

В. А. ДОРФМАН и Д. П. ЩЕРБАЧЕВА

О ПЕРВИЧНОМ РАСПАДЕ БАКТЕРИЙ ПОД ВЛИЯНИЕМ АНТИБИОТИКОВ

(Представлено академиком Б. Л. Исаченко 9 XII 1947)

Нами было показано (^{1,2}), что увеличение электрокинетического (ζ) потенциала бактерий под влиянием самых разнообразных антибиотиков, повидимому, является одним из самых ранних выражений воздействия этих агентов на бактериальную клетку. Вполне естественно поэтому попытаться расшифровать физико-химическую природу этого воздействия, исходя из указанного ζ -эффекта. Первые количественные исследования ζ -эффекта (^{1,2}) показали, что, судя по форме кривой зависимости этого эффекта от концентрации антибиотика (пенициллина), мы имеем здесь дело не столько с адсорбцией антибиотика, сколько с распадом вещества поверхностного слоя бактерии. Непосредственной причиной увеличения электрокинетического потенциала бактерии при воздействии на нее антибиотика является, повидимому, указанный ионогенный распад ее поверхности. Количество образующихся при этом электрически заряженных продуктов распада ничтожно мало и аналитически неуловимо для одной клетки, однако, благодаря чувствительности метода электрофореза может быть уловлено.

Для проверки предложенной нами схемы действия антибиотиков необходимо было раньше всего проверить, насколько универсальны те количественные закономерности, которые были найдены для пенициллина. Для этой цели в настоящей работе была прослежена количественная зависимость ζ -эффекта антибиотика лизоцима от его концентрации. В данном случае был выбран антибиотик, резко отличающийся своей белковой природой и литическим действием от бактериостатически действующего низкомолекулярного пенициллина. Первые данные о ζ -эффекте лизоцима были опубликованы нами в 1942 г. (³).

Опыты производились с суточной агаровой культурой *M. lysodeicticus*, которая после двукратного центрифугирования и промывания в 0,5% NaCl взвешивалась в этой среде. Определения ζ -потенциала производились по ранее описанному методу (¹⁻³) в микрокамере Норсропа — Абрамсона (см. также (⁴)). Скорость миграции бактерий в электрическом поле определялась при помощи объектива 20 \times и окуляра 28 \times на дистанции 100—150 μ . ζ -эффект выражен в процентном увеличении скорости миграции бактерий по сравнению с контролем, не подвергнутым действию антибиотика.

В работе (³) было показано, что при высоких концентрациях лизоцима эффект его на ζ -потенциал бактерии эволюционирует во времени, скоро достигая максимума, а затем обнаруживая тенденцию к возвращению к норме. В настоящей работе мы значительно расши-

рили зону концентрации лизоцима, в связи с чем необходимо было предварительно проследить изменения ζ -эффекта во времени.

Опыт показал, что при средних концентрациях лизоцима (1:20) ζ -эффект наступает относительно быстро и затем нарастает во времени, достигая максимума через 20—30 мин., после чего может наступить временное падение кривой (рис. 1). При меньших концентрациях лизоцима ($c \leq 1:100$) ζ -эффект растягивался во времени на много часов. В этих случаях ζ -эффект определялся на следующий день —

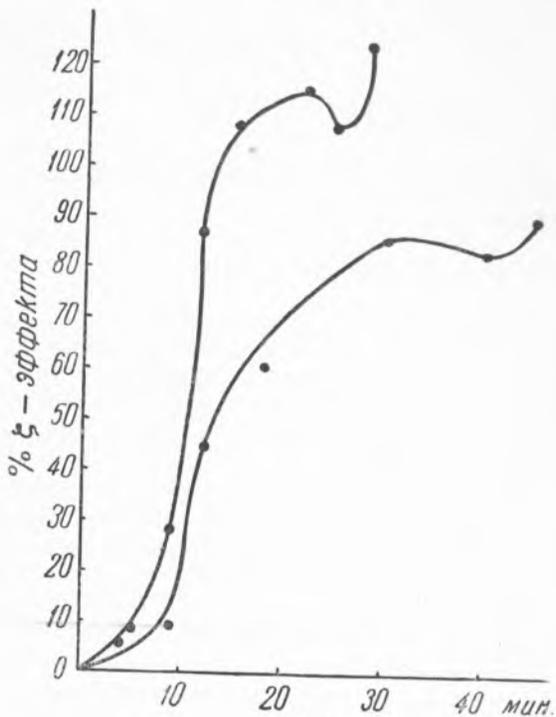


Рис. 1

через 18 час., и одновременно с этим измерялся ζ -потенциал контроля. Соответственно этим предварительным данным, для опытов служила серия концентраций лизоцима в пределах разведений исходного лизоцима от 1:22 до 1:2850. На рис. 2 концентрация лизоцима условно обозначена порядковыми цифрами, причем единица означает наиболее низкую концентрацию, а вся серия концентраций лизоцима представляет геометрическую прогрессию.

Как показывает кривая рис. 2, зависимость ζ -эффекта лизоцима от его концентрации носит такой же сигмоидный характер, как и в случае пенициллина. В сообщении (1) достаточно подробно обсуждались вы-

текающие отсюда выводы, которые указывают на распад бактериальной поверхности как на непосредственную причину повышения ζ -потенциала бактерии. Для двух типов антибиотиков (бактериостатически действующего пенициллина и литически действующего лизоцима) справедливы, как мы видим, одни и те же выводы.

Конечно, приведенные выше выводы не были бы достаточно убедительны, если бы мы ограничились одним только формальным толкованием эмпирически полученных кривых. В самом деле, указанные кривые допускают совершенно иного рода толкование: их сигмоидный ход можно рассматривать как указание на чисто статистический характер распределения чувствительности популяции бактериальной суспензии к действию антибиотика. Это соображение можно было бы подкрепить тем фактом, что и кривая ζ -эффекта во времени носит такой же сигмоидный характер, тогда как процесс лизиса протекает по уравнению для мономолекулярной реакции (5), т. е. носит совершенно иной характер. Эти расхождения обеих кривых кинетики лизиса, в свете приведенного выше возражения, можно было бы связать с тем фактом, что лизис прослеживается на суспензии бактерии, состоящей из миллионов клеток, тогда как ζ -эффект прослеживается на немногих клетках (при методе микрокатафореза). Таким образом, и сигмоидный характер кривой ζ — c можно было бы объяснить тем, что она получена при работе с немногочисленными

бактериями. В действительности, однако, такое возражение отпадает по той простой причине, что тем же методом микрокатафореза, но при работе с ионами солей, были получены кривые зависимости ζ -потенциала бактерий от концентрации электролита, которые носят не сигмовидный характер, а воспроизводят классическую изотерму адсорбции.

Однако, помимо чисто формально-математических соображений, всегда косвенных, для лизоцима существуют непосредственные экспериментальные данные, указывающие на процессы распада, вызываемые им в бактериальной клетке. Совсем недавно Эпштейн и Чейн (6) показали, что из бактерий, чувствительных к лизоциму, можно выделить полисахарид, который расщепляется лизоцимом. Этот полисахарид указанные авторы считают ответственным за действие лизоцима на живую клетку*.

Мы приходим, таким образом, к выводу, что действие антибиотика можно рассматривать как явление цитолиза, начинающегося в поверхностном слое бактериальной клетки (1,3). Простое наблюдение в микроскоп также показывает, что вскоре после прибавления лизоцима бактерии обнаруживают характерные оптические изменения, которые говорят о цитолитических изменениях в их поверхностном слое: контуры бактерии становятся нечеткими вследствие изменения показателя преломления клетки.

Таким образом, существуют как теоретические, так и экспериментальные предпосылки для того, чтобы рассматривать первичный эффект антибиотика как процесс распада бактериальной поверхности, независимо от того, заходит ли этот процесс достаточно далеко, чтобы вызвать полный распад (лизис) клетки, или он не распространяется дальше поверхностного слоя бактерии, лишая ее, однако, способности к делению (бактериостатическое действие).

Прямые доказательства, подкрепляющие этот вывод, были получены в недавнее время одним из нас (В. А. Дорфманом) в сотрудничестве с Е. А. Молдавской. Действительно, удалось показать, что как в случае пенициллина, так и в случае лизоцима в суспензии бактерий накапливаются продукты их распада, которые можно обнаружить благодаря тому, что они действуют так же, как исходный антибиотик, т. е. вызывают в свежих бактериях ζ -эффект. Эти продукты распада бактерий обладают, повидимому, также бактериостатическим действием на бактериальную клетку. Исследованные антибиотики действуют, следовательно, по принципу бактериофага, т. е. как бы „размножаются“ за счет бактериальной клетки. Процесс антибиотического действия носит, повидимому, аутокаталитический характер (см. кривые рис. 1 и 2).

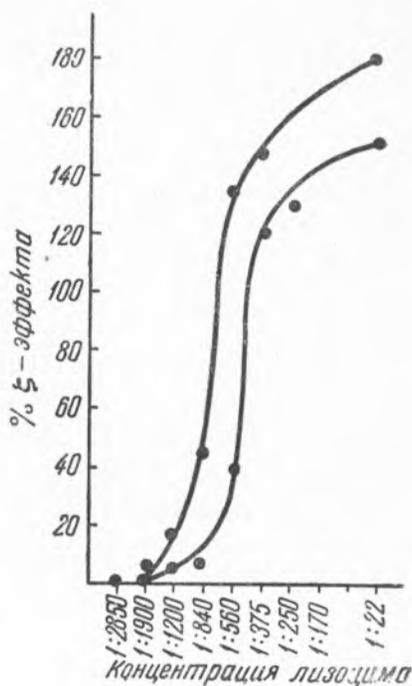


Рис. 2

* Данные, полученные в нашей лаборатории А. А. Фейгиной, позволяют предположить, что в живой клетке этот субстрат находится в ином состоянии, чем в пробирке, и соответственно показывает несколько иную зависимость действия от pH.

Природа обнаруженных нами продуктов распада бактерий под влиянием антибиотиков, степень их специфичности и т. д. являются в настоящее время предметом исследования.

Центральный научно-исследовательский
контрольный институт вакцин и сывороток
Министерства здравоохранения СССР

Поступило
9 XII 1947

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ В. А. Дорфман, Е. А. Молдавская и П. С. Засыпкина, Биохимия, 10, № 5—6, 407 (1945); Amer. Rev. Sov. Med., August 1946. ² В. А. Дорфман и П. С. Засыпкина, Бюлл. эксп. биол. и медиц., 20, в. 4—5, 57 (1945). ³ В. А. Дорфман, Е. А. Молдавская и Е. Каракаш, там же, 13, в. 5—6, 48 (1942); Nature, 153, No. 3875, 169 (1944); Amer. Rev. Sov. Med., 1944. ⁴ В. А. Дорфман и Т. Л. Касторская, Микробиология, 15, в. 1, 67 (1946). ⁵ В. А. Дорфман, Бюлл. Эксп. биол. и медиц., 14, в. 1, 112 (1942). ⁶ L. A. Epstein and E. Chain, The British J. Exper Pathol., 21, 339 (1940).