

БИОХИМИЯ

М. П. ЗНАМЕНСКАЯ, П. А. АГАТОВ и А. Н. БЕЛОЗЕРСКИЙ

**О БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЙ ГРУППЕ ГРАМИЦИДИНА С**

(Представлено академиком А. И. Опариным 15 IX 1947)

Механизм взаимодействия антибиотических веществ с тем или иным субстратом, обуславливаемый, несомненно, всем своеобразием построения их молекулы, в значительной мере определяется и наличием в них различных функциональных групп, ответственных за характер первоначальной связи антибиотиков с живыми клетками. Чем больше в молекуле какого-либо антибиотика функциональных групп различного характера, чем шире в силу этого диапазон его действия на окружающие живые клетки, тем на большее количество разнообразных механизмов и ферментных систем, принимающих участие в жизнедеятельности клеток, может влиять антибиотик, и тем труднее в данном случае разобраться в сложном механизме его действия.

Попытки такого рода, т. е. поиски «свободных химических групп», мы имеем в исследованиях Н. Christensen'a (1) над тироцидином. Работами R. Hotchkiss'a (2) было показано, что для детергирующего действия тироцидина, каковое, по его мнению, этот антибиотик оказывает на живые клетки, имеют значение активные группы основного характера. Работами R. Donovick'a, G. Rake'a и J. Fried'a (3) выявлена определенная роль карбонильной группы в молекуле стрептомицина.

Имея в своем распоряжении антибиотик известного и сравнительно несложного состава, каким является кристаллический полипептид, так называемый советский грамицидин или грамицидин С, выделенный Г. Гаузе и М. Бражниковой (4) из особого штамма аэробной споровой палочки, мы решили установить, какой участок в его молекуле является в первую очередь ответственным за механизм его действия.

В настоящее время, благодаря исследованиям А. Белозерского и Т. Пасхиной (5), подтвержденным и расширенным затем R. Synge (6) и дополненным F. Sanger (7), мы знаем состав аминокислот и порядок их сочетания в молекуле грамицидина С; мы знаем также, что аминная группа орнитина в молекуле грамицидина С свободна и, весьма вероятно, играет определенную роль в механизме его действия.

Прежде всего, исходя из свойств грамицидина С как довольно сильного основания, мы предположили возможность связывания его какими-либо кислыми компонентами клетки, в частности нуклеиновыми кислотами. Последние, как известно, имеют исключительное значение для роста и размножения клетки. Кроме того, в последнее время Henry и Stacey (8) было показано, что грамположительность микроорганизмов связана с локализацией магниевой соли рибонуклеиновой кислоты на поверхности клетки. Для проверки подобного предположения мы попытались получить продукт взаимодействия грамицидина С с рибонуклеиновыми кислотами. В качестве исходного вещества мы име-

ли кристаллический грамицидин-хлоргидрат, выделенный из продажного спиртового раствора этого антибиотика, применяемого в медицине; этот препарат грамицидина С отвечал всем константам, приведенным для него в исследованиях А. Белозерского и Т. Пасхиной. При обработке водно-спиртового раствора такого препарата водным раствором натриевой соли рибо- или тимонуклеиновой кислоты, мы получили вещества, отвечающие по своему составу и свойствам солеобразному соединению грамицидина С с нуклеиновыми кислотами; в случае рибонуклеиновой кислоты вещество содержало 14,93% N и 3,23% P (теоретически вычислено для рибонуклеиновокислого грамицидина 15,23% N 3,46% P); в случае тимонуклеиновой кислоты вещество содержало 15,42% N и 3,13% P (теоретически вычислено в этом случае 15,45% N и 3,50% P). Эти солеобразные соединения разлагались соляной кислотой, образуя первоначальный грамицидин-хлоргидрат и соответствующую нуклеиновую кислоту. Испытанные на биологическую активность по отношению к *Staphylococcus aureus*, штамм 209, эти препараты обнаруживали нормальное активное действие грамицидина С. Таким образом, будучи предельно насыщен такими довольно высокомолекулярными соединениями, как нуклеиновые кислоты, грамицидин С не теряет своей физиологической активности. Исходя из этих опытов, вряд ли возможно думать, что механизм действия грамицидина С сводится только к блокировке нуклеиновых кислот, столь необходимых для размножения и роста клетки.

В дальнейшем нами был поставлен вопрос о значимости свободной аминной группы грамицидина С в его биологической активности.

С этой целью мы решили произвести более прочное блокирование аминной группы грамицидина С, подвергая его реакциям бензоилирования и ацетилирования. Бензоилирование в пиридиновом растворе позволяет получить полностью бензоилированный продукт с 17,85% бензоила (теоретически вычислено для бензоилированного грамицидина С 18,42%  $C_6H_5CO$ ). Бензоилирование же грамицидина С в аналогичных условиях, только в щелочном растворе (7% NaOH), приводит лишь к частично бензоилированному продукту с 8,60%  $C_6H_5CO$ ; требуется более длительное воздействие хлористого бензоила для получения в щелочном растворе полностью бензоилированного продукта. Ацетилирование грамицидина С мы проводили посредством уксусного ангидрида в среде пиридина. Полученный препарат содержал 7,48%  $CH_3CO$  (вычислено 7,02%  $CH_3CO$ ). Мы провели также реакцию дезаминирования грамицидина С посредством  $NaNO_2$  в ледяной уксусной кислоте; полученный в ряде опытов дезаминированный грамицидин имел точку плавления 194—196° С и содержал 12,12% N (теоретически вычислено для дезаминированного грамицидина 12,26% N). Интересно отметить, что при дезаминировании совершенно меняется кристаллографическая форма грамицидина С, а также растворимость его в спирте и в других растворителях.

Биологическая активность как самого грамицидина, так и всех полученных нами его производных проверялась нами по отношению к *Staphylococcus aureus*, штамм 209. Для контроля мы проверяли также биологическую активность грамицидина С, подвергнутого нами в отдельных опытах действию ледяной уксусной кислоты, пиридина и 7% щелочи. Для испытания бралась односуточная культура стафилококка, выращенная на мясо-пептонном агаре, из которой готовилась его взвесь с таким расчетом, чтобы концентрация стафилококка в 1 мл была равна приблизительно 500 000 000 клеток. К 2 мл мясо-пептонного бульона с определенной концентрацией грамицидина прибавлялось 0,1 мл взвеси стафилококка, приготовленной, как описано выше. Результаты опытов отмечались после 18-час. стояния пробы в термостате при

37° С. Сравнительное действие солей грамицидина С и его производных приведено в табл. 1.

Таблица 1

Рост *Staphylococcus aureus*, штамм 209 в присутствии грамицидина С и его производных

Название препарата	Концентрация грамицидина С в 1 мл питательной среды в γ						Контроль
	243	81	27	9	3	1	
Грамицидин С							
Солянокислый . . . . .	—	—	—	—	—	+	+
Рибонуклеиновокислый . . . . .	—	—	—	—	—	+	+
Тимонуклеиновокислый . . . . .	—	—	—	—	—	+	+
Бензоилированный в щелочи (8,60% С <sub>6</sub> Н <sub>5</sub> СО) . . . . .	—	—	—	—	+	+	+
Полностью бензоилированный в щелочи . . . . .	+	+	+	+	+	+	+
Бензоилированный в пиридине . . . . .	+	+	+	+	+	+	+
Ацетилованный . . . . .	+	+	+	+	+	+	+
Дезаминированный . . . . .	+	+	+	+	+	+	+
После обработки пиридином . . . . .	—	—	—	—	—	+	+
После обработки ледяной уксусной кислотой . . . . .	—	—	—	—	—	+	+
После обработки 7% щелочью . . . . .	—	—	—	—	—	+	+

Примечание. — означает отсутствие роста, + означает развитие стафилококка.

Из данных опыта с полной очевидностью следует, что при блокировании аминной группы (введение бензоила или ацетила) грамицидин С лишается своих антибиотических свойств. Точно так же ведет себя и дезаминированный грамицидин. Интересно отметить, что частично бензоилированный грамицидин (с 8,60% С<sub>6</sub>Н<sub>5</sub>СО) сохраняет в некоторой степени свою биологическую активность.

Мы провели также биологическое титрование всех полученных нами препаратов грамицидина С по отношению к *Bact. coli*. Результаты опыта те же; грамицидин С, будучи в солеобразной связи с нуклеиновыми кислотами, оказывает губительное действие на развитие *Bact. coli*. В присутствии же бензоилированного (полностью), ацетилованного и дезаминированного грамицидина С рост *Bact. coli* не прекращается.

По данным проф. М. Н. Мейсель \*, рост дрожжевых клеток, который задерживается как грамицидином С, так и его солями с нуклеиновыми кислотами, остается без изменений в присутствии ацетилованного, бензоилированного и дезаминированного грамицидина.

В заключение мы провели определение количества свободной аминной группы в грамицидине и во всех полученных нами и испытанных на биологическую активность его препаратах. Определение аминной группы производилось в микроаппарате Ван-Слайка; полученные результаты представлены в табл. 2.

Из данных табл. 1 и 2 явствует, что биологическая активность грамицидина С убывает параллельно с уменьшением в нем количества свободной аминной группы.

Вышеприведенные опыты со всей очевидностью показывают значение аминной группы в молекуле грамицидина С в его биологических проявлениях. Однако следует полагать, что аминная группа должна

\* Личное сообщение.

быть рассматриваема лишь как точка приложения к тем субстратам, с которыми реагирует данный антибиотик, в то время как направлен-

Таблица 2

Аминный азот по Ван-Слайку в процентах на абсолютно сухое вещество

Название препарата	Продолжительность реакции, мин.	
	5	30
Грамицидин С		
Солянокислый . . . . .	2,09	2,39
Рибонуклеиновокислый . . . . .	1,60	2,40
Тимонуклеиновокислый . . . . .	1,61	2,04
Частично бензоилированный (8,60% $C_6H_5CO$ ) . . . . .	1,26	—
Полностью бензоилированный . . . . .	0,31	0,37
Ацетилованный . . . . .	0,11	0,31
Деаминарованный . . . . .	0,26	0,42

ность и специфичность его действия на те или иные субстраты или метаболиты, несомненно, должна обуславливаться структурными особенностями и составом всей молекулы в целом.

Выводы. 1. Биологическая активность грамицидина С связана с наличием в его молекуле свободной аминной группы.

2. Вступая в солеобразное соединение с нуклеиновыми кислотами, грамицидин С не теряет своих антибиотических свойств.

3. Бензоилированный или ацетилованный грамицидин С теряет свою биологическую активность.

4. Деаминарованный грамицидин С также не имеет антибиотических свойств.

Институт биохимии им. А. Н. Баха  
и Институт микробиологии  
Академии Наук СССР

Поступило  
15 IX 1947

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> H. Christensen, J. Biol. Chem., 160, No. 1 (1945). <sup>2</sup> R. Hotchkiss, Adv. in Enzymology, 4 (1944). <sup>3</sup> R. Donovan, G. Rake and J. Fried, J. Biol. Chem., 164, 173 (1946). <sup>4</sup> Г. Гаузе и М. Бражникова, Журн. микроб. и эпидемиол., № 4-5 (1943). <sup>5</sup> А. Белозерский и Т. Пасхина, Биохимия, 10, в. 4 (1945). <sup>6</sup> R. Syngé, Biochem. J., 39, No. 4 (1945). <sup>7</sup> F. Sanger, ibid., 40, No. 2 (1946). <sup>8</sup> H. Henry and M. Stacey, Nature, 151, 671 (1943).