

А. М. НЕЙМАРК и А. Г. ПАСЫНСКИЙ

СВЯЗЫВАНИЕ АНТИБИОТИКОВ БАКТЕРИЯМИ И ПРОТЕИДАМИ

(Представлено академиком А. И. Опарным 31 XII 1953)

Действие антибиотиков на бактериальную клетку предполагает наличие непосредственного контакта молекул антибиотика с клеткой. Антибиотики обычно действуют при столь малых концентрациях (например, пенициллин и стрептомицин при 10^{-5} и 10^{-6} М), что невозможно представить изменение свойств растворителя, которое могло бы объяснить наблюдаемое действие и, тем более, его специфичность. Несомненно, что взаимодействие антибиотика с бактериальной клеткой, даже вне макроорганизма, имеет чрезвычайно сложный характер (влияние проницаемости клетки, характера выключаемого метаболического процесса, окислительно-восстановительных условий в клетке и мн. др.), но при всех условиях первичным звеном взаимодействия должно быть прямое соединение молекул антибиотика с бактериальной клеткой в форме поверхностной адсорбции или поглощения внутри клетки. Разумеется, одного факта связывания антибиотика совершенно недостаточно для объяснения антибактериального действия, но без этого связывания антибиотик вообще не мог бы оказать этого действия. Еще сравнительно недавно в различных зарубежных монографиях (Ваксман (1), Эррел (2)), встречались утверждения, что, например, пенициллин не связывается чувствительными бактериями, что придавало его действию несколько мистический характер. В работе одного из нас с Т. Л. Касторской (3) при помощи специальной методики была впервые измерена величина адсорбции пенициллина на бактериях, оказавшаяся чрезвычайно небольшой (не более 1000 молекул на клетку), вследствие чего она ранее ускользала от определения.

Полученный результат был впоследствии подтвержден другими авторами, применившими метод радиоактивных изотопов (найдена адсорбция около 750 молекул пенициллина на клетку) (4). Однако вопрос об адсорбции антибиотиков бактериальной клеткой и до сих пор еще не подвергся систематическому изучению, вследствие чего задачей настоящей работы являлось расширение полученного в этой области экспериментального материала; в частности, кроме пенициллина и стрептомицина, была впервые исследована группа полипептидно-белковых антибиотиков (грамицидин С, эритрин, лизоцим), обладающая, как оказалось, резко отличной величиной адсорбции.

Были взяты следующие препараты антибиотиков: пенициллин кристаллический (1650 ед/мг); стрептомицин-сульфат высокоочищенный (720 ед/мг); грамицидин С кристаллический с т. пл. 269° ; эритрин — порошкообразный препарат темнокрасного цвета *; лизоцим ** — электрофоретически однородный препарат.

В опытах были использованы следующие виды бактерий: золотистый стафилококк S. aug. 209, суточная культура ($6 \cdot 10^8$ /мл) — в опытах со

* От проф. Л. М. Якобсон (5).

** От проф. З. В. Ермольевой.

всеми испытанными антибиотиками; полученный из него путем многократного пересева (К. И. Германова, ВНИИА) резистентный штамм S₄, устойчивый к концентрации стрептомицина 10 тыс. ед/мл — в опытах со стрептомицином; штаммы *Proteus vulg.* 3307 и 4636, устойчивые к 500 ед/мл пенициллина (без образования пенициллиназы) — в опытах с пенициллином и эритроном; штамм *B. coli* 848 — резистентный к эритроину.

Измерения адсорбции пенициллина бактериями производились при помощи ранее описанной методики (3). В опытах со стрептомицином применялась микроанометрическая методика, специально разработанная для подобных измерений (6) и позволяющая определять стрептомицин при концентрации всего около 0,005—0,05 γ/мл с относительной точностью ±4%.

Вследствие отсутствия пригодной методики количественные измерения адсорбции стрептомицина бактериями до сих пор в литературе отсутствовали.

В типичном опыте 3 л суточной культуры *S. aur.* 209 концентрировались в 500 раз методом повторного центрифугирования и промывки фосфатным буфером (рН 7,4). В полученные 6 мл бактериальной суспензии вводился стрептомицин (0,25 γ/мл). Смесь выдерживалась в термостате при 37° 30 мин. (было проверено, что этого времени вполне достаточно для достижения адсорбционного равновесия), затем производилось центрифугирование (5 мин. при 8000 об/мин) и в центрифугате непосредственно или после разбавления определялось микроанометрическим методом изменение содержания стрептомицина. Аналогично проводились также опыты по измерению адсорбции полипептидно-белковых антибиотиков (граммицидин С, эритроина, лизоцима), но ввиду их более высокой адсорбируемости сгущение бактериальной суспензии производилось лишь в 10 раз, концентрация антибиотика составляла 80—100 γ/мл, а изменение концентрации в центрифугате определялось методом биологического титрования (граммицидин С — по *S. aur.* 209, эритроин — по *B. brevis*, лизоцим — по *M. lysodeict.*). Различие в опыте и контроле составляло не менее 5—6 пробирок ряда, что обеспечивало достаточную точность отсчета. Величина связывания антибиотика выражалась в виде отношения поглощенного количества антибиотика (в весовых единицах) к рассчитанному общему весу сухой бактериальной массы) (3).

Все опыты были повторены по 3—4 раза с хорошо совпадающими результатами. Одновременно во всех опытах ставились контроли с замедленной бактериальной суспензии буферным раствором. Результаты произведенных измерений сведены в табл. 1.

Таблица 1

№№ п/п.	Антибиотик	Вид бактерий	Чувствительность штамма	Величина связывания
1	Пенициллин	<i>S. aur.</i> 209	Чувств.	$1,56 \cdot 10^{-6}$
2	"	<i>Proteus vulg.</i> 3307	Резист.	$1,61 \cdot 10^{-6}$
3	Стрептомицин	<i>S. aur.</i> 209	Чувств.	$2,2 \cdot 10^{-6}$
4	"	<i>S. aur.</i> S ₄	Резист.	$2,3 \cdot 10^{-6}$
5	Граммидин С	<i>S. aur.</i> 209	Чувств.	$4,0 \cdot 10^{-2}$
6	"	<i>Proteus vulg.</i> 4636	Резист.	$8,0 \cdot 10^{-2}$
7	Эритроин	<i>S. aur.</i> 209	Чувств.	$5,5 \cdot 10^{-2}$
8	"	<i>B. coli</i> 848	Резист.	$5,8 \cdot 10^{-2}$
9	Лизоцим	<i>S. aur.</i> 209	Чувств.	$10-14 \cdot 10^{-3}$

Из табл. 1 следует общий вывод, что связывание антибиотиков чувствительными и резистентными штаммами одинаково и что, следовательно, устойчивость штаммов не зависит от величины адсорбции. Это показывает, что число центров связывания антибиотика и их активность

остаются сравнительно постоянными при развитии резистентности (ср. особенно №№ 3 и 4 в табл. 1) и что различия в устойчивости бактерий обусловлены последующими звеньями процесса действия антибиотика на клетку, прежде всего, вероятно, различиями в биохимических свойствах штаммов (7).

Однако, как уже указывалось, это обстоятельство не уменьшает значения факта связывания антибиотика как необходимого первого звена действия антибиотика. С этой точки зрения в табл. 1 можно выделить две основные группы антибиотиков: 1) пенициллин и стрептомицин, связывание которых чрезвычайно невелико, порядка $2 \cdot 10^{-6}$, или 0,0002% от веса бактерий, и 2) остальные испытанные антибиотики пептидной природы, у которых величина связывания достигает $5-10 \cdot 10^{-2}$, или 5—10% от веса бактерий. Низкая величина связывания антибиотиков первой группы совместима только с их действием на ферменты бактериальной клетки (3), тогда как для второй группы антибиотиков необходимо считаться и с другими возможностями, вплоть до прямой блокировки значительной части поверхности (порядка 15—20%) клетки.

Несомненный интерес представляют также данные о связывании антибиотиков различными простыми и сложными белками, что имеет значение, в частности, для вопросов распределения антибиотиков в организме, инактивирующего действия сыворотки и др. В отношении пенициллина этот вопрос исследовался в ряде работ (8), тогда как для стрептомицина и других антибиотиков он еще крайне мало изучен.

В настоящей работе мы исследовали методом равновесного анализа (через целлофановую мембрану, 4 суток при 0°) связывание стрептомицина рядом белков — серумальбумином человека (4,76%), серумглобулином человека (2,8%) и белками, выделенными экстрагированием 0,9% NaCl и осаждением насыщенным $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ из растертого мицелля — продуцента стрептомицина с последующим диализом (2,3%), а также нуклеопротеидом мицелля, выделенным 0,2 NaOH с центрифугированием и последующим диализом (0,5%). Все опыты по равновесному диализу проводились на фосфатном буфере (рН 6,8, M/15). Контрольные опыты проводились аналогичным образом, но без белка. Кроме того, тем же методом было измерено связывание пенициллина серумальбумином человека (4,76%). Было найдено, что связывание пенициллина составляет 0,16% от веса белка, т. е. менее 1 молекулы антибиотика на молекулу белка, тогда как связывание стрептомицина белками оказалось совершенно незначительным. С другой стороны, связывание стрептомицина нуклеопротеидом составляет около 1,4%, что, несомненно, является результатом реакции стрептомицина с остатками нуклеиновых кислот (9). Возможно, что именно нуклеиновые кислоты связывают стрептомицин на поверхности бактерий, что согласуется и с данными электрофоретических измерений (9).

Всесоюзный научно-исследовательский
институт антибиотиков

Поступило
26 XI 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ S. Waksman, Microbial antagonism and antibiotic substances, N. Y., 1945, p. 205. ² W. E. Herrell, Penicillin and other antibiotic agents, Philad., 1946, p. 35.
³ А. Г. Пасынский, Т. Л. Касторская, Биохимия, 12, 465 (1947).
⁴ E. Maas, M. Johnson, J. Bacter., 57, 415 (1949); M. Pollack, Brit. J. Exp. Pathol., 32, 387 (1951); J. Gen. Microbiol., 8, 186 (1953). ⁵ Л. М. Яковсон, А. С. Конилова и др., Тр. ВНИИА, 1, 151 (1953). ⁶ А. М. Неймарк, Вопросы мед. хим., 3, 102 (1951). ⁷ К. И. Германова, М. М. Левитов, Антибиотики, № 7, 5 (1948). ⁸ Е. Абрагам, Сборн. Антибиотики, ИЛ, 1951, стр. 148. ⁹ А. Р. Марсо, Сборн. Антибиотики, № 5 (31), 120 (1952); K. Mc Quilpen, там же, № 5 (31), 151 (1952).