

В. Н. ШРЕДЕР

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ФИЗИОЛОГИИ СПЕРМИЕВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ. ПРИРОДА ЛИПОИДОВ АНОДНЫХ И КАТОДНЫХ СПЕРМИЕВ КРОЛИКА**

*(Представлено академиком И. И. Шмальгаузенем 14 I 1940)*

В одной из ранее опубликованных мною работ (1) было показано качественное различие протеинов, полученных путем водных, щелочных и кислотных вытяжек из анодных и катодных спермиев.

Методом ультрамикроскопического анализа было найдено, что из катодно двигающихся спермиев, т. е. спермиев с Y-хромосомой (1, 2, 3, 4), могут быть получены растворы протеинов с изоэлектрической точкой, лежащей выше изоэлектрической точки обычных протеинов, именно при  $pH=6-7,5$ . Протеины, полученные из анодно двигающихся спермиев, обнаруживают изоэлектрическую точку, лежащую в кислой среде при  $pH=4,5$ .

На основании этих фактов было высказано предположение, что различие биохимической природы спермиев с X- и Y-хромосомой, обуславливающие различие движений их в электрическом поле (к аноду и катоду), связано с количественным соотношением амфолитов-протеинов с более щелочной и более кислой изоэлектрической точкой, с одной стороны, и качественно различных липоидов, с другой.

Поэтому задача настоящего исследования, которая может быть определена как задача дальнейшего изучения природы биокolloидов спермиев с X- и Y-хромосомой, сводилась к изучению липоидов этих биологически различных клеток с биофизико-химической и физиологической точек зрения.

Изучение физиологических различий липоидов из спермиев можно связать с предположением возможного вхождения в липоидную фракцию этих клеток гормональных включений. Имеются некоторые литературные данные по этому вопросу (5).

Аналізу были подвергнуты липоиды из спермиев кролика как до разделения их в электрическом поле (целая сперма), так и после разделения их в электрическом поле, т. е. анодная и катодная часть спермиев. Задачей нашего исследования было изучение качественных различий липоидов, полученных из анодных и катодных спермиев, т. е. из спермиев X- и Y-хромосомами, у которых мы предположили возможность вхождения в липоидную фракцию этих клеток гормональных включений, и поэтому методика нашего исследования была направлена к тому, чтобы выделить липоидную фракцию из спермиев с X- и Y-хромосомой и изучить эту липоидную фракцию как путем применения цветных химических реакций на гормон,

так и путем применения биологических тестов. При этом в липоидах из спермиев предполагалось наличие половых гормонов.

В основном обработка спермиев для извлечения липоида происходила по методу, описанному Пинкус и Цаль (6) для извлечения эстрогена (фракция женского полового гормона) из мочи беременных женщин. Этот метод представляет видоизменение методики Коген и Мэрриэн (7).

Методика химической обработки спермиев для извлечения из них липоидов была несколько видоизменена, именно мы исключили растворение в толуоле, как лишний момент при работе со спермиями; далее подкисление мы вели не пропуская  $\text{CO}_2$ , а подкислением  $N/1\text{HCl}$  после обработки  $N/1$  раствором  $\text{NaOH}$ . В некоторых сериях опытов обработка  $N/1$  раствором  $\text{NaOH}$  опускалась совсем. В основном методика представляет собой кислотный гидролиз клеток спермиев и последующую экстракцию липоидов эфиром, отмывание кислот водой, отгонку эфира и растворение полученного осадка липоидов в 96°-ном спирите. Таким образом нашими рабочими растворами были: названный нами раствор I (а), содержащий эфирные вытяжки, не обработанные  $N/1$  раствором  $\text{NaOH}$ , и раствор II (б) после обработки экстракта  $N/1$  раствором  $\text{NaOH}$ .

По типу растворов I (а) и II (б) обрабатывались спермии, как те, которые не подвергались разделению в электрическом поле, так и те, которые после разделения в электрическом поле были получены с анода или катода.

Спермии разделялись в электрическом поле в растворе-разбавителе Ring  $Z^{d+}$ -гликолла. Этот раствор-разбавитель описан мною в ряде моих предыдущих работ.

Для получения липоидов было проведено 192 опыта разделения спермы в электрическом поле и собраны спермии отдельно с анода и катода; каждая проба с анода и катода подвергалась отдельной обработке по типу растворов I (а) и II (б). Затем все анодные экстракты I (а) собирались вместе, так же как и катодные типа I (а). Анодные обработки типа II (б) соединялись вместе, катодные вытяжки типа II (б) также соединялись вместе. Таким образом 96 проб с анода и 96 проб с катода были обработаны по типу I (а), другие 96 проб (из 192 разделений в электрическом поле) были обработаны по типу II (б). Подобной же обработке по типу I (а) и II (б) подверглись и спермии, не разделенные в электрическом поле, т. е. в наших опытах с цельной спермой.

Таким образом нашими рабочими растворами, с которыми нами были проведены все эксперименты как химического, так и биологического порядка, были:

I (а) Вытяжка из спермиев:	II (б) Вытяжка из спермиев:
Без разделения в электр. поле	Без разделения в электр. поле
С анода (после разделения в электр. поле)	С анода (после разделения в электр. поле)
С катода » » » » » »	С катода » » » » » »

В результате экспериментов в первую очередь нами были изучены цветные реакции на половой гормон; в этом отношении мы воспользовались цветной реакцией на женский половой гормон, описанной Кобером (8) и видоизмененной Коген и Мерриэн (9). Этот метод дает возможность химическим путем проводить анализ исследуемого вещества (в нашем случае липоида, выделенного из спермиев).

Изучение цветной реакции на женский половой гормон в липоидных фракциях из спермиев, не подвергавшихся катафорезу и обработанных по типу растворов I (а) и II (б), показало, что мы имеем положительную реакцию Коген и Мерриэн (измененная реакция Кобера), т. е. в конечном итоге получается желто-оранжевое окрашивание, исчезающее, вернее, переходящее в розовое при прибавлении 3%-ного раствора перекиси водорода.

Таблица 1

Картина макровскрытия подопытных и контрольных животных

Введенный раствор	Число взятых инфантильных мышей или?	Процент половозрелых мышей опытных и контрольных через 100 час.	Состояние половой железы опытных и контрольных животных
4. Вытяжка липоидов спермиев, не разделенных в электр. поле. Обработка I (a)	8 ♂	100	Семенники { у всех сильно увеличены, семяпроводы увеличены, наполнены беловатой жидкостью
	и 40 ♀	100	
	7 ♂ и 7 ♀ контрольн.	0	Матка { тело и рога матки увеличены у всех, железы развиты
2. Липоидная вытяжка из анодных спермиев. Обработка I (a)	8 ♂	0	Семенники инфантильны
	и 8 ♀	100	
	7 ♂ и 7 ♀ контрольн.	0	Матка { тело увеличено, железы развиты
3. Липоидная вытяжка из катодных спермиев. Обработка I (a)	8 ♂	100	Семенники { сильно увеличены, у всех гроздевидное строение, сильно развиты кровеносные сосуды
	и 8 ♀	0	
			Матка—рога и матка у всех бледна, не увеличена
4. Вытяжка липоидов спермиев, не разделенных в электрическом поле. Обработка II (b)	7 ♂	100	Семенники { увеличены, семяпроводы увеличены, семенники наполнены беловатой жидкостью
	и 10 ♀	80	
	контроль 8 ♂ и 7 ♀ остались инфантильными		Рога и матка увеличены у 80%, 20% инфантильны
5. Липоидная вытяжка из анодных спермиев. Обработка II (b)	15 ♂	0	Семенник { у 33% легкое увеличение семенника, 67% инфантильны
	и 14 ♀	75	
			Матка увеличена у 75%, 25% инфантильны
6. Липоидная вытяжка из катодных спермиев. Обработка II (b)	15 ♂	80	Семенник { увеличен сильно у 80%, 20% инфантильны
	и 14 ♀	0	
			Матка инфантильна у 90%, у 10% слегка утолщена

Цветные реакции на белки: Миллона и ксантопротейновая, были отрицательны.

С липоидами, полученными из спермиев с анода и катода, цветные реакции не производились, так как они требуют довольно большого количества исходного материала, который очень трудно добыть вследствие большой трудоемкости экспериментов, и поэтому было нецелесообразно его расходовать на эти ориентировочные эксперименты.

В виду того что цветные реакции на гормон мы считаем лишь ориентировочными экспериментами и мало убедительными, мы в дальнейшем перешли к биологическим тестам и изучили влияние различных липоидных вытяжек из спермиев на инфантильных мышей, самцов и самок белых мышей (<sup>10-14</sup>) и на кастрированных взрослых самок белых мышей (<sup>15, 16</sup>).

В опытах с инфантильными самцами и самками белых мышей 10 см<sup>3</sup> алкогольного экстракта из спермиев концентрировалось в 1 см<sup>3</sup> и доводилось дистиллированной водой до 10 см<sup>3</sup>. Неполовозрелые самки и самцы белых мышей (вес 7—9 г) получали дважды в день по 0,3 см<sup>3</sup> этого липоидного экстракта в течение 3 дней. Затем мыши убивались и производилось макро- и микроскопическое исследование их половых желез.

Результаты этих экспериментов сведены в таблицах макровскрытий экспериментальных животных и таблицах микроскопического, гистологического анализа их половых желез после 3 дней инъекции липоидных вытяжек из спермиев. Одновременно дано состояние половых органов контрольных мышей того же возраста и веса (табл. 1).

Таким образом из табл. 1 видно, что липоидная вытяжка из спермиев, взятых с анода, т. е. из спермиев с X-хромосомой, вызывает созревание половых органов инфантильных самок; липоидная вытяжка из спермиев, взятых с катода, т. е. спермиев с Y-хромосомой, вызывает созревание половых органов инфантильного самца. Липоидная вытяжка из спермиев, которые не подверглись разделению в электрическом поле, т. е. вытяжка из смеси спермиев с X- и Y-хромосомами, вызывает созревание половых органов как инфантильных самцов, так и инфантильных самок. Микроскопическое, т. е. гистологическое изучение половых органов (семенник, яичник, матка) подопытных животных подтверждает факты, которые наблюдались при макровскрытии этих животных.

Результаты гистологического анализа даны в табл. 2.

Все контрольные животные инфантильны: семенник на стадии раннего сперматогенеза (сперматиды); яичник и матка не развиты.

Нами были произведены также эксперименты, в которых липоидные вытяжки из спермиев вводились кастрированным самкам белых мышей, у которых изучался характер течки. Эти эксперименты показали, что липоидные вытяжки, полученные из анодно двигающихся спермиев, влияют сильнее вытяжки из катодных спермиев, т. е. анодные вытяжки вызывают течку более энергично, чем липоидные вытяжки из катодных спермиев; эта энергично вызванная течка также и более длительна. Липоидные вытяжки из катодных спермиев вызывают очень поздно наступающий и слабо протекающий эструс.

Липоиды спермиев с анода и катода оказались по вышеприведенным биологическим тестам столь же качественно физиологически отличными, как сильно различной оказалась в наших прежних экспериментах величина изоэлектрической точки протейнов, полученных из анодных и катодных спермиев (<sup>1-4</sup>).

Из этих экспериментов вытекает также вывод, что гормональный эффект присущ не только железам, но и клеткам в первых стадиях развития.

Резюмируя результаты всего нашего экспериментального материала, мы должны еще раз подчеркнуть, что спермии, которые при электрофорезе

Таблица 2

Гистологическая картина при введении инфантильным ♂ и ♀ белым мышам липоидных вытяжек из спермиев

Введенный раствор	Состояние половых желез инфантильных подопытных мышей через 100 час. после введения липоидной вытяжки из спермиев		
	Семенник	Яичник	Матка и рога
1. Вытяжка из липоидов спермиев, не разделенных в электрическом поле, при обработке I (a) и II (b)	Развит хорошо, сперматогенез на стадии головок, имеются зрелые спермии с хвостами	В яичнике имеются увеличенные фолликулы с созревающими яйцеклетками	Рога и матка увеличены, тело матки утолщено. Железы матки хорошо развиты
2. Липоидная вытяжка из анодных спермиев при обработке I(a) и II(b)	Сперматогенез ранних стадий сперматогонии, сперматозиты, сперматиды	В яичнике имеются увеличенные фолликулы с созревающими яйцеклетками	Рога и тело матки увеличены. Железы матки хорошо развиты
3. Липоидная вытяжка из катодных спермиев при обработке I (a) и II (b)	Семенник развит хорошо, сперматогенез на стадии головок в большинстве случаев. Имеются также вполне зрелые спермии	Яичник инфантилен. В фолликулах не видно созревающих яйцеклеток	Тело матки и рога слабо развиты. Тело удлинено. Железы не развиты

приходят на анод и катод, представляют собой клетки, глубоко отличные друг от друга, как по физико-химической структуре, так и по физиологическим качествам своих биокolloидов; эти отличия связаны с особенностями биологической природы этих клеток, именно с наличием у них X- и Y-хромосом.

Биохимические различия биокolloидов этих двух родов спермиев у млекопитающих позволяют, как видно из приведенного экспериментального материала, разделить этих клеток в электрическом поле, а следовательно, допустить применение метода электрофореза как одного из методов искусственного контроля пола.

Институт экспериментальной биологии  
Академия Наук СССР

Поступило  
14 I, 1940

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> В. Н. Шредер, Биол. журнал, VI, № 5—6 (1937). <sup>2</sup> Ibid., I, № 5—6 (1933). <sup>3</sup> Ibid., III, № 3 (1934). <sup>4</sup> Ibid., V, № 4 (1936). <sup>5</sup> Кольцов, Вопр. питания, № 4 (1936). <sup>6</sup> Pincus u. Zahl, J. of Gen. Phys., 20, № 6 (1937). <sup>7</sup> Cohen a. Marrian, The biochem. J., XXVIII (1934). <sup>8</sup> Kober, Biochem. ZS., 239, H1-3 (1931). <sup>9</sup> Cohen a. Marrian, The biochem. J., XXVIII (1934). <sup>10</sup> Zondek u. Aschheim, Klin. Wochenschr., № 29 (1925). <sup>11</sup> Zondek u. Aschheim, Arch. f. Gynäk., № 127 (1925). <sup>12</sup> Zondek u. Aschheim, Arch. f. Gynäk., № 10/22 (1926). <sup>13</sup> Dingermans, Jough, Kober, Laqueur, Deutsche Med. Wochenschr., № 8 (1930). <sup>14</sup> Goldschmidt u. Streber, Klin. Wochenschr., 16 (1937). <sup>15</sup> Allen a. Doisy, J. Amer. Med. Assoc., 81 (1925); 85 (1925). <sup>16</sup> Allen a. Doisy, Amer. Z. Anat., 34 (1934).