

## К вопросу о применении реакции Манойлова для определения пола внутриутробного плода.

Д-ра А. П. Чигарина.

Половой диморфизм является крайне важной и интересной проблемой биологии за последние 25 лет. Открытие Mac Kleen'ом и Wilson'ом (в 1905 г.) X-хромозомы и количественной разницы хромозом в яйцевой клетке и сперматозоиде у клопа *Anasa tristis*, дающих при копуляции то четную комбинацию, то нечетную и предопределяющих этим в дальнейшем развитие то самки (22 хромозомы), то самца (21 хромозома), открытие Weichardt'ом возможности путем перекрестной иммунизации отличать кровь человека от крови человекообразных обезьян, а также мужскую кровь от женской, при высокой степени их разведения, известная разница между мужской и женской кровью по количеству эритроцитов (Nägeli), их оседаемости (Faerheus) и вязкости (Detterman), по Ph и содержанию белка и коллоидных веществ, т. е. по биохимическому составу, а также по общему количеству крови (Rattman),—все эти факты подтверждают, что мужской организм биологически резко отличается от женского. При этом работы последних лет в области эндокринологии определенно указывают, что отмеченная разница зависит от желез внутренней секреции и главным образом от половых желез (Воронов, Steinach, Завадовский и др.), гормоны которых поступают в кровь. Последняя, являясь передатчиком всего совершающегося в организме, как зеркало, отражает все мельчайшие изменения в нем, что подтверждается повседневно клиникой и экспериментом. В частности беременность у женщины, вызывая разнообразнейшие изменения всего организма, между прочим, ведет к ряду изменений и в крови, причем в числе этих изменений уже а priori можно ожидать встретить и такие, которые зависят от функции половых желез плода. Кроме того и прямыми наблюдениями (Hirsch) установлено, что биологические взаимоотношения между матерью и плодом мужского пола совсем иные, нежели между матерью и плодом женского пола: беременность мальчиком предьявляет большие требования к организму матери, чем беременность девочкой. — быть может, именно вследствие включения в организм матери чуждой железы, железы, которая по многим работам последнего времени действует антагонистически и до некоторой степени угнетает женский организм (Biedl). Отсюда вытекает, что пол утробного плода может быть установлен путем исследования крови беременной, именно, путем открытия в ней тех изменений, которые вызываются циркулирующими в ней гормонами, с одной стороны, мужских половых желез плода, с другой—женских. Попытку установить колориметрически эти изменения и представляет реакция Манойлова.

Еще до Манойлова, опубликовавшего свою реакцию в 1923 году, Dewitz, в 1917 году, применял для определения пола следующий способ: он брал куколок бабочек мужского и женского пола, после предварительного удаления у них кишечника и затем высушивания растирал их в порошок, определенное количество такого порошка (0,15—0,2 гр.) смешивал с определенным количеством (25 к. с.) 0,001<sup>0</sup>/<sub>0</sub> раствора метиленовой синьки и к этой смеси прибавлял некоторое количество толуола. В ближайшие же дни происходило обесцвечивание раствора, но с неодинаковой быстротой,—раствор из тканей самцов обесцвечивался быстрее, чем раствор, взятый из тканей самок. Способ этот был проверен на куколках четырех различных видов бабочек.

Д-р Манойлов предложил для отличия пола также цветовой способ, при котором, под действием одних и тех же реактивов, мужская кровь дает полное обесцвечивание, а женская—темную лилово-коричневую окраску. После ряда проверочных работ с различными реактивами в разнообразных комбинациях (Манойлов работал над этим вопросом 23 года, причем им было выработано более 30 различных модификаций) он остановился на реакции с пятью реагентами: папайотином, далее, марганцевокислым кали, соляной кислотой и тиозинамином, причем в качестве испытуемого материала бралась не гемолизированная и не активированная кровь. С этой модификацией им было обследовано 530 проб мужской и женской крови и получено от 80%—90% правильных ответов, определяющих пол. Реакция была, далее, испробована им и на растениях, причем Манойлов исходил из факта, установленного Ненцким, Мархлевским и Залесским, что гемоглобин и хлорофилл имеют общее происхождение из химического ядра индиговой группы красок; исследования на растениях дали результат подобный результату с кровью животных и людей: цветы мужского пола давали обесцвечивание, цветы женского пола—темную лилово-коричневую окраску. Мало того, данная реакция была Манойловым проверена и на минералах, причем оказалось, что минералы, кристаллизующиеся различным образом, давали с указанными реактивами различные результаты: минералы, кристаллизующиеся в форме куба и додекаэдра, стереотипно давали обесцвечивание, как бы „мужскую“ реакцию, дающие же кристаллы ромбической системы не обесцвечивались, давая „женскую“ реакцию. Далее, кислые химические растворы давали мужскую реакцию, а щелочные—женскую. Таким образом, по словам Соловцовой, „был найден ключ, которым открываются врата трех царств природы“.

При проверочных опытах д-ром Манойловым было отмечено еще один неожиданный факт: получив однажды с бойни около 100 проб крови быков и коров и проделав с ними свою реакцию, Манойлов получил у коров большой процент „мужских“ ответов. Проверив затем на бойне записи, он заметил, что в тех случаях, когда реакция у коров давала „мужской“ ответ, они были стельны бычком. Факт этот побудил Манойлова применить реакцию для определения пола плода по крови беременной матери. При этом методика реакции в дальнейших исследованиях была изменена, а именно, кроме вышеуказанных реактивов был введен еще один реактив, именно, эскулин, после применения дали.

Щеглова, изучив реакцию под руководством самого Манойлова. на 436 пробах крови, взятой из пуповины, получила 88,1<sup>0</sup>/<sub>0</sub> правильных

ответов. При проверочной работе Пречистенской с кровью из пуповины получилось, однако, лишь 79% верных ответов, 8% неясных и 13% неправильных (нужно отметить, что Пречистенская работала с зеленой метиловой краской). Сам Манойлов, исследовав кровь рожениц за 5—6 часов до рождения ребенка (в 44 сл.) и за неделю до родов (в 8 сл.), получил 77% правильных ответов. Конъюхас, исследовав 123 беременных женщины в различных периодах беременности, получил с реакцией Манойлова 72,7% правильных ответов. Гуревич, исследовав 60 случаев, из них 37 в начале родовой деятельности и 23—в последнее время беременности, получила в первой группе 4 неправильных ответа, а во второй — 3, в общем же 89% правильных ответов.

Методика реакции Манойлова в ее окончательной модификации такова: кровь беременной разводится до цвета 3% раствора  $\text{Hb}$  физиологическим раствором поваренной соли, 3 куб. с. этого разведения крови наливается в пробирку, и к нему прибавляются реактивы в следующем порядке и количестве: 1) 1% водный раствор папайотина (пепсина), свежеприготовленный и профильтрованный, в количестве 10 капель, причем после прибавления папайотина пробирка поворачивается между ладонями, и жидкость осторожно смешивается; 2) 1% спиртовый раствор далии — в количестве 3 капли, причем после прибавления пробирка осторожно встряхивается; 3) 1% водный раствор эскулина, подогретый до растворения, — 6 капель; после прибавления пробирка опять осторожно встряхивается; 4) 1% водный, свежеприготовленный за 1 час до производства реакции, раствор марганцевокислого кали в количестве 10 капель; после прибавления пробирку опять надо встряхнуть; 5) 3 капли раствора соляной кислоты, после прибавления которой пробирку снова надо хорошо встряхнуть; наконец, 6) 5 капель 1% или 2% водного раствора тиозинамина, хорошо профильтрованного; после прибавления пробирку следует встряхнуть еще сильнее.

При плоде мужского пола получается полное просветление смеси, при наличии плода женского пола реактивная жидкость приобретает вишневофиолетовый цвет. Манойлов и другие, работавшие с его реакцией, рекомендуют иметь стандартные разведения крови, чтобы, сравнивая с ними, производить соответственные разведения свежеполученной крови.

В вышеописанную методику разведения крови нами было введено некоторое изменение, а именно, я беру 8 одинакового размера, стерильных, чистых даже от волосков ваты пробирок и в каждую пробирку наливаю по 3 куб. с. физиологического раствора поваренной соли, затем в 4 из этих пробирок берется кровь из пальца после укола иглой Frank'a, по 3 равных капли величиной со среднюю горошину в каждую пробирку, и одна пробирка оставляется про запас, вторая — для контроля, т. е. для производства реакции без эскулина, третья — для реакции с эскулином, в четвертую же пробирку с кровью наливается 3 куб. с. физиологического раствора поваренной соли из пробирки № 5, перемешивается, потом 3 куб. с. перемешанной разбавленной крови переливается обратно в пробирку № 5, последняя вновь доливается 3 куб. с. физиологического раствора из пробирки № 6 и перемешивается, после чего 3 куб. с. перемешанной крови из пробирки № 5 отливается обратно в пробирку № 6 и т. д. Таким образом мы получаем различные разве-

денция крови в пробирках от № 3 до № 8 в нисходящей степени, по цвету соответствующие 3% раствору гемоглобина и меньше. Прodelывая реакцию М а н о й л о в а во всех этих пробирках, мы получаем различные цветовые результаты и таким образом в состоянии бываем судить не только о характере реакции, но и о степени ее, которую обозначаем крестиками; реакция, закончившаяся во всех пробирках одинаковым цветовым эффектом мужского (цвет светлого портвейна), или женского типа (от рубиново-вишневого до густо-фиолетового с коричневым оттенком), обозначается 4 крестиками, в случаях уменьшения цветового эффекта и реакция обозначается меньшим количеством крестиков.

Всего нами реакция для определения пола плода была проделана у 62 беременных, находившихся в разных стадиях беременности—от 3-х мес. до конца, причем после появления плода на свет пол его определялся—частью путем осмотра наружных гениталий (у более зрелых плодов), частью путем гистологического исследования половых желез (у плодов 3-х и 4-х месяцев развития). Результаты исследования могут быть представлены в виде таблицы (стр. 891), в которой неверные результаты отмечены цифрами, поставленными в рамку, верные—цифрами без рамки.

Как видно из данных таблицы, из 62 наших случаев правильны ответы получались в 50 (80,7%), неправильные — в 12.

Известный интерес представляют 6 случаев, где реакция была проделана нами для определения пола плода у рожениц в периоде потуг и прорезывания головки. Два раза она ставилась в один и тот же день и час с кровью от двух рожениц, причем получались типичная женская и типичная мужская реакции; когда же происходили роды,—оказывалось, что там, где реакция была мужская, родилась девочка, и наоборот. После этого реакция нами вновь была поставлена с целью проверки, в 2 случаях также в период родовых потуг, и результат получился такой же. Эти 6 случаев мы затруднились внести в приведенную выше таблицу, считаясь с возможностью, что во время родовых потуг биохимические свойства крови матери и плода изменяются, почему кровь дает извращение реакции.

Не внесли мы в таблицу также случай родов 2-яйцевыми двойнями, в котором реакция М а н о й л о в а дала окраску ж. + +, а родилась девочка и мальчик.

Кроме указанных в таблице случаев, реакция была нами испробована с кровью беременных в самых ранних стадиях беременности (на I—II месяцах) и параллельно—с кровью безусловно небеременных женщин, вне и во время регул. Результаты реакции у тех и других совпадали, причем были преимущественно типично-женскими; поэтому от применения реакции для определения ранней беременности нам пришлось отказаться. Наконец, реакция М а н о й л о в а (с эскулином же) проделывалась нами и у родильниц, у которых она, будучи поставлена до родов, дала правильные ответы. При этом отмечался следующий факт: у родивших девочку женская реакция оставалась и после родов без изменения, у родивших же мальчика в первый день после родов она оставалась также без изменения, т. е. была мужской, но уже на 4-й и 5-й день постепенно превращалась в женскую.

Касаясь сущности реакции М а н о й л о в а, необходимо отметить, что среди авторов, работавших с нею, имеются два мнения: одни (С о-



ловцова, сам Манойлов) полагают, что реакция эта связана непосредственно с наличием того или другого полового гормона и есть реакция качественная, биологическая, другие же (Галвяло, Владимиров, Виноградов, Оппель, Шмидт, Перевозская, Alsterberg, Hakansson, Schratz, Гусев) считают эту реакцию количественной, чисто-химической, зависящей от того или иного содержания белка в среде.

Для выяснения этого вопроса нами были поставлены опыты с воздействием реактивов Манойлова (в том числе с эскулином и без него) на настойку сухих препаратов яичка и яичника фирмы Мерск'а, на растворы овариолизата и тестолизата, приготовленные по способу проф. Тушнова, и на раствор спермина Колосова.

Реакция с настойками сухих препаратов яичка и яичника на физиологическом растворе поваренной соли не дала нам выраженного результата, почему в дальнейших опытах мы применили расщепление сухих препаратов ферментами: папайотином и пепсином—то в присутствии соляной кислоты, то без нее; в некоторых опытах мы брали и только соляную кислоту без ферментов.

Первая серия опытов такова: в стерильные пробирки помещались сухие препараты яичка и яичника Мерск'а в количестве 0,02 на пробирку, затем в пробирку наливалось по 3 куб. сант. физиологического раствора с 30 каплями 1% раствора папайотина, и пробирки ставились в термостат на сутки при 37° С. Пред прибавлением реактивов смесь фильтровалась. Результаты получились следующие: с препаратом яичка реакция Манойлова без эскулина дала полное просветление; с тем же препаратом реакция Манойлова с эскулином дала грязно-малиновую окраску с вишневым оттенком; с препаратом яичника р. Манойлова без эскулина дала окраску цвета светлого портвейна; с препаратом яичника от реактива Манойлова с эскулином получилось густое фиолетовое окрашивание.

Вторая серия опытов заключалась в следующем: брались сухие препараты яичка и яичника Мерск'а, по 0,02, в стерильные пробирки; далее в каждую пробирку добавлялось по 2 к. с. 1% раствора папайотина; затем пробирки ставились в термостат при 96° С. на 2 часа, после чего перемещались в другой термостат, где и находились при 37° С. в течение 1½ суток. В первом термостате пробирки держались потому, что в литературе имеются указания, будто папайотин наибольшую ферментативную энергию развивает именно при 96° С. (Виноградов, Владимиров, Оппель). Результаты получились следующие: с препаратом яичка реакция без эскулина дала розово-вишневую окраску, с тем же препаратом с эскулином—насыщенную вишневую окраску с рубиновым оттенком, с препаратом яичника без эскулина получился цвет светлого портвейна, с тем же препаратом с эскулином—насыщенный вишневый цвет с рубиновым оттенком.

Зная, что соляная кислота действует на белки расщепляющим образом, мы поставили, затем, третью серию опытов—с сухими препаратами яичка и яичника Мерск'а после предварительной обработки их соляной кислотой с пепсином и без пепсина (последний рекомендуется Манойловым, как заменяющий папайотин). Опыты были проделаны в следующем виде: в стерильные пробирки брались сухие препараты яичка

и яичника Мерска по 0,02, и к ним добавлялось в одном ряде пробирок по 5 капель 40% соляной кислоты, в другом ряде по 10 капель такого же раствора ас. muriatici, и в третьем ряде в пробирки, кроме сухих препаратов и соляной кислоты в тех же дозах, добавлялся физиологический раствор поваренной соли в количестве 3 куб. сант. Все пробирки ставились на сутки в термостат при 37° С. Через сутки жидкости в пробирках фильтровались, а затем с ними проделывалась реакция Манойлова с эскулином и без него. Результаты получались везде одинаковые, а именно, везде получилось просветление лишь с небольшим желтоватым оттенком, за исключением пробирок с сухим препаратом яичника и 5 каплями 40% соляной кислоты, где получилась ярко-оранжевая окраска, исчезающая через 10 минут.

Четвертая серия опытов, в которых к сухим препаратам яичка и яичника в тех же дозах, кроме 5 кап. 40% ас. muriatici, добавлялось еще по 30 кап. 1% водного раствора пепсина, а затем, после суточного стояния в термостате при 37° С., — 3 куб. с. физиологического раствора, дала следующие результаты: с препаратами яичка реакция Манойлова как с эскулином, так и без эскулина дала полное просветление, с препаратом яичника от реакции без эскулина получилось просветление, с тем же препаратом от реакции с эскулином — просветление с вишневым оттенком.

Зная из докладов проф. М. П. Тушнова, что его опопрепараты яичника и яичка (овариолизаты и тестолизаты) получаютя расщеплением сложных белков до полипептидов, и что эти полипептиды сохраняют свое специфическое влияние на организм, нами были поставлены опыты с реакцией Манойлова на этих препаратах, причем получились следующие результаты: с 3 куб. с. тестолизата реакция Манойлова без эскулина дала вишневый цвет с рубиновым оттенком, с 3 куб. с. овариолизата та же реакция — просветление до цвета светлого портвейна. Далее, с 2 куб. с. тестолизата, разбавленного 1 куб. с. физиологического раствора, реакция Манойлова без эскулина дала сиреневую окраску, реакция же с эскулином — темно-вишневую. Параллельно поставленные опыты с овариолизатом в тех же соотношениях с физиологическим раствором показали, что реакция Манойлова без эскулина дает просветление смеси овариолизата с физиологическим раствором до цвета портвейна, а с эскулином — рубиновый цвет, т. е. другими словами, получается извращенная реакция Манойлова.

С 2 куб. с. спермина Колосова плюс 1 куб. с. физиологического раствора реакция Манойлова без эскулина дала нам насыщенное фиолетовое окрашивание, а с эскулином — окраску вишневого цвета, т. е. тип „женской“ реакции. Будучи затем проделана с другими опопрепаратами, — гипофизинном, адреналином, инсулином, — реакция эта давала нам разнообразные цветные результаты.

Как известно, грудные железы выделяют, с одной стороны, свой специфический гормон, с другой — молоко и молозиво, содержащие в себе белки. В виду этого нами было поставлено испытание реакции Манойлова с молоком кормящих грудью матерей и с молозивом беременных с учетом результатов реакции, проделанной у тех же женщин до родов. С 1 куб. с. молозива плюс 2 куб. с. физиологического раствора реакция эта с эскулином и без эскулина давала всегда темные цвета — лиловый

или фиолетовый, причем жидкости в пробирках оставались всегда непрозрачными для проходящего света. Будучи проделана затем с молоком, взятым вместе с физиологическим раствором в той же пропорции, реакция эта давала вначале впечатление полного совпадения с результатами реакции, проделанной с кровью до родов, т. е. молоко, взятое у родильниц, кормивших девочек, как и кровь, давало типичную женскую реакцию, у родильниц же, кормивших мальчиков,—просветление до бледно-розового цвета. При дальнейшей проверке оказалось, однако, что здесь все зависит от того, на какой день кормления взято молоко у кормящих девочку или мальчика: в первые и вторые сутки реакция дает лиловый и темно-вишневый цвета, а в последующие дни цвет становится светлее, на 4-й день реакция дает уже желто-зеленый цвет, а на 5-й—цвет нормального молока.

Опыты с молозивом и молоком естественно заставили нас обратиться к опытам с белком, причем мы избрали для этого куриный альбумин, полученный покойным проф. А. А. Панормовым. Для исследования брались 5% и 10% растворы куриного белка в дистиллированной воде, причем раствор наливался в пробирки по 3 куб. с. и разводился по нашему „аккордному“ методу физиологическим раствором с таким расчетом, чтобы в каждой пробирке было по 3 куб. с. смеси. На лакмус эти растворы давали кислую реакцию. Реакция Манойлова, проделанная во всем „аккорде“ пробирок, давала нам целую гамму цветов, начиная от желтоватого — в пробирке с большим разведением белка и кончая сине-голубоватым или фиолетовым—в пробирке с меньшим разведением, причем жидкость во всех пробирках была мутная. В частности реакция с эскулином дала различные нюансы цветов, переходя постепенно от почти бесцветной к темно-вишневой окраске с рубиновым оттенком. Особенно характерными и близкими по цветовым эффектам к реакциям с кровью оказались реакции, проделанные по нашему методу разведения с 5% белком.

Переходя к разбору вышеизложенных опытов, мы должны сделать определенный вывод, что белковые вещества, куриный химически-чистый альбумин, полипептиды в лизатах проф. М. П. Тушнова, белки сухих препаратов яичника и яичка Мерск'а при расщеплении их соляной кислотой, пепсином и папайотином, натуральные белки молока кормящих грудью женщин и молозива, наконец, белки крови,—играют большую роль в реакции не только качественно, но главным образом количественно. Этим не исключается, конечно, возможность влияния половых гормонов на результат реакции Манойлова, но для того, чтобы это влияние сказалось на реакции, необходимы особые условия, именно, наличие определенного количества белков и определенное их состояние.

На основании своих исследований Перевозская и Шмидт пришли в выводу, что удельный вес сыворотки мужской крови колеблется от 1,024 до 1,029, большею частью равняясь 1,025—1,027, удельный же вес сыворотки женской крови колеблется от 1,025 до 1,031, чаще всего равняясь 1,028—1,029. Параллельно с разницей удельного веса,—отмечают названные авторы,—идет и разница в содержании белков, причем сыворотка женской крови на 85% богаче последними, чем сыворотка мужской крови. Этой разницей они и объясняют различный исход реакции Манойлова.

Гусев, критикуя опыты и выводы Перевозской и Шмидта указывает, что аналогичные по удельному весу растворы химически-чистых белков в его исследованиях давали только типично-женскую реакцию, мужскую же реакцию химически-чистые белки давали только при удельном весе в 1,0177—1,0166. Этот автор отвергает объяснение Шмидта и Перевозской и высказывает предположение, что реакция Манойлова имеет связь с количеством гемоглобина, главным образом с содержащимся в последнем железом, причем большую роль играет здесь,—находится железо в закисном, или окисном состоянии. Последнее предположение является впрочем пока гипотезой, высказанной Данилевским, так как мы еще не знаем, в каком состоянии находится железо в крови,—может быть, это состояние в крови лиц разного пола различно, что и улавливается реакцией Манойлова.

В заключение позволим себе сделать следующие выводы:

- 1) Реакция Манойлова в применении к распознаванию пола утробного плода особенного практического значения не имеет, ибо дает в среднем лишь около 80% правильных ответов.
- 2) При помощи ее пол плода более правильно узнается во вторую половину беременности, ближе к родам.
- 3) Ранняя беременность, как таковая, реакцией Манойлова не устанавливается.
- 4) Белки имеют большое значение в исходе реакции количественно, а может быть и качественно, почему при производстве реакции необходимо крайне щепетильно относиться к объему исследуемой крови и т. д., а также и объему реагентов, причем последние должны быть обязательно химически-чистыми.

#### ЛИТЕРАТУРА.

Манойлов. Врач. газ., 1923, №№ 15, 21 и 22; Труды по прикл. ботанике, 1922/23, кн. 13, № 2; Вестник знания, 1925, № 12.—Щеглова. Врач. газ., 1924, № 5.—Гуревич. Гиг. вест., 1924, № 1; Врач. газ., 1923, №№ 15—22; Врач. газ., 1924, № 1.—Грюнберг. Врач. газ., 1924, № 5; Труды по прикл. ботанике, 1922/23, № 2.—Соловцова. Реакция Манойлова, ее биологическое значение и перспективы. Изд. Кубуч, 1927.—Пречистенская. Сб. в честь Окинчица, 1924.—Бернацкий. Врач. газ., 1924, № 18.—Галвяло. Врач. газ., 1926, № 13.—Шмидт и Перевозская. Врач. газ., 1926, № 13.—Biedl. Внутренняя секреция.—Гусев. Арх. криминологии и суд. мед., 1926—1927, т. I; Каз. мед. журн., 1927, № 5.