

УДК 576.895.421 + 591.434.1

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СРЕДНЕЙ КИШКИ
САМОК КЛЕЩЕЙ РОДА IXODES (ACARI: IXODIDAE)
ВО ВРЕМЯ ИММУНИЗИРУЮЩИХ КОРМЛЕНИЙ**

© Л. А. Григорьева

У самок *Ixodes persulcatus* и *I. ricinus* во время 2-го и 3-го иммунизирующих кормлений на лабораторных кроликах полного насыщения не происходит. Кровососание прерывается на 2-й фазе. Наблюдается смена 3 генераций пищеварительных клеток. Фаза быстрого питания не наступает.

Взаимоотношения иксодового клеща и прокормителя как участников системы «паразит—хозяин» включают реакцию прокормителя в виде противоклещевой резистентности и реакцию клеща на противоклещевую резистентность хозяина.

Явление противоклещевой резистентности как способности хозяев-прокормителей сопротивляться и противодействовать питающимся на них клещам было впервые описано Трагером (Trager, 1939). В его опытах кролики и морские свинки после кормления на них личинок и нимф *Dermacentor variabilis* Say, 1821 развивали высокую степень устойчивости к повторным кормлениям клещей этого вида. Многочисленными экспериментами была установлена противоклещевая резистентность у многих видов лабораторных и сельскохозяйственных животных (Wikel, 1996).

Общей реакцией млекопитающих, птиц и рептилий на паразитирование иксодовых клещей является образование антител на специфические антигены, выделяемые клещом при питании, причем на развитие противоклещевой устойчивости требуется не менее 2 недель (Allen, 1989; Лабетская, 1990; Brossard, 1992; Galbe, Oliver, 1992; Wikel, 1996; Bowman et al., 1997).

Тема развития противоклещевого иммунитета у прокормителей за последние годы получила широкое освещение в литературе. Большинство исследований посвящено молекулярным и иммунологическим характеристикам слюнных (Needham et al., 1989; Jaworski et al., 1992; Lawrie, Nuttall, 2001; Kovar et al., 2002; Lebouille et al., 2002; Valenzuela et al., 2002) и кишечных (Agbede, Kemp, 1986; Willadsen, Kemp, 1988) антигенов, выделяемых клещами при питании. Действие этих белков распространяется на все этапы воспалительной реакции хозяина, а также на врожденный и приобретенный иммунитет хозяина (Koresky et al., 1998, 1999).

Резистентность хозяина влияет на питание и последующее развитие клеща и вызывает значительные отклонения основных экологических количественных показателей, например, происходит уменьшение количества на-

питавшихся клещей вследствие гибели некоторых из них при прикреплении и на более поздних сроках питания, удлинение времени питания, уменьшение массы крови, поглощенной питающимися особями, снижение процента перелинявших личинок и нимф, а также уменьшение числа отложенных яиц и вылупившихся из них личинок (Таежный..., 1985; Agbede, Kemp, 1986; Wikel, 1996; Балашов, 1998).

Вполне естественно предположить, что все эти отклонения являются следствием нарушений питания клеща, о чем должно свидетельствовать проявление не только внешних признаков, но и глубоких морфологических изменений пищеварительной системы. Детальному рассмотрению морфофункциональных изменений кишечника 2 видов клещей рода *Ixodes* в результате иммунизирующих кормлений посвящена эта работа.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Для исследования использованы самки *I. persulcatus* Schulze, 1930 и *I. ricinus* (L., 1758), полученные в течение и после 2-го и 3-го иммунизирующих кормлений на лабораторных кроликах. Иммунизация заключалась в трехкратном последовательном кормлении самок клещей (по 10 особей каждого вида) на одних и тех же кроликах с интервалом в 1 мес. Клещей вскрывали в фосфатном буфере (рН 7.4). Кишечник фиксировали в 9%-ном формалине и спирт-формалине, заливали в парафин через метилбензоат-целлоидин. Срезы толщиной 5 мкм окрашивали азур-эозином, азаном по Гейденгайну, гематоксилин-эозином.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кишечный эпителий голодных самок представлен пищеварительными клетками нимфальной фазы и резервными клетками. Пищеварительные клетки имеют кубическую форму, их цитоплазма содержит зерна гематина. Через 12—18 ч после прикрепления и начала иммунизирующих кормлений пищеварительные клетки начинают расти, они функционируют в течение последующих 2—2.5 сут, их цитоплазма может содержать не только гематин, но и пищеварительные вакуоли (рис. 1, 1—3, 2, 1, 2, см. вкл.). Сформировавшиеся к этому периоду в «регенерационных гнездах» клетки являются пищеварительными клетками первой имагинальной генерации (рис. 1, 1, 2, 1). Эти клетки остаются активными практически до конца питания клеща, так что на 6—8 сут питания они еще различимы в кишечном пласте, но большая их часть уже разрушена (рис. 2, 3). В последние 5—8 сут питания кишечник самок образуют молодые пищеварительные клетки второй имагинальной генерации (рис. 1, 3, 2, 3), активность которых только начинает проявляться, о чем свидетельствует образованный на их апикальной поверхности перитрофический матрикс (Григорьева, Амосова, 2004). Таким образом, во время второго и третьего иммунизирующих кормлений в кишечнике питающихся клещей синхронно происходят одинаковые изменения.

Поглощений значительных количеств пищи у самок за период иммунизирующих кормлений не происходит. Это наглядно подтверждается изменениями веса в течение питания, приведенными в таблице. Установлено, что у самок клещей *I. persulcatus* за время первого неиммунизирующего кормления масса тела увеличивается в 200—240, а у самок *I. ricinus* —

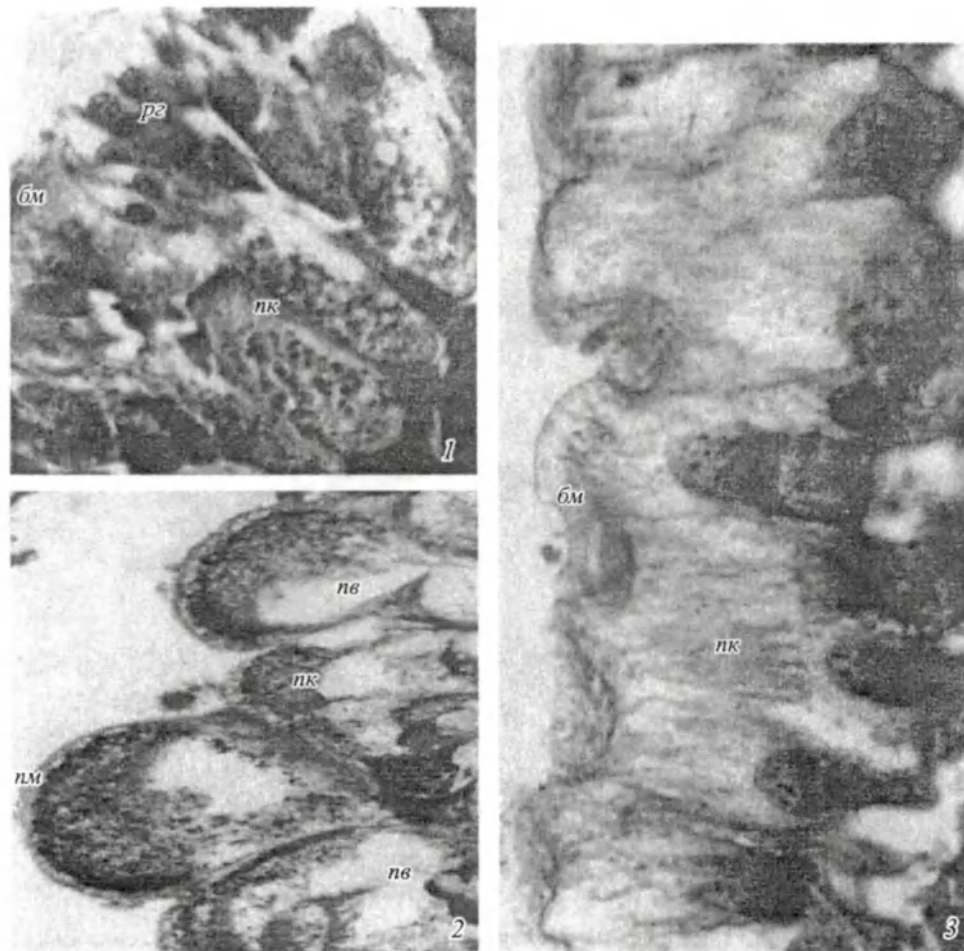


Рис. 1. Изменения кишечника самок во время второго иммунизирующего кормления. 1 — самка *I. persulcatus* через 2 сут после прикрепления. $\times 600$. Азур-эозин; 2 — самка *I. ricinus* через 2.5 сут после прикрепления. $\times 600$. Азан по Гейденгайну; 3 — самка *I. persulcatus* через 8 сут после прикрепления. $\times 600$. Гематоксилин-эозин. бм — базальная мембрана, пв — пищеварительные вакуоли, пк — пищеварительные клетки, пм — перитрофический матрикс, рз — регенерационные гнезда.

Fig. 1. Changes of the midgut in the *Ixodes* females during the second immunizing feeding.

в 130—150 раз (Григорьева, 2003), а при иммунизирующих кормлениях эти показатели резко сокращаются до 25.5—27 и 16—17 раз соответственно.

Сильно складчатая форма базальной мембраны кишечника (рис. 1, 1—3, 2, 2, 3), а также столбчатая форма всех пищеварительных клеток (рис. 1, 1, 3, 2, 2, 3), образующих кишечный пласт на протяжении всего периода питания, свидетельствуют о том, что полость кишечника не заполнялась тем количеством пищи, для которого она была подготовлена. Однако развитие кишечника шло почти по той же схеме, что и у самок при неиммунизирующих кормлениях: происходило увеличение размеров кишки и числа клеток, поступающая пища переваривалась сменяющимися друг друга генерациями пищеварительных клеток.

Содержимое полости кишки изменяется на протяжении питания. В 1-е сут содержимое гомогенное, слабо эозинфильно окрашиваемое с единичны-

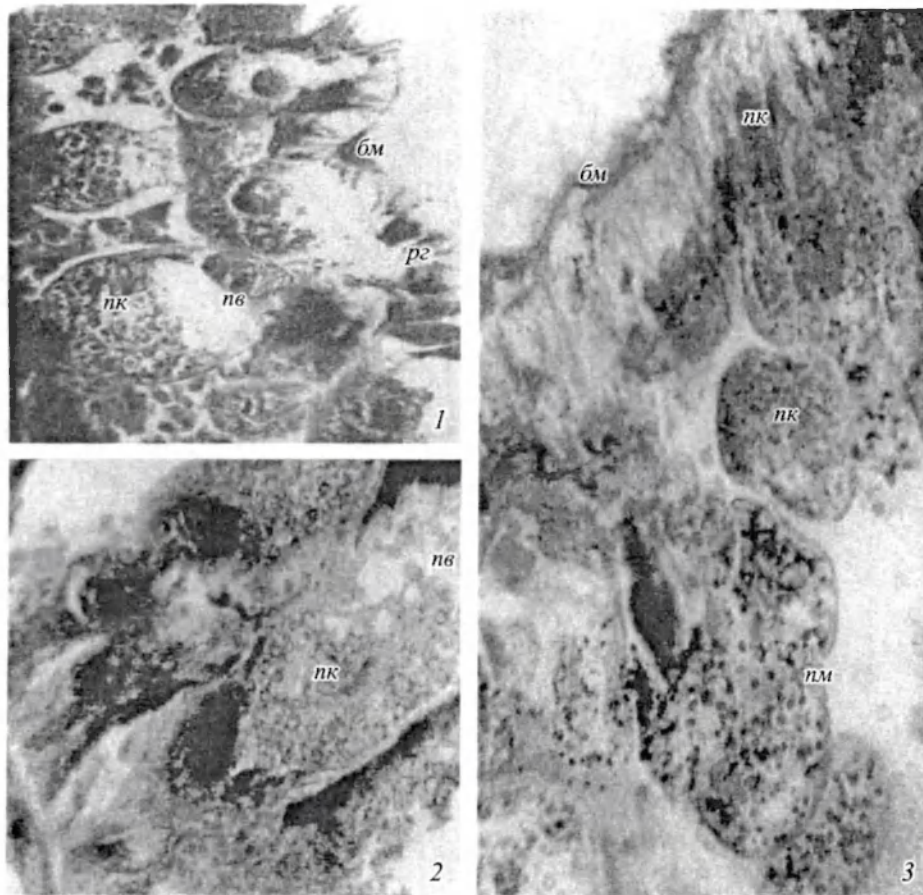


Рис. 2. Изменения кишечника самок во время третьего иммунизирующего кормления. 1 — самка *I. ricinus* через 2 сут после прикрепления. $\times 600$. Азан по Гейденгайну; 2 — самка *I. persulcatus* через 2.5 сут после прикрепления. $\times 600$. Азур-эозин; 3 — самка *I. persulcatus* через 6 сут после прикрепления. $\times 600$. Азур-эозин. Остальные обозначения те же, что и на рис. 1.

Fig. 2. Changes of the midgut in the *Ixodes* females during the third immunizing feeding.

ми гранулоцитами. На 2-е сут питания в полость кишки начинают поступать эритроциты и увеличивается количество клеток лейкоцитарного, а на 4—5-е сут и лимфоцитарного ряда. Причем, в конце иммунизирующих кормлений их количество настолько значительно, что они выглядят как скопления неразрушенных клеток в полости кишки.

Если при неиммунизирующих кормлениях у самок на 4—4.5 сут пищеварительные клетки первой генерации уплощаются при растяжении кишки вследствие поглощения большой порции пищи, то при иммунизирующих кормлениях этого не происходит ни с клетками первой ни с клетками второй имагинальной генерации. Кроме того, клетки второй имагинальной генерации оказываются лишь на начальных этапах пищеварительной активности ко времени отпадения клеща. Кишечник оказывается готовым к принятию пищи, так как благодаря усвоенной ранее пищи произошло его развитие на начальных этапах, однако новые порции пищи, стимулирующие дальнейшее пищеварение, не поступают.

Продолжительность питания и масса самок *Ixodes persulcatus* и *I. ricinus* при иммунизирующих кормлениях
Feeding time and mass of the *Ixodes persulcatus* and *I. ricinus* females during the immunizing feeding

Виды клещей	<i>I. persulcatus</i>			<i>I. ricinus</i>		
	1	2	3	1	2	3
№ кормления	1	2	3	1	2	3
Количество самок в опыте, особ.	10	10	10	10	10	10
Продолжительность питания, сут	8—10	6—8	3—8	8—10	6—8	5—8
Средняя масса самок после питания, мг	480.0	54.0	51.0	248.0	32.0	29.5

Таким образом, следует полагать, что при иммунизирующих кормлениях клещей обсуждаемых видов на прокормителях, обладающих противоклещевой резистентностью, возникают нарушения в поступлении пищи в полость кишки. В большей степени это проявляется в недостатке пищи с высоким содержанием эритроцитов, которые, скорее всего, и являются основным источником органических веществ для питающегося клеща, так как клетки лейкоцитарного ряда могут длительное время переживать в полости кишки, не подвергаясь разрушению.

Причину подобных нарушений, приводящих к недостаточному поступлению крови в организм питающегося клеща, скорее всего, следует искать в особенностях развития воспалительной реакции в месте присасывания паразита у хозяина-прокормителя, обладающего противоклещевой резистентностью. Нарушение целостности кожных покровов хозяина ротовым аппаратом клеща приводит к активации комплемента, под действием которого тучные клетки выделяют медиаторы воспаления из группы гистамина, анафилоксинов и простагландинов, при повреждении эндотелия сосудов высвобождается фибрин и брадикинин, привлекающие в очаг воспаления нейтрофилов, эозинофилов, а в последствие и лимфоцитов, вырабатывающих специфические антитела (Wikel, Bergman, 1997). Приведенная общая схема развития противоклещевой резистентности, вероятно, нуждается в уточнениях по отношению к различным группам прокормителей. Давно известно, что у природных прокормителей иксодовых клещей противоклещевая резистентность не развивается, тогда как многие виды сельскохозяйственных и лабораторных животных ее бурно проявляют (Randolph, 1979; Лабецкая, 1990; Galbe et Oliver, 1992; Lawrie et Nuttall, 2001). Отсутствие резистентности у естественных хозяев иксодовых клещей объясняется реакцией подавления иммунных ответов компонентами слюны паразитов, что считается результатом взаимоадаптации партнеров по паразитарной системе (Ribeiro, 1989). Возможно, исследование особенностей воспалительной реакции, а также клеточного и гуморального иммунитета у неспецифических прокормителей иксодовых клещей могло указать на те факторы резистентности, которые блокируются у природных хозяев и пресекают развитие резистентности. Нашими исследованиями очагов питания клещей рода *Ixodes* на кроликах и белых мышах установлено, что лабораторные животные не образуют оформленную фибриновую капсулу вокруг ротового аппарата питающегося клеща, как это наблюдалось у природных хозяев (Григорьева, 2001а, б, 2002). Таким образом, очаг воспаления и зона поражения в месте питания клеща у лабораторных животных значительно больше, с развитым отеком и зоной гиперемии, что является следствием нарушения целостности сосудов и связанных с этим гуморальных реакций. Особенно следует отметить раз-

витие в пораженных тканях дермы обильного инфильтрата нейтрофильных лейкоцитов, который даже при однократном кормлении вызывает отторжение клещей в конце питания вследствие нагноения. Скопление нейтрофилов на поверхности эпидермиса часто высыхает, что может приводить к «склеиванию» клеща с кожей и шерстью хозяина. Это образование ранее принималось за поверхностную часть цементного футляра. Однако клеточный состав, хорошо различимый на гистологических препаратах, и иммунологическая принадлежность хозяину показывают, что эта структура является струпом и принадлежит хозяину-прокормителю (Балашов, Григорьева, 2002).

Таким образом, в качестве заключения следует отметить, что при иммунизирующих кормлениях в течение многодневного периода кровососания в организме питающегося клеща происходят значительные морфофункциональные перестройки по типу неосомии, т. е. доразвитие кишечника, слюнных желез, кутикулы. Увеличиваются тело клеща и поверхность кишечника, что позволяет всасывать и переваривать значительно большие количества крови (Григорьева, 2003). Период питания принято делить на 3 фазы. 1-я — продолжается первые 6—24 ч, в течение которых происходит прикрепление клеща. 2-я, самая продолжительная, занимает последующие 5—6 сут, именно в этот период увеличивается кишечник и меняются кишечные клетки 3 имагинальных и 1 нимфальной генераций. Во время последней фазы происходит быстрое насыщение клеща и интенсивное переваривание полученной крови (Балашов, 1967, 1998; Akov, 1982; Sonenshine, 1991). Однако при иммунизирующих кормлениях на лабораторных кроликах питание клеща прерывается на 2-й фазе, наблюдается смена 1 генерации пищеварительных клеток нимфальной фазы и 2 генераций пищеварительных клеток имагинальной фазы, генерация секреторных клеток отсутствует. Клещ завершает питание и отпадает, когда последняя генерация пищеварительных клеток находится на начальных этапах активности. Потребляемые количества крови не достаточны для ритмичного функционирования кишечника, вследствие чего питание прерывается на 2-й фазе и полного насыщения не происходит. Мы считаем, что это связано с нарушением поступления крови в полость кишки питающегося клеща, что, возможно, является результатом воздействия какого-либо фактора противоклещевой резистентности неспецифических хозяев-прокормителей.

Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (Инициативный грант № 02-04-48666) и гранта поддержки ведущих научных школ (№ НШ-1664.2003.4).

Список литературы

- Балашов Ю. С. Кровососущие клещи (Ixodoidea) — переносчики болезней человека и животных. Л., 1967. 320 с.
- Балашов Ю. С. Иксодовые клещи — паразиты и переносчики инфекций. СПб., 1998. 287 с.
- Балашов Ю. С., Григорьева Л. А. Гистопатологические особенности питания клещей рода *Ixodes* (Acari: Ixodidae) на амниотах // Доклады Академии наук. 2002. Т. 385, № 1. С. 126—129.
- Григорьева Л. А. Гистопатологические изменения кожи мелких млекопитающих в местах питания клещей *Ixodes trianguliceps*, *I. persulcatus* и *I. ricinus* (Ixodidae) // Паразитология. 2001а. Т. 35, вып. 3. С. 177—183.

- Григорьева Л. А. Гистопатологические изменения кожи птиц в местах питания клещей рода *Ixodes* (Acari: Ixodidae) // *Паразитология*. 2001б. Т. 35, вып. 6. С. 490—495.
- Григорьева Л. А. Гистопатологические изменения кожи ящериц (Reptilia: Lacertidae) в местах питания клещей рода *Ixodes* (Acari: Ixodidae) // *Паразитология*. 2002. Т. 36, вып. 5. С. 375—378.
- Григорьева Л. А. Морфофункциональные изменения средней кишки самок клещей рода *Ixodes* (Acarina: Ixodidae) во время и после питания // *Паразитология*. 2003. Т. 37, вып. 3. С. 177—184.
- Григорьева Л. А., Амосова Л. И. Особенности перитрофического матрикса в кишечнике самок клещей рода *Ixodes* (Acarina: Ixodidae) // *Паразитология*. 2004. Т. 38, вып. 1. С. 3—11.
- Лабецкая А. Г. Защитная реакция у млекопитающих при паразитировании иксодовых клещей // *Наука и техника*. 1990. 157 с.
- Таежный клещ *Ixodes persulcatus* Schulze (Acarina, Ixodidae): Морфология, систематика, экология, медицинское значение / Под ред. Н. А. Филипповой. Л., 1985. 416 с.
- Agbede R. I. S., Kemp D. H. Immunization of cattle against *Boophilus microplus* using extracts derived from adult female ticks: histopathology of ticks feeding on vaccinated cattle // *Intern. Journ. Parasitol.* 1986. Vol. 16. P. 35—41.
- Akov S. Blood digestion in ticks // *Physiology of ticks* / Ed. by F. D. Obenchain, R. Galun. Oxford etc., 1982. P. 197—211.
- Allen J. R. Immunology of interactions between ticks and laboratory animals // *Exp. Appl. Acarol.* 1989. Vol. 7. P. 5—13.
- Brossard M. Immunity against *Ixodes ricinus* // First Intern. conf. on tick-borne pathogens at host-vector interface. Saint Paul (Minnesota), 1992. P. 226—232.
- Bowman A. S., Coons L. B., Needham G. R., Sauer J. R. Tick saliva: recent advances and implications for vector competence // *Med. Vet. Entomology*. 1997. Vol. 11. P. 277—285.
- Galbe J., Oliver J. H. Jr. Immune response of lizards and rodents to larval *Ixodes scapularis* // *Journ. Med. Entomol.* 1992. Vol. 29. P. 774—783.
- Jaworski D. C., Rossell R., Coons L. B., Needham G. R. Tick attachment cement and salivary gland cells contain similar immunoreactive polypeptides // *Journ. Med. Entomol.* 1992. Vol. 29. P. 305—309.
- Kopecky J., Kuthejlova M. Suppressive effect of *Ixodes ricinus* salivary gland extract on mechanisms of natural immunity in vitro // *Parasite Immunology*. 1998. Vol. 20. P. 169—174.
- Kopecky J., Kuthejlova M., Pechova J. Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* ticks inhibits production on interferon-gamma by the upregulation of interleukin-10 // *Parasite Immunology*. 1999. Vol. 21. P. 351—356.
- Kovar L., Kopecky J., Rihova B. Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* tick modulates the host immune response towards the Th2 cytokine profile // *Parasitol Res.* 2002. Vol. 88. P. 1066—1072.
- Lawrie C. H., Nuttall P. A. Antigenic profile of *Ixodes ricinus*: effect of developmental stage, feeding time and the response of different host species // *Parasite Immunology*. 2001. Vol. 23. P. 549—556.
- Leboulle G., Crippa M., Decrem Y., Meyri N., Brossard M., Bollen A., Godfrid E. Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from *Ixodes ricinus* ticks // *Journ. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277. P. 10 083—10 089.
- Needham G. R., Jaworski D. C., Simmen F. A., Sheerif N., Muller M. T. Characterization of ixodid tick salivary-gland gene products, using recombinant DNA technology // *Exp. Appl. Acarol.* 1989. Vol. 7. P. 21—32.
- Randolph S. E. Population regulation in ticks, the role of acquired resistance in natural and unnatural host // *Parasitology*. 1979. Vol. 79. P. 141—156.
- Ribeiro J. M. C. Role of saliva in tick/host associations // *Exp. Appl. Acarol.* 1989. Vol. 7. P. 15—20.
- Sonenshine D. *Biology of ticks*. Oxford. 1991. Vol. 1. 472 p.
- Trager W. Acquired immunity to ticks // *Journ. Parasitol.* 1939. Vol. 25. P. 57—81.
- Valenzuela J. G., Francischetti I. M. B., Pham V. M., Garfield M. K., Mather T. N., Ribeiro J. M. C. Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis* // *The Journ. of Experiment. Biology*. 2002. Vol. 205. P. 2843—2864.
- Wikel S. K. Host immunity to ticks // *Ann. Rev. Entomol.* 1996. Vol. 41. P. 1—22.

- Wikel S. K., Bergman D. Tick — host immunology: significant advances and challenging opportunities // *Parasitol. Today*. 1997. Vol. 13. P. 383—389.
- Wiiladsen P., Kemp D. H. Vaccination with «concealed» antigens for tick control // *Parasitol. Today*. 1988. Vol. 4. P. 196—198.

MORPHOFUNCTIONAL CHANGES
IN THE MIDGUT OF THE IXODES FEMALES (ACARI: IXODIDAE)
DURING THE IMMUNIZING FEEDINGS

L. A. Grigorieva

Key words: ticks, *Ixodes*, females, midgut, digestive cells, immunizing feeding.

SUMMARY

The changes of the midgut in the females of the tick species *Ixodes persulcatus* and *I. ricinus* during the second and third immunizing feeding on rabbits were studied by the histological technics. The alternation of one generation of the digestive cells of nymphal stage and two generations of the digestive cells of adult stage was observed. The generation of secretory cells is absent. The tick completes feeding and drop off when the last generation of the digestive cells is on the initial activity stages. The amount of the blood consumed is not enough for the rhythmical functioning of the midgut. The feeding of tick is broken on the second phase and full satiation does not take place. It is apparently an effect of the interruption of the blood entrance into the midgut cavity of feeding tick as a probable result of anti-ticks resistance of unnatural hosts.
