О ДЕЙСТВУЮЩИХ НАЧАЛАХ БИОСТИМУЛЯТОРОВ

(Сообщение 1)

Профессор П. Е. РАДКЕВИЧ,
кандидат ветеринарных наук В. П. РАДЧЕНКОВ,
кандидат биологических наук И. А. БУРКОВ,
мл. научный сотрудник С. П. РОГОЖИН,
ст. лаборанты Н. А. ЗОРГЕНФРЕЙ, Т. М. ТРУЖНИКОВА

До настоящего времени окончательно не выяснены действующие начала тканевых препаратов и их химическая природа.

Академик В. П. Филатов и его школа объясняют биологическую активность (стимулирующую и лечебную) тканевых препаратов наличием образуемых в процессе переживания тканей биогенов, к которым относится ряд органических кислот, таких, как дикарбоновые жирного ряда (янтарная), дикарбоновые оксикислоты (яблочная, винная). Из аминокислот к биогенам относятся глутаминовая, аспарагиновая кислоты и другие соединения (Филатов, Благовещенский, Палладина, Гудина, Бархаш, Скородинская, Шевелева, Сысоев и др.).

Однако некоторые авторы считают, что действующими началами биостимуляторов являются продукты гидролиза, деструкции, протеолиза тканей (Тушнов, Беленький, Мозгов и др.).

В 1964 году нами проводились частичные исследования по выяснению действующих начал тканевой эмульсии, приготовленной из селезенки крупного рогатого скота по методу академика В. П. Филатова.

МЕТОДИКА И РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В лаборатории были приготовлены эмульсии из селезенки крупного рогатого скота (в марте — 3-я серия, в июне и июле— 5 и 4-я серии). Для выяснения значения сроков консервации в накоплении биогенов из селезенок были приготовлены следующие эмульсии: неконсервированная, консервированная при температуре 2—4°С в течение 6 и 12 дней, эмульсия из селезенки, находившейся в замороженном состоянии в течение 12 дней.

Эмульсии испытывали на безвредность, стерильность и активность. Активность определяли подсчетом количества дрожжевых клеток. Для этого в несколько пробирок (не менее четырех на каждый препарат) наливали по 3 *мл* питательной среды, состоящей из 100 *мл* дистиллированной воды, 0,2 *г* фосфата аммония, 0,01 *г* хлорида калия и 10 *г* глюкозы, и по 1 *мл* дрожжевой взвеси. Дрожжевую взвесь приготовляли следующим образом. Брали 0,2 *г* сухих пекарских дрожжей, растворяли их в 15 *мл* дистиллированной воды и оставляли в покое на 1 минуту для осаждения, после чего жидкость сливали в другую пробирку, а осадок выбрасывали. Содержимое пробирок хорошо перемешивали, закрывали ватной пробкой и оставляли на 24 часа при температуре 18—20°С.

В две пробирки с полученной взвесью добавляли по 1 *мл* исследуемого препарата (эмульсии, фугата, диализата и т. д.), а в две другие пробирки — по 1 *мл* дистиллированной воды (контроль). Содержимое пробирок хорошо перемешивали (встряхиванием) и оставляли на 24 часа при указанной температуре. Далее во все пробирки, за исключением пробирок, из которых брали пробы для определения гликолиза на аппарате Варбурга, для прекращения роста дрожжей вносили незначительное количество (на кончике скальпеля) хлорида натрия («гасили»).

Содержимое каждой испытуемой пробирки разводили водой в соотношении 1 : 20. Если показатели прибора выше его градуировки, то проводили дальнейшее разведение до соотношения 1 : 40, 1 : 80 и т. д. подкрашивали двумя каплями фуксина Циля. Затем брали пробы для исследования на активность. Активность эмульсии, как и ее фракций, определяли путем подсчета числа дрожжевых клеток в камере Горяева и эритрогемометром в модификации лаборатории.

Подсчет количества дрожжевых клеток производили по формуле:

$$X = \frac{Э \times Р}{700}, \text{ где}$$

X — количество дрожжевых клеток в 1 $мм^3$ неразведенного рабочего раствора,

Э — показания эритрогемометра по шкале «эритроциты», в млн.,

Р — степень разведения,

700 — поправка на шкалу эритрогемометра и степень разведения (Бурков, Кочергин, Рогожин).

Активность определяли также и фотоэлектроколориметром в модификации лаборатории. Спустя 30 минут после того как пробы «погашены», содержимое пробирок разводили дистиллированной водой с таким расчетом, чтобы конечное разведение

явилось 1 : 40. Фотометрирование проводили с зеленым светофильтром в кювете на 3 *мл*. С целью исключения влияния оптической плотности при определении интенсивности роста дрожжей испытуемого препарата определяли оптическую плотность не только контрольных проб, но и каждого из изучаемых образцов препарата. Для этого фотометрировали изучаемый образец препарата в разведении 1 : 40.

Величину биологической активности препарата определяли по формуле:

$$X\ \% = \frac{а - в}{к},\ \text{где}$$

а — показатель экстинкции дрожжей культуры опытных пробирок,

в — показатель экстинкции образца исследуемого препарата,

к — показатель экстинкции контрольной пробы.

Сравнимые результаты в различных пробах получали путем выражения степени биологической активности в процентах по отношению к экстинкции контрольных проб (к), которая всегда принималась за 100 (Радченков).

Для более полного выяснения биологической активности стимулятора ее определяли в аппарате Варбурга для установления гликолитической активности дрожжевых клеток.

Гликолиз дрожжей изучали манометрическим методом в аппарате Варбурга. Результаты брожения определяли по увеличению объема газа в сосудиках за счет выделения CO_2. Анаэробиз достигался неподвижностью сосудов в ванне аппарата.

Таблица 1

Результаты определения активности эмульсии, приготовленной из селезенки 6-дневной консервации (3-я серия)

Дата исследования	Гликолиз в % к контролю	Количество дрожжевых клеток в % к контролю	
		эритрогемометр	ФЭК
15/V	406	261	200
28/V	494	323	130
25/VI	149	181	158
9/VII	435	129	188
18/VII	124	298	278
В среднем	323	230	198

Как видно из таблицы 1, стимуляция роста числа дрожжевых клеток в большинстве случаев была слабее стимуляции гликолитических процессов. Интенсивность гликолиза, видимо, зависит не только от числа клеток, но и от их физиологического состояния. В целом можно видеть, что активность указанной

эмульсии была определенной и по отношению к контролю в среднем равнялась 200%. Примерно такая же активность была и у эмульсии 4 и 5-й серий приготовления, которая определялась эритрогемометром и ФЭКом.

При проверке биологической активности эмульсии (серия 3) на восьми кроликах путем подкожного ее введения в дозе 0,1 *мл* на 1 *кг* веса через 7 дней количество эритроцитов по сравнению с контролем повысилось на 7%, а гемоглобина на 9%.

При испытании эмульсии серии 5 на кроликах ее активность была несколько меньшей.

Таблица 2

Активность эмульсии по дрожжевому тесту, разных сроков консервирования селезенки

Эмульсия (фильтрат)	Количество исследований	В % к контролю	
		микроскоп	эритрогемометр
Свежеприготовленная	4	163,7	196,4
-дневной консервации	4	210,5	275,3
2-дневной консервации	3	157,7	196,8
2-дневного замораживания	2	166,5	198,3
Контроль (физраствор)	4	100,0	100,0

Из таблицы 2 видно, что несколько большую, примерно на 25%, активность показала эмульсия из селезенки 6-дневной консервации по сравнению с неконсервированной, 12-дневной консервации и 12-дневного замораживания, активность которых была близка между собой.

Указанные эмульсии подвергались исследованию на наличие РНК, общего и остаточного азота. Данные этих исследований представлены в таблице 3.

Таблица 3

Содержание РНК, общего и остаточного азота в тканевых препаратах (мг%)

Наименование препаратов	Содержание фосфора РНК		Содержание общего азота		Содержание остаточного азота	
	серия 3	серия 5	серия 3	серия 5	серия 3	серия 5
Эмульсия из селезенки 6-дневной консервации	10,51	10,37	630	700	238	—
Эмульсия из селезенки 12-дневной консервации	11,22	—	595	—	308	—
Эмульсия из селезенки неконсервированной	11,36	—	595	—	163	—
Эмульсия из замороженной селезенки	13,18	—	560	—	205	—
Фугат из селезенки 6-дневной консервации (центрифуг. при 3 тыс. *об/мин*)	—	11,50	—	493	—	291

Из таблицы 3 следует, что по содержанию фосфора РНК тканевые препараты, независимо от условий и сроков консервации, были примерно одинаковыми, хотя в эмульсии, полученной из замороженной селезенки, и в фугате из эмульсии селезенки 6-дневной консервации (фугат 3 тыс. *об/мин*) фосфора РНК содержалось несколько больше.

По содержанию общего азота тканевые препараты существенной разницы не имели; количество остаточного азота в эмульсии из неконсервированной (свежей) селезенки было значительно меньше в сравнении с другими препаратами. Фугат имел наиболее низкие показатели общего азота.

В дальнейшем выяснение действующих начал проводилось только в эмульсии из селезенки 6-дневной консервации (3 и 5-й серии).

Эмульсию центрифугировали при 3 и 16 тыс. *об/мин*, осадок (крошки) трижды с помощью магнитной мешалки промывали дистиллированной водой. Центрифугат (фугат) освобождали от белка путем осаждения спиртом, а затем ацетоном в объеме, равном взятому фугату, с последующим выпариванием осадителя. Фугат до и после осаждения белка подвергали диализу. Всего проведено 10 диализов и приготовлено из фугатов и цельной эмульсии 650 *мл* диализатов.

Диализ вели в течение 2, 4, 7 и 10 суток при температуре 1—2°. В целлофановые мешочки, которые погружали в дистиллированную воду в объеме 50—100 *мл*, помещали по 40—50 *мл* эмульсии. Каждую порцию диализата сливали отдельно и проверяли реакциями на наличие белка, хлоридов и аминокислот. Когда в последней порции диализата реакция на наличие аминокислот оказывалась отрицательной, диализ считали законченным. Диализаты сливали один раз в сутки. Затем все диализаты сливали вместе и выпаривали на водяной бане до объема эмульсии, взятой для диализа. Из диализатов приготовляли разведения нужной концентрации. Реакция на белок во всех порциях диализатов была отрицательной.

Разгонку диализатов эмульсии производили электрофорезом в веронал-ацетатном буфере pH-8,6 в течение 9 часов. Часть полос фореграмм подвергли окрашиванию амидошварцем с целью выяснения возможности наличия белков. Полосы оставались неокрашенными, что свидетельствовало об отсутствии белка. Вторую часть полос окрашивали нингидрином (как хроматограммы), при этом проявлялись три интенсивно окрашенные полосы: в центре основная яркая полоса, у положительного полюса — полоса, окрашенная в два цвета (розовый и фиолетовый); у отрицательного полюса — полоса розового цвета. Это свидетельствовало о наличии в диализате аминокислот и, видимо, низкомолекулярных полипептидов. В последующем диализаты без гидролиза были подвергнуты хроматографической

разгонке с целью выяснения состава свободных аминокислот, вышедших в диализат. Установлено наличие в диализате цистина, лизина, гистидина, аргинина, аспарагиновой кислоты, серина, глицина, глутаминовой кислоты, треонина, аланина, тирозина, метионина, валина, фенилаланина, лейцина, изолейцина, норлейцина. Фильтрат эмульсии подвергали перегонке (дистилляции) и проверяли дистиллят и содержимое колбы на биологическую активность дрожжевым тестом.

С целью выяснения наличия органических (карбоновых и дикарбоновых) кислот в тканевых препаратах, эмульсия (серия 5) подверглась обработке Н-трибутилфосфатом по методике Педжела и др. (1956) в модификации лаборатории (С. П. Рогожин), которая заключалась в следующем: титрование щелочью проводилось не водного, а верхнего слоя фугата, обработанного Н-трибутилфосфатом, то есть с экстрагированием в этот слой органических кислот. Титрование шло в среде спирта в соотношении 3 : 5. Результаты исследования (титрования) представлены в таблице 4

Таблица 4

Содержание дикарбоновых кислот в исследуемых препаратах

Препараты	Число исследованных проб	Концентрация NaOH	Количество NaOH в *мл*, пошедшее на титрование	
			до сохранения порозовения 30 секунд	до сохранения порозовения 2 минуты
Эмульсия (фильтрат) серия № 5 . .	18	0,025н.	0,87	1,3
Н-трибутилфосфат	5	»	—	0,6
Контроль (бидистиллят)	5	»	0,35	0,6

Данные таблицы 4 свидетельствуют о наличии в эмульсии карбоновых и дикарбоновых кислот.

Изучаемую эмульсию и ее фракции проверяли на биологическую активность путем подсчета дрожжевых клеток (главным образом эритрогемометром, ФЭКом и частично микроскопией и нефелометром) и гликолизом. Результаты исследований представлены в таблице 5.

Как видно из таблицы 5, биологической активности не проявили осадок после центрифугирования цельной эмульсии, то есть денатурированные белки ткани, так называемые «крошки», дистиллят эмульсии, осадок (белок) после центрифугирования неосажденного фугата при 16 тыс. оборотов в минуту. Осадок фугата (осажденного спиртом и ацетоном) проявил незначительную активность, равно как и содержимое целлофанового мешочка после диализа неосажденного фугата. Наибольшую активность проявила цельная эмульсия и неосажденный фугат.

Таблица 5

Активность препаратов

Эмульсия и ее фракции	Серия	Число исследований	В % к контролю		
			эритрогемометр	ФЭК	гликолиз
Эмульсия цельная	3 и 4	10	228	201	342
Фугат неосажденный	3, 4, 5	16	189	219	372
Фугат осажденный	3, 4, 5	8	153	170	294
Осадок после центрифугирования (крошки)	3, 4, 5	7	129	85	93
Осадок после центрифугирования неосажденного фугата (16 тыс. *об/мин*)	3, 5, 4	2	105	118	102
Белок фугата, осажденного спиртом и эфиром	3, 4, 5	2	120	121	121
Дистиллят эмульсии	3	4	106	106	85
Содержимое колбы после дистилляции	3	3	193	203	292
Диализат эмульсии	3	6	158	172	396
Содержимое целлофанового мешочка после диализа	3	4	110	64	124
Диализат неосажденного фугата при 3 тыс. *об/мин*	3	6	165	260	265
Содержимое целлофанового мешочка после диализа неосажденного фугата	3	6	130	129	109
Диализат осажденного фугата	3	7	136	159	299
Содержимое целлофанового мешочка после диализа осажденного фугата	3	6	109	109	104
Физраствор (контроль)	—	10	100	100	100

Несколько меньшая активность отмечена у диализата, осажденного фугата и других фракций.

Можно предположить, что в дистилляте не было никаких летучих действующих начал. Характерно, что осадок центрифугата, так называемые «крошки», осажденные белки и осадок от центрифугирования при 16 и 3 тыс. *об/мин* содержимое целлофановых мешочков после диализа, где оставались все белки, по дрожжевому тесту не проявили активности.

Анализируя данные по влиянию тканевой селезеночной эмульсии, приготовленной по Филатову, и ее фракций на гликолиз дрожжей, можно сделать следующее заключение. По сравнению с контролем (берется за 100%) цельная эмульсия усиливает гликолиз дрожжевых клеток в 3—4 раза (300—400%). Фугат эмульсии при 3 и 16 тыс. *об/мин* обладает примерно такой же активностью. Иногда эта активность выражена несколько сильнее, чем у цельной эмульсии. Осадок фугата (при 16 тыс. *об/мин*) неактивен или слабо активен. Диализат цельной эмульсии или фугата обладает таким же примерно действием, как цельная эмульсия или фугат.

Содержимое целлофанового мешочка (диализного) в ряде проб не обладало активностью, а в ряде — показало слабую активность. Фугат после осаждения белков спиртом и ацетоном обладал в первых опытах несколько более слабым действием, нежели без осаждения (возможно, было неполное удаление осадителя), а в последующих опытах проявлял или равное действие или даже несколько более активное. Дистиллят (как цельной эмульсии, так и фугата) не обладал активностью. Диализат фугата после осаждения белков обладал одинаковым действием с цельной эмульсией, фугатом, диализатом (без осаждения белка) или в некоторых опытах более слабым.

Содержимое целлофанового мешочка после диализа (после предварительного осаждения белка) не обладало активностью или обладало ею в очень слабой степени. Содержимое колбы после дистилляции эмульсии обладало выраженным активизирующим гликолиз действием, равным примерно действию остальных активных фракций (фугату, диализату).

Поскольку наиболее выраженным активизирующим гликолиз действием обладают жидкие фракции (цельная эмульсия, фугат, диализат), можно сделать предположение, что химические вещества, стимулирующие гликолиз дрожжей, находятся в основном в жидкой части эмульсии. В плотной части эмульсии (осадок фугата, содержимое диализного мешочка) химических веществ, усиливающих гликолиз, содержится значительно меньше или они находятся в слабо реагентной форме, то есть в форме, препятствующей переходу их в раствор. Осадок или содержимое диализного мешочка представляет собой более

или менее крупные частицы клеток и тканей того органа, из которого готовился препарат.

Гликолиз клеток под действием тканевых препаратов обычно коррелирует с усиленным размножением дрожжевых клеток — накоплением дрожжевой массы в питательной среде. Эти два процесса, видимо, тесно связаны между собой и объясняются тем, что размножение дрожжей сопровождается накоплением клеточной массы и гликолитические процессы в клетке значительно усиливаются. Усиленный рост (в процессе синтеза) требует и большого количества энергии, необходимой для осуществления указанных процессов. Эта энергия, по-видимому, и поставляется усиленными гликолитическими процессами.

Допуская, что дрожжевой тест как показатель размножения микробных клеток и гликолиз этих клеток не могут являться универсальными в смысле полного отражения активности стимуляторов на синтетические процессы клеток животного организма, нами проведено два опыта на молодых крысах с испытанием влияния на их рост и привесы изучаемых основных фракций тканевой эмульсии. Они вводились подкожно в двухпроцентном растворе, заготовленном впрок из расчета 0,1 *мл* эмульсии на 1 *кг* веса. Повторные введения делались через 7 дней на протяжении двух месяцев.

Испытывались эмульсии серии 3 и 5 и их нижеследующие фракции: цельная эмульсия в дозе 0,1 *мл/кг* веса и 0,2 *мл/кг* веса; осадок после центрифугирования (крошки); фугат эмульсии без осаждения белков; фугат после осаждения белков; диализат эмульсии; диализат фугата эмульсии после осаждения белка; содержимое целлофанового мешочка после диализа эмульсии; осадок (белок) после центрифугирования при 16 тыс. *об/мин* фугата эмульсии, полученного при 3 тыс. *об/мин*. Контролем служили: группа крыс, которым вводился физиологический раствор в дозе 0,1 *мл/кг* веса, группа крыс, которым вводилась взвесь толченого стекла как контроль к «крошкам», и группа, которой ничего не вводилось, проводилось только взвешивание.

Первый опыт поставлен на 90, второй — на 110 крысах. В первом опыте животные получали в рацион черный хлеб, молоко, овес, зеленую траву и рыбий жир. Во втором опыте крысы получали, кроме этого, сушеное мясо и мясокостную муку.

Как в первом, так и во втором опыте полученные результаты не дали ясной картины. Стимулирующего эффекта (в привесах) той или иной фракции, равно как и самой эмульсии, не получено. Предполагалось, что рацион для крыс в первом опыте был неполноценным по белку и это явилось причиной отсутствия дополнительных привесов к контролю. Однако во втором опыте для крыс по белку рацион был полноценным,

животным бесперебойно давали мясо и мясокостную муку, и тем не менее стимулирующего эффекта не отмечено, хотя в этом опыте интенсивность роста всех крыс была почти в два раза больше в сравнении с первым опытом.

Таблица 6

Показатели количества эритроцитов и гемоглобина в крови крыс (в % к контролю)

Препараты	23/IX-64		30/IX-64	
	гемоглобин	эритроциты	гемоглобин	эритроциты
Эмульсия цельная (0,1 *мл/кг*) . . .	113,4	104,9	98.9	96,3
Фугат неосажденный	104,6	110,8	95,9	96,9
Фугат осажденный	96,09	115,4	99,9	102,4
Осадок после центрифугирования (крошки)	106,4	109,2	95,02	111,6
Диализат цельной эмульсии	87,6	113,3	93,9	97,9
Содержимое мешочка	94,4	109.4	104,02	115,5
Физраствор (контроль)	100,0	100,0	100 0	100,0
Стекло	92,2	94,04	92,3	96,9
Группа, свободная от введения . . .	94,1	88,3	96,3	107,3
Эмульсия цельная (0,2 *мл/кг*) . . .	97,6	94,04	94,6	106,5
Диализат осажденного фугата . . .	102,06	107,8	106,06	106,1
Осадок (белки осажденного фугата)	101,7	95,4	100,59	108,1

Все же следует отметить некоторое увеличение количества эритроцитов и гемоглобина у стимулируемых крыс во втором опыте, что видно из таблицы 6. Даже через 7 дней после взятия крови из хвоста крыс у большинства групп стимулированных животных количество эритроцитов было больше, чем у контрольных.

Выводы

1. Консервация селезеночной ткани на холоде имела значение, хотя и не столь большое, в повышении активности приготовленного из нее препарата.

2. Является ли указанная активность результатом накопления биогенов переживаемой ткани или это продукты ее аутолиза, определить пока не представляется возможным. Невозможно в селезеночной ткани прервать окислительно-восстановительные и одновременно сохранить протеолитические процессы, как свидетельство чистого аутолиза.

3. В тканевой эмульсии не обнаружено летучих действующих веществ.

4. Белковая часть эмульсии не проявляла или очень слабо проявляла активность на дрожжевом тесте. Возможно, это объясняется несовершенством этого теста.

5. Биологический тест на крысах не дал четких результатов. Возможно, рацион не был сбалансирован по аминокислотному составу, микроэлементам и витаминам.

6. Полное разделение и отделение с помощью диализа белковой части эмульсии от безбелковой показывает, что по дрожжевому тесту в безбелковой части эмульсии активность сохраняется почти равной активности цельной эмульсии и ее фугата.

7. В безбелковой части (в диализате эмульсии) установлено суммарное наличие органических карбоновых и дикарбоновых кислот, наличие семнадцати указанных выше аминокислот.

На основании проведенного электрофореза фугата эмульсии можно предположить, что жидкая часть эмульсии содержит низкомолекулярные полипептиды.

Литература

Беленький Н. Г. Физиологическая стимуляция организма. Изд., 1959.

Благовещенский А. В. Биогенные стимуляторы и урожай. «Биология и медицина», 1962, серия VIII, № 1.

Мозгов И. Е. Сравнительная оценка стимулирующего влияния специфических и неспецифических сывороток Материалы межвузовской конференции по проблеме влияния биостимуляторов на организм животных и их применение в сельскохозяйственной практике. Ереван, 1963.

Палладина Л. И., Гудина А. М. Некоторые данные о природе биогенных стимуляторов. ДАН СССР, т. 87, № 2, 1952.

Сысоев А. Ф. Накопление органических кислот в консервированных на холоде тканях. Тканевая терапия. Укр. АН. Киев, 1953.

Тушнов М. П. Проблемы спермотоксинов и лизатов. Изд., 1936.

Филатов В. П Тканевая терапия. Изд, 1943.

Pagel Anal Chem, 22 1207, 1956.