

БЙЁРН ЭКВАЛЛ И ЕГО ВКЛАД В СОВРЕМЕННУЮ КЛЕТОЧНУЮ ТОКСИКОЛОГИЮ

© A. Колман

*Шведский фонд научных исследований без проведения экспериментов на животных, Стокгольм, Швеция;
электронный адрес: ada.kolman@telia.com*

Доктор Бйёрн Эквалл (1940—2000) являлся выдающимся шведским ученым, внесшим крупный вклад в область токсикологии на клеточном уровне. Сформулированная им в 1983 г. концепция так называемой базовой цитотоксичности (basal cytotoxicity) лежит в основе сегодняшнего направления этой области токсикологии: использование тестов на клетках в культуре для определения острой токсичности химических веществ у человека вместо тестов на животных. Чтобы на практике проверить свои теории, Эквалл организовал международный токсикологический проект под названием МЕИС (Multicentre Evaluation of In Vitro Cytotoxicity Programm, 1989—1999), в котором 50 отобранных химических веществ тестились в 100 лабораториях во всем мире, причем было применено более 60 различных тестов *in vitro* (лаборатории сами выбирали тесты). Этот проект был уникальным не только по своим масштабам, но и потому, что в нем впервые использовались для сравнения данные по концентрациям химических веществ в человеческой крови при острых отравлениях в целях проверки предсказуемости тестов на клеточных культурах. Результаты проекта МЕИС наглядно продемонстрировали возможность использования тестов *in vitro* для прогнозирования токсических концентраций химических веществ в организме человека.

Краткая биография

Бйёрн Эквалл родился 13 июня 1940 г. в г. Упсале, Швеция. Закончив в 1959 г. колледж, он поступил учиться на медицинский факультет Упсальского университета, где в 1969 г. получил диплом врача. Проработав недолго врачом, Эквалл начал преподавать на кафедре анатомии Упсальского университета. Здесь же он поступил в аспирантуру, которую закончил в 1980 г. В своей диссертации Эквалл занимался изучением токсического действия химических веществ на человеческие клетки HeLa в культуре, применяя различные тесты *in vitro*. При этом он делает первую попытку выяснить, насколько тесты на клеточных культурах подходят для прогнозирования острой общей токсичности химических веществ у человека. Во время своего последующего 6-месячного пребывания в Соединенных Штатах в токсикологической лаборатории в г. Мемфисе (Material Science Toxicology Laboratory, штат Тенесси) Эквалл занимается изучением той же проблемы. После возвращения в Швецию он продолжает работать в токсикологическом отделе Упсальского университета, где в 1996 г. становится доцентом.

В 1983 г. Эквалл основал в Упсале цитотоксикологическую лабораторию (CTLU). В том же году он организует конференцию скандинавских токсикологов-цитологов, на которой по его инициативе было создано Скандинавское общество клеточной токсикологии (Scandinavian Society for Cell Toxicology, SSCT; www.ssct.net). Общество ставило своей главной целью организацию конференций, где ученые-токсикологи могли бы заниматься обсуждением клеточных моделей для тестирования химических веществ. Кроме того, общество должно было взять на себя

организацию международного проекта, базировавшегося на гипотезах Эквали и получившего название МЕИС (Multicentre Evaluation of In Vitro Cytotoxicity). Этот проект продолжался почти 10 лет и полностью подтвердил гипотезу Эквали о базовой токсичности. После проекта МЕИС Эквалл инициировал следующий международный проект EDIT (Evaluation-guided Development of New In Vitro Tests), который ему так и не удалось завершить. Б. Эквалл скончался после тяжелой болезни 19 августа 2000 г.

В течение 6 лет (1990—1996) Эквалл являлся вице-президентом Шведского фонда научных исследований без экспериментов на животных.

Концепция базовой цитотоксичности

Идея использовать тесты в клеточных культурах для прогнозирования токсического действия химических веществ на человеческий организм появилась у Эквали, когда он работал над диссертацией, где-то в конце 1970-х годов (Ekwall, 1980a, 1980b). Уже тогда он приходит к заключению о том, что около 80 % химических веществ имеют одинаковую токсичность как в организме человека, так и в человеческих клетках и тканях, т. е. так называемую базовую токсичность (Ekwall, 1983). Он ввел классификацию токсичности на клеточном уровне, разделив ее на три типа. Первый тип — базовая цитотоксичность (basal cytotoxicity). Определенные структуры и функции являются общими для всех человеческих клеток, поэтому они и называются «базовыми», отсюда и токсичность — базовая. Химические вещества влияют на

базовые структуры и функции, необходимые для выживания клетки, клеточного деления, репликации ДНК и т. д. Второй тип — ор га но сре ди чес кая цитотоксичность (organ-specific cytotoxicity). Химические вещества оказывают влияние на структуры и функции, специфические для определенных клеток, тканей или органов. Для изучения такой токсичности больше всего подходят тесты на клеточных линиях, изолированных из различных органов, например из крови, печени, почек и центральной нервной системы. Третий тип — в не клеточная токсичность (extracellular toxicity), т. е. токсичность на уровне целого организма, охватывающая процессы, происходящие вне самих клеток, например клеточную секрецию.

Эквалл также пришел к выводу о том, что базовую цитотоксичность химических веществ «можно тестировать на недифференцированных клеточных линиях ... используя простые и недорогостоящие тесты на клеточных культурах» (Ekwall, 1983). Он сумел доказать на многих примерах, что острую токсичность после отравления химическими веществами можно предсказать, используя вышеописанные тесты (Ekwall, Ekwall, 1988).

Международные проекты под руководством Б. Эквалла

Одной из главных задач Эквалла было доказать правильность его гипотезы базовой цитотоксичности. С этой целью он задумывает и реализует крупнейший международный проект под названием MEIC, часто представляемый в литературе как «Программа MEIC». В его программу входило тестирование одного и того же набора 50 химических веществ в 100 лабораториях во всем мире, причем методы *in vitro* выбирались на местах самими лабораториями. При этом все лаборатории работали на добровольных началах, без какой-либо финансовой компенсации. В общей сложности к концу проекта лаборатории применили более 60 тестов *in vitro*.

Набор химических веществ был выбран экспертами Шведского информационного центра отравлений (Swedish Poison Information Centre). Тут были лекарственные средства, химические вещества, применяемые в промышленности, биоциды, яды и т. д. Выбирали такие химические вещества, для которых были заранее известны сублетальные и летальные дозы в организме человека, причем использовались клинические и судебно-медицинские данные.

Чтобы легче было координировать сотрудничество между лабораториями и оценивать полученные результаты, Эквалл начинает издавать информационный бюллетень «MEIC Newsletters» (Walum, Ekwall, 1989). Директором Организационного комитета проекта стал д-р Эрик Валум, известный шведский нейроцитотоксиколог.

Здесь надо отметить, что проекту MEIC предшествовал целый ряд других межлабораторных проектов, ставивших себе целью произвести оценку способности тестов *in vitro* прогнозировать токсичность химических веществ по сравнению с тестами, проводимыми на экспериментальных животных. В течение многих десятилетий, начиная с 1950-х годов, тестирование химических веществ в косметике и индустрии проводилось исключительно на экспериментальных животных и требовало ежегодно гибели сотен тысяч различных животных (мышей, крыс, кроликов, собак, кошек и т. д.), причем тесты часто

бывали крайне мучительными. Чаще всего токсическое действие химических веществ измерялось величиной LD50 (Lethal Dose 50) — летальной дозой химического вещества, при которой погибает 50 % животных. Тесты требовали многих месяцев, были неэкономичными и часто недопустимыми с этической точки зрения. Уже в 1959 г. об этом писали Рассел и Берч в своей книге «Принципы экспериментальных методов у человека» (Russel, Burch, 1959). Они выдвинули принцип трех «R»: Reduction, Refinement, Replacement (имеются в виду сокращение количества тестов на экспериментальных животных, усовершенствование тестов и, наконец, полная их замена тестами *in vitro*).

По сравнению с другими подобными проектами проект MEIC был уникальным не только по своим масштабам, но в первую очередь по своей методологии. Как известно, токсикологи на клеточном уровне определяют токсическое действие химических веществ, чаще всего используя величину IC50 (Inhibitory Concentration 50), т. е. концентрацию химического вещества, подавляющего рост 50 % клеток в клеточной культуре. Чтобы проверить способность тестов на культурах прогнозировать токсичность химических веществ, Эквалл впервые предложил сравнивать результаты таких тестов (IC50) не только с тестами на животных (LD50), но и с концентрациями химических веществ в сыворотке и (или) плазме крови человека после острых отравлений. Для этой цели он вместе с группой сотрудников собрал необходимые сведения для 50 веществ, используя в качестве источников базу данных Шведского информационного центра отравлений, а также данные подобных центров в других странах, различные базы данных в Интернете и печатные статьи в медицинских и других научных журналах. В результате получилась огромная база данных, содержащая кроме концентраций различных химических веществ в крови жертв отравлений также данные о возрасте и поле пациентов, симптомах и признаках острых отравлений, методах лечения и об исходе отравления (выживание или смертельный исход). Данные об отравлениях химическими веществами имеются в форме 50 отдельных монографий в Интернете (www.cctoxconsulting.a.se).

В проекте MEIC концентрацию химического вещества в крови пациента после острого отравления сравнивали с величинами IC50 и LD50. Чтобы было легче произвести оценку качества тестов в культурах и тестов на экспериментальных животных, Эквалл вводит новую величину LC50 (Lethal Concentration 50 %), представляющую собой кульминационный пик концентрации химического вещества в крови человека после острого отравления с летальным исходом. При такой концентрации смертность составляет 50 %. Величину LC50 можно вычислить исходя из большого числа данных по сублетальным и летальным концентрациям, представленным в виде графиков (по оси абсцисс откладывают время, выраженное в часах, от приема химикалии до определенного исхода, а по оси ординат — концентрации химического вещества в крови человека, выраженные в микромолях).

Результаты проекта MEIC были опубликованы в 8 отдельных статьях в журнале ATLA. 4 статьи были посвящены описанию методов *in vitro*, использованных в разных лабораториях для изучения токсичности химических веществ, а также полученным результатам этих исследований (Clemedson et al., 1996a, 1996b, 1998a, 1998b). В общей сложности токсическое действие 50 химических веществ было изучено в 84 различных тестах в клеточных

культурах. 5-я статья (Ekwall et al., 1998b) содержит базу данных по этим же 50 химическим веществам в отношении их действия на человека, например дозы, вызывающие острое отравление, летальные концентрации химикалий в крови, данные по кинетике химических веществ в организме и т.д. В той же статье описывается новый подход к решению проблемы оценки релевантности тестов на клеточных культурах для определения острой токсичности химических веществ у человека путем использования величины LC50.

Две последующие статьи (Ekwall et al., 1998a; Clemedson et al., 2000) посвящаются оценке возможности использования тестов на клеточных культурах (величины IC50) для прогнозирования острой токсичности химических веществ у человека. Для этой цели тесты на клеточных культурах сравнивают с тестами на животных (величины LD50), а также с максимальными концентрациями химикалий в крови человека (LC50) после острых отравлений. Оценка данных проводится методом регрессионного анализа (линейная регрессия). В общей сложности анализировали 50 химических веществ, используя около 60 цитологических методов. Наилучшее прогнозирование продемонстрировали клеточные линии и первичные культуры, выделенные у человека: коэффициент детерминации составлял 0.76—0.84, тогда как при использовании животных коэффициенты детерминации — 0.65 (мыши) и 0.61 (крысы), т. е. прогнозирование было гораздо хуже.

В последней, 8-й статье (Ekwall et al., 2000) оценка полученных данных была сделана с помощью статистического метода множественной регрессии (multivariate partial least square modeling), подтвердившего хорошее прогнозирование с использованием тестов на культурах. Был составлен набор тестов, определявших базовую токсичность и показавших наилучшее прогнозирование острой токсичности после отравления химическими веществами: 1) содержание белка (тест 24 ч), 2) содержание АТФ (тест 24 ч), 3) изменения морфологии клеток (тест 24 ч), 4) изменения pH (тест 7 сут).

Однако проект MEIC продемонстрировал и определенные недостатки. Так, оказалось, что токсичность некоторых химических веществ не могла быть определена ни одним из использованных методов. Эти так называемые отклонения (outliers) чаще всего обладали специфическим механизмом действия, например опосредованным через рецепторы или энзимы, которых нет в недифференцированных клеточных линиях. Всего таких химикалий из набора 50 химических веществ оказалось около 14 %.

Чтобы решить этот вопрос, Эквалл задумал в 1999 г. следующий проект под названием EDIT (Evaluation-guided Development of New In Vitro Tests), ставивший своей задачей разработать тесты на дифференцированных клетках и клеточных линиях, выделенных из определенных органов, например из нервной системы, печени, почек и т. д. Эквалл понимал, что только комбинация тестов для определения базовой токсичности и тестов, специфических для определенных органов, может дать наилучшее прогнозирование (Ekwall et al., 1999). К сожалению, проект EDIT не был осуществлен: Эквалл скончался в 2000 г. Однако проекты MEIC и EDIT сыграли важную роль в развитии клеточной токсикологии, опирающейся на идеи Б. Эквалла.

В настоящее время Европейское сообщество (EU) и его партнер Европейский центр для оценки альтернативных методов (ECVAM — European Centre for Validation of Alternative Methods) организуют и финансируют целый

ряд подобных проектов. К числу таких проектов относятся, например, международные проекты ACuteTox, ReProTect и Sens-it-iv. Они ставят перед собой те же самые задачи, которыеставил ранее Эквалл в проектах MEIC и EDIT: 1) выработать оптимальную комбинацию *in vitro* тестов, которые могли бы лучше всего прогнозировать острую токсичность химических веществ у человека; 2) убедить законодательные органы в том, что альтернативные методы тестирования токсических химических веществ на клеточных культурах могут вполне заменить тестирование на животных; 3) добиться внедрения альтернативных методов тестирования химических веществ в косметике, промышленности и медицине.

Список литературы

- Clemedson C., McFarlane-Abdulla E., Andersson M. et al. 1996a. MEIC evaluation of acute systemic toxicity. Pt I. Methodology of 68 *in vitro* toxicity assays used to test the first 30 reference chemicals. ATLA. 24 (Suppl. 1) : 249—272.
- Clemedson C., McFarlane-Abdulla E., Andersson M. et al. 1996b. MEIC evaluation of acute systemic toxicity. Pt II. *In vitro* results from 68 toxicity assays used to test the first 30 reference chemicals and a comparative cytotoxicity analysis. ATLA. 24 (Suppl. 1) : 273—311.
- Clemedson C., Barile F. A., Ekwall B. et al. 1998b. MEIC evaluation of acute systemic toxicity. Pt III. *In vitro* results from 16 additional methods used to test the first 30 reference chemicals and a comparative cytotoxicity analysis. ATLA. 26 : 93—129.
- Clemedson C., Andersson M., Aoki Y. et al. 1998a. MEIC evaluation of acute systemic toxicity. Pt IV. *In vitro* results from 67 toxicity assays used to test reference chemicals 31—50 and a comparative cytotoxicity analysis. ATLA. 26 : 131—183.
- Clemedson C., Barile F., Chesné C. et al. 2000. MEIC evaluation of acute systemic toxicity. Pt VII. Prediction of human toxicity by results from testing of the first 30 reference chemicals with 27 further *in vitro* assays. ATLA. 28 : 161—200.
- Ekwall B. 1980a. Screening of toxic compounds in tissue culture. Toxicology. 17 : 127—142.
- Ekwall B. 1980b. Preliminary studies on the validity of *in vitro* measurement of drug toxicity using HeLa cells. II. Drug toxicity in the MIT-24 system compared with mouse and human lethal dosage of 52 drugs. Toxicol. Lett. 5 : 309—317.
- Ekwall B. 1983. Screening of toxic compounds in mammalian cell cultures. Ann. N. Y. Acad. Sci. 407 : 64—77.
- Ekwall B., Barile F., Castano A. et al. 1998a. MEIC evaluation of acute systemic toxicity. Pt VI. The prediction of human toxicity by rodent LD50 values and results from 61 *in vitro* methods. ATLA. 26 : 617—658.
- Ekwall B., Clemedson C., Crafoord B. et al. 1998b. MEIC evaluation of acute systemic toxicity. Pt V. Rodent and human toxicity data for the 50 reference chemicals. ATLA. 26 : 571—616.
- Ekwall B., Clemedson C., Ekwall B., Ring P., Romert L. 1999. EDIT: a new international multicentre programme to develop and evaluate batteries of *in vitro* tests for acute and chronic systemic toxicity. ATLA. 27 : 339—349.
- Ekwall B., Ekwall K. 1988. Comments on the use of diverse cell systems in toxicity testing. ATLA. 15 : 193—200.
- Ekwall B., Ekwall K., Sjöström M. 2000. MEIC evaluation of acute systemic toxicity. Pt VIII. Multivariate partial least squares evaluation, including the selection of a battery of cell line tests with a good prediction of human acute lethal peak blood concentrations for 50 chemicals. ATLA. 28 : 201—234.
- Russel M. L., Burch R. L. 1959. The principles of human experimental technique. Methuen, London. 238 p.
- Walum E., Ekwall B. 1989. Welcome to john the MEIC programme. MEIC Newsletter. 1 : 1—4.

BJÖRN EKWALL AND HIS CONTRIBUTION TO MODERN CELL TOXICOLOGY

A. Kolman

Swedish Fund for Research Without Animal Experiments, Stockholm, Sweden;
e-mail: ada.kolman@telia.com

Dr. Björn Ekwall (1940—2000) was a prominent Swedish scientist — cell toxicologist, who made an outstanding contribution in the field of *in vitro* toxicology. In the early 80-ties Ekwall formulated so called basal cytotoxicity concept, which served as a basis for modern orientation in the field of cell toxicology: the use of tests on cells in culture for prediction of acute systemic toxicity in humans, instead of the use of tests on experimental animals. To be able to verify his theories, Ekwall organized and led the international toxicological project called MEIC: Multicentre Evaluation of In Vitro Cytotoxicity Programme (1989—1999). In this project, 50 selected chemicals were tested in 100 laboratories worldwide with more than 60 different *in vitro* tests (laboratories have chosen tests themselves). MEIC project was unique not only because its large scale, but, in particular, because, for the first time, the human peak blood concentrations after acute poisoning with chemicals were used as references, aiming to check predictability of the *in vitro* assays. The results of the MEIC project have clearly demonstrated a possibility to use *in vitro* tests for prediction of toxicity of chemicals in humans.
