

МИКРОБИОЛОГИЯ

Член-корреспондент АН СССР В. Л. РЫЖКОВ, член-корреспондент АН СССР
М. И. КАБАЧНИК, Л. М. ТАРАСЕВИЧ, Т. Я. МЕДВЕДЬ, Н. А. ЗЕЙТЛЕНКО,
Н. К. МАРЧЕНКО, В. А. ВАГЖАНОВА, Е. Ф. УЛАНОВА и Н. В. ЧЕБУРКИНА

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ α -АМИНОФОСФИНОВЫХ
КИСЛОТ**

Существует значительное число работ, показавших, что различные аналоги природных аминокислот обладают способностью подавлять размножение бактерий и вирусов (¹). Фосфиновые аналоги этих аминокислот (², ³) еще никем не были испытаны в отношении их биологической активности, а между тем они представляют особый интерес. Примером α -аминофосфиновых кислот может служить аминометилфосфиновая кислота, являющаяся аналогом гликокола $\text{NH}_2 - \text{CH}_2 - \text{PO}(\text{OH})_2$.

В отличие от гликокола, на месте карбоксильной группы в этом соединении имеется остаток фосфорной кислоты. Вопрос о поведении этого соединения в организме представляет особый интерес уже по одному тому, что построенное по образцу естественной аминокислоты оно содержит такие необходимые для организма группировки, как аминогруппа и остаток фосфорной кислоты, однако в сочетании, совершенно необычном для организма. В соединении имеется связь углерода с фосфором, неизвестная в веществах биологического происхождения. Именно эти своеобразные особенности рассматриваемой группы соединений и побудили нас испытать их влияние на размножение вирусов и на организмы, в которых эти вирусы паразитируют.

Опыты по влиянию названной группы соединений на рост молочнокислого стрептококка и его фаголизис, проведенные обычным способом (⁴), не обнаружили способности у аминометилфосфиновой кислоты (1:1000) и других аминофосфиновых кислот подавлять размножение этой бактерии и фаголизис. Известно, что некоторые аминокислоты подавляют фаголизис молочнокислого стрептококка и что этот эффект снимается соединениями, содержащими лабильную метильную группу, например бетаином (⁴). Мы воспользовались фосфонбетаином, являющимся фосфиновым аналогом бетаина (⁵), с целью выяснить, может ли быть использована бактерией метильная группа этого соединения, так же как она использует метильную группу бетаина. Ответ получился отрицательный. Фосфонбетаин не снимал подавления фаголизиса, вызванного глутаминовой кислотой.

Влияние названной группы соединений на размножение клеток изучалось на корешках табака, для чего едва начавшие прорастать семена табака помещались на фильтровальной бумаге в чашках Петри в доведенные до pH около 6,8 растворы аминофосфиновых кислот, а контрольные проростки — в воду. В каждом опыте участвовало 50 проростков, причем влияние фосфиновых кислот учитывалось путем измерения длины корешков. Следует отметить, что естественные аминокислоты весьма токсичны для корешков табака. Корешки проростков в гликоколе (1:1000) имели только 12,5% длины контрольных. Точно такой же эффект имела аминометилфосфиновая кислота, причем в ее растворах очень плохо шло развитие табачных растений: из 50 семян только 12 дали вышедшие из кожуры семядоли. В опыте с комбинацией гликокола и аминофосфиновой кислоты не наблюдалось ни усиления, ни нейтрализации каждого из ком-

понентов. Длина корешков в опыте имела 12,5% длины контрольных корешков. Аминоизопропил-, аминоизобутил-, аминоизоамил- и аминоизогексилфосфиновые кислоты обладали менее выраженным подавляющим эффектом на рост корешков.

Влияние аминокосфиновых кислот на размножение вируса мозаичной болезни табака изучалось как методом подавления, так и методом накопления (6). Ни одно из названных соединений не оказывало заметного влияния на развитие некротической реакции на листьях *Nicotiana glutinosa* под влиянием вируса мозаичной болезни табака. Данные о

Таблица 1

Влияние аминокосфиновых кислот и гликокола на размножение вируса мозаичной болезни табака (титр вируса выражен в числе некрозов на 20 половинок листьев *Nicotiana glutinosa*)

Вещество	Титр вируса		Опыт в % к контролю
	контроль	опыт	
Аминометилфосфиновая к-та	689	366	53
Аминоизопропилфосфиновая к-та	714	290	39
То же	907	565	61
Аминоизобутилфосфиновая к-та	354	396	111
То же	1118	909	89
Аминоизоамилфосфиновая к-та	1042	691	65
То же	187	103	55
Аминоизогексилфосфиновая к-та	324	197	60
То же	665	505	76
Гликокол	549	269	49

влиянии аминокосфиновых кислот на размножение названного вируса в листьях табака приведены в табл. 1. Из этой таблицы видно, что эффект аминокосфиновых кислот в данном случае очень незначителен. Известно, что естественные аминокислоты могут в разной степени подавлять размножение вируса мозаичной болезни табака (7). Если сравнить это подавление с эффектом аминокосфиновых кислот, то окажется, что этот последний менее выражен, чем эффект многих естественных аминокислот. Подавление аминометилфосфиновой кислотой было примерно того же порядка, что и подав-

ление размножения вируса мозаичной болезни табака гликоколом.

Довольно подробно изучалось действие аминокосфиновых кислот на развитие шелкопряда и вируса желтухи, поражающего это насекомое.

Аналог гликокола — аминометилфосфиновая кислота — представляла особый интерес, так как гликоколом чрезвычайно богат шелк, вырабатываемый шелкоотделительной железой личинок шелкопряда. Возникал вопрос, будет ли это соединение препятствовать образованию кокона и будет ли оно входить в состав шелка. Что касается вируса желтухи, то он содержит около 6,8% гликокола (8). Гусеницы с первого дня третьего возраста кормились листьями шелковицы, смоченными в растворе аминометилфосфиновой кислоты (1:1000). В опыте и контроле всегда было по 50 гусениц здоровых и по 50 гусениц зараженных. Эти последние заражались в первый день четвертого возраста желтухой. В этом опыте из 50 зараженных контрольных гусениц заболело желтухой 36, а из зараженных, получавших аминометилфосфиновую кислоту, заболело 24. В другом опыте в контроле заболело 34 гусеницы, а в опыте, где гусеницы получали в 10 раз меньшее количество аминокосфиновой кислоты (1:10 000), заболело 26 гусениц. Эти данные не позволяют говорить о подавлении аминокосфиновой кислотой желтухи, так как цифры слишком незначительны. Определение титра внутриядерных специфичных для желтухи включений-полиэдров у опытных и контрольных гусениц не обнаружило статистически достоверных различий. В контроле было на единицу веса гусеницы $5,6 \cdot 10^6$ полиэдров, а в опыте $7,5 \cdot 10^6$ полиэдров. В этих опытах $l = 1,7$, т. е. различие недостоверно. В табл. 2 приведены данные о различных формах фосфора в гусеницах пятого возраста, как получавших амина-

метилфосфиновую кислоту, так и контрольных. Формы фосфора фракционировались и определялись так, как это было описано ранее ⁽⁹⁾. Тимонуклеиновая кислота определялась колориметрически по реакции с дифениламином ⁽¹⁰⁾. Из табл. 2 видно, что в контроле между больными и здоровыми гусеницами существуют различия, уже установленные ранее. Эти различия у гусениц, получавших аминометилфосфиновую кислоту, имеют некоторую тенденцию нивелироваться.

Аминометилфосфиновая кислота в концентрации 1:1000 не влияла сколько-нибудь существенно на развитие гусениц и на их вес. Подопытные

гусеницы нормально развились коконы, не отличавшиеся по весу от коконов контрольных. В шелке коконов обнаружено как в опыте, так и в контроле только 0,016% фосфора. Из этих данных видно, что аминометилфосфиновая кислота не играет роли антиметаболита для шелкопряда и вируса желтухи. Было испытано также действие других аминифосфиновых кислот. Смачивание листьев их растворами 1:10 000 не влияло существенно на вес гусениц. Только аминогексилфосфиновая кислота несколько задержала сроки линьки гусениц. Содержание фосфора в контроле и опыте существенно не меняется. Данные о влиянии на желтуху нуждаются в дальнейшей проверке.

Влияние на размножение вируса гриппа изучалось на развивающихся куриных эмбрионах, причем соответствующие соединения вводились в хориоаллантоисную полость эмбриона спустя 30—60 мин. после введения вируса. Титр вируса определялся в аллантоисной жидкости по реакции гемагглютинации через 48 час. после заражения. Этот титр выражен в единицах, указывающих во сколько раз может быть разведен вирус без утраты им способности вызывать гемагглютинацию. Для сравнения были поставлены также опыты с влиянием гликокола (см. табл. 3). Колебания титров вируса во всех опытах лежат в пределах ошибки.

Обращает на себя внимание, что имеющиеся в литературе данные о способности гликокола подавлять размножения вируса гриппа ⁽¹¹⁾ не получают подтверждения. Это связано, очевидно, с тем, что, как известно, данные от опыта к опыту подвержены значительным колебаниям и во многих публикуемых сообщениях приводимые цифры носят случайный характер. Только очень мощные ингибиторы вируса дают более постоянный результат. Гликокол, очевидно, не принадлежит к их числу.

Хотя имеющаяся в испытанных нами соединениях связь углерода с фосфором и не встречается в продуктах биологического происхождения, была сделана попытка выяснить, не обладает ли все же организм способностью разрывать эту связь. С этой целью аминометилфосфиновая и аминобензилфосфиновая кислоты инкубировались при 37° в течение 1,5 часа и 24 час. с кашицей печени, почек мышей и корней моркови. Ставилось 2 серии опытов — при pH 5,3 и при pH 8,6. Опыты сопровождало 2 контроля. В первом из них фермент инактивировался кипячением, а во втором каша инкубировалась без добавления фосфиновых кислот. Во втором контроле наблюдался некоторый прирост минерального фосфора за счет

Таблица 2

Формы фосфора у гусениц шелкопряда здоровых и больных желтухой при кормлении их аминометилфосфиновой кислотой (в % на сух. вес)

Форма фосфора	Контроль		Опыт	
	здоровые	больные	здоровые	больные
Общий	0,73	1,03	0,96	0,86
Кислотно-растворимый минеральный	0,19	0,25	0,21	0,19
Кислотно-растворимый органический	0,19	0,22	0,20	0,29
Белковый и нуклеиновых кислот суммарно	0,18	0,18	0,21	0,22
Тимонуклеиновой кислоты	0,05	0,07	0,05	0,06

отщепления его от соединений, имеющих в кашице. В опыте с фосфиновыми кислотами и кашицей печени и почек наблюдался такой же прирост минерального фосфора, как и во втором контроле. В одном опыте с морковью при рН 8,6 наблюдался небольшой прирост минерального фосфора в кашице с бензилфосфиновой кислотой по сравнению с вторым контролем, лежащий в пределах ошибки. Таким образом, не обнаружено способности автолизатов печени, почек и корней моркови отщеплять фосфорную кислоту от аминокислот.

Таблица 3

Влияние аминокислот и гликокола на титр вируса гриппа А в развивающихся куриных эмбрионах

Вещество и концентрация (в мг на эмбрион)	Гибель эмбрионов *	Средний геометрич. титр РГА **	
		опыт	контроль
Аминометилфосфиновая к-та 0,25 . . .	0	295	354
" 1,0 . . .	2/21	955	1349
Аминобензилфосфиновая к-та 1,0 . . .	0	1072	1349
" 10,0 . . .	11/30	117	199
Гликокол 0,25	3/24	324	275
" 1,0	1/24	195	275
" 10,0	3/24	339	355

* В числителе приведены данные о гибели эмбрионов, в знаменателе — общее число эмбрионов в опыте. Числитель выражает превышение гибели эмбрионов в опыте по сравнению с контролем.

** РГА — реакция гемагглютинации.

Подводя некоторые итоги, можно отметить, что аминокислоты обладают известной биологической активностью. В значительных концентрациях они токсичны, что видно из задержки развития шелкопряда и гибели эмбрионов при больших концентрациях аминокислот. Их биологическая активность также выражается в задержке размножения вируса мозаичной болезни табака, в подавлении роста корешков табака и т. д. Согласно полученным данным, изученные нами аминокислоты по отношению к испытанным объектам не проявили свойств биологических аналогов естественных аминокислот. Не удалось показать, чтобы аминокислоты в организме «конкурировали» с естественными аминокислотами, даже там, где этого было особенно легко ожидать, например при образовании шелка шелкопрядом. Это поднимает очень сложный вопрос о том, почему одно вещество ведет себя как антиметаболит, а другое — нет.

Институт вирусологии им. Д. И. Ивановского
Академии медицинских наук СССР и
Институт элементоорганических соединений
Академии наук СССР

Поступило
7 VII 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ K. Dittmar, Ann. New York Ac. Sci., 8, 1274 (1952).
- ² М. И. Кабачник, Т. Я. Медведь, ДАН, 83, № 5 (1952).
- ³ Т. Я. Медведь, М. И. Кабачник, ДАН, 84, № 4 (1952).
- ⁴ В. Л. Рыжков, Н. К. Марченко, ДАН, 91, № 6 (1953).
- ⁵ Т. Я. Медведь, М. И. Кабачник, Изв. АН СССР, ОХН, 5 (1951).
- ⁶ В. Л. Рыжков, В. А. Смирнова, О. С. Городская, Биохимия, 11, № 3 (1948).
- ⁷ В. Л. Рыжков, ДАН, 80, № 4 (1951).
- ⁸ G. Bergold, Advances in Virus Research, 1, 91 (1953).
- ⁹ Л. М. Тарасевич, Биохимия, 17, № 3 (1952).
- ¹⁰ Z. Dische, Microchem., 8, 4 (1930).
- ¹¹ C. Happon, C. R., 235, 21 (1952).