УДК: 61.616

ДЕЙСТВИЕ СЛЮНЫ КЛЕЩЕЙ НА ОБЪЕМ И ДЛИТЕЛЬНОСТЬ КРОВОТЕЧЕНИЯ В УСЛОВИЯХ IN VIVO У КРЫС

Одилова Ш., Галиева З.И.

KALAMUSHLARDA IN VIVO SHAROITIDA KANALAR SO‘LAGINING QON KETISH HAJMI VA DAVOMIYLIGIGA TA’SIRI

Odilova Sh., Galiyeva Z.I.

THE EFFECT OF TICK SALIVA ON BLEEDING VOLUME AND DURATION IN VIVO RATS

Odilova Sh., Galieva Z.I.

Ташкентский государственный медицинский университет

Maqsad: *iksod kanalari so‘lagining antikoagulyant ta’sirini in vitro sharoitida baholash.* **Material va usullar:** *tajriba uchun dastlabki vazni 130-140 g bo‘lgan 36 ta jinsiy voyaga yetgan zotsiz oq erkak kalamushlardan foydalanildi, dala sharoitida so‘lak yig‘ildi, quritildi va 80, 60, 40 va 20% fiziologik eritmada suspenziya tayyorlandi. Preparatlar qorin bo‘shlig‘iga har bir konsentratsiyada 50 va 25 mg/kg dan tajriba boshlanishidan 60 daqiqa oldin yuborildi. Intakt hayvonlarga fiziologik eritma 5 ml/kg hajmda berildi. Har bir tajriba nuqtasi uchun 4 tadan hayvonlar olindi.* **Natijalar:** *qon ketish vaqti qon tomirlarining elastikligini va ularning shikastlanish paytida qisqarish qobiliyatini, shuningdek, trombotsitlar tizimining holatini (adgeziya va agregatsiya qobiliyati) tavsiflaydi. U trombotsitopeniyalar, trombotsitopatiyalar, tomir devorining buzilishi yoki ushbu omillarning kombinatsiyasi tufayli birlamchi gemostazning buzilishini aks ettiradi. Ko‘rinib turibdiki, kanalar so‘lagining kichik konsentratsiyalari qo‘llanilganda qon ketish vaqtining uzayishi kalamushlarning aylanib yuruvchi qoniga ham tomir devoriga, ham birlamchi gemostaz ko‘rsatkichlariga ta’sir qiluvchi antikoagulyantlarning kirishini ko‘rsatadi. Kanalar so‘lagining yuqori konsentratsiyasini kiritish xo‘jayinning birlamchi gemostazini faollashtirishga yordam beradi, buning tasdig‘i sifatida oqib chiqqan qon massasining kamayishini ko‘rsatish mumkin.* **Xulosalar:** *kana so‘lagining o‘ziga xos xususiyatlari uni farmakologik birikmalar olishning potensial manbai sifatida ko‘rib chiqish imkonini beradi.*

Kalit so’zlar: *iksod kanalari, tajriba, kalamushlar, qon ketishi.*

Objective: *To evaluate the anticoagulant effect of ixodid tick saliva in vitro.* **Materials and methods:** *Thirty-six mature, outbred, white male rats weighing 130-140 g were used in the experiment. Saliva was collected in the field, dried, and suspended in saline at 80, 60, 40, and 20% concentrations. The drugs were administered intraperitoneally at 50 and 25 mg/kg of each concentration 60 minutes before the experiment. Intact animals received 5 ml/kg of saline. Four animals were used for each experimental point.* **Results:** *Bleeding time characterizes the elasticity of blood vessels and their ability to contract during injury, as well as the state of the platelet system (adhesion and aggregation capacity). It reflects a disruption of primary hemostasis due to thrombocytopenia, thrombocytopathy, vascular wall damage, or a combination of these factors. Apparently, the prolongation of bleeding time with low concentrations of tick saliva indicates the introduction of anticoagulants into the rats’ circulating blood, affecting both the vascular wall and primary hemostasis parameters. Administration of higher concentrations of tick saliva promotes activation of primary host hemostasis, as evidenced by a decrease in the volume of blood lost.* **Conclusions:** *The unique properties of tick saliva make it a potential source for pharmacological compounds.*

Key words: *Ixodid ticks, experiment, rats, bleeding.*

Ixodes scapularis (иксодовые клещи) широко распространены в Узбекистане, особенно в южных его регионах [2]. Они являются облигатными гематофагами, переносчиками различных патогенов. В их слюне имеется широкий набор белков и пептидов, обладающих антикоагулянтным действием. В отличие от других насекомых, иксодовые клещи – долгожители, обладающие высоким репродуктивным потенциалом, широким спектром хозяев и способностью впитывать большое количество крови на протяжении относительно длительного времени. При этом передача позвоночному инфекционного агента происходит через слюну, вырабатываемую слюнными железами [3]. Слюнная железа клеща является важным местом для поглощения и размножения вируса, а сложные компоненты слюнной железы играют ключевую роль в передаче вируса. Во время кормления клещи вводят слюну в организм хозяина и поочерёдно впитывают свою пищу через один и тот же канал. Они кормятся в бассейнах, выливая всю жидкость, выделяющуюся в геморрагический бассейн, образованный при укусе. Инфекционные агенты они поглощают во время питания на заражённых хозяевах. Поступившие из средней кишки клещей агенты проходят через пищеварительный эпителий и проникают в гемокоэль, оттуда в эпителий слюнных желез и передаются новому хозяину через слюну, входящую во время нового приема крови [6].

Слюна клещей содержит богатый коктейль из биоактивных молекул, включая производные белков и липидов с высокой связывающей способностью, авидностью и селективностью в отношении своих мишеней в различных системах защиты хозяина. Слюна состоит из воды, ионов (Na, K, Mg, Ca), антимикробных пептидов, небелковых компонентов (гликолипиды, гликопротеины, простагландины, мРНК), белков (Salp15, серпины, ихостатины, цистатины, дефензины, липокалины, металлопротеиназы, глицинсодержащие белки, апиразы), экстрацеллюлярные везикулы (везикулы, внутри содержащие micPHK, РНК, пептиды и белки EVs), неизвестные молекулы хозяина и клеща [4,5].

Среди членистоногих, питающихся кровью, иксодовые клещи уникальны длительностью прикрепления к хозяину, которая в зависимости от стадии жизни и вида клещей варьирует от нескольких дней до недель. При прикреплении к хозяину ротовые части большинства иксодовых клещей окружены цементным конусом, что позволяет клещам прочно закрепляться в коже хозяина и одновременно защищает ротовые органы от иммунной системы хозяина.

Слюна клеща богата антиагрегантными и антикоагулянтными белками, обеспечивающими не-

прерывный кровоток. Протеомные исследования слюны клещей показали наличие физиологически активных вазодилататоров, антикоагулянтов и антиагрегантов. В частности, для противодействия вазоконстрикторам, полученным от хозяина, клещи выделяют вазодилататоры простациклин и простагландины, гистамин (tHRF) и ингибитор серинпротеиназы (serpin) IRS-2, изменяющие сосудистую проницаемость. В них содержатся белки Salp14 и Iris. Salp14, белок 28 кДа, которые ингибирует фактор Ха и превращение протромбина в тромбин. Iris, ингибитор эластазы, блокирует внутренний путь коагуляции и агрегацию тромбоцитов. Иммуномодулирующий белок Salp15 блокирует функцию дендритных клеток, связываясь с лектиновым рецептором DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular адгезивная молекула-3-grabbing non-integrin).

Это связывание изменяет секрецию цитокинов дендритными клетками. Кроме того, Salp15 связывается с гликопротеином CD4 на CD4+ Т-хелперах, ингибируя сигнальные пути Т-клеточных рецепторов. Iris снижает продукцию и секрецию провоспалительных ИЛ-6 и ФНО-α макрофагами и влияет на пролиферацию Т-клеток. Наряду с этим Iris является серпином с антикоагулянтными, антигемостатическими и иммуномодулирующими свойствами. Ингибитор адгезии клещей нарушает процесс адгезии тромбоцитов к растворимому коллагену и их последующей активации и агрегации. Наряду с этим слюнная апираза (аденозинтрифосфат (АТФ)-дифосфогидролаза) участвует в расщеплении АДФ, PGI2 или PGF2á, повышает cAMP, являющийся внутриклеточным ингибитором агрегации тромбоцитов, мубатин и липокалин поглощают тромбоксан А2, подавляя агрегацию тромбоцитов, индуцированную коллагеном.

Дезинтегриноподобные пептиды савинигрин, моногрин, вариабилин и иксодегрины распознают интегрин RGD и препятствуют связыванию других лигандов с тромбоцитарным рецептором. Дезагрегация агрегатов тромбоцитов хозяина клещи может осуществляться путём смещения фибриногена с рецептора посредством конкурентного связывания (савинигрин), либо фибринолизом. Вышеперечисленные соединения слюнных желез клешей подавляют первичный сосудосто-тромбоцитарный гемостаз.

В последние годы проводится изучение состава и структуры белков слюны клещей в качестве фармакологического сырья для получения биологически активных веществ с антикоагулянтным и иммуномодулирующими свойствами.

Цель исследования

Оценка в условиях in vitro антикоагулянтного эффекта слюны иксодовых клещей.

Материал и методы

Слюну собирали в полевых условиях, высушивали и готовили суспензию 80, 60, 40 и 20% в физиологическом растворе. Для эксперимента использованы 36 половозрелых беспородных белых крыс-самцов с исходной массой 130-140 г. Препараты вводили внутрибрюшинно в каждой концентрации по 50 и 25 мг/кг за 60 минут до начала опыта [1]. Интактные животные получали физиологический раствор в объеме 5 мл/кг. Для каждой экспериментальной точки брали по 4 животных. Эксперименты проводили в термостате с открытой дверцей при 30ºС в течение одного часа. Объем потери крови и продолжительность кровотечения определяли общепринятым методом путем нанесения надрезов хвоста длиной 10-12 мм. Надрезанные участки покрывали фильтровальной бумагой, подтекающая кровь равномерно распределялась по ней. По истечении времени фильтровальную бумагу высушивали и определяли объем кровотечения, время кровотечения фиксировали секундомером. Цифровой материал обработан методом вариационной статистики.

Результаты

Исследования показали, что у крыс контрольной группы продолжительность кровотечения и объем крови составили соответственно 72,0±7,1 секунды и 58,0±5,6 мг. У животных, получавших 80% раствор слюны в дозе 25 мг/кг, время кровопотери существенно не изменилось, а объем потерянной крови возрос до 73,0±7,1 мг ($p<0,05$). При использовании 2 раза большей концентрации (50 мг/кг) наблюдалось достоверное уменьшение времени кровотечения до 50,0±4,8 секунды и объема вытекшей крови до 44,5±4,2 мг. При использовании 60% раствора слюны в дозе 25 мг/кг продолжительность кровотечения имела лишь тенденцию к удлинению (78,5±7,7 с), тогда как масса вытекшей крови возросла приблизительно в 2 раза и составила 213,0±20,0 мг. В то же время при использовании дозы 50 мг/кг длительность кровотечения увеличилась до 107,5±10,6 секунды, при этом отмечалась тенденцию к уменьшению объема вытекшей крови (48,5±4,5 мг). При введении крысам 40% раствора слюны клещей в дозе 25 мг/кг время кровотечения удлинилась до 134,0±13,2 секунды, а объем вытекшей крови увеличился до 1083,5±100,62 мг. При введении этой же концентрации в дозе 50 мг/кг отмечалась лишь тенденция к удлинению времени кровотечения до 88,0±8,6 секунды и достоверное увеличение объема вылившейся крови до 119,5±11,8 мг. Наилучшие результаты наблюдались при использовании 20% раствора слюны. Так, в дозе 25 и 50 мг/кг длительность кровотечения удлинилась соответственно до 151,0±15,2 и 165,0±15,9 секунды, а объем вытекшей крови увеличился до 1685,0±164,8 и 1885,5±188,6 мг.

Следует отметить, что время кровотечения характеризует эластичность кровеносных сосудов и их способность к сокращению при травме, а также состояние тромбоцитарной системы (способность к адгезии и агрегации). Оно отражает нарушение первичного гемостаза вследствие тромбоцитопений, тромбоцитопатий, нарушения сосудистой стенки или сочетания этих факторов. Видимо, удлинение времени кровотечения при применении малых концентраций слюны клещей свидетельствует о поступлении в циркулирующую кровь крыс антикоагулянтов, влияющих как на сосудистую стенку, так и на показатели первичного гемостаза. Введение более высоких концентраций слюны клещей способствуют активизации первичного гемостаза хозя-

ина, подтверждением чему является уменьшение массы вытекшей крови.

Согласно данным литературы, клещи выделяют вазодилататоры простациклин и простагландины, гистамин (tHRF) и ингибитор серинпротеиназы (serpin) IRS-2, изменяющие сосудистую проницаемость. Наряду с этим в слюне присутствуют слюнная апираза, мубатин и липокалин. Указанные соединения слюнных желез клешей подавляют первичный сосудосто-тромбоцитарный гемостаз.

Выводы

1. В результате эволюции клещи разработали уникальный аппарат, позволяющий ослабить защиту хозяина и облегчить кровоток для обеспечения достаточного питания.

2. Уникальные свойства слюны клещей позволяют рассматривать ее как потенциальный источник получения фармакологических соединений.

Литература

1. Хабриев РУ и др. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М 2005.
2. Мирзаева АУ и др. Видовое разнообразие клещей семейства Ixodidae (Acari: Parasitiformes) – переносчиков трансмиссивных заболеваний сельскохозяйственных животных и человека Сырдарьинской области. Путь науки.2021;6(88):35-38.
3. Леонович СА. Строение органа Галлера и систематика иксодовых клещей подсемейства Ixodinae (семейство Ixodidae). Паразитология.2020;54(6):470-490.
4. Cicculli V, Capai L, Quilichini Y et al. Molecular investigation of tick-borne pathogens in ixodid ticks infesting domestic animals (cattle and sheep) and small rodents (black rats) of Corsica, France. Ticks Tick Borne Dis.2019 10(3):606-13. doi: 10.1016/j.ttbdis.2019.02.007. Epub 2019 Feb 13. PMID: 30777731.
5. Šimo L, Koči J, Žitňan D, Park Y. Evidence for D1 dopamine receptor activation by a paracrine signal of dopamine in tick salivary glands // PloS One.2011;6:e16158. doi: 10.1371/journal.pone.0016158
6. Suppan J, Engel B, Marchetti-Deschmann M, Nurnberger S. Tick Attachment Cement - Reviewing the Mysteries of a Biological Skin Plug System. Biol. Rev. Camb Philos. Soc.2018;93.1056-76. doi: 10.1111/brv.12384

ДЕЙСТВИЕ СЛЮНЫ КЛЕЩЕЙ НА ОБЪЕМ И ДЛИТЕЛЬНОСТЬ КРОВОТЕЧЕНИЯ В УСЛОВИЯХ IN VIVO У КРЫС

Одилова Ш., Галиева З.И.

Цель: *оценка в условиях in vitro антикоагулянтного эффекта слюны иксодовых клещей.* ***Материал и методы:*** *для эксперимента использованы 36 половозрелых беспородных белых крыс-самцов с исходной массой 130-140 г. слюну собирали в полевых условиях, высушивали и готовили суспензию 80, 60, 40 и 20% в физиологическом растворе. Препараты вводили внутрибрюшинно в каждой концентрации по 50 и 25 мг/кг за 60 минут до начала опыта. Интактные животные получали физиологический раствор в объеме 5 мл/кг. Для каждой экспериментальной точки брали по 4 животных.* ***Результаты:*** *время кровотечения характеризует эластичность кровеносных сосудов и их способность к сокращению при травме, а также состояние тромбоцитарной системы (способность к адгезии и агрегации). Оно отражает нарушение первичного гемостаза вследствие тромбоцитопений, тромбоцитопатий, нарушения сосудистой стенки или сочетания этих факторов. Видимо, удлинение времени кровотечения при применении малых концентраций слюны клещей свидетельствует о поступлении в циркулирующую кровь крыс антикоагулянтов, влияющих как на сосудистую стенку, так и на показатели первичного гемостаза. Введение более высоких концентраций слюны клещей способствуют активизации первичного гемостаза хозяина, подтверждением чему является уменьшение массы вытекшей крови.* ***Выводы:*** *уникальные свойства слюны клещей позволяют рассматривать ее как потенциальный источник получения фармакологических соединений.*

Ключевые слова: *иксодовые клещи, эксперимент, крысы, кровотечение.*

Сведения об авторах

Одилова Шахноза Хайруллоевна, асс. каф. медицинской и биологической химии ТГМУ. Тел: +998915888881, e-mail: shaxnoza.odilova.so83@gmail.com, https://orcid.org/0009-0004-3246-136X

Галиева Зульфия Ибрахимовна, ст. преп. каф. медицинской медицинской и биологической химии ТГМУ. Тел: +998901884659, e-mail: zulfiagalieva76@gmail.com, https://orcid.org/0009-0003-0975-0692