

УДК 579.65, 579.66

Токсическое воздействие соединения 2-этил(бицикло[2.2.1]гептан) на бактериальные клетки

© 2019 А. Г. КЕССЕНИХ¹, И. В. МАНУХОВ^{1,2,*}, Л. С. ЯГУЖИНСКИЙ¹, М. В. БЕРМЕШЕВ³,
М. А. ЗИСМАН¹, В. Г. ПЕВГОВ¹, В. О. САМОЙЛОВ³, С. В. ШОРУНОВ³, А. Л. МАКСИМОВ³

¹ФГАОУ ВО Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет)
Москва, 117303

²ФГБУ Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных
микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»–ГосНИИгенетика,
Москва, 113545

³Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН, Москва, 119991

*e-mail: manukhovi@mail.ru

Поступила в редакцию 25.09.2019 г.

После доработки 07.10.2019 г.

Принята к публикации 15.10.2019 г.

Проведено исследование токсического воздействия 2-этилнорборнана (2-этил(бицикло[2.2.1]гептан) (ЭЦГ) на бактериальные клетки с использованием lux-биосенсоров *Escherichia coli* pRecA-lux и *E. coli* pKatG-lux. Показано, что добавление ЭЦГ в среду инкубации приводит к гибели и задержке роста клеток и характеризуется высоким уровнем окислительного стресса и повреждений ДНК в клетках *E. coli*. Предполагается, что окисление ЭЦГ атмосферным кислородом приводит к образованию в среде активных форм кислорода, которые вносят основной вклад в токсичность данного вещества.

Ключевые слова: биосенсор, люцифераза, биолюминесценция, индуцируемый промотор, P_{recA}, P_{katG}

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-6-67-72

Несмотря на большой набор химических соединений, пригодных для использования в качестве углеводородного топлива, реальное применение в ракетной технике нашел весьма узкий круг веществ. 2-этилнорборнан (2-этил(бицикло[2.2.1]гептан) (ЭЦГ)) относится к каркасным напряженным высокоэнергоемким углеводородным соединениям, которые обладают повышенной теплотой сгорания по сравнению с обычными углеводородами, что делает их перспективными для разработки на их основе высокоэффективного, прежде всего ракетного, топлива. Особым и очень важным требованием условий эксплуатации компонентов ракетного топлива является их низкая токсичность. Продукты неполного окисления топлива, могут быть крайне

опасными, загрязняя атмосферу, водоемы и почву токсичными элементами при падении ступеней ракеты отработанных или в аварийных ситуациях.

Цель настоящей работы – исследование токсичности ЭЦГ с использованием бактериальных lux-биосенсоров.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Для данного исследования ЭЦГ был получен из 5-винил-2-норборнана согласно [1–5]. Молекула ЭЦГ содержит норборнановый фрагмент с напряженной структурой (рис. 1) и состоит из 9 атомов углерода и 16 атомов водорода.

Список сокращений: ЭЦГ – 2-этилнорборнан (2-ethylnorbornane, ЕВН); НДМГ – несимметричный диметилгидразин; ОП₆₀₀ – оптическая плотность при 600 нм.

Бактериальные штаммы и плазмиды

Исследование токсичности проводилось с использованием цельноклеточных бактериальных lux-биосенсоров. Lux-биосенсоры – это клетки *Escherichia coli* трансформированные гибридными плазмидами, содержащими в своем составе последовательности генов *luxCDABE* из *Photobacterium luminescens* под контролем различных стрессовых индуцируемых промоторов [6–10].

В качестве lux-биосенсоров для исследования токсичности норборнана были взяты клетки штамма *E. coli* K12 MG1655 (F-*ilvG rfb-50 rph-1*) с плазмидными конструкциями pKatG-lux и pRecA-lux, которые отвечают на окислительные и на вызывающие SOS-ответ повреждения ДНК соответственно. Используемые в работе плазмиды: pKatG-lux, pRecA-lux [8] были сконструированы авторами ранее на основе беспромоторного вектора pDW201 [7]. В качестве неиндуцирующегося контроля использовали клетки *E. coli* MG1655, трансформированные плазмидой pXen7 с конститутивной экспрессией *luxCDABE* генов, которые находятся под контролем P_{lac} -промотора, транскрибирующегося конститутивно без добавления лактозы [11].

Питательные среды и условия роста

Ночную культуру растили в бульоне Луриа-Бертани (LB) с добавлением 100 мкг/мл ампициллина при 30 °С с аэрацией. Полученную культуру клеток разводили 1:100 в LB и растили при 30 °С с аэрацией 200 об/мин до ранней логарифмической фазы ($ОП = 0,1–0,2$), затем полученные клетки использовали для проведения измерений при комнатной температуре.

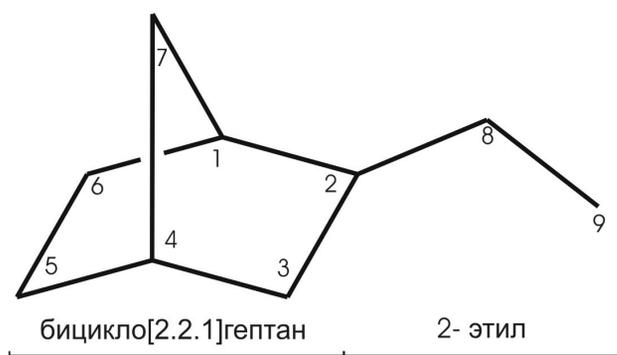


Рис. 1. Структурная схема молекулы 2-этил-(бицикло[2.2.1]гептана) (ЭЦГ). Номерами указаны атомы углерода

Fig. 1. Schematic structure of EBH 2-ethylnorbornane (2-ethylbicyclo[2.2.1]heptane). The numbers are carbon atoms

Проведение измерений люминесценции

Аликвоты логарифмической культуры (по 200 мкл) переносили в стерильные виалы и добавляли в них по 10 мкл тестируемого вещества требуемой концентрации. В контрольную пробирку добавляли 10 мкл дистиллированной воды. Затем пробы инкубировали без перемешивания и измеряли интенсивность биолюминесценции при комнатной температуре с использованием высокочувствительного люминометра «Биотокс-7» или планшетного LM-01A (Immunotech). Оценка проводилась на трех параллельных образцах каждого биосенсора с пятикратным повторением опыта.

Химические вещества

Все химические препараты были аналитической чистоты. Перекись водорода была получена от фирмы Ferraine (Россия). Митоминин С получен от Sigma Chemical Co. (США). Все тест-растворы приготавливали непосредственно перед их использованием. Исследуемое соединение ЭЦГ было синтезировано следующим образом: 8,4 г (70 ммоль) 5-винил-2-норборнена гидрировали в присутствии 170 мг 10% Pd/C в 15 мл пентана при давлении 20 атм. в течение 30 ч. После окончания реакции, реакционную смесь отфильтровывали через небольшой слой силикагеля, упаривали и перегоняли, собирая фракцию с T кипения 140–150 °С [1–5].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние ЭЦГ на рост клеток *E. coli* в жидкой среде

На первом этапе было исследовано влияние ЭЦГ на рост клеток *E. coli* в жидкой среде. К клеткам *E. coli* MG1655 pXen7, выращенным до ранней логарифмической фазы $ОП = 0,3$, добавляли различные количества ЭЦГ и затем инкубировали их при 37 °С с аэрацией. Через 30 мин и через 3 ч инкубации были измерены $ОП$ и титр клеток. Усредненные результаты трех экспериментов приведены в табл. 1.

Данные табл. 1 показывают, что начиная с 1% ЭЦГ в среде, его токсическое воздействие на клетки замедляет их рост и снижает люминесценцию. Увеличение титра КОЕ при 3-часовой инкубации даже при добавлении максимальной концентрации ЭЦГ (10%) говорит о способности части клеток к росту, несмотря на неблагоприятные условия (табл. 1). Следует отметить, что ЭЦГ, из-за высокой гидрофобности, образует в инкубационной

Влияние ЭЦГ на рост клеток *E. coli* в LBEffect of EBH on *E. coli* MG1655 cells growth in LB.

Содержание ЭЦГ, %	ОП ₆₀₀	Титр, кл./мл	Люминесценция, отн. ед.
0,5 ч инкубации			
Контроль	0,710	$8 \cdot 10^7$	16500
0,1	0,650	$6 \cdot 10^7$	16300
1,0	0,635	$5 \cdot 10^7$	5690
10,0	0,370	$1 \cdot 10^6$	720
3 ч инкубации			
Контроль	2,5	$2 \cdot 10^9$	52900
0,1	1,8	$1 \cdot 10^9$	65200
1,0	1,3	$5 \cdot 10^8$	29800
10,0	0,4	$2 \cdot 10^6$	909

среде раздел фаз, поэтому на клетки оказывает влияние лишь часть содержащегося в среде вещества, находящегося на поверхности раздела фаз или в растворенном состоянии.

Далее, по аналогии с исследованием токсических свойств компонента другого ракетного топлива – несимметричного диметилгидразина (НДМГ), – токсические свойства которого исследовались с использованием lux-биосенсоров [12–15], для исследования токсического воздействия ЭЦГ на бактериальные клетки были использованы lux-биосенсоры *E. coli* MG1655 с плазмидными конструкциями pKatG-lux и pRecA-lux.

На рис. 2 приведены данные измерения кинетики люминесценции *E. coli* MG1655 с плазмидой pRecA-lux, после добавления ЭЦГ. В результате возникает остановка репликационной вилки, образование одонитевых участков ДНК и, как следствие, SOS-ответ. Клетки инкубировались при комнатной температуре без аэрации в течение 3 ч с периодическим измерением люминесценции. В качестве положительного контроля использовался антибиотик митомицин С, образующий сшивки с ДНК.

Как видно из данных, приведенных на рис. 2, содержание ЭЦГ в пробах с концентрацией 10% и 1% приводит к повреждениям ДНК, которые вызывают SOS-ответ. Максимально возможная амплитуда ответа биосенсора *E. coli* (pRecA-lux) составляет около 50 раз (отношение уровня люминесценции в отн. ед. положительного контроля к отрицательному контролю было описано в предыдущих статьях [9]). В данном опыте максимальная активация биосенсора – при инкубации с ЭЦГ 10 мг/мл (~ в 3 раза).

На рис. 3 приведены данные измерения кинетики люминесценции *E. coli* MG1655 с плазмидой pKatG-lux, после добавления ЭЦГ. В качестве положительного контроля использовалась перекись водорода. Клетки инкубировались при комнатной температуре в течение 2 ч с периодическим измерением люминесценции.

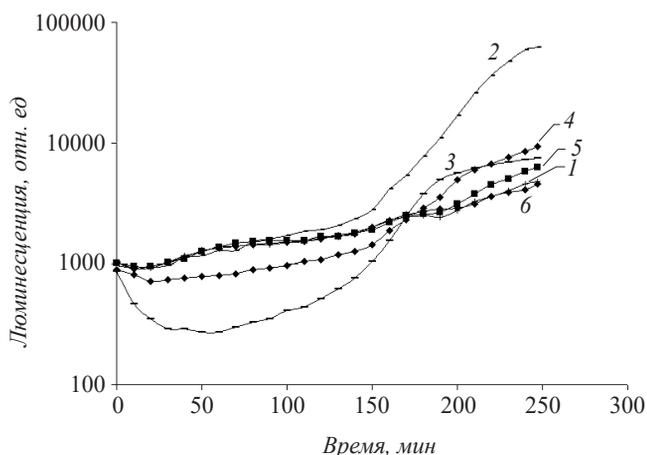


Рис. 2. Зависимость люминесценции клеток *E. coli* MG1655 pRecA-lux от времени инкубации после добавления ЭЦГ. 1 – контроль (без добавления токсиканта); 2 – добавлен митомицин С до конечной концентрации 10 мкМ; 3 – содержание ЭЦГ в пробе 100 мг/мл; 4 – ЭЦГ 10 мг/мл; 5 – ЭЦГ 1 мг/мл; 6 – ЭЦГ 0,1 мг/мл

Fig. 2. Luminescence of *E. coli* MG1655 pRecA-lux cells after addition of EBH depending on incubation time. 1 – control cells *E. coli* MG1655 pRecA-lux without added toxicant; 2 – added mitomycin with up to a final concentration of 10 μM; 3 – the sample contains EBH 100 mg/mL, 4 – EBH 10 mg/mL, 5 – EBH 1 mg/mL, 6 – EBH 0,1 mg/mL

На рис. 3 показан окислительный стресс, вызванный перекисью водорода. Повреждения клетки в результате стресса могут привести к модификациям азотистых оснований ДНК, и, как следствие, к увеличению скорости мутагенеза. Максимальный эффект достигался при содержании 1% ЭЦГ в среде (10 мг/мл, кривая 4). Содержание ЭЦГ <1 мг/мл не вызывало достоверного увеличения люминесценции, а 100 мг/мл оказывало сильно выраженное общетоксическое действие на клетки, приводящее к снижению базового уровня люминесценции.

В табл. 2 приведены пороговые значения НДМГ и ЭЦГ в среде, вызывающие активацию стрессовых промоторов. В качестве контроля приведены концентрации для стандартных токсикантов, специфических для данного промотора, индуцирующих усиление в 1,5–2,0 раза биолюминесценции *lux*-биосенсоров (митомицин С индуцирует повреждения в ДНК, перекись водорода индуцирует окислительный стресс). Этанол использовали как контроль общей токсичности – падение люминесценции коррелирует с количеством живых клеток. Время инкубации взято оптимальное для каждого биосенсора: для *E. coli* pResA-*lux* – 2 ч, pKatG-*lux* – 40 мин, pXen7 – 30 мин.

Как видно из данных приведенных в табл. 2, токсичность ЭЦГ эффективно выявляется по активации клеточных систем предотвращения окисления. По активации промотора P_{katG} ЭЦГ лишь на порядок уступает высокотоксичному компоненту ракетного топлива НДМГ.

Итак, согласно данным [16], каркасные напряженные высокоэнергетические углеводородные соединения окисляются кислородом так же, как и все углеводороды, по свободно-радикальному цепному механизму. Радикальный механизм окисления наряду с повышенной энергией реакции позволяет предположить, что токсическое действие такого типа соединений должно определяться главным образом реакциями образования активных

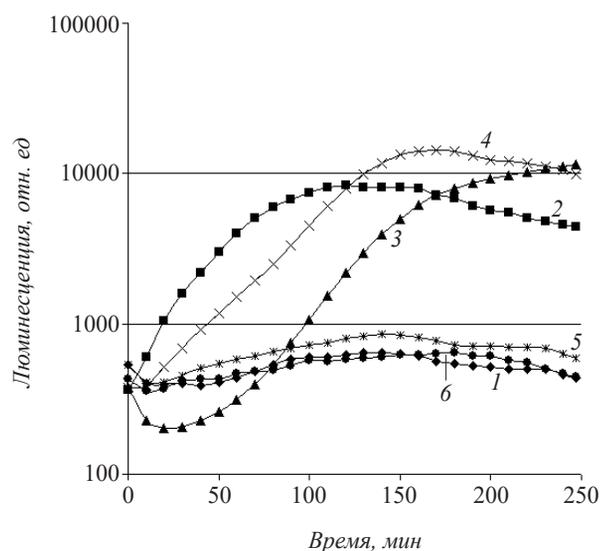


Рис. 3. Зависимость люминесценции клеток *E. coli* MG1655 pKatG-*lux* после добавления ЭЦГ от времени инкубации. 1 – без добавления токсиканта; 2 – добавлена перекись водорода до конечной концентрации 0,1 мМ; добавлен ЭЦГ до конечной концентрации: 3 – 100 мг/мл; 4 – 10 мг/мл; 5 – 1 мг/мл; 6 – 0,1 мг/мл

Fig. 3. Luminescence of *E. coli* MG1655 pKatG-*lux* cells after adding EBH depending on incubation time. 1 – control cells of *E. coli* MG1655 pKatG-*lux* without added toxicant; 2 – added hydrogen peroxide to a final concentration of 0.1 mM; 3 – added ECG to final concentration of: 3 – 100 mg/mL, 4 – 10 mg/mL, 5 – 1 mg/mL; 6 – 0.1 mg/mL

форм кислорода. В связи с этим, следует отметить, что, по данным выполненных экспериментов, токсичность ЭЦГ, определяемая проявлением в клетках окислительного стресса, всего в 10 раз меньше, чем токсичность НДМГ (табл. 2), несмотря на то, что испытания проводили с недиспергированной формой продукта нерастворимого в воде, контакты которого с биологическими объектами резко снижены и определяются только поверхностью раздела фаз. Выбранные условия эксперимента моделируют условия случайного пролива топлива, при которых глубокое диспергирование отсутствует.

Таблица 2

Активация стрессовых промоторов в присутствии НДМГ и ЭЦГ в среде
Activation of stress-inducible promoters in the presence of NDMG and EBH in LB

Исследуемый токсикант	Пороговые значения токсикантов (М) для <i>lux</i> -биосенсоров		
	pXen7	pKatG- <i>lux</i>	pResA- <i>lux</i>
Стандартный токсикант, специфический для данного промотора	C ₂ H ₅ OH, 1·10 ⁻²	H ₂ O ₂ , 3·10 ⁻⁵	Митомицин С, 1·10 ⁻⁸
НДМГ (по [10])	2·10 ⁻³	2·10 ⁻⁴	8·10 ⁻⁶
ЭЦГ	4·10 ⁻²	3·10 ⁻³	7·10 ⁻³

Генотоксическое действие ЭЦГ определено имеет место и определяется защитными системами клетки: SOS-ответ и охуRS-регулон.

Активация SOS-ответа наступает лишь при очень высоких концентрациях ЭЦГ в среде (пороговая концентрация составляет порядка 1 г/л). Тот факт, что имеет место активация окислительного стресса (рис. 3) может означать, что окисление ЭЦГ в среде в присутствии клеток *E. coli* приводит к появлению активных форм кислорода, возникающих при окислении ЭЦГ атмосферным кислородом, как это было показано и для НДМГ [12].

Несмотря на низкую растворимость ЭЦГ, минимальная концентрация этого вещества всего на один порядок менее активна, чем НДМГ (взятый в той же концентрации). Таким образом, в работе впервые обнаружена высокая токсичность химического соединения их ряда насыщенных углеводородов. Полученный результат позволяет думать, что при хорошем контакте с живыми системами токсин будет проявлять весьма высокую активность. Очевидно, следует провести более тщательное исследование токсичности этого вещества на других объектах.

Авторы работы признательны Чалкину С.Ф. за развитие междисциплинарных связей в научном сообществе.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (уникальный идентификатор проект RFMEFI60417X0181, соглашение №14.604.21.0181 от 26.09.2017).

ЛИТЕРАТУРА

- Bermeshev M.V., Chapala P.P. Addition polymerization of functionalized norbornenes as a powerful tool for assembling molecular moieties of new polymers with versatile properties. *Prog. Polym. Sci.*, 2018, 84, 1–46.
- Mol K.J., Ivin J.C. (Eds.) Applications of the olefin metathesis reaction. In *Olefin metathesis and metathesis polymerization*. Academic Press: London, 1997, 397–410.
- Ushakov N.V., Selective hydrogenation of 5-vinylnorborn-2-ene and other methods for the synthesis of 2-vinylnorbornane. *Russ. J. Appl. Chem.*, 2018, 91(5), 728–745.
- Shorunov S.V., Piskunova E.S., Petrov V.A., et al. Selective Hydrogenation of 5-Vinyl-2-Norbornene to 2-Vinylnorbornane. *Pet. Chem.*, 2018, 58(12), 1056–1063.
- Bermeshev M.V., Antonova T.N., Shangareev D.R., et al. Selective catalytic hydrogenation of alicyclic dienes with hydrogen in a liquid phase. *Pet. Chem.*, 2018, 58(10), 869–875.
- Van Dyk T.K., Majarian W.R., Konstantinov K.B., et al. Rapid and sensitive pollutant detection by induction of heat-shock gene – bioluminescence gene fusion. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, 60, 1414–1420.
- Van Dyk T.K., Rosson R.A., LaRossa E.A. *Photorhabdus luminescens luxCDABE* promoter probe vectors. *Methods Mol. Biol.*, 1998, 102, 85–95.
- Манухов И.В., Котова В.Ю., Завильгельский Г.Б. Lux-биосенсоры для детекции SOS-ответа, теплового шока и окислительного стресса. *Биотехнология*, 2009, 6, 16–25.
- Манухов И.В., Котова В.Ю., Мальдов Д.Г. и др. Индукция окислительного стресса и SOS-ответа в бактериях *Escherichia coli* растительными экстрактами: роль гидроперекисей и эффект синергизма при совместном действии с дисплатиной. *Микробиология*, 2008, 77(5), 1–8.
- Завильгельский Г.Б., Котова В.Ю., Манухов И.В., Кондратьев А.Д., Самброс В.В., Шатров Я.Т., Чалкин С.Ф. Набор lux-биосенсоров для определения гептила в среде. Патент РФ № 2297450 от 2007.04.20.
- Завильгельский Г.Б., Зарубина А.П., Манухов И.В. Определение и сравнительный анализ нуклеотидной последовательности Lux-оперона *Photorhabdus luminescens*, штамм ZM1. ERIC – элементы как предполагаемые «горячие» точки рекомбинации. *Мол. биол.*, 2002, 36(5), 792–804.
- Zavilgelsky G.B., Kotova V.Yu., Manukhov I.V. Action of asymmetric 1,1-dimethylhydrazine on bacterial cells is determined by hydrogen peroxide. *Mutation Res.*, 2007, 634(1–2), 172–176.
- Горянин И.И., Котова В.Ю., Краснопева Е.Д., и др. Генотоксическое действие 1,1 – диметилгидразина определяется алкилирующими соединениями, возникающими при его окислении, и перекисью водорода. *Труды МФТИ*, 2013, 5(17), 103–111.
- Манухов И.В., Горбунов М.А., Дегтев Д.И., Завильгельский Г.Б., Кессених А.Г., Коноплева М.Н., Котова В.Ю., Краснопева Е.Д., Мотовилов К.А., Осетрова М.С., Чалкин С.Ф., Шатров Я.Т. Набор lux-биосенсоров для определения генотоксичных продуктов неполного окисления несимметричного диметилгидразина в среде. Патент РФ №2569156 Дата подачи 18.12.2014.
- Кессених А.Г., Манухов И.В., Вагапова Э.Р., Высоких М.Ю., Коноплева М.Н., Котова В.Ю., Горбунов М.А., Чалкин С.Ф., Завильгельский Г. Б. Набор lux-биосенсоров для детекции токсичных продуктов неполного окисления несимметричного диметилгидразина в среде. Патент РФ № 2626569 от 17.12.2015.
- Dóbe S., Turányi T., Bérces T., Márta F. The kinetics of hydroxyl radical reactions with cyclopropane and cyclobutane. *Proceedings of the Indian Academy of Sciences – Chem. Sci.*, 1991, 103(3), 499–503.

Toxic Effect of 2-ethyl (bicyclo[2.2.1] heptane) on Bacterial Cells

A. G. KESSENIKH¹, I. V. MANUKHOV^{1,2,*}, L. S. YAGUZHINSKY¹, M. V. BERMESHEV³,
M. A. ZISMAN¹, V. G. PEVGOV¹, V. O., SAMOILOV³, S. V. SHORUNOV³, AND A. L. MAKSIMOV³

¹Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Moscow oblast, 141700, Russia

²State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of the National Research Center «Kurchatov Institute», Moscow, 117545, Russia

³Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991, Russia

*e-mail: manukhovi@mail.ru

Received September 25, 2019

Revised October 7, 2019

Accepted October 15, 2019

Abstract—Toxic effect of 2-ethylnorbornane (2-ethyl(bicyclo[2.2.1]heptane) (EBH)) on bacteria has been studied using the *E. coli* pRecA-lux and *E. coli* pKatG- lux cells as lux-biosensors. It was shown that the addition of EBH to the incubation medium leads to death and growth retardation, high level oxidative stress and DNA damage in *E. coli* cells. It is assumed that the oxidation of EBH with atmospheric oxygen causes the formation of reactive oxygen species in the medium, which makes a major contribution to the toxicity of this substance.

Key words: biosensor, luciferase, bioluminescence, inducible promoter, P_{recA}, P_{katG}

Acknowledgements—The authors are grateful to Stanislav Filippovich Chalkin for the development of interdisciplinary ties in the scientific community.

Funding—The work was financially supported by the Ministry of Higher Education and Science of Russia (Project Unique Identifier RFMEFI60417X0181, Agreement No. 14.604.21.0181 of 26.09.2017).

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-6-67-72