye nerveceller. Evnen til å lage nye celler opprettholdes faktisk gjennom hele livet, hos både virveldyr og virvelløse dyr. Dette er nå godt dokumentert, siden det i de siste ca. 20 årene er utviklet en analysemetoden som tillater oss å telle slike nyfødte nerveceller. Ved hjelp av det kjemiske stoffet 5-bromo-2'-deoksiuridin (BrdU) kan antall nerveceller som blir født over en gitt tidsperiode måles direkte. Endringer i miljøet har vist seg å kunne gi forskjell i antall

”hjernecellefødsler” per tidsenhet etter kort tids eksponering. BrdU-analysene gir derfor raskt statistisk brukbare resultater. Målet med gjesteforskeroppholdet ved Beltz laboratorium er å utvikle den videre med tanke på å bruke den ved både miljø-, akvakultur- og klimarelatert forskning. I akvakultur er for eksempel oppdrettsmiljøet i de tidlige livsstadiene svært forskjellig fra hva larver og yngel er tilpasset til i naturen. Samtidig er det velkjent at det er en stor grad av feilutvikling ved yngeloppdrett av fisk. I forbindelse med havbeite, så er det også påvist atferdsforskjeller hos tilsynelatende korrekt utviklete dyr.

BrdU analysen, en histofytokjemisk metode

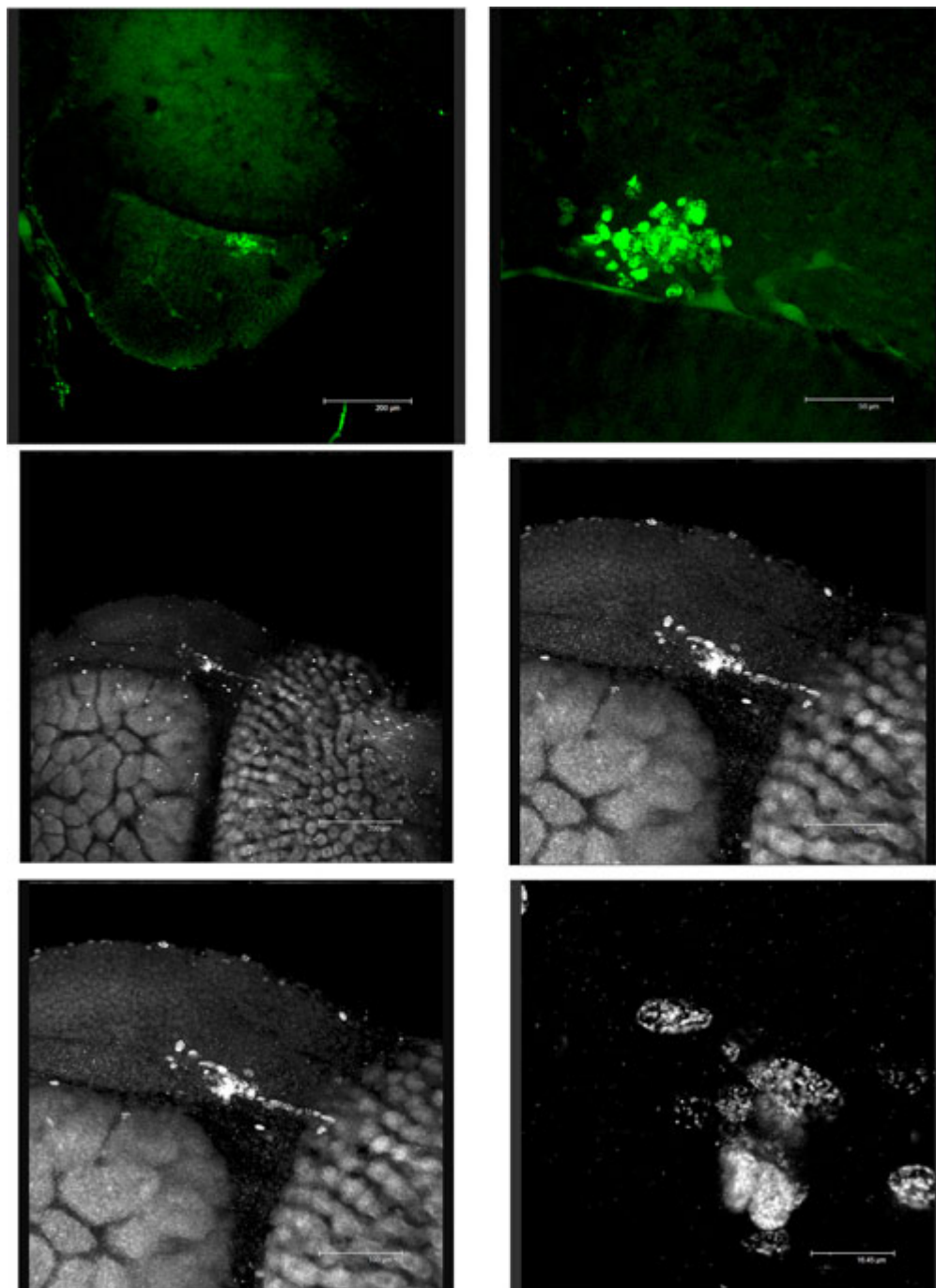
Selve BrdU-analysen er basert på en immunocytokjemisk prosess, der BrdU-molekylet taes opp ved celledelingen og som så kan merkes med en immunomarkør (antistoff) som kan spores i mikroskop. BrdU er en analog molekylstruktur som erstatter basen thymidin i DNA-kjeden. Forskjellen er at thymidin på et sted har ett karbohydrat der BrdU har et bromatom (Fig. 1).



Figur 1. Molekylstrukturen til thymidin (til venstre) og BrdU (til høyre)

Det ser ikke ut til at en lav dose med BrdU er skadelig for DNA-strukturen eller cellens overlevelsessevne og funksjon. Merkingen skjer når cellen dupliserer DNA trådene før oppsplitting. De nye cellene vil ha merkingen i seg fra første stund. Etter inkorporering in DNA’et, benyttes spesifikt utviklete antistoffer som kun fester til BrdU. Til dette komplekset tilføres et nytt antistoff utstyrt med fluorescens, som sees ved tilførsel av ultrafiolett lys i et

fluorescensmikroskop. Slike celler lyser opp når de belyses ved helt bestemte laserskaptelysbølglengder (Fig. 2).

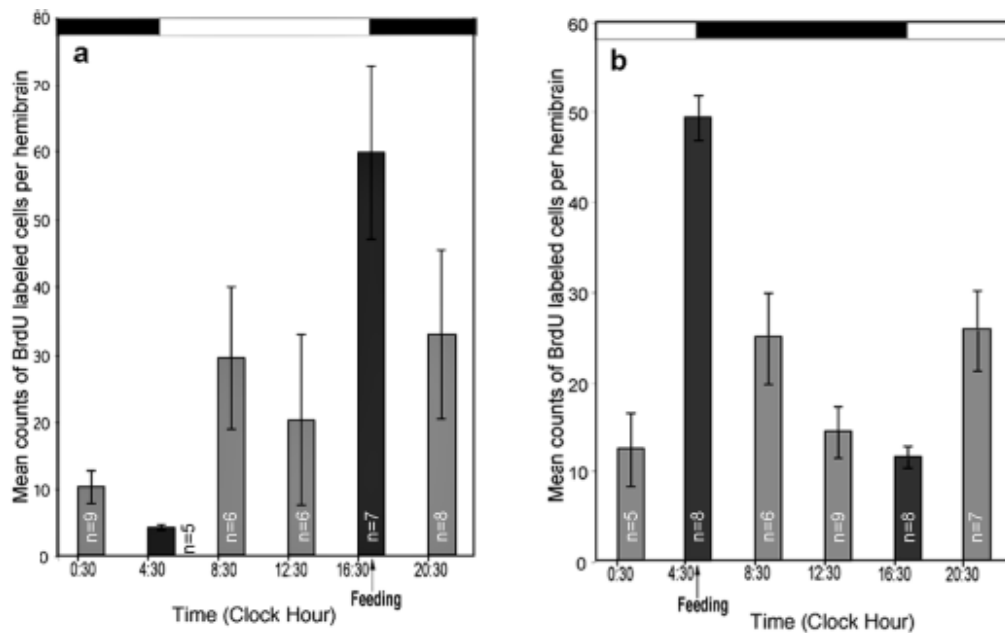


Figur 2. Et serie utsnitt av en BrdU-behandlet hummerhjerne, som viser stabelen med nyfødte celler (Samling 10) rett ved luktesenteret, og enkeltceller i denne stabelen, der BrdU lyser opp inne i cellekjernen.

Ved bruk av et konfokalt fluorescensmikroskop kan cellenes posisjon, antall og form sees og fotograferes i tre dimensjoner. Metoden benyttes også for en rekke andre molekyler, særlig innen medisin. Det finnes flere ulike antistoffer som fluoriserer ved ulike bølgelengder. Derfor kan vi i tillegg til å se etter nyfødte celler med BrdU, også følge opp med å undersøke hva slags celle den nyfødte cellen blir til, ved å merke utvalgte molekyler som vi forventer skal produseres i den modne cellen. Dette kan være aktive celleprodukter, som for eksempel kjemiske signalstoffer knyttet til spesielle celletyper. BrdU-molekylene vil befinne seg i cellekjernen så lenge cellen lever. Koplingen mellom et aktivt celleprodukt med BrdU i cellekjernen er et bevis på at akkurat denne cellen ble dannet i den korte perioden organismen ble behandlet med BrdU-løsningen, og hva slags celle det er.

Spennende resultater

Metoden er til nå stort sett brukt til å finne ut hvor og hvordan celledannelsen foregår, og hva som inngår, særlig i prosessen i hjernen. Det har imidlertid vist seg at en rekke ytre miljøfaktorer har stor effekt på hyppighetene i hjernecelledannelse. Lys (Fig. 3), ernæring, sosialt miljø og fysiske omgivelser har alle vist en klar effekt på celledeling i hjernen, på både positivt og negativt.



Figur 3. Telling av celler født i Samling 10, ved skumring , natt, gryning og dag hos amerikansk hummer (Goergen et al. 2002). Mens BrdU viser nyfødte celler er serotonin et aktivt signalstoff som inngår i mange prosesser i nervesystemet.

Siden de basale hjerneprosessene har vist seg å være praktisk talt like, det være seg hos bananflue, hummer, sangfugl eller menneske, så blir mye av prosessforskningen gjort på virvelløse dyr. Særlig tifotskreps er mye brukt, på grunn av sin praktiske størrelse, kjempestore nerveceller, og at de er lette å ha i laboratorier. Beltz laboratoriet er et ledende laboratorium for å utvikle metoden. Her benyttes både ferskvannskreps, hummer og strandkrabber. Samspillet mellom ulike signalstoffer (for eksempel serotonin , melatonin og andre pigment-relaterte hormoner) og ulike former for ytre stimuli (blant annet lys, ernæring og aktivitet) står sentralt i dette laboratoriets fokus.

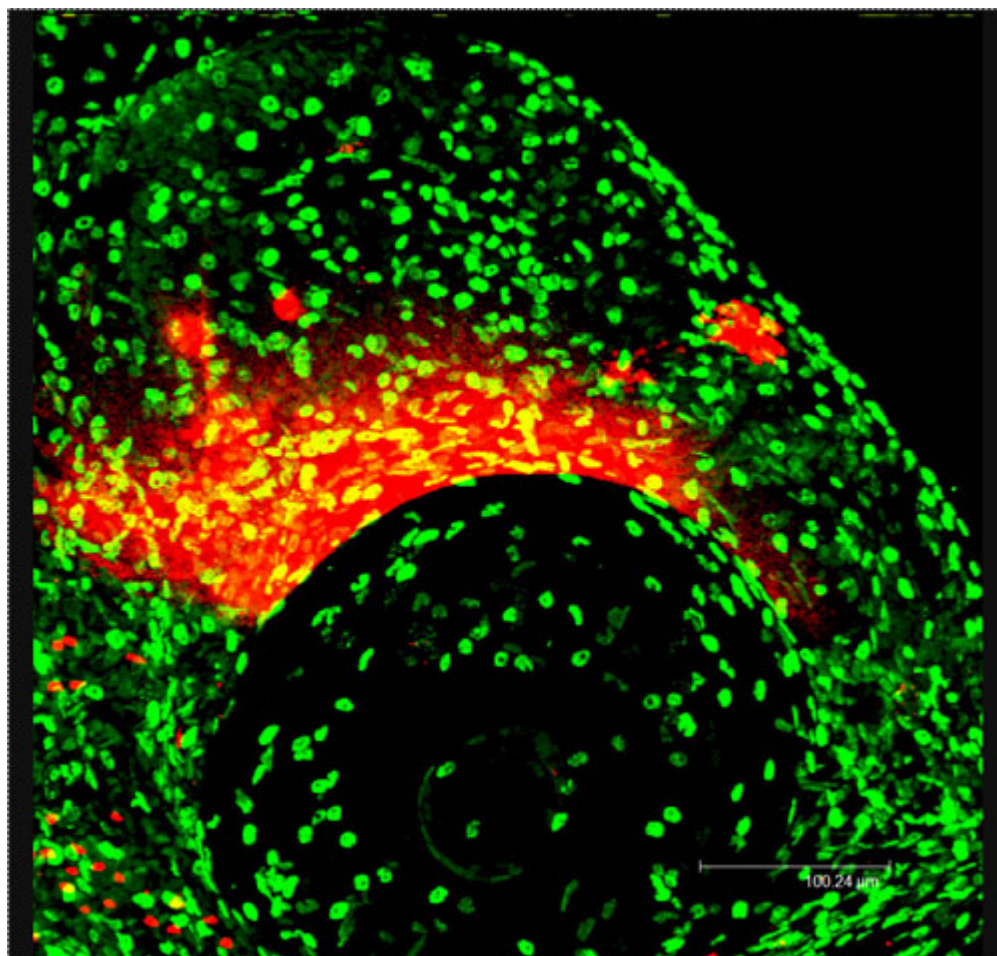
Hvorfor er Havforskningsinstituttets forskere involbert?

Havforskningsinstituttets to forskere ble invitert på grunn av interessen for metoden, koblet med bakgrunn fra miljørelaterte forskning innen en praktisk biologisk bakgrunn fra økologi og oppdrett. Forskerne har i tillegg støtte fra Norges forskningsråd og prosjektmidler fra Biologisk institutt ved Universitetet i Bergen, som også ser de mange mulighetene med denne analysemetoden.

Etter USA-oppholdet håper de å kunne få til å etablere et tilsvarende laboratorium ved Austevoll forskningsstasjon. De har produksjonslinjer for hele livssyklusen til en rekke fiskeslag, også andre organismer om nødvendig. Austevoll forskningsstasjon er et ideelt sted for å kunne utføre miljøunderøkelser, være seg i naturen eller oppdrett. De ser en anvendelse av metoden inn mot høyaktuelle olje-fisk problemstillinger, og mot ernæring og vannkvalitet for egg. Allerede nevnt er miljøforholdenes betydning for larver og yngel i oppdrett, men også effekten av endringer i plankton-fisk næringskjeden i Nordsjøen er aktuelt å se nærmere på. Dessuten er det også problemstillinger rundt parasittisme, sykdom og temperaturforhold, og spørsmål inn mot velferd og kvalitet på oppdrettsdyr. Det siste er særlig aktuelt inn mot utsetting/ rømning fra oppdrettsanlegg. I et rutinert laboratoriet for slike histocytokjemiske undersøkelser vil det også være mulig å utvikle tilsvarende immunoehytokjemiske analyser for å se på andre organer enn hjernen. Eksempelvis rekruttering av fisk, dersom det finnes spesifikke molekyler som kan

knyttet direkte til kjønnsmodning eller eggutvikling, og som kan merkes spesifikt med et fluorescerende antistoff. Dette er viktige parametre inn mot forvaltning av fiskeriressursene.

Denne vinteren er de i gang med grunnutdannelsen. Den vil de kombinere med å undersøke hummeryngel for å se om oppdrettsmiljøet vil ha en betydning på både hummerens hjernevekst og reaksjonsevner. Dessuten vil de prøve å utvikle metoden for bruk på marine fiskelarver og yngel (Fig. 4).



Figur 4. Larve av "summerflounder", behandlet med BrdU (grønt) og serotonin antistoff (rødt). Det er en kraftig cellevekst, særlig i hud, mens det er en påtakelig serotoninproduksjon sentralt i hodet, i tillegg til langs kjever, gjeller og i tarmen.

Fisk i denne sammenhengen er nybrottsarbeid. Men de tror at de videre mulighetene for å utnytte BrdU metoden som et verktøy til å oppnå verdifulle resultater innen anvendt forskning, er meget store, både for miljø, ressurs og oppdrettsrelatert forskning.

Utvalgt litteratur:

- Beltz, B.S., & Sandeman, D.C. 2003. Regulation of life-long neurogenesis in the decapod crustacean brain. *Arthropod Structure and Development*, 32: 39-60.
- Goergen, E.M., Bagay, L.A., Rehm, Kris, Benton, J.L., & Beltz, B.S. 2002. Circadian control of neuregenesis. *Journal of Neurobiology*, 53: 90-95.
- Helluy, S., Ruchhoeft, M., & Beltz, B. 1995. Development of the olfactory and accessory lobes in the American lobster: An allometric analysis and its implications for the deutocerebral structure of decapods. *Journal of Comparative Neurology*, 358: 1-13.
- Laverack, M.S. 1988. The numbers of neurons in decapod Crustacea. *Journal of Crustacean Biology*, 8:1-11.
- Olla, B.L., Davies, M.W., & Ryer, C.H., 1998. Understanding how the hatchery environment represses and promotes the development of behavioural survival skills. *Bulletine of Marine Science*, 62: 531-550.
- Sandeman, D. 1982. Organisation of the central nervous system. In: Atwood, H.A. & Sandeman, D.C. (eds.) *Biology of the Crustacea Vol. 3. Neurobiology: Structure and Function*. Academic Press, New York, pp. 1-54.
- Sandeman, R. & Sandeman, D. 2000. "Impoverished" and "enriched" living conditions influence the proliferation and survival of neurons in crayfish brains. *Journal of Neurobiology*, 45: 215-226.
- Sullivan, J.M., & Beltz, B.S. 2005. Newborn cells in the adult crayfish brain differentiate into distinct neuronal types. *Journal of Neurobiology*, 65: 157-170.