

Р. Я. ЮДЕЛОВИЧ

О МЕХАНИЗМЕ ДЕЙСТВИЯ ГРАМИЦИДИНА С НА ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ

(Представлено академиком А. И. Опариным 29 VI 1950)

Успехи в области применения антибиотиков биологического происхождения явились толчком к изучению механизма действия этих веществ.

Химическая природа грамицидина С была подробно изучена А. Н. Белозерским и Т. С. Пасхиной ⁽¹⁾. Что касается механизма действия грамицидина С, то он еще недостаточно изучен. М. Г. Бражникова ⁽²⁾ наблюдала, что грамицидин С в малых концентрациях стимулирует, а в больших угнетает дыхание золотистого стафилококка. Грамицидин С, подобно грамицидину Дюбо, не переваривается протеолитическими ферментами, что связано, повидимому, с включением оптической инверсии в структуру этих антибиотиков.

Исследования Гочкиса ⁽³⁾ показали, что стафилококки теряют способность к эстерификации минерального фосфата в присутствии глюкозы в аэробных условиях при добавлении небольших концентраций грамицидина Дюбо. Грамицидин Дюбо блокирует процесс фосфорилирования через циклофоразную систему ⁽⁴⁾ и тем самым снижает реакции, связанные с окислением жирных кислот.

Связь между окислительными процессами и фосфорилированием была впервые установлена Энгельгардтом ⁽⁵⁾ в работе с ядерными эритроцитами и привела его к представлению о коферментной роли А. Т. Ф. не только в процессе гликолиза, но и в процессах дыхания.

Настоящее сообщение посвящено вопросу о механизме действия грамицидина С на процессы окислительного фосфорилирования.

Методика. Опыты ставились с экстрактами и кашицей печени морской свинки, кроликов и голубей.

Реакционная смесь содержала: 1 мл экстракта и фтористый натрий в конечной концентрации 0,1 М, 2 мг гликогена и 2 мг водорастворимого очищенного грамицидина и фосфатного буфера с рН 7,4—7,5 с содержанием фосфора от 0,35 до 0,6 мг, а в опытах с экстрактами кроликов и голубей — от 0,8 до 1,5 мг на 1 мл опытной пробы. Общий объем реакционной пробы равнялся 2 мл. Контрольные пробы ставились в тех же условиях с добавлением воды вместо раствора грамицидина. После насыщения O_2 или N_2 инкубация продолжалась в течение 20 мин. при 28° в колбочках с пришлифованными пробками, имеющими 2 отводные трубки. Реакция останавливалась добавлением 2 мл 5% трихлоруксусной кислоты. Белки удалялись центрифугированием. В фильтрате определялось: минеральный фосфор осаждением магnezальной смесью; гексозодифосфат осаждением в виде Ва-соли при рН 8,2 и в дальнейшем количество фруктозы определялось по методу Рое ⁽⁶⁾. Фосфор определялся по Фиска и Зуббарову.

Кристаллическая альдолаза была получена из мышц кроликов ⁽⁷⁾. А.Т.Ф. и гексозодифосфат переводились в Na-соли перед опытом. Расчет гексозодифосфата приведен в мг на дибариевую соль по фруктозе.

Результаты исследований. В первой серии опытов изуча-

лось влияние грамицидина С на убыль минерального фосфата в аэробных и анаэробных условиях (см. табл. 1).

Таблица 1

Влияние грамицидина С на убыль минерального фосфата в экстрактах печени (убыль минерального фосфата в мг и в % к исходному количеству фосфата)

Условия опыта	Убыль минер. фосф.	Морская свинка				Кролик			Голубь		
		№№ опытов									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
В атмосфере O ₂		Контроль — без грамицидина									
	В мг	-0,93	-0,74	-0,78	-0,71	-0,73	—	0,73	-0,98	-1,28	-1,06
	В % к										
	исх.	81	65	89	70	98	—	75	61	80	64
		Добавлен грамицидин									
	В мг	-0,34	-0,32	-0,5	-0,39	-0,4	—	0,41	-0,47	-0,9	-0,66
	В % к										
	исх.	30	28	57	40	55	—	40	29	55	40
		Контроль — без грамицидина									
	В атмосфере N ₂	В мг			-0,5	-0,39	—	-0,44	-0,41		
В % к											
исх.				57	40	—	50	40			
		Добавлен грамицидин									
В мг				-0,49	-0,35	—	-0,43	-0,40			
	В % к										
	исх.			57	36	—	50	40			

Как видно из данных табл. 1, грамицидин С снижает убыль неорганического фосфата в аэробных условиях и не влияет на этот же процесс в атмосфере азота. Обращает на себя внимание тот факт, что в анаэробных условиях как в присутствии грамицидина, так и в контрольных опытах убыль минерального фосфата практически аналогична с деминерализацией фосфата в аэробных условиях в присутствии грамицидина. Эти данные позволили предположить, что грамицидин С не влияет на активность фосфоролазы печени и резко угнетает процессы окислительного фосфорилирования, т. е. способность минеральной фосфорной кислоты воспринимать энергию, освобождающуюся при биологическом окислении, и переноситься на адениловую систему.

Аналогичную картину мы наблюдали в отношении влияния грамицидина С на фосфорилирование в аэробных условиях, при использовании кашицы вместо экстрактов печени.

Влияние грамицидина С на окислительное фосфорилирование специфично, так как ряд аминокислот, как то гистидин, β-аланин, метионин и дипептид карнозин, дали отрицательные результаты в этих условиях. Дальнейшие опыты были поставлены в направлении выяснения механизма торможения грамицидином С фосфорилирования в атмосфере кислорода. Более энергичная убыль фосфата в аэробных условиях в экстрактах и кашице печени можно было объяснить восстановлением запасов А.Т.Ф. окислительным путем и дальнейшим переносом фосфорной кислоты с А.Т.Ф. на фруктозо-6-фосфат, образующийся из фосфорилированных углеводов в результате фосфоролиза.

Добавленный нами фтористый натрий в конечной концентрации 0,1 М полностью тормозил активность фосфатаз в отношении фосфо-

рилированных эфиров углеводов, но расщепление А.Т.Ф. тормозилось только на 50—60%. Таким образом, А.Т.Ф. частично могла расщепляться, частично переносилась на фруктозо-6-фосфат, что приводило к накоплению гексозодифосфата. Если грамицидин С угнетает синтез А.Т.Ф. в аэробных условиях, то гексозодифосфат должен накапливаться меньше в опытах с добавлением грамицидина.

Результаты этих исследований представлены в табл. 2. Из табл. 2 видно, что в присутствии грамицидина существенно нарушается образование гексозодифосфата. В опытах с экстрактами печени гексозодифосфат почти совсем не образуется при добавлении грамицидина, а в опытах с кашцей печени морских свинок и кроликов синтеза гексозодифосфата снижается на 40—50%. Полученные нами результаты с полной очевидностью указывают, что грамицидин нарушает синтез А.Т.Ф. в аэробных условиях. Чтобы исключить возможность расщепления гексозодифосфата в экстрактах печени при добавлении грамицидина, влиянием последнего на активность альдолазы, мы проверяли действие грамицидина С на скорость расщепления гексозодифосфата под влиянием кристаллической альдолазы.

В дальнейшем изучалась скорость гидролиза натриевой соли гексозодифосфата при добавлении альдолазы как в присутствии грамицидина, так и без добавления. О расщеплении гексозодифосфата мы судили по нарастанию фосфора триоз.

Как видно из рис. 1, грамицидин не влияет на скорость расщепления гексозодифосфата под влиянием кристаллической альдолазы.

Если действительно грамицидин нарушает только синтез А.Т.Ф., но не влияет на реакцию переэстерификации А.Т.Ф., то при добавле-

Таблица 2

Влияние грамицидина С на образование гексозодифосфата в аэробных условиях

№ опытов	Состав опытной пробы	Ферментн. система	Гексозоди- фосфат в мг по фруктозе		Фосфор в мг Р	
			найде- но	измене- ние	найде- но	измене- ние
1	Начальная	Экстракт печени кро- лика	0,240	—	1,80	—
	После инкубации:					
	Контроль (без грамицидина)		1,440	+1,200	1,25	—0,55
2	Начальная	Экстракт печени мор- ской свинки	0,250	+0,010	1,54	—0,26
	После инкубации:					
	Контроль		0,756	—	1,25	—
3	Начальная	Экстракт печени мор- ской свинки	1,580	+0,824	следы	—1,25
	После инкубации:		0,756	0	0,61	—0,64
	Добавлен грамицидин					
4	Начальная	Экстракт печени мор- ской свинки	0,288	—	1,33	—
	После инкубации:					
	Контроль		1,260	+0,972	0,33	—1,00
5	Начальная	Экстракт печени мор- ской свинки	0,288	0	0,83	—0,50
	После инкубации:					
	Добавлен грамицидин		0,360	—	1,26	—
6	Начальная	Морская свинка, каш- ца печени, 450 мг	3,484	+3,124	0,5	—0,76
	После инкубации:		0,396	+0,036	0,96	—0,30
	Контроль					
7	Начальная	Кролик, кашца печени, 450 мг	0,378	—	1,38	—
	После инкубации:					
	Контроль		3,600	+3,222	0,78	—0,6
8	Начальная	Кролик, кашца печени, 450 мг	2,100	+1,722	1,00	—0,38
	После инкубации:					
	Добавлен грамицидин		0,57	—	—	—
9	Начальная	Кролик, кашца печени, 450 мг	2,52	+1,95	—	—
	После инкубации:		1,67	+1,10	—	—
	Добавлен грамицидин					

нии А.Т.Ф., в наших условиях опыта синтез гексозодифосфата должен был бы осуществиться и в присутствии грамицидина.

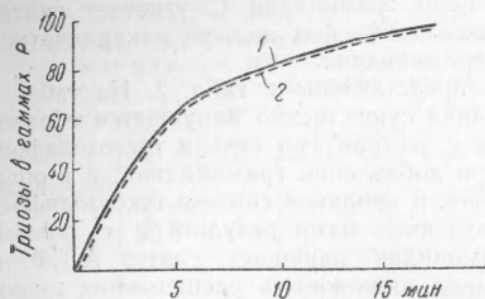


Рис. 1. Влияние грамицидина С на скорость ферментативного расщепления гексозодифосфата. 1 — контроль, 2 — грамицидин

гексозодифосфата, как и в контрольных пробах без добавления грамицидина. Эти данные полностью подтверждают, что грамицидин не влияет на реакцию переэстерификации с А.Т.Ф. на фруктозо-6-фосфат, а только на синтез А.Т.Ф. окислительным путем.

Полученные нами результаты опытов позволяют сделать следующие выводы. Механизм действия грамицидина С на окислительное фосфорилирование заключается в нарушении синтеза А.Т.Ф. в аэробных условиях. Грамицидин С, резко угнетая процессы окислительного фосфорилирования, влияет скорее на процессы синтеза энзиматического

Таблица 3
Влияние добавления А.Т.Ф. на образование гексозодифосфата в экстрактах печени в аэробных условиях

Состав опытной пробы	Гексозодифосфат в мг по фруктозе		
	Оп. 1	Оп. 2	Оп. 3
До инкубации	0,61	0,680	0,648
После инкубации:			
Контроль	3,60	3,85	—
Контроль + А.Т.Ф.	3,85	3,52	3,60
Добавлен грамицидин	0,590	0,720	0,612
Добавлено грамицидин + А.Т.Ф.	3,20	3,38	3,80

комплекса, чем на активность ферментных систем, участвующих в реакциях фосфорилирования, в их готовой каталитической форме.

В заключение приношу глубокую благодарность проф. А. М. Кузину за советы в работе и проф. А. Н. Белозерскому и М. П. Знаменской за предоставление препаратов водорастворимого грамицидина С.

Московский медицинский институт
Министерства Здравоохранения РСФСР

Поступило
10 VI 1950

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. Н. Белозерский и Т. С. Пасхина, Биохимия, 10, 344 (1945).
- ² М. Г. Бражникова, ДАН, 59, 1349 (1948).
- ³ R. D. Hotchkiss, Adv. Enzym., 4, 153 (1944).
- ⁴ R. J. Gross, J. V. Taggart, G. A. Cavo and D. E. Green, Journ. Biol. Chem., 177, 655 (1949).
- ⁵ W. A. Engelhardt, Biochem. Zs., 227, 16 (1930).
- ⁶ W. W. Umbreit, R. H. Burres and J. F. Stauffer, Manometrik Technics and Related Methods for the Study of Tissue Metabolism.
- ⁷ F. A. Taylor, A. A. Green and G. J. Cori, Journ. Biol. Chem., 173, 593 (1948).