

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

**ТОКСИЧНОСТЬ ИОНОВ РТУТИ (II)
И АНТИТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ УНИТИОЛА,
ВЫЯВЛЯЕМЫЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЛЮМИНЕСЦИРУЮЩИХ БИОТЕСТОВ**

**TOXICITY OF MERCURY (II) IONS
AND UNITIOL ANTITOXIC ACTIVITY REVEALED
WITH USE OF BACTERIAL LUMINESCENT
BIOTESTS**

Е.С. Алешина¹, И.В. Манухов², А.С. Дюзельбаева¹

E.S. Aleshina¹, I.V. Manukhov², A.S. Dyuzel'baeva¹

¹ ФГБОУ ВПО «Оренбургский государственный университет»

² ФГУП «ГосНИИГенетика», Москва

¹ Orenburg State University, Orenburg, Russia

² State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow, Russia

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ртуть, биолюминесцентный анализ, биотоксичность, антидот, Унитиол.

KEYWORDS: mercury, bioluminescent analysis, biotoxicity, antidote, Unitiol.

РЕЗЮМЕ. На примере двух бактериальных биотестов на основе *Escherichia coli*, отличающихся характером экспрессии *lux*-генов, дана оценка токсичности ртути и оценены возможности снижения ее биодоступности с использованием Унитиола. При биотестировании на *E.coli luxCDABE* с конститутивным типом свечения определен токсикологический параметр EC_{50} , составивший 5×10^{-6} М. В свою очередь индуцируемый в присутствии ионов ртути *E.coli pmerR::luxCDABE* развивал максимальный уровень свечения при концентрации 10^{-6} М. Введение в систему Унитиола дозозависимо сохраняло свечение сенсорного штамма и препятствовало индукции свечения репортерного варианта.

ABSTRACT. Toxicity of mercury ions and antitoxicity of Unitiol is estimated by use of two test systems on the basis of *Escherichia coli*, differing in *lux*-genes expression type and luminescence effected by them. When using the strain *E.coli luxCDABE*, the toxicological parameter EC_{50} for mercury ions was determined as 5×10^{-6} M. Maximum luminescence of the second strain *E.coli pmerR::luxCDABE* was observed in response to 10^{-6} M of mercury ions. Addition of Unitiol to the mercury containing medium resulted in a decrease of EC_{50} values and lower induction indexes, that confirms the possibility of using Unitiol as an antidote medicinal product.

ВВЕДЕНИЕ

Ртуть и ее соединения широко применяются в разных отраслях промышленности, сельском хозяйстве и медицине. Без нее не обходится технология производства хлора и каустической соды, винилхлорида, ртутных и ртутьсодержащих гальванических элементов, контрольно-измерительных приборов, термометров различного предназначения, люминесцентных ламп, некоторых видов медицинской аппаратуры и приборов (Петросян, 1999).

Одновременно ртуть относится к группе особо токсичных веществ (первый класс опасности) и обуславливает серьезные нарушения ферментативных систем организма, всех видов обмена веществ, прежде всего белкового (Петросян, 2003). Сказанное определяет актуальность создания и совершенствования средств антидотной терапии (Ашбель, 1964; Голота, 1980), среди которых в течение нескольких десятилетий важное место занимает Унитиол (Белоножко, Щепотинин, 1959).

Унитиол – это дитиольный комплексобразователь, по своей химической природе представляющий собой 2,3-димеркантопропансульфонат натрия, хорошо растворим в воде, что дает ему преимущество перед рядом других препаратов (Климова, 1959). Механизм антидотного действия

Унитиола заключается в химическом взаимодействии сульфгидрильных групп препарата с металлами, в результате чего образуются прочные малотоксичные соединения (Оксенгендлер, 1982).

Санитарно-гигиеническое нормирование ртути и оценку силы антитоксического действия уже существующих и вновь созданных лечебных препаратов чаще всего проводят с использованием методов химического анализа. Альтернативным и дополняющим методом может служить метод биолоуминесцентного анализа, который позволяет не только сформировать интегральное представление об общем уровне токсической опасности с возможностью прямой экстраполяции полученных данных на здоровье человека (Strachan et al., 2001), но и специфически выявлять наличие тяжелых металлов и определять их биодоступность. Дополнительными преимуществами биолоуминесцентного анализа являются его быстрое действие, высокая чувствительность, а также хорошая корреляция с результатами, получаемыми с использованием более сложных моделей (Kaiser, 1998).

В этой связи целью работы явилось исследование токсичности ионов ртути Hg^{2+} и антитоксической активности Унитиола, выявляемые с использованием люминесцирующих штаммов *Escherichia coli*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При проведении исследования нами были использованы хлорид ртути $HgCl_2$ (ООО «ПО Уфа-ХимПроект», Россия) и раствор Унитиола (Мосхимфармпрепараты им. Н.А. Семашко, Россия). Предварительно навески хлорида ртути помещали в стеклянные емкости, куда вносили по 1 мл химически чистой дистиллированной воды, чтобы начальная концентрация раствора хлорида ртути составляла 2×10^{-2} М. Исходный же раствор Унитиола в ампулах составлял 0,238 М, что было избыточным при проведении наших исследований, и его дополнительно разводили химически чистой дистиллированной водой до начальной концентрации 2×10^{-3} М. Полученные суспензии интенсивно перемешивали пипетированием и путем десятикратных разведений получали дополнительные концентрации исследуемых образцов.

При проведении биолоуминесцентного анализа нами были использованы два штамма *Escherichia coli* с типами свечения:

конститутивным – биосенсор «Эколюм», представляющий собой рекомбинантный штамм *E. coli* K12 TG1 с клонированными *luxCDABE*-генами природного морского люминесцирующего микроорганизма *Photobacterium leiognathi* (ЗАО НВО «Иммунотех», Россия) (Данилов и др, 2002);

индуцибельным – репортерный штамм *E. coli* *pmerR::luxCDABE*, несущий плазмиду *pDEW*, в которой промотор *merR* клонирован перед каскадом *luxCDABE*-генов природного люминесцирующего

микроорганизма *Photorhabdus luminescens* (ГосНИИгенетика, Россия).

В первом из названных штаммов промотор плазмиды *luxCDABE* обеспечивает конститутивную (постоянную) экспрессию генов биолоуминесценции. Данный биосенсор представляет собой лиофилизированный штамм, не требующий какой-то дополнительной подготовки и предполагающий только внесение во флакон 10 мл химически чистой дистиллированной воды.

Второй штамм имеет изначально низкий уровень свечения и специфично отвечает его индукцией при появлении в среде культивирования ионов Hg^{2+} и Cd^{2+} . При этом данный репортерный штамм требовал предварительного выращивания в течение 18–24 ч на LB-агаре в присутствии селективного фактора гибридных плазмид ампициллина в концентрации 100 мкг/мл и дополнительного доращивания в LB-бульоне в течение 3 ч при 37 °C на шейкере до OD = 0,5 ед.

При регистрации биолоуминесценции нами использовался микропланшетный люминометр LM-01T («Immunotech», Чехия), в 96-луночные планшеты которого вносили по 50 мкл раствора хлорида ртути и Унитиола таким образом, чтобы каждая ячейка планшета содержала разные концентрационные соотношения вносимых растворов. Регистрацию бактериального свечения проводили в течение 60 мин в кинетическом режиме. Результаты измерения выражали величинами биолоуминесцентного индекса/индекса индукции, рассчитанного на 60 мин эксперимента по формуле БЛИ/ИИ = I_0/I_k , где I_0 – интенсивность свечения бактерий в опытной кювете, I_k – интенсивность люминесценции бактерий в контрольной кювете.

На основании полученных данных рассчитывали величины токсикологических параметров EC_{20} и EC_{50} , соответствующие концентрациям, вызывающим 20% или 50% ингибирование свечения сенсорного микроорганизма по сравнению с контролем.

Полученные результаты обрабатывали методами вариационной статистики с использованием пакета компьютерных программ «Statistica» V8 («StatSoft Inc.», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ступенчатое насыщение среды ионами ртути Hg^{2+} результировалось в прогрессирующем подавлении уровня свечения сенсорного штамма *E. coli* K12 TG1, отражающем развитие летального эффекта использованного химического воздействия на бактериальные клетки-мишени (рис. 1), начиная с концентраций хлорида ртути в среде более 10^{-6} М. При этом ионы ртути в концентрации 10^{-5} М уже вызывали выраженный ингибирующий эффект, и рассчитанные значения EC_{20} и EC_{50} составили 2×10^{-6} и 5×10^{-6} М соответственно. Полученные данные согласуются с представлениями о ртути как о сильно токсичном элементе, способном

связываться с сульфгидрильными соединениями белков и аминокислот с образованием нерастворимых меркантидов (Оксенгендлер, 1982), что нарушает процессы дыхания и метаболизма бактериальной клетки.

Полученная колибровочная зависимость интенсивности свечения репортерного штамма *E. coli* pmerR::luxCDABE от концентрации ионов ртути (рис. 1) позволила констатировать, что ответ репортерного штамма характеризовался отсутствием свечения при концентрациях ртути ниже 10^{-8} М и максимальным уровнем индукции при концентрации ионов ртути 10^{-6} М, а формирующееся в результате максимальное относительное значение стимуляции свечения характеризовалось кратностью 38,12 по сравнению с интактным (неиндуцированным) контролем.

При этом наблюдается определенное соответствие концентраций ионов ртути, вызывающих ингибирование конститутивного штамма *E. coli* K12 TG1 и индукцию репортерного штамма *E. coli* pmerR::luxCDABE, заключающееся в том, что рассчитанное значение токсикологического параметра EC_{50} всего в 5 раз превышает индекс индукции, что объясняется наличием у репортерного штамма генов устойчивости к солям ртути.

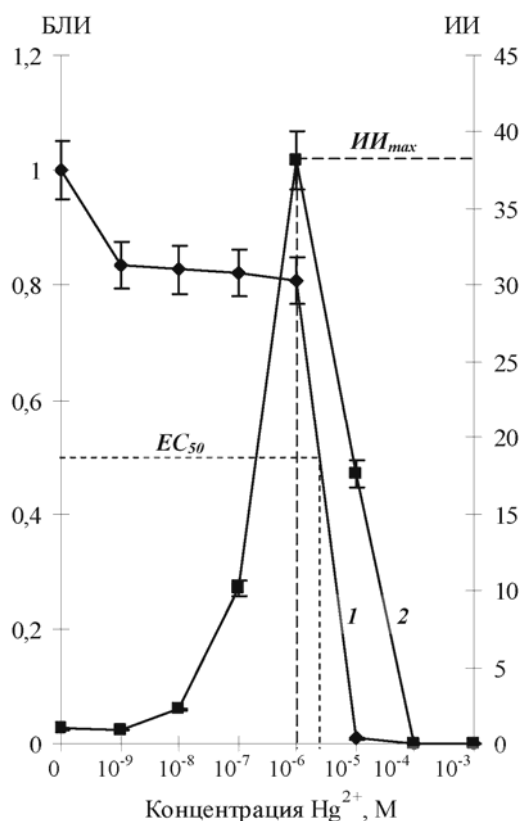


Рис. 1. Влияние концентраций ионов ртути Hg^{2+} на интенсивность свечения люминесцирующих штаммов *E. coli* с конститутивным «Эколюм» (1) и индуцибельным pmerR::luxCDABE (2) типом свечения

Следует сказать, что использование первой тест-системы при оценке биологической активности микроэлементов является неспецифичной и позволяет оценивать только токсичность/нетоксичность химического фактора. В качестве альтернативного варианта стало использование второй тест-системы репортерного типа на основе *Escherichia coli* pmerR::luxCDABE, которая позволяет оценивать биологическую активность не по тушению, а по стимуляции свечения бактериальных клеток в присутствии в среде ионов ртути выше пороговой концентрации (Дерябин, 2009).

Исследование люминесценции рекомбинантного штамма *E. coli* K12 TG1 с клонированными luxCDABE генами *P. leiognathi* при контакте с Унитиолом в различных концентрациях от 10^{-3} до 10^{-5} М позволило установить, что данный штамм демонстрировал уровень свечения, значительно превышающий фоновый, но по своей сути не отличимый от регистрируемого в контрольной пробе, что подтверждает нетоксичность самого Унитиола и возможность его использования для заявленных целей.

В свою очередь добавление в среду, содержащую ионы ртути Hg^{2+} , Унитиола вело к существенной модификации эффекта ионов ртути, где наиболее типичным являлось менее выраженное снижение относительных показателей свечения

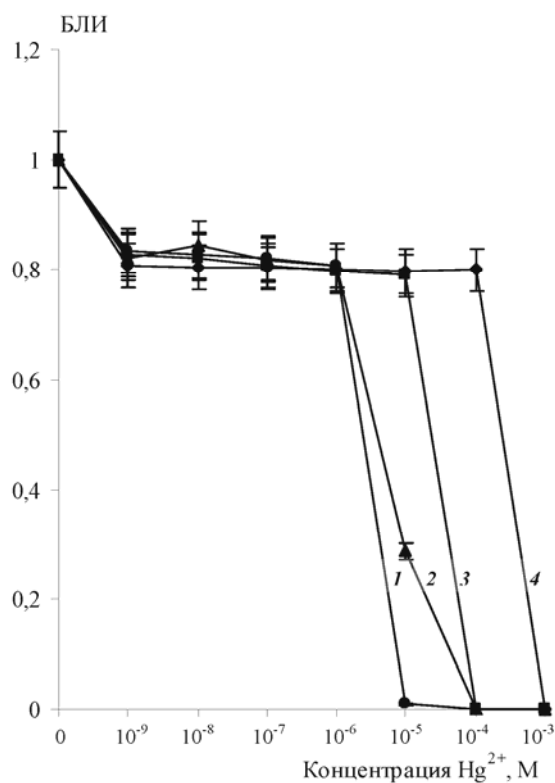


Рис. 2. Зависимость уровня биolumинесценции люминесцирующего штамма *E. coli* «Эколюм» от концентрации ртути (1), ртути и унитиола в концентрациях 10^{-5} (2), 10^{-4} (3), 10^{-3} (4) М

Escherichia coli K12 TG1 и сдвиг кривых вправо (рис. 2). Данный эффект объясняется появлением в растворе связанных ионов ртути Hg^{2+} и уменьшением вследствие этого свободных, биодоступных для бактериальных клеток, что и приводит к снижению регистрируемых токсикологических параметров. В частности происходило выраженное снижение концентраций ионов ртути Hg^{2+} , необходимых для 50% подавления биолюминесценции сенсорного микроорганизма. Так, при сочетании использования ртути и Унитиола значения EC_{50} для концентрации Унитиола 10^{-5} снижались в 1,5 раза, 10^{-4} – 10 раз, 10^{-3} – 100 раз и составили 6×10^{-6} , 4×10^{-5} , 4×10^{-4} соответственно.

Для выяснения силы антиоксидического действия Унитиола проводили эксперименты по выявлению его сочетанного влияния с ионами ртути на бактериальные клетки *E. coli pmerR::luxCDABE* (рис. 3). При этом происходило значительное снижение регистрируемых индексов индукции, а также сдвиг максимумов индукции вправо. Так, зарегистрированные максимумы индукции бактериальных клеток *E. coli pmerR::luxCDABE* при совместном влиянии максимальных концентраций ионов ртути и препарата Унитиола снижались до 20,76. При этом процент бионедоступных ионов ртути составлял более 99% во всех исследованных случаях.

И все же, несмотря на многие положительные свойства, Унитиол как лечебный препарат не свободен и от недостатков, что приводит к поиску не только новых дитиоловых антидотных средств, которые бы были лишены нежелательного побочного действия, но и препаратов на основе веществ другой химической природы. При этом использованный метод биолюминесцентного анализа позволяет не только проводить тестирование антиоксидического действия уже существующих препаратов, но и может быть использован при тестировании новых лекарственных средств, ориентированных на обезвреживание ряда других тяжелых металлов.

ЛИТЕРАТУРА

Ашбель С.И. Интоксикации ртутьорганическими ядохимикатами. М.: Медицина, 1964.

Белоножко Г.А., Щепотинин Б.М. Лечебное действие унитиола при отравлении некоторыми инсектофунгицидами // В кн.: Гигиена, токсикология и клиника новых инсектофунгицидов. М.: Медгиз, 1959. С. 347–350.

Голота Л.Г. Лечебные и антидотные свойства унитиола // Фармацевтический журнал. 1980. № 1. С. 18–22.

Данилов В.С., Зарубина А.П., Ерошинков Г.Е., Соловьева Л.Н., Карташев Ф.В., Завигельский Г.Б. Сенсорные биолюминесцентные системы на основе lux-оперонов разных видов люминесцентных бактерий // Вестник московского университета. Биология. 2002. № 3. С. 20–24.

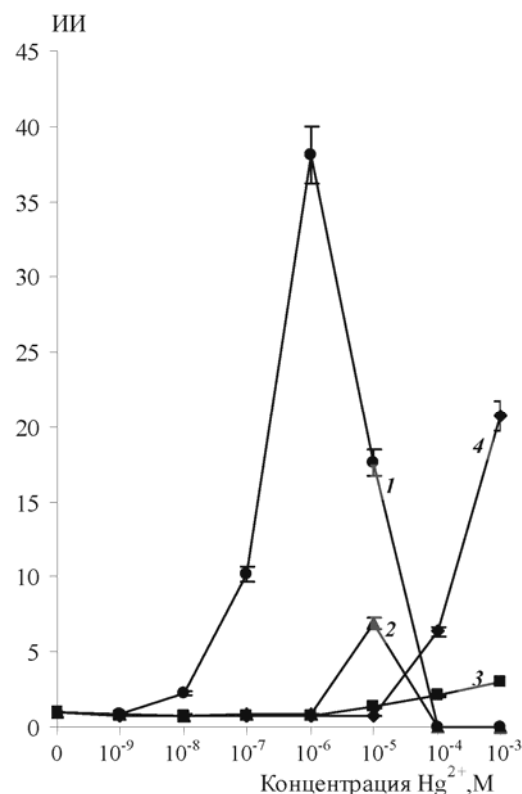


Рис. 3. Зависимость уровня биолюминесценции люминесцирующего штамма *E. coli pmerR::luxCDABE* от концентрации ртути (1), ртути и Унитиола в концентрациях 10^{-5} (2), 10^{-4} (3), 10^{-3} (4) М

Дерябин Д.Г. Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты: учебник. М.: Наука, 2009. 246 с.

Климова Л.К. Экспериментальные материалы по фармакологии нового антидота унитиола: Автореф. ... канд. дис. Киев, 1959.

Оксенгендлер Г.И. Яды и противоядия, М.: Наука, 1982.

Петросян В.С. Загрязнение ртутью: причины и последствия // Экология и промышленность. 1999. № 12. С. 34–38.

Петросян В.С. Ртуть и ее соединения в окружающей среде / Человек и среда его обитания. М.: Мир, 2003. С. 282–290.

Kaiser K.L.E. Correlation of *Vibrio fischeri* bacteria test data with bioassay data for other organisms // Environ Health Perspect. 1998, 106(2):583–591.

Strachan G., Preston S., Maciel H., Porter A.J.R., Paton G.I. Use of bacterial biosensors to interpret the toxicity and mixture toxicity of herbicides in freshwater // Wat Res. 2001, 35(14):3490–3495.