

## METHODE ZUR HERSTELLUNG EINER BIOAKTIVEN SUBSTANZ AUS BLUTSERUM

Technisches Fachgebiet, zu dem die Erfindung gehört pdfulltext Die präsentierte Erfindung gehört zur Medizin und kann zur Gewinnung aus dem Blutserum einer aktiven Substanz verwendet werden, die sich bei einigen Erkrankungen und Störungen des menschlichen und tierischen Organismus als nützlich erweist (Hörvermögen, Geschlechtsaktivität, räumliches Gedächtnis etc.). Stand der Technik Weit bekannt sind Verfahren zur Gewinnung einer aktiven Substanz aus dem Blutserum, denen die Entnahme des Spenderblutes, die Inkubation sowie die Abscheidung mit anschließender Konservierung zugrunde liegen. Diese Verfahren setzen voraus die Gewinnung von Immuns Serum oder von Blutserum, das in Umgehung des Immunsystems wirkt, welches die Widerstandskraft des Organismus gegen solche exogene und endogene Faktoren erhöht wie atmosphärischer Druck, Temperatur, Schwerkraft, Licht u. dgl. sowie gegen Hunger, Durst, Schlaf- und Sexbedürfnis u. dgl. (Japans Patent Nr.2123287, EP 0542303A2, Russlands Patent Nr.2096041, Russlands Patent Nr.2120301). Im zweiten Falle erhält man das Serum vom Spender, der zuvor in einen bestimmten funktionalen Zustand gebracht wird; dabei werden, je nach der Einwirkungsart, Seren mit unterschiedlich gearteter biologischer Aktivität: myogen, somnogen, opthalmogen, audioaktiv, thermoaktiv, diätaktiv, sexaktiv, antihypoxisch, Antialkohol- und Antinikotin-. Die bemerkenswerte Besonderheit der Seren, die in den Quellen (1) beschrieben sind, ist deren absolute Unbedenklichkeit (keine Toxizität); wie die Autoren feststellen, gibt es für diese Seren keine Gegenindikationen. Relativer Nachteil der genannten Seren besteht darin, dass der Anwender - darunter auch der behandelnde Arzt - in der Regel nicht weiß, mit welcher konkreten Substanz er zu tun hat, und ihm somit die Entscheidung für die eine oder andere Behandlungskur zur Zustandskorrektur des jeweiligen Patienten schwer fällt. Das Anliegen der vorgestellten Erfindung war die Abscheidung einer neuen aktiven Substanz aus dem Blutserum, deren Identifizierung, d.h. Ermittlung von deren biologischer Aktivität, aber auch die Ermittlung der physikalisch-chemischen Eigenschaften, um dieses Produkt von anderen biologisch-aktiven Komponenten unterscheiden zu können, die aus dem Blutserum gewonnen wurden. Die andere Aufgabe der Erfindung bestand darin, das Spektrum jener Quellen zu erweitern, aus denen sich die aktive Substanz gewinnen lässt, und somit die Möglichkeit zu finden, das Endprodukt zu verbilligen. Eine weitere Aufgabe der Erfindung war die Entwicklung von praktisch anwendbaren Arzneimittelformen der aktiven Substanz. Eine zusätzliche Aufgabe der Erfindung war die Ermittlung der Dosisintervallen der aktiven Substanz, die für die Zustandskorrektur des Patienten nützlich sind. Kurzbeschreibung des Wesens der Erfindung Überraschend war, dass die Behandlung des Blutserums mit Gammastrahlen dazu führt, dass darin eine überaus aktive Substanz entsteht, die sich auf einige Funktionen des Organismus des Patienten positiv auswirken. Dies war um so mehr überraschend als bis dato laut der gängigen Meinung die ionisierende Strahlung von 25 kGy eine sterilisierende Dosis sei. Die genannte Dosis wird zur Sterilisation medizinischer Produkte in der Russischen Föderation empfohlen (Staatliche Pharmakopoe der UdSSR.// 1.Auflage. - Moskau, Medizin-Verlag. - 1990 - Ausgabe 2. - S.19-24). Zugleich war bekannt (Martynow W.A. u.a. Einfluss der Strahlensterilisation auf die physikalisch-

chemischen Eigenschaften der blutstillenden Gaze sowie auf die biochemische Aktivität der Proteinpräparate.//Radiazionnaya Medizina. Moskau, Verlag Atomisdat. 1972. Seiten 123-125; Gergely J., et. al. Studies of gamma-raz-irradiated human immunoglobulin G.//Radiosterilization of Medical Products,- 1967. - Vienna.- S. 115-124), dass das Blut und dessen Präparate sowie die Arzneimittel peptider Herkunft strahlenempfindlich und instabil sind und unter Einwirkung der ionisierenden Strahlen inaktiv werden. All das ließ nicht das Ergebnis erwarten, welches die Urheber der vorliegenden Erfindung bekommen haben. Es stellte sich heraus, dass wenn man venöses Blut der Tiere (insbesondere von Pferd und Mensch) oder arterielles Vogelblut im Laufe von etwa 24 Stunden unter niedrigen Temperaturen (ca. 4-8 °C) inkubiert und anschließend nach der Blutgerinnungselektrophorese und -abscheidung ein Serum gewinnt, lyophilisiert und mit ca. 10 bis 40 kGy bestrahlt, so lässt sich eine aktive Substanz S (1, 2, 3) gewinnen, die einige Aktivitäten aufweist (darauf wird weiter unten eingegangen), die sich bei ungünstigen Zuständen des Patienten (darauf wird weiter unten eingegangen) als nützlich erweisen. Laut Angaben der Massenspektrometrie entstehen in den Blutseren als Ergebnis der Behandlung Peptidenfraktionen, die zuvor im nativen Serum nicht nachzuweisen waren, wobei - je nach der Serumsart - die Eigenschaften der Peptide stark differieren. Somit war das Ziel der vorliegenden Erfindung die Entwicklung eines neuen Verfahrens zur Gewinnung biologisch aktiver Substanz aus dem Blutserum. Bei einem weiteren Ausführungsaspekt richtet sich die Erfindung auf die neue biologisch aktive Substanz, die aus dem Blutserum einiger Tiere und Vögel gewonnen wurde. Im bevorzugten Durchführungsaspekt richtet sich die Erfindung auf die Substanz und deren Gewinnung aus dem Blutserum des Pferdes. In einem weiteren Durchführungsaspekt richtet sich die Erfindung auf die Substanz und das Verfahren für deren Gewinnung aus dem Blutserum der Vögel. In einem anderen Durchführungsaspekt richtet sich die Erfindung auf die Substanz und das Verfahren für deren Gewinnung aus dem Blutserum des Menschen. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist die Entwicklung einer Arzneimittelform für die neue biologisch aktive Substanz. Die Erfindung setzt diverse Arzneimittelformen voraus: darunter auch für perorale, parenterale, nasale und buccale Gabe, in Form von Suppositorien und für ähnliche Verabreichungsarten. In der Erfindung ist die Verwendung von geeigneten und physiologisch vertretbaren Medien (wie z.B. destill. Wasser), Füllmitten (z.B. Kakaoöl) vorgesehen. Die biologisch aktive Substanz kann sowohl selbständig als auch in Verbindung mit anderen biologisch aktiven Mitteln verwendet werden. Ein zusätzliches Ziel der Erfindung ist eine pharmazeutische Komposition, bei der die aktive Substanz gemäß der vorliegenden Erfindung als Agens auftritt. Dabei muß die pharmazeutische Komposition den aktiven Inhaltsstoff in einer Menge aufweisen, die ausreicht, um eine günstige Wirkung auf den Organismus des Patienten auszuüben, d.h. eine effektive Menge. Ein weiteres Ziel der Erfindung ist die Ermittlung der effektiven Dosis der aktiven Substanz gemäß der vorliegenden Erfindung. Vermutlich liegt diese Dosis im Bereich von 0,15 bis 1000 mg/kg des Körpergewichtes des Patienten. Die konkrete Dosis soll offensichtlich der behandelnde Arzt ausgehend vom Zustand des Patienten, seinem Körpergewicht und der Behandlungskur festlegen. Die Erfindung wird weiter unten mit Abb. 1-3 erläutert, wo folgendes dargestellt ist: Abb.1 das Spektrum des Blutserums der Vögel (S1) vor Bestrahlung (Kontrolle) und nach Bestrahlung (Versuch); Abb.2 - das Spektrum des Blutserums des Menschen (S3) vor Bestrahlung (Kontrolle) und nach Bestrahlung (Versuch); Abb.3- das Spektrum des Blutserums

des Menschen (S3) vor Bestrahlung (Kontrolle) und nach Bestrahlung (Versuch). Ausführliche Beschreibung der Erfindung

Nachfolgend wird die Erfindung in den bevorzugten Varianten der konkreten Ausführung eingehend geschildert. Dabei dürfen die angeführten Beispiele der aktiven Substanzen und Gewinnungsverfahren, der pharmazeutischen Kompositionen und Arzneimittelformen kein Grund zur Einschränkung der Ansprüche sein, sondern sind lediglich dazu gedacht, die Machbarkeit der Erfindung sowie die Umsetzung der genannten Zweckbestimmung(en) vorzuführen. Jeder Fachmann auf diesem Gebiet wird sich sicherlich davon überzeugen, dass für die hier angeführten Optionen der Erfindungsausführung zahlreiche Modifikationen vorgeschlagen werden können, die allesamt unter die Ansprüche fallen, die weiter unten in der Erfindungsformel geschildert sind.

1. Methodik zur Blutserum-Gewinnung von Vögeln (Substanz S-1), Pferden (Substanz S-2) und Mensch (Substanz S-3)

Zur Serumsgewinnung verwendete man das Blut der Vögel, der Pferde und des Menschen. Das Blut wurde aus punktierten Venen (Pferde, Mensch) und Arterien (Vögel) gesammelt. Das Blut wurde in Galsfläschchen gesammelt, die dann innerhalb von 24 Stunden unter einer Temperatur von 4-8 0C inkubiert wurde. Nach der Blutgerinnung retraktion wurden die Fläschchen im Laufe von 20-30 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert, das Serum wurde von Blutgerinnung getrennt und unter gewöhnlichen Verhältnissen lyophilisiert. Die Fläschchen mit dem lyophilisierten Serum wurden auf RZ-100M-Anlagen (Biotechnologija, Russland) in den Betriebsarten 19, 20, 30 oder 40 kGy unter Nutzung von Co60 bestrahlt. Die auf diese Weise gewonnene Substanz S (1, 2, 3) wurde bei einer von 4-8 0C gelagert.

2. Beweise für die stimulierende Wirkung der Gammastrahlung auf das Serum von Vögeln, Pferden und Mensch

2.1. VOGELSERUM (Substanz S-1)

Die Versuche wurden an Ratten der Linie WISTAR (Männchen mit Körpermasse von 220-240 g) durchgeführt. Bei der ersten Versuchsreihe wurden die Tiere in 6 Gruppen je 20 Ratten eingeteilt:

1. Gruppe - den Ratten wurde eine physiologische Lösung verabreicht;
2. Gruppe - den Ratten wurde unbestrahltes Serum verabreicht;
3. Gruppe - den Ratten wurde mit 10 kGy bestrahltes Serum verabreicht;
4. Gruppe - den Ratten wurde mit 20 kGy bestrahltes Serum verabreicht;
5. Gruppe - den Ratten wurde mit 30 kGy bestrahltes Serum verabreicht;
6. Gruppe - den Ratten wurde mit 40 kGy bestrahltes Serum verabreicht;

Die physiologische Lösung, unbestrahltes Serum und die Substanz S-1 wurden intraperitoneal in einem Volumen von 1 ml verabreicht. Das Serum und die Substanz S-1 wurden in diesem Volumen jeweils in den Dosen von 15, 60, 100 und 120 mg/kg Körpermasse der Ratten gelöst. Sämtliche Stoffe wurden 30 Minuten vor dem Beginn der Versuchstests verabreicht. Die Vortests wurden 48 Stunden vor dem Beginn der Versuchstests durchgeführt. Untersucht wurde die Einwirkung der Substanz S-1 auf die körperliche Ausdauer, ermittelt an der Schwimmzeit der Tiere unter Belastung (eine am Schwanz befestigte Last mit 30 g Masse). Dazu wurden die Ratten paarweise in ein mit Wasser gefülltes thermostatisches Gefäß ausgesetzt, das in zwei Teile getrennt war. Die Wassertemperatur betrug +25 0C. Die Lufttemperatur betrug +20 0C. Ermittelt wurde die Schwimmzeit der Tiere bis zu den ersten Krampferscheinungen und bis zum endgültigen Schwimmverzicht und Abtauchen auf den Gefäßboden. Einwirkung auf die körperliche Ausdauer der Strahlendosis der Substanz. S-1 in einer Konzentration 100 mg/kg Körpermasse der Ratten

Bestrahlungsverhältnisse

Vortest (ohne Substanz)

Versuchstest (nach Verabreichung der Substanz S-1)

Phys. Lösung (ohne Bestrahlung)

4'50" ± 30" 4'59" ± 18" Serum ohne Bestrahlung

4'33" ± 19" 4'40" ± 29" 10 kGy

4'44" ±

$20^{\circ}8'23'' \pm 24^{\circ}20'00''$  kGy  $4^{\circ}44'' \pm 20^{\circ}8'51'' \pm 18^{\circ}30'00''$  kGy  $4^{\circ}47'' \pm 23^{\circ}8'33'' \pm 36^{\circ}40'00''$  kGy  $4^{\circ}46'' \pm 43^{\circ}4'41'' \pm 32^{\circ}00''$  Anmerkung: \* - p < 0,05 Einwirkung auf die körperliche Ausdauer der Substanz S-1 in einer Konzentration von 15, 60 und 120 mg/kg Körpermasse der Ratten Bestrahlung bei 10 kGy Serumdosis Vortest (ohne Substanz) Versuchstest (nach Verabreichung der Substanz S-1) Kontrolle  $4^{\circ}45'' \pm 27^{\circ}4'54'' \pm 22^{\circ}15'00''$  mg/kg  $4^{\circ}45'' \pm 17^{\circ}9'02'' \pm 56^{\circ}60'00''$  mg/kg  $4^{\circ}46'' \pm 31^{\circ}7'16'' \pm 53^{\circ}120'00''$  mg/kg  $4^{\circ}52'' \pm 23^{\circ}9,04'' \pm 55^{\circ}00''$  Anmerkung: \* - p < 0,05 Einwirkung auf die körperliche Ausdauer der Substanz S-1 in einer Konzentration von 15, 60 und 120 mg/kg Körpermasse der Ratten Bestrahlung bei 20 kGy Serumdosis Vortest (ohne Substanz) Versuchstest (nach Verabreichung der Substanz S-1) Kontrolle  $4^{\circ}45'' \pm 27^{\circ}4'54'' \pm 22^{\circ}15'00''$  mg/kg  $4^{\circ}33'' \pm 28^{\circ}7'55'' \pm 19^{\circ}60'00''$  mg/kg  $4^{\circ}39'' \pm 24^{\circ}8'15'' \pm 27^{\circ}120'00''$  mg/kg  $4^{\circ}59'' \pm 27^{\circ}9,42'' \pm 41^{\circ}00''$  Anmerkung: \* - p < 0,05 Einwirkung auf die körperliche Ausdauer der Substanz S-1 in einer Konzentration von 15, 60 und 120 mg/kg Körpermasse der Ratten Bestrahlung bei 30 kGy Serumdosis Vortest (ohne Substanz) Versuchstest (nach Verabreichung der Substanz S-1) Kontrolle  $4^{\circ}45'' \pm 27^{\circ}4'54'' \pm 24^{\circ}15'00''$  mg/kg  $4^{\circ}55'' \pm 24^{\circ}9'18'' \pm 52^{\circ}60'00''$  mg/kg  $4^{\circ}55'' \pm 24^{\circ}7'17'' \pm 36^{\circ}120'00''$  mg/kg  $4^{\circ}43'' \pm 32^{\circ}8,49'' \pm 29^{\circ}00''$  Anmerkung: \* - p < 0,05 Aus der Tabelle 1 ist ersichtlich, dass die Verabreichung der aktiven Substanz S-1 in einer Dosis von 100 mg/kg Körpermasse der Ratten bei einer Bestrahlung mit 10 kGy bereits statistisch aussagekräftige Erhöhung der körperlichen Ausdauer der Tiere mit sich bringt. Die Untersuchung der Dosis-Effekt-Abhängigkeit bei unterschiedlichen Bestrahlungsverhältnissen (Tabellen 2 und 3) erab, dass ein statistisch aussagekräftiger positiver Effekt ab einer Dosis unter 15 mg/kg nachweisbar ist.

**2.2. PFERDESERUM (Substanz S-2)** Die Versuche wurden nach der Technologie gemäß Punkt 2.1. durchgeführt, ausgenommen die Verhältnisse der Gammabestrahlung. Die Strahlenbehandlung erfolgte bei 20 kGy. Unbestrahltes Serum und die Substanz S-2 wurden intraperitoneal in einer Dosis von 100 mg/kg Körpermasse der Ratten verabreicht. Bestrahlungsverhältnisse Vortest (ohne Substanz) Versuchstest (nach Verabreichung der Substanz S-2) Serum ohne Bestrahlung  $4^{\circ}0'' \pm 235^{\circ}19'' \pm 35^{\circ}20'00''$  kGy  $3^{\circ}63'' \pm 33^{\circ}7'59'' \pm 1^{\circ}25'00''$  Anmerkung: \* - p < 0,05

**2.3. MENSCHLICHES SERUM (Substanz S-3)** Die Versuche wurden nach der Technologie gemäß Punkt 2.1. durchgeführt. Unbestrahltes Serum und die Substanz S-3 wurden in einer Dosis von 100 mg/kg Körpermasse der Ratten verabreicht. Bestrahlungsverhältnisse Vortest (ohne Substanz) Versuchstest (nach Verabreichung der Substanz S-1) Serum ohne Bestrahlung  $4^{\circ}49'' \pm 17^{\circ}5'47'' \pm 25^{\circ}10'00''$  kGy  $4^{\circ}43'' \pm 16^{\circ}7'08'' \pm 12^{\circ}20'00''$  kGy  $4^{\circ}41'' \pm 15^{\circ}7'10'' \pm 22^{\circ}30'00''$  kGy  $4^{\circ}39'' \pm 26^{\circ}6'09'' \pm 14^{\circ}40'00''$  kGy  $4^{\circ}41'' \pm 21^{\circ}5'02'' \pm 22^{\circ}00''$  Anmerkung: \* - p < 0,05 Die Daten der Tabellen 5 und 6 berechtigen zu einer definitiven Aussage über das Vorliegen eines positiven Effektes auf die körperliche Ausdauer der Ratten bei der Verabreichung der Substanzen S-2 und S-3 eben so wie im Falle der Substanz S-1.

**2.4. STIMULIERUNG DER PPOLIFERATION EMBRYOBALER ZELLEN DES MENSCHLICHEN GEHIRNS DURCH DIE SUBSTANZ S-1** Mittel und Reagenzien. Wachstumsmedium: Nadel-Medium ("Iglä"), modifiziert durch Dulbekko (DMEM) oder RPMI-1640 (Gibco, Grand Island), 10% des embryonalen Kuhserums (Sigma, USA). Die Stammlösung der Substanz S-1 20,0 mg/ml wird mittels Auflösen in DMEM zubereitet und in unterschiedlichen Konzentrationen in das Wachstums- oder Versuchsmedium mit Zellen auf eine 96-Grübchen-Kulturplanchette gebracht. Versuchsmedium. Modifizierte Dulbekko-Nadel mit 0,58 g/l Glutamin, 50 mkg/l Gentamizin imd 0,2% Bullenserum-Albumin. Hereingewinnung der Organe. Ein Embryo mit 10-12 Wochen Histazie, hereingewonnen mittels einer Kürette durch herkömmliche

Abortmethode, wird in ein steriles Gefäß mit der Henks-Lösung gebracht, die 200 mkg/ml Gentamizin enthält. Das Gefäß wird abgeschlossen und maximal 24 Stunden bei einer T +4 0C in einem Kühlschrank gelagert. Das Embryo, das bei T +4 0C in einem Gefäß mit Flüssigkeit gelagert wurde, wird herausgenommen und auf eine PetriSchale im Laminarschrank gelegt, der vorher im Laufe von 60 Minuten mit UV-Strahlung behandelt wurde. Die dabei benutzten Instrumente sollen entweder durch Abkochen oder mittels 70% Äthanol sterilisiert sein. Das Gehirn wird in ein steriles Reagenzglas mit einer bis auf 4 0C abgekühlten Hibernationslösung (270 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 975 mM D-Sorbitol, 25 mM D-Glukose, 100 mM Natriumlaktat, 100 mkg/ml Gentamizin). Das Reagenzglas mit dem Organ wird bis zur nächsten Bearbeitungsphase maximal 8-9 in einem Kühlschrank bei einer T +4 0C gelagert. Abscheidung der Gehirnzellen. Das Gehirn im Reagenzglas wird mittels Pipettierung resuspendiert, die grobe Suspension wird auf ein Nylonsieb mit 80-100 mkm-Poren ausgeschüttet und mit einem Pistill oder 10-ml-Spritzenplunger durchgerieben, wobei das Sieb ständig mit einer Hibernationslösung durchgespült wird. Die Suspension wird 5 min lang bei T +4 0C und 1500 U/min zentrifugiert und in einer Hibernationslösung resuspendiert. Es wird die Zahl der lebendigen Zellen mittels Ausschließen von Trypanblau berechnet. Die Suspension wird erneut 5 min lang bei T +4 0C und 1500 U/min zentrifugiert und diesmal in einem Kultivierungsmedium (DMEM + 10% Embryoserum der Kühe + 10,0 mkg/ml Gentamizin) in einer Konzentration 3-10<sup>6</sup> kl/ml resuspendiert. Die Suspension wird je 100 mkl in die Grübchen der 96-Grübchen-Kulturalplanchette, die vorher mit Kollagen bedeckt wurde. Die Kulturalplanchette wird für 24 Stunden in einen CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 0C, 5% CO<sub>2</sub> und 90% Feuchtigkeit getan. Alle 24 Stunden werden in die Grübchen der 96-Grübchen-Kulturalplanchette jeweils 100 mkl Kultivierungsmedium hinzugefügt. Messung der mitochondrialen Atmung nach der Mosman-Monks-Methode. In die 96-Grübchen-Kulturalplanchette werden die zu analysierenden Zellen im Wachstumsmedium gebracht, und 50 mkl 1mg/l MTT-Lösung in SFR bis zur Endkonzentration von 200 mkg/ml hinzugegeben. Nach 2-4 Stunden, je nach der Aktivität der mitochondrialen Atmung der zu analysierenden Zellen, bilden sich am Boden der Grübchen violette im Wasser nicht lösliche Kristalle. Die 96-Grübchen-Kulturalplanchette mit den ausgefallenen Kristallen wird 10 min bei 1500 U/min zentrifugiert, die Flüssigkeit über dem Niederschlag wird vorsichtig abgesaugt, und danach 200 mkl DMSO zum Auflösen von Kristallen und zur Bildung einer gefärbten Lösung dazugegeben. Die optischen Dichtewerte werden bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen, was eine Kennzahl für die Aktivität der mitochondrialen Zellenatmung ist. Versuchsbedingungen. Die Zellkultur wird auf dem Wachstumsmedium bei 37 0C in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator in einer Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> und 95% Feuchtigkeit gezüchtet. Beim Versuch wird die Zellsuspension in Zentrifugen-Reagenzgläser ausgeschüttet, 5 min bei 1500 U/min in einem Bucket-Totor zentrifugiert, die Flüssigkeit über dem Niederschlag wird ausgegossen, der Zellenniederschlag mittels Pipettierung im Versuchsmedium resuspendiert. Danach wird die Zellsuspension in die Grübchen der 95-Grübchen-Kulturalplanchette hineingetan, und zuvor wird in diese Grübchen der zu analysierende Stoff in den nötigen Konzentration dazugegeben. Die Kulturalplanchetten werden 24, 48, 72 Stunden oder länger in einem Volumen von 200 mkl/Grübchen inkubiert. Zu den Zellen wird eine MTT-Lösung (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromid; Blau-Dimethyl) nach der Mosman-Methode hinzugefügt, um die mitochondriale Atmung zu messen. Bei der Direktzählung der Zellenanzahl

mittels Färbung mit Trypanblau liegt der Rechenfehler  $\pm 10-15\%$ , während die Ermittlung der mitochondrialen Atmung eine Streubreite von  $\pm 1,5-2,0\%$  aufweist. Deswegen wird normalerweise als Zellenanzahl in der Probe die quantitative Schätzung des Niveaus der mitochondrialen Atmung genommen, weil dieser Wert mit höherer Genauigkeit gemessen werden kann. Um aussagekräftige Meßergebnisse zu bekommen, werden pro Meßpunkt jeweils 3-4 Grübchen gemessen. Untersuchungsergebnisse. Bei sämtlichen getesteten Konzentrationen der biologisch aktiven Substanz S-1 (0,1-10,0 mg/ml) wurde die proliferative Aktivität des komplizierten Systems embryonaler Zellen des menschlichen Gehirns stimuliert (Tabelle 7). Der stimulierende Effekt von S-1 in einer Konzentration 0,2 mg/ml war vergleichbar mit dem stimulierenden Effekt von 0,1 ME/ml Insulin und bei einer Konzentration 1,0 mg/ml ähnlich der Wirkung von 1%-Albumin-Lösung. Kontrolle Substanz S-1 1%Alb 0,1ME/ml Ins 1%Alb +0,1 ME/ml Ins 1mg/ml S-1 +0,1 ME/ml Ins S-11mg/ml + 0,5%Alb +0,1 ME/ml Ins 10mg/ml 2mg/ml 1mg/ml 0,2mg/ml 0,1mg/ml

opt. Dichte 0,0540,3590,2980,220,1610,1230,2690,1630,450,330,239 Anmerkung: S-1 biologisch aktive Substanz Alb Albumin Ins Insulin opt. Dichte optische Dichte Eine derartige Reaktion der embryonalen Zellen des menschlichen Gehirns auf die Einwirkung der Substanz S-1 zeugt davon, dass in dieser Phase der Zytogenese von Gehirnzellen S-1 als trophischer Faktor fungiert. Dabei verweisen die zytomorphologischen Eigenschaften des untersuchten Gewebes auf die besondere Empfindlichkeit der astrozytärer Zellen gegenüber dieser Einwirkung. Zugleich ergab die Analyse der kombinatorischen Wirkung von S-1 mit Albumin und Insulin, dass bei den genannten Substanzen konkurrente Wechselbeziehungen mit den Zellenrezeptoren bestehen, weil die gemeinsame Einwirkung aller drei Präparate in Konzentrationen, die bei separater Nutzung optimal waren, nicht den erwarteten Effekt zeigt. Mehr noch: die gemeinsame Nutzung von 1,0 mg/ml S-1 und 0,1 ME/ml Insulin führt zu einer stärker ausgeprägten Proliferation als wenn man diesem Gemisch noch eine 0,5%-Albumin-Lösung beigibt. Diese Daten sind ein Zeugnis dafür, dass S-1 einen wesentlichen Einfluss auf das Wachstum und die Lebenstätigkeit der Zellen ausübt, indem sie vermutlich auf die regulatorischen und trophischen Mechanismen einwirkt. Dabei können die Peptidenkomponenten der Substanz S-1 in ihrer Funktion als trophische Agenzien im Bestand der Aminosäuren (auch der Albumin-Aminosäure) auftreten, während die regulatorischen Wirkungen auf der Ebene der Rezeptoren von äußeren Zellenmembranen und Mitochondrien zur Geltung kommen können, indem sie auf den Energieaustausch einwirken.

**PROTEIN-PEPTIDEN-ZUSAMMENSETZUNG DER SUBSTANZ S-1** Die Methodik der Mustervorbereitung für die Massenspektroskopie Eine trockene Mustereinwaage wurde in 0,1%-Trifluoröthansäure (TFA) in einer Konzentration 10 mg/ml gelöst und 10 min lang bei 13 000 U/min zentrifugiert (20 cm Rotorradius). Das Extrakt wurde über eine Umkehrphasensäule mit 1 ml LiChrosorb C18 (10 µm) durchgelassen. Danach folgte die Stufenelution je 1 ml hintereinander: 10%, 30%, 80%, 100% Azetonitrilom (AN) mit 0,1% TFA-Gehalt. Die gewonnenen Fraktionen wurden einer massenspektrometrischen Analyse mittels MALDI TOF-Methode unterzogen.

**SUBSTANZ S-1** Nach der  $\gamma$ -Bestrahlung macht sich im Vogelserum ganz deutlich ein erhöhtes Niveau an niedermolekularen Peptiden bemerkbar (Abb. 1). Die Differenzen der wichtigsten Spitzenwerte bei der Massenspektrometrie des Vogelserums vor und nach der  $\gamma$ -Bestrahlung sind in Tabelle 8 ausgewiesen.

**MASSENSPEKTROMETRIE DER SUBSTANZ S-1** Vogelserum ohne -

Bestrahlung (D) Vogelserum nach der -Bestrahlung bei 20 kGy (D) 66656,6-66808,8- 43653,5-49599,3- 14156,9-33708,5- 4073,8 3115,4-3372,9 2431,3-2946,8 SUBSTANZ S-3 Beim menschlichen Serummuster lassen sich vor der 7-Bestrahlung in auffälliger Menge Proteine mit Molekularmasse 33.4, 52.3, 66.6 kDa nachweisen: das erstere und das letztere entsprechen vermutlich dem Albumin, das in der Säule nicht sorbiert wurde. Nach der Bestrahlung verschwinden diese Spitzen (Abb.2). Starke Differenzen sind auch im Bereich der Molekularmassen von 2,0 bis 4,0 kDa bemerkbar, wobei nach der Bestrahlung niedermolekulare Peptide sich ganz deutlich nachweisen lassen (Abb.3). Die Besonderheiten der Massenspektrometrie der Substanz S-3 sind in Tabelle 9 ausgewiesen.

MASSENSPEKTROMETRIE DER SUBSTANZ S-3 Menschliches Serum ohne -Bestrahlung (D) Menschliches Serum nach der -Bestrahlung bei 20 kGy (D) 66654,2- 52309,8- 22447,0-33420,0- - 7177,4-10571,3 1433,9-2434,2 2431,3-4332,4 823,1-1147,6 1208,8-2431,3 895,0-1179,5

THERAPEUTISCHE WIRKUNG DER SUBSTANZ S-1A. RÄUMLICHES GEDÄCHTNIS Beim Versuch wurden Ratten der Linie WISTAR (Männchen mit Körpermasse von 220-240 g) genutzt. Die Substanz S-1 wurde intraperitoneal in einer Dosis von 100 mg/kg der Körpermasse der Tiere 30 Minuten vor dem Testbeginn verabreicht. Untersucht wurde die Einwirkung der Substanz S-1 auf das räumliche Gedächtnis in einem T-förmigen Labyrinth. 2 Tage vor den Tests wurden die Ratten an das Labyrinth gewöhnt und hatten die Möglichkeit, das Labyrinth im Laufe von 3 Minuten zu untersuchen. Keine der Ratten zeigte deutliche Bevorzugung für irgendwelche Seite. Die Ratten bekamen nichts zu essen während 36 Stunden vor den Tests, das Wasser war nach Bedarf da. Beim Versuch wurde ein einfaches Schema genutzt: das Futter befand sich immer rechts. Die Ratte wurde in die Startsektion ausgesetzt, und es wurden im Laufe 1 Minute deren Bewegungen über das Labyrinth registriert. Die Rückkehr in die Startsektion war möglich. Beim Versuch gab es 10 Anläufe. 2 Tage später wurden die Tests wiederholt. Unter den 20 untersuchten Ratten (10 Kontrolltiere und 10 Versuchstiere) beobachtete man bei 10 Ratten den ersten Lauf nach links und bei 10 anderen nach rechts. Im folgenden verteilten sich die Laufrichtungen wie folgt (Tabelle 10).

Gruppen	Linksläufe	Rechtsläufe	Kein Zugang	Anzahl
Durchschn. Zeit	2914,1"	5522,7"	16	

Versuchsgruppe	Linksläufe	Rechtsläufe	Kein Zugang	Anzahl
Durchschn. Zeit	2221,7"	6824,0"	10	

Versuchsgruppe	Linksläufe	Rechtsläufe	Kein Zugang	Anzahl
Durchschn. Zeit	2124,9"	5523,2"	24	

Das Kriterium "3 richtige Zugänge nacheinander" erreichten während der wiederholten Tests 8 von 10 Kontrollratten und alle 10 Versuchsratten. Somit kann man von der stimulierenden Wirkung der Substanz S-1 auf die Erlangung und Erhaltung der räumlichen Fertigkeiten in einem T-förmigen Labyrinth, d.h. vom räumlichen Gedächtnis sprechen.

3. KORREKTUR DER PARKINSONISCHEN SYMPTOME Die Wirksamkeit der biologisch aktiven Substanz S-1 wurde an einem experimentellen Parkinson-Modell bewertet. Zur Simulation der Parkinsonschen Krankheit wurde Neurotoxin 6-Hydroxydopamin (6-GD), das die katecholaminergischen Terminals destrukturiert. 6-GD (6-Hydroxydopamin, 6-HODA) - 10 mkg in einem 10 ml Volumen wurde stereotaxisch entlang den Koordinaten des Gehirnatlas der Finkowa-Ratte Marschal im Laufe von 10 Minuten in den kompakten Teil der schwarzen Substanz (SN) eingeführt. 6-GD wurde in der physiologischen Lösung gelöst, die 1% Ascorbinsäure enthielt. Die eingeführte Lösung wurde mit Hilfe von Natriumbikarbonat-Lösung auf pH=7 gebracht. Die

Applikation des Stoffes erfolgte unter Äthernarkose zweimal (jeweils einmal binnen 24 Stunden), um stabile Verhaltensmuster zu bekommen. Beim Versuch wurden Männchenratten der Linie Wistar mit der Körpermasse von 250-300 g genutzt. Die Beobachtungen erfolgten im Laufe von 17 Tagen seit der ersten Injektion. Sämtliche Tiere wurden in 2 Gruppen je 20 Ratten eingeteilt. Den Tieren der ersten Gruppe wurden 1 Stunde nach der zweiten 6-GD-Applikation intraperitoneal die Substanz S-1 verabreicht, die im destillierten Injektionswasser in einer Dosis 100 mg/kg gelöst war. Den Tieren der zweiten Gruppe wurde 1 ml destilliertes Wasser verabreicht, das 100 mg/kg gewöhnlich unbestrahltes Serum enthielt. Die Symptome der Parkinsonschen Krankheit: Tremor, Pyloerektion, insilaterale zirkulatorische Drehbewegungen - wurden mit Expertenmethode bewertet. Diese Effekte lassen sich bei den Kontrolltieren im Laufe von 3 Tagen nach der letzten Applikation der 6-GD-Lösung nachweisen. Außerdem werden die beschriebenen Effekte im Laufe weiterer 12-14 Tage gewaltsam (taktile Einwirkung) bei den Tieren provoziert. Die Verabreichung der Substanz hat jeweils die Erscheinungsformen der Parkinsonschen Krankheit wesentlich verändert. Die positive Einwirkung der Substanz S-1 auf die Parkinsonschen Merkmale sind in Tabelle 12 ausgewiesen. Die typischen Merkmale der Parkinsonschen Krankheit Kontrolle Substanz S-1 Tremor, Pyloerektion und zirkulatorische Drehbewegungen 72 Stunden 24 Stunden Taktile Provokation der Merkmale der Parkinsonschen Krankheit 12-14 Tage bis 9 Tage

### DIE THERAPEUTISCHE AKTIVITÄT DER SUBSTANZ S-2

Beim Versuch wurden Ratten der Linie WISTAR (geschlechtsreife Männchen und Weibchen mit Körpermasse von 220-240 g) genutzt. Intraperitoneale Verabreichung der Substanz S-2 Die Männchen wurden in 4 Gruppen je 10 Ratten eingeteilt. Aus der Verbindung dieser Gruppen wurden 4 Gruppen eingeteilt - KK (Kontrollmännchen und Kontrollweibchen), KO1 (Kontrollmännchen und Versuchsweibchen), OK (Versuchsmännchen und Kontrollweibchen), und OO (Versuchsmännchen und Versuchsweibchen). Zuerst erfolgten Vortests. Danach wurde den Männchen eine 15 Tage lange Erholung gegönnt. Die Weibchen wurden jeweils nur einmal genutzt. Die Substanz S-2 wurde 30 Minuten vor dem Beginn der Versuchstests verabreicht. Den Kontrolltieren wurde 1 ml gewöhnliches Pferdeserum verabreicht. Das Männchen wurde für 15 Minuten in einen getrennten Käfig ausgesetzt, danach wurde ein Weibchen im Estrus-Zustand (ermittelt an dem Zustand der äußeren Geschlechtsorgane) in denselben Käfig getan. Während des Versuchs wurden folgende Kennziffern registriert: latente Periode der ersten Aussetzung (LP der Aussetzung); latente Periode der ersten Intromission (LPIM); die Zahl der Intromissionen (IM-Zahl); die Zahl der Aussetzungen ohne Intromissionen (Zahl "leerer Aussetzungen"); latente Periode der Ejakulation (LP der Ejakulation); refraktäre Periode nach der Ejakulation (PERP); die Zahl der Ejakulationen im Laufe des Versuchs (Zahl der Ejakulationen). Kennziffern der kopulativen Aktivität der Männchen aus der KK-Gruppe

	LP der Aussetzung	Zahl der "leeren Aussetzungen"	LP IM(sek)	IM-Zahl	LP der Ejakulation(sek)	PERP(sek)	Zahl der Ejakulationen
Kontrolle	7,5±1,07	0±1,01	11,8±0,91	0,7±1,45	74±97	455±432	4
Versuch	7,6±1,17	1±0,81	11,9±0,91	0,7±0,95	60±90	453±442	4
Differenz(%)	+1%	+1%	+1%	0%	-2%	+0%	

Kennziffern der kopulativen Aktivität der Männchen aus der KO-Gruppe

	LP der Aussetzung	Zahl der "leeren Aussetzungen"	LP IM(sek)	IM-Zahl	LP der Ejakulation(sek)	PERP(sek)	Zahl der Ejakulationen
Kontrolle	7,5±1,06	3±0,61	11,9±0,91	0,9±0,75	93±92	444±462	5
Versuch	7,5±1,06	6±0,71	11,8±1,11	0,9±1,15	91±83	437±442	4
Differenz(%)	+0%	+5%	-1%	0%	0%	-2%	



Kennziffern der kopulativen Aktivität der Männchen aus der OK-Gruppe LP der Aussetzung Zahl der "leeren Aussetzungen") LP IM(sek) IM-Zahl LP der Ejakulation(sek) PERP(sek) Zahl der Ejakulationen Kontrolle  $7,6 \pm 1,16,7 \pm 0,611,9 \pm 0,811,0 \pm 0,8590 \pm 87462 \pm 441-4$  Versuch  $7,6 \pm 1,14,3 \pm 1,09,1 \pm 0,715,0 \pm 0,8591 \pm 76370 \pm 394-6$  Differenz(%)  $-29\%-36\%-24\%+36\%0\%-20\%$

Kennziffern der kopulativen Aktivität der Männchen aus der 00-Gruppe LP der Aussetzung Zahl der "leeren Aussetzungen") LP IM(sek) IM-Zahl LP der Ejakulation(sek) PERP(sek) Zahl der Ejakulationen Kontrolle  $7,3 \pm 0,96,6 \pm 0,811,8 \pm 0,910,9 \pm 1,3585 \pm 85459 \pm 391-4$  Versuch  $4,9 \pm 0,94,3 \pm 0,69,1 \pm 1,015,0 \pm 0,5588 \pm 81368 \pm 374-7$  Differenz(%)  $-33\%-35\%-23\%+38\%0\%-20\%$

Somit hat die intraperitoneale Verabreichung dem Weibchen der Substanz S-2 von Hengsten so gut wie keinen Einfluss auf die kopulative Aktivität des Männchens, während die Verabreichung der S-2 Substanz dem Männchen die Zahl der Intromissionen und Ejakulationen im Versuch erhöht sowie die refraktäre Periode nach der Ejakulation (PERP) verkürzt. Intragastriale Verabreichung der Substanz S-2 Die Männchen wurden in 4 Gruppen je 10 Ratten eingeteilt. Zuerst erfolgten Vortests. Danach wurde den Männchen eine 15 Tage lange Erholung gegönnt. Die Weibchen wurden jeweils nur einmal genutzt. Die Substanz wurde 60 Minuten vor dem Beginn der Versuchstests verabreicht. Es wurden folgende Dosen verwendet: 300 mg/kg, 500 mg/kg und 1000 mg/kg. Den Kontrolltieren wurden 2 ml physiologische Lösung verabreicht. Das Männchen wurde für 15 Minuten in einen getrennten Käfig ausgesetzt, danach wurde ein Weibchen im Estrus-Zustand (ermittelt an dem Zustand der äußeren Geschlechtsorgane) in denselben Käfig getan. Während des Versuchs wurden folgende Kennziffern registriert: latente Periode der ersten Aussetzung (LP der Aussetzung); latente Periode der ersten Intromission (LPIM); die Zahl der Intromissionen (IM-Zahl); refraktäre Periode nach der Ejakulation (PERP); die Zahl der Ejakulationen im Laufe des Versuchs (Zahl der Ejakulationen). Kennziffern der kopulativen Aktivität der Männchen aus der Kontrollgruppe LP der Aussetzung LP IM(sek) IM Zahl PERP (sek) Zahl der Ejakulationen Kontrolle  $9,6 \pm 0,916,3 \pm 1,07,6 \pm 1,7558 \pm 462-5$  Versuch  $9,7 \pm 0,716,2 \pm 0,97,9 \pm 1,2543 \pm 572-5$  Differenz(%)  $+1\%-1\%+4\%-3\%$

Kennziffern der kopulativen Aktivität der Männchen aus der Gruppe mit der Dosis 300 mg/kg LP der Aussetzung LP IM(sek) IM-Zahl PERP(sek) Zahl der Ejakulationen Kontrolle  $9,8 \pm 1,015,9 \pm 0,88,1 \pm 1,2561 \pm 432-5$  Versuch  $8,1 \pm 0,813,0 \pm 1,011,7 \pm 1,6422 \pm 513-6$  Differenz(%)  $-17\%-18\%+44\%-25\%$

Kennziffern der kopulativen Aktivität der Männchen aus der Gruppe mit der Dosis 500 mg/kg LP der Aussetzung LP IM(sek) IM-Zahl PERP(sek) Zahl der Ejakulationen Kontrolle  $9,9 \pm 1,016,1 \pm 0,97,7 \pm 1,3523 \pm 612-4$  Versuch  $8,1 \pm 0,813,5 \pm 0,811,8 \pm 1,8397 \pm 483-7$  Differenz(%)  $-18\%-16\%+53\%-24\%$

Kennziffern der kopulativen Aktivität der Männchen aus der Gruppe mit der Dosis 1000 mg/kg LP der Aussetzung LP IM(sek) IM-Zahl PERP(sek) Zahl der Ejakulationen Kontrolle  $9,7 \pm 0,916,1 \pm 1,07,7 \pm 1,6541 \pm 392-5$  Versuch  $7,1 \pm 0,811,4 \pm 0,911,9 \pm 2,1384 \pm 553-7$  Differenz(%)  $-27\%-29\%+55\%-29\%$

Somit erhöht die intragastriale Verabreichung der Substanz S-2 die Zahl der Intromissionen und Ejakulationen im Versuch und außerdem verkürzt die latente Periode der Aussetzungen und Intromissionen sowie die PERP-Kennziffer. Schlußfolgerung. Die Substanz S-2 stimuliert die geschlechtliche Aktivität der Versuchsratten (Männchen). Diese Substanz hat keinen Einfluss auf die geschlechtliche Aktivität der Weibchen. DIE THERAPEUTISCHE AKTIVITÄT DER SUBSTANZ S-3 Beim Versuch wurden Ratten der Linie WISTAR (Männchen mit Körpermasse von 240-260 g) genutzt. Die Ratten wurden

einzelnen in Versuchskammern ("shuttle-boxes") hereingetan, die mit einer Trennwand in zwei Teile geteilt waren. Der vorhandene Schallerzeuger gestattete es, einen Schallerreger mit einer Frequenz von 7 kHz und Leistung von 1 bis 10 dB zu präsentieren.<sup>84</sup> Ratten befanden sich in den Kammern in 10 Versuchen - je 20 Präsentationen pro Versuch. Bei jeder Präsentation wurde jeweils ein Schallerreger mit 2 dB-Leistung und 5 sek Dauer eingeschaltet. Die Zeitdauer jeder einzelnen Präsentation betrug 30 sek, die Zeitdauer des Versuchs 10 Minuten. Den Kontrolltieren (43 Ratten) wurde im Laufe von 5 Tagen je 1 ml gewöhnliches Spenderserum verabreicht, während man den Versuchstieren (42 Ratten) im Laufe von 5 Tagen täglich Streptomizin (Streptomizinsulfat aus der Produktion der Kiewer Fabrik für medizinische Präparate) verabreicht wurde, und zwar gelöst im Injektionswasser in einer Dosis von 400 000 Einheiten je kg Körpergewicht des Tieres. Nach den Tests wurde an die Versuchsgruppe der Ratten mit Hörstörungen intraperitoneal die Substanz S-3 (Bestrahlung bei 20 kGy) in einer Dosis von 10 mg/100 g Körpermasse der Tiere verabreicht. Die Reaktion auf den Schallerreger mit 2,0 dB-Leistung wurde 30 min nach der Verabreichung der Substanz S-3 eingeschätzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 21 ausgewiesen. Der Einfluss der Substanz S-3 auf den Schallerreger der Tiere mit Hörstörung (in fiktiven Einheiten.)

Kontrolle Nach Verabreichung des Spenderserums bei einer Hörstörung  
Nach Verabreichung der Substanz S-3 bei einer Hörstörung

$18,5 \pm 0,45$ ,  $46 \pm 0,66$   $16,2 \pm 0,7$  Somit hat die Substanz S-3 eine korrigierende Wirkung auf die Gehörverminderung, die beim Versuch durch die Streptomizingabe verursacht war.

简体中文网页