

THADDEUS MANN

UNIVERSITÀ DI CAMBRIDGE

2. - ASPETTI BIOCHIMICI DELLA RIPRODUZIONE (*)

Le due principali funzioni fisiologiche delle gonadi maschili sono: 1) la spermogenesi, il processo di trasformazione cellulare che porta alla formazione degli spermatozoi; 2) la produzione degli ormoni sessuali maschili, dai quali dipendono le caratteristiche sessuali maschili secondarie. Negli ultimi decenni sono stati fatti diversi e rapidi progressi nella conoscenza biochimica di questi due processi testicolari, specialmente della funzione endocrina, tipico esempio l'isolamento e l'identificazione chimica del testosterone.

Le nostre ricerche, iniziate nel 1944, concernevano principalmente la biochimica degli spermatozoi e del plasma seminale, cioè del mezzo fluido nel quale gli spermatozoi sono normalmente eiaculati, e che rappresenta la combinazione delle secrezioni degli organi accessori della riproduzione, i quali comprendono in molti mammiferi, compreso l'uomo: gli epididimi, le vescicole seminali, la prostata, le glandole di Cowper, così come alcune delle strutture glandolari minori poste lungo il canale uretro-genitale. Le nostre ricerche fino al 1954 sono state passate in rivista recentemente in forma di monografia su « Biochimica del seme » ed io vorrei perciò avvalermi dell'opportunità creatami dal cortese invito del Prof. MAROTTA, per dirvi qualche cosa sui problemi e le ricerche dei quali ci stiamo occupando in questo momento a Cambridge, nel Centro di Fisiologia della Riproduzione e di Biochimica del Consiglio Nazionale di Ricerca di Agricoltura. Mi limiterò deliberatamente a sottolineare e discutere problemi di natura fondamentale piuttosto che applicativa, e che abbiano interesse generale piuttosto che specifico, specialmente per dei biochimici impegnati in studi sul metabolismo cellulare e sugli enzimi, un campo nel quale il Prof. CHAIN e i suoi collaboratori all'Istituto Superiore di Sanità hanno fatto negli ultimi anni dei notevoli progressi.

(*) Conferenza tenuta nell'Aula Magna dell'Istituto Superiore di Sanità il 28 maggio 1956.

I tre problemi sui quali vorrei intrattenermi oggi sono: 1) la funzione secretoria degli organi accessori maschili, come la prostata, la vescicola seminale e gli epididimi, con particolare riguardo alle relazioni di questi organi con gli ormoni sessuali maschili prodotti nei testicoli; 2) la biochimica e la fisiologia degli spermatozoi, sottolineando in special modo la distribuzione e il meccanismo di azione degli enzimi dello sperma, e 3) il metabolismo del seme, e la sua dipendenza da alcune notevoli relazioni enzima-substrato tra le cellule dello sperma e il loro contorno fisiologico: il plasma seminale.

1. - LA FUNZIONE SECRETORIA DEGLI ORGANI ACCESSORI MASCHILI DI RIPRODUZIONE E LA SUA DIPENDENZA DALL'ANDROGENO.

Questo argomento, che è stato passato in rivista da mia moglie e da me nel 1931, nelle *Physiological Reviews*, continua ad attrarre gran parte della nostra attenzione. I nostri studi attuali, che comprendono una notevole varietà di specie, dall'uomo, al toro, al verro, al montone, fino alla talpa, al riccio, al ratto e al coniglio, continuano a fornire un numero sempre crescente di esempi sull'esistenza di caratteristiche biochimiche altamente specifiche negli organi accessori del maschio.

I quattro prodotti secreti dalle glandole maschili accessorie, sui quali il nostro interesse si concentra in questo momento, sono il fruttosio, l'acido citrico, l'ergotioneina e l'inositolo. Di queste quattro sostanze, tre, cioè fruttosio, ergotioneina e inositolo furono effettivamente trovate nel nostro laboratorio.

La larga diffusione del fruttosio come principale zucchero seminale, che io trovai per la prima volta nel 1934 nel seme di toro, è stata ora provata in un gran numero di mammiferi superiori ed inferiori. Il fruttosio si trova nel seme in concentrazioni che vanno da pochi mg. % (verro) a 1 % (toro) e in molte specie, compresi uomo, toro, verro e montone, è secreto principalmente da un organo accessorio, e precisamente la vescicola seminale. La regola non è però senza eccezioni. Nel riccio per esempio, animale del quale mi sono assai interessato negli ultimi tempi, il componente principale dell'apparato maschile accessorio, la cosiddetta glandola prostatica, è composta di tre parti distinte, generalmente descritte dagli anatomisti come parti I, II e III, rispettivamente (cf. OPPEL, 1904). Io ho trovato che, mentre le parti I e II, che sono di colore decisamente rosa, secernono un fluido estremamente ricco di fruttosio ed ergotioneina, ma povero di acido citrico, la secrezione della parte III, che è di colore decisamente rosso-bruno, è priva di frut-

tosio e di ergotioneina, ma è decisamente ricca d'acido citrico. In un altro insettivoro, la talpa, l'intera glandola prostatica sembra interessata nella secrezione di tutte e tre le sostanze, acido citrico, fruttosio ed ergotioneina. Ulteriori esempi illustranti un deciso scostamento dalla regola che le vescicole seminali sono le principali produttrici di fruttosio, si trovano fra i roditori. Così nel ratto il fruttosio è secreto nella glandola coagulante e nella prostata dorsolaterale, mentre la secrezione della vescicola seminale è completamente priva di fruttosio, ma contiene nello stesso tempo un'alta concentrazione di acido citrico. Ma già in un animale assai vicino al ratto, cioè nel topo, lo schema di distribuzione del fruttosio e dell'acido citrico è diverso; qui il fruttosio si trova non soltanto nella glandola coagulante, ma anche nella vescicola seminale. Di nuovo in un altro roditore, il coniglio, non è la glandola vescicolare che è considerata l'analogo anatomico della vescicola seminale, ma la glandola prostatica, la principale produttrice di fruttosio.

Nella specie umana, il fruttosio deriva soprattutto dalla vescicola seminale, mentre l'acido citrico è un componente caratteristico della sola secrezione prostatica. Sia il fruttosio che l'acido citrico sono presenti nel seme umano in altissime concentrazioni, fino a 600mg/100ml e in certi casi anche di più, mentre l'ergotioneina è praticamente assente, o presente in quantità piccolissime, e il contenuto di inositolo è pure relativamente basso. Le due specie che possiedono un contenuto caratteristico alto di ergotioneina nel seme sono il verro e lo stallone. Mentre però il verro secerne l'ergotioneina nelle vescicole seminali (MANN e LEONE, 1953), nello stallone, come mostrato dal Prof. LEONE dell'Università di Napoli, essa è prodotta nella glandola ampollare, una struttura anatomica completamente distinta dalle vescicole seminali.

Qualche indicazione sui componenti caratteristici e sulla complessità chimica delle secrezioni accessorie maschili è fornita nella tabella I, che riassume i risultati analitici ottenuti sulle secrezioni vescicolare ed epididima del verro. Un paragone di queste due secrezioni mostra che, mentre la secrezione vescicolare è ricca in fruttosio, ergotioneina, inositolo ed acido citrico, quella prodotta negli epididimi contiene solo tracce di queste quattro sostanze, ma mostra d'altra parte un alto contenuto di un carboidrato capace di reagire con l'antrone (che non è né fruttosio né glucosio) e nello stesso tempo un contenuto caratteristico ed alto di composti del fosforo non proteici, che possono essere estratti ugualmente bene con TCA, $Zn(OH)_2$ ed etanolo.

Piuttosto recentemente i Dottori DAWSON, WHITE ed io stesso abbiamo eseguito uno studio profondo dei composti fosforati nelle secrezioni accessorie del maschio; la sostanza che costituisce la più gran parte del

Composizione chimica delle secrezioni vescicolare ed epididimale nel verro.

	Secrezione della vescicola seminale mg/100 ml	Fluido epididimale mg/100 ml
Peso secco	17,25	6,520
dializabile	5,975	4,150
non dializabile	11,250	2,370
solubile in etanolo al 66%	4,795	3,750
Ceneri	0,432	0,694
Cloruro	0,012	0,012
Sodio	0,062	0,088
Potassio	0,212	0,188
Calcio	0,012	0,006
Azoto totale	1,396	0,357
Azoto non proteico dopo:		
precipitazione con $Zn(OH)_2$	0,061	0,173
acido tricloroacetico	0,072	0,198
etanolo al 66%	0,060	0,157
Azoto ureico	0,009	0,009
Fosforo totale	0,037	0,292
Fosforo non proteico dopo:		
precipitazione con $Zn(OH)_2$	0,034	0,290
acido tricloroacetico	0,035	0,291
etanolo al 66%	0,034	0,292
Fosforo inorganico	0,007	0,015
Carboidrati totali reagenti con l'antrone	0,139	0,184
Ammino-zuccheri totali	—	0,128
Fruttosio	0,059	0,004
Inositolo	2,150	0,095
Ergotioneina	0,057	0,003
Acido citrico	0,635	0,012

fosforo non proteico nel fluido dell'epididimo del verro è stata identificata come glicerilfosforilcolina.

La funzione secretoria della prostata, della vescicola seminale, degli epididimi, e invero di tutti gli altri organi di riproduzione accessori del maschio, è fortemente dipendente da certi fattori estranei, fra i quali la più grande importanza va certamente attribuita all'ormone sessuale prodotto dai testicoli. La formazione e l'emissione di questo ormone è a sua volta dipendente dall'influenza gonadotrofica esercitata dal lobo anteriore della glandola pituitaria sui testicoli. La funzione dell'ormone testicolare, per quel che concerne le glandole accessorie di riproduzione, è di provvedere lo stimolo necessario per la loro crescita e il normale sviluppo e per l'elaborazione dei loro prodotti di secrezione, inclusi alcuni costituenti seminali altamente specifici, come il fruttosio, l'acido citrico, l'ergotioneina, l'inositolo, la glicerilfosforilcolina, e inoltre un gran numero di enzimi caratteristici ed assai potenti, come le fosfatasi acide ed alcaline, la β -nucleotidasi, la fibrinolisin e la fibrinogenasi. La determinazione chimica di ciascuno di questi componenti, sia direttamente nella secrezione accessoria, sia nel seme in toto così come eiaculato, può servire come indice assai utile e quantitativo della funzione glandolare accessoria. Il grande vantaggio di questi metodi chimici su quelli vecchi anatomici e istologici, che dovevano essere compiuti sugli organi accessori dissezionati, è che ci permettono di provare lo stato funzionale degli organi accessori del maschio in animali *viventi*, ad intervalli di tempo frequenti, e se necessario, per un periodo di mesi o anni. Non è mia intenzione entrare qui in una descrizione dettagliata, o in una discussione sui molti problemi connessi con gli aspetti ormonali della formazione del seme, che noi abbiamo affrontato negli ultimi anni, specialmente perchè abbastanza recentemente questo soggetto è stato passato in rassegna da me alla conferenza Laurenziana degli ormoni in America (MANN, 1956). Vorrei comunque accennare molto brevemente ad alcuni esempi, che potrebbero forse aiutarvi ad apprezzare l'utilità dei nuovi metodi chimici di analisi del seme come mezzi per studiare l'attività dell'ormone androgeno nell'animale intatto.

E' innanzi tutto possibile, analizzando sia l'intero seme, sia le secrezioni accessorie individuali, dare una risposta pronta ed inequivocabile sull'effetto che la rimozione delle gonadi o dell'ipofisi produce sulla funzione delle glandole accessorie. Così, per esempio, in esperimenti sui conigli è stato possibile mettere in evidenza che sia il fruttosio che l'acido citrico scompaiono entro due settimane dalla castrazione (MANN e PARSON, 1950). Similmente l'analisi chimica fornisce una strada conveniente per le ricerche sugli effetti di malattie, disfunzioni endocrine o deficienze

nutrizionali sul sistema accessorio maschile. In rapporto a ciò, vorrei menzionare due serie di esperimenti, uno su ratti privati della vitamina B, che dimostravano come poche settimane di dieta senza di essa portino a un pronunciato regresso degli organi accessori maschili, regresso cui si può però rimediare completamente mediante iniezione di gonadotropine pituitarie o corioniche (LUTWACK-MANN e MANN, 1950a, 1950b); l'altra, una serie di esperienze sui tori, che mostrava molto chiaramente come l'iponutrizione ritardi lo stabilirsi della funzione delle glandole accessorie nei giovani tori in via di sviluppo (senza disturbare necessariamente lo stabilirsi della spermatogenesi) e sopprima molto fortemente la funzione delle glandole stesse in animali già maturi (MANN e WALTON 1953; MANN e ROWSON 1956).

Finalmente, considerando l'attività degli organi accessori del maschio, potrei aggiungere come illustrazione (forse la migliore illustrazione) della specificità chimica altamente specializzata di queste glandole, che quando frammenti dei tessuti glandolari vengono trapiantati nei ratti sotto cute, essi riassumono prontamente le loro specifiche funzioni chimiche, come per esempio la secrezione di fruttosio o di acido citrico, purchè naturalmente l'ormone sessuale maschile sia presente nell'animale; perfino se del tessuto glandolare maschile è trapiantato in un ratto femmina, esso mantiene la sua capacità di produrre fruttosio ed acido citrico, ma questo solo se il ratto femmina è trattato con testosterone.

2. - CARATTERISTICHE CHIMICHE E FUNZIONALI DEGLI SPERMATOZOI, PARTICOLARMENTE RIGUARDO ALLA DISTRIBUZIONE E ALLA FUNZIONE DEI SISTEMI ENZIMATICI INTRACELLULARI.

I tre componenti morfologici principali della cellula spermatica, cioè la testa, il pezzo mediano e la coda, differiscono in modo sorprendente nella loro composizione chimica e nella loro funzione fisiologica.

La testa, che è composta principalmente dal nucleo spermatico, consiste largamente di desossiribonucleoproteina, ed è coperta da una struttura a forma di cappello conosciuta come l'acrosoma, che contiene alcuni interessanti zuccheri legati a proteine; i componenti zuccherini del polisaccaride acrosomico sono stati identificati da CLERMONT, GLEGG e LEBLOND (1954) come galattosio, mannosio, fucosio ed exosamina. Piuttosto recentemente ho avuto l'opportunità di preparare il polisaccaride acrosomico da spermatozoi lavati di montone e di esaminare i suoi effetti sul metabolismo e la sopravvivenza dello sperma. Ho trovato che, diversamente dal mannosio, glucosio o fruttosio, gli zuccheri legati nel

polisaccaride acrosomico non hanno un effetto marcato nè sulla motilità nè sulla respirazione dello sperma, nè sono convertiti ad acido lattico nel corso della glicolisi anaerobica o aerobica. La loro funzione sembra essere legata con la fisionomia strutturale piuttosto che metabolica della cellula spermatica, e possono essere posti in relazione con il caratteristico gonfiamento che occorre nell'acrosoma come risultato dell'invecchiamento o dello shock freddo. Questi cambiamenti possono essere seguiti con un metodo istochimico basato sulla reazione acido periodico-schiff. (PAS). Ordinariamente, la quantità di materiale che si colora col PAS nello acrosoma produce solo una debole reazione colorata, ma in casi eccezionali, specialmente nei tori, la concentrazione può aumentare parecchie volte e produrre una reazione colorata molto forte col reattivo alla fuxina dopo che lo sperma è stato pretrattato con acido periodico.

Nella frazione mediana, che nello spermatozoo umano per esempio è circa della lunghezza della testa ($4,6 \mu$) ma solo un decimo della larghezza, c'è una concentrazione caratteristica alta di lipidi, la maggior parte dei quali si trova come lipoproteina. E' qui che è anche largamente concentrato il sistema citocromo-citocromo ossidasi.

La coda, nel caso dell'uomo circa 10 volte più lunga che il pezzo mediano, consiste della guaina, una struttura a spirale circondata da uno strato di lipoproteina, e del così detto filamento assiale, che è una continuazione di una struttura simile nel pezzo mediano, composto di 20 fibrille individuali disposte in tre gruppi, un cilindro esterno di 9 fibrille, un cilindro interno di 9 fibrille ma più fini, e una coppia centrale di 2 fibrille. La precisa natura chimica delle fibrille è ignota, ma in base a recenti ricerche la proteina fibrosa dello sperma sembrerebbe in relazione con le proteine dei flagelli dei protozoi e con le cellule epiteliali dei metazoi. Recenti studi al microscopio elettronico su sezioni di spermatozoi animali (BRADFIELD, 1954; AFZELIUS, 1955), di flagelli di protozoi e di ciglia di un certo numero di cellule epiteliali di origine animale (FAWCETT e PORTER, 1954), ed anche gli spermatozoi e ciglia di piante (MANDON e CLARK, 1952), mostrano tutti essenzialmente la stessa orientazione delle strutture fibrillari: due filamenti situati nel centro e 9 paia di fibrille spaziate ugualmente alla periferia.

Riguardo alla distribuzione degli enzimi tra la testa, il pezzo mediano e la coda dello spermatozoo, voglio riferirvi qui alcuni esperimenti che ho condotto recentemente con il seme di un toro Guernesey, un animale completamente sterile che produce eiaculati con praticamente tutti gli spermatozoi in uno stato disintegrato, cioè con le teste separate dalle porzioni mediana e coda.

Le caratteristiche del seme di questo toro come si osservano al mi-

eroscopio sono mostrate nella fig. 1. Posso aggiungere che questo tipo di difetto seminale, che è invariabilmente associato con la sterilità, non è affatto raro nella razza Guernesey, come mostrato, per esempio, dai risultati di un'indagine eseguita nel 1949 da HANCOCK e ROLLINSON, che

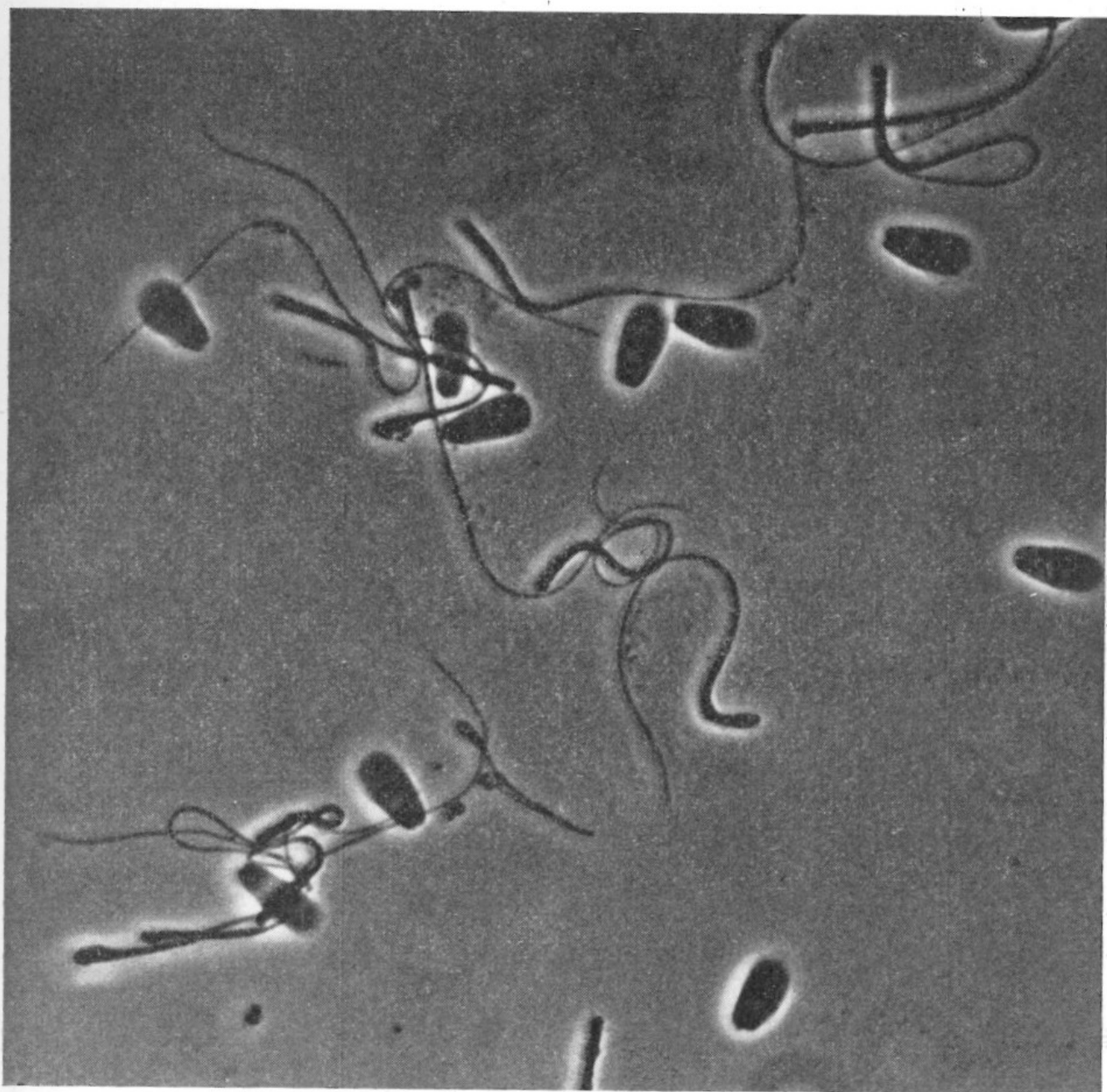


Fig. 1. - Spermatozoi con teste e code staccate nel seme di un toro Guernesey sterile (Contrasto di fase, $\times 1200$).

incontrarono questa condizione in 12 tori Guernesey su 89; in tutti questi 12 casi c'era una virtuale assenza di spermatozoi intatti, e gli eiaculati contenevano solo libere teste e libere code. Secondo HANCOCK (1955) la disintegrazione avviene dopo che gli spermatozoi hanno lasciato i testicoli, probabilmente perchè la gocciolina chinoplasmica che migra non

riesce a separarsi dalla regione-collo della testa e letteralmente strappa via la testa dal pezzo mediano.

Sottoponendo il seme di un tale toro Guernesey a centrifugazione frazionata a bassa velocità, sono riuscito ad ottenere due frazioni distinte, una frazione inferiore, consistente di teste ben impaccate ed immobili, e una frazione superiore consistente in una sospensione di code libere da teste e ancora perfettamente mobili. Le due frazioni sono state esaminate separatamente riguardo: 1) alla distribuzione dell'azoto, del fosforo acido-solubile, dei lipidi e della nucleoproteina; 2) alla fruttolisi; 3) alla respirazione; 4) all'attività adenosintrifosfatasica ed adenosindifosfatasica. I risultati sono in breve i seguenti.

Come può vedersi dalla tabella II, il materiale secco è distribuito più

TABELLA II

Distribuzione del peso secco, azoto ed alcuni composti fosforati tra le teste e le code.

I risultati sono espressi in mg/100 ml di seme di toro Guernesey. Prima della misura le teste e le code erano lavate con soluzione di Ringer.

	Teste	Code	Insieme
Peso secco	684	839	1523
Azoto non proteico	5,6	17,3	22,9
Fosforo inorganico	0,8	1,0	1,8
Fosforo acido-solubile	0,7	1,8	2,2
Fosforo lipidico	0,9	2,3	3,2
Fosforo residuo	19,3	0,5	19,8

o meno egualmente tra teste e code. Mentre però, le code sono più ricche di fosforo acido-solubile e lipidi, le teste contengono la maggior parte del fosforo residuo, che non è estratto dall'acido tricloroacetico nè dai solventi dei lipidi, e si deve presumere formato principalmente da acido desossiribonucleico. Si può aggiungere qui che ripetuti tentativi di dimostrare la presenza di acido ribonucleico nelle teste o nelle code hanno dato risultati negativi.

La fruttolisi e la respirazione procedono a velocità molto più alta nelle code che non nelle teste, come si può vedere nella fig. 2. Se la leggera fruttolisi e la respirazione osservate nella frazione teste siano di fatto dovute interamente alle teste, è difficile da decidere, dato che la presenza di una piccola quantità di code frammentate nella frazione teste non può essere esclusa con assoluta certezza. Prima di esaminare le frazioni teste e code per le attività ATP-asica ed ADP-asica ambedue le frazioni erano lavate a fondo con soluzione di Ringer, così da rimuovere

completamente tutte le tracce del plasma seminale, che contiene in abbondanza non solo un'alta attività ATP-asi, ma anche una potente δ -nucleotidasi; quest'ultimo enzima defosforilerebbe rapidamente qualsiasi acido adenilico che si formasse sia dall'ATP sia dall'ADP. Incubando frazioni lavate delle teste e delle code di eguale densità con ATP ed ADP rispettivamente, si trovò che la defosforilazione dell'ATP e del-

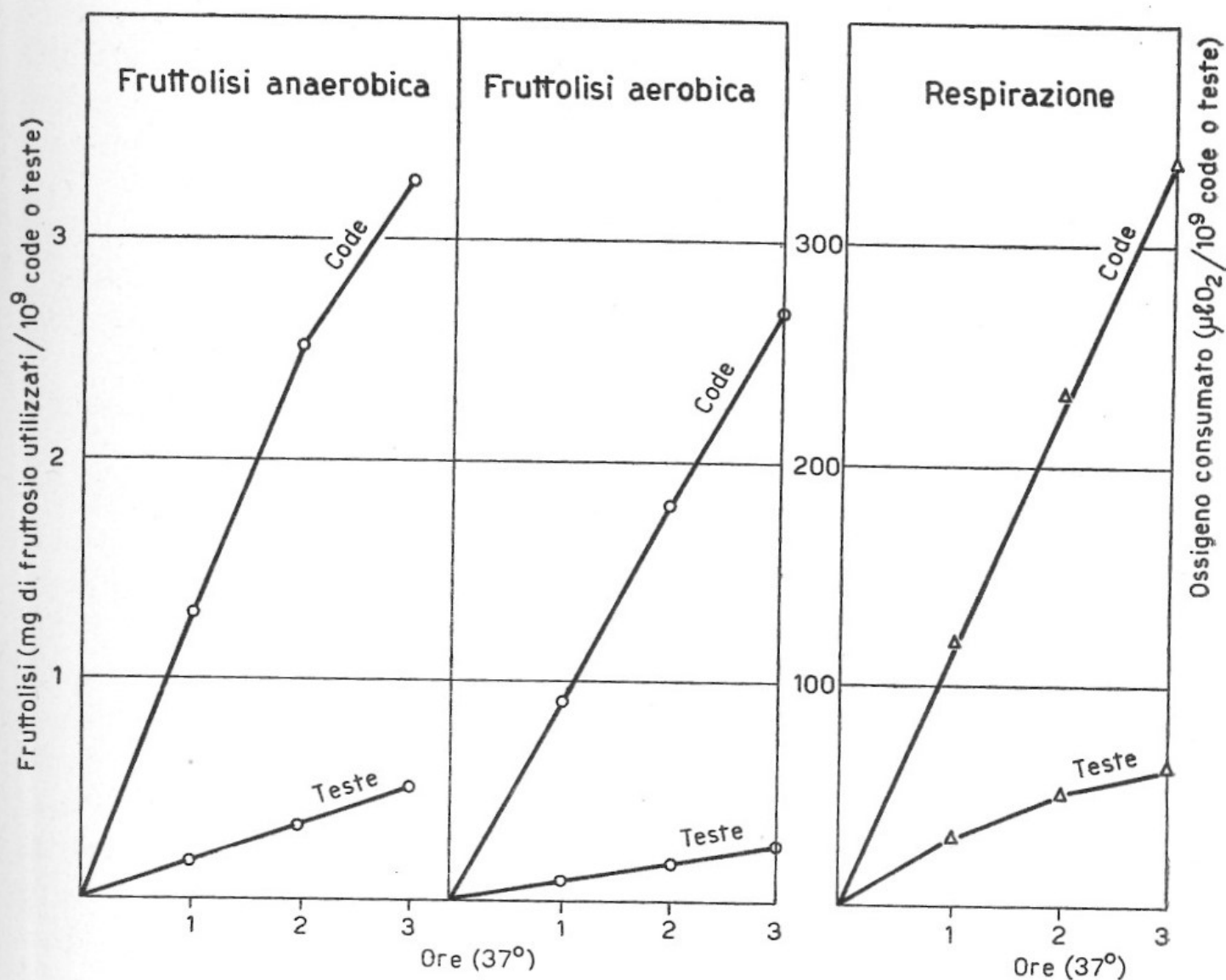


Fig. 2. - Fruttolisi e respirazione in teste (immotili) e code (motili) di spermatozoi.

l'ADP procede 3 o 6 volte più rapidamente nei campioni contenenti le code che in quelli contenenti le teste. Questo risultato è in accordo con l'osservazione riportata da NELSON (1954), che quando gli spermatozoi di toro sono omogeneizzati, cioè disintegrati meccanicamente, l'attività specifica dell'apirasi nelle code è circa 3 volte quella del pezzo mediano e dell'omogenato totale, mentre le teste non mostrano praticamente alcuna attività apirasica.

3. - METABOLISMO DEL SEME E SUA DIPENDENZA SULLE RELAZIONI FUNZIONALI TRA SPERMATOZOI E PLASMA SEMINALE.

Le velocità dei due principali processi metabolici nel seme, vale a dire la fruttolisi e la respirazione, dipendono largamente dal numero di spermatozoi mobili nel seme.

In assenza di ossigeno il seme dipende dal fruttosio come sorgente principale di energia metabolica; gli spermatozoi metabolizzano il fruttosio anaerobicamente ad acido lattico ad una velocità di circa 2 mg/10⁹ cellule mobili/ora a 37°. Il fruttosio non è utilizzato, o solo poco, dal seme azoospermico, cioè da eiaculati che non contengono spermatozoi, o da quello necrospermico, cioè con cellule spermatiche immobili.

La correlazione tra la fruttolisi e la motilità è infatti così evidente, che determinazioni chimiche della quantità di fruttosio che scompare possono essere usate come misura rapida, conveniente e quantitativa della motilità dello sperma.

Un semplice, ma caratteristico esempio è fornito dall'esperimento registrato nella fig. 3, che illustra l'effetto di soluzioni ipertoniche di NaCl sulla fruttolisi spermatica. Quando, dopo 30 minuti d'incubazione a 37°, l'esperimento fu terminato e lo sperma esaminato al microscopio, si trovò che nel campione contenente 1,8% NaCl la fruttolisi era di circa 50% e nel campione contenente 5,4% NaCl era assente.

Nel luogo della loro origine, nei testicoli e negli epididimi, gli spermatozoi ancora immobili hanno difficoltà del fruttosio a loro disposizione. Essi diventano mobili e vengono per la prima volta in contatto con fruttosio durante il loro passaggio lungo il tratto generativo del maschio, cioè non prima di aver raggiunto le secrezioni complementari. Il processo di fruttolisi dipende perciò da intricate relazioni tra il substrato glicolizzabile rifornito dal plasma seminale e il sistema di enzimi intracellulari glicolitici presenti negli spermatozoi, che comprende esochinasi, zimoesasi, fosfotrioso deidrogenasi, diverse fosfochinasi e la deidrogenasi dell'acido lattico (MANN, 1954). Se l'uno o l'altro fattore fa difetto, la fruttolisi ne soffre. Se gli spermatozoi vengono separati dal plasma seminale, per esempio per centrifugazione e lavaggio, essi diventano incapaci di vivere anaerobicamente, a meno che il plasma seminale non sia rifornito o sostituito da un mezzo artificiale contenente carboidrati glicolizzabili, come glucosio, fruttosio o mannosio.

Spermatozoi lavati dai quali sia stato rimosso tutto lo zucchero sono incapaci di muoversi anaerobicamente, a meno che non si aggiunga uno zucchero o l'ossigeno. Lo stato di immobilità nel quale gli spermatozoi possono essere forzati escludendo gli zuccheri glicolizzabili e l'ossigeno,

è comunque reversibile e perciò può essere descritto più propriamente come uno stato di letargo piuttosto che di inattivazione.

Purchè questa condizione non sia troppo prolungata, una resurre-

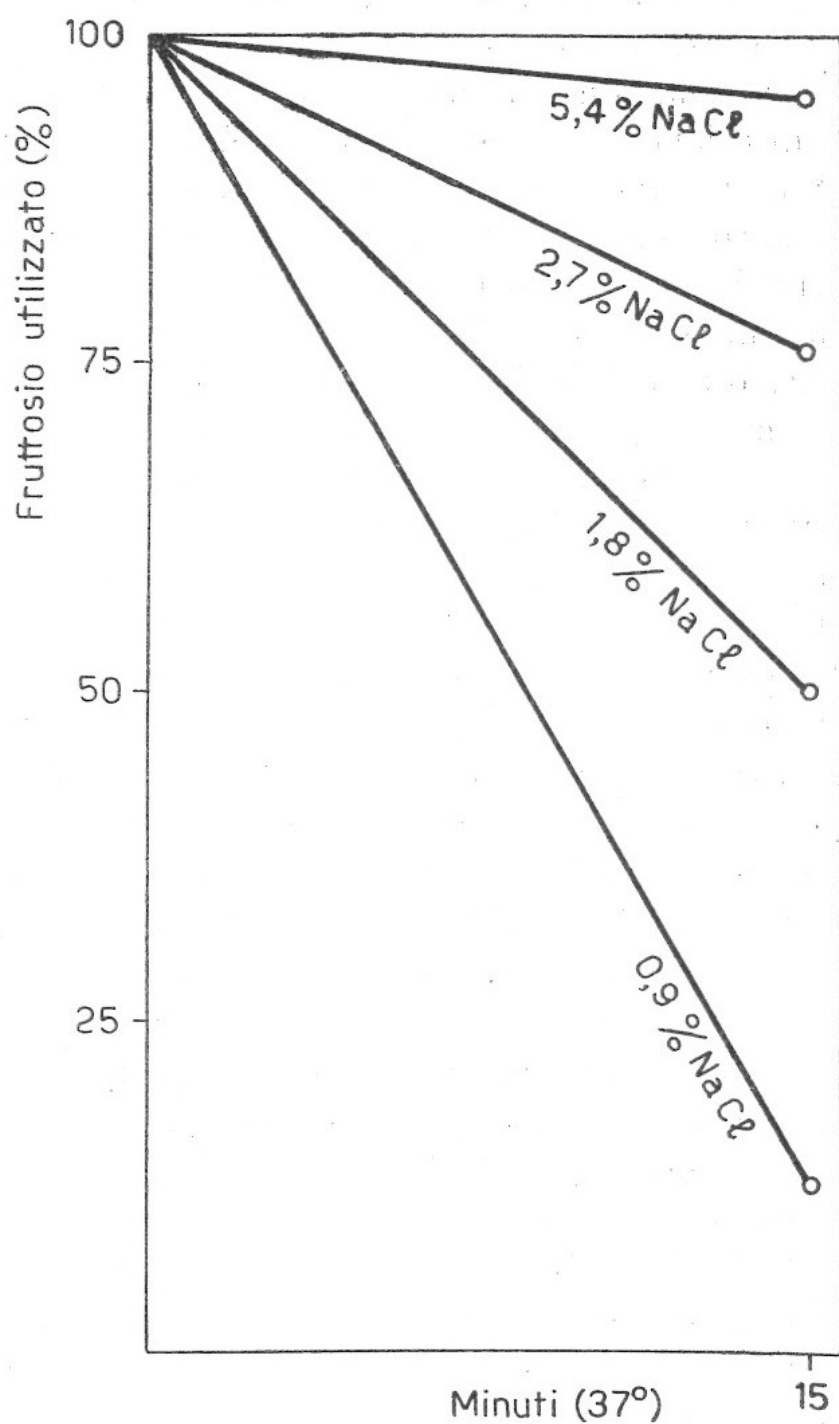


Fig. 3. - Effetto di soluzioni ipertoniche di cloruro di sodio sulla fruttolisi dello sperma.

zione è possibile, fornendo zucchero od ossigeno. Quasi sempre però l'effetto dell'ossigeno non è immediato, ma si sviluppa lentamente entro un'ora circa (a 37°).

Aerobicamente, anche se tutto il plasma seminale è stato rimosso

per centrifugazione e lavaggio, gli spermatozoi rimangono mobili e consumano nello stesso tempo una considerevole quantità di ossigeno a una velocità di circa 10-20 μ l O_2 /10⁸ cellule spermatiche/ora a 37°.

La fonte di questo assorbimento di ossigeno, che può essere meglio descritto come una respirazione endogena in contrasto con la respirazione esogena che dipende dai substrati extracellulari, non è nota finora. C'è qualche indicazione che possa essere un lipide, e secondo LARDY e PHILLIPS (1944 a, b; 1945) c'è una netta diminuzione nel contenuto in fosforo fosfolipidico delle sospensioni di spermatozoi lavati che siano stati prima privati di zucchero e poi incubati in presenza di ossigeno. Noi stessi non siamo finora stati capaci di dimostrare alcuna marcata scomparsa di fosforo fosfolipidico, che possa essere messa in relazione con la respirazione endogena degli spermatozoi. Tuttavia la maggior parte dei nostri esperimenti concernenti questo problema sono stati finora quasi completamente limitati agli spermatozoi di montone.

Noi troviamo che gli spermatozoi lavati di montone contengono in media circa 15 mg di P lipidico/100 ml di seme, i quali possono essere estratti egualmente bene trattando la porzione insolubile in TCA dello sperma con etanolo o etanolo/etere (3:1) o acetone. Quando gli spermatozoi lavati in una concentrazione di circa 10⁹ cellule/per ml. di soluzione di Ringer sono incubati aerobicamente in manometri di Barcroft a 37° per un periodo di 3-6 ore, essi assorbono ossigeno ad una velocità quasi costante di 100-200 μ l O_2 /10⁹ cellule/ora e durante questo tempo vi è una netta diminuzione della quantità di composti fosforati acido-solubili (TCA-solubili), ma non del fosforo fosfolipidico.

La velocità di assorbimento dell'ossigeno da parte degli spermatozoi può essere aumentata da diverse sostanze, come zuccheri, acido lattico, acido piruvico ed acido acetico. L'effetto di queste sostanze dipende però molto strettamente dalle condizioni sperimentali e da come attentamente e completamente il fruttosio è stato rimosso lavando prima di aggiungere le sostanze ossidabili. Questo è particolarmente vero nel caso del glicerolo che, come dimostrato da WHITE e da altri (1954), è ossidato dagli spermatozoi ad acido lattico. In alcuni recenti esperimenti condotti insieme al Dr. White, siamo riusciti a mettere in relazione l'effetto del glicerolo sull'assorbimento dell'ossigeno con la scomparsa del glicerolo e la formazione di acido lattico. Quest'ultimo tuttavia si accumula molto più rapidamente negli spermatozoi che siano stati sospesi in un mezzo isotonico Ringer-fosfati, piuttosto che in uno povero di fosfati o completamente privo. Questa particolare influenza del fosfato è dovuta all'effetto deprimente che esso ha sulla velocità di ossidazione dell'acido lattico. Il diidrossiacetone e gli alfa- e beta-glicerofosfati stimolano la respira-

zione dello sperma, il glicerofosfato tuttavia solo dopo essere stato defosforilato dallo sperma.

Molto rimane ancora da imparare circa le reazioni enzimatiche che riguardano i processi anaerobico ed aerobico del seme. Un aspetto notevole della cellula spermatica glicolizzante è la dipendenza assai stretta dalla presenza di gruppi sulfidrilici. Rispetto a ciò, l'ergotioneina ha probabilmente un importante ruolo da svolgere. Come dimostrato dal Dr. LEONE e da me, l'ergotioneina protegge gli spermatozoi, almeno in condizioni « in vitro », dall'influenza di diversi inibitori che fissano il sulfidrilico, compresi reagenti ossidanti, alchilanti e formatori di mercaptidi (MANN e LEONE, 1953). Un altro aspetto interessante della biochimica dello sperma, che dev'essere esaminato più a fondo, è la funzione della cosiddetta membrana spermatica nel passaggio delle sostanze dall'ambiente extracellulare nello spermatozoo. L'importanza di questa funzione può essere illustrata da un'osservazione (KOEFOED-JOHNSEN e MANN, 1954): che, mentre la respirazione degli spermatozoi intatti non è affetta dal succinato, questa sostanza ha un notevole effetto stimolante sull'assorbimento dell'ossigeno (ma non sulla motilità) delle cellule spermatiche che siano state precedentemente assoggettate a un trattamento con certe sostanze tensio-attive.

Mi piace concludere con una citazione dal trattato monumentale di SPALLANZANI sugli spermatozoi, che, benchè vecchio di quasi due secoli, non ha perso nulla della sua freschezza e del suo significato:

« Lo scopo di questa opericciuola è stato di esaminare con ogni diligenza più esatta la natura, gli andamenti e i caratteri di questi misteriosi ospiti de' semi animali, facendomi lecito tutto insieme di ventilare e discutere gli altrui pensamenti su tale materia, i quali per la loro discordanza, e per la celebrità di chi ha proposti hanno tenuti sospesi finora, ed incerti gli animi de' naturali filosofi. Se in questa parte io ne sia riuscito, se sgombrato abbia, o almeno diradato le nebbie, che velavano la faccia di questo Vero, lascio che li decida il dotto lettore, al cui savio, ed imparziale giudizio sottopongo queste mie carte ».
