



Мамонова И.А.^{1,2}, Кошелева И.С.¹, Широков А.А.^{2,3,4}, Гусев Ю.С.^{1,3,4},
Микеров А.Н.^{1,2}

Использование культуры клеток человека для оценки токсичности воды (обзор литературы)

¹Саратовский медицинский научный центр гигиены ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 410022, Саратов, Россия;

²ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского», 410012, Саратов, Россия;

³ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», 410012, Саратов, Россия;

⁴Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр "Саратовский научный центр Российской академии наук"», 410012, Саратов, Россия

Проблема загрязнения водных объектов, связанная с растущей антропогенной нагрузкой, привлекает особое внимание. Большинство алгоритмов изучения физико-химических характеристик образцов воды для оценки гигиенического состояния водоисточников не позволяют определить весь спектр загрязняющих соединений. Однако санитарно-химический анализ водных объектов становится более информативным при его сочетании с биотестированием. Одним из перспективных направлений является использование в качестве тест-объектов клеточных линий человека. Для подготовки литературного обзора использовали источники, опубликованные за последние 10 лет и размещённые в следующих базах данных: Scopus, Web of Science, PubMed, РИНЦ. Информация, полученная в результате проведённого анализа литературных данных, свидетельствует о высокой чувствительности клеточных линий, полученных из пищеварительной (Caco-2, HepG2) и выделительной (HEK-293) систем человека, к содержащимся в образцах воды поллютантам. Данные указывают не только на цитопатическое действие находящихся в воде загрязняющих соединений, но и на изменения цитохимических и цитоморфологических характеристик культур клеток под воздействием определённого поллютанта.

Использование культуры клеток человека в качестве тест-объекта для проведения биотестирования имеет особую актуальность при исследовании без процедуры предварительной пробоподготовки воды источников, которые являются единственными для водоснабжения населения в хозяйственно-питьевых целях. Применение культуры клеток человека в процедуре биотестирования позволит дать токсикологическую характеристику проб воды и оценить возможность развития нежелательного эффекта, связанного с попаданием поллютантов во внутреннюю среду организма.

Ключевые слова: обзор; источники питьевого водоснабжения; биотестирование; культура клеток; Caco-2; HepG2; HEK-293

Для цитирования: Мамонова И.А., Кошелева И.С., Широков А.А., Гусев Ю.С., Микеров А.Н. Использование культуры клеток человека для оценки токсичности воды (обзор литературы). *Гигиена и санитария*. 2023; 102(5): 509–515. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2023-102-5-509-515> <https://elibrary.ru/zifbgn>

Для корреспонденции: Мамонова Ирина Александровна, канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. химико-биологического мониторинга качества воды Саратовского медицинского научного центра гигиены ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», 410022, Саратов. E-mail: mamonova.83@rambler.ru

Участие авторов: Мамонова И.А. – концепция и дизайн исследования, написание текста, ответственность за целостность всех частей статьи; Кошелева И.С. – сбор и обработка материала, написание текста, редактирование; Широков А.А. – написание текста, редактирование, Гусев Ю.С. – концепция и дизайн исследования; Микеров А.Н. – утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Благодарность. Выражаем благодарность сотрудникам центра коллективного пользования «Симбиоз» и лаборатории иммунохимии ИБФРМ РАН, выполняющим исследования в рамках проекта ГЗ № 121031100266-3, за оказание консультативной помощи при подборе и анализе литературных данных.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила: 22.03.2023 / Принята к печати: 31.05.2023 / Опубликовано: 20.06.2023

Irina A. Mamonova^{1,2}, Irina S. Kosheleva¹, Aleksandr A. Shirokov^{2,3,4}, Yuriy S. Gusev^{1,3,4}, Anatoly N. Mikerov^{1,2}

Using human cell culture to assess the toxicity of water (literature review)

¹Saratov Hygiene Medical Research Center of the Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Saratov, 410022, Russian Federation;

²Saratov State Medical University named after V.I. Razumovsky, Saratov, 410012, Russian Federation;

³N.G. Chernyshevsky Saratov National Research State University, Saratov, 410012, Russian Federation;

⁴Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences (IBPPM RAS), Saratov, 410012, Russian Federation

The problem of water sources pollution, connected with increasing anthropogenic charge is attracting a lot of attention nowadays. Most of hygienic evaluation methods of water objects are based on physicochemical analysis of water samples. These methods can't be considered as consistent in determination of full range of pollutants. Sanitary chemical analysis of water environment, coupled with biological testing seems to be more informative. One of the most prospective research trends nowadays is using human cell lines as test objects. During the preparation of this review, there were used following database sources: Scopus, Web of Science, PubMed, RISC. As a conclusion of performed sources analysis, we can point at high sensitivity of cell lines, extracted from human digestive (Caco-2, HepG2) and excretory systems (HEK-293) to the influence of pollutants taken from different water sources. The data obtained by the authors indicate both a cytopathic effect and a change in the cytochemical and cytomorphological characteristics of cell cultures under the influence of pollutants in water. The use of human cell cultures as test objects in water biotesting is an urgent direction in the study of water supply sources for drinking and household needs of the population without preliminary purification. The use of human cell cultures in the biotesting of water makes it possible to give not only a toxicological characteristic of water samples, but also to assess the possibility of developing an undesirable effect associated with the ingress of pollutants into the internal environment of the body.

Keywords: review; sources of drinking water; biotesting; cell culture; Caco-2; HepG2; HEK-293

For citation: Mamonova I.A., Kosheleva I.S., Shirokov A.A., Gusev Yu.S., Mikerov A.N. Using human cell culture to assess the toxicity of water (literature review). *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2023; 102(5): 509–515. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2023-102-5-509-515> <https://elibrary.ru/zifbgn> (In Russ.)

For correspondence: Irina A. Mamonova, MD, Ph.D., researcher of Laboratory of chemical-biological monitoring of water quality of the Saratov Medical Scientific Centre of Hygiene of the Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Saratov, 410022, Russian Federation. E-mail: mamonova.83@rambler.ru

Information about authors:

Mamonova I.A., <https://orcid.org/0000-0003-3941-4334>
Shirokov A.A., <https://orcid.org/0000-0003-4321-735X>
Mikerov A.N., <https://orcid.org/0000-0002-0670-7918>

Kosheleva I.S., <https://orcid.org/0000-0003-1992-5305>
Gusev Yu.S., <https://orcid.org/0000-0001-7379-484X>

Contribution: Mamonova I.A. – concept and design of the study, writing the text, responsibility for the integrity of all parts of the article; Kosheleva I.S. – collection and processing of material, writing text, editing; Shirokov A.A. – writing the text, editing; Gusev Yu.S. – concept and design of the study; Mikerov A.N. – approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article.

Gratitude. We thank research center «Symbiosis» and immunochemistry laboratory IBPPM RAS for their providing advisory assistance in the selection and analysis of literature data performing research within the framework of the project GR No. 121031100266-3.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Received: March 22, 2023 / Accepted: May 31, 2023 / Published: June 20, 2023

Состав воды поверхностных и подземных источников питьевого водоснабжения оказывает значительное влияние на состояние здоровья населения. Увеличивающаяся с каждым годом антропогенная нагрузка приводит к неуклонному росту загрязнения водных объектов [1]. При этом в качестве основных загрязнителей могут выступать синтетические неорганические соединения, соли тяжёлых металлов, органические вещества, среди которых особое место занимают продукты нефтепереработки, пестициды, инсектициды, бытовые моющие средства [2, 3], а также различные лекарственные соединения, поступающие в водоисточники со сточными водами фармакологических производств, в результате неконтролируемого использования лекарственных препаратов населением и несоблюдения мер по утилизации отходов [4].

В 2018 г. зарегистрировано около 16 000 летальных исходов среди населения Российской Федерации, связанных с использованием питьевой воды, загрязнённой химиче-

скими веществами и микробиологическими агентами, и примерно 1 800 000 случаев заболеваний органов пищеварительной, выделительной и эндокринной систем ассоциируют с употреблением населением некачественной воды [5]. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), значительная часть заболеваний, сопряжённых с употреблением воды, является результатом её несоответствия санитарно-микробиологическим нормам, однако возникновение более серьёзных проблем со здоровьем связывают именно с химическим загрязнением воды. Токсические вещества способны вызывать неблагоприятные последствия для здоровья человека после продолжительного периода воздействия, что особенно актуально при использовании жителями одного источника водоснабжения в течение длительного времени [6].

В настоящее время на территории Российской Федерации основные санитарно-гигиенические требования к составу питьевой воды централизованного и нецентрали-

зованного водоснабжения населения определяются нормативными документами^{1,2,3}. Оценка качества питьевой воды определена в ст. 23 (п. 4) и ст. 24 (п. 5) Федерального закона № 416-ФЗ «О водоснабжении и водоотведении» от 07.12.2011 г.⁴. Вода, используемая для хозяйственно-бытовых нужд, считается соответствующей установленным требованиям, если уровень содержащихся в ней загрязняющих веществ не превышает величины ПДК. Перечень химических соединений, для которых установлены значения ПДК в питьевой воде, включает, согласно СанПин 2.1.3685–21, 1350 показателей. Приведённые в этом документе предельно допустимые концентрации некоторых загрязняющих веществ соответствуют значениям, рекомендованным ВОЗ. При этом в МР 2.1.4.0176–20.2.1.4 минимальный перечень показателей, отражающих безопасность и качество питьевой воды, содержит только 20 критериев для поверхностных водоисточников и 19 – для подземных водных объектов. Определение санитарно-химических показателей по минимальному перечню не позволяет выявить весь спектр содержащихся в образцах воды поллютантов, которые могут оказывать влияние на здоровье населения. Выбор необходимых показателей химического состава питьевой воды проводится для каждой системы водоснабжения на основании анализа результатов расширенных исследований химического состава воды источников питьевого водоснабжения, а также технологии водоподготовки.

Особую опасность для организма человека представляет присутствие в воде фармацевтических препаратов, в частности химиопрепаратов, обладающих антибактериальными, антипаразитарными и противоопухолевыми механизмами действия [7]. Сложность очистки сточных вод, загрязнённых лекарственными соединениями, связана с их плохой деградацией активным илом очистных сооружений и, как следствие, поступлением в водоисточник в неизменённом состоянии [7]. В населённых пунктах, расположенных на территориях Московской, Тверской и Ленинградской областей, проводились исследования по определению содержания антибиотиков в сточных водах, прошедших процедуру очистки. В анализируемых образцах обнаружены офлоксацин, сульфаметоксазол, триметоприм и эритромицин. Концентрация эритромицина и ципрофлоксацина не превышала установленных СанПин норм, для остальных антибиотиков значения ПДК отсутствуют [8–11].

Большинство программ мониторинга гигиенического состояния водоисточников направлено на проведение санитарно-химических исследований образцов воды, при этом не представляется возможным определение всего спектра загрязняющих соединений, содержащегося в водоисточнике [12]. Кроме того, подобный подход не позволяет выявить синергический эффект между соединениями, содержащимися в питьевой воде. Примером может служить комплекс, образующийся при взаимодействии ионов меди с гумусовыми веществами, поступающими в поверхностные водоисточники в период половодья. Установлено, что токсичность этого комплекса более чем в 500 раз превышает уровень ток-

сической дозы отдельных компонентов [13, 14]. Кроме того, трудно прогнозировать ответную реакцию организма на поступление комплекса поллютантов, основываясь на токсикологической характеристике отдельных соединений. Таким образом, показатель индивидуальной токсичности веществ не может отвечать за суммарный биологический эффект нескольких загрязняющих соединений, находящихся в воде.

Санитарно-химический анализ образцов воды поверхностных и подземных водоисточников, используемых для водоснабжения населения, становится более информативным при его сочетании с биотестированием, позволяющим получить интегральную токсикологическую характеристику исследуемого объекта. В основе данного метода исследования лежит биологическое моделирование, а именно определение токсичности исследуемых проб по отношению к тест-организмам в условиях *in vitro*. При этом полученные в результате исследования данные экстраполируются с более простой системы (моделированной в условиях *in vitro*) на более сложную. При таком подходе важным является правильный выбор тест-объектов [15].

В настоящее время для оценки токсичности воды из источников питьевого водоснабжения утверждены методики, которые внесены в федеральный реестр и реестр природоохранных нормативных документов как рекомендованные к использованию для токсикологической оценки^{5,6,7,8,9,10,11}. В качестве тест-объектов для проведения биотестирования применяются гидробионты, относящиеся к различным таксономическим группам: низшие ракообразные (*Daphnia magna* Straus., *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg), одноклеточные зелёные водоросли (*Chlorella vulgaris* Beijer), одноклеточные животные (*Paramecium caudatum* Ehrenberg), биoluminesцентные микроорганизмы. Наиболее часто используемыми тест-функциями являются выживаемость и плодовитость исследуемых тест-организмов. При проведении биотестирования необходимо учитывать, что применение одного тест-объекта может быть недостаточным в связи с невосприимчивостью некоторых организмов к действию отдельных химических веществ, поэтому наиболее перспективным является применение множественного биоанализа [16]. Недостатком использования биотест-объектов является то, что полученные данные сложно экстраполировать на популяцию человека.

Известно, что основными биологическими моделями, используемыми в токсикологии, являются высшие теплокровные животные. Такие исследования являются трудоёмкими, длительными, дорогостоящими, проведение их возможно только в условиях вивария, что требует соблюдения определённых норм и наличия специальных помещений. Особое место занимает биоэтическая сторона вопроса.

⁵ ФР.1.39.2007.03222. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости дафний. М: Акварос; 2007.

⁶ ФР.1.39.2007.03221. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости церидафний. М: Акварос; 2007.

⁷ ФР.1.39.2007.03223. Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей. М: Акварос; 2007.

⁸ ФР.1.39.2006.02506. ПНД Ф Т 14.1:2:3.1306 (ПНД Ф Т 16.1:2:3:3.1006). Методика определения токсичности отходов, почв, осадков сточных, поверхностных и грунтовых вод методом биотестирования с использованием равноресничных инфузорий *Paramecium caudatum* Ehrenberg. М: Издательский дом «Типография»; 2006.

⁹ ФР.1.39.2007.04104. ПНД Ф Т 16.3.1207. Методика определения токсичности золошлаковых отходов методом биотестирования на основе выживаемости парамедий и церидафний. М: МГУ, 2006.

¹⁰ ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.1004 (ПНД Ф Т 16.1:2:3:3.704). Методика определения токсичности проб поверхностных пресных, грунтовых, питьевых, сточных вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по изменению оптической плотности культуры водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer). М: Стандартинформ; 2014.

¹¹ ПНД Ф Т 14.1:2:4.1206 (ПНД Ф Т 16.1:2:3:3.906). Методика определения токсичности водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов, питьевой, сточной и природной воды по смертности тест-объекта *Daphnia magna* Straus. М: Стандартинформ; 2014.

¹ СанПин 1.2.3685–21. Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания. Утв. Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 28 января 2021 г.

² СанПин 2.1.3684–21. Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий. Утв. Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 28 января 2021 г. (с изм. и доп.).

³ МР 2.1.4.0176–20.2.1.4. Питьевая вода и водоснабжение населённых мест. Организация мониторинга обеспечения населения качественной питьевой водой из систем централизованного водоснабжения. Методические рекомендации. Утв. Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 30.04.2020 г.

⁴ Федеральный закон № 416-ФЗ «О водоснабжении и водоотведении» от 07.12.2011 г.

Вышеизложенные обстоятельства диктуют необходимость замены традиционных методов оценки токсичности *in vivo* с использованием в качестве тест-объекта цельного животного организма на методы изучения цитотоксичности *in vitro* с применением культуры клеток млекопитающих, в частности человека [17]. Перспектива применения в качестве тест-объектов клеточных линий человека связана с тем, что в основе формирования комплекса реакций организма на воздействие неблагоприятных факторов окружающей среды, в том числе направленных на защиту его целостности за счёт развития различного рода адаптивных ответных реакций клеток, лежат единые фундаментальные механизмы, обеспечивающие одинаправленные изменения как на морфологическом, так и на клеточном и молекулярном уровнях.

Всё более актуальным в настоящее время становится вопрос о возможности использования культур клеток человека в качестве тест-объектов для оценки токсичности проб воды, взятых из источников централизованного и нецентрализованного питьевого водоснабжения. Основными преимуществами проведения исследований по биотестированию *in vitro* на культурах клеток человека являются высокая эффективность метода, его чувствительность, возможность повторно воспроизвести полученные результаты, простота использования [18, 19]. В литературе имеются данные исследований по оценке токсичности проб воды методом биотестирования на клеточных линиях человека. При этом в качестве объектов исследования использовали культуры клеток человека Нер2 (клетки карциномы гортани человека), HeLa (клетки карциномы шейки матки человека) [20] и NSCs (клетки глиального фенотипа) [21]. Авторами установлена высокая чувствительность тест-объектов, проявляющаяся в реализации цитотоксического эффекта.

При планировании исследований по проведению биотестирования на культурах клеток человека особое внимание необходимо уделять выбору тест-модели. Действие токсикантов на организм выражается в наборе реакций, которые приводят к изменениям на клеточном уровне, что отражается в функционировании конкретного органа. В связи с этим в тестах *in vitro* целесообразно использовать клеточные линии, принадлежащие органу, наиболее подверженному токсическому действию.

Наиболее перспективным в настоящее время является использование при проведении биотестирования проб воды в качестве тест-объекта клеточных линий пищеварительной и выделительной систем человека. Известно, что процесс всасывания воды в организме происходит на всём протяжении желудочно-кишечного тракта: большая часть её усваивается в тонком кишечнике, оставшееся количество вместе с растворимыми в ней солями – в толстом его отделе. Очевидно, что органы пищеварительной системы в первую очередь подвержены воздействию поллютантов, входящих в состав воды, потребляемой человеком. Кишечник является физиологическим барьером, повреждение которого может привести к проникновению микроорганизмов, антигенов, а также различных токсикантов во внутреннюю среду макроорганизма, что, несомненно, вызовет нарушение его гомеостаза. Установлено, что растворённые в контаминированной воде ионы тяжёлых металлов обладают цитотоксическим действием, вызывают развитие окислительного стресса, в результате чего происходит повреждение молекулы ДНК клеток, а также липидов, входящих в состав клеточной мембраны [22]. Jiao-Yang и соавт. (2022) показали повышение продукции активных форм кислорода, противовоспалительных медиаторов (IL-1 β , IL-8 и TNF- α), а также активацию экспрессии генов *GADD45a*, *Caspase-3* и *Caspase-8*, регулирующих апоптоз, после воздействия на клетки аденокарциномы человека Сасо-2 водных вытяжек, полученных из загрязнённых ионами кадмия и ионами никеля почв. Развитие такого рода реакций может способствовать нарушению проницаемости кишечника [23].

Эпителий кишечника играет решающую роль в поддержании функциональных свойств пищеварительной системы

человека [24]. Монослой эпителия может быть использован в качестве биомаркёра жизнеспособности клеток, так как вызванная токсичными веществами потеря его целостности часто происходит до начала их дифференциации и гибели. Применение первичных клеток кишечника в качестве модели для проведения биотестирования ограничивается их короткой продолжительностью жизни и быстрой потерей дифференцированных характеристик [25, 26]. В настоящее время в исследованиях *in vitro* широко используется иммортализованная клеточная линия Сасо-2, имитирующая эпителий кишечника человека благодаря схожей структуре микроворсинок [27, 28]. При культивировании клетки Сасо-2 дифференцируются в поляризованные клетки эпителия кишечника с покрытой микроворсинками апикальной частью, мембраной на базальной части и плотными межклеточными контактами [29]. Несмотря на то что клетки Сасо-2 по происхождению относятся к клеткам толстого кишечника, они проявляют большинство морфологических и функциональных свойств энтероцитов тонкого кишечника, что делает их перспективной моделью для проведения биотестирования.

В ранее проведённых исследованиях установлена чувствительность клеток Сасо-2 к химическим соединениям, загрязняющим объекты окружающей среды. Husejnovic и соавт. (2018) на клетках линии Сасо-2 изучили токсичность экстрактов почв, собранных вблизи электростанций и содержащих ионы металлов в превышающих ПДК количествах [30]. Установлено выраженное цито- и генотоксическое действие исследуемых образцов. Формирование такого рода клеточных реакций может привести к развитию дисфункции эпителиальных клеток кишечника, что в свою очередь сопровождается развитием воспалительного ответа, схожего с энтеропатией. Клеточную линию Сасо-2 применяли в токсикологической оценке эффективности очистки сточных вод текстильного производства методом мембранного биореактора. Установлено нарушение проницаемости клеточного монослоя Сасо-2, а также увеличение экспрессии генов стресса клетками кишечника после воздействия загрязнёнными образцами. После обработки сточных вод этот эффект нивелировался [31]. Orescanin V. и соавт. (2018) провели исследования по изучению цитотоксического действия на культуру клеток колоректальной аденокарциномы человека водных вытяжек необработанного ила, загрязнённого гальваническим шламом с высоким содержанием ионов цинка, железа и никеля. В результате проведённой работы авторами установлен цитотоксический эффект на культуре клеток Сасо-2, который нивелировался при разведении исходного экстракта в 200 раз [32].

Ионы металлов, содержащиеся в загрязнённой воде, находятся в доступной для всасывания в желудочно-кишечном тракте форме, что способствует распространению их отравляющего действия на весь организм в целом [23–30]. Поэтому токсическому воздействию поллютантов, содержащихся в воде, может подвергаться не только кишечник, но и другие органы-мишени, в том числе печень и почки. Проникшие через кишечный барьер токсические вещества поступают в кровь, а оттуда по воротной вене – в печень. Клетки печени являются стандартными культурами для исследования биологической активности химических соединений, что объясняется прохождением основной стадии биотрансформации ксенобиотиков в гепатоцитах. При этом наиболее часто используют клетки гепатобластомы человека линии НерG2 [33–35], которые синтезируют метаболизующие ферменты, принимающие участие в процессе детоксикации загрязняющих соединений [36, 37]. Таким образом, в качестве тест-объекта для проведения биотестирования водисточников могут быть также выбраны клеточные линии печени. В исследованиях Leme D.M. и соавт. (2015) и Liu J. и соавт. (2012) выполнено тестирование клеток линии НерG2 в качестве модели для оценки цитотоксического, а также генотоксического действия загрязняющих веществ [38, 39]. Данная культура клеток получила широкое применение в скрининговых исследованиях

по выявлению мутагенов, что в первую очередь связано с формированием у неё эффективного метаболического ответа [40]. Sommaggio L.R.D. и соавт. (2018) показали в своих работах чувствительность клеток HepG2 к загрязнителям, находящимся в сточных водах [41]. Проведены исследования по оценке активности загрязняющих воду веществ в отношении клеток линии HEK-293, представленных эпителием почек эмбриона человека [42, 43]. Zulkarnain N.N. и соавт. (2020), изучавшие действие на морфологические и физиологические характеристики тест-культуры HEK-293 кетопрофена, содержащегося в сточных водах фармацевтических предприятий, установили, что низкие концентрации препарата не влияли на морфологию клеток, однако приводили к снижению скорости роста клеточной культуры. Выявлены изменения метаболической активности клеток, культивируемых в присутствии кетопрофена, что выразилось в возрастании уровня потребления глюкозы. Особое внимание авторы обращают на проявление генотоксического эффекта после воздействия загрязняющего вещества, что выразилось в подавлении экспрессии гена *COX-1*, относящегося к маркерам воспалительного процесса [42]. Выполненная Acevedo-Bargios R. и соавт. (2018) работа по изучению действия загрязняющих веществ на клетки HEK-293 позволила установить чувствительность культуры к солям хлорной кислоты – природным и антропогенным загрязнителям, широко распространённым в объектах окружающей среды и оказывающим негативное влияние на организм человека [43].

Таким образом, проведённый анализ литературных данных позволил установить высокую чувствительность к различным поллютантам, содержащимся в воде, клеток линий Сасо-2, HepG2, HEK-293, что открывает перспективу их использования в качестве тест-модели при проведении биотестирования. Применение клеток кишечника, печени и почек в качестве тест-культуры позволит экстраполировать полученные данные на человека и оценить возможность развития токсического эффекта, связанного с воздействием загрязняющих веществ на внутреннюю среду организма.

При планировании работ по биотестированию для установления качественных и количественных закономерностей в токсикологии широко используют тест-реакции, отражающие фундаментальные основы функционирования организма на клеточном уровне и имеющие однозначную трактовку. При этом в качестве индикатора используют показатели, определяющие жизнеспособность культур, а также изменение скорости их пролиферации и метаболической активности, синтеза макромолекул, состояние клеточной мембраны и морфологии клетки в целом. Такого рода методы исследования просты в исполнении, не требуют дополнительной квалификации специалистов, отличаются низкой себестоимостью и высокой удельной скоростью тестирования проб [44, 45]. Использование в качестве тест-объектов для проведения биотестирования перевиваемых культур клеток человека ограничивается необходимостью создания оптимальных условий для их культивирования. В частности, это обеспечение постоянного пополнения и замены культуральной среды, а также наличие специального оборудования для поддержания оптимальных условий культивирования клеток, в том числе температурного режима в пределах 37 °С и пятипроцентного содержания углекислого газа, что ограничивает возможности их применения.

Наиболее часто используемыми в токсикологии методами оценки жизнеспособности клеток являются окраска трипановым синим, позволяющая дифференцировать живые и мёртвые клетки в культуре; определение содержания общего белка как показателя прироста клеточной биомассы в тесте с сульфородаминам В; выявление активности митохондриальных ферментов в тесте с метилтетразолием (МТТ-тест); оценка лизосомальной активности и интенсивности процессов активного мембранного переноса по поглощению красителя нейтрального красного; выявление степени по-

вреждения цитоплазматической мембраны методом определения содержания лактатдегидрогеназы в культуральной среде; флуорометрический анализ ДНК методом проточной цитометрии.

Классическим методом для проведения скрининговых исследований по определению цитотоксичности различных соединений является МТТ-тест, в основе которого лежит способность NADPH-зависимых клеточных оксидоредуктазных ферментов восстанавливать тетразолиевый краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид в нерастворимый формазан. Продукт реакции экстрагируют органическими растворителями и оценивают его количество с помощью спектрофотометрии.

В исследовании Jaeger N. и соавт. (2015) при определении цитотоксичности сточных вод кожевенных заводов в отношении клеточной линии HEp-2 был выбран МТТ-анализ [18]. Применение данного метода исследования позволило оценить степень жизнеспособности клеточной популяции после обработки загрязнёнными образцами воды. Авторы работы делают вывод о возможности использования цитотоксического анализа на культивируемых клетках в качестве одного из скрининговых методов определения уровня загрязнения образцов воды, в том числе и для анализа эффективности процесса очистки сточных вод. В работе Friha I. и соавт. (2015) по определению качества обработки сточных вод текстильного производства на клетках Сасо-2 также использован МТТ-тест. Авторами установлен дозозависимый характер действия загрязнённых образцов воды на исследуемую культуру [33]. МТТ-тест является наиболее популярным и экономически выгодным методом оценки жизнеспособности клеток, однако он имеет ряд недостатков, в частности возможность получения ложноположительных результатов, что объясняется способностью некоторых химических соединений восстанавливать соли тетразолия даже в отсутствие клеток. Поэтому при биотестировании на культуре клеток МТТ-тест необходимо сочетать с другими методами оценки жизнеспособности.

Известно, что красители в большинстве своём плохо проникают через неповреждённую клеточную мембрану и слабо связываются с внутриклеточными структурами. Повреждение клетки приводит к увеличению проницаемости биологических мембран, что способствует повышению концентрации красителя в её цитоплазме. Данный принцип лежит в основе оценки жизнеспособности методом окраски трипановым синим. В работе по оценке цитотоксичности кетопрофена, обнаруженного в сточных водах фармацевтической промышленности, в отношении клеток HEK 293 применялось окрашивание трипановым синим в сочетании с МТТ-анализом. Совместное использование этих методов позволило установить антипролиферативную активность образцов сточных вод, содержащих кетопрофен [44].

Заключение

Совершенствование токсикологических исследований водных объектов является актуальным в связи с растущей антропогенной нагрузкой и происходящими естественными геохимическими процессами, поскольку уровень загрязнения источников водоснабжения населения постоянно возрастает. Кроме того, токсикологическая характеристика питьевой воды сильно зависит от качества предварительной водоподготовки. Одним из методов оценки токсикологических свойств воды является биотестирование. В литературе описано определение токсичности воды с использованием в качестве тест-объектов гидробионтов, относящихся к различным таксономическим группам: низшие ракообразные (*Daphnia magna* Straus., *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg), одноклеточные зелёные водоросли (*Chlorella vulgaris* Beijer.), одноклеточные животные (*Paramecium caudatum* Ehrenberg.), биолюминесцентные микроорганизмы. Однако полученные в результате таких исследований данные нельзя в полной мере экстраполировать на человека. В то же время выпол-

нение исследований на лабораторных животных трудоёмко, длительно и экономически затратно. Использование в качестве тест-объектов культур клеток пищеварительной и выделительной систем человека является перспективным направлением научных работ санитарно-гигиенического профиля. Информация, полученная нами в результате анализа литературных данных, выявила, что клетки Сасо-2, НерG2, НЕК-293 высокочувствительны к поллютантам, содержащимся в воде. Исследователями доказано цитопатическое действие находящихся в воде загрязняющих соединений и обнаружены изменения цитохимических и цитоморфологических характеристик культур клеток под воздействием определённого поллютанта, что может быть использовано при биоте-

стировании для определения типа токсиканта, содержащегося в исследуемом образце воды. Использование культуры клеток человека в качестве тест-объекта для проведения биотестирования проб воды актуально при исследовании водоисточников, из которых население получает воду для своих хозяйственно-бытовых нужд без процедуры предварительной водоподготовки и которые являются единственным источником водоснабжения. Использование культуры клеток человека для проведения биотестирования позволит дать не только токсикологическую характеристику проб воды, но и оценить возможность развития нежелательного эффекта, связанного с попаданием поллютантов во внутреннюю среду организма.

Литература

(см. 1–4, 12, 16–24, 27, 28, 30–34, 36–43 см. References)

5. Зайцева Н.В., Сбоев А.С., Клейн С.В., Вековшинина С.А. Качество питьевой воды: факторы риска для здоровья населения и эффективность контрольно-надзорной деятельности Роспотребнадзора. *Анализ риска здоровью*. 2019; (2): 44–55. <https://doi.org/10.21668/health.risk/2019.2.05> <https://elibrary.ru/ebsbcs>
6. Косарев А.В., Иванов Д.Е., Микеров А.Н., Савина К.А. Оценка канцерогенного и неканцерогенного рисков здоровью, обусловленных качеством питьевой воды родников аридной зоны. *Гигиена и санитария*. 2020; 99(11): 1294–300. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2020-99-11-1294-1300> <https://elibrary.ru/hvdgpr>
7. Новикова Ю.А., Маркова О.Л., Фридман К.Б. Основные направления минимизации рисков здоровью населения, обусловленных загрязнением поверхностных источников питьевого водоснабжения лекарственными средствами. *Гигиена и санитария*. 2018; 97(12): 1166–70. <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-12-1166-1170> <https://elibrary.ru/vqbsob>
8. Русских Я.В., Чернова Е.Н., Некрасова Л.В., Воякина Е.Ю., Никифоров В.А., Жаковская З.А. Первые результаты определения новых экотоксикантов в водоёмах Северо-Запада РФ. *Региональная экология*. 2011; (1–2): 82–7. <https://elibrary.ru/twhukv>
9. Некрасова Л., Русских Я., Чернова Е., Жаковская З., Никифоров В., Рыжов М. Одновременное определение ряда лекарственных соединений методом жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии высокого разрешения. *Аналитика*. 2012; 2(3): 38–45. <https://elibrary.ru/piespt>
10. Баренбойм Г.М., Чиганова М.А. Загрязнение поверхностных и сточных вод лекарственными препаратами. *Вода: Химия и экология*. 2012; (10): 40–6. <https://elibrary.ru/pdhjyv>
11. Проудоус О.А., Шлычков Д.И. Прогнозирование возможности продолжения эксплуатации самотечных сетей водоотведения с отложениями в лотковой части труб. *Известия вузов. Инвестиции. Строительство. Недвижимость*. 2021; 11(4): 646–53. <https://doi.org/10.21285/2227-2917-2021-4-646-653> <https://elibrary.ru/oofpre>
13. Иванов Д.Е., Сулейманов Р.А., Косарев А.В., Микеров А.Н., Кошелева И.С., Валеев Т.К. Возможности применения методов биотестирования в интегральной оценке качества поверхностных источников водоснабжения населения. *Медицина труда и экология человека*. 2022; (1): 159–76. <https://doi.org/10.24411/2411-3794-2022-10111> <https://elibrary.ru/fkevqr>
14. Донерьян Л.Г., Водянова М.А. Обоснование места альтернативных биохимических методов в гигиенических исследованиях. *Гигиена и санитария*. 2018; 97(11): 1093–7. <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-11-1093-97> <https://elibrary.ru/ypxhvx>
15. Маячкина Н.В., Чугунова М.В. Особенности биотестирования почв с целью их экотоксикологической оценки. *Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского*. 2009; (1): 84–93. <https://elibrary.ru/jwyuef>
25. Тарасова Е.Ю., Семенов Э.И., Матросова Л.Е., Мишина Н.Н., Мухарьямова А.З. Изучение сорбционной активности потенциальных средств профилактики микотоксикозов в отношении афлатоксинов. *Ветеринарный врач*. 2020; (2): 51–8. <https://doi.org/10.33632/1998-698x.2020-2-51-58> <https://elibrary.ru/eljldki>
26. Самсонов А.И. Культура клеток как объект для оценки токсичности микотоксинов и средств защиты *in vitro* (обзор). *Вестник Марийского государственного университета. Серия: Вельскохозяйственные науки. Экономические науки*. 2021; 7(3): 242–50. <https://doi.org/10.30914/2411-9687-2021-7-3-242-250> <https://elibrary.ru/nxighc>
29. Шохин И.Е., Раменская Г.В., Кулинич Ю.И., Савченко А.Ю. Изучение кишечной проницаемости в условиях *in vitro* на монослой эпителиальных клеток Сасо-2 (обзор). *Сеченовский вестник*. 2012; (3): 31–5. <https://elibrary.ru/smhfar>
35. Целоусова О.С., Вахитова Ю.В., Вахитов В.А. *Механизмы и методы оценки цитотоксичности*. Уфа; 2012.
44. Зарицкая Е.В., Полозова Е.В., Богачева А.С. Современные альтернативные токсикологические методы исследования и перспективы их использования в практической деятельности. *Гигиена и санитария*. 2017; 96(7): 671–4. <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2017-96-7-671-674> <https://elibrary.ru/zfbyuf>
45. Афанасьева А.Н., Сапарова В.Б., Сельменских Т.А., Макаренко И.Е. Выбор оптимального метода детекции жизнеспособности клеточных культур для тестов на пролиферативную активность и цитотоксичность. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2021; (2): 16–24. <https://doi.org/10.29296/2618723X-2021-02-03> <https://elibrary.ru/oiiaanc>

References

1. Sommaggio L.R.D., Mazzeo D.E.C., Pamplona-Silva M.T., Marin-Morales M.A. Evaluation of the potential agricultural use of biostimulated sewage sludge using mammalian cell culture assays. *Chemosphere*. 2014; 199: 10–5. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.144>
2. Heritier L., Duval D., Galinier R., Meistertzheim A.L., Verneas O. Oxidative stress induced by glyphosate-based herbicide on freshwater turtles. *Environ. Toxicol. Chem.* 2017, 36(12): 3343–50. <https://doi.org/10.1002/etc.3916>
3. Trintinaglia L., Bianchi E., Silva L., Nascimento C., Spilki F., Ziulkoski A. Cytotoxicity assays as tools to assess water quality in the Sinos River basin. *Braz. J. Biol.* 2015; 75(2 Suppl.): 75–80. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.0113>
4. Miège C., Choubert J.M., Ribeiro L., Eusèbe M., Coquery M. Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants – conception of a database and first results. *Environ. Pollut.* 2009; 157(5): 1721–6. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.11.045>
5. Zaytseva N.V., Sboev A.S., Kleyn S.V., Vekovshina S.A. Drinking water quality: health risk factors and efficiency of control and surveillance activities by Rosпотребнадзор. *Анализ риска здоровью*. 2019; (2): 44–55. <https://doi.org/10.21668/health.risk/2019.2.05> <https://elibrary.ru/sqdkxn>
6. Kosarev A.V., Ivanov D.E., Mikerov A.N., Savina K.A. Evaluation of a carcinogenic and non-carcinogenic health risks due to the quality of drinking water by springs in the arid zone. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2020; 99(11): 1294–300. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2020-99-11-1294-1300> <https://elibrary.ru/hvdgpr> (in Russian)
7. Novikova Yu.A., Markova O.L., Fridman K.B. Main aspects of minimization of population health risks caused by pharmaceutical pollution of surface sources of drinking water supply. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2018; 97(12): 1166–70. <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-12-1166-1170> <https://elibrary.ru/vqbsob>
8. Russkikh Ya.V., Chernova E.N., Nekrasova L.V., Voyakina E.Yu., Nikiforov V.A., Zhakovskaya Z.A. The first results of identification of new ecotoxicants in waters of North-West RF. *Regional'naya ekologiya*. 2011; (1–2): 82–7. <https://elibrary.ru/twhukv> (in Russian)
9. Nekrasova L., Russkikh Ya., Chernova E., Zhakovskaya Z., Nikiforov V., Ryzhov M. Simultaneous determination some pharmaceuticals using liquid chromatography-high resolution mass spectrometer LTQ orbitrap. *Analitika*. 2012; 2(3): 38–45. <https://elibrary.ru/piespt> (in Russian)
10. Barenboym G.M., Chiganova M.A. Pharmaceutical pollution of surface and waste water. *Voda: Khimiya i ekologiya*. 2012; (10): 40–6. <https://elibrary.ru/pdhjyv> (in Russian)
11. Prodous O.A., Shlychkov D.I. Forecasting continued operation of gravity drainage networks with deposits in pipe water troughs. *Izvestiya Vuzov. Investitsii. Stroitel'stvo. Nedvizhimos't'*. 2021; 11(4): 646–53. <https://doi.org/10.21285/2227-2917-2021-4-646-653> <https://elibrary.ru/oofpre> (in Russian)
12. Niss F., Rosenmai A.K., Mandava G., Örn S., Oskarsson A., Lundqvist J. Toxicity bioassays with concentrated cell culture media – a methodology to overcome the chemical loss by conventional preparation of water samples. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2018; 25(12): 12183–8. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1656-4>

Review article

13. Ivanov D.E., Suleymanov R.A., Kosarev A.V., Mikerov A.N., Kosheleva I.S., Valeev T.K. The possibilities of applying biotesting methods in the integrated assessment of the quality of surface water supply sources of the population. *Meditisina truda i ekologiya cheloveka*. 2022; (1): 159–76. <https://doi.org/10.24411/2411-3794-2022-10111> <https://elibrary.ru/fkevqr> (in Russian)
14. Doner'yan L.G., Vodyanova M.A. Substantiation of the place of alternative biological methods in hygienic research. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2018; 97(11): 1093–7. <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-11-1093-97> <https://elibrary.ru/ypxhvx> (in Russian)
15. Mayachkina N.V., Chugunova M.V. Peculiarities of soil biotests to evaluate soil ecotoxicity. *Vestnik Nizhegorodskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo*. 2009; (1): 84–93. <https://elibrary.ru/jwyeuf> (in Russian)
16. Jaeger N., Moraes J.P., Klauck C.R., Gehlen G., Rodrigues M.A., Ziulkoski A.L. Cytotoxicity assays to evaluate tannery effluents treated by photoelectrooxidation. *Braz. J. Biol.* 2015; 75(4 Suppl. 2): 53–61. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.01713suppl>
17. Burden N., Benstead R., Clook M., Doyle I., Edwards P., Maynard S.K., et al. Advancing the 3Rs in regulatory ecotoxicology: A pragmatic cross-sector approach. *Integr. Environ. Assess. Management*. 2016; 12(3): 417–21. <https://doi.org/10.1002/ieam.1703>
18. Bianchi E., Goldoni A., Trintinaglia L., Lessing G., Silva C.E.M., Nascimento C.A., et al. Evaluation of genotoxicity and cytotoxicity of water samples from the Sinos River Basin, southern Brazil. *Braz. J. Biol.* 2015; 75(2 Suppl.): 68–74. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.1913>
19. Poteser M. Cell-based in vitro models in environmental toxicology: a review. *Biomonitoring*. 2017; 4(1): 11–26. <https://doi.org/10.1515/bimo-2017-0002>
20. Orescanin V., Kopyar N., Durgo K., Elez L., Gustek S.F., Colic J.F. Cytotoxicity status of electroplating wastewater prior/after neutralization/purification with alkaline solid residue of electric arc furnace dust. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 2009; 44(3): 273–8. <https://doi.org/10.1080/10934520802597945>
21. Masood M.I., Hauke N.T., Nasim M.J., Sarfraz M., Naseem M., Schäfer K.H. Neural stem cell-based in vitro bioassay for the assessment of neurotoxic potential of water samples. *J. Environ. Sci. (China)*. 2021; 101: 72–86. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.07.028>
22. Haber A.L., Biton M., Rogel N., Herbst R.H., Shekhar K., Smillie C., et al. A single-cell survey of the small intestinal epithelium. *Nature*. 2015; 551(7680): 333–9. <https://doi.org/10.1038/nature24489>
23. Ma J.Y., Bao X.C., Tian W., Cui D.L., Zhang M.Y., Yang J. Effects of soil-extractable metals Cd and Ni from an e-waste dismantling site on human colonic epithelial cells Caco-2: Mechanisms and implications. *Chemosphere*. 2022; 292: 133361. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133361>
24. Rapa S.F., Di Paola R., Cordaro M., Siracusa R., D'Amico R., Fusco R. Plumericin protects against experimental inflammatory bowel disease by restoring intestinal barrier function and reducing apoptosis. *Biomedicine*. 2021; 9(1): 67. <https://doi.org/10.3390/biomedicine9010067>
25. Tarasova E.Yu., Semenov E.I., Matrosova L.E., Mishina N.N., Mukharlyamova A.Z. Study of sorption activity of potential means of prevention of mycotoxicosis against aflatoxins. *Veterinarnyy vrach*. 2020; (2): 51–8. <https://doi.org/10.33632/1998-698x.2020-2-51-58> <https://elibrary.ru/eljdki> (in Russian)
26. Samsonov A.I. Cell culture as an object for assessing the toxicity of mycotoxins and in vitro protective agents (review). *Vestnik Mariyskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Sel'skokhozyaystvennye nauki. Ekonomicheskie nauki*. 2021; 7(3): 242–50. <https://doi.org/10.30914/2411-9687-2021-7-3-242-250> <https://elibrary.ru/nxighc> (in Russian)
27. Vila L., Marcos R., Hernández A. Long-term effects of silver nanoparticles in caco-2 cells. *Nanotoxicology*. 2017; 11(6): 771–80. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1355997>
28. Keemink J., Bergström C.A.S. Caco-2 cell conditions enabling studies of drug absorption from digestible lipid-based formulations. *Pharm. Res.* 2018; 35(4): 74. <https://doi.org/10.1007/s11095-017-2327-8>
29. Shokhin I.E., Ramenskaya G.V., Kulnich Yu.I., Savchenko A.Yu. The study of intestinal permeability in vitro on a monolayer of epithelial Caco-2 cells (review). *Sechenovskiy vestnik*. 2012; (3): 31–5. <https://elibrary.ru/smhfar> (in Russian)
30. Husejinovic M.S., Bergant M., Jankovic S., Zizek S., Smajlovic A., Softic A., et al. Assessment of Pb, Cd and Hg soil contamination and its potential to cause cytotoxic and genotoxic effects in human cell lines (CaCo-2 and HaCaT). *Environ. Geochem. Health*. 2018; 40(4): 1557–72. <https://doi.org/10.1007/s10653-018-0071-6>
31. Friha I., Bradai M., Johnson D., Hilal N., Loukil S., Amor F.B., et al. Treatment of textile wastewater by submerged membrane bioreactor: In vitro bioassays for the assessment of stress response elicited by raw and reclaimed wastewater. *J. Environ. Manage.* 2015; 160: 184–92. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.06.008>
32. Orescanin V., Durgo K., Mikelic I.L., Halkijevic I., Kuspilic M. Toxicity assessment of untreated/treated electroplating sludge using human and plant bioassay. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 2018; 53(10): 925–30. <https://doi.org/10.1080/10934529.2018.1462911>
33. Fotakis G., Timbrell J.A. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol. Letters*. 2006; 160(2): 171–7. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.07.001>
34. Sussman J.L., Walterschied M., Butler T., Cali J.J., Riss T., Kelly J.H. The predictive nature of high-throughput toxicity screening using a human hepatocytes cell line. *Cell Notes*. 2002; 3: 7–10.
35. Tselousova O.S., Vakhitova Yu.V., Vakhitov V.A. *Cytotoxicity Assessment Tools and Methods [Mekhanizmy i metody otsenki tsitotoksichnosti]*. Ufa; 2012. (in Russian)
36. Knasmüller S., Mersch-Sundermann V., Kevekordes S., Darroudi F., Huber W.W., Hoelzl C. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology*. 2004; 198(1–3): 315–28. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.02.008>
37. Uhl M., Helma C., Knasmüller S. Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (Hep G2) cells. *Mutat. Res.* 2000; 468(2): 213–25. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(00\)00051](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(00)00051)
38. Leme D.A., Primo F.L., Gobo G.G., Vieira da Costa C.R., Palma de Oliveira A.M.T.D. Genotoxicity assessment of reactive and disperse textile dyes using human dermal equivalent (3D cell culture system). *J. Toxicol. Environ. Health*. 2015; 78(7): 466–80. <https://doi.org/10.1080/15287394.2014.999296>
39. Liu J., Song E., Liu L., Ma X., Tian X., Dong H., et al. Polychlorinated biphenyl quinone metabolites lead to oxidative stress in HepG2 cells and the protective role of dihydrolipoic acid. *Toxicol. In Vitro*. 2012; 26(6): 841–8. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.04.028>
40. Mazzeo D.E.C., Fernandes T.C.C., Marin-Morales M.A. Attesting the efficiency of monitored natural attenuation in the detoxification of sewage sludge by means of genotoxic and mutagenic bioassays. *Chemosphere*. 2016; 163: 508–15. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.060>
41. Sommaggio L.R.D., Mazzeo D.E.C., Pamplona-Silva M.T., Marin-Morales M.A. Evaluation of the potential agricultural use of biostimulated sewage sludge using mammalian cell culture assays. *Chemosphere*. 2018; 199: 10–5. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.144>
42. Zulkarnain N.N., Anuar N., Johari N.A., Abdullah S.R.S., Othman A.R. Cytotoxicity evaluation of ketoprofen found in pharmaceutical wastewater on HEK 293 cell growth and metabolism. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2020; 80: 103498. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103498>
43. Acevedo-Barrios R., Sabater-Marco C., Olivero-Verbel J. Ecotoxicological assessment of perchlorate using in vitro and in vivo assays. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 2018; 25(14): 13697–708. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1565-6>
44. Zaritskaya E.V., Polozova E.V., Bogacheva A.S. Modern alternative toxicological research methods and prospects of their use in practical activities. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2017; 96(7): 671–4. <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2017-96-7-671-674> <https://elibrary.ru/zfbyyf> (in Russian)
45. Afanas'eva A.N., Saparova V.B., Sel'menskikh T.A., Makarenko I.E. Optimal choice method of detection of the viability of cell cultures for tests on proliferation and cytotoxicity. *Laboratornye zhivotnye dlya nauchnykh issledovaniy*. 2021; (2): 16–24. <https://doi.org/10.29296/2618723X-2021-02-03> <https://elibrary.ru/oiaanc> (in Russian)