

**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ И МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЫ
ГЕМОЦИТОВ АРГАСОВОГО КЛЕЩА
ALVEONASUS LAHORENSIS (ARGASIDAE)**

В. Е. Сидоров, И. Н. Кокорин, Э. Д. Мискарова

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

Работа посвящена прижизненным наблюдениям с применением микрокино съемки, а также цитохимической характеристике гемоцитов клещей *Alveonasus lahorensis* в культуре клеток.

Одним из компонентов тканей внутренней среды клещей является гемолимфа с ее клеточными элементами — гемоцитами. Последние представляют превосходный объект для многих прижизненных паразитологических и других биологических исследований.

Наши ранние прижизненные наблюдения были проведены с переживающими гемоцитами в капле гемолимфы. В дальнейшем появилась настоятельная необходимость в получении длительных клеточных культур. С этой целью мы разработали метод получения первичных переживающих культур гемоцитов в камерах с питательной средой. В настоящей статье приведены данные преимущественно прижизненной характеристики гемоцитов в первичных клеточных культурах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

В качестве материала для приготовления культур гемоцитов использовали гемолимфу нимф III или (чаще) половозрелых клещей. Для длительного культивирования гемоцитов были испытаны многочисленные комбинации питательных сред с различным количеством сыворотки. Критерием оценки выживаемости и функциональной активности клеток в культуре были ежедневные прижизненные наблюдения в фазово-контрастном микроскопе. В результате этих опытов мы выбрали для работы среду, составленную из равных количеств среды 199 и среды Игла с добавлением 10—15% фетальной бычьей сыворотки, витаминного комплекса Игла и питательного коктейля по Mishell и Dutton (1966).

Цитологическое и цитохимическое исследование проводили на препаратах, окрашенных азури II-эозином или по Браше, на жиры, нейтральные и кислые полисахариды, а также определяли активность гидролитических (кислой и щелочной фосфатазы) и окислительно-восстановительных (сукцинатдегидрогеназы, НАД-диафоразы) ферментов.

Прижизненные наблюдения и микрокино съемку гемоцитов вели из препаратов, приготовленных в миниатюрных камерах из плексигласа (пластинке размером с предметное стекло, толщиной 2—3 мм, с отверстием в центре $D=12-18$ мм). Отверстие с обеих сторон закрывали покровным стеклом, приклеенным замазкой из смеси воска с канифолью. Наблюде-

ния проводили до трех недель без смены питательной среды. Иногда для переживающих культур использовали простейшую камеру на предметном стекле.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гемоциты, взвешенные в гемолимфе, а также сразу после помещения их в питательную среду, представлены в основной своей массе округлыми клетками, заполненными сферическими вакуолями, придающими гемоцитам морулообразный вид. Крупные вакуоли имеют полигональную форму, обусловленную взаимным сжатием вакуолей (рис. 4). Большая часть помещенных в питательную среду гемоцитов прикрепляется к поверхности стекла. Уже в 1-й час культивирования отдельные гемоциты начинают расплываться на поверхности стекла. При этом наиболее энергично расплываются клетки по периферии препарата или по периферии компактных скоплений гемоцитов (рис. 7). В центральной части препарата клетки могут длительное время сохранять морулообразную форму. Часть клеток проявляет очень активную подвижность.

В процессе культивирования число распластавшихся клеток быстро увеличивается за счет сферических. В ряде культур распластаны почти все клетки (рис. 8). Наиболее часто расплывание большинства клеток в культуре мы наблюдали при исследовании гемолимфы от клещей, которым предварительно вводили парентерально питательную среду (рис. 9, 10).

Во время расплывания клеток содержимое большинства вакуолей растворяется в цитоплазме (рис. 2). Обратного процесса восстановления пищеварительных вакуолей *in vitro* мы не наблюдали.

Полностью распластанные клетки содержат также значительное количество вакуолей, размеры которых редко достигают размеров пищевых вакуолей, не блестят в фазовом контрасте (рис. 3, 6). Эти вакуоли появляются в результате пиноцитоза клеткой питательной среды или гемолимфы (рис. 4, 5). Киносъемка весьма демонстративно выявляет активный пиноцитоз с захватом питательной среды и движением пиноцитозных вакуолей в эндоплазму.

Эктоплазма (гиалоплазма) обычно гомогенна и находится в непрерывном движении, которое выражается в появлении псевдоподий различной величины и формы (рис. 11). При этом клетка может передвигаться, но может оставаться на месте.

Нередко на распластавшихся клетках можно обнаружить прикрепившиеся гемоциты, которые, возможно, являются питающими клетками (рис. 11).

При расхождении распластавшихся клеток между ними можно видеть тонкие плазматические перемычки.

Размеры распластавшихся гемоцитов могут быть до 100—150 мкм в поперечнике, а цитоплазматические перемычки могут достигать 500 мкм и более.

Размеры амебоцитов, находящихся в нераспластанном состоянии и имеющих сферическую форму *in vitro*, колеблются от 5—7 до 20—25 мкм в диаметре. Ядра, которые *in vivo* можно наблюдать только в распластавшихся амебоцитах, имеют преимущественно правильную сферическую постоянную форму.

Ядро гемоцитов обычно круглое, с 1—2 ядрышками. При культивировании гемоцитов митотической активности клеток мы не наблюдали. Иногда встречались картины, похожие на амитотическое деление ядер (рис. 12). Однако и при длительных наблюдениях за одной клеткой (до 2 суток) перетяжки ядер сохраняли свой первоначальный вид. Вероятно, это были либо уродливые ядра, либо действительно начало амитоза, остановившегося при изменении состава питательной среды или других факторов, связанных с пребыванием клеток вне организма.

При витальных наблюдениях в фазовом контрасте в эндоплазме гемоцитов обычно можно видеть митохондрии. В некоторых клетках они имеют вид нежных коротких палочек, в других — нитевидную форму.

Длинные нитевидные митохондрии под влиянием движения цитоплазмы причудливо изгибаются и находятся в непрерывном движении. Нередко в одной клетке находятся митохондрии разных размеров. Это следует иметь в виду при прижизненном изучении развития в клетках риккетсий, поскольку они могут быть приняты за митохондрии, и наоборот.

В препаратах, окрашенных азур II-эозином встречаются слабо вакуолизированные клетки с выраженной базофилией цитоплазмы или пиронинофильные при окраске по Браше и сильно вакуолизированные гемоциты, цитоплазма которых бедна рибонуклеопротеидами. При этом вакуоли окрашиваются метахроматически в различные оттенки от голубого до фиолетового цвета.

Для выяснения природы содержимого вакуолей и других включений были проведены окраски на жиры, нейтральные и кислые полисахариды. При изучении свободного жира обнаружено его незначительное количество в единичных клетках препаратов. Общие липиды (суммарные жиры) при окраске суданом черным В обнаружены во всех мембранных структурах, включая и мембраны вакуолей. Общие липиды были выявлены в отдельных вакуолях, большинство из которых было свободно от липидов.

Все изложенное, а также окраска вакуолей анилиновыми красителями свидетельствует об иной, не липидной, природе содержимого вакуолей. Окраска толуидиновым и альциановым синим указывает на присутствие в некоторых вакуолях кислых мукополисахаридов или связанных с ними структур. В разных клетках количество мукополисахаридов варьирует от отдельных пятен в цитоплазме до полного заполнения клетки. Изменение количества мукополисахаридов наблюдается в процессе культивирования гемоцитов: в некоторых опытах количество их значительно нарастает, в других — наоборот, снижается, что может быть связано со сроками кормления клещей, из которых была взята гемолимфа, и с синтезом мукополисахаридов гемоцитами в культуре.

При окраске нейтральных полисахаридов (фуксинсернистой кислотой) включения мелких, более крупных и сливных капель гликогена были обнаружены только в цитоплазме. Вакуоли обычно свободны от гликогена и только в единичных вакуолях встречаются мелкие фагоцитированные капли гликогена.

Одним из существенных показателей метаболической активности клеток является состояние их ферментных систем.

Активность кислой фосфатазы выявлена в небольшом количестве клеток, но чаще ее активность не проявлялась. Наличие активности кислой фосфатазы в виде полиморфных гранул отмечалось всегда непосредственно в цитоплазме гемоцита и связано с наличием в них лизосом. Выявление кислой фосфатазы не зависело от температуры инкубации препаратов (при 28 или 37°), что свидетельствует о широком температурном диапазоне активности кислой фосфатазы у клещей. Активность щелочной фосфатазы в гемоцитах ни разу не была отмечена.

Активность окислительно-восстановительных ферментов, связанных с митохондриями: сукцинатдегидрогеназы и НАД-диафоразы также были выявлены в цитоплазме гемоцитов. В начальный период культивирования гемоцитов активность сукцинатдегидрогеназы и НАД-диафоразы достаточно высокая: четкие гранулы диформаза иногда заполняют цитоплазму, хотя нередко имеются лишь единичные гранулы.

Следует отметить, что в течение 14 суток культивирования в препаратах имеются клетки, обладающие высокой активностью ферментов, которая снижается в процессе культивирования в большинстве клеток. В то же время в более поздние сроки появляются гемоциты с высокой активностью окислительно-восстановительных ферментов с четкими гранулами формазана.

Для стимуляции активности гемоцитов клещам за несколько дней до постановки культур вводили парентерально питательную среду, которая использовалась для культивирования клеток. В отдельных опытах

на одной и той же группе клещей наиболее высокая активность СДГ появлялась на 5-е сутки после парентеральной подкормки клещей, в то время как на 4-е и 6-е сутки эта реакция была незначительна. При этом на 5-е сутки повышение активности СДГ характеризовалось не только своей интенсивностью, но и обилием клеток, в которых обнаружена эта активность.

Прижизненные наблюдения гемоцитов показали также, что, помимо очевидной их трофической функции и связанной с ней фагоцитарной активностью, гемоциты принимают участие в построении различных мембран в организме клеща (Сидоров, 1977а, 1977б).

ОБСУЖДЕНИЕ

Прижизненные наблюдения с микрокиносъёмкой и цитохимическое исследование гемоцитов клещей *Alveonius lahorensis* в культуре клеток показали, что культуры гемоцитов являются удобным объектом для длительных исследований.

Гемоциты способны длительно (до 3 недель) переживать в культуре клеток без смены питательной среды. Они не способны пролиферировать в культуре, являясь, видимо, дифференцированными зрелыми клетками. В связи с этим культуры гемоцитов следует отнести к переживающим культурам.

Длительные наблюдения за гемоцитами в культуре установили, что эти клетки, по-видимому, однотипны. Морфообразная форма гемоцитов, также как и активная подвижность, характерны для всех клеток, а не являются атрибутом каких-то определенных клеточных форм. Форма гемоцитов характеризует лишь функциональное состояние клеток, которые могут находиться в состоянии относительного покоя или функциональной активности, связанными с условиями их существования в культуре. Обычно центральную часть препарата занимают сферические формы. Число распластавшихся клеток больше на периферии препарата. Скорее всего определяющим моментом является концентрация клеток, кислородный градиент или накопление метаболитов. В начале культивирования все клетки или подавляющее их число имеют сферическую форму. Визуальные наблюдения и микрокиносъёмка позволили установить, что распластывание клеток происходит параллельно с растворением крупных сферических вакуолей. Эти вакуоли, сильно преломляющие свет в фазовом контрасте, по нашим данным (Сидоров, 1959, 1960, 1977а, 1977б), являются пищевыми и содержат запасные питательные вещества.

Прижизненные наблюдения за гемоцитами нимф III и имаго клещей *A. lahorensis* и изучение окрашенных препаратов позволили нам ранее выделить три основных типа гемоцитов: юные (крайне редко встречающиеся), зрелые и старые (Сидоров, 1960). Между ними имеются все переходные формы. В настоящее время мы склонны рассматривать зрелые гемоциты как один вид гемоцитов, поскольку размеры вакуолей, которые брали в основу систематики гемоцитов, — величина переменная и при распластывании гемоцитов почти все, а нередко и все вакуоли растворяются и ассимилируются в цитоплазме. Никаких значительных различий в характеристике разных гемоцитов нами не установлено. Различия цитохимических показателей свидетельствуют лишь о различном функциональном состоянии клеток и могут меняться (Кокорин, Сидоров, 1976; Мискарова и др., 1976). В частности, в зависимости от функциональных раздражений, например парентерального введения питательной среды, значительно меняется активность окислительно-восстановительных ферментов, свидетельствующих об интенсивном энергетическом обмене в клетках. На основании этого признака можно установить оптимальный срок взятия гемолимфы из парентерально подкормленных клещей с целью получения первичных культур гемоцитов с максимальным выходом клеток в культуру.

Л и т е р а т у р а

- К о к о р и н И. Н., С и д о р о в В. Е. 1976. Прижизненные наблюдения и киносъемка культуры клеток иксодидных клещей. — Тез. докл. на III Всесоюз. совещ. по теорет. и приклад. акарологии (4—6 октября, 1976 г.). Ташкент : 198—199.
- М и с к а р о в а Э. Д., С и д о р о в В. Е., К о к о р и н И. Н. 1976. Цитохимические исследования культуры гемоцитов аргасового клеща. — Там же. Ташкент : 173—174.
- С и д о р о в В. Е. 1959. Пути циркуляции возбудителя в аргасовых клещах. — В кн.: X совещание по паразитологическим проблемам и природноочаговым болезням. Вып. 2 : 112—114.
- С и д о р о в В. Е. 1960. Полость тела аргасовых клещей, как среда обитания спирохет и бруцелл. — Журн. микробиол., эпидемиол., иммунол., 6 : 91—97.
- С и д о р о в В. Е. 1977а. К вопросу об образовании основного вещества гемоцитами клещей *Alveonassus lahorensis* Neumann (Argasidae, Ixodoidea) (наблюдения in vitro). — Журн. общей биол., 38 (6) : 934—939.
- С и д о р о в В. Е. 1977б. Образование мембран основного вещества гемоцитами клещей *Alveonassus lahorensis*. — Паразитология, 11 (6) : 480—483.
- M i s h e l l R. I., D u t t o n R. W. 1966. Immunisation of normal mouse spleen cell suspensions in vitro. — Science : 153, 1004.

FUNCTIONAL AND MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE PRIMARY CULTURE OF HAEMOCYTES OF ALVEONASSUS LAHORENSIS (ARGASIDAE)

V. E. Sidorov, I. N. Kokorin, E. D. Miskarova

S U M M A R Y

Observations with the use of microfilming and cytochemical investigations of haemocytes of *Alveonassus lahorensis* in the primary cell culture have enabled the authors to give morphological and functional characteristics of these cells. Morulashaped haemocytes as well as active mobility are characteristic of all the cells and determine only their functional state. Mature haemocytes should be regarded as a type of the cells since the size of vacuoles is a variable and cannot be used for classification, the more so that all vacuoles are sometimes dissolved and assimilated in cytoplasm.

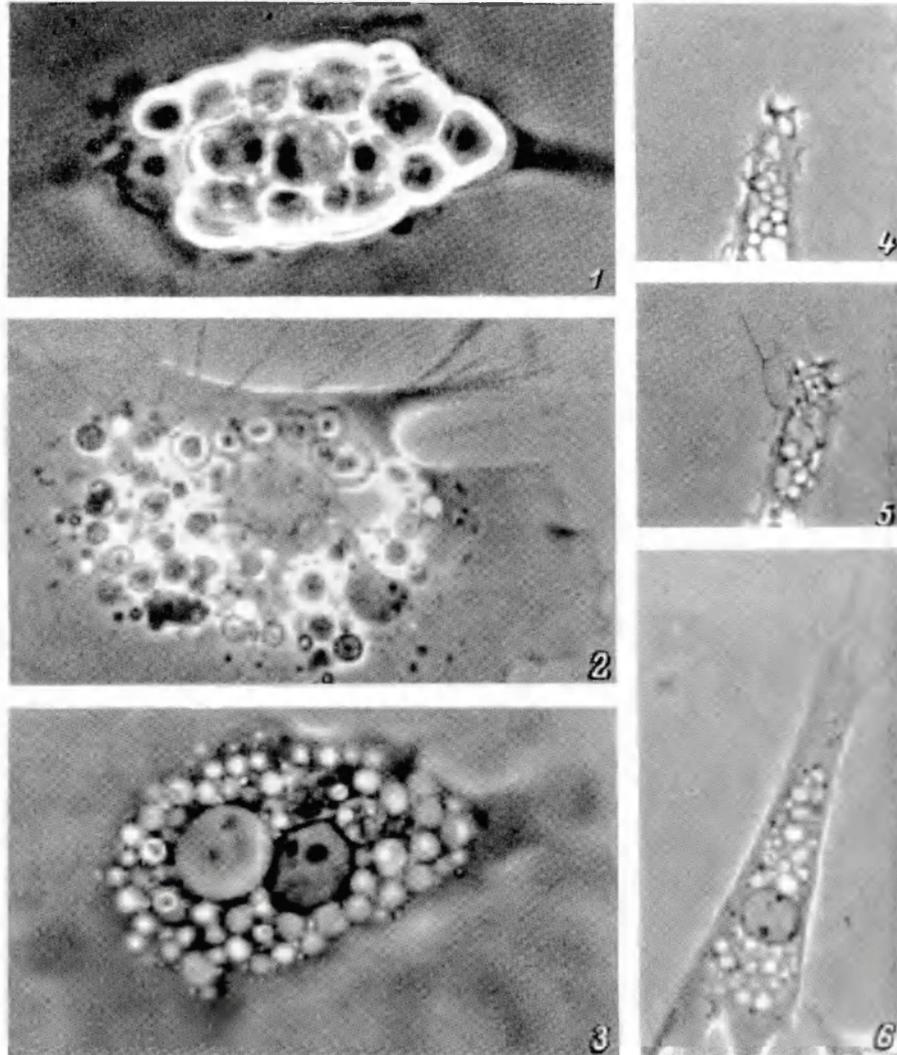


Рис. 1—6.

1 — только что прикрепившийся гемоцит с первыми псевдоподиями. (Везде далее фазовый контраст).
 Объектив $\times 90$ ф. 2 — распластывающийся гемоцит. Крупные вакуоли практически все растворились.
 Объектив $\times 90$ ф. 3, 6 — распластавшиеся клетки. Эндоплазма заполнена пиноцитозными вакуолями.
 Объектив $\times 90$ ф. Увеличение соответственно 1400 и 800 раз. 4, 5 — псевдоподия распластавшейся
 клетки, активный пиноцитоз. Интервал между кадрами 12 мин. Объектив $\times 90$ ф.

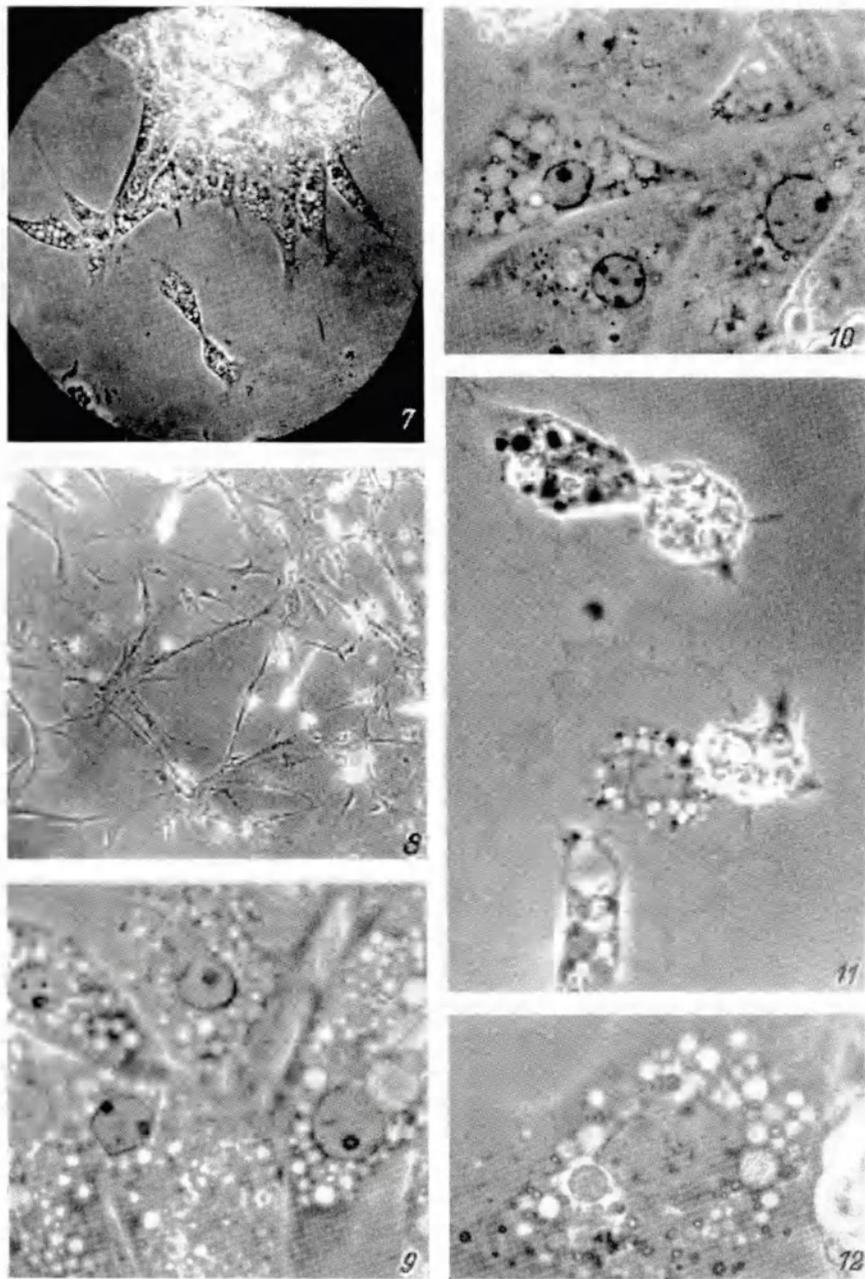


Рис. 7—12.

7 — миграция гемоцитов из клеточного скопления. Объектив $\times 20$ ф. 8 — сеть из распластавшихся гемоцитов. Объектив $\times 8$ ф. 9, 10 — культура гемоцитов из клеща, получившего парентерально питательную среду. Объектив $\times 90$ ф. 11 — распластавшиеся клетки с прикрепленными к ним «питающими» клетками. Объектив $\times 40$ ф. 12 — очень крупное ядро, форма которого имитирует незавершенный амитоз. Объектив $\times 90$ ф.