УДК 576.3:57.085.23 https://doi.org/10.7124/FEEO.v28.1375

ВЕРГОЛЯС М. Р.[1,2]✉, КОВАЛЕНКО Д. В.[2], ХАЛІМАН І. О.[2], ВІХЛЯЄВА М. В.[2], МОЛОЖАН К. О.[2], ВЕРГОЛЯС О. О.[2]

[1] *Міжнародна академія екології та медицини,*
Україна, 02091, м. Київ, Харківське шосе, 121, e-mail: vergolyas@meta.ua
[2] *Мелітопольський державний педагогічний університет імені Богдана Хмельницького,*
Україна, 72300, Запорізька область, м. Мелітополь, вул. Гетьманська, 20, e-mail: dashyliakovalnko30@gmail.com
✉ *vergolyas@gmail.com, (068) 041-95-02, (050) 541-01-00*

ДОСЛІДЖЕННЯ ЦИТОТОКСИЧНОЇ ДІЇ ПИТНОЇ ВОДИ З ВИКОРИСТАННЯМ МЕТОДІВ *IN VITRO*

Мета. Оцінка якості питної води різного походження за її цитотоксичною дією на культури клітин людини і тварин у дослідах *in vitro*. ***Методи***. Було досліджено цитотоксичний вплив контрольної води, отриманої відповідно до вимог ДСТУ 4174: 2003, водопровідної, бюветної і фасованої води «Evian». Дослідження були проведені на клітинах лінії НЕК-293 (клітини нирки людини) і лінії L929 (фібробласти миші) з Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України. ***Результати.*** Дослідження в МТТ-тесті цитотоксичності зазначених зразків води показали, що найбільшу токсичну активність щодо клітин нирки людини лінії НЕК-293 проявляли водопровідна і фасована вода (кількість життєздатних клітин за їх впливу склала 61,84 % і 79,06 % відповідно). За впливу води з бювету – 84,55 %, контрольна вода продемонструвала найменший вплив – 93,13 %. У тесті з сульфородаміном В кількість живих клітин за впливу контрольної води склала 100,00 %, водопровідної води – 80,15 %, води з бюветів – 97,11 %, «Evian» 84,70%. ***Висновки.*** Найбільший цитотоксичний ефект, за даними МТТ-тесту і тесту з сульфородаміном В, на клітини нирки людини лінії НЕК-293 і фібробласти миші лінії L929 проявляла водопровідна і фасована вода. Найменший вплив на життєздатність клітин надавала вода з бювету і контрольна. Негативний вплив води на життєздатність клітин проявлявся в порушенні функції мітохондрій і синтезу білка.

Ключові слова: цитотоксичность, культура клітин, питна вод.

Останнім часом вивчення впливу на здоров'я населення різних несприятливих факторів навколишнього середовища, пов'язаних із людською діяльністю, є найбільш актуальним і складним завданням. Небезпека негативного впливу на здоров'я населення та біоту в цілому може виникати внаслідок антропогенного забруднення водного середовища. Основними причинами забруднення водойм, за санітарно-епідеміологічним і мікробіологічними показниками, є скидання неочищених господарсько-побутових і промислових стічних вод, незадовільна експлуатація очисних споруд, відсутність санітарних зон, а також поява і накопичення відходів, що утворюються в результаті аварійних ситуацій і катастроф. У зв'язку з цим на сьогоднішній день однією з актуальних проблем є забезпечення населення України якісною і безпечною питною водою [1, 2].

Вплив питної води на споживача може варіювати залежно як від комбінації самих домішок, так і від їх концентрацій (навіть за умов відповідності встановленим санітарно-гігієнічним нормам). У воді можуть бути присутні біологічно активні домішки, які негативно впливають на здоров'я людини, та інші живі організми. Фізико-хімічні методи аналізу складу води не дають можливості вичерпно оцінювати якість води і прогнозувати вплив присутніх у ній речовин на живі об'єкти. Ці методи визначають тільки наявність і кількість хімічних елементів у тестованих водних зразках, але не можуть визначити специфіку формування якості тестованих водних зразків через дуже велику кількість можливих комбінацій хімічних сполук у водних розчинах (їх понад 75 млн.), в тому числі поведінку антропогенних сполук і природну вразливість водних екосистем до комбінованих ефектів їх забруднення. Таким чином,

© **ВЕРГОЛЯС М. Р., КОВАЛЕНКО Д. В., ХАЛІМАН І. О., ВІХЛЯЄВА М. В., МОЛОЖАН К. О., ВЕРГОЛЯС О. О.**

виникає потреба у розробці і використанні нових методів комплексної оцінки безпечності та якості питної води з можливістю прогнозування її впливу на різні живі організми [3].

В сучасній токсикологічній практиці поряд із традиційними на лабораторних тваринах експериментами оцінки токсичності ксенобіотиків використовують альтернативні моделі різної біологічної організації – безхребетні тварини, гідробіонти, мікроорганізми, рослини, культури клітин людини та тварин [3, 4].

Багатьма дослідженнями підтверджено, що методи in vitro є досить точними, швидкими у постановці та економічно рентабельними. Перспективність досліджень із використанням методів in vitro підсилюється і зростаючою увагою до ролі етичних аспектів під час вибору об'єкта досліджень, збільшенням зацікавленості науковців та широкої громадськості у гуманному ставленні до теплокровних тварин, скороченням їх чисельності в наукових експериментах [5, 6].

За рекомендаціями ISO (International Organization for Standardization), ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) та інших міжнародних організацій, дослідження цитотоксичної дії речовин можуть проводитися на первинних культурах клітин і тканин, виділених з організму тварин, людини, а також постійних клітинних лініях, отриманих з окремих видів пухлин. Вибір клітин-мішеней залежить від очікуваних біологічних ефектів досліджуваної речовини. Дослідження безпосередньо на культурі клітин людини спрощує екстраполяцію даних і прогнозування токсичності речовини відносно організму людини [6, 7, 8].

Метою дослідження була оцінка якості питної води різного походження за даними її цитотоксичної дії на культури клітин людини і тварин в умовах *in vitro.*

Матеріали і методи

Під час дослідження визначали цитотоксичну дію контрольної води, що отримана згідно з рекомендаціям ДСТУ 4174:2003 в лабораторії на базі ПВНЗ Міжнародної академії екології та медицини, води з водогону (зразок води набрали в Святошинському районі м. Києва), води з бювету (зразок води набрали в парку ім. Шевченка) і фасованої води «Evian» (зразок води придбали в торговому центрі «Ашан»).

Дослідження були проведені на клітинах лінії НЕК-293 (ембріональні клітини нирки людини), лінії L929 (фібробласти миші), люб'язно наданих Інститутом мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України.

Клітини культивували в поживному середовищі RPMI 1640 («SIGMA», США), яке містило 4 ммоль/л L-глутаміну, 10 % ембріональної сироватки теляти («SIGMA», США), 40 мкг/мгл гентаміцину, у термостаті за 37 ^{o}C з 5 % CO_2 на пластиковому посуді (SenteLab, Україна). Зміну середовища проводили кожні 2 доби. Пересів клітин здійснювали за допомогою розчину Версена за утворення клітинами суцільного моношару (4 – 5 доба росту). Дослідження проводили за умови наявності у клітинній суспензії не менше 90 % живих клітин [6, 9].

Під час дослідження клітини висаджували на 96-лункові планшети в концентрації 1×10^5/мл (по 100 мкл на лунку) у повному ростовому середовищі. Через 24 години до цих середовищ вносили досліджувані зразки води. За контроль були взяті лунки з клітинами, в які не додавали воду. Цитотоксичну активність води щодо до культур клітин визначали в тестах із метилтетразолієм (МТТ) та сульфородаміном В (SR B) після 24 годин інкубації. Експеримент повторювали двічі.

Принцип методу МТТ заснований на здатності сукцинатдегідрогенази – фермента мітохондріальної мембрани клітини – відновлювати жовту сіль метилтетразолію (3-[4,5-диметилтіазол-2-іл] – 2,5-дифенілтетразолія бромід) до кристалів формазану фіолетового кольору, що накопичуються в результаті цієї реакції в цитоплазмі живих клітин. Таким чином, за інтенсивністю накопичення кристалів формазану в цитоплазмі можна судити про рівень мітохондріального дихання клітини, що є показником її життєздатності. Тест фарбування сульфородаміном В дозволяє визначити вміст загального білка, що може бути показником приросту клітин та їх проліферації [9, 10, 11, 12].

Кількість життєздатних клітин в обох методах розраховували за формулою: ОГдл / ОГкл х 100%, де: ОГкл – оптична густина розчину в контрольних лунках; ОГдл – оптична густина розчину в дослідних лунках. Оптичну густину контрольних і дослідних лунок визначали за допомогою мультилункового спектрофотометра Sunrise Tecan (Австрія) за довжини хвилі 540 нм [11, 13].

Результати та обговорення

Результати МТТ-тесту показали, що найменший цитотоксичний вплив на ембріональні клітини нирки людини справила контрольна вода, за її впливу кількість життєздатних клітин становила 93,13±0,09 %. Найбільшу цитотоксичну активність щодо культури клітин лінії НЕК-293 проявляли зразки води з водогону та фасована (кількість життєздатних клітин за їх впливу становила 61,84±4,78 % і 79,06±5,04 %, $p<0,05$ порівняно з контрольною водою). За впливу води з бювету кількість життєздатних клітин була 84,55±0,14 %, ($p<0,05$). За даними, що були отримані в тесті з сульфородаміном В, кількість живих клітин після додавання контрольної води становила 100,00±1,00 %, тоді як води з водогону – 80,15±1,15 %, води з бювету – 97,11±1,15% і фасованої води – 84,70±3,14% ($p<0,05$) (табл. 1). Ці дані можуть свідчити про те, що контрольна та вода з бювету суттєво не впливали на синтез білка.

Під час дослідження цитотоксичної активності питної води щодо клітин лінії L929 було встановлено, що за додавання контрольної води кількість живих клітин склала 91,05±6,01 % та води з бювету – 84,10±0,15 %. Найбільшу цитотоксичну активність щодо фібробластів миші проявили вода з водогону – кількість життєздатних клітин 53,77±1,15 % і вода фасована – кількість життєздатних клітин 64,03±0,70 % (табл. 2).

За даними тесту з сульфородаміном В, спостерігали таку ж картину. Кількість життєздатних клітин після додавання до середовища культивування контрольної води становила 90,10±3,15 %, води з водогону – 62,55±1,25 %, води фасованої – 67,01±1,10 % води з бювету – 81,98±4,03 % (табл. 2).

Під час дослідження цитотоксичності питної води було встановлено зміни морфології клітин (рис.). За додавання у поживне середовище для культивування клітин лінії L929 контрольної води суттєвого порушення їхнього моношару не встановлено (рис. а).

Після додавання до клітин L929 води з водогону спостерігали їх округлення, підвищену вакуолізацію, збільшення ядер, зниження їхньої здатності до адгезії, зміну форми. Все це може бути ознаками апоптозу клітин (рис. б). Інкубація клітин з фасованою водою сприяла порушенню клітинних контактів, округленню та лізису клітин (рис. в). За впливу води з бювету суттєвих змін морфології клітин L929 встановлено не було, за зовнішнім виглядом клітини були подібні до клітин у контрольних лунках (рис. г).

Отримані результати дослідження кореспондують із даними наукової літератури. Так, в експериментах, що виконані в роботі [14], показано, що внесення до культури клітин хлорованої води з водогону вже через 2 год спричиняло цитотоксичну дію. При цьому спостерігали деструкцію моношару, склеювання, зміни морфологічної структури клітин. Найбільш чутливими до токсичного впливу досліджуваної води виявилися клітин нирок людини лінії НЕК-293, що може вказувати на негативний вплив води на сечовидільну систему.

Таблиця 1. Цитотоксична активність питної води різного походження на клітини лінії НЕК-293

Метод дослідження	% життєздатних клітин за впливу різних зразків води			
	Вода контрольна	Вода з водогону	Вода фасована	Вода з бювету
МТТ-тест	93,13±0,09	61,84±4,78*	79,06±5,04*	84,55±0,14*
Тест з сульфородаміном В	100,00±1,06	80,15±1,15*	84,70±3,14*	97,11±1,15*

Примітка. * – позначена вірогідна відмінність ($p < 0,05$) щодо показників для контрольної води.

Таблиця 2. Цитотоксична активність питної води різного походження на клітини лінії L 929

Метод дослідження	% життєздатних клітин за впливу різних зразків води			
	Вода контрольна	Вода з водогону	Вода фасована	Вода з бювету
МТТ-тест	91,05±6,01	53,77±1,15*	64,03±0,70*	84,10±0,15
Тест з сульфородаміном В	90,10±3,15	62,55±1,25*	67,01±1,10*	81,98±4,03

Примітка. * – позначена вірогідна відмінність ($p < 0,05$) щодо показників для контрольної води.

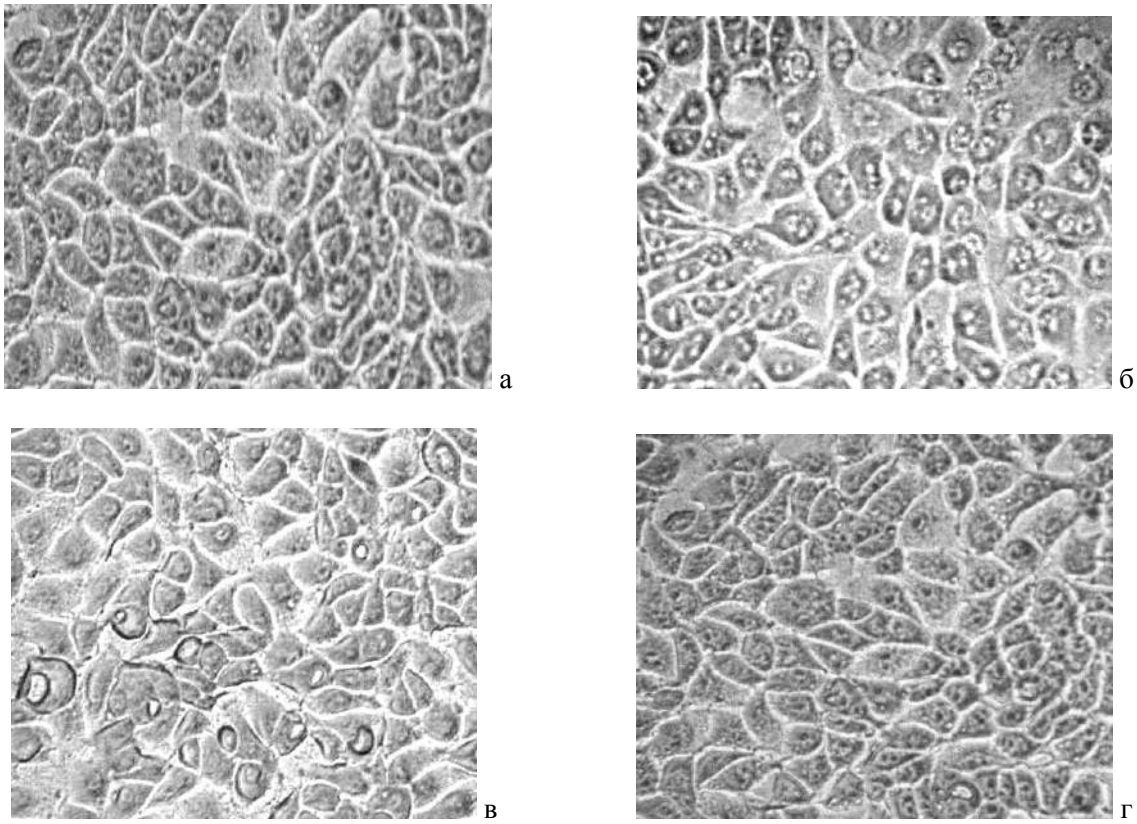

Рис. Клітини лінії L929 після 24 годин інкубації із зразками питної води (фарбування сульфородаміном В, зб.х100): а) вода контрольна; б) вода з водогону; в) вода фасована; г) вода з бювету.

Висновки

Отже, дослідження цитотоксичної активності питної води різного походження на культурі клітин в умовах in vitro дозволяють дійти таких висновків:

– негативний вплив питної води на життєздатність клітин залежав від її хімічного складу та проявлявся у порушенні функції мітохондрій та синтезу білка;

– найбільший цитотоксичний вплив, за даними МТТ-тесту та тесту з сульфородаміном В, на клітини нирки людини (лінія НЕК-293) спричиняла вода з водогону та фасована вада «Evian»;

– за використання фібробласти миші (лінія L 929) також спостерігали негативний вплив питної води з водогону та фасованої води;

– найменший цитотоксичний вплив на життєздатність клітин спричиняла вода з бювету та контрольна вода.

Результати представленої роботи підтверджують отримані дані наукових досліджень про перспективність використання культури клітин людини і тварин для оцінки якості питної води.

References

1. Serdyuk A.M., Polka N.S., Makhnyuk V.M. Modern problems of hygiene of planning and building of settlements (normative-legal regulation). Kyiv: Medinform, 2014. 174 s. [in Ukraine]
2. Prokopov V.O. Drinking water of Ukraine: medical-ecological and sanitary-hygienic aspects. Kyiv: «Medicine», 2016. 400 s. [in Ukrainian].
3. Vergolyas M. Cytogenetic evaluation of the drinking water toxicity. *EUREKA: Life Sciences.* 2016. Vol. 1. P. 47–54. doi: http://dx.doi.org/10.21303/2504-5695.2016.00054
4. Trachtenberg I.M. Alternative methods and test systems. Kyiv: VD "Avicenna", 2008. 268 s. [in Ukrainian]
5. Clemedson C., Kolman A., Forsby A. The Integrated Acute Systemic Toxicity Project (ACuteTox) for the optimisation and validation of alternative in vitro tests. *Altern Lab Anim.* 2007. Vol. 35. doi: https://doi.org/10.1177/026119290703500102.
6. Vergolyas M.R., Trachtenberg I.M., Dmitrukha I.M. Estimation of cytotoxic activity of water from different sources of water supply. *Environment and Health*. 2016. Vol. 4 (80). P. 19–22 [in Ukrainian].
7. Combes R.D. The use of human cells in biomedical research and testing. *Altern. Lab. Anim*. 2004. Vol. 32. P. 43–49.

8. Cavas T. The evaluation of toxicity and mutagenicity of various drinking waters in the human blood lymphocytes (HULYs) in vitro. *Food and Chemical Toxicology*. 2008. Vol. 46 (7). P. 247–254.
9. Trakhtenberg I.M., Ulberg Z.R., Chekman I.S., Dmitrukha N.M. Methodical recommendations. Safety assessment of medicinal nanopreparations. Kyiv, 2011. 108 p. [in Ukrainian].
10. Lee S.K., Kim H.J., Chi S.G., Jang J.Y. Bioflor suppresses expression of Interleukin-8 in HT-29 cell. *Intestinal Res*. 2004. Vol. 2 (2). P. 96–101.
11. Atlas RM. Handbook of Microbiological Media. 4th edition. London New York: Boca Raton: CRC Press; 2010.
12. Jozefczuk J., Drews K., Adjaye J. Preparation of mouse embryonic fibroblast cells suitable for culturing human embryonic and induced pluripotent stem cells. *J Vis Exp*. 2012. Vol. 64. P. 3854. doi: 10.3791/3854.
13. Vergolyas M. Research of cytotoxic activity of water from different water supply sources. *Adv Tissue Eng Regen Med Open Access.* 2019. Vol. 5 (3). P. 92– 96. doi: 10.15406/atroa.2019.05.00105.
14. Yakubchak O.M., Zagrebelny V.O., Adamenko L.V. Regarding the toxicity of chlorinated tap water. *Scientific Bulletin of the National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine.* 2013. Vol. 188 (3). P. 182–185.

VERGOLYAS M.R.[1,2], KOVALENKO D.V.[2], KHALIMAN I.O.[2], VIKHLIAIEVA M.V.[2], MOLOZHAN K.O.[2], VERHOLIAS O.O.[2]

[1] *International Academy of Ecology and Medicine,*
Ukraine, 02091, Kyiv, Kharkov highway, 121, e-mail: vergolyas@meta.ua
[2] *Bogdan Khmelnitsky Melitopol State Pedagogical University,*
Ukraine, 72300, Melitopol, Hetmanska str., 20, e-mail: dashyliakovalnko30@gmail.com

RESEARCH OF CYTOTOXIC OF DRINKING WATER USING METHODS *IN VITRO*

Aim. The aim of this work is to assess the quality of drinking water of various origins by its cytotoxic effect on human and animal cell cultures in *in vitro* experiments. ***Methods*.** The cytotoxic effect of control water obtained in accordance with the requirements of DSTU 4174: 2003, tap water, pump room and packaged Evian water was studied. The studies were carried out on NEC-293 cells (human kidney cells) and L929 (mouse fibroblasts) cells from the Institute of Microbiology and Virology named after V.I. D.K. Zabolotny National Academy of Sciences of Ukraine. ***Results***. Studies in the MTT test of cytotoxicity of these water samples showed that tap water and bottled water exhibited the greatest toxic activity against human kidney cells of the NEC-293 line (the number of viable cells under their influence was 61.84% and 79.06%, respectively). Under the influence of water from the pump room - 84.55%, the control water showed the least influence - 93.13%. In the test with sulforhodamine B, the number of living cells under the influence of control water was 100.00%, tap water 80.15%, water from pump rooms 97.11%, Evian 84.70%. ***Conclusions*.** The greatest cytotoxic effect according to the MTT test and the test with sulforhodamine B on human kidney cells of the HEK-293 line and fibroblasts of the L929 mouse was exhibited by tap and bottled water. The least influence on the viability of the cells was exerted by the water from the pump room and the control. The negative effect of water on cell viability was manifested in the dysfunction of mitochondria and protein synthesis.
Keywords: cytotoxicity, cell culture, drinking water.