

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ОРГАНОВ АРГАСОВОГО КЛЕЩА ORNITHODOROS PAPILLIPES (ARGASIDAE)

В. Н. Крючечников, С. В. Щербаков

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

Предложен способ получения культуры органов аргасового клеща в простейшей микрокамере, который допускает длительные витальные наблюдения за культурой при минимальном расходе культуральной среды в отсутствие антибиотиков.

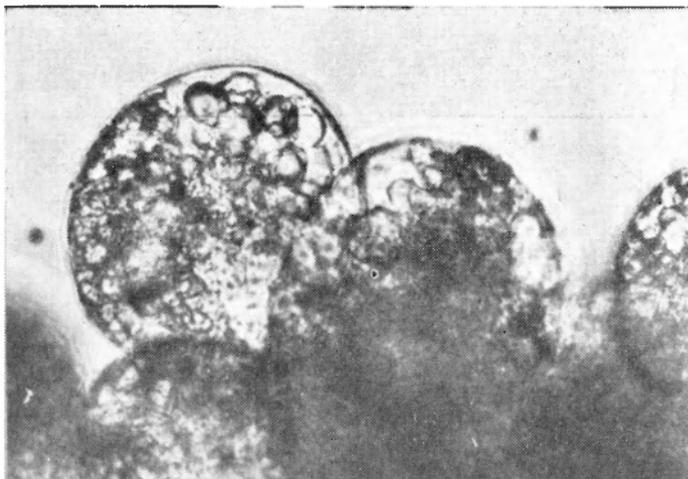
Разработка методов длительного сохранения живых органов клещей *in vitro* представляет самостоятельную задачу экспериментальной физиологии иксодидных клещей. Оживление интереса к стабилизированным культурам органов и клеток наблюдается и в работах по культивированию органов и тканей других групп членистоногих, преимущественно насекомых (Marks, 1980). Успехи в создании перевиваемых культур клеток иксодидных клещей — *Hyalomma asiaticum* (Медведева и др., 1972), *Boophilus microplus* (Pudney e. a., 1973; Holman a. Ronald, 1980; Ronald a. Cruz, 1981), *Rhipicephalus appendiculatus* (Varma e. a., 1975), *Dermacentor parumapertus* (Bhat. a. Yunker, 1977); *Dermacentor andersoni* (Yunker a. Meibos, 1979) до настоящего времени связаны исключительно с получаемыми из яиц клещей недифференцированными эмбриональными клетками. Эти культуры позволяют сейчас изучать развитие ряда возбудителей — арбовирусов, гальпировий, бабезий и других, однако возможности экстраполяции результатов этих работ на события, происходящие в организме клеща, явно ограничены. Что касается довольно многочисленных к настоящему времени успешных попыток получения первичных культур клеток иксодидных клещей из различных источников (средней кишки, гонад, слюнных желез и т. п.), то пролиферация этих клеток в культуре обычно приводит к потере морфологического и функционального сходства с нормальными клетками клещей. Поэтому получение достаточно простых, доступных для биохимических, морфофизиологических и микробиологических исследований стабилизированных переживающих культур органов и клеток иксодидных клещей представляет чрезвычайный интерес с позиций изучения нормальной физиологии этой группы членистоногих, в том числе таких важнейших функций, как оогенез, пищеварение и осморегуляция, функциональные перестройки мембранных структур в органах, их гуморальная регуляция и т. п. Без углубленного понимания этих процессов невозможны, в частности, дальнейшие исследования механизмов связи возбудителей трансмиссивных инфекций с организмом клеща, так как именно через слюнные железы и гонады осуществляется восприятие и передача инфекции. Органные культуры предоставляют новые возможности для оценки различий в характере связи этих органов с возбудителем трансмиссивной болезни у специфических и неспецифических переносчиков.

В настоящем сообщении предлагается способ получения длительно переживающих культур органов аргасового клеща *Ornithodoros papillipes* (Bir.), который обеспечивает стабильное состояние органа без пролиферации входящих в его состав клеток.

В качестве сред для получения переживающих культур органов и клеток клещей часто используют модификации среды Игла (Hoffman e. a., 1970), среды 199 (Kaufman, Phillips, 1973; Kaufman, 1976) или их сочетаний (Сидоров и др., 1979) с добавлениями различных сывороток, витаминов и антибиотиков. После испытания нескольких питательных сред (в том числе наиболее широко применяемых для культивирования клеток членистоногих —

среды Grace и среды Mitsuhashi a. Maragomogsch с добавлениями различных концентраций фетальной бычьей сыворотки) мы установили, что наилучший результат для нашего объекта достигается при использовании среды, предложенной ранее для получения первичной культуры гемоцитов аргасовых клещей (Сидоров и др., 1979); это смесь основной среды Игла с витаминным бульоном по Митчеллу и Уилсону, но без добавления фетальной бычьей сыворотки.

Отсепарованный стерильно орган клеща, например слюнную железу, помещали в простейшую камеру, а именно в полость, образуемую сквозным отверстием диаметром 6 мм в стандартном предметном стекле, которое герметизируется с обеих сторон покровными стеклами, фиксируемыми парафином. Поверхности предметного и покровных стекол, образующих такую камеру, предварительно стерилизуют пламенем или ультрафиолетовым облу-



Секреторные альвеолы слюнной железы самца *Ornithodoros papillipes* в камере на 11-й день культивирования (общ. ув. 330×).

чением от ламп типа БУВ или ПРК. Затем с нижней стороны предметного стекла с отверстием фиксируют расплавленным парафином покровное стекло, в образовавшуюся лунку помещают изолированный орган, заполняют лунку средой (0.03—0.04 мл), закрывают сверху другим покровным стеклом, не допуская попадания под него пузырей воздуха, и также фиксируют парафином. Полученные препараты, например слюнных желез *O. papillipes*, в таких камерах термостатировали при 28° и ежедневно наблюдали с помощью фазово-контрастного устройства микроскопа (см. рисунок). Клетки альвеол слюнных желез в этих условиях полностью сохраняли первоначальное состояние, не пролиферировали и не видоизменялись. Плазмолиз, разрывы и отслаивание мембранных структур, деформации и иные дегенеративные изменения не происходили до 23-го дня (срок наблюдения). Несмотря на полное отсутствие антибиотиков в среде, бактериальный пророст ни разу не имел места. Предлагаемый способ обладает следующими достоинствами: 1) создает возможность длительного наблюдения за находящимися в стабильном состоянии живыми отсепарованными органами клещей в среде без антибиотиков, что особенно важно для работы с возбудителями болезней; 2) не требует применения каких-либо специальных культуральных сосудов или сложных камер и позволяет работать с общедоступными предметными и покровными стеклами; 3) допускает наблюдения с любой стороны камеры как с обычным, так и с инвертированным микроскопом, причем общая толщина препарата допускает нормальную работу с любыми высокоапертурными системами без разгерметизации камеры; 4) резко снижает расход культуральной среды благодаря крайне малому объему камеры.

Л и т е р а т у р а

- М е д в е д е в а Г. И., Б е с к и н а С. Р., Г р о х о в с к а я И. М. Культура эмбриональных клеток иксодовых клещей. — Мед. паразитол. и паразитарн. болезни, 1972, вып. 1, с. 39—40.
- С и д о р о в В. Е., К о к о р и н И. Н., М и с к а р о в а Э. Д. Функциональная и морфологическая характеристика первичной культуры гемоцитов аргасового клеща *Alveonatus lahorensis* (Argasidae). — Паразитология, 1979, т. 13, вып. 2, с. 129—133.

- B h a t U. K. M., Y u n k e r C. E. Establishment and characterization of a diploid cell line from the tick, *Dermacentor parumapertus* Neumann (Acarina: Ixodidae). — *The Journal of Parasitology*, 1977, vol. 63, N 6, p. 1092—1098.
- H o f f m a n P. J., S c h e i n E., J a g o w M. Untersuchungen an extipiren und in der Kultur gehaltenen Zeckengeweben. — *Zeitschrift für Tropenmedizin und Parasitologie*, 1970, Bd 21, N 1, S. 16—61.
- H o l m a n P. J., R o n a l d N. C. Report of a new tick cell line derived from *Boophilus microplus*. — *Research in Veterinary Sciences*, 1980, vol. 29, p. 383—387.
- K a u f m a n W. The influence of various factors on fluid secretion by in vitro salivary glands of ixodid ticks. — *Journ. of Experimental Biology*, 1976, vol. 64, p. 727—742.
- K a u f m a n W. R., P h i l l i p s J. E. Ion and water balance in the ixodid tick, *Dermacentor andersoni*. II. Mechanism and control of salivary secretion. — *Journ. of Experimental Biology*, 1973, vol. 58, p. 537—547.
- M a r k s E. P. Insect tissue culture: an overview, 1971—1978. — *Annual Review of Entomology*, 1980, vol. 25, p. 73—101.
- P u d n e y M., V a r m a M. G. R., L e a k e C. J. Culture of embrionic cells from the tick *Boophilus microplus* (Ixodidae). — *Journ. of Medical Entomology*, 1973, vol. 10, p. 493—496.
- R o n a l d N. C., C r u s D. Transmission of *Babesia bovis*, using undifferentiated embryonic cells from *Boophilus microplus* tick eggs. — *American Journ. of Veterinary Research*, 1981, vol. 42, N 3, p. 544—545.
- V a r m a M. G. R., P u d n e y M., L e a k e C. J. The establishment of three cell lines from the tick *Rhipicephalus appendiculatus* (Acari: Ixodidae) and their infection with some arboviruses. — *Journ. of Medical Entomology*, 1975, vol. 11, p. 698—706.
- Y u n k e r C. E., M e i b o s H. Culture of embryonic tick cells (Acari: Ixodidae). — *Tissue Culture Association Manual*, 1979, vol. 5, N 1, p. 1015—1017.

CULTIVATION OF ORGANS OF ORNITHODOROS PAPILLIPES (ARGASIDAE)

V. N. Kruchechnikov, S. V. Shcherbakov

S U M M A R Y

A new method is suggested for obtaining cultures of ticks' organs in a simple microchamber constructed by means of ordinary cover glass and slide. The method permits long life observations, reduces expenditures of cultural medium to minimum and does not require the addition of antibiotics.
