

Skickas till: info@stifud.se

Ev. artiklar och publikationer skickas till:

Stiftelsen Forskning utan djurförsök,

Gamla Huddingevägen 437, 125 42 Älvsjö

1. Anslagstagare Sandra Ceccatelli	
Arbetsplats (fullständig postadress) Karolinska Institutet, Inst f Neurovetenskap, Retziusväg 8, 17177 Stockholm	E-postadress Sandra.Ceccatelli@ki.se
2. Projektnummer	
3/06	Sista redovisningsdatum (se kontraktet) 2008
3. Projekttitel (svenska) Utveckling av ett in vitro test för mätning av överproduktion av reaktivt syre i humana neuronala stamceller.	
4. Projektet <input type="checkbox"/> är avslutat <input checked="" type="checkbox"/> pågår utan fortsatt stöd från Stiftelsen Forskning utan djurförsök	
5a. Kortfattad beskrivning av projektet (syfte och utförande) ca 1 A4-sida Testning av toxiska effekter under utvecklingsstadiet (embryo, foster och nyfödd) utförs i nuläget genom exponering av gravida djur, främst råtta och kanin och i huvudsak undersöks grava toxiska effekter på fostret, såsom externa missbildningar, förändringar på skelett, tillväxtstörningar samt missfall och dödfödsel. Av det totala antalet djur som används för toxicitetstestning och riskbedömning används ca 5 % för utvecklingstoxikologiska studier. På senare tid har man särskilt uppmärksammat hur exponering under fosterstadiet eller barndomen påverkar utvecklingen av det centrala nervsystemet. Bildandet av det centrala nervsystemet sker genom en serie hårt reglerade steg och man har sett att exponeringsnivåer med ingen eller liten effekt hos vuxna individer kan ge upphov till långvariga störningar när foster eller barn utsätts för dem. Vidare har man sett att moderns exponering av vissa miljögifter och läkemedel inte bara påverkar fosterutvecklingen utan också kognitiva funktioner senare i livet. Tidigare studier har visat att primära humana fetala neuronala stamceller är ett lämpligt modellsystem för att upptäcka och undersöka de molekylära mekanismer som kan ligga bakom utvecklingsneurotoxicitet. En accepterad och viktig markör för <i>in vitro</i> utvecklingsneurotoxicitets testning är apoptos, vilket är en form av kontrollerad och naturlig förekommande celledöd. Vår forskningsgrupp har karakteriserat vilka signalvägar som är involverade vid apoptos i neuronala stamceller från mus och råtta som exponerats för cytotoxiska substanser. Bl.a. upptäcktes att den så kallade mitokondriella signalvägen är aktiverad vid cytotoxisk stimulering, medan Fas-receptorn, som ofta är aktiverad vid apoptos, uttrycktes i dessa celler men inte var aktiv. Vidare visade vi att neuronala stamceller var känsligare än differentierade neuron eller glia celler för exponering av metylkvicksilver. Studier har visat att odling av neuronala stamceller <i>in vitro</i> i stor utsträckning följer normala utvecklingsprocesser av nervsystemet, vilket gör neuronala stamceller speciellt attraktiva för utveckling av toxicitetstestning för embryonal/fosterutvecklingen. Målet med det här projektet var att etablera och utveckla användning av humana neuronala stamceller för neurotoxicitets studier. Ett ytterligare mål var att utveckla en metod för att detektera reaktivt syre.	
5b. Ange nyckelord (max 6 st) humana fetala neuronala stamceller, utvecklingsneurotoxicitet	
6. Kortfattad populärvetenskaplig beskrivning av de resultat som uppnåtts (bifoga gärna illustrationer, helst grafiska teckningar), ca ½ - max 1 A4-sida Betydelsen av utvecklingsneurotoxicitet har erkänts världen över under de senaste åren. Frekvensen av utvecklingsstörande sjukdomar i nervsystemet hos människan uppskattas att vara ca 12-17 %. Förutom genetiska orsaker, diskuteras också exponering till miljögifter som en eventuell orsak till neurologiska störningar. Därför ökar behovet av utvecklingsneurotoxicitets testning med avseende på riskidentifiering av kemikalier. För att nå tillförlitliga testningsresultat, måste <i>in vitro</i> system efterlikna den humana hjärnans utveckling så ingående som möjligt. I detta avseende, är <i>in vitro</i> system baserade på humana celler nödvändiga. Syftet med projektet var att utveckla <i>in vitro</i> modeller baserade på humana stamcellskulturer, eftersom dessa kan vara ett relevant biologiskt system för att studera molekylära	

mekanismer som reglerar celldöd i humana neuronala stamceller efter exponering till toxiska stimuli. Vi har etablerat i vårt labb humana neuronala stamceller som ett *in vitro* modellsystem. Dessa celler odlas i serumfritt medium som neurosfärer och antar en organ-liknande tredimensionell struktur. Efter odling har vi analyserat hur celler reagerar efter exponering till celldöd-inducerande substanser, inklusive ämnen som inducerar reaktivt syre (ROS) produktion. De aspekter som har analyserats är morfologi, DNA fragmentering, gen och protein uttryckt. Vi har också använt speciella fluorescenta markörer för att detektera ROS i celler med användning av konfokal mikroskopi.

7. Sammanfattning av resultatens betydelse för att ersätta/begränsa djurförsök (ge gärna konkreta exempel)

Nuvarande utvecklingsneurotoxicitets testings riktlinjer föreslår studier på gnagare, vilket kräver många djur. För att kunna förlika sig med de 3 R:en (förbättring, minskning och ersättning av djurförsök), behövs det alternativa metoder vilka tillåter känsliga och mekanismbaserade undersökningsmetoder. I vår studie har inga djur använts. Vi har dessutom etablerat ett *in vitro* modellsystem som odlas i serumfritt medium.

8. Vilket är den största framgången hittills i projektet?

Man kan föreställa sig att våra studier kommer att tillföra förenklade testsystem med ännu större specificitet och säkerhet, som kan förutsäga de kemiska riskerna från exponering till kemiska farmakologiska ämnen förekommande i miljön och i kosten. Dessa steg kommer att ha tydliga praktiska konsekvenser för hur toxikologiska tester kommer att genomföras i framtiden.

9a. Beskrivning av vad som gjorts för att validera och sprida metoden/metoderna

Ytterligare forskning behövs för att validera modell. Vi har börjat diskutera metoden med andra forskare som är intresserade av neurotoxiska mekanismer.

9b. Vad mer skulle behöva göras för att metoden/metoderna ska bli spridda och praktiskt användbara?

Användning av modell från olika forskningsgrupper och utbyte av kunskap kommer att förbättra och sprida metoden.

10. Förteckning över publikationer som projektet resulterat i

Data kommer att presenteras på konferens och ett manuskript kommer att publiceras.

11a. Kortfattad vetenskaplig rapport (abstract) på engelska (projektitel, syfte, utförande, och resultat), ca ½ A4-sida

The importance of developmental neurotoxicity has been recognized world wide during the last years. The estimated frequency of neurodevelopmental disorders in humans is around 12-17%. Beside genetic reasons, exposure to environmental toxins is discussed as a reason for neurodevelopmental disturbances. Therefore, the need for developmental neurotoxicity (DNT) testing in respect to hazard identification of chemicals is increasing. Current DNT testing guidelines propose investigations in rodents, which require the use of about 140 dams and 1000 pups. To conform to the 3R's (refine, reduce and replace animal experiments), alternative methods for DNT testing are needed to allow sensitive and mechanism-based screenings. To achieve relevant testing results, *in vitro* systems have to mimic human brain development as closely as possible. One accepted and important endpoint for *in vitro* DNT testing is the assessment of cell death. Within this project, we have characterized the cell death features and molecular mechanisms regulating cell death in human neural stem/progenitor cells after exposure to different toxic stimuli in comparison to established rodent *in vitro* systems. By continuing this work we will be able to propose these cells as an alternative model for DNT testing.

11b. Bifoga eventuellt en vetenskaplig rapport på engelska, max 4 sidor (syfte, utförande, och resultat)