

АКАДЕМИК Н. К. КОЛЬЦОВ

ИСКУССТВЕННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПОЛА У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Четыре года назад Институт животноводства ВАСХ-НИЛ ввел в свой план проблему искусственной регуляции пола у домашних животных. В 1933 г. эта тема была перенесена в план Института экспериментальной биологии Наркомздрава, где и продолжается ее разработка в настоящее время.

Не приходится останавливаться на том, насколько важно было бы для широко планируемого советского животноводства получить в свое распоряжение способ по произволу изменять процентное отношение самцов и самок в приплоде обобществленных стад.

Вопрос об искусственной регуляции пола имеет за собой длинную историю, очень бедную действительными достижениями, зато богатую совершенно ненаучными и порою анекдотическими «открытиями» недавнего прошлого. Между тем биология в настоящее время уже с полной точностью определила те пути, по которым эта практическая проблема может быть разрешена, хотя она и не гарантирует успешного разрешения¹.

Биология точно установила, что не может быть одного общего метода для регуляции пола у всех домашних животных. У птиц и шелкопрядов пол яйца определен уже до оплодотворения, так что для регуляции пола надо как-то действовать на самку с еще несозревшими яйцами. У пчел все оплодотворенные яйца превращаются в самок, а неоплодотворенные дают самцов. У млекопитающих пол зародыша определяется в момент оплодотворения, так как здесь существуют два рода сперматозоидов: спермии на самца и спермии на самку. На основании точных данных по происхождению этих сперматозоидов мы имеем все основания определенно утверждать, что «мужских» спермиев возникает ровно столько же, сколько «женских»: этим объясняется, почему среди потомства оказывается обычно приблизительно столько же самцов, сколько самок, если только почему-либо во время развития зародышей одного пола не погибает больше, чем другого.

Итак, регулировать по произволу распределение самцов и самок в потомстве млекопитающих возможно лишь в том случае, если нам удастся изменить соотношение между мужскими и женскими сперматозоидами в ту или иную сторону от обычного 1 : 1. Превращение

женских сперматозоидов в мужские или наоборот мы должны на основании прочных теоретических данных признать невозможным. Возможно только или уничтожить (ослабить) сперматозоиды одного рода или же произвести искусственное разделение их в две стороны. От поисков в первом направлении мы решили отказаться, так как трудно представить себе такие условия, которые губили бы сперматозоидов одного рода, а сперматозоидов другого рода оставляли неповрежденными. Но попытка разделить оба рода сперматозоидов, развести их в разные стороны нам представлялась неизбежно. Можно было предположить, что сперматозоиды обоих родов, как имеющие разное морфологическое строение («женские» несут в головке икс-хромосому, а «мужские» — игрек-хромосому), могут нести разные электрические заряды и в таком случае они будут по-разному передвигаться в электрическом поле. Эта задача и была предложена сотруднице В. Н. Шредер.

В первую очередь необходимо было овладеть методикой физиологических разбавителей для спермы кроликов. До сих пор эта методика разрабатывалась преимущественно для целей искусственного осеменения и преследовала одну определенную цель: сохранить возможно долее жизнь сперматозоидов в искусственной среде. Теоретические обоснования предлагаемых рецептов разбавителей не всегда ясны с научной точки зрения. Нам казалось необходимым научиться широко варьировать состав этих разбавителей, в особенности по отношению к содержанию различных неорганических ионов и к активной реакции, так как именно эти факторы могут влиять, в первую очередь, на результаты прохождения электрического тока через разбавленную сперму. Чтобы изменять по желанию активную реакцию спермы, т. е. содержание водородных ионов, до сих пор употребляется почти исключительно буферный раствор фосфорнокислых солей. Но под влиянием последних в средних и щелочных растворах выпадает кальций, и поэтому такие растворы не должны содержать солей кальция. А между тем именно кальций в ионном составе физиологического раствора может принадлежать выдающаяся роль, в особенности при пропускании тока. Ввиду этого при составлении физиологического разбавителя был применен не фосфатный, а гликоколовый буфер, который допускает наличие ионов кальция. Именно этот буфер и был положен в основу ряда комбинированных разбавителей для спермы кролика и лошади.

¹ Краткая сводка работ в этой области с указанием и на наше исследование помещена в *Journal of Heredity*, 1933 г.

В выпуске 5—6 тома I «Биологического журнала» (1933) от имени В. Н. Шредер и ее сотрудницы Г. П. Раменской были опубликованы три работы, в которых описаны результаты этой группы исследований и приведены точные рецепты всех изученных ими ионно-эквивалентных разбавителей для спермы жеребца и кролика. Для кролика наилучшую выживаемость дает раствор, получивший название Рингер Z^d , содержащий на 100 ч. NaCl—2 ч. KCl и 2 ч. CaCl₂ и забуферированный гликоколом до нейтральной реакции. Сперма этим раствором разбавляется в 8—16 раз. Для спермы жеребца лучше брать повышенное содержание кальция: Рингер 5, содержащий на 100 ч. NaCl—2 ч. KCl и 8 ч. CaCl₂. Растворы могут иметь здесь различную активную реакцию (от pH=4,1 до 7,8), но кислая среда особенно благоприятна, причем для кислого разбавителя возможны разведения спермы в 16 раз, а для щелочного—не более чем в 4 раза. Присутствие глюкозы и фосфатов, в которых некоторые исследователи желают видеть источник энергии сперматозоидов, нам для наших опытов казалось излишним.

После того как были испробованы разнообразные разбавители, можно было приступить и к основному опыту разделения спермы электрическим током. Было ясно, что опыты надо производить сразу в крупных размерах, чтобы получить достаточное количество спермы, так как проверить биологические результаты возможно лишь путем искусственного осеменения. Поэтому были изготовлены камеры М и х а э л и с а различных размеров. Эта камера представляет собою U-образный сосуд, оба вертикальных колена которого могут быть замкнуты кранами от горизонтальной части. Объем горизонтальной камеры взят для спермы лошади около 10 см, а для спермы кролика—около 5 см. В горизонтальное колено наливается разбавленная соответствующим образом сперма, а вертикальные колена наполняются тем же самым разбавителем при замкнутых кранах. В открытые концы вертикальных колен вставляются агаровые электроды. Затем краны открываются и через камеру пропускается ток обычно в 0,03 амп. при 110 вольт. Спустя полтора-три часа катафорез считается законченным, и для учета количества сперматозоидов, собравшихся в анодном и катодном коленах, измеряется в каждом количестве азота, находящегося в сперматозоидах.

Результаты этих опытов описаны В. Н. Шредер в ее четвертом сообщении («Биологический журнал», т. I, вып. 5—6 и в «Проблемах животноводства», 1933 г., вып. 1). При пропускании электрического тока через сперму действительно обнаруживается разделение. Часть сперматозоидов передвигается к катоду, а другая—к аноду, причем на обоих полюсах значительное количество сперматозоидов (иногда 100%) оказываются живыми и свободно движутся.

Эти опыты показали, что на распределение сперматозоидов между положительным и отрицательным полюсами большое влияние оказывает содержание водородных ионов в растворе. При кислой реакции (pH=4,1) из спермы лошади сперматозоиды свободно выходят в катодное колено, а большая часть спермиев вообще не выходит из горизонтальной части камеры, куда с самого начала помещается разбавленная сперма. Но при нейтральной реакции (pH=около 7) в обе стороны отходят почти равные количества сперматозоидов. В общем та же картина наблюдается и в опытах со спермой кроликов, где наилучшие выходы—100% живых сперматозоидов поровну в обе стороны—наблюдались именно при нейтральной реакции (pH=от 7 до 7,2).

То обстоятельство, что сперматозоиды в электрическом поле при той установке, которая обычно применяется для изучения катафореза, расходятся в противоположных направлениях, само по себе является за-

мечательным. Обычно считалось, что все живые клетки заряжены отрицательно и в электрическом поле идут к аноду. Будто бы лишь после смерти происходит перемена реакции: наблюдалось, что мертвые клетки переносятся к катоду, т. е. меняют свой при жизни отрицательный заряд на положительный, посмертный. Здесь же электрический ток разделяет сперматозоиды на две различные группы, из которых одна идет к аноду, а другая к катоду. Катодные сперматозоиды движутся не хуже анодных. В ряде опытов, в особенности со спермой кроликов, все 100% их живы и, как показали дальнейшие опыты, способны оплодотворить яйцевые клетки, причем из оплодотворенных таким образом яиц развивается живое и здоровое потомство.

По внешнему виду анодных сперматозоидов не удается их отличить от катодных. Но физиологическая разница между ними—противоположное отношение к электрическому полю—настолько велика, что говорит о глубоком, не случайном диморфизме между этими двумя сортами сперматозоидов. Было совершенно естественно выставить гипотезу, что этот физиологический диморфизм соответствует диморфизму между «мужскими» и «женскими» спермиями цитологов и генетиков.

Цитологи установили достаточно прочно, что половина сперматозоидов млекопитающих несет икс-хромосому, а другая игрек-хромосому. Как ни малы абсолютные размеры икс- и игрек-хромосом, этого различия, как доказывают генетики, совершенно достаточно для того, чтобы определить все порою весьма существенные половые отличия между взрослым самцом и самкой. Вполне допустимо предположить, что различие между икс- и игрек-хромосомами, незаметное в головке взрослого сперматозоида, обуславливает разницу зарядов мужских и женских сперматозоидов.

Существует ряд фактов, которые также позволяют предположить, что диморфизм сперматозоидов у животных сопровождается разницей в электрических зарядах их головок. У трех видов, далеко отстоящих друг от друга в систематическом отношении: у одного моллюска (*Turritopsis*), у жука (*Dytiscus*) и у двуутробки (*Didelphys*) наблюдалось любопытное спаривание сперматозоидов. Такие сперматозоиды свободно движутся своими жгутами, но головки их сцеплены. Конечно такие спаренные спермии не могут совместно оплодотворить яйцо, и действительно наблюдается, что спаренные спермии, попадая в иную среду по пути к оплодотворению, расклеиваются и становятся свободными. Было бы заманчиво предположить, что спаривание спермиев происходит вследствие противоположности электрических зарядов головок, а расхождение их вызывается переменной химической среды.

В. Н. Шредер в указанной выше работе склонна считать, что в сперме жеребца и кролика в сильно кислом разбавителе действительно происходит перезарядка электроположительных сперматозоидов в электроотрицательные. Возможно, что такую же перезарядку одного из каждой пары сперматозоидов указанных видов животных вызывает переход в ту среду, в которой происходит расклеивание спаренных спермиев.

Для проверки развиваемой здесь гипотезы могло послужить также изучение поведения в электрическом поле сперматозоидов таких животных, у которых цитологический и генетический диморфизм отсутствует, причем все спермии несут икс-хромосому, а пол определяется диморфизмом яиц. К этой группе относятся птицы. Для опыта была взята сперма павлина и петуха. При пропускании электрического тока все сперматозоиды пришли здесь, как и следовало ожидать, к одному полюсу—аноду. Никакого разделения не произошло.

Но конечно ни аналогия со спаренными спермиями, ни отрицательный результат разделения спермы куриных не могут разрешить проблемы. Необходимо было поставить решающие эксперименты с искусственным осеменением крольчих анодной и катодной порциями спермы.

Лаборатория быстро овладела несложной техникой искусственного осеменения кроликов. При тщательном подборе крольчих искусственное осеменение удавалось почти у всех. Пол новорожденных кроликов определялся с полной уверенностью трудно, и потому окончательное определение пола производилось лишь через месяц после рождения. Лишь в тех случаях, когда новорожденные кролики умирали, производилось вскрытие, при котором пол определяется легко.

Первый опыт дал яркие и, казалось бы, вполне достоверные результаты. Три крольчихи были осеменены тремя порциями спермы из камеры Михаэлиса: одна из анодного колена, другая из катодного и третья из горизонтальной части, содержащей неразделенную электрическим током сперму. Крольчиха, осеменная анодной порцией спермы, дала шесть крольчат исключительно женского пола. Крольчиха, осеменная катодной порцией, дала 5 крольчат, из которых четыре самца и одна самка. Крольчиха, осеменная смешанной неразделенной порцией спермы, дала половину самцов и половину самок.

Из этих результатов можно было вывести с очень большой вероятностью, что спермии, приходящие к аноду, являются «женскими» спермиями, т. е. содержат инд-хромосому, а спермии, приходящие к катоду— «мужские», содержащие игрек-хромосому. Вероятность того, что такое распределение полов в первом же опыте вывело простую случайностью, казалось ничтожно малой, как случайная выемка из урны, содержащей поровну черных и белых шариков, десяти одноцветных шариков из одиннадцати вынутых.

Эти первые результаты были опубликованы нами в советской и зарубежной печати и привлекли к себе внимание широких кругов. В статье американского «Журнала наследственности», о которой упоминалось выше, подвергнуты резкой критике бесчисленные предложенные до сих пор методы искусственной регуляции пола, но для намеренного нами метода сделано исключение и отмечена его теоретическая обоснованность. Указывалось только совершенно справедливо, что цифровые результаты еще недостаточны. Был однако один пункт в этом опыте, который тогда же заставил нас отнестись к нему с большим вниманием: катодная порция спермы оказалась не вполне чистой, так как 20%—у одной особи из пяти—она дала отступление от ожидаемого, т. е. самку вместо самца; значит даже в таком удовлетворительном опыте могут быть проскоки, и к мужским спермиям могут примешиваться женские. Необходимо было выяснить причину этого.

Теоретически можно представить себе ряд причин, по которым разделение электрическим током (методом катафореза мелких частиц, несущих различные заряды) может давать неполное и неправильное разделение. Прежде всего электрическое поле в камере Михаэлиса не так просто, как кажется—от анода к катоду. Стеклообразные стенки сосуда также заряжены, и движение по ним может происходить и в обратном направлении. К полюсам передвигаются с разной скоростью разнообразные ионы и взвешенные частицы—сперматозоиды. Благодаря гидростатическому давлению равновесие выравнивается, и в камере возникают различные течения по оси и по стенкам, которые могут увлекать с собою взвешенные частицы. В разных частях аппарата химический состав разбавителя может меняться и вызывать перезарядку сперматозоидов, пришедших к тому или другому полюсу. Наконец может происходить

агломинация разноименно заряженных сперматозоидов, причем группы склеенных сперматозоидов могут получить тот или иной общий заряд и увлекать к аноду наряду с отрицательными и некоторое количество положительно заряженных сперматозоидов, загрязняя результаты опытов. В разбавленной сперме такая агломинация действительно часто наблюдается, и под микроскопом можно видеть, что спермии млекопитающих сталкиваются головками и склеиваются попарно, как у названных выше моллюсков, жуков и двуустробок. Потом к парочке приклеивается головкой третий сперматозоид, и может возникнуть целый комок спермиев, склеенных головками, но подвижных. Какой заряд могут нести такие комки спермиев, предсказать нельзя, но по видимому и они могут переноситься током в ту или другую сторону. В некоторых случаях это—реакция необратимая, склеившиеся головки сперматозоидов изменяются химически, не могут вновь разделиться и не принимают участия в оплодотворении. Но реакция эта может быть в некоторых случаях обратимой, подобно тому как облигаторные парочки указанных выше трех видов при перемене среды снова освобождаются.

Кроме того не надо забывать, что сперматозоиды обладают самостоятельной подвижностью и обычно плывут против течения. В том сложном электрическом поле, которое имеет место в камере Михаэлиса, могут оказаться такие течения, по которым сперматозоиды могут пробираться активно независимо от их зарядов, загрязняя своим присутствием анодное и катодное колено камеры.

Эти соображения были подтверждены дальнейшими опытами 1933 г., описанными подробно в статье В. Н. Шредер («Биологический журнал», т. III, вып. 3, 1934 г.). В зимние месяцы 1933 г. было повторено искусственное осеменение крольчих анодной и катодной порциями спермы в тех же условиях (разбавитель Рингер Z^d , рН=7,2). Получено 60 крольчат. Анодная порция на 26 крольчат дала 20 самок (77%) и 6 самцов, а катодная на 34—23 самца (68%) и 11 самок. Таким образом теоретические предположения, основанные на первом опыте, подтвердились, хотя и не в столь яркой форме.

Однако опыты, проведенные летом в 1933 г., дали совсем иные цифры. При общем количестве потомков 58 штук на аноде получилось 30% самок и 70% самцов, а на катоде 55% самцов и 45% самок.

Цифры распределения полов, полученные на положительном полюсе, оказались обратными ожидаемым. Можно было заключить, что в самую постановку летней серии опытов был включен какой-то фактор, резко отличавший эту серию от зимней. Так как разбавитель был тот же самый, пришлось обратить внимание на температуру, при которой происходило разделение спермы. Обе серии ставились при комнатной температуре, которая записывалась. Зимняя серия проводилась при 10—14° Ц, летняя при 23—26° Ц.

Для проверки влияния этого фактора осенью и зимой 1933 г. были поставлены опыты, при которых разделение спермы производилось в термостате при определенных температурах в одном и том же разбавителе. Результаты опытов приведены в таблице 1, где дается процент самок и самцов в потомстве.

Эти опыты подтверждают высказанное предположение о наличии влияния температуры. При низких температурах (10° Ц), как и в первой серии, на положительном полюсе оказывается преобладание женских спермиев, а на отрицательном—мужских. А при повышенных температурах отношение обоих сортов сперматозоидов может получиться обратным: большинство мужских спермиев приходит к аноду, большинство женских—к катоду.

Таблица 1

Пол	Анодные спермии				Катодные спермии		
	10°	15°	24—25°	25°	10°	15°	24—25°
♀ . . .	83,3	52	25	0	16,7	13	80
♂ . . .	16,7	48	75	100	83,3	87	20

Опыт с тем же разбавителем Рингер Z^d при нейтральной реакции pH=7,08 и температуре 10° Ц был повторен летом 1934 г., чтобы проверить, нет ли каких-либо сезонных изменений, не зависящих от температуры. Здесь из 20 кроликов, родившихся от осеменения анодной спермой, 15 штук (75%) оказались самками и 5 (25%) самцами. Из 17 кроликов, родившихся от осеменения катодной спермой, 14 штук (82,3%) были самцами и 3 штуки (17,7%)—самками. Таким образом первоначальное предположение, что при данных условиях, осуществимых в любое время года, к положительному полюсу приходят преимущественно женские, а к отрицательному—преимущественно мужские спермии, подтвердилось полностью. В текущий зимний сезон этот опыт будет повторен в еще больших размерах, чтобы получить еще более крупные цифры потомства.

Все-таки 100-процентного разделения спермы на мужскую и женскую группу получено не было. Вследствие этого В. Н. Шредер поставила еще ряд опытов с разделением спермы кроликов в разнообразных разбавителях, при разных pH и при разных температурах. Так оказалось, что если разбавитель Рингер Z^d, давший наилучшие результаты, довести буферным гликоловым раствором до pH=5,14 (сильно кислая реакция), то при температуре 10° Ц в обеих порциях—и анодной и катодной—и мужских и женских спермиев

оказывается поровну. В опыте родилось 23 кролика: в анодной порции 3 самки и 3 самца, в катодной—9 самок и 8 самцов. Но при такой же кислой реакции pH=5,25, полученной путем прибавления фосфатного буфера (в кислой реакции фосфорнокислый кальций не выпадает) при той же температуре 10° Ц, из 40 крольчат, родившихся от осеменения анодной порцией, 25 (т. е. 62,5%) оказались самками. Отклонения гликолового разбавителя в щелочную сторону (pH=7,72) дает равномерное распределение мужских и женских спермиев как в катодной, так и в анодной порциях, в потомстве от этого опыта получено 65 кроликов.

Были испробованы и другие разбавители, и всего за лето 1934 г. от 70 самок, осемененных спермой, разделенной электрическим током, получен приплод 290 штук. Но более полного разделения, чем в описанном выше опыте с разбавителем Рингера Z^d при pH=7,08 и температуре 10° Ц, давшем 75% самок от анодной порции и 82,34% самцов от катодной порции, получено не было.

Однако мы еще не считаем работу с кроликами законченной, будем стремиться получить большие цифры при нашем лучшем разбавителе, а также пробовать и другие рецепты разбавителей.

Описанные опыты обнаруживают тонкую зависимость разделения сперматозоидов электрическим током на мужскую и женскую группу от ионного состава разбавителя, от его pH, от температуры. Отсюда естественно сделать вывод, что результаты опытов с разделением спермы кроликов ни в каком случае не могут быть распространены без специальных экспериментов на других животных и на человека.

Опыт с работой над кроликами показал, что надо планировать такие эксперименты на несколько лет, чтобы перед началом следующего случайного периода учитывать результаты биологической проверки прошлого года.