

Н. Б. Ильинская

**ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ВИТАЛЬНОЙ ОКРАСКИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ
ТКАНЕВОЙ РЕАКЦИИ МУХ НА ДДТ**

[N. B. I L J I N S K A J A. STAINING IN VIVO AS A METHOD OF INVESTIGATING THE
RESPONSE OF CERTAIN TISSUES TO DDT IN THE BLOWFLY PROTOPHORMIA
TERRAE-NOVAE R. D.]

Широкое использование новых химических средств борьбы с насекомыми вредителями сельского хозяйства и паразитами человека и животных все настоятельнее требует понимания тех процессов, которые обуславливают гибель отравленных животных. Незнание этих закономерностей рано или поздно приводит к развитию отрицательных последствий: появляются насекомые, адаптированные к действию яда, нарушается соотношение между вредными и полезными насекомыми и т. д. При этом отрицательные последствия проявляются тем в больших масштабах, чем шире размах инсектицидных работ.

В этой связи особое внимание привлекает изучение механизма действия ДДТ (дихлордифенилтрихлорэтана) — первого из современных синтезированных органических инсектицидов, интенсивное применение которого на протяжении последних 10 с лишним лет уже привело к ряду нежелательных явлений.

С момента открытия ДДТ был отнесен к разряду «нервных ядов» (Läuger и др., 1944; Wiesmann, 1949 и др.), так как у отравленных им насекомых отмечается возбуждение, нарушается координация движений, развиваются судороги, которые затем сменяются параличем, и, наконец, при состоянии общего паралича насекомые погибают (Wiesmann a. Fenjves, 1944; Läuger и др., 1944; Tobias a. Kollros, 1946; Погодина, 1947; Buck a. Keister, 1949; Wiesmann, 1949, и мн. др.).

Действительно, в соответствии с нейрогенной гипотезой действия ДДТ у отравленных насекомых обнаружено изменение функционального состояния нервной системы. Под влиянием яда наблюдается повышение возбудимости и проводимости нервов, в результате чего в ответ на одиночный стимул возникают вместо одиночной волны возбуждения залпы импульсов и развивается ритмическая активность (Roeder a. Weiant, 1946, 1948, 1951; Welsch a. Gordon, 1947; Gordon a. Welsch, 1948; Dresden, 1948; Smyth a. Roys, 1955). Реакция отдельных элементов нервной системы зависит от дозы ДДТ. Наиболее чувствительным элементом является сенсорная часть рефлекторной дуги (Tobias a. Kollros, 1946; Fritsch u. Krupp, 1952) и в ней особые органы чувств — «campaniform sensilla» (Roeder a. Weiant, 1948), импульсация в которых возникает при действии ничтожных количеств яда. Для раздражения же моторных нервов требуются большие дозы яда, а нервные ганглии, в этом смысле, наименее чувствительны к действию яда (Yeager a. Munson, 1945; Bodenstein, 1946; Tobias a. Kollros, 1946; Fritsch a. Krupp, 1952). Эти возник-

шие в нервной системе импульсы и вызывают у насекомых судороги, которые столь характерны для отравления ДДТ.

Несмотря на столь явные функциональные изменения в нервной системе, которые появляются уже в самом начале действия яда, попытки обнаружить соответствующие им морфологические изменения окончились неудачно. У насекомых, наиболее чувствительных к яду, бурно на него реагирующих судорогами и быстро гибнущих, нервная ткань остается неизменной. Ни обычные методы гистологического исследования, ни применение витального микроскопирования — фазоконтрастной и поляризационной микроскопии — не позволили выявить дегенеративные изменения даже на последних стадиях действия яда¹ (Richards a. Cutkomp, 1945; Witt, 1947; Bozkurt, 1948; Chadbourne a. Rainwaten, 1953; Jones, 1953). Незначительные разрушения затрагивают только органоиды нервных клеток — тельца Ниссля и аппарат Гольджи (Chang, 1951; Lüers и др., 1954). Однако поскольку они незначительны и встречаются лишь у некоторых из погибших особей, этим нарушениям нельзя придавать общий характер. Лишь при длительно протекающем отравлении у насекомых развивается общая неспецифичная дегенерация клеток, которая захватывает не только нервную, но и другие ткани (Федотов и Бочарова, 1950, 1952, 1955; Норр, 1953; Теплякова, 1955). Таким образом, морфологические исследования говорят против избирательного повреждения нервной ткани и находятся в явном противоречии с нейрогенной гипотезой действия ДДТ.

В результате некоторые исследователи стали отрицать специфически нервное действие яда и высказывали предположение, что поражение нервной системы происходит вторично, а гибель насекомых обусловлена общим нарушением обменных процессов (Hoffmann u. Lendle, 1948; Кожанчиков, 1953; Lüers и др., 1954, и др.).

В связи с этим для понимания механизма действия ДДТ представляется весьма важным детальное изучение реакции нервной ткани на отравление и сопоставление этой реакции с реакцией на отравление других тканей.

Основной задачей данного исследования и явилось выявление патологических изменений в тканях отравленных насекомых. Для решения этой задачи была использована количественная методика витального окрашивания ткани, которая обладает рядом преимуществ по сравнению с обычными методами морфологического анализа.

МЕТОДИКА

В качестве объекта исследования была избрана весенняя падальная муха — *Protophormia terrae-novae* R. D. Она характеризуется относительно крупными размерами, легко разводится в лаборатории и обладает значительной чувствительностью к яду. Последнее обстоятельство является, на наш взгляд, очень существенным, так как только в случае быстро развивающегося отравления можно ожидать, что зафиксированные в тканях изменения являются первичными.

Работа проводилась со взрослыми мухами обоего пола в возрасте от 4 до 11 дней.²

Для отравления мух ДДТ они помещались на 10 минут под чашки Петри на диски из фотопленки. Как пленка, так и внутренняя сторона чашки Петри были предварительно обработаны раствором технического ДДТ в 96%-м спирте из расчета 2 г/м². В результате испарения спирта обработанная поверхность оказывалась покрытой тонким слоем мелких кристаллов яда. После десятиминутного контакта с отравленной поверхностью мухи переносились в чистые чашки Коха, где и находились до начала препаровки.

¹ Указания Гартцеля (Hartzell, 1945) на дегенерацию ядер в нейронах ганглиев комнатных мух впоследствии не было подтверждено (Lüers и др., 1954).

² Поскольку в пищевом радионе мух отсутствовали белки, так называемый физиологический возраст мух был одинаковым.

Подробное описание поведения мух, отравленных ДДТ, можно найти в работе Бука и Кейстер (Buck a. Keister, 1949). В наших опытах признаки отравления появлялись у мух уже через несколько минут после контакта с ДДТ. Через 10—15 минут все мухи опрокидывались на спинку с судорожно сокращающимися конечностями, а к концу первых суток у них развивался паралич.

У отравленных мух проводилось исследование грудного нервного ганглия и среднего отдела кишечника — «желудка». Для этого через различные промежутки времени после действия ДДТ, начиная с падения мух на спинку и кончая третьими-четвертыми сутками, мухи декапитировались и у них осторожно отпрепаровывались грудной ганглий и кишечник.

Необходимость изучения тканей через такой длительный срок (3—4 суток) после отравления была вызвана тем обстоятельством, что момент гибели насекомых точно не установлен. Вместе с тем известно, что еще некоторое время после наступления паралича мухи остаются живыми.

Поскольку в группе в 20—30 одновременно отравленных мух всегда можно отметить более чувствительных к ДДТ насекомых, у которых процесс отравления протекает быстрее, и таких, у которых процесс задерживается, в опыт отбирались те особи, состояние отравления которых являлось для всей группы доминирующим. Только в ряде опытов для того чтобы выяснить, имеется ли связь между внешним состоянием отравленных мух и состоянием их тканей, ставились параллельно эксперименты с мухами, состояние которых было различным, несмотря на одинаковое время действия яда.

Как уже указывалось, анализ состояния тканей мух, отравленных ДДТ, проводился количественным методом витальной окраски с целью выявления в тканях патологических изменений.

Возможность применения метода витальной окраски для решения поставленной задачи основывается на том факте, что способность тканей сорбировать витальные красители, в конечном счете, зависит от состояния белка в протоплазме. Работами Насонова, Александрова и их сотрудников было установлено, что сорбционная способность денатурированных белков значительно больше сорбционной способности нативных и что самые различные воздействия, вызывающие альтерацию белков протоплазмы, одновременно меняют сорбционную способность ткани. Таким образом, по количеству сорбированного тканью красителя можно судить о состоянии белка протоплазмы (Александров и Насонов, 1939; Насонов и Александров, 1940; Браун, 1949, и др.). Под влиянием раздражителей не только увеличивается окрашиваемость ткани, но одновременно меняется и характер распределения красителя в клетке. Клетка теряет функцию гранулообразования, и краситель начинает диффузно прокрашивать протоплазму и ядро. Все это позволяет по характеру окраски судить об изменениях физиологического состояния различных клеток.

При незначительных воздействиях изменения белковой структуры ткани и связанные с ним изменения характера окраски и некоторых других свойств протоплазмы, комплекс которых был назван Насоновым и Александровым (1934, 1940) паранекрозом, являются обратимыми, в противном случае паранекротические изменения перерастают в посмертные.

Для исследования патологического процесса, протекающего в тканях насекомых, пораженных ДДТ, мы избрали количественный метод витального окрашивания. По сравнению с качественным методом он является более точным, вскрывает более ранние изменения и позволяет измерять глубину поражения ткани. Однако до настоящего времени при работе с насекомыми количественный метод витальной окраски еще не применялся. О состоянии протоплазмы клеток насекомых, подвергнутых различным воздействиям (удушье, гипотония, наркотики, утомление и проч.), авторы судили только качественно, по характеру распределения красителей в клетке (Prowazek, 1902; Александров, 1932; Мецкерская, 1935; Макаров, 1938; Левин, 1949). Поэтому, прежде чем непосредственно приступать к изучению тканей отравленных насекомых, предстояло выяснить, возможно ли применение количественного метода витальной окраски к тканям насекомых.

Впервые количественное определение сорбционной способности клеток, подвергнутых различным воздействиям, было выполнено в лаборатории Д. Н. Насонова Брауном и Ивановым (1934) на мышечной ткани лягушки. Сущность этого метода сводится к сравнению количества красителя, сорбированного опытной тканью, с количеством красителя, сорбированного при тех же условиях контрольной тканью.

При определении количества сорбированного красителя необходимо соблюдать особую тщательность при препаровке органов, так как даже незначительная механическая травма резко увеличивает сорбцию красителя (Александров, 1932; Раевская, 1948).

Именно этим требованием в значительной мере обусловлены методические трудности количественного определения сорбционной способности тканей насекомых. В связи с мелкими размерами органов и наличием большого количества трахей, пронизывающих органы насекомых, выбор объекта исследования пришлось ограничить только двумя органами: грудным нервным ганглием и средним отделом кишечника. Эти органы относительно легко и быстро можно извлечь из насекомого, однако и в этом

случае трудно избежать повреждения. Так, несмотря на соблюдение предосторожностей, приблизительно одна треть изолированных грудных ганглиев имела различные механические повреждения. Поэтому сразу после окраски производилась отбраковка органов, что было возможно, так как поврежденные участки резко выделялись своей интенсивной окраской.

Методика определения сорбционного уровня тканей насекомых заключалась в следующем. Отпрепарованные под бинокулярной лупой грудной ганглий или средний отдел кишечника подвешивались на серфине на 15 минут в раствор красителя с температурой 19—21° С. В качестве красителей использовались 0.1%-й раствор нейтрального красного и 0.004%-й раствор фенолового красного, приготовленные на растворе Бидля и Эфруссии. Окрашенные органы споласкивались в чистом растворе Бидля и Эфруссии и под лупой очищались от обрывков посторонних тканей, с ганглия снималась оболочка, а кишечник разрезался вдоль и из него извлекалась перитрофическая мембрана с остатками пищи. После отбраковки все неповрежденные органы на сутки помещались в пробирки с подкисленным спиртом для извлечения сорбированного красителя. Для извлечения нейтрального красного применялся 70%-й спирт с 2%-й серной кислотой, а для фенолового красного — 70%-й спирт с 7%-й серной кислотой. Полученные таким образом вытяжки красителя фотометрировались на ступенчатом фотометре Пульфриха с применением микрокувет.

Уже первые опыты показали, что того количества красителя, которое сорбируется кишечником, а тем более ганглием одной мухи, явно недостаточно (для работы на фотометре Пульфриха). Поэтому мы стали экстрагировать краситель одним объемом спирта (0.7 мл) сразу из органов, отпрепарованных у нескольких мух, находящихся в одинаковом состоянии. Так, при окраске нейтральным красным для получения вытяжки красителя нужной интенсивности оказалось достаточным брать в одну пробу кишечник от 4—6 мух, а ганглий от 10—15 мух. При работе с феноловым красным необходимое количество органов оказалось еще большим. Таким образом, получаемые значения сорбции красителя являются суммарными для нескольких органов. Для получения сравнимых величин мы рассчитывали количество красителя, сорбированное одним ганглием. При делении получаемых величин сорбции на количество ганглиев в вытяжке получается средняя величина сорбции красителя одним ганглием. В случае кишечника расчет сорбции красителя производился на 1 мм длины кишки, для чего отрезки кишечника перед помещением в спирт измерялись с помощью окуляр-микрометра.

В качестве контрольных органов использовались соответствующие органы, взятые от нормальных, не отравленных мух. Так как по неизвестной причине сорбционный уровень контрольных органов за все время работы не оставался постоянным, мы проводили окраску опытных и контрольных к ним серий приблизительно в одно и то же время и таким образом сохраняли стандартность условий окраски. Действительно, как это видно из табл. 1 (стр. 305), при постановке контрольных серий опытов с нервными ганглиями в один сезон величины сорбции ими нейтрального красного поддерживаются на одном уровне даже на протяжении нескольких месяцев. Подобные отношения наблюдаются и в контрольных сериях, поставленных с кишечником.

Поскольку отравленные насекомые прекращают питаться, при работе с кишечником потребовалась специальная серия контрольных опытов для установления того влияния, которое может оказать на окраску кишечника состояние голода. С этой целью производилась окраска кишечника у сытых и голодных мух. При этом оказалось, что функциональное состояние эпителиальных клеток не оказывает заметного влияния на сорбционные свойства и окраска кишечника как голодных, так и сытых мух поддерживается на одном и том же уровне: среднее значение сорбции нейтрального красного для 8 серий сытых мух равняется 11.4, а для голодных — 10.8. Разница между ними находится в пределах колебаний отдельных серий внутри каждой из групп

$$\left(\frac{M_1 - M_2}{m_{\text{diff.}}} = \frac{11.4 - 10.8}{1.1} < 3 \right).$$

Во всех опытах полученные величины сорбции красителя контрольными органами принимались за 100% и по отношению к ним в процентах высчитывалась сорбция красителя опытными органами.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Сорбция красителя грудным ганглием отравленных мух

Наиболее подробно были исследованы сорбционные свойства грудного ганглия по отношению к нейтральному красному. Всего с нейтральным красным было поставлено 48 серий опытов, включающих 661 ганглий.

В этих опытах было прослежено изменение сорбционной способности ганглиев, начиная с 30 минут от начала действия ДДТ и кончая 50 часами.

На рис. 1 приведено графическое изображение полученных данных. Как видно из рисунка, в процессе отравления происходит постепенное изменение окраски ганглиев. В первый час отравления характер окраски

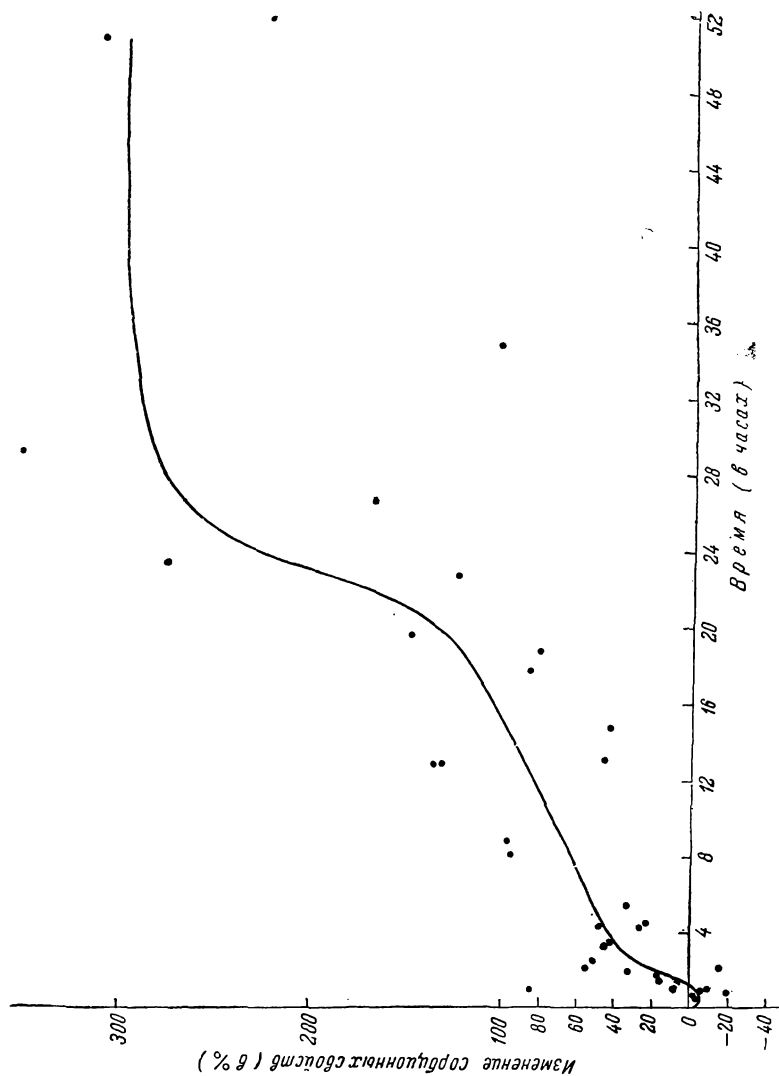


Рис. 1. Изменение сорбции нейтрального красного грудными ганглиями мух, отравленных ДДТ. На графике не поместились одна точка, соответствующая 40 часам от начала действия яда, где превышение сорбции красителя достигает +477%.

не совсем ясен и хотя в некоторых сериях можно отметить значительное понижение окраски (до 19.2%), среднее уменьшение сорбционных свойств нервных узлов статистически недостоверно (табл. 2).

Намечающееся снижение сорбции соответствует максимальной двигательной активности отравленных мух (у мух наблюдаются судорожные сокращения мускулатуры конечностей и брюшка). В течение следующего часа в большинстве серий опытов начинается повышение сорбционных свойств нервных ганглиев. Однако в этот период в отдельных сериях еще встречается понижение сорбции, и поэтому полученное повышение оправдать не удастся ($+31.1\% \pm 13.9\%$ — среднее из 6 серий, включающих 89 отдельных опытов).

Таблица 1

Окраска нейтральным красным нервных ганглиев нормальных мух.

№ серии	Дата постановки серии	Количество ганглиев в вытяжке	Количество сорбированного красителя на 1 ганглий в относительных единицах ¹	Общее количество ганглиев	Среднее арифметическое значение сорбции	Квадратичная ошибка отклонения
1	18 XI—22 XI	15	4.2	} 90	5.2	±0.34
2	23 XI—5 XII	15	5.6			
3	19 XII—25 XII	15	4.7			
4	27 XII—5 I	14	5.4			
5	13 I—15 I	15	4.7			
6	1 II—3 II	16	6.5			

Начиная с 2½ часов отмечается стойкое усиление окрашиваемости, которое достигает в среднем 36.2% при квадратичной ошибке отклонения $\pm 4.2\%$ (табл. 3). К этому времени судорожные сокращения конечностей переходят в высокочастотное дрожание, которое у части особей постепенно затухает, но может быть спровоцировано механическим раздражением. Как видно из табл. 3, степень усиления окраски ганглия не зависит от степени двигательной активности мух: она остается на одном уровне как при интенсивном дрожании лапок, так и при отсутствии какого-либо спонтанного движения у отравленных насекомых.

В последующие часы сорбция красителя ганглиями продолжает постепенно расти, и к тому времени, когда у отравленных мух развивается паралич, окраска превышает контрольный уровень на 109.2% (среднее для 4 серий опытов из 49 ганглиев).

В дальнейшем, примерно через 24 часа после действия ДДТ, происходит очень резкое возрастание окраски ганглиев, которое в одной из серий достигает +477.8%.

К этому времени заметно проявляется различная чувствительность мух к ДДТ, поэтому в этой зоне степень окрашиваемости ганглия начинает сильно зависеть от устойчивости насекомого к яду. У более чувствительных мух вскоре после развития паралича появляются макроскопические изменения в тканях, которые сопровождаются значительным ростом сорбционных свойств ганглия (в среднем +314.8% $\pm 47.8\%$ через 35 часов действия яда для 6 серий опытов с 54 ганглиями), тогда как у более стойких мух макроскопические изменения еще некоторое

Таблица 2

Изменение сорбции нейтрального красного грудным ганглием мух в течение первого часа после начала действия ДДТ

№№ серий	Количество ганглиев в серии	Среднее для серии время от начала действия ДДТ (в мин.)	Изменение сорбционных свойств ганглия (в %)
1	15	63	—10.7
2	15	49	—19.2
3	15	35	—1.5
4	16	34	—3.1
5	15	61	+3.6

Среднее арифметическое изменение сорбции красителя и квадратичная ошибка отклонения . .	—6.2% $\pm 3.9\%$
---	-------------------

¹ Показания фотометра в экстинциях $\times 10^3$.

Таблица 3

Изменение сорбции нейтрального красного грудным ганглием мух через $2\frac{1}{2}$ — $5\frac{1}{2}$ часов после начала действия ДДТ

№ серий	Количество ганглиев в серии	Среднее для серии время от начала действия ДДТ (в мин.)	Состояние двигательной активности отравленных мух	Изменение сорбционных свойств ганглия (в %)
1	15	160	} Интенсивное дрожание лапок.	+50.0
2	15	265		+27.6
3	15	267	} Мухи неподвижны, дрожание лапок только при механическом раздражении.	+24.3
4	13	181		+34.6
5	15	266		+47.3
6	15	331		+33.3

Среднее арифметическое изменение сорбции красителя и квадратичная ошибка отклонения $+36.2\% \pm 4.2\%$

время отсутствуют и сорбция красителя сохраняется на более низком уровне (+103.7% через 35 часов после действия яда для одной серии опытов с 10 ганглиями).

К сожалению, до настоящего времени еще не имеется строгого критерия для определения момента гибели парализованных насекомых. Поэтому для того чтобы убедиться, что некоторые из находящихся в параличе мух еще продолжают оставаться живыми, мы воспользовались влиянием температуры на процесс отравления.

Как известно, ДДТ обладает отрицательным температурным коэффициентом действия, и при повышении температуры в пределах физиологической нормы насекомые становятся более устойчивыми к действию ДДТ, так что могут даже полностью оправиться от отравления (Lindquist и др. 1945; Häfliger, 1948; Fan и др., 1948; Hoffman et al. Lindquist, 1949; Hoffman и др., 1949; Pradhan, 1949; Weaver, 1950; Дербенева-Ухова и Морозова, 1950; Ягужинская, 1952; Vinson a. Kearns, 1952; Roth a. Lindquist, 1953; Lüers и др., 1954, и мн. др.).

Чтобы убедиться в наличии необратимого паралича, мы подносили парализованных мух к электрической лампе. По мере нагревания, у части из них наблюдалось восстановление двигательной активности, в то время как другие оставались неподвижными. При этом было выяснено, что нагревание мух электрической лампой не вызывает восстановления судорог насекомых в том случае, если у них при вскрытии можно обнаружить макроскопические изменения тканей (сильное высыхание, отсутствие гемолимфы, сморщивание тканей и т. д.). Отсюда можно заключить, что отсутствие восстановления движений при незначительном нагревании неподвижных насекомых является хотя и грубым, но довольно удобным критерием необратимых изменений в организме насекомого.

Таким образом, в результате опытов с нейтральным красным было установлено, что при отравлении мух ДДТ происходит увеличение сорбционной способности нервного ганглия. Оно может быть обнаружено уже в первые часы отравления и в дальнейшем становится тем больше, чем больший срок проходит с момента действия яда.

Поскольку из описания методики следует, что для определения сорбции красителя, последний экстрагируется сразу из группы ганглиев, возникает опасность, не является ли изменение сорбции случайным совпадением, вызванным резким выпадением окраски одного-двух ганглиев. Для того чтобы оценить вероятность такого толкования результатов, кроме колориметрирования суммарной вытяжки красителя, про-

водилась также визуальная оценка окраски каждого ганглия. Оценка проводилась по двухбалльной системе, ганглии условно делились на слабо и сильно окрашенные и их количество выражалось в процентах к общему числу. При графическом изображении этих данных, включающих 793 ганглия (рис. 2), видно, что с течением процесса отравления, количество слабо окрашенных ганглиев (левые столбики) падает, а количество сильно окрашенных ганглиев нарастает (правые столбики). Это означает, что увеличение сорбции вызвано не повышенной окраской отдельных слу-

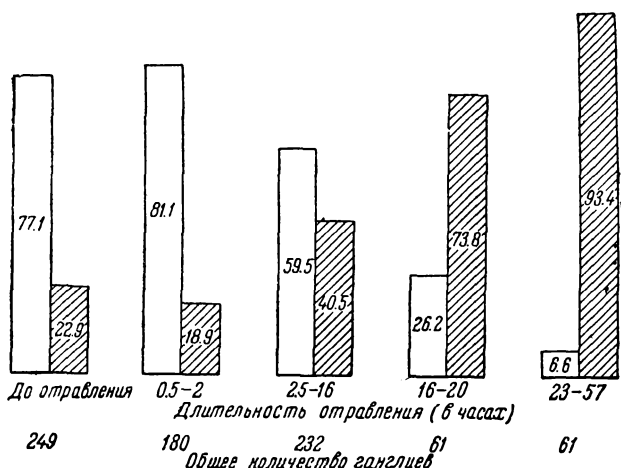


Рис. 2. Количество слабо и сильно окрашенных нейтральным красным ганглиев при отравлении мух ДДТ по данным визуальной оценки. Светлые столбики — количество слабо окрашенных ганглиев, заштрихованные столбики — количество сильно окрашенных ганглиев в процентах к общему числу ганглиев.

чайных ганглиев, а повышением сорбционных свойств у их основной массы.

Нарастанию количества сильно окрашенных ганглиев в процессе отравления предшествует небольшое понижение окраски: количество слабо окрашенных ганглиев увеличивается по сравнению с контрольными, что позволяет думать, что обнаруженное нами начальное понижение окраски ганглиев является реальным (табл. 2, рис. 1).

Нейтральный красный относится к так называемым гранулярным красителям и способен, спустя некоторое время после проникновения в клетки, собираться в них в виде гранул, поэтому обнаруженное в наших опытах усиление окраски может быть вызвано как увеличением диффузного фона, так и более интенсивным образованием гранул. Однако только в случае усиления диффузного фона можно утверждать, что увеличение сорбционных свойств непосредственно связано с процессом денатурации клеточных белков.

Для выяснения этого вопроса было проведено микроскопическое изучение окрашенных ганглиев. Как показали эти наблюдения, за избранный нами пятнадцатиминутный срок окраски в нейронах ганглия не происходит образования гранул. В расположенных с края ганглия крупных нейронах хорошо видно, что протоплазма приобретает бледно-розовый оттенок, и на ее фоне выделяется бесцветное ядро.

Таким образом, изменение сорбционных свойств к нейтральному красному в наших опытах всецело обусловлено диффузной окраской и совершенно не связано с функцией гранулообразования.

Так как витальные красители являются солями с окрашенным анионом или катионом, окрашиваемость ими тканей в значительной мере зависит от рН протоплазмы, которое значительно изменяется при различных раздражениях ткани.

В связи с этим необходимо было проверить, не объясняются ли полученные с нейтральным красным результаты изменением со стороны рН протоплазмы. Если бы повышение окраски нейтральным красным (основной краситель) было вызвано всецело изменением среды протоплазмы, то при окраске кислым красителем вместо повышенной сорбции следовало бы ожидать снижения окраски. Для проверки этого предположения был использован кислый краситель — феноловый красный. По сравнению с нейтральным красным он окрашивает нервные ганглии более слабо, и поэтому для получения вытяжек краситель экстрагировался сразу из 25 ганглиев. Обычно окраска кислым красителем выявляет несколько более глубокие патологические изменения ткани, поэтому из всей кривой, полученной с нейтральным красным, с феноловым красным мы повторили лишь небольшой участок кривой, соответствующий моменту развития у насекомых паралича. В этих опытах были использованы макроскопически неизменные ганглии мух через 16—30 часов после контакта насекомых с ДДТ. В результате было получено среднее превышение сорбции фенолового красного на 42.5% при квадратичной ошибке отклонения $\pm 13.4\%$ (5 серий опытов при общем количестве ганглиев 108).

Таким образом, у отравленных мух сорбционная способность ганглиев возрастает не только по отношению к основному красителю, но также и по отношению к кислому красителю. Это означает, что увеличение сорбционных свойств к витальным красителям не может быть объяснено изменениями среды протоплазмы, а всецело обусловлено денатурационным изменением клеточных белков нервной ткани.

С о р б ц и я к р а с и т е л я с р е д н и м о т д е л о м к и ш е ч н и к а о т р а в л е н н ы х м у х

В опытах с окраской кишечника нами исследовался расположенный в груди прямой отрезок среднего отдела кишечника — «желудок» (Lowne, 1890—1895; Hewitt, 1910), причем основная часть, из которой экстрагировался краситель, падала на средний «гофрированный» отдел желудка, с рыхло расположенными мышечными волокнами и лежащими между ними криптами эпителиальных клеток. Этот участок кишечника отщипывался вместе с примыкающим к нему провентрикулюсом, и так как его свободный конец защемляется при окраске серфином, краситель, проникая в полость кишечника через всю толщу стенки, последовательно окрашивал перитонеальную оболочку и мышечный и эпителиальный слой.

Изучение сорбционных свойств кишечника у отравленных ДДТ насекомых, так же как и нервного ганглия, проводилось с помощью двух витальных красителей: нейтрального красного и фенолового красного.¹ С последним были получены более четкие результаты, поэтому с ним и будет начато изложение экспериментального материала.

Всего с феноловым красным было поставлено 36 серий опытов, которые позволили проследить сорбционные свойства кишечника у 309 отравленных мух на протяжении 100 с лишним часов от момента действия яда.

Повышение окраски кишечника развивается очень рано. Однако, несмотря на то, что статистически оправданное увеличение окраски было выявлено уже в первые часы действия ДДТ (табл. 4), устойчивое повы-

¹ Как показало микроскопическое наблюдение, сорбция красителя кишечником, так же как и ганглием, обусловлена диффузной окраской всех тканей кишки.

шение сорбции красителя кишечником наступает только в начале вторых суток. Стойкому повышению сорбции фенолового красного предшествует двукратное временное повышение окраски, сменяемое временными понижениями сорбции красителя. Таким образом, в отличие от ганглия, сорбционные свойства кишечника в процессе отравления изменяются волнообразно. Волнообразный характер изменения сорбционных свойств наиболее отчетливо выступает при графическом изображении полученных данных (рис. 3).

Как видно из рисунка, начальное, наиболее слабое из всех повышение окраски сменяется наиболее глубоким понижением окраски, достигающим в одной из серий — 42.8%. Тогда как следующее, более мощное повышение окраски (+63.8%—15.4%, среднее для 5 серий опытов) постепенно переходит в очень незначительное понижение. Это слабое понижение, в свою очередь, переходит в самое значительное увеличение окрашиваемости, достигающее предела в 200 с лишним процентов через 60—80 часов. Отсюда видно, что в процессе отравления волнообразные изменения сорбции фенолового красного происходят на фоне все возрастающей окраски.

Существование волнообразного изменения сорбционных свойств кишечника, возникающего в ответ на действие ДДТ, не может вызывать сомнений, так как в опытах с другим красителем, нейтральным красным, было получено такое же изменение окраски (рис. 4). При сопоставлении кривых сорбции двух красителей (рис. 3 и 4) видно, что изменения сорбции нейтрального красного не только по своему характеру напоминает изменения, полученные с феноловым красным, но что повышение и понижение окраски совпадают у обоих красителей во времени. Такое совпадение является тем более неожиданным, что обе кривые были получены в различные сезоны.

Для каждого повышения и понижения окрашиваемости для обеих кривых сорбции красителя кишечником была проведена статистическая обработка соответствующих серий опытов, результаты которой представлены на табл. 5.

Как показывает приведенный цифровой материал, разница между повышением и понижением окрашиваемости кишечника оправдывается, что позволяет говорить о достоверности волнообразного изменения сорбционных свойств кишечника у отравленных насекомых.

При очень большом сходстве кривых сорбции нейтрального красного и фенолового красного кишечником, между ними все же имеются небольшие различия. Так, при окраске феноловым красным лучше выражено начальное повышение окрашиваемости, а при окраске нейтральным красным наблюдается значительно более глубокое вторичное снижение окрашиваемости. Подобное различие в сорбции обоих красителей связано,

Таблица 4

Изменение сорбции фенолового красного кишечником мух через 1—4 часа после начала действия ДДТ

№ серии	Количество мух в серии	Среднее для серии время от начала действия ДДТ (в мин.)	Изменение сорбционных свойств кишечника (в %)
1	8	185	+117.8
2	9	120	+ 63.0
3	10	205	+ 76.9
4	11	163	+ 14.2
5	8	135	+ 29.3
6	7	148	+ 18.6
7	7	68	+ 36.9
8	7	110	+ 27.1

Среднее арифметическое изменение сорбции красителя и квадратичная ошибка отклонения	+47.9% ± 12.6%
---	----------------

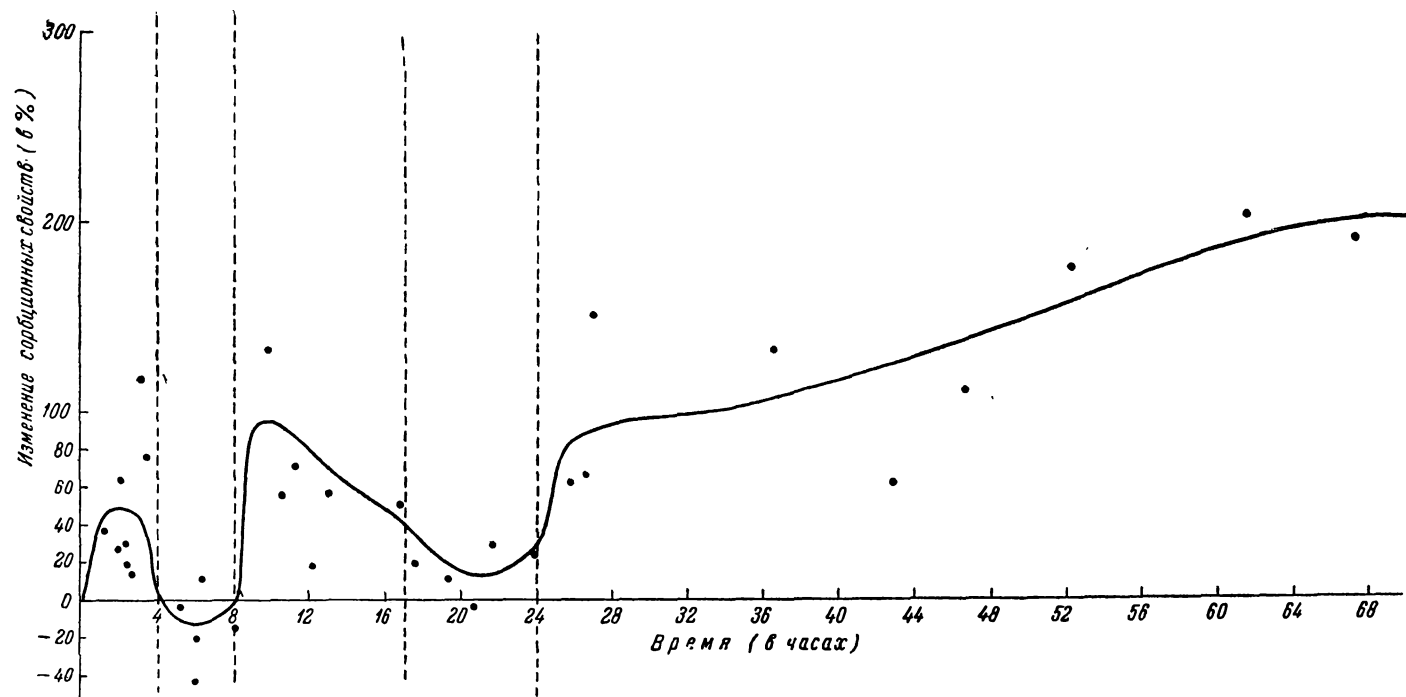


Рис. 3. Изменение сорбции фенолового красного средним отделом кишечника мух, отравленных ДДТ. Вертикальные прерывистые линии — интервалы времени, в соответствии с которыми проведена статистическая обработка результатов.

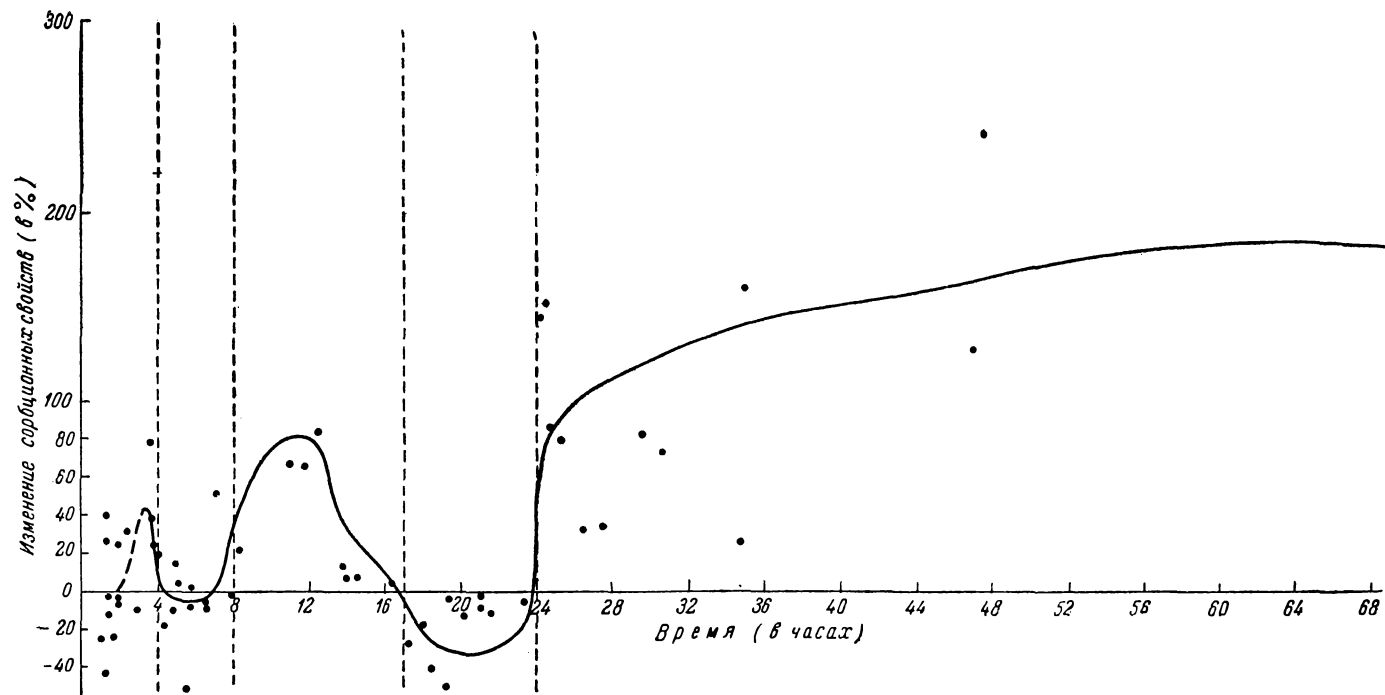


Рис. 4. Изменение сорбции нейтрального красного средним отделом кишечника мух, отравленных ДДТ.
Обозначения те же, что на рис. 3.

Таблица 5

Изменение сорбционных свойств кишечника по отношению к нейтральному красному и феноловому красному в различные интервалы времени после отравления мух ДДТ

Интервалы времени от начала действия ДДТ (в часах)	Нейтральный красный						Феноловый красный					
	число серий опытов	количество мух в опытах	среднее арифметическое отклонений сорбции (в %)	квadraticная ошибка отклонений (в %)	разность средних отклонений (в %)	квadraticная ошибка разности (в %)	число серий опытов	количество мух в опытах	Среднее арифметическое отклонений сорбции (в %)	квadraticная ошибка отклонений (в %)	разность средних отклонений (в %)	квadraticная ошибка разности (в %)
1—4	16	78	+ 9.9	± 7.8	} 12.0	± 10.8	8	67	+ 47.9	± 12.6	} 62.4	± 15.5
4—8	11	52	— 3.1	± 7.5		± 10.8	5	43	— 14.5	± 9.0		± 15.5
8—17	8	40	— 34.2	± 11.5		± 13.8	6	55	+ 63.8	± 15.4		± 17.8
17—24	10	48	— 18.4	± 5.1		± 12.6	5	45	+ 15.8	± 6.0		± 16.5
24—187	16	59	+ 136.8	± 22.4		± 23.0	12	99	+ 155.4	± 19.2		± 60.3

по нашему мнению, с тем, что наряду с изменением тинкториальных свойств белка при отравлении происходит постепенное уменьшение pH протоплазмы, в результате чего окрашиваемость клеточных белков кислыми красителями улучшается, а основными — падает. Это объяснение является тем более вероятным, что при окраске нейтральным красным мы обнаружили изменение тона нейтрального красного, указывающее на изменение реакции среды в кислую сторону.

Таким образом, в отличие от неуклонно возрастающей в процессе отравления окраски нервного ганглия, субстанциональные изменения в кишечнике протекают волнообразно. Следует подчеркнуть, что оба временных снижения окраски кишечника наблюдаются уже у тяжело отравленных насекомых. Первое уменьшение развивается через 4 часа, когда мухи лежат на спинке и их конечности судорожно сокращаются, а второе наступает через 16 часов у мух, уже длительное время находящихся в состоянии общего, но еще обратимого паралича.

Резкое нарастание сорбционных свойств желудка появляется только тогда, когда у парализованных мух уже не удается выявить биений сердца и когда кратковременное нагревание мух не вызывает устранения паралича. Повидимому, в это время насекомые уже погибают.

Как известно, ДДТ является ядом контактного действия, вместе с тем в ряде работ было обнаружено, что ДДТ может действовать и как типичный кишечный яд. При попадании яда в кишечник он вызывает отравление, которое по своим признакам ничем не отличается от обычного отравления, вызванного соприкосновением покровов с ДДТ (Holst, 1944; Lindquist и др., 1944; Maple, 1945; Бочарова, 1947; Сазонов, 1948; Вашков, 1948; Weaver, 1950; Федотов и Бочарова, 1950 и 1952; Buck и др., 1952; Козлова, 1950).

В связи с этим возникает вопрос: в какой мере обнаруженные нами изменения сорбционных свойств кишечника обусловлены влиянием ДДТ, проникшего через покровы, и в какой мере местным (кишечным) действием яда?

Для решения этой задачи мы исследовали сорбционные свойства кишечника у таких мух, у которых непосредственное попадание ДДТ в кишечник было предотвращено предварительным обрезанием хоботка. Как установили Линдквист с соавторами (Lindquist и др., 1951), эта

операция не оказывает влияния ни на процент смертности комнатных мух от контакта с ДДТ, ни на распределение этого яда по тканям и органам насекомого.

Обрезание хоботка проводилось у мух, подвергнутых легкому кратковременному наркозу парами цианистого калия.

Через 5—7 часов после операции мухи совершенно оправляются и остаются живыми и нормально подвижными более полутора суток. Контрольные опыты показали, что через 20—30 часов после такой операции, сорбция фенолового красного кишечником в среднем почти не меняется ($-5.1\% \pm 6.1\%$ из 6 серий опытов, включающих 120 мух).

Спустя 17—24 часа после обрезания хоботка, прооперированные мухи обычным способом подвергались воздействию ДДТ. Возникающее у этих мух отравление по внешним признакам не отличается от процесса отравления у нормальных мух и, как обычно, через 15—18 часов заканчивается общим параличом насекомого. Через различные промежутки времени после контакта с ДДТ у мух отпрепаровывался кишечник и окрашивался феноловым красным. Поскольку в контрольных опытах при удалении хоботка часть мух через 30—38 часов погибает, изменение сорбционных свойств кишечника под влиянием ДДТ у прооперированных мух было прослежено только до 16 часов действия яда, т. е. спустя 25 часов после операции. Всего с окраской кишечника у отравленных мух без хоботка было поставлено 14 серий, включающих 118 опытов.

Как показывает цифровой материал, приведенный в табл. 6, за весь исследованный промежуток времени (от $1\frac{1}{2}$ до 16 часов с момента действия ДДТ) сорбционные свойства кишечника мух с отрезанными хоботками значительно ниже сорбционных свойств кишечника неоперированных мух.

Так, если у опытных мух с хоботками в первые 4 часа действия ДДТ сорбция фенолового красного кишечником достигает $+47.9\%$ и является достоверной (табл. 4), то из 6 серий опытов с оперированными мухами только в одной серии наблюдается небольшое повышение

окраски ($+18.5\%$) а в остальных сериях сорбция красителя кишечником или не меняется, или даже значительно снижена. Среднее значение сорбции за этот период равняется $-10.4\% \pm 10.2\%$, и, таким образом, различие между сорбцией красителя кишечником оперированных и неоперированных мух является достоверным

$$\left(\frac{M_1 - M_2}{m_{\text{diff.}}} = \frac{64.7}{16.3} > 3 \right).$$

Таблица 6

Изменение сорбции фенолового красного кишечником мух без хоботков, после отравления мух ДДТ

№ серии	Количество мух в серии	Среднее для серии время от начала действия ДДТ	Изменение сорбционных свойств кишечника (в %)
1	8	1 ч. 40 м.	+18.5
2	8	2 ч. 30 м.	-23.1
3	9	2 ч. 35 м.	+ 1.2
4	7	2 ч. 50 м.	- 5.5
5	9	3 ч. 35 м.	0
6	8	3 ч. 50 м.	-53.7
7	8	4 ч. 50 м.	- 8.2
8	13	7 ч. 00 м.	-49.8
9	7	8 ч. 15 м.	-21.3
10	8	11 ч. 5 м.	+20.3
11	8	12 ч. 45 м.	+17.9
12	8	14 ч. 40 м.	-33.7
13	9	15 ч. 55 м.	+ 7.0
14	8	16 ч. 10 м.	+22.3

В дальнейшем, вместо второго значительного повышения окрашиваемости кишечника ($+63.8\% \pm 15.4\%$ у мух с хоботками) между 8 и 16 часами после отравления у мух без хоботка наблюдается колебание сорбции красителя около контрольного уровня (среднее для 6 серий опытов

$+2.1\% \pm 9.8\%$ при максимальных отклонениях $+22.3\%$ и -3.7%), причем и в данном случае различие между сорбцией фенолового красного кишечником отравленных мух с хоботками и без хоботков является достоверным.

Таким образом, отрезание хоботка снимает оба временные, значительные повышения сорбции красителя кишечником отравленных мух. Следовательно, эта операция не только уменьшает окрашиваемость кишечника, но одновременно сглаживает волнообразные изменения сорбционных свойств кишечника, отмеченные при обычном отравлении мух ДДТ.

Подобное изменение окрашиваемости, по нашему мнению, нельзя отнести за счет самого оперативного вмешательства, так как, во-первых, в результате операции в контрольных сериях опытов не было получено значительного изменения сорбционных свойств кишечника и, во-вторых, известная травма, которая наносится кишечнику обрезанием хоботка должна была бы суммироваться с действием яда и тем самым увеличить сорбционные свойства кишечника.

Однако, как было установлено, этого не наблюдается, и во всем интервале времени, начиная от 2-го часа и вплоть до 16 часов после начала отравления, происходит относительно снижение сорбционных свойств кишечника. Это означает, что два временных повышения сорбционных свойств кишечника при обычном контакте насекомого с ядом следует относить за счет местного кишечного действия ДДТ.

Связывая временные повышения окрашиваемости кишечника с местным действием яда, можно полагать, что волнообразный характер этих изменений обусловлен двумя противоположно направленными процессами: с одной стороны — накоплением, а с другой — разрушением. В пользу такого толкования результата можно привести данные Стернбурга и Кернса (Sternburg a. Kearns, 1952), согласно которым разрушение яда особенно интенсивно протекает в переднем и среднем отделах кишечника.

Таким образом, изменение сорбционных свойств кишечника у отравленных насекомых зависит от способа проникновения яда в организм насекомого. При обычном контакте насекомого с отравленной ДДТ поверхностью наряду с проникновением яда через покровы и дальнейшим распространением его с током гемолимфы часть ДДТ проникает в пищеварительный тракт непосредственно через ротовое отверстие. При этом смешанном контактно-кишечном способе воздействия наблюдается раннее повышение сорбционных свойств протоплазмы тканей кишечника, которое в дальнейшем изменяется волнообразно и через 24 часа заканчивается резким увеличением сорбционного уровня тканей и смертью животного. В случае изолированного контактного действия ДДТ, начального повышения сорбционных свойств кишечника не происходит. Однако и в этом случае отравление наступает и животное гибнет. Это означает, что изменение тканей кишечника (при контактном отравлении) наступает только в конце первых суток после отравления насекомого и что эти изменения никак не могут быть причиной, ответственной за развитие всех признаков отравления и смерти животного.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для понимания механизма действия какого-либо яда, наибольшее значение имеют те изменения в организме, которые возникают в процессе отравления наиболее рано, так как более поздние изменения обычно развиваются вторично и являются однотипными при действии любого повреждающего фактора.

В то же время при обзоре литературы по механизму действия ДДТ обращает на себя внимание отсутствие данных о каких-либо ранних изменениях в тканях. Все нарушения, которые можно было отметить в тканях насекомых, развивались очень поздно: или на последних стадиях отравления, или же спустя много часов и даже дней после начала отравления.

Применение методики витального окрашивания тканей позволяет обнаружить изменения в клетках отравленных мух уже в первые часы после начала действия ДДТ. Эти изменения возникают как в клетках нервного ганглия, так и в тканях среднего отдела кишечника, но протекают в них различно, что указывает на специфичность тканевого действия ДДТ.

Особенно четко различие в реакции тканей ганглия и кишечника на ДДТ проявляется при сравнении кривых сорбции красителей этими органами (ср. рис. 1 с рис. 4). В то время как возникающие в ганглии нарушения сорбции являются стойкими и с течением времени прогрессивно нарастают, ранние изменения в тканях кишечника не постоянны и имеют волнообразный характер. Более того, при устранении кишечного действия яда, когда сохраняется только контактный способ проникновения ДДТ в организм насекомого, начальных изменений сорбции обнаружить вообще не удается. В связи с этим начальные изменения окраски в кишечнике можно расценивать, как результат кишечного действия яда, тогда как при контактном действии ДДТ повышения сорбционных свойств кишечника не происходит вплоть до развития паралича. Эти данные позволяют говорить о более ранней повреждаемости тканей ганглия по сравнению с тканями кишечника. Даже при непосредственном кишечном отравлении сорбционные свойства кишечника изменяются волнообразно. По данным Трошиной (1956), более слабое раздражение тканей приводит к колебательному изменению функционального состояния ткани, тогда как относительно сильное воздействие очень скоро вызывает стойкую ответную реакцию. Поэтому стойкое повышение окраски ганглия уже через 2½ часа после отравления указывает на более сильную повреждаемость нервной ткани по сравнению с тканями кишечника даже в случае смешанного контактно-кишечного действия яда.

Зарегистрированное нами повышение сорбционных свойств нервного ганглия может объясняться двумя способами: с одной стороны, оно может быть связано с непосредственной реакцией нервных клеток на действие яда, а с другой — может указывать на возбужденное состояние насекомых.

Как известно, одним из первых признаков отравления ДДТ является общее двигательное возбуждение насекомого, которое не может не сопровождаться возбужденным состоянием нервных клеток.

Вместе с тем, как было показано в ряде работ, выполненных в лаборатории Насонова, возбужденное состояние нервных клеток характеризуется повышенным сродством цитоплазмы к витальным красителям (Романов, 1948, 1953; Смиттен, 1948; Ушаков, 1949; Зараковский и Левин, 1953, и др.). Естественно думать поэтому, что более раннее стойкое повышение окраски нервного ганглия по сравнению с тканями кишечника не имеет прямого отношения к местному токсическому действию ДДТ, а обусловлено общим двигательным возбуждением животного.

Однако, как это следует из сопоставления повышения сорбционных свойств ганглия с изменением двигательной активности насекомого, такое толкование результатов встречает затруднения. Дело в том, что максимальная двигательная активность мух падает на первый час отравления, когда окраска ганглия не только не повышается, а наоборот — испытывает тенденцию к некоторому понижению. Можно было бы думать, что раздражения в течение одного часа еще недостаточно для получения повышенной окрашиваемости ганглия, но это объяснение не является

правильным. Во всех указанных выше работах статистически достоверные изменения сорбционных свойств нейронов были получены уже после 30—60-минутного раздражения, а в опытах Романова (1948) даже через 10 минут. Следовательно, отсутствие достоверной реакции нейронов при сильном двигательном возбуждении насекомого в течение первых двух часов после действия яда, нельзя объяснить недостаточно длительным раздражением.

Это позволяет считать, что в наших условиях опыта общее возбуждение и двигательная активность отравленных насекомых не оказывает заметного влияния на сорбционные свойства нейронов.

Статистически достоверное повышение окрашиваемости, наступающее уже через 2½ часа после начала отравления, происходит на фоне сильно пониженной двигательной активности мух, что дает основание связывать повышение сорбционных свойств ганглия не с двигательным возбуждением насекомых, а с непосредственным местным действием яда на ткань ганглия.

Возможность местного действия яда на ганглий обеспечивается значительным накоплением инсектицида в ткани нервного ганглия мух. Так, согласно данным ряда авторов (Lindquist и др., 1951; Hoffmann и др., 1952; Tahori a. Hoskins, 1953), примерно 10—15% всего ДДТ, проникшего во внутренние органы насекомых, можно обнаружить в грудном нервном ганглии. Принимая во внимание малые размеры нервного узла в сравнении с другими органами, нужно признать, что концентрация ДДТ в ганглии достигает весьма значительных величин. В связи с этим возникают благоприятные условия для его действия на нервную ткань насекомых.

Механизм тканевого действия ДДТ, по современным представлениям, сближается с действием цианистых соединений (Кожанчиков, 1947, 1953; Sactor, 1950; Барбарин, 1954).

В опытах *in vitro* было доказано, что ДДТ, подобно цианистому калию, избирательно блокирует дыхательные ферменты цитохромной системы и таким образом нарушает клеточное дыхание (Johnston, 1951; Anderson и др., 1954; Morrison a. Brown, 1954; Ludwig и др., 1955).

Учитывая, что нервные клетки наиболее чувствительны к кислородному голоданию (Петров, 1949) и что в наших опытах наиболее ранние изменения обнаруживаются именно в нервном ганглии, можно думать, что повышение окраски ганглия вызвано нарушением внутриклеточного дыхания нейронов. В пользу такого толкования результатов можно привести данные Гублера (1949), который изучал кислородное голодание нервной и других тканей лягушки количественным методом витальной окраски. Подобно тому, как это наблюдалось в наших опытах, кислородное голодание раньше всего сказывается на окрашиваемости нервных клеток. Более того, даже в деталях повреждающее действие ДДТ на нервную ткань сходно с влиянием, которое оказывает на нее кислородная недостаточность. Как в том, так и в другом случае, вызываемые ими нарушения не обнаруживаются обычными приемами гистологической техники и могут быть вскрыты только методом витальной окраски.

Таким образом, сопоставление собственных данных с литературным материалом приводит нас к выводу, согласно которому решающее значение в механизме токсического действия ДДТ принадлежит нарушению клеточного дыхания нервной системы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проникая в организм насекомого, ДДТ током гемолимфы разносится по всем органам и тканям, где, вследствие блокады цитохромной системы, вызывает нарушение клеточного дыхания.

В связи с плохой растворимостью ДДТ в водных растворах и хорошей растворимостью в липоидах он концентрируется, в основном, в тканях, богатых липоидами (жировое тело, нервная система и др.). Это создает известные предпосылки для тканевой специфичности действия яда. Еще большее значение имеет различная чувствительность органов к кислородному голоданию.

Эти два фактора и, наконец, возбужденное состояние насекомого являются причиной наибольшей уязвимости нервной системы по сравнению с другими органами. В итоге в нервной системе развивается острая кислородная недостаточность, вызывающая повреждение протоплазмы и связанное с ним повышение сорбционных свойств по отношению к витальным красителям.

С течением времени наблюдается развитие кислородной недостаточности и в других органах, и они перестают нормально функционировать. Так, например, в наших опытах сердечная мышца, которая по данным ряда авторов наиболее устойчива к действию ДДТ (Maple, 1945; Tobias a. Kollos, 1946; Schäfer a. Becker, 1953, и др.), переставала сокращаться в среднем через 22—25 часов. Примерно в это же время развивается стойкое и резкое повышение сорбционных свойств тканей кишечника. По времени эти явления совпадают со вторичным усилением окраски нервного ганглия. В дальнейшем сорбционные свойства обоих органов остаются без заметных изменений, и даже в опытах с мухами, находившимися в параличе 2—4 суток, они существенно не меняются. Все эти явления позволяют считать, что отравленные насекомые к этому моменту погибали и что резкое повышение сорбции обоих органов является уже посмертным.

Подводя итог выполненной работе, можно сделать следующее заключение. Метод витальной окраски позволяет обнаружить патологические изменения в тканях мух, отравленных ДДТ. Применение этой методики позволило выявить первичное поражение грудного ганглия уже через 2½ часа после начала действия яда. Таким образом были зарегистрированы субстанциональные изменения в нервной ткани, которые соответствуют давно обнаруженным ранним функциональным изменениям нервной системы. Это обстоятельство является существенным доводом в пользу нейрогенной гипотезы механизма действия ДДТ.

Считаю приятным долгом выразить глубокую благодарность дорогому и глубокоуважаемому Дмитрию Николаевичу Насонову за руководство и внимание к работе.

ВЫВОДЫ

1. Применение количественной методики витального окрашивания тканей весенних падальных мух, *Protophormia terrae-novae* R. D., в отличие от других методов гистологического исследования позволяет обнаружить первичную реакцию тканей на отравляющее действие ДДТ.

2. Сорбционная способность протоплазмы клеток грудного ганглия и среднего отдела кишечника изменяется уже в первые часы после 10-минутного контакта мух с обработанной ядом поверхностью (2 г яда на 1 м² площади).

3. Нарушения, возникающие в ганглии, являются стойкими и с течением времени прогрессивно нарастают. В противоположность этому начальные изменения в тканях кишечника не постоянны. Они связаны с местным, кишечным действием яда и не обнаруживаются при строго контактном способе воздействия ДДТ на организм насекомого. На основании этого можно говорить о более ранней повреждаемости нервной ткани по сравнению с тканями кишечника.

4. Найденные ранние субстанциональные изменения нервной ткани находятся в соответствии с давно обнаруженными ранними функциональными сдвигами в нервной системе и являются существенным доводом в пользу нейрогенной гипотезы действия ДДТ.

5. В результате сопоставления собственных и литературных данных, полученное при отравлении ДДТ изменение сорбционной способности первого ганглия было связано с нарушением процессов тканевого дыхания вследствие блокады инсектицидом цитохромной системы нейронов.

ЛИТЕРАТУРА

- [Александров В. Я.] Alexandrov V. J. 1932. Über die Bedeutung der oxydoreduktiven Bedingungen für die vitale Färbung, mit besonderer Berücksichtigung der Kernfärbung in lebendigen Zellen (*Chironomus-Larven und Daphnia pulex*). *Protoplasma*, 17, 2 : 162—217.
- Александров В. Я. и Д. Н. Насонов. 1939. О причинах коллоидных изменений протоплазмы и увеличения сродства ее к красителям под влиянием повреждающих воздействий. *Архив анат., гистолог. и эмбриолог.*, 22, 1 : 11—43.
- Барбарин В. В. 1954. Изменения окислительных процессов и их адаптивное значение в жизненном цикле простейших и в онтогенезе некоторых беспозвоночных. Автореф. дисс. Военно-морск. медик. акад., Л. : 1—29.
- Бочарова С. И. 1947. Испытание пентахлорина в борьбе с вредителями сельскохозяйственных растений. В кн.: Синтетические инсектициды. М. : 77—83.
- Браун А. Д. 1949. Взаимодействие нативных и денатурированных белков с красителями. Автореф. дисс., Инст. exper. медик., Л. : 1—9.
- Браун А. А. и М. Ф. Иванов. 1933. Витальная окраска поперечно-полосатой мышечной ткани в различных экспериментальных условиях. *Архив анат., гистолог. и эмбриолог.*, 12, 1 : 3—26.
- Вашков В. И. 1948. Некоторые данные о ДДТ, как кишечном яде для насекомых. *Медик. паразитолог. и паразитарн. болезни*, 17, 1 : 45—46.
- Губер Е. В. 1949. О прижизненном отложении нейтральрот в тканях мозга и мышцы при кислородном голодании. Автореф. дисс. Военно-медик. акад. им. С. М. Кирова, Л. : 1—9.
- Дербенева-Ухова В. П. и В. И. Морозова. 1950. Случай появления ДДТ-устойчивости у комнатной мухи. *Медик. паразитолог. и паразитарн. болезни*, 19, 5 : 464—467.
- Зарковский Г. М. и С. В. Левин. 1953. Влияние различной силы раздражения симпатических и спинальных ганглиев на связывание ими прижизненных красителей. *Физиолог. журн. СССР*, 39, 1 : 81—88.
- Кожанчиков И. В. 1947. О специфической устойчивости обмена насекомых к дихлордифенилтрихлорметилметану. *ДАН СССР*, 68, 2 : 345—348.
- Кожанчиков И. В. 1953. К пониманию физиологического действия дихлордифенилтрихлорэтана (ДДТ) на насекомых. *Сб. работ Инст. прикладн. зоолог. и фитопатолог.*, 2 : 3—16.
- Козлова Е. Н. 1950. О проникновении органических инсектицидов в ткани растений. *Докл. ВАСХНИЛ*, 3 : 30—32.
- Левин В. Л. 1949. К вопросу о механизме образования пупария у мух. *Уч. зап. ЛГУ, сер. биолог.*, 20, 113 : 229—253.
- Макаров П. В. 1938. Проблема общего и клеточного наркоза. *Архив анат., гистолог. и эмбриолог.*, 19, 1—2 : 5—104.
- Мещерская К. А. 1935. Особенности реакции половых клеток на действие агентов в сублетальных дозах. *Архив биолог. наук, сер. Б*, 37 : 827—836.
- Насонов Д. Н. и В. Я. Александров. 1934. К вопросу об изменениях живого вещества при обратимом переходе его в мертвое состояние. *Архив биолог. наук, сер. А*, 36, 1 : 95—111.
- Насонов Д. Н. и В. Я. Александров. 1940. Реакция живого вещества на внешние воздействия. *Изд. АН СССР, М.—Л.* : 1—252.
- Петров И. Р. 1952. Кислородное голодание головного мозга. *Медгиз, Л.* : 1—211.
- Погодина Л. Н. 1947. Новый инсектицид ДДТ в борьбе с паразитами человека. *Тр. Центр. н.-и. дезинфекц. ин-та*, 3 : 115—120.
- Раевская М. А. 1948. Возникновение и распространение повреждений в поперечно-полосатых мышцах лягушки под влиянием механических воздействий. *Сб. памяти акад. А. А. Заварзина, изд. АН СССР, М.—Л.* : 443—475.
- Романов С. Н. 1948. Влияние продолжительности раздражения нервных клеток на величину связывания ими красителей. *ДАН СССР*, 61, 4 : 761—764.

- Романов С. Н. 1953. Изменение сорбционных свойств нервных клеток головного мозга крыс под влиянием условнорефлекторного раздражителя. ДАН СССР, 90, 1 : 117—120.
- Сазонов П. В. 1948. Новые препараты ДДТ и ГХЦГ для борьбы с вредителями овошных культур. Л. : 1—54.
- Смиттен Н. А. 1948. Витальная окраска нейронов лягушки при раздражении. Сб. памяти акад. А. А. Заварзина, изд. АН СССР, М.—Л. : 482—492.
- Теплякова М. Я. 1955. Патологические изменения в яичниках вредной черепашки, развивающиеся под воздействием препарата ДДТ в активный период ее жизни. ДАН СССР, 101, 4 : 775—778.
- Трошина В. П. 1956. Функциональное состояние изолированных тканей, переживающих при температуре, близкой к нулю. Автореф. дисс., Лен. Гос. унив., Л. : 1—12.
- Ушаков Б. П. 1949. Влияние раздражения на витальную окраску нервных клеток спинного мозга узла лягушки. Уч. зап. Лен. гос. унив., сер. биол., 16, 99 : 114—123.
- Федотов Д. М. и О. М. Бочарова. 1950. Действие препарата ДДТ на вредную черепашку. ДАН СССР, 75, 4 : 587—590.
- Федотов Д. М. и О. М. Бочарова. 1952. Изменение морфо-функционального состояния вредной черепашки под воздействием препарата ДДТ. Зоолог. журн., 31, 4 : 528—537.
- Федотов Д. М. и О. М. Бочарова. 1955. Действие препарата ДДТ и некоторых фосфорорганических инсектицидов на вредную черепашку (*Eurygaster integriceps* Put.) В кн.: Вредная черепашка, т. 3 : 238—275.
- Ягужинская Л. В. 1952. Влияние температуры на отравление мух ДДТ. Мед. паразитол. и паразитарн. болезни, 21, 3 : 278—283.
- Anderson A. D., R. B. March a. R. L. Metcalf. 1954. Inhibition of the succinoxidase system of susceptible and resistant house flies by DDT and related compounds. Ann. Entom. Soc. Amer., 47, 4 : 596—602.
- Bodenstein D. 1946. Investigation on the locus of action of DDT in flies (*Drosophila*). Biol. Bull., 90, 2 : 148—150.
- Bozkurt B. 1948. Vergleichende Untersuchungen zur Aufnahme von Insektiziden (DDT und Gammexane) in den Arthropodenkörper. Istanbul. Univ. Ten Fakultesi Mecmuasi (Rev. Fac. Sci. Univ. Istanbul), ser B, Sci. Nat., 13, 1 : 55—66.
- Buck J. B. a. M. L. Keister. 1949. Respiration and water loss in the adult blowfly *Phormia regina* and their relation to the physiological action of DDT. Biol. Bull., 97, 1 : 64—81.
- Buck J. B., M. L. Keister a. J. Posner. 1952. Physiological effects of DDT on *Phormia* larvae. Ann. Entom. Soc. Amer., 45, 3 : 369—384.
- Chadbourne D. S. a. C. F. Rainwater. 1953. Histological effects of calcium arsenates, DDT and dieldrin on larval tissues of the bollworm. Journ. Econ. Entom., 46, 1 : 44—48.
- Chang P. I. 1951. The action of DDT on the Golgi bodies in insects nervous tissue. Ann. Entom. Soc. Amer., 44 : 311—326.
- Dresden D. 1948. Site of action of DDT and cause of death after acute DDT poisoning. Nature, 162, 4130 : 1000—1001.
- Gordon H. T. a. J. H. Welsh. 1948. The role of ions in axon surface reactions to toxic organic compounds. Journ. Cell. a. Comp. Physiol., 31, 3 : 395—420.
- Fan H. Y., T. H. Cheng a. A. G. Richards. 1948. The temperature coefficient of DDT action in insects. Physiol. Zool., 21, 1 : 48—59.
- Fritsch H. u. H. Krupp. 1952. Wirkung von Insektiziden auf eine isoliertes Ganglien-Muskel-Präparat von *Dytiscus marginalis* (Gelbrandkäfer). Arch. Exper. Path. u. Pharmacol., 214, 3 : 227—241.
- Häfliger E. 1948. Der Einfluß der Temperatur auf die Giftwirkung des DDT bei Honigbienen (*Apis mellifica* L.). Experientia, 4, 6 : 223—225.
- Hartzell A. 1945. Histological effects of certain sprays and activators on the nerves and muscles of the housefly. Contrib. Boyce Thomson Inst., 13, 9 : 443—454.
- Hewitt C. G. 1910. The house fly (*Musca domestica* L.). Manchester Univ. press: 195 pp.
- Hoffmann I. u. L. Lendle. 1948. Zur Wirkungsweise neuer insektizider Stoffe. Arch. Exper. Path. u. Pharm., 205, 1 : 223—242.
- Hoffman R. A. a. A. W. Lindquist. 1949. Effect of temperature on knock-down and mortality of house flies exposed to residues of several chlorinated hydrocarbon insecticides. Journ. Econ. Entom., 44, 6 : 891—893.
- Hoffman R. A., A. R. Roth a. A. W. Lindquist. 1949. Effect of air temperature on the insecticidal action of some compounds on the sheep tick and on migration of sheep tick on the animal. Jour. Econ. Entom., 44, 6 : 893—896.
- Hoffman R. A., A. R. Roth, A. W. Lindquist a. J. S. Butts. 1952. Absorption of DDT in house flies over an letended period. Science, 115, 2986 : 312—313.

- Holst E. C. 1944. DDT as a stomach and contact poison for honey bees. Jour. Econ. Entom., 37, 1 : 159—159.
- Hopp H. H. 1953. Veränderung in den Organen der Kleiderlaus (*Pediculus vestimenti* N.) unter der Einwirkung von Insecticiden (Chlorierten Kohlenwasserstoffen). Zool. Jahrb., Allg. Zool., 64, 3 : 267—322.
- Johnston C. D. 1951. The in vitro effect of DDT and related compounds on the succinoxidase system of rat heart. Arch. Biochem. a. Biophys., 31, 3 : 375—382.
- Jones J. C. 1953. Microanatomical study of DDT-moribund *Anopheles quadrimaculatus* Say. Science, 117 : 452—453.
- Läuger H., H. Martin u. P. Müller. 1944. Über Konstitution und toxische Wirkung von natürlichen und neuen synthetischen insektentötenden Stoffen. Acta Helvetica Chemica, 27, 4/5 : 892—928.
- Lindquist A. B., E. F. Knipling, H. A. Jones a. A. H. Madden. 1944. Mortality of bedbugs on rabbits given oral dosages of DDT and pyrethrum. Journ. Econ. Entom., 37, 1 : 128—128.
- Lindquist W., A. R. Roth, R. A. Hoffman a. J. S. Butts. 1951. The distribution of radioactive DDT in house flies. Journ. Econ. Entom., 44, 6 : 931—934.
- Lindquist A., H. Wilson, H. Schroeder, a. A. Madden. 1945. Effect of temperatures on knockdown and kill of house flies exposed to DDT. Journ. Econ. Entom., 38, 2 : 261—264.
- Lowne B. T. 1890, 1895. The anatomy, physiology, morphology and development of the blow-fly (*Calliphora erythrocephala*), 1—2, London : 1—778.
- Ludwig D., M. C. Barsa a. C. T. Cali. 1955. The effect of DDT on the activity of cytochrome oxidase. Ann. Entom. Soc. Amer., 48, 3 : 165—170.
- Lüers T., H. Köpf u. H. Lüers. 1954. Über Nervenzellveränderungen bei *Drosophila* nach DDT Vergiftung. Biol. Zentralblatt, 73, 3/4 : 203—212.
- Maple J. D. 1945. The larvicidal action of DDT on *Anopheles quadrimaculatus*. Journ. Econ. Entom., 38, 4 : 437—439.
- Morrison P. E. a. A. W. Brown. 1954. The effects of insecticides on cytochrome oxidase obtained from the american cockroach. Journ. Econ. Entom., 47, 5 : 723—730.
- Pradhan S. 1949. Studies on the toxicity of insecticide films. II. Effect of temperature on the toxicity of DDT films. Bull. Entom. Res., 40, 2 : 239—265.
- Prowazek St. 1902. Vitalfärbungen an Insecten. Zeitschr. Entom., 7 : 12—14.
- Richards A. G. a. L. K. Cutcomp. 1945. Neuropathology in insects. Journ. New York Entom. Soc., 53, 4 : 313—349.
- Roeder K. D. a. E. A. Weiant. 1946. The site of action of DDT in the cockroach. Science, 103, 2671 : 304—306.
- Roeder K. D. a. E. A. Weiant. 1948. The effect of DDT on sensory and motor structures in the cockroach leg. Journ. Cell. a. Comp. Physiol., 32, 2 : 175—186.
- Roeder K. D. a. E. A. Weiant. 1951. The effect of concentration, temperature and washing on the time of appearance of DDT-induced trains in sensory fibers of the cockroach. Ann. Entom. Soc. Amer., 44, 3 : 372—380.
- Roth A. R. a. A. W. Lindquist. 1953. Effect of temperature and the activity of house flies on their absorption of DDT. Journ. Econ. Entom., 46, 1 : 127—130.
- Sacktor B. 1950. A comparison of the cytochrome oxidase activity of two strains of house flies. Journ. Econ. Entom., 43, 6 : 832—838.
- Schäfer R. u. H. Becker. 1953. Über die Tätigkeit des Dorsalgefäßes bei *Aphis sambuci* L. nach Begriftung mit verschiedenen Insektiziden. Zeitschr. Pflanzenkrankh., 60, 7 : 348—354.
- Smyth, T. J. a. C. C. Roys. 1955. Chemoreception in insects and the action of DDT. Biol. Bull., 108, 1 : 66—76.
- Sternburg J. a. C. W. Kearns. 1952. Metabolic fate of DDT when applied to certain naturally tolerant insects. Journ. Econ. Entom., 45, 3 : 497—505.
- Tahori A. S. a. W. M. Hoskins. 1953. The absorption, distribution and metabolism of DDT in DDT-resistant house flies. Journ. Econ., Entom., 46, 3 : 302—306; 5 : 829—837.
- Tobias J. M. a. J. J. Kollros. 1946. Loci of action of DDT in the cockroach (*P. americana*). Biol. Bull., 91, 3 : 247—255.
- Vinson E. B. a. C. W. Kearns. 1952. Temperature and the action of DDT on the american cockroach. Journ. Econ. Entom., 45, 3 : 484—496.
- Weaver N. 1950. Toxicity of organic insecticides to honeybees: stomach poison and field tests. Journ. Econ. Entom., 43, 3 : 333—337.
- Welsh J. H. a. H. F. Gordon. 1947. The mode of action of certain insecticides on the arthropod nerve axon. Journ. Cell. a. Comp. Physiol., 30, 2 : 147—174.
- Wiesmann R. 1949. Der Wirkungsmechanismus des Dichlordiphenyltrichlorethans bei den Arthropoden, speziell bei Insekten. Erg. Hyg. usw., 26, 1 : 46—61.
- Wiesmann R. u. P. Fenjves. 1944. Autotomie bei Lepidopteren und Dipteren nach Berührung mit Gaserol. Mitt. Schweiz. Ent. Ges., 19, 4—5 : 179—184.

- Witt P. N. 1947. Ein Test zur Prüfung der Wirksamkeit insektiziden Substanzen und ein Beitrag zum Mechanismus der Wirkung von DDT und HCC. Ztschr. Naturforsch., 26, 9/10 : 361—366.
- Yeager J. a. S. Munson. 1945. Physiological evidence of a site of action of DDT in an insect. Science, 102, 2647 : 305—307.

Лаборатория цитологии
Зоологического института
Академии наук СССР,
Ленинград.

SUMMARY

The quantitative method of staining insect tissues *in vivo* has an important advantage over other histological methods, for it reveals the direct response of the tissues to the toxic action of DDT. Thus, as early as during the first few hours following the ten minutes contact of the flies with a poison-treated surface (2 g/m²) changes in the dye binding capability of the protoplasm were observed both in the cells of the thoracic ganglion and in those of the hyle stomach. These pathological changes in the thoracic ganglion are persistent and increase progressively with time. On the contrary, these primary changes in the intestine tissues are not persistent, they are due to the purely local effect of DDT as of stomach poison and are never observed under the conditions of strictly contact action of DDT. A conclusion has been drawn from these observations that the response of the nervous tissue to DDT is more rapid as compared to that of the intestine tissues.

These early changes in the living substance of the nervous tissue revealed by the author by means of staining *in vivo* technique are in perfect agreement with a much earlier discovery of functional disturbances in the nervous system induced by DDT and afford a reliable evidence in support of the hypothesis of neurotoxic action of DDT.

Only after 24 hours following the contact of the insect with crystals of poison do the sorbtion curves of the ganglion and intestine tissues become similar. By this time the insects exhibit no signs of life whatever. Therefore, this rapid increase in the dye binding capability of the protoplasm should be attributed to the postmortem phenomena in the tissues.

On the basis of the evidence available from the literature the change in the dye binding capability of the nervous ganglion induced by the toxic action of DDT has been attributed to pathological changes of the respiratory metabolism in the tissues due to inhibition of the cytochrome system of neurons by the insecticide.

Considerations concerning the factors causing the relatively high sensibility of the nervous system to the poison are discussed.

Zoological Institute,
Academy of Sciences of the USSR,
Leningrad.
