

ASSESSMENT OF CYTOTOXIC ACTIVITY OF WATER FROM VARIOUS WATER SUPPLY SOURCES

Verholias M.R., Trakhtenberg I.M., Dmytrukha N.N.

ОЦІНКА ЦИТОТОКСИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ВОДИ ІЗ РІЗНИХ ДЖЕРЕЛ ВОДОПОСТАЧАННЯ

3

¹ ВЕРГОЛЯС М.Р.,
² ТРАХТЕНБЕРГ І.М.,
² ДМИТРУХА Н.М.

¹ Інститут колоїдної хімії та хімії води НАН України
ім. Думанського А.В., м. Київ
² ДУ «Інститут медицини праці Національної академії медичних наук України, м. Київ

УДК 574.64:57.085.23

Ключові слова:
цитотоксичність,
культура кліток,
питна вода.

абруднення біосфери шкідливими хімічними речовинами загрожує стану довкілля, здоров'ю населення і обмежує можливості подальшого збалансованого розвитку суспільства [1].

Однією з актуальних і нагальних нині проблем є забезпечення населення України якісною і безпечною питною водою. Вплив питної води на споживача може варіюватися залежно від комбінації самих домішок і від їхніх концентрацій навіть за умов відповідності встановленим санітарно-гігієнічним нормам. У воді можуть бути присутніми біологічно активні домішки, які негативно впливають на здоров'я людини та інші живі організми. Сучасні фізико-хімічні методи аналізу складу води не дають можливості вичерпно оцінювати якість води і прогнозувати вплив присутніх у ній речовин на біологічні об'єкти. Таким чином, виникає потреба у розробці і використанні нових методів комплексної оцінки безпечності та якості питної води з можливістю прогнозування її впливу на різні живі організми [2].

У сучасній токсикологічній практиці разом з традиційними експериментами оцінки токсичності ксенобіотиків на лабораторних тваринах використовують альтернативні моделі різної біологічної організації – безхребетних тварин, 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 з використанням методів *in vitro* підсилюється і зростаючою увагою до ролі етичних аспектів при виборі об'єкту досліджень, збільшенням зацікавленості науковців та широкої громадськості у гуманному ставленні до теплокровних тварин, скорочення чисельності їх у наукових експериментах [5].

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 із організму тварин, людини, а також постійних клітинних лініях, отриманих із 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 щодо організму людини [6].

Метою нашого дослідження була оцінка якості питної води з різних джерел водопостачання за даними її цитотоксичної дії на культури клітин людини і тварин в умовах *in vitro*.

Матеріали та методи дослідження. Під час дослідження визначали цитотоксичну дію контрольної води, що отримана згідно з рекомендаціями ДСТУ 4174:2003 у лабораторії

ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ВОДЫ ИЗ РАЗНЫХ ИСТОЧНИКОВ ВОДОСНАБЖЕНИЯ

¹ Верголяс М.Р., ² Трахтенберг И.М., ² Дмитруха Н.Н.

¹ Институт коллоидной химии и химии воды им. Думанского А.В. НАН Украины, г. Киев

² ГУ «Институт медицины труда Национальной академии медицинских наук Украины, г. Киев

Цель работы — оценка качества питьевой воды из разных источников водоснабжения по ее цитотоксическому действию на культуры клеток человека и животных в опытах *in vitro*.

Материалы и методы. Нами было исследовано цитотоксическое влияние контрольной воды, полученной в соответствии с требованиями ДСТУ 4174:2003 в лаборатории ИКХХВ НАН Украины, водопроводной, бюветной воды и бутилированной воды «Знаменская». Исследования были проведены на клетках линии НЭК-293 (клетки почки человека), линии L929 (фибробласты мыши) и РТР (клетки тестикул поросят) из Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины.

Результаты. Исследования в МТТ-тесте цитотоксичности указанных образцов воды показали, что наибольшую токсическую активность в отношении клеток почки человека линии НЭК-293 проявляли водопроводная и бюветная вода (количество жизнеспособных клеток под их влиянием составило

64,41% и 77,00% соответственно). Под влиянием воды «Знаменская» количество жизнеспособных клеток было 81,75%. Контрольная вода продемонстрировала наименьшее влияние — 91,73%. В тесте с сульфородаминном В количество живых клеток под влиянием контрольной воды составило 103,00%, водопроводной воды — 82,45%, воды из бювета — 89,20%, «Знаменская» — 96,75%. В тесте с сульфородаминном В количество жизнеспособных клеток после добавления контрольной воды составляло 81,45%, воды «Знаменская» — 69,45%, водопроводной воды — 68,2%, воды из бювета — 66,95%.

Выводы. Наибольший цитотоксический эффект, по данным МТТ-теста и теста с сульфородаминном В, на клетки почки человека линии ХЕК-293 проявляла водопроводная вода, а на фибробласты мыши линии L929 и клетки тестикул поросят РТР — вода из бювета. Наименьшее влияние на жизнеспособность клеток оказывала вода контрольная. Негативное влияние воды на жизнеспособность клеток проявлялось в нарушении функции митохондрий и синтеза белка. Более чувствительными к токсическому действию воды оказались клетки линии РТР, что может указывать на возможное негативное влияние воды на половую систему организма.

Ключевые слова: цитотоксичность, культура клеток, питьевая вода.

© Верголяс М.Р., Трахтенберг И.М., Дмитруха Н.М.

СТАТТЯ, 2016.

Інституту колоїдної хімії та хімії води НАН України ім. А.В. Думанського, води із водогону цього інституту, води із бювета і фасованої води «Знаменівська». Обрані зразки питної води відрізнялись за хімічним складом.

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

Клітини культивували у 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 температури 37°C з 5% CO₂ на пластиковому посуді (SenteLab, Україна). Зміну середовища проводили кожні 2 доби. Пересів клітин здійснювали за допомогою розчину Версену при утворенні клітинами суцільного моношару (4-5 доба росту). Дослідження проводили за умови наявності у клітинній суспензії не менше 90% живих клітин.

Під час дослідження клітини висаджували на 96-лункові планшети у концентрації 1x10⁵/мл (по 100 мкл на лунку) у повному ростовому середовищі. Через 24 години до клітин

вносили досліджувані зразки води. За контроль було взято лунки з клітинами, в які не додавали воду. Цитотоксичну активність води щодо культур клітин визначали у тестах з метилтетразолієм (МТТ) та сульфородаміном В (SR В) після 24 годин інкубації.

Принцип методу МТТ заснований на здатності сукцинатдегідрогенази – ферменту мітохондріальної мембрани клітини відновлювати жовту сіль метилтетразолію (3-[4,5-диметилтіазол-2-іл] – 2,5-дифенілтетразол-ол-2-іл) – 2,5-дифенілтетразолу до кристалів формазану фіолетового кольору, що накопичуються у результаті цієї реакції у цитоплазмі живих клітин. Таким чином, за інтенсивністю накопичення кристалів формазану у цитоплазмі можна судити про рівень мітохондріального дихання клітини, що є показником їхньої життєздатності. Тест фарбування сульфородаміном В дозволяє визначити вміст загального білка, що може бути показником приросту клітин та їх проліферації [7].

Кількість життєздатних клітин в обох методах розраховували за формулою: ОГдл / ОГкл x 100%, де ОГкл – оптична густина розчину у контрольних лунках; ОГдл – оптична густина розчину у дослідних лунках. Оптичну густина контрольних і дослідних лунок визначали за допомогою мультилункового спектрофото-

метра Sunrise Tecan (Австрія) за довжини хвилі 540 нм.

Результати дослідження та їх обговорення. Результати МТТ-тесту показали, що найменший цитотоксичний вплив на ембріональні клітини нирки людини справила контрольна вода. За її впливу кількість життєздатних клітин становила (91,73±0,06)%. Найбільшу цитотоксичну активність щодо культури клітин лінії НЕК-293 проявляли зразки води із водогону та бювета (кількість життєздатних клітин за їхнього впливу становила (64,41±6,98)% і (77,00±6,14)%, p<0,05 порівняно з контрольною водою). За впливу фасованої води «Знаменівська» кількість життєздатних клітин становила (81,75±0,64)% (p<0,05). За даними, отриманими у тесті з сульфородаміном В, кількість живих клітин після додавання контрольної води становила (103,00±1,10)%, тоді як води із водогону – (82,45±0,50)%, води із бювета – (89,20±3,40)%, бутильованої води «Знаменівська» – (96,75±1,05)% (p<0,05) (табл. 1). Ці дані можуть вказувати на те, що контрольна та «Знаменівська» води суттєво не впливали на синтез білка.

Під час дослідження цитотоксичної активності питної води щодо клітин лінії L929 було встановлено, що при додаванні контрольної води кількість живих клітин склала (88,55±8,55)%. Найбільшу цитотоксичну активність щодо фібробластів миші проявили вода із бювета (кількість життєздатних клітин – (58,56±1,45)%) і вода «Знаменівська» (кількість життєздатних клітин – (61,90±0,80)%). При додаванні до середовища культивування клітин L929 води із водогону встановлено підвищення показника життєздатності до (134,30±0,01)%. Таке збільшення може бути ознакою стимуляції дихальної функції цих клітин (табл. 2).

За даними тесту з сульфородаміном В, усі досліджувані зразки води справляли приблизно однаковий вплив на життєздатність клітин лінії L929. Так, кількість життєздатних клітин після додавання до середовища культивування контрольної води становила (70,40±1,50)%, води із водогону – (66,85±3,05)%, води із бювета – (65,50±1,60)%, води «Знаменівська» – (68,90±4,50)% (табл. 2).

Дослідження, що були виконані на клітинах РТР у МТТ-тесті, дозволили встановити, що за умови культивування клітин з

Таблиця 1
Цитотоксична активність питної води із різних джерел водопостачання на клітини лінії НЕК-293

Метод дослідження	% життєздатних клітин за впливу різних зразків води			
	контрольна	із водогону	із бювета	Знаменівська
МТТ-тест	91,73±0,06	64,41±6,98*	77,00±6,14*	81,75±0,64*
Тест з сульфородаміном В	103,00±1,10	82,45±0,50*	89,20±3,40*	96,75±1,05*

Таблиця 2

Цитотоксична активність питної води із різних джерел водопостачання на клітини лінії L 929

Метод дослідження	% життєздатних клітин за впливу різних зразків води			
	контрольна	із водогону	із бювета	Знаменівська
МТТ-тест	88,55±8,55	134,30±0,01*	58,56±1,45*	61,90±0,80*
Тест з сульфородаміном В	70,40±1,50	66,85±3,05	65,50±1,60	68,90±4,50

Таблиця 3

Цитотоксична активність питної води із різних джерел водопостачання на клітини РТР

Метод дослідження	% життєздатних клітин за впливу різних зразків води			
	контрольна	із водогону	із бювета	Знаменівська
МТТ-тест	72,80±0,60	65,50±4,40*	61,50±8,00*	66,75±5,45
Тест з сульфородаміном В	81,45±6,90	68,20±1,80*	66,95±1,95*	69,45±4,65

Примітка до таблиць 1-3: * – позначено вірогідну відмінність (p<0,05) щодо показників для контрольної води.

ASSESSMENT OF CYTOTOXIC ACTIVITY OF WATER FROM VARIOUS WATER SUPPLY SOURCES

¹ Verholias M.R., ² Trakhtenberg I.M., ² Dmytrukha N.N.

Dumansky A.V. Institute of Colloid Chemistry and Water

¹ Chemistry, National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv

² State Institution "Institute of Occupational Medicine, National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv

Objective. We assessed a quality of drinking water from various sources of water supply by its cytotoxic effect on the cultures of human and animal cells in the experiments *in vitro*.

Materials and methods. We investigated a cytotoxic effect of control water, obtained according to the requirements of the State Standards of Ukraine 4174: 2003 in the Laboratory of the Institute of Colloid Chemistry and Water Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, tap water, pump-room water, and bottled water "Znamenska." Studies were performed on the cells of HEK-293 line (human kidney cells), L929 line (mouse fibroblasts), and RTR (piglet testicles cells) from Zabolotny D.K. Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine.

Results. Research of cytotoxicity of mentioned water samples in the MTT-test showed that the most toxic activity against human kidney cells (HEK-293) was

manifested by the pump room water and tap water (a number of viable cells under their effect made up 64.41% and 77.00% respectively). In "Znamenska" water a number of viable cells made up 81.75%, control water demonstrated the smallest impact -91.73%. In the test with sulforodamin B a number of living cells under exposure of control water made up 103.00%, of tap water — 82.45%, of water from the pump rooms — 89.20%, of "Znamenska" water — 96.75%. In the test with sulforodamin B after addition of control water a number of viable cells was 81.45%, after addition of "Znamenska" water — 69.45%, tap water — 68.2%, and water from the pump room — 66.95%.

Conclusions. Tap water had the highest cytotoxic effect according to MTT-test and test with sulforodamin B on human kidney cells (HEK-293), water from the pump room had the highest effect on the mouse fibroblast (L 929), water from the pump room had the highest one on the RTR testicles of piglets. Control water had the smallest impact on the cell viability. A negative impact of water on cell viability was manifested in the violations of mitochondria function and protein synthesis. The cells of RTR line were more sensitive to the toxic effect of water that may indicate the possible negative impact of water on the reproductive system of the organism.

Keywords: cytotoxicity, cell culture, drinking water.

контрольною водою кількість життєздатних клітин склала (72,80±0,60)%. Найбільшою цитотоксичною активністю володіла вода із бювета (кількість життєздатних клітин була 61,50±8,00%). Води із водогону і «Знаменівська» мали майже однаковий вплив на виживаність клітин тестикулів поросят (65,50±4,40)% і (66,75±5,45)% живих клітин) (табл. 3).

У тесті з сульфородаміном В кількість життєздатних клітин РТР після додавання контрольної води становила (81,45±6,90)%, води із водогону — (68,20±1,80)%, води «Знаменівська» — (69,45±4,65)%, наймен-

ша — за впливу води із бювета — (66,95±1,95)% (табл. 3).

Таким чином, отримані результати свідчать, що досліджувані зразки питної води справляли різну цитотоксичну дію на культури клітин людини та тварин. Найбільшу токсичну дію на клітини справляла вода із бювета, а більш чутливими до впливу води виявилися клітини тестикулів поросят (РТР).

При дослідженні цитотоксичності питної води було встановлено зміни морфології клітин (рис. 1). Так, при додаванні до поживного середовища для культивування клітин лінії L929 контрольної води в окремих клі-

тинах було виявлено збільшені вакуолі, проте суттєвого порушення їхнього моношару не встановлено (рис. 1б).

Після додавання до клітин L929 води із водогону спостерігали округлення їх, підвищену вакуолізацію, збільшення ядер, зниження їхньої здатності до адгезії, зміну форми. Усе це може бути ознаками апоптозу клітин (рис. 1в). Інкубація клітин з водою із бювета сприяла порушенню клітинних контактів, округленню та лізису клітин (рис. 1г). За впливу води «Знаменівська» суттєвих змін морфології клітин L929 встановлено не було. За зовнішнім виглядом

Рисунок 1

Клітини лінії L929 після 24 годин інкубації зі зразками питної води (фарбування сульфородаміном В, зб. x100).

а) – контрольні (інтактні) клітини; б) – вода контрольна; в) – вода із водогону; г) – вода із бювета; д) – вода «Знаменівська»

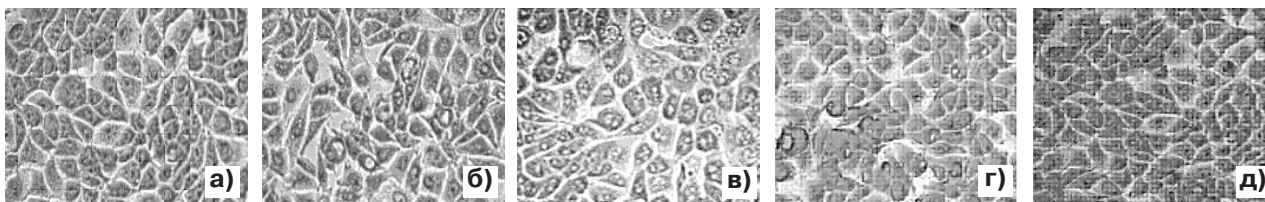
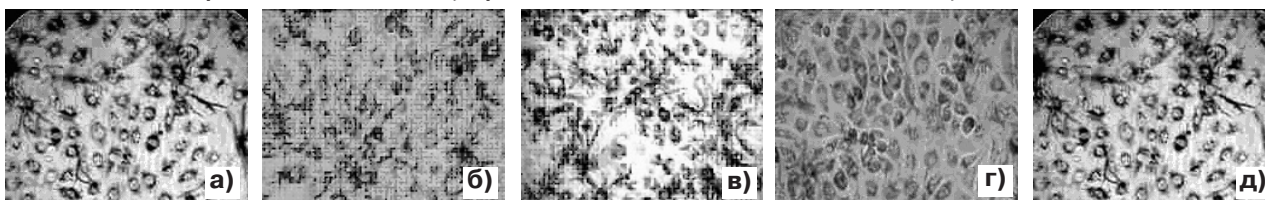


Рисунок 2

Утворення кристалів формазану у клітинах лінії L929 після 24 годин інкубації з різними зразками питної води:

а) – контрольні (інтактні) клітини; б) – вода контрольна; в) – вода із водогону; г) – вода із бювета; д) – вода «Знаменівська». МТТ-тест, зб. x100



клітини були подібні до клітин у контрольних лунках (рис. 1д).

На рисунку 2 представлено інтенсивність утворення кристалів формагану у клітинах L929 після 24 годин інкубації з досліджуваними зразками питної води (дані МТТ-тесту). Найбільш інтенсивне утворення кристалів формагану було встановлено у клітинах L929, що зазнавали впливу води із водогону (рис. 2в), а найменше – за дії води із бювета (рис. 2г).

Слабке утворення кристалів формагану є ознаками низької життєздатності клітин, зокрема дихальної функції мітохондрій, що свідчить про цитотоксичну активність води.

При дослідженні морфології клітин РТР після інкубації їх з питною водою із різних джерел було виявлено зміни (рис. 3). Так, після інкубації клітин з контрольною водою було встановлено округлення окремих клітин та наявність у них крупних вакуолей, схожих на повітряні пухирці, при цьому порушення моношару не спостерігалось (рис. 3б). При додаванні до клітин РТР води із водогону було виявлено порушення моношару за рахунок округлення і роз'єднання клітин, збільшення кількості мертвих клітин. В окремих клітинах були наявні збільшені за розміром вакуолі (рис. 3 в).

Вода із бювета при додаванні до клітин РТР викликала найбільший токсичний ефект, спостерігали порушення моношару, появу округлених інтенсивно забарвлених апоптичних клітин (рис. 3г). За впливу води «Знаменівська» суттєвих змін у структурі моношару та самих клітинах порівняно з контрольними виявлено не було (рис. 3д).

Отримані результати дослідження кореспондують с даними літератури. Так, в експериментах, описаних у роботі [8], показано, що внесення до культури клітин хлорованої води із водогону вже за 2 години справляло цитотоксичну дію. При цьому спостерігали деструкцію моношару, склеювання, зміни морфологічної структури клітин.

Найбільш чутливими до токсичного впливу досліджуваної води виявилися клітини нирок людини лінії ХЕК-293, що може вказувати на негативний вплив води на сечовидільну систему.

Таким чином, дослідження цитотоксичної активності питної води із різних джерел водопостачання на культурі клітин в умовах *in vitro* дозволяють дійти таких **висновків**:

1. Негативний вплив питної води на життєздатність клітин залежав від її хімічного складу та проявлявся у порушенні функції мітохондрій та синтезу білка.

2. Найбільший цитотоксичний вплив, за даними МТТ-тесту та тесту з сульфородаміном В, на клітини нирки людини (лінія ХЕК-293) справляла вода із водогону, а на фібробласти миші (лінія L 929) та клітини тестикулів поросят (РТР) – вода із бювета. Найменший вплив на життєздатність клітин мала вода контрольна.

3. Більш чутливими до токсичної дії води виявилися клітини лінії РТР, що може вказувати на можливий негативний вплив води на статеву систему організму.

ЛІТЕРАТУРА

1. Сердюк А.М. Навколишнє середовище і здоров'я населення // Довкілля та здоров'я. — 1998. — № 4 (7). — С. 2-6.
2. Верголяс М.Р. Оценка качества воды с помощью тест-организмов и их клеток / М.Р. Верголяс, В.В. Гончарук // Химия и технология воды. — 2016. — Т. 38, № 1. — С. 108-118.
3. Альтернативні методи і тест-системи / І.М. Трахтенберг, В.М. Коваленко, Н.В. Кокшарева та ін. — К.: Авіценна, 2008. — 268 с.
4. Гончарук В.В. Исследование мутагенности и генотоксичности питьевой воды / В.В. Гончарук, М.Р. Верголяс, И.В. Болтина // Химия и технология воды. — 2013. — № 5. — С. 426-435.
5. Optimization and pre-validation of an *in vitro* test strategy for predicting human acute toxicity / С. Clemedson, В. Blaauboer, J. Castell et al. // ALTEX. — 2006. — № 23 (Suppl.). — P. 254-258.
6. Combes R.D. The use of human cells in biomedical research and testing / R.D. Com-

bes // Altern. Lab. Anim. — 2004. — № 32. — P. 43-49.

7. Методичні рекомендації. Оцінка безпеки лікарських нанопрепаратів / І.М. Трахтенберг, З.Р. Ульберг, І.С. Чекман та ін. — Київ, 2011. — 108 с.

8. Якубчак О.М. Щодо токсичності хлорованої водопровідної води / О.М. Якубчак, В.О. Загребельний, Л.В. Адаменко // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. — 2013. — Вип. 188 (3). — С. 182-185.

REFERENCES

1. Serdiuk A.M. Dovkillia ta zdorovia. 1998; 4 (7) : 2-6 (in Ukrainian).
2. Vergolias M. R., Goncharuk V.V. Khimiia i tekhnologiiia vody. 2016; 38 (1) : 108-118 (in Russian).
3. Trakhtenberh I.M., Kovalenko V.M., Kokshareva N.V. et al. Alternatyvni metody i test-systemy [Alternative Methods and Test Systems]. Kyiv : Avitsenna; 2008 : 268 p. (in Ukrainian).
4. Goncharuk V.V., Vergolias M.R., Boltina I.V. Khimiia i tekhnologiiia vody. 2013; 5 : 426-435 (in Russian).
5. Clemedson C., Blaauboer B., Castell J., Prieto P. et al. ALTEX. 2006; 23 (suppl.) : 254-258.
6. Combes R.D. Altern. Lab. Anim. 2004; 32 : 43-49.
7. Trakhtenberh I.M., Ulberh Z.R., Chekman I.S., Dmytrukha N.M. et al. Metodichni rekomendatsii. Otsinka bezpeky likarskykh nanopreparativ [Methodical Recommendations. Assessment of the Safety of Medicinal Nanopreparations]. Kyiv; 2011 (in Ukrainian).
8. Yakubchak O.M., Zahrebelnyi V.O., Adamenko L.V. Shchodo toksychnosti khlorovanoi vodoprovodnoi vody [On the Toxicity of Chlorinated Tap Water]. In : Naukovyi visnyk Natsionalnoho universytetu biosursiv i pryrodokorystuvannia Ukrainy. Ser.: Veterynarna medytsyna, yakist i bezpeka produktsii tvarynnystva [Scientific Bulletin of the National University of Bioresources and Nature Management of Ukraine. Ser.: Veterinarian Medicine, Quality, and Safety of Cattle-Breeding Production]. 2013; 188 (3) : 182-185 (in Ukrainian).

Надійшло до редакції 02.08.2016

Рисунок 3

Морфологія клітин лінії РТР після 24 годин інкубації з різними зразками питної води:
а) – контрольні (інтактні) клітини; б) – з водою контрольною; в) – вода із водогону;
г) – вода із бювета; д) – вода «Знаменівська». Фарбування сульфородаміном В, зб. x100

