

УДК 619:576.895.42

DOI:

Поступила в редакцию 03.06.2015

Принята в печать 19.02.2016

Для цитирования:

Мирзаева А. У., Акрамова Ф. Д., Хушматов С. Ш. О физиологических механизмах действия секретов слюнных желез клещей *Argas persicus* Oken, 1818 (Argasidae, Argas). // Российский паразитологический журнал. – М., 2016. – Т.35. – Вып. 1. – С.

For citation:

Mirzaeva A. U., Akramova F.D., Hushmatov S. Sh. On physiological mechanism of salivary secretion in ticks *Argas persicus* Oken, 1818 (Argasidae, Argas). Russian Journal of Parasitology, 2016, V.35, Iss.1, pp.

**О ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМАХ ДЕЙСТВИЯ СЕКРЕТОВ СЛЮННЫХ
ЖЕЛЕЗ
КЛЕЩЕЙ ARGAS PERSICUS OKEN, 1818 (ARGASIDAE, ARGAS)**

Мирзаева А. У.¹, Акрамова Ф. Д.¹, Хушматов С. Ш.²

¹ Институт генофонда растительного и животного мира, Академия Наук Республики Узбекистан, 100053, Узбекистан, г. Ташкент, ул. Багишамол, 232, e-mail: mirzaieva_a.u@mail.ru

² Институт биоорганической химии им. А. С. Садыкова, Академия Наук Республики Узбекистан

Реферат

Цель исследования – изучение коагулянтного и релаксантного влияния секретов слюнных желез клещей *Argas persicus*, на функциональную активность кровеносно-сосудистой системы.

Материалы и методы. Эксперименты проводили на препаратах аорты, выделенных из грудной клетки беспородных белых крыс. Изометрическую силу сокращения препарата мышцы регистрировали с помощью механотрона. Для выяснения антикоагулянтных механизмов плазмы крови при дефиците X, XI, IX и VIII факторов использовали время частичной активизации тромбина (ВЧАТ).

Результаты и обсуждение. Установлено замедление процесса свертывания плазмы крови у крыс. Показатели свертываемости зависели от концентрации испытуемых секретов. При концентрации, равной 150 мкг/мл, степень коагуляции плазмы крови по сравнению с контролем снижалась до 78,4 %. Выяснена роль ионов кальция в регуляции сократительной активности гладкомышечных клеток кровеносных сосудов. Компоненты слюнных желез *A. persicus* обладают релаксантным действием на сократительную активность препарата аорты крысы.

Ключевые слова: клещи, *Argas persicus*, слюнные железы, антикоагулянт, кровеносная система, биологически активные вещества.

Введение

За последние годы значительно возрос интерес к кровососущим клещам Ixodidae и Argasidae как к переносчикам трансмиссивных болезней с одной стороны и изучению токсичности секретов их слюнных желез – с другой.

Общеизвестно, что состав слюны кровососущих клещей состоит из простагландинов, вазодилаторов, антитромбоцитов, иммуномодуляторов и антикоагуляционных веществ, связанных с их основными адаптивными механизмами. При исследовании структурно-функциональных особенностей слюны обнаружено наличие ядовитых компонентов. Имеющиеся антикоагулянтные вещества, предотвращают свертывание крови хозяина [1, 2, 4]. Большинство биологически активных веществ, входящих в состав слюны клещей, имеют широкий диапазон действий. Механизм действия биологически активных веществ, выделенных из слюны ряда видов клещей и обладающих антикоагулянтным, антитромбоцитным действиями, достаточно хорошо изучен. Однако, недостаточно выяснены физиологические механизмы действия секретов слюны клещей Argasidae.

Основная цель данного исследования – изучение коагулянтного и релаксантного влияния секретов слюнных желез клещей *Argas persicus*, распространённых на территории Узбекистана, на функциональную активность кровеносно-сосудистой системы.

Материалы и методы

Опыты по изучению антикоагулянтного влияния секретов слюны клещей *A. persicus* осуществляли по общепринятым методам [7, 12]. В качестве объекта использовали кровь беспородной белой крысы и барана.

Эксперименты проводили на препаратах аорты (диаметр 2–3 мм, длина 3–4 мм), выделенных из грудной клетки беспородных белых крыс массой 200–250 г и помещенных в специальную камеру (5 мл), перфузируемую физиологическим раствором Кребса (состав, мМ: NaCl – 120; KCl – 4,8; CaCl₂ – 2; MgSO₄ – 1,2; KH₂PO₄ – 1,2; NaHCO₃ – 20; глюкоза – 10), pH 7,4, оксигенированного карбогеном (O₂ – 95 %, CO₂ – 5 %) при температуре 37±0,5 °C. Изометрическую силу сокращения препарата мышцы регистрировали с помощью механотрона F03 (Grass Instrument Co., США). К каждому препарату прикладывали начальное напряжение, соответствующее 10 мН. После периода стабилизации (45 мин) индуцировали сокращение мышцы с помощью KCl (50 мМ) и норадреналином (НА) (1 мкМ) и в этих условиях выполняли все эксперименты. Сигнал с датчика натяжения подавался на усилитель и регистрировался с помощью самописца Endim 621,02 (Чехия).

Полученные данные обрабатывали с помощью компьютерной программы OriginPro 7,0. При этом амплитуда сократительных ответов выражалась в процентах от максимального ответа и рассчитывалась как среднее для 4–7 различных экспериментов. Значения $P < 0,05$ указывают на статистически значимые различия.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований по изучению антикоагулянтного действия секретов слюнных желез клещей *A. persicus* установлено замедление процесса свертывания плазмы крови крысы. Параметры свертываемости находились в зависимости от концентрации испытуемых секретов (25–150 мкг/мл). При концентрации 150 мкг/мл степень коагуляции плазмы крови (по сравнению с контролем) снижалась до 78,4 %.

Для выяснения антикоагулянтных механизмов плазмы крови при дефиците X, XI, IX и VIII факторов использовали ВЧАТ (время частичной активизации тромбина). При этом процесс агрегации тромбоцитов крови в значительной степени продлевался. На рисунке 1 приведен процесс агрегации тромбоцитов крови крысы.

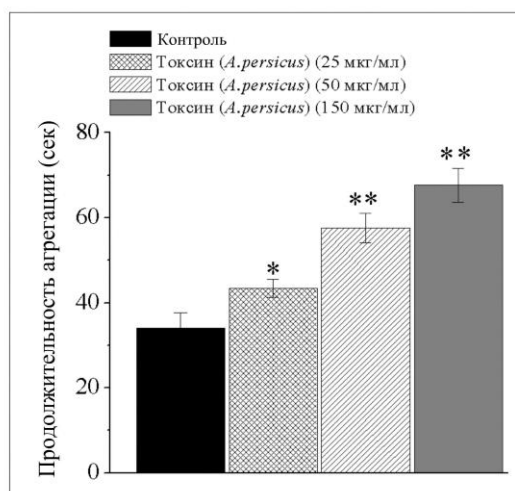


Рис. 1. Влияние секретов слюнных желез клещей *Argas persicus* разной концентрации на агрегацию тромбоцитов крови крысы (оригинал)

Отмеченное замедление антикоагулянтного процесса биологически активными веществами секретов клещей привело к ослаблению активности тромбоцитов и ингибированию X факторов. Некоторые антикоагулянтные компоненты привели к сокращению образования тромбоцитных пластинок [14], другие – к активизации Ха факторов ингибирования [13]. Определено действие комплекса протромбиназы или Ха комплекса, а также связи тромбина при антикоагулянтном влиянии [5].

Выделенные из слюнных желез клещей *Ornithodoros moubata* и *O. savignyi* компоненты, замедляющие процессы свертывания крови, привели к снижению активизации тромбина, а дизагегин и савигнигрин имеют антиагрегационную особенность (скопление тромбоцитов) в кровеносной системе. Монобин, выделенный из слюнных желез *A. monolakensis*, также обладает антикоагулянтным действием [13].

Установлено, что выделенный из слюнных желез ТАР (tick anticoagulant peptide), замедлял активность действия FXa факторов на процессы свертывания крови плазмы человека. Вследствие чего выявлено образование активных связей ТАР протеина FXa фактора и получены положительные результаты в процессе их противотромбозного влияния в кровеносной системе [8, 9].

Результаты наших исследований и данные литературы показывают, что секреты *A. persicus* (25–150 мкг/мл) в значительной степени действуют на активность гемостазной связи и в меньшей – на продолжительность антикоагуляционных особенностей плазмы крови в соответствии с тестом (ВЧАТ). Секреты *A. persicus* оказывают замедляющее действие на факторы X, XI, IX, VII в кровеносной системе.

На рисунке 2 отмечено релаксантное (расслабляющее) влияние компонентов слюнных желез *A. persicus* на сократительную активность мышечного препарата, приготовленного из аорты крысы.

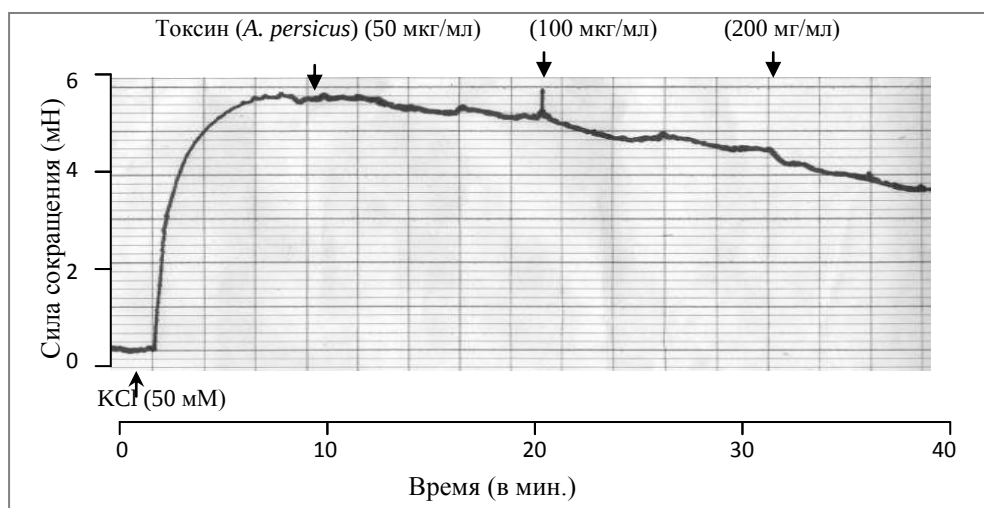


Рис. 2. Релаксантное влияние секретов *Argas persicus* на сократительную активность препарата аорты крыс (оригинал)
(при концентрации секретов *A. persicus* 10–100 мг/мл в инкубационной среде, сокращение, вызванное влиянием KCL (50 мМ), достигало наивысшей точки)

В свою очередь, влияние KCl при концентрации яда 150 мкг/мл привело к регрессу силы сокращения мышечного препарата по сравнению с контролем. На рисунке 3 отражен показатель полумаксимального влияния концентрации EC_{50} – 32,7 мкг/мл при pD_2 ($-\log EC_{50}$), равной 4,63 (рис. 3).

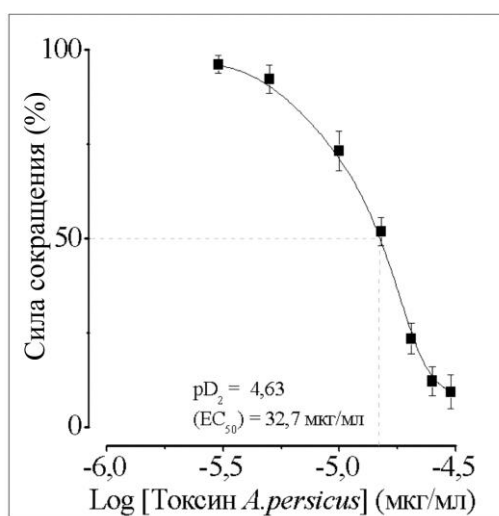


Рис. 3. Полумаксимальное релаксантное влияние показателя концентрации (EC_{50}) относительно сократительной активности препарата аорты крысы под воздействием секретов *Argas persicus* (оригинал)
(ось ординат – максимальная сила мышечного сокращения в %; ось абсцисс – логарифмическая концентрация (мкг/мл) секретов клеща *A. persicus*)

Ионы $[Ca^{2+}]$ играют важную роль в регуляции сократительной активности гладкомышечных клеток кровеносных сосудов, и этот процесс непосредственно связан с $[Ca^{2+}]_i$. В регуляции этого процесса участвуют: каналы, расположенные в плазмолемме Ca^{2+}_L [6], а также активизирующиеся рецепторные каналы, находящиеся под влиянием саркоплазматического ретикулума инозитол 1,4,5-трифосфата (IP_3R), белок кальмодулина [11], Ca^{2+} -АТФаза, находящиеся в плазмолемме Ca^{2+} -АТФаза и Na^+/Ca^{2+} -обменника и связи протеинкиназы.

Для того, чтобы обеспечить приток крови в организм клещей, в состав их слюнных желез входит ряд вазодилаторов – веществ, обеспечивающих расширение стенок кровеносных сосудов [3, 10]. В составе слюнных желез клещей семейств Ixodidae и Argasidae определены простагландины, имеющие свойства вазодилаторов. Кроме того, они оказывают расслабляющий эффект на гладкие мышцы кровеносных сосудов и осуществляют замедление агрегации тромбоцитов [3].

При повреждении стенок кровеносных сосудов в процессе активизации тромбоцитов наблюдают повышение ионов Ca^{2+} , связанное с сокращением активности гладких мышц кровеносных сосудов. В этой связи, имеющиеся в составе слюнных желез клещей молекулы белка (кальретикулин) связывают ионы Ca^{2+} и ограничивают сокращение гладких мышц кровеносных сосудов [4].

Из анализа литературных данных и результатов проведенных исследований видно, что действие компонентов секретов слюнных желез клещей *A. persicus* на сократительную активность препарата аорты крысы и кровеносных сосудов гладких мышц имеет расслабляющее действие. В свою очередь, это осуществляется действием простагландинов в качестве вазодилатора и связывающим действием молекул белка кальретикулина с ионами Ca^{2+} .

Таким образом, нами изучена степень продолжительности антикоагуляционных особенностей плазмы крови под действием различных концентраций секретов слюнных желез клещей *A. persicus* на активность гемостазной системы и установлено, что компоненты слюнных желез *A. persicus* имеют релаксантное действие на сократительную активность препарата аорты крысы.

Полученные результаты проведенных исследований носят сугубо предварительный характер. Биоактивные вещества секретов слюнных желез клещей имеют определенное значение в медицинской и фармакологической сфере в плане использования природных компонентов для создания и совершенствования средств коррекции сосудистых патологий.

Литература

1. Алексеев А. Н. Система клещ – возбудитель и ее эмерджентные свойства. – Санкт-Петербург, 1993.
2. Балашов Ю. С. Паразито-хозяйинные отношения членистоногих с наземными позвоночными. – Ленинград: Наука, 1982.
3. Andrade B. B., Teixeira C. R., Barral A., Barral-Netto M. Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood // Anais da Academia Brasileira de Ciências, 2005. – V. 77, No 4. – P. 665–693.
4. Bowman A. S. Tick salivary prostaglandins: Presence, origin and significance // Parasitology. – 1996. – V. 12. – P. 388–396.
5. Corral-Rodríguez M. A. Tick-derived Kunitz-type inhibitors as antihemostatic factors // Insect Biochem. Mol. Biol. – 2009. – V. 39, No 9. – P. 579–595.
6. Cribbs L. L. Vascular Smooth Muscle Calcium // Channels. Could T be a target. Circ. Res. – 2001. – V. 89. – P. 560–567.
7. Fry B. G., Roelants K., Champagne D. E. et al. The Toxicogenomic multiverse: Convergent recruitment of proteins into animal venoms // An. Rev. Genom. Human Gen. – 2009. – V. 10. – P. 483–511.
8. Fukumoto S., Sakaguchi T., You M., Xuan X., Fujisaki K. Tick troponin I-like molecule is a potent inhibitor for angiogenesis // Microvasc. Res. – 2006. – V. 71. – P. 218–221.
9. Rezaie A. R. Kinetics of factor Xa inhibition by recombinant tick anticoagulant peptide: both active site and exosite interactions are required for a slow- and tight-binding inhibition mechanism // Biochemistry. – 2004. – V. 43. – P. 3368–3375.
10. Ribeiro J. M., Francischetti I. M. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and postsialome perspectives // Annu. Rev. Entomol. – 2003. – V. 48. – P. 73–88.

11. Sanders K. M. Signal Transduction in Smooth Muscle: Mechanisms of calcium handling in smooth muscles // *J. Appl. Physiol.* – 2001. – V. 91. – P. 1438–1449.
12. Veltkamp J. J. Thrombin time. In: Hemker H. C., Loeliger E. A., Veltkamp J. J., editors. *Human blood coagulation* // New York: Leiden Univ. Press., 1969.
13. Waxman L. Tick anticoagulant peptide (TAP) is a novel inhibitor of blood coagulation factor Xa // *Science*. – 1990. – V. 248. – P. 593–596.
14. Waxman L., Connolly T. M. Isolation of an inhibitor selective for collagen-stimulated platelet aggregation from the soft tick *Ornithodoros moubata* // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V. 268. – P. 5445–5449.

References

1. Alekseev A. N. Sistema klesh – vozbuditel" i ee emerzhentnyye svoystva [Parasitic System «Tick-Causative Agent» and its emergent properties]. – St-Petersburg, 1993.
2. Balashov Yu. S. Parazito-hozyainnye otnosheniya chlenistonogih s nazemnymi pozvonochnymi [Relationship host-parasite between arthropods and terrestrial vertebrates]. – Leningrad: Nauka, 1982.
3. Andrade B. B., Teixeira C. R., Barral A., Barral-Netto M. Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood // *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 2005. – V. 77, No 4. – P. 665–693.
4. Bowman A. S. Tick salivary prostaglandins: Presence, origin and significance // *Parasitology*. – 1996. – V. 12. – P. 388–396.
5. Corral-Rodríguez M. A. Tick-derived Kunitz-type inhibitors as antihemostatic factors // *Insect Biochem. Mol. Biol.* – 2009. – V. 39, No 9. – P. 579–595.
6. Cribbs L. L. Vascular Smooth Muscle Calcium // Channels. Could T be a target. *Circ. Res.* – 2001. – V. 89. – P. 560–567.
7. Fry B. G., Roelants K., Champagne D. E. et al. The Toxicogenomic multiverse: Convergent recruitment of proteins into animal venoms // *An. Rev. Genom. Human Gen.* – 2009. – V. 10. – P. 483–511.
8. Fukumoto S., Sakaguchi T., You M., Xuan X., Fujisaki K. Tick troponin I-like molecule is a potent inhibitor for angiogenesis // *Microvasc. Res.* – 2006. – V. 71. – P. 218–221.
9. Rezaie A. R. Kinetics of factor Xa inhibition by recombinant tick anticoagulant peptide: both active site and exosite interactions are required for a slow- and tight-binding inhibition mechanism // *Biochemistry*. – 2004. – V. 43. – P. 3368–3375.
10. Ribeiro J. M., Francischetti I. M. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and postsialome perspectives // *Annu. Rev. Entomol.* – 2003. – V. 48. – P. 73–88.
11. Sanders K. M. Signal Transduction in Smooth Muscle: Mechanisms of calcium handling in smooth muscles // *J. Appl. Physiol.* – 2001. – V. 91. – P. 1438–1449.
12. Veltkamp J. J. Thrombin time. In: Hemker H. C., Loeliger E. A., Veltkamp J. J., editors. *Human blood coagulation* // New York: Leiden Univ. Press., 1969.
13. Waxman L. Tick anticoagulant peptide (TAP) is a novel inhibitor of blood coagulation factor Xa // *Science*. – 1990. – V. 248. – P. 593–596.
14. Waxman L., Connolly T. M. Isolation of an inhibitor selective for collagen-stimulated platelet aggregation from the soft tick *Ornithodoros moubata* // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V. 268. – P. 5445–5449.

**ON PHYSIOLOGICAL MECHANISM OF SALIVARY SECRETION IN TICKS ARGAS
PERSICUS OKEN, 1818 (ARGASIDAE, ARGAS)**

Mirzayeva A. U.¹, Akramova F.D.¹, Hushmatov S. Sh.²

¹ The Institute of Gene Pool of Plants and Animals world of Uzbekistan Academy of Sciences, 100053 Uzbekistan, Tashkent, 232 Bogishamol st.,
email: mirzaieva_a.u@mail.ru

² Scientific Institute of Bioorganic Chemistry named after A.S. Sadykov, Academy of Sciences of Republic Uzbekistan, 100170 Tashkent, 83. Mirzo Ulugbek st.

Abstract

The anticoagulant effect of salivary secretion of ticks *Argas persicus* was studied. The experiments were conducted on aorta preparations isolated from the chest of white outbred rats. Isometric contraction in an isolated muscle preparation was registered by mechanotron. To determine the anticoagulant mechanism of blood plasma at deficiency of factors X, XI, IX and VIII we used the activated partial thromboplastin time. It was determined that the process of blood coagulation in rats slows down. The coagulation values depend on the concentration of tested secretions. It was found that at concentration 150 mkg /ml, the blood coagulation rate fell to 78,4 %. The role of calcium ions in regulation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) contraction was determined. The components of salivary glands *A. Persicus* have a relaxation effect on the contraction of rat aortic ring preparation.

Keywords: ticks, *Argas persicus*, salivary glands, anticoagulant, blood system, biologically active compounds.

© 2015 The Authors. Published by All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants named after K.I. Skryabin. This is an open access article under the Agreement of 02.07.2014 (Russian Science Citation Index (RSCI) http://elibrary.ru/projects/citation/cit_index.asp) and the Agreement of 12.06.2014 (CABI.org / Human Sciences section: <http://www.cabi.org/Uploads/CABI/publishing/fulltext-products/cabi-fulltext-material-from-journals-by-subject-area.pdf>)