

К. О. ОВНАНЯН

ЭЛЕКТРОННОМИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ
ВОЗБУДИТЕЛЯ КЛЕЩЕВОГО ВОЗВРАТНОГО ТИФА
BORRELIA SAUCASICA В КИШЕЧНИКЕ КЛЕЩА
ORNITHODOROS VERRUCOSUS

До настоящего времени изучение морфологии возбудителя клещевого возвратного тифа в кишечнике аргасовых клещей, а также их дальнейшая судьба в организме специфического переносчика проводилась на уровне светового микроскопа. Данные этих исследований отражены в многочисленных работах [1, 3, 5, 7—11, 13, 14, 20 и др.]. Однако еще многие вопросы, касающиеся интимных взаимоотношений возбудителя клещевого возвратного тифа и его специфического переносчика, остаются невыясненными.

С помощью электронного микроскопа нами изучена ультраструктура *Borrelia saucasica* в кишечнике клеща *Ornithodoros verrucosus*, а также сделана попытка выявить пути и механизм проникновения возбудителя из просвета кишечника в гемоцель.

Материал и метод. Объектом нашего изучения были взрослые клещи *Ornithodoros verrucosus*, зараженные возбудителем клещевого возвратного тифа *B. saucasica*.

Клещи кормились на 1—2-дневных цыплятах, вылупившихся из зараженных куриных эмбрионов, а также на зараженных морских свинках, при высокой концентрации возбудителя в крови. После кормления клещей содержали при комнатной температуре.

Вскрытие клещей и изоляцию кишечника проводили по методу, разработанному академиком Е. Н. Павловским [6], с некоторой модификацией по В. Е. Сидорову [7].

Для фиксации материала были применены следующие методы: фиксация по Ритер-Келленбергеру [16], по Шёстранду [18], а также 1% глutarальдегидом на фосфатном буфере, с последующей дофиксацией осмием [17]. После фиксации материал обезжизивали в спиртах и заключали в смесь метакрилатов. Ультратонкие срезы (толщиной 200—300 А) были получены на ультратоме LKB-Produkter и дополнительно контрастировали 5% уранил-ацетатом и лимоннокислым свинцом [15]. Исследование и микрофотографирование материала проводили на микроскопе JEM-6С при увеличении $\times 20\,000$. Срезы толщиной 1000—1500 А освобождали от метакрилатов с помощью ацетона. Окраску проводили (водным или спиртовым растворами) толудиновым синим, затем после проводки в спиртах возрастающей концентрации и ксилоле заключали в канадский бальзам. Препараты, приготовленные вышеуказанным методом [19], изучали в световом микроскопе.

Боррелии в содержимом кишечника исследовали также в мазках, фиксированных этиловым или метиловым спиртом и окрашенных азур-эозином по Романовскому-Гимза.

Результаты и обсуждение. Вскрытие клещей, изоляцию кишечника проводили в различные сроки после кровососания: через 15 мин., 48 час. через каждые 3 часа и в течение последующих 10 суток через каждые 24 часа.

Электронномикроскопическое изучение *B. saucasica*, выделенного из крови теплокровных животных (морских свинок, цыплят), проведено методами негативного окрашивания, ультратонких срезов и описано в наших ранних работах [4].

Большинство клеток боррелий в течение 10 дней сохраняет три *основные компонента клеточной организации*: покров, цитоплазматический цилиндр и осевую нить (рис. 1).

Покров боррелий состоит из трехслойной поверхностной мембраны клеточной стенки (двух осмиофильных слоев 30 А и промежуточного осмиофобного слоя 25 А). Между поверхностной мембраной клеточной стенки и цитоплазматической мембраной находится пространство, заполненное осмиофобным материалом. В этом же слое располагаются фибриллы осевой нити—локомоторный аппарат боррелий. Цитоплазматическая мембрана также имеет трехслойное строение.

Цитоплазма имеет гранулярное строение. В центральных участках цитоплазмы имеются осмиофобные зоны, заполненные нежным фибриллярным материалом. Эти зоны соответствуют ядерному аппарату.

Клетки боррелий в содержимом кишечника клеща встречаются как в свободном состоянии, так и внутри форменных элементов насосавшегося крови теплокровного животного. В содержимом кишечника наряду с боррелиями и форменными элементами крови обнаружены и другие микроорганизмы, некоторые из них по своей ультраструктуре напоминают микоплазму. Нам удалось установить наличие боррелий с помощью электронного микроскопа в просвете кишечника в течение 9 дней после кровососания, тогда как при светооптическом исследовании они выявляются в течение 20 дней. Начиная с 12 час. встречались отдельные клетки боррелий, окруженные мембранными структурами (рис. 2). Эти цистоподобные образования имеют оболочку, представленную как одиночной мембраной с трехслойным строением, так и в виде двух листков, между которыми расположен промежуточный слой меньшей электроннооптической плотности. Ультраструктура боррелий, находящихся внутри этих цистоподобных образований, сохраняет характерный для них тип строения, по-видимому, их оболочка способствует сохранению возбудителя.

Наряду с сохранившимися клетками боррелий встречаются и разрушенные, при этом внутрицитоплазматические кольцевидные мембранные структуры этих клеток лежат вне клетки в свободном состоянии. По всей вероятности, именно подобные образования при светооптическом

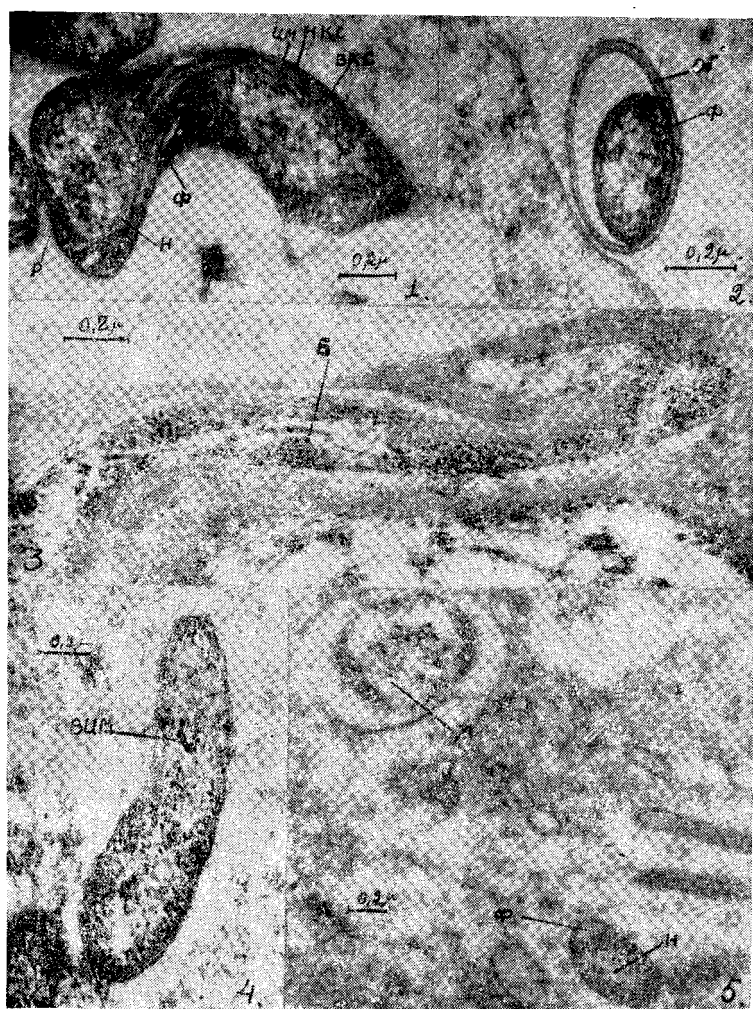


Рис. 1. *B. caucasica* в просвете кишечника. $\times 40\,000$.

Рис. 2. Цистоподобные образования *B. caucasica* в просвете кишечника. $\times 50\,000$.

Рис. 3. Слой стенки кишечника, обращенного в гемоцель, где расположена *B. caucasica*. $\times 46\,000$.

Рис. 4. Внутрицитоплазматическая кольцевидная мембранная структура в клетке *B. caucasica*. $\times 40\,000$.

Рис. 5. *B. caucasica* в цитоплазме эпителиальной клетки кишечника. $\times 30\,000$.

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ.

1. НКС — наружный слой клеточной стенки. 2. ВКС — внутренний слой клеточной стенки. 3. ЦМ — цитоплазматическая мембрана.
4. ВЦМ — внутрицитоплазматическая мембранная структура. 5. р — рибосома. 6. Н — нуклеоид. 7. Ф — фибриллы. 8. Об — оболочка.
9. М — микоплазма. 10. Б — *B. caucasica*.

изучении принимались как гранулярные формы возбудителя клещевого возвратного тифа [9, 10, 13 и др.].

Начиная с 12 час. и в течение всего исследования (10 дней) боррелии обнаружены в разных участках эпителиальных клеток стенки кишечника клеща: в цитоплазме, вблизи ядра, а также в слое кишечника, обращенном в гемоцель.

В эпителиальных клетках боррелии могут находиться как в вакуолях, имеющих оболочку толщиной в 250 А, так и непосредственно в самой цитоплазме.

В цитоплазме эпителиальных клеток имеются мембранные структуры, по-видимому, лизосомы, которым приписывают активную роль в переваривании заглоченных форменных элементов крови и бактерий [2, 12]. Однако в цитоплазме этих клеток возбудитель клещевого возвратного тифа видимых морфологических изменений не претерпевает (рис. 5), что указывает на их паразитические взаимоотношения.

Проникновение возбудителя из просвета кишечника в полость клеща вероятно происходит путем фагоцитоза. Не исключается также активное проникновение боррелий в клетку путем разрушения ее оболочки.

В ы в о д ы

1. Изучена ультраструктура возбудителя клещевого возвратного тифа *B. caucasica* в содержимом и в стенке кишечника клеща *O. verrucosus*.

2. В просвете кишечника клеща имеются цистоподобные образования боррелий, по-видимому, они являются более устойчивыми формами возбудителя клещевого возвратного тифа.

3. Начиная с 12 час. и в течение всего периода исследования (10 дней) боррелии располагаются на разных участках эпителиальных клеток стенки кишечника клеща. При этом ультраструктура боррелий морфологических изменений не претерпевает.

4. Проникновение возбудителя клещевого возвратного тифа *B. caucasica* в стенку кишечника клеща *O. verrucosus* и дальнейшая ее миграция в гемоцель происходит при фагоцитозе эпителиальных клеток стенки кишечника. Не исключается также активное проникновение боррелий в клетку путем разрушения ее оболочки.

Ереванский государственный университет
и Институт эпидемиологии и микробиологии
им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР

Поступило 3.V 1967 г.

Կ. Օ. ՀՈՎՆԱՆՅԱՆ

ՏՉԱՅԻՆ ՀԵՏԱԴԱՐՁ ՏԻՖԻ ՀԱՐՈՒՑԻՉԻ՝ BORRELIA CAUCASICA-Ի
ԷԼԵԿՏՐՈՆԱՄԻԿՐՈՍԿՈՊԻԱԿԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ
ORNITHODOROS VERRUCOSUS ՏՉԻ ԱՂԻՔՈՒՄ

Ա մ փ ն փ ն մ

Ներկա աշխատության մեջ ուսումնասիրված է տղային հետադարձ տիֆի հարուցիչի ուտրակառուցվածքը և նրա թափանցման մեխանիզմը տղի աղիքի պարունակությունից հեմոցել, վարակված կենդանիների վրա կերակրելուց հետո (15 րոպեից սկսած մինչև 10 օրը):

Տղերը հերձելուց հետո, անջատված աղիքները իր պարունակությամբ ֆիքսված է 1%-անոց օսմիի բուֆերային լուծույթով ըստ Ռիտեր-Կելլենբերգերի [16] և Շյոստրանդի [18] մեթոդների, ինչպես նաև 1% գլյուտարալդեհիդի ֆոսֆատային բուֆերով, հետագա ֆիքսացիան շարունակելով օսմիով:

Հետազոտվող նյութը բարձրացող կոնցենտրացիայի սպիրտների մեջ անցկացնելուց հետո, պարփակված է մետակրիլատների խառնուրդով: LKB-Produktor ուտրատումի վրա ստացված ուտրանուրը կտրվածքները ներկված են 5%-անոց ուրանիլ ացետատով և լիմոնաթթվային կապարով: Պատրաստի պրեպարատները նկարահանված են JEM6C էլեկտրոնային միկրոսկոպով 20000 խոշորացումով:

Վերը նշված մեթոդների օգտագործումը հնարավորություն տվեց բացահայտել հետևյալ պատկերը.

1. Տղային հետադարձ տիֆի հարուցիչի բջիջների մեծ մասը հետազոտման ժամանակաշրջանում (10 օր) պահպանում են իրենց բնորոշ կառուցվածքը, ծածկույթը, ցիտոպլազմատիկ գլանը և առանցքային թելը:

2. Հարուցիչը աղիքի պարունակության մեջ հանդիպում է ցիտոսոման գոյացությունների ձևով, որը, հավանորեն, *B. caucasica*-ի կայուն ձևերից է:

3. Հարուցիչի բջջի ցիտոպլազմայի մեջ հանդիպում են օղականման թաղանթային կառուցվածքներ: Նման գոյացությունները հանդիպում են նաև աղիքի լուսանցքում ազատ վիճակում: Հավանական է, որ հենց այդ գոյացություններն են, որ լուսային միկրոսկոպիայի ժամանակ մի շարք հեղինակների [9, 10, 13 և ուրիշները] կողմից ընդունվել են որպես հարուցիչի գրանուլային կամ ֆիլարիվոլ ձևեր:

4. Կերակրելուց 12 ժամ հետո և հետագա 10 օրվա ընթացքում *B. caucasica*-ն կանոնավոր հանդիպում է տղի աղիքի էպիթելիային բջիջների ցիտոպլազմայի տարբեր հատվածներում:

5. էպիթելիային բջիջներում հարուցիչը գտնվում է ինչպես վակուոլում սահմանափակված թաղանթում 250 Å հաստությամբ, այնպես էլ անմիջապես ցիտոպլազմայում:

6. Տղի աղիքի բջիջներում հանդիպում են թաղանթային կառուցվածքներ, որոնք հիշեցնում են լիզոսոմներին: Վերջիններիս վերաբրում են կարևոր դեր բջջի կողմից կլանված մասնիկների մարսման պրոցեսում: Չնայած դրան, հետազոտման ամբողջ ժամանակաշրջանում աղիքի պատի մեջ հայտնաբերված *B. caucasica*-ի մոտ մորֆոլոգիական փոփոխություններ չեն նկատվում:

7. Հարուցիչի ներթափանցումը աղիքի լուսանցքից տզի աղիքի մեջ, ինչպես նաև դրա հետագա տեղաշարժը դեպի հեմոցել էպիթելալին բջիջների կողմից կատարվում է ֆագոցիտոզի հետևանքով: Չի բացառվում նաև հարուցիչի ակտիվ շարժունակության դերը աղիքի պատի մեջ ներթափանցման պրոցեսում:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Аракчеева С. Г. Мед. паразитол. и паразитарные болезни, 6, 665—667, 1963.
2. Брауде А. И. Успехи современной биологии, 62, 1 (4), 1966.
3. Москвин И. А. Клещевые спирохетозы. 127—128, 1960.
4. Овнанян К. О. Биологический журнал Армении АН АрмССР, т. 20, 2, 1967.
5. Павловский Е. Н. Сб. Жив. параз. и некоторые параз. бол. человека в Тадж. Изд. Н. К. З. Тадж.ССР, 84—121, 1929.
6. Павловский Е. Н. Лабораторный практикум медицинской паразитологии. Медгиз, 1959.
7. Сидоров В. Е. Зоол. ж., т. XX, XIX, 69, 1324—1327, 1960.
8. Теравский И. К. Тр. ВМОЛА им. С. М. Кирова, т. 105, 135—141, 1959.
9. Софиев М. С., Штырева Л. В., Шеулов А. П. Мед. паразитол. и паразитарные болезни, 4, 335—342, 1956.
10. Шеулов А. П. Мед. паразит. и паразитарн. бол., т. XXV, в. 4, 342—345, 1956.
9. Burgdorfer W. Acta tropica 8, 3, 193, 1951.
12. De Duve C., Walfiaux R. Ann. Rev. Physiol. 28: 435—493, 1966.
13. Leischman W. B. Trans. soc. Tropical med. and Hyg., 1910.
14. Marchoux E. et Couvy L. Ann. Inst Pasteur, 1, 27, 450, 1913.
15. Reynold E. S. J. Cell. Biology, 17, 1, 208—211, 1963.
16. Ryter A. and Kellenberger. Zeitschr. Naturforsch. 13, в. 597, 1958.
17. Sabatini D. D., Bensch K., Barnett R. J. J. Cell. Biology, 17, 1, 19—58, 1963.
18. Schostrand F. S. J. Cell. Comp. Physiol., 42, 15, 1953.
19. Tawara I. J. Electron. Microsc., 14, 4, 301, 1965.
20. Wolbach S. B. J. Med. Res., в. 40, 1, 37—48, 1914.