

Реакция Маноилова в свете современной критики ¹⁾.

Пр.-доцента А. Д. Гусева.

В 1923 году Маноилов сообщил об открытой им химической реакции, при помощи которой можно отличить кровь мушны от женской. Вполне понятен тот глубокий интерес, который был вызван этим сообщением. За последние годы целый ряд работ был посвящен реакции Маноилова, но только в самое последнее время, когда несколько улеглось увлечение этой пробой, химизм реакции до известной степени выяснился.

Маноилов предложил три модификации своей реакции, но предпочтение, по его словам, должно быть отдано последнему, третьему видоизменению, как дающему наиболее верные результаты. Реактив, применяемый для этой модификации, состоит из пяти отдельных растворов, постепенно прибавляемых к эмульсии крови, или к раствору сыворотки, приготовленным по определенному стандарту.

Автор приготавливал эмульсию крови из сгустка, разбалтывая его в 4—5 объемах физиологического раствора NaCl до получения полупрозрачной смеси, из которой и делал дальнейшие разведения, приблизительно до цвета 50% раствора гемоглобина. К 2—3 куб. сант. полученной эмульсии прибавляется, в порядке постепенности, 10 капель 1% водного раствора папайотина Merc's'a, 2—3 капли 10% спиртового раствора дали (Grübler), 10 капель 1% водного раствора $KMnO_4$, 3 капли 40% раствора HCl и 5 капель 2% раствора тиозинамина. Если была взята эмульсия женской крови, то смесь остается окрашенной в лилово-коричневый цвет, если же кровь была мужская, то смесь обесцвечивается.

Маноилов получал в результате исследования крови 3000 людей 88,6%, а с применением корректуры—96% верных ответов. Таким образом в руках автора реакция эта давала настолько ясные указания, что он не мог сомневаться в полной пригодности ее для практических целей. Даже полученные автором ошибки еще более утверждали его в таком мнении; так, напр., в первом ряде своих опытов с кровью коров Маноилов в большом % получил мужскую реакцию, причем оказалось, что все давшие мужского типа реакцию коровы были стельны, и плод у всех был бычек.

Первым, проверившим методику Маноилова, был Егоров. В результате своих исследований он пришел к выводу, что реакция

¹⁾ Доложено в заседании Физиологической Секции О-ва Врачей при Казанском У-те 2/III 1927 г.

Маноилова неточна, дает только около 62% правильных ответов и поэтому непригодна для практических целей. Но Егоров нестрого придерживался правил Маноилова,—при его опытах отсутствовала стандартизация реактивов и эмульсии, и вместо папайотина он применял пенисин. Все это, вместе с небольшим числом опытов Егорова, было поставлено ему в вину, и его критическое отношение к пробе совершенно затерялось в ряде отзывов других авторов, получивших вполне удовлетворительные результаты с реакцией Маноилова.

Сюда следует отнести проверку реакции Маноилова, произведенную Исаевой, Щегловой, Гуревич, Поповым, Лифшиц, Соловцовой—с кровью, и работы S. Jatin'ой, а также Грюнберг, с растениями. Все эти исследователи были вполне удовлетворены полученными результатами; в то же время они пытались научно обосновать реакцию Маноилова.

Прежде всего у них возник вопрос о связи реакции с половыми гормонами, оказывающими столь сильное влияние на весь организм животного. Маноилов сам сделал предположение, что результаты его реакции зависят от этих гормонов. Клинические наблюдения, а затем и ряд опытов, казалось, вполне подтверждали это предположение. Так, реакция Маноилова (которая в дальнейшем везде будет обозначаться нами, для сокращения, буквами RM) получается наиболее типичной с кровью нормальных людей в расцвете сил, у стариков же и детей она нетипична.

Особенно интересны в этом отношении наблюдения д-ра Феокритовой, получившей целую гамму цветов при RM с кровью 180 детей в возрасте от 9 до 15 лет. Феокритова отметила, что вполне типичная RM получается у нормально развитых детей старшего возраста, из чего она и сделала вывод, что RM зависит от количества гормонов в крови, и ею можно пользоваться для установления степени сексуального развития ребенка.

С другой стороны Попов у глубоких стариков всегда получал нетипичную RM, из чего, а также на основании своих опытов над кастрированными кроликами и кроликами с пересаженными половыми железами, он тоже пришел к заключению, что RM находится в связи с продукцией половых гормонов.

Такая же связь обнаружилась и в опытах Опделя. У него 6 кастрированных самцов стали давать или нетипичную мужскую, или женскую RM. При пересадке же яичек старым, а также кастрированным самцам, у них вновь стала получаться типичная RM, а у двух кастрированных самок—нетипичная мужская реакция после пересадки яичек превратилась в типично-мужскую.

Вполне согласовались с этим и результаты наблюдений д-ра Орлова над 4 гомосексуалистами, кровь которых давала ему обратного типа RM, в чем Орлов видел проявление нарушения половых факторов. Но Орлов отмечает, что RM не является только отражением деятельности половых желез, а указывает еще на какие-то глубокие биохимические явления. В параллель с этим надо отметить, что и Попов, кроме влияния на RM половых гормонов, указал на связь ее с окислительными процессами организма, менее интенсивными у стариков и женщин. Такую связь Попову удалось подтвердить исследованием крови

133 терапевтических больных,—у больных мужчин при понижении окислительных процессов RM получалась женского типа, а у лихорадящих женщин—мужского типа.

Особенно горячей сторонницей гипотезы о непосредственной связи RM с половыми гормонами является д-р Соловцова. При своих опытах Соловцова подметила, что RM изменяется под влиянием K и Ca как *in vivo*, так и *in vitro*, что она объясняет двухфазным действием гормонов под влиянием электролитов. Далее, Соловцова указывает, что RM изменяется под влиянием специфических гормонов в зависимости от количественных отношений,—она получается только с кровью, плацентой и слабо с мочей, но не получается с вытяжками из органов и мышц (?), в которых, по Loeuwe, нет половых гормонов. Белок, по мнению Соловцовой, только активизирует действие гормона.

Выводы Соловцовой как будто-бы несколько противоречат сущности RM. Если связь последней с половыми гормонами находит некоторое подтверждение в опытах с животными и растениями, то отчего же может зависеть получение ее с кристаллами неорганических тел, в которых безусловно нет гормонов? Между тем автор реакции и с кристаллами получил типичную реакцию, именно, он нашел, что вещества, кристаллизующиеся в формах куба и додекаэдра, дают мужскую RM, кристаллы же ромбической формы—женскую. Такое явление явно противоречит заключению о непосредственной связи RM с гормонами.

С другой стороны наблюдения Маноилова и Грюнберг показали, что RM получается только с неподогретыми эмульсиями крови или вытяжками из растений. В опытах Грюнберг нагревание вытяжек до 60°, продолжительное хранение их, действие на них CaF_2 и сернистого ангидрида—нарушало ход реакции: мужская вытяжка не обесцвечивалась, и реакция была одинаковой с вытяжками обоих полов. Эти данные как будто-бы подтверждают возможность связи RM с половыми гормонами.

В общем гипотеза о такой связи RM с половыми гормонами была принята большинством авторов, почему RM и была выдвинута в качестве реакции, определяющей нормальное состояние половых желез. Так, напр., проф. Брейтман указывает, что она служит ценным подспорьем для диагностики инкреторной недостаточности половых желез.

Если вполне согласиться с мнением Соловцовой, что RM исключительно связана с половыми гормонами и изменяется в зависимости от количественных отношений гормонов, циркулирующих в крови, то становится непонятным, почему мужская кровь, взятая в концентрации, предлагаемой Маноиловым, дает мужскую реакцию, а если ту же кровь взять в несколько большей концентрации, то получается негипичная реакция, несмотря на то, что количество гормона, вступающего в реакцию, в последнем случае будет большим. Оппель, исходя из этого факта, делает определенный вывод, что RM не есть реакция на половой гормон.

Как мы уже упоминали, первоначальное увлечение RM в самое последнее время сменилось более критическим отношением к ней, и, вместе с этим, начались попытки выяснения химической стороны реакции. Результаты этих попыток особенно интересны, ибо они более выясняют сущность RM, чем теория связи ее с половыми гормонами.

Особенно детальной критике подверглась РМ на II Всесоюзном Съезде Физиологов, бывшем в 1926 г. Галвяло, Владимиров, Виноградов и Оппель в своих опытах определяли роль всех в отдельности составных частей РМ. При этом названные авторы, считая капельный метод слишком неточным, перешли к несколько видоизмененной методике Попова с определением объемных отношений составных элементов реакции.

В то время, как Маноилов придает большое значение папайотину, расщепляющему белковую молекулу, названные авторы своими опытами доказали, далее, что такое расщепляющее действие папайотин производит только при t° от 80 до 90°, а при температурных условиях РМ переваривающее действие его столь незначительно, что он не может оказать существенного влияния на исход реакции, и применение его не необходимо. Сущность реакции, по мнению авторов, заключается в том, что KMnO_4 в кислой среде быстро окисляет далию, которая при этом обесцвечивается. В присутствии веществ, которые окисляются легче, чем краска, небольшого количества KMnO_4 может не хватить на окисление далии, и исследуемая жидкость при этом не обесцветится. HCl необходима потому, что окисление происходит энергично только в кислой среде. Наконец, тиозинамин необходим потому, что он редуцирует образующуюся при реакции и выпадающую в виде темн-коричневого осадка перекись марганца.

Кроме того, авторы показали, что РМ неспецифична и получается с целым рядом других веществ, способных легко окисляться KMnO_4 . К таким веществам авторы относят белки, гемоглобин, фенол и его дериваты, причем главную роль в этом отношении играют некоторые группы веществ, именно, тирозин, триптофан, дериваты пиррола (пролин, оксипролин) и целый ряд других веществ.

Авторам удалось доказать и полную пропорциональность между концентрацией применяемого для исследования вещества и количеством KMnO_4 , необходимым для обесцвечивания далии в условиях РМ.

В заключение авторы приходят к выводу, что РМ неспецифична, результаты ее изменяются в зависимости от концентрации исследуемого раствора и реактивов, и задержка обесцвечивания далии стоит в связи с преимущественным окислением тирозиновых, пиррольных и триптофановых групп белка. По мнению авторов такие вещества, которые входят в исследуемую жидкость в незначительном количестве (напр., аминокислоты и гормоны), не оказывают никакого влияния на исход РМ.

К таким же выводам пришли Шмидт и Перевозская. Они указывают, что РМ не может зависеть от действия половых гормонов, так как 1% раствор KMnO_4 , применяемый для нее, является столь сильным окислителем, что под влиянием его гормоны мгновенно разрушаются, не успев проявить характерного для них действия. Шмидт и Перевозская указывают на исследования Callisto, пришедшего к заключению, что РМ неприменима для определения пола даже при самом строгом соблюдении методики Маноилова и употреблении химически-чистых реактивов. Между прочим Callisto при исследовании цельной крови морской свинки получил РМ женского типа, а при исследовании одной только плазмы крови той же свинки — мужского типа. Этот факт Callisto объясняет, конечно, не наличием мужского гормона

в сыворотке и женского—в цельной крови, а тем, что цельная кровь богаче органическими веществами.

Шмидт и Перевозская получили правильные результаты при RM только в пределах от 50 до 60%. Они поставили ряд опытов с разными разведениями сыворотки и эмульсии крови барана и овцы, причем оказалось, что в зависимости от степени разведения, т. е. от количества белков, как у овцы, так и у барана получалась то мужская, то женская RM. Затем авторы исследовали удельный вес сыворотки людей и кроликов и получили разницу его для мужского и женского пола. Так, удельный вес мужской сыворотки приблизительно равен 1,024—1,029, причем в большинстве мужские сыворотки имеют удельный вес 1,025—1,027; удельный же вес женских сывороток колеблется в пределах от 1,025 до 1,031, причем большая часть этих сывороток имеет удельный вес 1,028—1,029. Параллельно с колебаниями удельного веса идет и различие в количестве белков сыворотки, причем в женской крови их на 8,5% больше, чем в мужской, в чем авторы и видят причину различного исхода RM.

Приблизительно к таким же результатам пришли Alstersberg и Hakansson. Они проверили RM на большом количестве материала, взятого как от животных, так и от растений, и пришли к совершенно неутешительным выводам. Механизм реакции они освещают совершенно так же, как и Галвяло, Владимиров и др., причем тоже отмечают, что папайотин не играет той роли, которую приписывает ему Маноилов. Разбираемая реакция, по мнению авторов, есть количественная, а не качественная, зависит исключительно от способности органических тел редуцировать KMnO_4 и не находится ни в какой связи с половыми гормонами.

Реакция, далее, неспецифична и для органических веществ,—добавлением к смеси реактивов Маноилова 2% водного раствора Natriumbisulfit в разных количествах Alstersberg и Hakansson получили все оттенки реакции от бесцветного до густо-фиолетового. Колебания в количественных соотношениях реактивов совершенно изменяли, затем, ход реакции. Так, напр., увеличение числа капель давали превращало мужскую реакцию в женскую, а увеличение числа капель KMnO_4 —действовало обратным образом. На основании целого ряда опытов авторы, наконец, пришли к заключению, что RM не дает возможности определять пол животного.

Подобная же оценка была дана RM Schratz'ем. Папайотин, по его мнению, играет совершенно ту же роль, что и белки крови и никакого расщепляющего действия не производит. Между прочим, Schratz'y, путем введения в RM различного числа капель папайотина, удалось при отсутствии крови получить все переходные оттенки реакции от мужского до женского типа.

Определяя схему хода RM, Schratz производит расчет на единицы редукиции, причем считает, что введенное Маноиловым количество KMnO_4 способно окислить 50 единиц редукиции (другими словами—содержит в себе 50 окислительных единиц). В связи с этим Schratz указывает, что женская кровь содержит в объеме, применяющемся для RM, 45 RE (редукц. единиц), мужская—35 RE, а папайотин—10 RE. Из этой схемы ясно вытекает ход реакции,—если взять только женский

экстракт или кровь с их 45 RE и добавить 50 OE (окислительных единиц) KMnO_4 , то оказывается избыток окислителя, и происходит обесцвечивание далии. Если, далее, к женскому экстракту добавить папайотин с имеющимися у него 10 RE, то 50 единиц KMnO_4 окажется недостаточно для окисления получившихся в смеси 55 RE, и смесь останется окрашенной. Мужской экстракт вместе с папайотином имеет только 45 RE, т. е. такое количество, которое заключается в одном женском экстракте без папайотина, почему далия и здесь будет обесцвечена.

На основании своих опытов Schratz заключает, что RM не должна применяться для установления пола, имеет только сравнительное значение, а все, сделанные ранее, выводы, относящиеся к этой реакции, должны подвергнуться тщательной проверке.

Итак более точные испытания RM лишили ее того значения, которое придавали ей Маноилов и его сторонники. RM не есть реакция на пол, а только реакция на количество белка. Опыты, поставленные в нашей лаборатории, дали результаты, совершенно совпадающие с этими выводами. Нами была исследована кровь 9 мужчин и 7 женщин, причем RM ставилась с кровью каждого субъекта в среднем не менее 5 раз.

Реактивы были сначала приготовлены нами точно по указаниям Маноилова, только папайотин был фабрики Gehe, а не Grüber'a, но затем пришлось несколько видоизменить концентрацию растворов.

Разведения крови готовились сначала по указаниям Маноилова таким образом, что сгусток крови взбалтывался и размешивался стеклянной палочкой в 4—5-кратном объеме физиологического раствора NaCl , а затем полученная эмульсия вновь разбавлялась физиологическим раствором до получения цвета 50% раствора гемоглобина, причем % гемоглобина определялся с помощью гемоглобинометра Ehrlich-Tálikuist'a. Такое разведение крови, независимо от пола, всегда давало нам RM женского типа, почему в дальнейшем насыщенность растворов крови определялась нами, согласно указаниям Маноилова, по определенным стандартам мужской и женской крови. Стандарт мужской крови имел несколько более бледную окраску, чем стандарт женской крови, что получилось и у Маноилова, и что он считает вполне естественным. С такими разведениями, приготовленными по стандартам, нам удалось получить реакции типичные как для мужчин так и для женщин.

Точно также нам пришлось опытным путем в дальнейшем определить и число капель реактивов. Наиболее отчетливые результаты получались при применении реактивов в следующих отношениях: папайотина 10 gtt, далии—5 gtt, KMnO_4 —7 gtt, HCl —9 gtt и тиозинамина—10 gtt. При применении 40% HCl (как это рекомендует Маноилов) всегда получалась, даже и с женской кровью, реакция мужского типа, почему пришлось вместо 40% HCl применять 5% (по весу) раствор кислоты, как это указано в работе Галвяло и др.

При этих условиях, если эмульсия крови бралась в количестве 3 куб. сант., RM всегда давала точные указания, но при изменении концентрации эмульсии крови результаты реакции тоже менялись, и из одной и той же крови удавалось получать все цветовые оттенки от типично-мужской до типично-женской RM.

Изменение числа капель далии тоже значительно влияло на исход реакции, а именно, при увеличении числа капель этой краски получалась женского типа RM и с мужской кровью.

Изменение числа капель KMnO_4 действовало обратным образом. Реакция без папайотина шла обычным порядком.

Кроме исследования свежей крови, нами была поставлена РМ и с хранившейся 14 лет сухой кровью коровы, а также с кристаллическим гемоглобином. С обоими этими веществами в крепких растворах (насыщенные растворы, разведенные равным количеством физиологического раствора NaCl) была получена РМ женского типа, при постепенном же разведении растворов окраска смеси делалась все более и более бледной, и, наконец, получался мужской тип реакции (приблизительно при разведении насыщенного раствора гемоглобина в 6 раз).

Два последних опыта с несомненностью показывают, что РМ не находится в связи с половым гормоном, так как нельзя предполагать существования такового в кристаллическом гемоглобине или в очень старой крови.

Таким образом и наши опыты приводят к тем же заключениям, — что РМ есть реакция количественная, а не качественная. Параллельно с изменением количества редуцирующих веществ она меняет свой характер, а так как в объектах судебно-медицинских исследований эти вещества находятся в неопределенных количествах, в зависимости как от времени хранения крови, так и от различных внешних влияний, то отсюда естественно вытекает сомнение в пригодности РМ для судебно-медицинских целей. Сомнение это должно еще более усиливаться, если принять во внимание указания Кузнецова, что кровь, взятая у одного и того же животного, но из разных частей тела, дает различный тип РМ.

Л И Т Е Р А Т У Р А.

- 1) Маноилов. Врач. Газ., 1923, №№ 15, 21, 22.—2) Егоров. Ibid., № 24.—3) Исаева. Ibid., 1924, № 14.—4) Щеглова. Ibid., № 5.—5) Гуревич. Ibid., 1923, №№ 15, 22; 1924, № 1.—6) Попов. Совр. Хир., 1924.—7) Он же. Журн. для усоверш. врачей, 1926, № 1.—8) Лифшиц. Врач. Газ., 1925, №№ 15—16.—9) Она же. Журн. для усоверш. врачей, 1926, № 1.—10) Соловцова. Реакция Маноилова, ее биологическое значение и перспективы. Ленинград, 1927.—11) S. Jatina. Цит. по Соловцовой.—12) Грюнберг. Врач. Газ., 1924, № 5.—13) Феокритова. Цит. по Соловцовой.—14) Орлов. Цит. по Соловцовой.—15) Брейтман. Болезни органов внутренней секреции, 1926.—16) Оппель. Эндокринологические хирургические наблюдения, 1926.—17) Galwjaló, Wladimirow, Winogradow und Oppel. Biochem. Zeitsch., Bd. 176, H. $\frac{1}{3}$.—18) Schmidt und Perewosskaja. Ibid., Bd. 176, H. $\frac{1}{3}$.—19) Alstersberg und Hakansson. Ibid., Bd. 176, H. $\frac{4}{6}$.—20) Труды II Всесоюзного Съезда Физиологов. Ленинград, 1926.