

Redovisning av forskningsanslag Projektnummer 53/06

Neurotoxiska mekanismer för bestämning av akut, systemisk toxicitet studerade in vitro

Anna Forsby, Institutionen för neurokemi, Stockholms universitet, 10691 Stockholm

Syfte med ansökan är att utveckla nya djurfria testmetoder med hjälp av celler från nervsystemet för att ersätta djurtester för bedömning av kemikaliers giftighet.

Bakgrund

Kemikaliers giftighet mäts ofta som den engångsdos vilken orsakar en påvisbar skadlig effekt (i svåra fall död) i råttor eller möss, sk. akut, systemisk toxicitet. Testningen utförs enligt angivna riktlinjer i sk. OECD test guidelines. Europeiska kommissionen har beslutat att alla kemikalier som säljs i mängder över 10 ton ska genomgå testning för akut systemisk toxicitet (sk. REACH-lagen), vilket kommer att kräva en förbrukning av ett stort antal djur till en betydande kostnad. Det har även beslutats att all testning av kosmetiska produkter och innehåll i dessa måste upphöra på djur under 2009 beträffande akut, systemisk toxicitet enligt det nya kosmetikadirektivet. Det föreligger alltså ett stort behov att utveckla snabba, tillförlitliga och billiga alternativa metoder till den traditionella djurtestningen och testning på isolerade celler som odlas i provrör är det som verkar mest lovande. Majoriteten av alla kemikalier i samhället orsakar toxicitet genom att påverka generella funktioner som finns i alla celltyper. För dessa kemikalier kan giftigheten bestämmas genom att man mäter hur stor dos av kemikalien som krävs för att påverka mängden levande celler i sk. viabilitetstest. En del kemikalier är dock giftiga pga att de interagerar med specifika molekyler som uttrycks i vissa celler, särskilt nervceller, och därmed stör normala funktioner i det drabbade organet. Vårt projekt syftar till att utveckla och utvärdera metoder som kan användas för att identifiera kemikalier med sådana specifika toxiska mekanismer i nervsystemet.

Utförande

Celler från en cancertumör med ursprung från embryonala nervceller, sk. neuroblastomaceller, isolerades från en flicka för 30 år sedan på Sloane Kettering-institutet i USA och en odödlig cellinje etablerades, kallad SH-SY5Y. Denna cellinje används som modell för nervceller i stället för normala nervceller som måste isoleras från hjärnor inför varje nytt experiment. Vi har utvecklat metoder för att studera några vitala nervcellsfunktioner genom att använda SH-SY5Y cellerna, nämligen olika sätt att påverka cellernas nervretningsförmåga samt återupptag och inaktivering av olika signalämnen i nervceller. Metoderna ska vara okomplicerade, reproducerbara, billiga och anpassade för testning av ett stort antal kemikalier på kort tid för att vara användbara i REACH-lagen och det nya kosmetikadirektivet.

Resultat

Vi har testat 23 kemikalier, inklusive droger och bekämpningsmedel, i 5 nya testmetoder; mätning av cellmembranpotentialen (CMP), funktion av spänningskänsliga kalciumkanaler, påverkan på signalämnet acetylkolins receptorer och inaktivering, samt

hämning av återupptag av signalämnet noradrenalin. För att kontrollera specificiteten av eventuella effekter på respektive testparameter undersöktes hur kemikalierna påverkade cellmembranets integritet genom att mäta läckage av det lösliga proteinet laktatdehydrogenas. Resultaten visade att kemikalier med förväntad effekt i respektive nervcellsfunktion förbättrade korrelationen till den toxiska blodkoncentrationen hos människa, jämfört med de enkla och generella viabilitetstesterna i celler. Ett av de mest lovande testerna var mätning av CMP-förändringar efter tillsats av kemikalier. Det är också ett test som täcker in flera möjliga mekanismer vilket är en fördel eftersom det är praktiskt omöjligt att utveckla ett test för varje toxisk mekanism i olika målorgan. Ytterligare 36 kemikalier testades i metoden och förändrad CMP registrerades för 24 av de 59 kemikalierna. Bl.a. identifierades nikotin, amfetamin, metadon, amitriptylin, orfenadrin, propranolol och atropin som toxiska kemikalier, vilket inte viabilitetstesterna klarade.

Djurbesparande effekt

Genom att använda den etablerade cellinjen SH-SY5Y som nervcellmodell undviks behovet av isolering av nervceller från mus- eller råttjärnor. Det är dock frågan om tumörceller (neuroblastom) som saknar en del normala funktioner, vilket också visades i vår studie. Huruvida CMP-metoden kan fungera som ett komplement till viabilitetstesterna för giftighetsbedömning visas under 2009 då ett stort antal tester kommer att ingå i en utvärdering inom EU-projektet, kallat ACUTETOX. ACUTETOX-projektet syftar till att finna en teststrategi för att ersätta de befintliga djurtesterna för bestämning av akut, systemisk toxicitet, vilket kan komma att leda till en revolutionerande minskning av antalet försöksdjur i hela världen. Oavsett om CMP-metoden visas användbar i ACUTETOX-strategin, har vårt projekt visat att de 5 utvecklade metoderna med framgång kan användas för studier av de nämnda nervcellsfunktionerna, utan att djurförsök krävs.

Neurotoxic mechanisms for determination of acute systemic toxicity, studied in vitro

Anna Forsby, Department of Neurochemistry, Stockholm University, 10691 Stockholm

The objective of this project is to develop and evaluate in vitro methods for estimation of acute systemic toxicity for chemicals possessing a neurotoxic mode of action. The human neuroblastoma SH-SY5Y cell line was used for studies on cell membrane potential (CMP), voltage operated calcium channel (VOCC) function, noradrenalin uptake, acetylcholine receptor (AChR) function and acetylcholine esterase (AChE) activity. Leakage of cellular lactate dehydrogenase was measured as indicator of non-specific toxicity. Twenty three reference chemicals were tested in all 6 assays and the concentrations causing 20 and 50 percent effect (EC20 and EC50, respectively) were determined. The toxicity of the chemicals was evaluated by comparing the EC20 and EC50 values with human lethal blood concentrations (estimated LC50). The results showed that the chemicals with specific toxic mechanisms were identified in the “correct” assay, e.g. dichlorvos and physostigmine inhibited the AChE activity, atropine inhibited the carbachol-activated AChR signal transduction, verapamil decreased the Ca²⁺ influx in the VOCC assay and amphetamine attenuated the noradrenalin uptake. The CMP assay was selected for further evaluation because it covers several neurochemical endpoints and is applicable to high throughput screening (HTS). In total, 59 chemicals were tested and the usefulness of the CMP assay as a complement to general cytotoxicity tests using less specified cell lines will be analyzed in the EU-funded project ACUTETOX, aiming at the replacement of in vivo based tests for estimation and classification of chemicals’ acute systemic toxicity.