

ГЕМОЦИТЫ КЛЕЩА *ALVEONASUS*
LAHORENSIS (ARGASIDAE)
В ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ

В. Н. Крючечников, С. В. Щербаков

Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР,
Москва

Для всех фаз развития клеща *Alveonasmus lahorensis* Neumann описаны основные типы гемоцитов и корреляции их количественных соотношений в ходе питания и развития отдельных стадий. В их числе прогемоциты, дающие начало ранним, а затем зрелым плазматочитам и сферулоцитам в двух разных физиологических состояниях. Выявлена высокая активность тирозиназы в сферулоцитах. Указывается на вероятную роль сферулоцитов как в нормальном гистогенезе, так и в протективных клеточных реакциях.

Гемоциты иксодоидных клещей играют ведущую роль в сохранении, размножении и диссеминации в пределах организма переносчика многих возбудителей облигатно-трансмиссивных болезней (вирусов, риккетсий, бактерий, простейших). Интерес к изучению морфологии и функций гемоцитов в последние годы значительно возрос, что легко объясняется расширением исследований по антимикробной резистентности членистоногих, поисками методов биологической борьбы и, наконец, оживлением общего интереса к проблеме взаимоотношений возбудителей болезней и их беспозвоночных хозяев.

Несмотря на то что гемоциты членистоногих, в особенности насекомых, изучаются уже более 100 лет, до последнего времени мы имели дело с их многочисленными, разнообразными, а иногда и противоречивыми классификациями. Это объясняется как объективными обстоятельствами (чрезвычайным многообразием и непостоянством морфологических типов у множества видов членистоногих) так и тем, что в большинстве классификаций авторы пользовались лишь достаточно субъективными признаками — внешний вид отдельных клеток, нередко без указаний размеров и тинкториальных свойств, без дифференцированных подсчетов выделяемых типов, без витальных наблюдений, без цитохимических исследований и т. п. Особенно часто при этом отсутствуют данные об изменениях реальных соотношений классифицируемых форм по ходу онтогенеза. Положение несколько изменилось к лучшему с момента предложенной Джоном (Jones, 1962) классификации гемоцитов насекомых. Последний не только обосновал подразделение клеток гемолимфы на основные типы, широко принятое сегодня, но и доказал необходимость применения в практике описания гемоцитов витальных наблюдений, цитохимических тестов и методов общего и дифференцированного подсчета клеток.

Что касается иксодоидных клещей, то в отношении изучения их гемоцитов имеется лишь несколько сообщений. В специально посвященных этому вопросу работах Сидорова (1960), Теравского (1957) и Цвилленовой (1959) описаны морфологические особенности и некоторые функции гемоцитов имаго иксодоидных клещей. Позднее в работе Долпа (Dolp, 1970) классификация гемоцитов иксодоидных клещей была унифицирована

в соответствии с терминологией Джонса на основе количественных методов подсчета свободных клеток гемолимфы и отдельных их типов у 2 видов аргасовых и 2 — иксодовых клещей, но только в фазе имаго. Подобную классификацию применяли японские исследователи (Fujisaki et al., 1975) для гемоцитов имаго *Ornithodoros moubata*. Бринтон с соавт. (Brinton et al., 1971), изучив ультраструктуру гемоцитов *Dermacentor andersoni*, сделали попытку дать на этой основе более дробную классификацию гемоцитов, но тоже только для имаго.

Цель настоящей работы — изучение изменений относительного количества разных гемоцитов по ходу питания и линек клеща, что позволяет полнее представить характер связи между разными гемоцитами и их функциональную роль. В то же время подобные данные заслуживают внимания с позиций изучения механизма трансфазовой передачи возбудителей трансмиссивных болезней, так как гемоциты во многих случаях являются основной средой их обитания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали постоянную лабораторную культуру клещей *Alveonasus lahorensis* Neum. — вида, принятого в качестве модельного объекта для большинства экспериментально-морфологических исследований в лаборатории переносчиков ИЭМ им. Гамалеи АМН СССР. Кормление клещей вели по общепринятой методике. Этот вид в личиночной и первых нимфальных стадиях питается и линяет на хозяине, отпадая лишь в стадии III нимфы; весь этот период занимает 22—35 дней. Линька на имаго происходит чаще всего без дополнительных питаний, а взрослые клещи кормятся, как и большинство других видов аргасид, путем кратковременных кровососаний (не более 1—2 ч). Гемолимфу клещей исследовали в каждой стадии в 11 разных физиологических состояниях: непитавшиеся и сытые личинки, нимфы I в начале питания после линьки и в конце питания перед линькой, нимфы II в начале и в конце питания перед линькой на нимфы III, нимфы III в начале питания и сытые, в момент отпадения с хозяина, имаго перелинявшие голодные, а также через 2 ч после питания и сброса коксальной жидкости и через 2 недели после питания. Поскольку значимых различий в соотношении типов гемоцитов у самцов и самок в ходе исследования не обнаружили, все представленные ниже данные усреднены для имаго обоих полов, взятых в опыт в равных количествах. Возможность распознавания отдельных типов гемоцитов для нас представляет наибольший интерес в случае применения простейших методов, пригодных в условиях массового микроскопирования мазков гемолимфы для обнаружения возбудителей. Кроме того, желателен способ фиксации и окраски, в равной мере приемлемый для исследования мазков, капель и пленочных препаратов, гистологических срезов и тотальных препаратов клещей. Исходя из этого, мы избрали следующий метод обработки препаратов. После фиксации сулемовой смесью «субтриэ» по Гайденгайну (Ромейс, 1953) гемолимфы, взятой асептически из конечности клеща (Сидоров, 1960), гемоциты окрашивали по Гимза и с масляной иммерсией производили подсчет основных, встречающихся у клещей типов клеток, а затем определяли их соотношения (в процентах от общего числа учтенных клеток). Всего исследовано 155 особей клеща (в перечисленных выше фазах и физиологических состояниях); при этом классифицировано 24 137 клеток. В каждом варианте опыта стремились соблюдать основное требование к репрезентативности выборки, т. е. число вторичных объектов (особей) приближалось к числу первичных (клеток). Исключением были только непитавшиеся личинки, так как из конечности одной голодной личинки обычно удается получить не более 5—6 свободных гемоцитов. Для оценки связей в соотношениях гемоцитов разных типов по ходу развития использовали коэффициент корреляции Спирмена (Гублер и Генкин, 1973). В отдельных случаях проводили также витальные наблюдения с фазовым контрастом и гистохимические реакции в соответствии

с рекомендациями Пирса (1962) и Гайера (1974). Фотографирование производили на микроскопе Olympus FHF-533 с общим увеличением 660 крат.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Полученные данные позволили охарактеризовать основные встречающиеся у клеща типы гемоцитов, их соотношения, изменения по ходу развития клеща, и их возможное функциональное значение.

С самого начала необходимо подчеркнуть, что выделяемые типы ни в коей мере не следует рассматривать как некие вполне самостоятельные и автономные по происхождению ряды клеток. Напротив, в большинстве случаев форма лишь отражает разную степень дифференцировки исходных мезенхимальных клеток в зависимости от выполняемых ими функций. Тем не менее такая классификация, безусловно, полезна, так как позволяет получить более полное представление о реальных процессах, происходящих в организме клеща по ходу его развития, и судить о степени участия гемоцитов в нормальных и патологических реакциях. Перейдем к краткой характеристике этих типов.

Прогемоциты. Самые мелкие из встречающихся в гемолимфе клеток. Имеют довольно правильную, округлую или близкую к округлой форму, обычно базофильную цитоплазму и отличаются весьма высоким ядерно-плазматическим отношением. Диаметр ядра 7.2 ± 2.7 , диаметр клетки 10.6 ± 3.4 мкм. Ядро округлой формы, весьма плотное, гомогенное. Ядрышки крупные, но просматриваются плохо. Цитоплазма выглядит гомогенной, всегда свободной от крупных вакуолей и включений. (рис. 1, *a—e*). Витальные наблюдения подтверждают отсутствие у этих клеток способности к пино- и фагоцитозу. Прогемоциты чаще всего способны к митотическим делениям. Подавляющее большинство (около 90%) делящихся в свободной гемолимфе клеток составляют именно прогемоциты (рис. 1, *n, o*), хотя митозы встречаются и в более дифференцированных клетках (рис. 1, *n, p*). Число митозов в гемолимфе по ходу развития клеща довольно велико: митотический индекс составляет в среднем 0.12% от общего числа клеток, и колебания этого показателя довольно значительны от 0.06 до 0.30%, хотя частота митозов в общем ниже, чем в гемолимфе большинства насекомых. Изменения показателя митотической активности не коррелируют с общим ходом развития клеща и сдвигами в относительном содержании определенных типов клеток. Однако число митозов достоверно возрастает в конце питания каждой стадии перед линькой на последующую ($td=2.9$, $P < 0.05$).

Ранние плазматocyты — это наиболее подвижный тип клеток, обладающий большой фагоцитарной активностью. В силу высокой подвижности и способности к образованию разного типа цитоплазматических выростов (от лобоподий до тончайших и длинных филоподий) эти клетки на фиксированных препаратах имеют весьма переменные размеры и чрезвычайно многообразные очертания. Диаметр ядра 10.7 ± 3.2 , диаметр клетки 17.8 ± 9.6 мкм. Ядра округлые или овальные, реже неправильной, в частности, бобовидной формы. Они обладают 1—2 ядрышками, относительно меньшего, чем у прогемоцитов, размера, но более четкими. Цитоплазма не содержит однородных, постоянно встречающихся включений (рис. 1, *g—e*). Отдельные включения в виде небольших прозрачных вакуолей или частиц детрита несомненно следует отнести за счет пино- и фагоцитоза.

Зрелые плазматocyты — крупные, весьма характерные клетки, которые у взрослых клещей обычно составляют более половины всех свободных клеток гемолимфы. Они менее подвижны, чем ранние, с относительно небольшим, иногда слегка пикнотизированным ядром и низким, по сравнению с другими типами, ядерно-плазматическим отношением (рис. 1, *ж—и*). Диаметр ядра 9.7 ± 2.4 , диаметр клетки 21.3 ± 12.8 мкм. Имеется 1—2 ядрышка. Самая характерная особенность этих клеток — наличие множества крупных полупрозрачных вакуолей, по всей видимо-

сти, пиноцитозного происхождения, количество и размер которых резко возрастает у сытых клещей. У голодных клещей размер вакуолей несколько уменьшается, содержимое их становится вполне прозрачным.

Постоянно встречаются в гемолимфе и клетки, совершенно отличные от плазматочитов. К ним относятся так называемые сферулярные клетки или с ф е р у л о ц и т ы (в соответствии с терминологией Джонса и

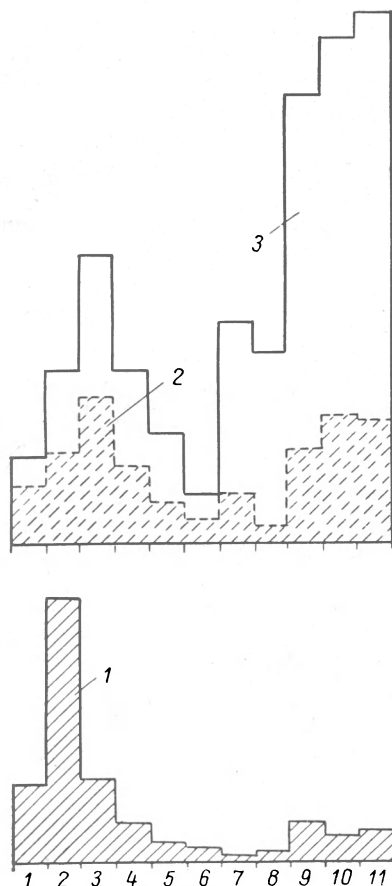


Рис. 2. Изменения относительного количества прогемоцитов и плазматочитов по ходу развития клеща *Al. lahorensis*. Высота столбцов соответствует доле определенного типа гемоцитов (в процентах от общего числа свободных клеток гемолимфы).

1 — доля прогемоцитов; 2 — доля ранних плазматочитов; 3 — доля зрелых плазматочитов; по оси абсцисс — данные для 11 разных стадий и физиологических состояний клеща по ходу развития.

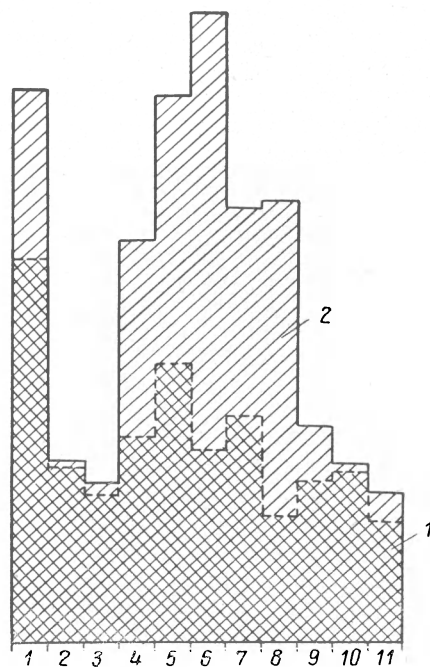


Рис. 3. Изменения относительного количества сферулоцитов по ходу развития клеща *Al. lahorensis*.

1 — доля сферулоцитов с неизменными сферулами; 2 — доля сферулоцитов с изменяющимися сферулами.

Остальные обозначения те же, что и на рис. 2.

Долпа). Это довольно крупные клетки, с изменчивыми на фиксированных препаратах контурами, из-за способности к амебoidalному движению (рис. 1, *к*). Диаметр ядра 10.3 ± 4.7 , диаметр клетки 28.3 ± 12.9 мкм. Имеется 1—2 ядрышка. Наиболее характерная особенность этих клеток — наличие крупных, довольно правильной сферической формы образований; диаметр последних в разных клетках варьирует в пределах от 1 до 4—5 мкм, хотя в одной клетке их размер более однороден. На некоторых препаратах эти гранулы обнаруживают концентрическую слоистость. Они отличаются высокой устойчивостью к действию фиксаторов и органических растворителей и обычно не меняют очертаний даже тогда, когда на препарате разрушена из-за артефактов сама клетка. Однако в некото-

рых сферулоцитах сферулы оказываются измененными. Они уменьшены в размерах, теряют способность к окрашиванию и исчезают (рис. 1, *л*). Конечно, наблюдение не позволяет однозначно трактовать направленность этого процесса: с равным успехом его можно рассматривать и как секрецию новых сферул, и как их лизис. Но тем не менее мы рассматриваем это явление как нормальный физиологический процесс, связанный с функцией клетки, но не как артефакт метода обработки, ибо сферулы весьма устойчивы по крайней мере к применявшимся химическим агентам. Поэтому при дифференцированном подсчете сферулоциты с неизменными и с измененными сферулами учитывались отдельно. Особый интерес вызывает природа этих сферул. Свободные и связанные липиды в них не обнаруживаются. Аналогичные клетки — сферулоциты насекомых — богаты тирозином, полифенолами и продуктами их ферментативного окисления. В связи с этим была поставлена ДОФА-реакция с соответствующими контролями, результаты которой доказывают наличие тирозиназы именно в сферулах сферулоцитов на фоне ее отсутствия в клетках других типов (рис. 1, *м*).

Изменения относительного содержания (в процентах от общего числа свободных клеток) разных типов гемоцитов клеща показаны в виде соответствующих гистограмм (рис. 2, 3). На них представлены данные, касающиеся относительного содержания основных типов гемоцитов для всех изученных фаз и физиологических состояний: непитавшиеся (1) и сытые (2) личинки, нимфы I в начале (3) и в конце питания перед линькой (4), нимфы II в начале (5) и в конце питания перед линькой (6), нимфы III в начале питания (7) и в момент отпадения с хозяина (8), перелинявшие голодные имаго (9), имаго через 2 часа (10) и через 2 недели (11) после питания. Закономерности в изменении соотношений всех основных типов гемоцитов удается достоверно проследить только у фаз, питающихся на хозяине (столбцы 1—7 на всех гистограммах), после отпадения с хозяина они стерты. На рис. 2 нижняя гистограмма показывает изменения относительного содержания прогемоцитов по ходу развития клеща. Доля прогемоцитов при этом закономерно убывает, отрицательно коррелируя с ходом развития ($r = -0.89$, $P < 0.01$). Снижение относительного количества ранних плазматоцитов (верхняя часть гистограммы) по ходу развития почти не проявляется ($r = -0.64$, $P > 0.05$), а изменения доли зрелых плазматоцитов явно не коррелируют с ходом развития ($r = +0.21$, $P > 0.05$). Характерно, что при этом относительное количество всех плазматоцитов (ранних и зрелых форм) в целом абсолютно не коррелирует с развитием клеща ($r = 0$). Совершенно по иному изменяется относительное содержание сферулоцитов (рис. 3). Так, если доля сферулоцитов с неизменными сферулами не коррелирует с ходом развития ($r = +0.04$, $P > 0.05$), то доля сферулоцитов с изменяющимися сферулами по ходу развития достоверно возрастает ($r = +0.79$, $P < 0.025$). За счет последних возрастает и относительное количество всех сферулоцитов ($r = +0.73$, $P < 0.05$), которое затем после отпадения с хозяина постепенно снижается, независимо от питания свободноживущих стадий клеща. В результате у взрослых клещей преобладающим типом клеток гемолимфы становятся плазматоциты (рис. 2). Интересно также, что изменения митотического индекса не обнаруживают значимых корреляций с изменениями относительного количества какого-либо из типов гемоцитов. Но показатели относительного содержания прогемоцитов и ранних плазматоцитов достоверно коррелируют ($r = +0.75$, $P < 0.05$), а относительное количество ранних плазматоцитов, в свою очередь, связано с долей общего количества плазматоцитов в гемолимфе ($r = +0.72$, $P < 0.05$). В соотношении сферулоцитов и плазматоцитов по ходу развития обнаружена отрицательная корреляция ($r = -0.893$, $P = 0.005$), что, по всей вероятности, связано с ростом доли сферулоцитов по мере развития клеща на хозяине ($r = +0.73$, $P < 0.05$), поскольку относительное количество всех плазматоцитов по ходу развития не меняется ($r = 0$). При этом доля сферулоцитов возрастает, как указано выше, почти исключительно за счет

сферулоцитов с изменяющимися сферами. После окончания питания и линек на хозяине доля сферулоцитов в гемолимфе начинает постепенно убывать (рис. 3, 8—11).

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о том, что прогемоциты как с морфологической точки зрения, так и по их соотношениям с другими клетками гемолимфы в ходе развития, представляют собой наиболее близкий к исходному типу клеток, дающий начало ранним плазматоцитам, которые, в свою очередь, способны к дальнейшей дифференцировке в зрелые клетки. Нарастание доли сферулоцитов с изменяющимися сферами по ходу онтогенеза связано, вероятнее всего, с морфогенетическими процессами, в частности с образованием соединительнотканых мембран, в построении которых гемоциты принимают непосредственное участие. Это известно для насекомых (Wigglesworth, 1956, 1973) и недавно показано для гемоцитов нашего объекта в культуре *in vitro* (Сидоров, 1977). Подобное предположение подтверждается и тем, что с окончанием морфогенеза и линек доля сферулоцитов постепенно убывает. Интенсивная селективная окраска сферул в ДОФА-реакции свидетельствует о локализации ДОФА-оксидазы (тирозиназы) именно в этих специфических включениях сферулоцитов. Это может быть связано со способностью сферулоцитов участвовать как в процессе образования мембран в ходе нормального гистогенеза, так и в эффекторных механизмах протективного иммунитета (Крючечников, 1974). Поэтому весьма перспективным представляется дальнейшее изучение связи гемопоэза клещей с инфекцией. Неясно, влияет ли размножение возбудителей в клеще на митотическую активность гемоцитов и соотношение разных типов гемоцитов, существуют ли различия в реактивности клеток у разных видов переносчиков.

Основные типы гемоцитов, наблюдавшиеся нами в течение всего постэмбрионального развития клеща, существенно не отличались от форм, которые описывает Долл. Классификация гемоцитов клещей, близкая к предлагаемой этим автором, представляется нам наиболее удобной и обоснованной по крайней мере для обычных светомикроскопических исследований. Эта простейшая классификация пригодна без кардинальных изменений и для рода *Alveonasus*, причем не только для имаго, но и для всех преимагинальных фаз. Единственное исключение — подразделение сферулоцитов на «зрелые» и «ранние» формы, которого мы не сочли возможным придерживаться. «Зрелые» отличаются от «ранних» в основном тем, что из-за скопления сферул в клетке не просматривается ядро; но последнее обстоятельство в большей степени зависит от степени расплывания, а не от зрелости клетки. Напротив, состояние самих сферул оказалось, как сказано выше, существенным признаком. Ультраструктурные исследования гемоцитов Бринтона и Бургдорфера (1971) весьма интересны, но предлагаемая ими довольно дробная классификация гемоцитов *Dermacentor* мало пригодна для обычных светомикроскопических работ и, кроме того, требует дальнейшего обоснования морфологической и функциональной самостоятельности выделяемых типов и подтипов, поскольку вся работа выполнена только на питающихся самках.

Вопрос о характере связи свободных клеток гемолимфы с другими производными соединительной ткани и об источнике свободных гемоцитов требует дальнейших исследований.

Л и т е р а т у р а

- Г а й е р Г. 1974. Электронная гистохимия. «Мир», М. : 1—488.
Г у б л е р Е. В., Г е н к и н А. А. 1973. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. «Медицина», Л. : 1—141.
К р ю ч е ч н и к о в В. Н. 1974. Изучение иммунитета у членистоногих в связи с проблемами медицинской паразитологии. — В кн.: Природноочаговые инфекции и инвазии. Вильнюс : 72—74.
П и р с Э. 1962. Гистохимия. Изд-во ИЛ. М. : 1—962.
Р о м е й с Б. 1953. Микроскопическая техника. Изд-во ИЛ. М. : 1—718.

- Сидоров В. Е. 1960. Полость тела аргасовых клещей как среда обитания спирохет и бруцелл. — Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 6 : 91—97.
- Сидоров В. Е. 1977. Образование мембран основного вещества гемоцитами клещей *Alveonassus lahorensis* (Argasidae). — Паразитология, 11 (6) : 480—483.
- Травский И. К. 1957. О форменных элементах гемолимфы клещей семейства Argasidae. — Зоол. журн., 36 (10) : 1448—1454.
- Цвилленева В. А. 1959. Форменные элементы гемолимфы иксодовых клещей. — ДАН ТаджССР, 2 (1) : 45—51.
- Brinton L. P., Burgdorfer W. 1971. Fine structure of normal hemocytes in *Dermacentor andersoni* Stiles (Acari : Ixodidae). — Parasitology, 57 (5) : 1110—1127.
- Dolp R. M. 1970. Qualitative and quantitative studies of hemocytes. — J. Med. Entomol., 7 (3) : 277—288.
- Fujisaki K., Kitaoaka Sh., Morii Ts. 1975. Hemocyte types and their primary cultures in the argasid tick, *Ornithodoros moubata* Murray (Ixodidae) : Appl. Ent. Zool., 10 (1) : 30—39.
- Jones J. C. 1962. Current concepts concerning insect hemocytes. — Amer. Zoologist, 2 : 209—246.
- Wigglesworth V. B. 1956. The haemocytes and connective tissue formation in an insect *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). — Quart. J. Microscop. Sci., 97 : 89—98.
- Wigglesworth V. B. 1973. Haemocytes and basement membrane formation in *Rhodnius*. — J. Insect Physiol., 19 (4) : 831—844.

HAEMOCYTES OF THE TICK ALVEONASSUS
LAHORENSIS (ARGASIDAE) DURING THE POSTNATAL DEVELOPMENT

V. N. Krjuchechnikov, S. V. Shcherbakov

S U M M A R Y

Changes in the cellular contents of the haemolymph during ontogenesis of *Alveonassus lahorensis* have been first studied. The main types of haemocytes and their abundance ratio at all stages of the postnatal development and at various physiological states during feeding and moulting are described. The role of individual types of haemocytes in haematopoiesis and protective cellular reactions to a parasite and disease agent is discussed.

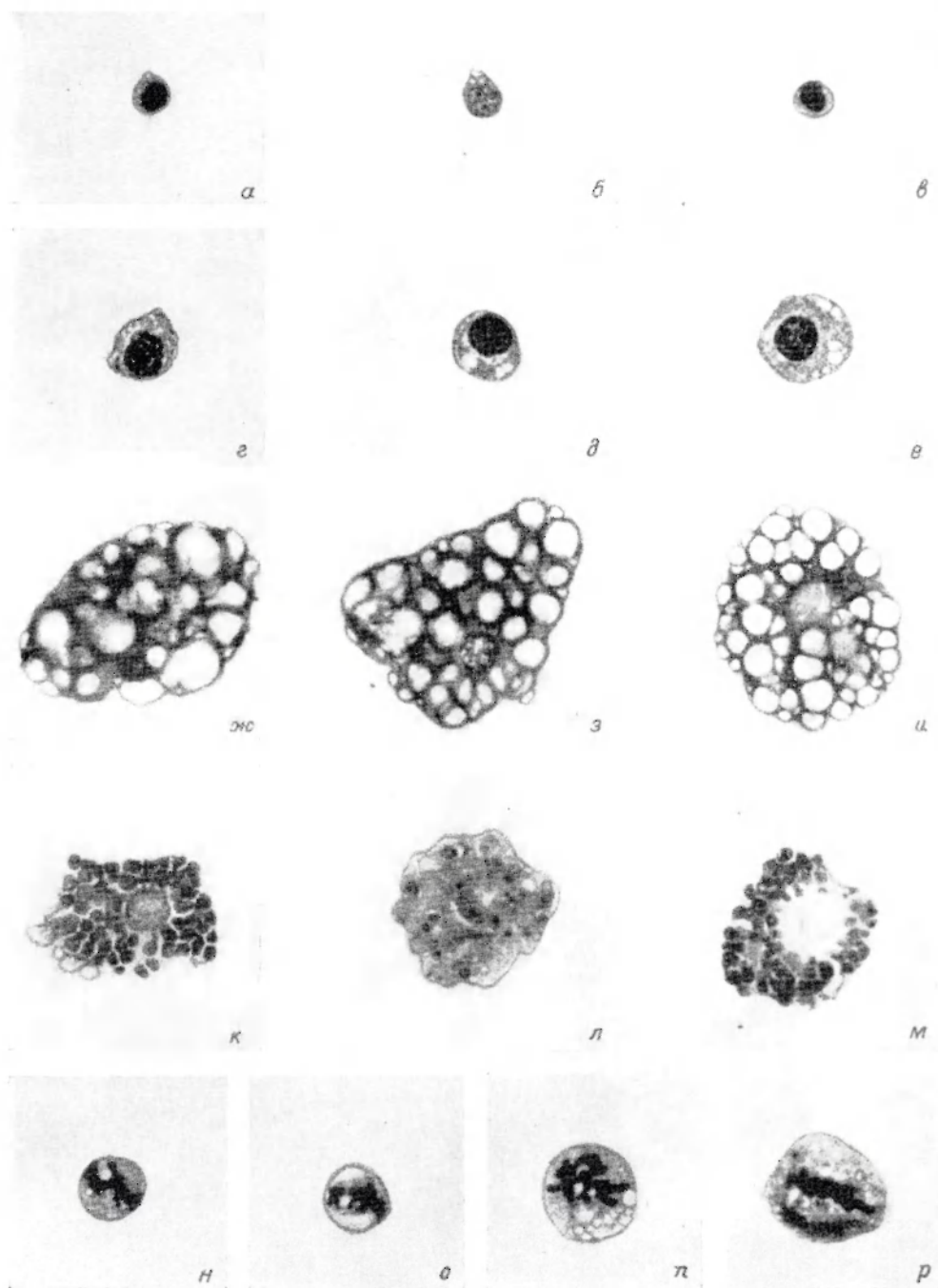


Рис. 1. Основные типы гемоцитов в гемолимфе клеща *Al. lahorensis*.

a—e — прогемоциты; *г—e* — ранние плазматоциты; *ж—и* — зрелые плазматоциты; *к, л* — сферулоциты; *м* — положительная ДОФА-реакция в сферулоците (рядом — плазматоциты), *н—р* — митозы в гемоцитах.