

С. Н. РОМАНОВ

## ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА ВИТАЛЬНОЙ ОКРАСКИ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ДЕЙСТВИЯ ФИТОНЦИДОВ НА НЕРВНЫЕ КЛЕТКИ

(Представлено академиком Л. А. Орбели 15 II 1950)

Метод витальной окраски клеток тканей, разработанный в школе проф. Насонова, в настоящее время широко и успешно применяется в различных областях биологии и медицины.

Как известно, в 1929 г. Б. П. Токин обнаружил, что растертая масса лука выделяет летучие вещества, которые обладают сильным токсическим свойством; эти вещества, пока еще неизвестной природы, Токин назвал фитонцидами (1). В связи с возможным применением различных фитонцидов в качестве терапевтических средств, нам казалось важным изучение действия фитонцидов на различные ткани организма. Некоторые исследования в этом направлении уже были сделаны. Так, Л. Ферри (2) изучал влияние фитонцидов лука на мерцательный эпителий лягушки; И. Камнев (3) исследовал влияние соков лука и чеснока на возбудимость нервов кролика и лягушки. В нашей работе мы решили изучить влияние летучих фракций некоторых растений на нервные клетки симпатических и чувствительных ганглиев кролика.

**Методика.** Все опыты были проведены на нервных клетках кролика *in vitro*. Кролик убивался воздушной эмболией. Сразу же извлекались чувствительные спинномозговые ганглии и ганглии шейного симпатического узла. Ганглии одной стороны животного брались для опыта, а ганглии противоположной стороны служили контролем. Из стеклянных трубочек делалась определенной высоты подставка, одна сторона которой переплетена нитью так, чтобы на эти нити можно было помещать ганглии. Такая подставка с ганглиями ставилась в чашку Петри, на дне которой помещалась кашица испытуемого растения, взятая строго по весу. Расстояние от поверхности кашицы до ганглиев было всегда 5 см. Чашка Петри вместе с подставкой, на которой находились ганглии, ставилась на стекло и накрывалась стеклянным колпаком, внутренняя поверхность которого покрыта фильтровальной бумагой, смоченной раствором Рингера; поверхность стекла под колпаком смазывалась вазелином. Колпачки применялись объемом в 0,5, 5 и 10 л. Таким образом, при постоянном весе кашицы менялся объем, который могли заполнять летучие фракции исследуемых растений. Ганглии выдерживались в атмосфере летучих фракций 15 мин., после чего они споласкивались и помещались в 0,1% раствор нейтрального красного на 30 мин., затем снова споласкивались, очищались от оболочки и проводящих путей и помещались в подкисленный спирт для экстракции красителя.

Количество красителя определялось с помощью фотометра Пульфриха и относилось к единице веса ганглия. Работа с контрольными ганглиями проводилась при совершенно одинаковых условиях, за исключением воздействия летучих фракций исследуемых растений.

Результаты исследований. В первой серии опытов мы изучали действие летучих фракций лука (*Allium* сера) на нервные клетки шейных симпатических узлов и спинальных ганглиев кролика. Кашица приготавливалась растиранием лука на обычной терке. Для опыта всегда бралось 30 г кашицы. Объем колпака, под которым находилась навеска

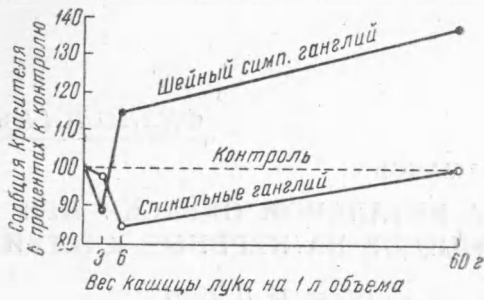


Рис. 1

кашицы, был в 1-й группе опытов 10 л, во 2-й — 5 л и в 3-й — 0,5 л. При пересчете веса кашицы на единицу объема получается, что на 1000 см<sup>3</sup> приходится в 1-й группе опытов 3 г кашицы, во 2-й — 6 г и в 3-й — 60 г. Результаты опытов с луком изображены графически на рис. 1. Кривые построены на основании средних величин из нескольких опытов. Достовер-

ность полученных данных статистически оправдана.

Из рис. 1 видно, что чувствительность нервных клеток симпатической и анимальной нервной системы не одинакова. От действия слабых концентраций летучих фракций нервные клетки симпатического узла сорбируют краску несколько меньше, чем в контроле (—10,4%), но с увеличением концентрации летучих фракций (до 60 г на 1000 см<sup>3</sup>) сорбционные свойства нервных клеток значительно возрастают и превышают сорбцию контрольными клетками на 38,6%, что свидетельствует о значительном их повреждении. Клетки анимальной нервной системы, наоборот, оказались менее чувствительными и, стало быть, более стойки.

В следующей серии опытов мы исследовали действие фитонцидов лавровишни. В лаборатории Б. П. Токина было установлено, что кашица из листьев лавровишни обладает сильным бактерицидным свойством. Мы исследовали действие фитонцидов лавровишни на те же объекты, что и в предыдущих опытах. Каждый раз бралось по 5 г кашицы. Кашица приготавливалась из листьев, которые измельчались ножницами и затем растирались в ступке. В остальном методика была той же, что и при работе с луком. Результаты опытов с лавровишней представлены на рис. 2.

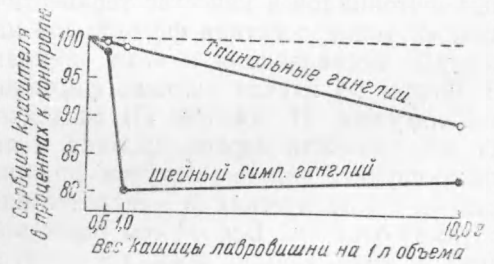


Рис. 2

В этих опытах мы встречаемся с самой первой, доступной для наблюдения, реакцией нервных клеток в ответ на самые слабые дозы раздражения фитонцидами лавровишни. Если взять 0,5 г кашицы лавровишни и поместить в сосуд объемом в 1 л, то летучие фракции лавровишни не вызовут никаких видимых изменений в нервных клетках ни симпатической, ни анимальной нервной системы. При увеличении концентрации до 1 г на 1 л объема в нервных клетках спинальных ганглиев все еще не обнаруживается никаких изменений сорбционных свойств, в нервных же клетках симпатических узлов обнаруживается сильное снижение сорбционных свойств по сравнению с контролем. Только при последующем увеличении концентрации в 10 раз нервные клетки чувствительных ганглиев обнаруживают понижение сорбционных свойств.

Можно ли рассматривать состояние нервных клеток с пониженной сорбционной способностью при действии определенными дозами фитонцидов лука и лавровишни как особое физиологическое состояние вызванное действием фитонцидов, или мы имеем здесь дело с явлением физико-химического характера, когда фитонциды исследуемых растений сами адсорбируются на поверхности мицелл и препятствуют сорбции красителя? Это предположение легко проверить экспериментально. Если летучие вещества действительно адсорбируются на поверхности мицелл и препятствуют сорбции красителя, то это явление должно наблюдаться и на фиксированных ганглиях. Такие опыты нами были проделаны. Ганглии фиксировались спиртом, после чего промывались в течение 4 час., вначале водой, а затем раствором Рингера. Промытые таким образом ганглии помещались в атмосферу фитонцидов на 15 мин., после чего ганглии споласкивались и погружались в 0,1% раствор нейтрального красного на 30 мин. В дальнейшем методика была та же, как и в предыдущих опытах. В результате этих опытов оказалось, что фитонциды лавровишни сами по себе не влияют на сорбцию нейтрального красного. Фиксированные ганглии, находившиеся в атмосфере фитонцидов, адсорбируют впоследствии столько же красителя, сколько и контрольные ганглии, не подвергавшиеся действию фитонцидов (см. табл. 1).

Таблица 1

№ опытов	1	2	3	4	5	6	Средн. из 6 опытов
Связывание красителя в % к контролю	105,3	100	100	101,2	95,0	101,6	100,5

Опыты с фитонцидами лука дали такие же результаты. Таким образом, мы можем утверждать, что мы имеем в наших опытах дело с ответной реакцией живых нервных клеток на действие фитонцидов, а не с блокированием поверхностей мицелл.

В итоге мы можем констатировать, что летучие фракции растертого лука и лавровишни вызывают в нервных клетках изменения сорбционных свойств, именно: в слабых дозах сорбционные свойства уменьшаются, при более сильных дозах в некоторых случаях увеличиваются, как это особенно заметно проявилось на примере нервных клеток симпатической нервной системы (см. рис. 1).

В поисках растений с более сильнодействующими летучими фракциями мы остановились на черемухе. Опыты ставились только с чувствительными клетками спинальных ганглиев кролика. Методика была та же, что и в предыдущих опытах. Навеска кашицы из листьев черемухи бралась 5 г, объем сосуда 0,5 л. Было изучено действие летучих фракций кашицы из листьев черемухи в различные периоды года.

Данные этой серии опытов изображены графически на рис. 3. Контролем служили нервные клетки, не подвергавшиеся действию фитонцидов. Кривая на рис. 3 построена на основании данных 18 опытов. Достоверность средней величины статистически оправдана. Максимальное повреждающее действие черемухи совпадает с периодом цветения и,

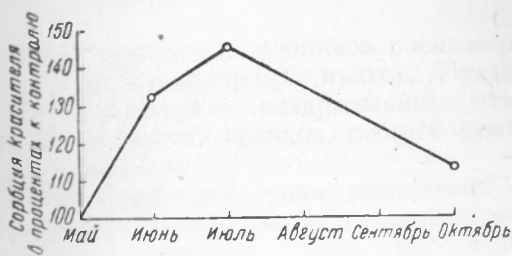


Рис. 3

главным образом, с периодом плодоношения. Изменение сорбционных свойств нервных клеток, вызванное 15-минутным действием фитонцидов черемухи в период плодоношения, соответствует по величине аналогичному действию непрерывного раздражения индукционным током в течение 20 мин. Такая повышенная сорбция свидетельствует о том, что клетки находятся в состоянии паранекроза. Следовательно, диапазон действия летучих фракций различных растений довольно большой.

На основании изложенного можно сделать следующие выводы:

1. Летучие фракции лука и листьев лавровишни, действуя на нервную систему *in vitro*, вызывают в нервных клетках, в зависимости от дозы воздействия, либо ослабление, либо усиление сорбционных свойств.

2. Метод витальной окраски дает возможность изучить действие различных фитонцидов на различные клетки и ткани организма; этот метод может оказаться плодотворным при изучении действия летучих фракций на живую ткань.

Поступило  
27 X 1949

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Б. Токин, Бактерициды растительного происхождения (фитонциды), 1942.  
<sup>2</sup> Л. Ферри, Приложение к книге Б. Токина, Бактерициды растительного происхождения (фитонциды), 1942. <sup>3</sup> И. Камнев, Фитонциды. Сборн. научных исследований об антисептиках растительного происхождения под ред. Карлова и Токина, Томск, 1944. <sup>4</sup> С. Н. Романов, ДАН, 69, № 3 (1949).