

БИОХИМИЧНИ И ХЕМОКОАГУЛАНТНИ ПРОУЧВАНИЯ НА ЕКСТРАКТИ ОТ СЛЮНЧЕНИ ЖЛЕЗИ НА *IXODES RICINUS* И *RHIPICEPHALUS BURSA* (СЕМ. *IXODIDAE*) В РАЙОНА НА ГР. ПЛОВДИВ

Атанас Д. Арнаудов

*Пловдивски университет “П. Хилендарски”, Факултет по биология,
катедра “Анатомия и физиология на човека”,
ул. “Цар Асен” 24, Пловдив 4000*

ABSTRACT

The present article provides information about the protein content, activity of esterases and anticoagulant properties of the salivary gland extracts (SGEs) of the ixodid ticks *Ixodes ricinus* and *Rhipicephalus bursa*, inhabiting the vicinity of Plovdiv.

Partial similarity between the proteins in SGE from these species has been found. Analysing the results for the esterase activity of the tissue extracts of the both species can be assumed that *Ixodes ricinus* is less resistant towards chemical and biological xenogenic influences, in view of the fact that it possesses only one esterase fraction with low intensity.

SGEs from both tick species possess high anticoagulant activity – their injecting to Wistar rats induces prolongation of the bleeding time and the prothrombin time.

We came to the conclusion that the inhibition of the host prothrombin activity is the main mechanism of the anticoagulant action of the SGEs of the *Ixodes ricinus* and *Rhipicephalus bursa*.

key words: *Ixodidae*, salivary glands extracts, proteins, esterases, bleeding time, prothrombin time.

ВЪВЕДЕНИЕ

Кръвосъсирването е основен защитен механизъм на гръбначните животни срещу кръвозагуба, при което се активира каскадна ензимна реакция, водеща в крайна сметка до пълно или частично компенсирание на съдовия дефект. За да улесняват процеса на кръвосмучене, много безгръбначни хемофаги в хода на еволюционното си развитие са придобили способността да подтискат основни

защитни механизми на топлокръвните (кръвосъсирване, възпалителна реакция и имунен отговор) (Riberiro et al., 1985, Markwardt, 1994, 1996, Hannier et al., 2003). Също така, паразитните безгръбначни са развили висока резистентност към химични и биологични въздействия (Brogdon et Mc Allister, 1998).

Досегашните проучвания на взаимодействието между кръвосмучещи насекоми от тип *Artropoda* и топлокръвни касаят предимно екологични и епидемиологични аспекти. Сравнително по-малобройни и по-нови са изследванията върху механизмите на хемоантикоагулантното действие на кръвосмучещите кърлежи. Антихемокоагулантните свойства на слюнката на кърлежи от сем. *Ixodidae* се проучват сравнително от скоро (Hoffmann et al. 1991, Limo et al. 1991, Motoyashiki et al., 2003). С помощта на електрофоретични и хроматографски методи са диференцирани нискомолекулни субстанции с белтъчна природа, носители на рзлични инхибиращи активности (Markwardt, 1994, 1996, Ganapamo et al. 1997, Hasimhan et al. 2002, Iwanaga et al. 2003, Da Yu, 2006).

Подобни проучвания у нас досега не са извършвани. Този факт, както и важната роля на видовете от сем. *Ixodidae*, като вектори на различни трансмисивни заболявания по домашните животни и човека ни насочиха към извършване на настоящото проучване. Негова цел е да се получат данни за биохимичната природа (свързани с резистентността към действие на химични ксенобиотици и потенциална инхибиторна активност) и механизмите на антихемокоагулационното действие на слюнката на видове кърлежи от сем. *Ixodidae*, обитаващи района на гр. Пловдив.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Събиране на екземпляри кърлежи и определяне на видовата им принадлежност

Събирането проведохме през първата половина на м. април (свързано с биологичните особености на кърлежите) в селища близо до гр. Пловдив (с. Избеглии и с. Първенец). Видовото определяне на събраните кърлежи извършвахме по Померанцев (1950).

Биологичния цикъл на различните видове кърлежи проследявахме при лабораторни условия. Личинки получавахме от напитки женски екземпляри, отглеждани в ексикатори при стайна температура.

Получаване на екстракти от слюнчени жлези и телесни тъкани от *Ixodes ricinus* и *Ripicephalus bursa*

Кърлежите разрязвахме на две половини – главова част (в която са разположени слюнчените жлези) и задна част, в която са разположени останалите органи.

От главовата част получавахме екстракт (*salivary gland extract*) по метод описан от Slovak et al. (2000) с незначителни изменения. Главовите части на кърлежите смесвахме във фосфатно-солев буфер (ФСБ) с рН 7.2 в ледена баня. Получената суспензия промивахме трикратно с ФСБ, хомогенизирахме и центрофугирахме на 800 g за 45 min. Получената надутаечна течност

събирахме и съхранявахме на -18° C. По подобен начин получавахме и тъканни екстракти от задната част на тялото на кърлежите.

Пречистване на екстрактите

Получените екстракти подлагаме на допълнително пречистване от баластни вещества, за което използвахме микрофилтрация с мембранни филтри *Milipore* с пропускливост $0.22 \mu\text{m}$.

Изследване на свойствата на получените екстракти

А. Определяне на белтъчните фракции в екстрактите

Белтъчните фракции на екстрактите от главовата част (*salivary gland extracts*) определяхме чрез електрофореза в полиакридамиден гел (7.5% –на концентрация) по първа система на Маурер, с някои модификации по Иванова (1996). Проявяването на разтворимите белтъци извършвахме чрез заливане на плаките с 14 %-на трихлороцетна киселина, в която прибавяхме малко количество кумаси брилянтво синьо R 250. След 2 дни поставяхме плаките в 7%-на оцетна киселина за съхранение.

Б. Изследване на екстрактите за наличие на естеразна активност

Наличието на естеразна активност определяхме в тъканни екстракти, получени от задната част на екземплярите. Екстрактите подлагаме на електрофоретично разделяне в полиакриламиден гел по метод на Корочкин, описан от Иванова (1996).

В. Влияние върху показателите на кръвосъсирването

На модел бели лабораторни плъхове 6 бр., порода Wistar (три мъжки и три женски) с тегло 200–250 g определяхме показателите на кръвосъсирването (описани по-долу) преди третиране с екстракта, както и 30 min след третирането. Получените стойности сравнявахме като използвахме методики на Сепетлиев (1985).

Лабораторните плъхове третирахме интравенозно при стерилни условия, съответно с $100 \mu\text{l}$ от пречистения екстракт.

1. Определяне времето на кръвене

За определянето му използвахме метода на Dúke (по Ибришимов и Лалов, 1984) с незначителна модификация. Предвид по-бъзопротичащата хемокоагулация при плъховете, течащата кръв попивахме на 15, вместо на 30 s.

2. Определяне на протромбиновото (тромбопластиновото) време и протромбиновия индекс.

Използвахме микрометода на Енев (1977). Тромбопластиновия реактив приготвяхме *ex tempore* като смесвахме 1 част противобясна ваксина, 8 части физиологичен разтвор и 1 част 0.025 M разтвор на CaCl_2 . На плота на микротермостат с работна температура 37°C накапвахме $20 \mu\text{l}$ реактив. След 5 s към него прибавяхме същото количество периферна кръв от опитните животни. Двете течности смесвахме и растилахме върху плота с тънък писец. Времето (в s), необходимо за образуване на първата фибринова нишка определяхме като протромбиновото време. Протромбиновия индекс изчислявахме по формулата:

$$\text{протромбинов индекс} = \frac{\text{протромбиново време преди третирането } (\bar{x})}{\text{протромбиново време след третирането } (\bar{x})} \times 100, \text{ в } \%$$

като референтните стойности са 70–110%.

3. Влияние на екстракта върху синтеза на протромбин в черния дроб

Предвид повлияването на екстрактите върху протромбиновата активност, си поставихме за цел да определим начина на действие на екстракта върху нея – т. е. дали се касае за блокиране на синтеза на протромбина в черния дроб, или за препятстване образуването на тромбопластин. За целта извършихме и функционална проба на черния дроб (позитивираща се при чернодробни увреждания)

Функционалното състояние на черния дроб определяхме с помощта на тимоловата проба на Mac Lagan (модификация на Ибришимов и Лалов, 1984) – реакцията отчитаме на 24-тия час по степента на флокуляция, а не фотометрично на ½ – 3 час. По този начин беше избягната възможността за получаване на фалшиво-положителни резултати при евентуална липемия.

РЕЗУЛТАТИ

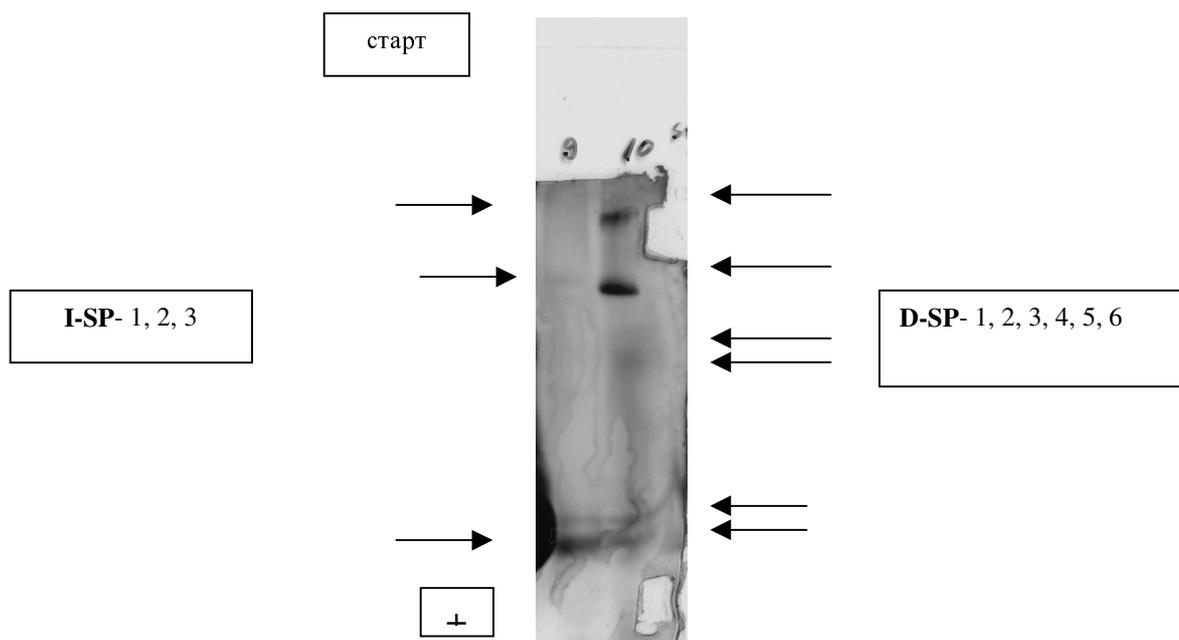
Видов състав на събраните кърлежи от сем. *Ixodidae*

От събраните екземпляри, най-висок процент бяха видовете *Rhipicephalus bursa* (58%), *Hyalomma plumbeum* (17%) и *Ixodes ricinus* (17%).

Белтъчно съдържание на екстракти от слюнчените жлези

В електрофоретичния спектър на протеините в екстрактите (след микрофилтрация) от *Ixodes ricinus* се извяват 3 фракции, които ние обозначихме в зависимост от електрофоретичната им подвижност от фронта към старта, съответно като I-SP1, I-SP2 и I-SP3. Най-интензивна е фракцията I-SP1 (фиг. 1).

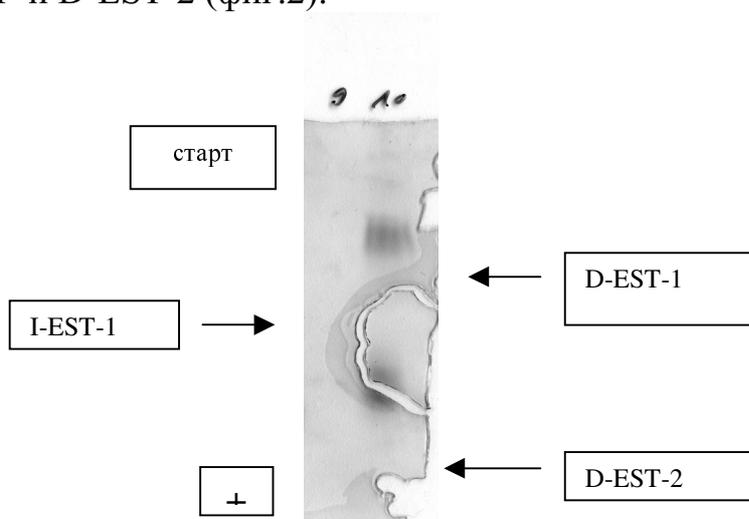
В електрофоретичния спектър на протеините в екстрактите (след микрофилтрация) от *Rhipicephalus bursa* се извяват общо 6 фракции, обозначени съответно D-SP-1, D-SP-2, D-SP-3, D-SP-4, D-SP-5 и D-SP-6 (фиг.1). Фракциите I-SP-1 и I-SP-2 от *Ixodes ricinus* са алагогични както по подвижност, така и по интензивност на изява с D-SP-1, D-SP-2 (фиг.1). Сходство би могло да се търси също между I-SP3 и D-SP-5, тъй като електрофоретичната им подвижност е много близка. За разлика от I-SP3, обаче, D-SP-5 е много по-интензивно и отчетливо изявена.



Фиг. 1. Спектър на разтворимите протеини в полиакриламиден гел при екстракти от слюнчени жлези на *Ixodes ricinus* (проба №9) и *Ripicephalus bursa* (проба №10), подложени на микрофилтрация. Номерацията на фракциите е в низходящ ред от старта.

Естеразна активност на тъканни екстракти на *Ixodes ricinus* и *Ripicephalus bursa*

В спектъра на неспецифичните естерази при тъканни екстракти от *Ixodes ricinus* се изяви само една фракция с такава активност – I-EST-1, която бе със слаба интензивност и отчетливост. При екстракта от *Ripicephalus bursa* е отчетлива изявата на 2 фракции със сходна интензивност на изява (означени като D-EST-1 и D-EST-2 (фиг.2)).



Фиг. 2. Спектър на неспецифичните естерази полиакриламиден гел при тъканни екстракти от *Ixodes ricinus* (проба №9) и *Ripicephalus bursa* (проба №10).

Влияние на екстракти от слюнчените жлези на *Ixodes ricinus* и *Rhipicephalus bursa* върху показателите на кръвосъсирването

Време на кръвене

Получените резултати са дадени на таблица 1.

Таблица 1. Време на кръвене, определено при третиране на лабораторни пълхове с екстракти от слюнчени жлези на кърлежи от сем. *Ixodidae*

време	екстракт от <i>Ixodes ricinus</i>	екстракт от <i>Rh. bursa</i>
преди третиране	51.3 \pm 5.3	50.0 \pm 3.2
след 30 мин.	65.0 \pm 4.5	62.5 \pm 5.2
след 96 часа	51.6 \pm 6.8	50.8 \pm 3.8

Третирането на опитните животни с екстракт от слюнчени жлези на *Ixodes ricinus* и *Rhipicephalus bursa* води до достоверно увеличаване времето на кръвене на 30-та min. На 96-тия час стойностите бяха много близки до тези преди третирането, а разликите между тях – недостоверни.

Протромбиново време

Третирането на опитните животни с екстракт от слюнчени жлези на *Ixodes ricinus* и *Rhipicephalus bursa* води и до удължаване на протромбиновото време на 30-та min след третирането с екстракта – таблица 2. На 96-тия час стойностите на тромбопластиновото време е близко до измереното преди третирането. Получените стойности, представени като протромбинов показател, показват че на 30 min има ясно изразена инхибиция на тромбопластиновата активност - 43.6 при третиране със слюнчен екстракт от *Ixodes ricinus* и 41.6 при третиране със слюнчен екстракт от *Rhipicephalus bursa* (резултат под 70 % е указание за удължаване на тромбопластиновото време). На 96-тия час разликите с отчетения показател преди третирането са в границите на нормата – 91.9% (референтни стойности 70–110%).

Таблица 2. Протромбинов индекс, определен при третиране на лабораторни пълхове с екстракти от слюнчени жлези на кърлежи от сем. *Ixodidae*

Протромбинов индекс (%)	преди третиране	30 min след третирането	96 h след третирането
екстракт от <i>Ixodes ricinus</i>	100	43.6	91.9
екстракт от <i>Rh. bursa</i>	100	41.6	96.9

Влияние на екстрактите върху синтеза на протромбин в черния дроб

На 30 min след третирането, функционалната проба показва положителен резултат при 2 от изследваните проби с екстракт от слюнчени жлези на *Ixodes ricinus* и при 3 от изследваните проби на пълхове третирани с екстракт от слюнчени жлези на *Rhipicephalus bursa*. На 96-тия час всички проби бяха отрицателни.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

От анализа на получените резултати можем да направим следните важни заключения и изводи:

1. Екстрактите на слюнчените жлези на *Ixodes ricinus* събирани в района около гр. Пловдив, съдържат три средно подвижни белтъчни фракции, а екстрактите на слюнчените жлези на *Rhipicephalus bursa* – 6 фракции. Установени са известни аналогии при фракции I-SP-1 и I-SP-2 с D-SP-1, D-SP-2 и частично между I-SP3 и D-SP-5. Въпреки, че екстрактите бяха подложени на микрофилтрация и голяма част от баластните вещества бяха отстранени, е необходимо в бъдещи изследвания чрез използване на ултрафилтрационни техники да се получат нискомолукулни фракции, които да бъдат изследвани както за антихемокоагулационна активност, така и за определяне и на други биологични свойства (имуносупресорни и противовъзпалителни, Riberi et al., 1985, Ganapato et al., 1997). По този начин ясно ще се диференцира функционалната активност на субстанциите, съдържащи се в екстрактите. Според Markwardt (1994, 1996), субстанцията с антихемокоагулантна активност е минипротеин с м. маса 6.5 Da.

2. В тотални екстракти от кърлежи *Ixodes ricinus* от изследвания район се съдържа, макар и в минимални количества, една фракция с естеразна активност. Естеразната активност при *Ixodes ricinus* е видимо по-малка от установената при екстракти от *Rhipicephalus bursa* – 2 отчетливи фракции. Наличието на естеразна активност определя резистентността на този вид кърлежи към действието на инсектицидни препарати – органофосфорни вещества, карбамати, синтетични пиретроиди и др. Според Brogdon и McAllister (1998) увеличаването на съдържанието и повишаването на активността им предполагат една сравнително по-слаба резистентност на вида *Ixodes ricinus* към действието на различни инсектициди. Следователно, можем да заключим, че вида *Ixodes ricinus* е сравнително по-слабо резистентен към действието на различни инсектициди, в сравнение с *Rhipicephalus bursa*.

3. Третирането на опитни животни с екстракти от слюнчени жлези на *Ixodes ricinus* и *Rhipicephalus bursa* предизвиква промени в изследваните показатели на хемостазата – време на кървене и протромбиново време. Следователно, антикоагулантната активност на слюнката на изследваните видове кърлежи се реализира чрез **инхибиране превръщането на протромбина в тромбин**. Получените резултати съвпадат с изказаното предположение от Markwardt (1994, 1996), че антитхемокоагулационната активност на кърлежите от сем. *Ixodidae* се дължи на инхибиране на образуването на тромбина. Според автора, инхибирането на тромбиновия синтез се дължи на инхибиране активирането на фактор X).

Удължаването на времето на кървене и протромбиновото време, съчетано с получаване на положителни тимолови проби (указане за възможно чернодробно увреждане) не ни позволи да разграничим кои от вероятните механизми подтискат образуването на тромбин, т.е. дали се касае за нарушаване синтеза на протромбина в черния дроб или на препятстване на

трансформирането му в тромбин, чрез инхибиране образуването на тромбопластина. Това би могло да се разграничи чрез използване на морфологични и хистохимични методи за изследване на черния дроб, както и на групови методи за изследване на хемокоагулацията (определяне активността на факторите на тромбопластиновия комплекс – тромбопластин, фактори V, VII и X).

* Изследванията, публикувани в настоящата статия са финансирани по проект 05Б25 (Фонд “Научни изследвания и мобилни проекти”, ПУ “П. Хилендарски”–Пловдив).

ЛИТЕРАТУРА

- Енев Н., 1977. Хематологични анализи с капилярна кръв, DL&M ООД, София, 22 стр.
- Ибришимов Н., Хр. Лалов, 1984. Клинично–лабораторни изследвания във ветеринарната медицина, Земиздат, С., 363 стр.
- Иванова Евг., 1996. Изменчивост при *Apis mellifera* L. – онтогенетични и популационно–генетични аспекти, Дисертационен труд, Пловдивско университетско издателство, Пловдив, 159 стр.
- Померанцев Б. И., 1950. Паукообразные, Иксодовые клещи (*Ixodidae*), Фауна СССР, т. IV, 2, Изд. Акад. Наук СССР, Москва–Ленинград, 224 стр.
- Сепетлиев Д. 1985. Медицинска статистика, Медицина и физкултура, София, 110 стр.
- Brogdon W.G., J. C. McAllister, 1998. Insecticide Resistance and Vector Control, Emerging Infectious Diseases, 4, 3 (WEB–based).
- Ganapamo F., B. Rutti, and M. Brossard, 1997. Identification of an *Ixodes ricinus* salivary gland fraction through its ability to stimulate CD4 T cells present in BALB/c mice lymph nodes draining the tick fixation site, Parasitology, 115: 91–96.
- Hannier S., J. Liversidge, J. M. Stenberg, A. S. Bowman, 2003. *Ixodes ricinus* tick salivary gland extract inhibits IL-10 secretion and CD69 expression by mitogen-stimulated murine splenocytes and induces hyporesponsiveness in B lymphocytes, Parasite Immunol. 25, 1:27–37.
- Hoffmann A, P. Walsmann, G. Riesener, M. Paintz, F. Markwardt, 1991. Isolation and characterization of a thrombin inhibitor from the tick *ixodes ricinus*, Pharmazie, 46, 3: 209–212.
- Iwanaga Sh., M. Okada, H. Isawa, A. Morita, M. Yuda and Y. Chinzei, 2003. Identification and characterization of novel salivary thrombin inhibitors from the ixodidae tick, *Haemaphysalis longicornis*, Eur. J. Biochem. 270: 1926–1934.
- Limo M., W. Voigt, A. Tumbo-Oeri, R. Njogu, O. Ole-Moi Yoi, 1991. Purification and characterization of an anticoagulant from the salivary glands of the ixodid tick *Rhipicephalus appendiculatus*, Exp. Parasitol., 72, 4: 418–429.
- Markwardt F., 1994. Coagulation inhibitors from blood-sucking animals, Pharmazie, 49: 313–316.
- Markwardt F., 1996. Antithrombotic agents from hematophagous animals, Clin. Appl. Thrombosis/Hemostasis, 2, 2: 75–82.
- Motoyashiki T, A. Tu, D. Azimov, K. Ibragim., 2003. Isolation of anticoagulant from the venom of tick, *Boophilus calcaratus*, from Uzbekistan, Thromb. Res., 1, 110, 4: 235–241.

- Narasimhan S., R. Koski, B. Beaulieu, J. Anderson, N. Ramamoorthi, F. Kantor M. Cappello and E. Fikrig, 2002. A novel family of anticoagulants from the saliva of *Ixodes scapularis*, *Insect Molecular Biology*, 11, 6: 641 – 650.
- Riberiro J., G. Makoul, J. Levine, D. Robinson and A. Spielman, 1985, Antihemostatic, antiinflammatory and immunosuppressive properties of the saliva of tick *Ixodes dammini*, *J. Exp. Med.*, 161: 332–344.
- Slovak M., V. Hajnicka, M. Labuda, and N. Fuchsberger, 2000. Comparison of the protein profiles of salivary gland extracts derived from tree species of unfed and partially fed ixoid ticks analysed by SDS-FAGE, *Folia Parasitologica*, 47: 67–71.
- Tu A., Motoyashiki T., Dj. Azimov, 2005. Bioactive compounds in tick and mite venoms (saliva), *Toxin Reviews*, 24, 2: 143 – 174.
- Yu D., Z Sheng., X. Xu, J. Li, H. Yang, Zh. Liu, H. Rees, R. Lai, 2006. A novel antimicrobial peptide from salivary glands of the hard tick, *Ixodes sinensis*, *Peptides*, 27: 31–35.
- Zhu K, A. Bowman, D. Brigham, R. Essenberg, J. Dillwith, J. Sauer, 1997. Isolation and characterization of americanin, a specific inhibitor of thrombin, from the salivary glands of the lone star tick *Amblyomma americanum* (L.), *Exp. Parasitol.*, 87, 1: 30–38.

**BIOCHEMICAL AND HEMOCOAGULANT INVESTIGATIONS
ON THE SALIVARY GLANDS OF *IXODES RICINUS* AND
RHIPICEPHALUS BURSA (IXODIDAE) FROM THE PLOVDIV
REGION**

Atanas D. Arnaudov

*University of Plovdiv, Faculty of Biology, Department of “Human anatomy
and physiology”, Tzar Assen 24, 4000 Plovdiv*

(Summary)

During evolution, the hematophagous invertebrates developed a diversity of anticoagulant and inhibitor substances that are being injected into the host through their saliva. This phenomenon is crucial for successful parasitism.

The present article provides information about the protein content, activity of esterases and anticoagulant properties of the salivary gland extracts (SGEs) of the ixodid ticks *Ixodes ricinus* and *Rhipicephalus bursa*, inhabiting the vicinity of Plovdiv.

Partial similarity between the proteins in SGE from these species has been found. This confirms the affirmation of Ganapamo et al. (1997) that the inhibitor substances in the tick saliva are species specific.

Analysing the results for the esterase activity of the tissue extracts of the both species can be assumed that *Ixodes ricinus* is less resistant towards chemical and biological xenogenous influences, in view of the fact that it possesses only one esterase fraction with low intensity.

SGEs from both tick species possess high anticoagulant activity – their injecting to Wistar rats induces prolongation of the bleeding time and the prothrombin time.

We came to the conclusion that the inhibition of the host prothrombin activity is the main mechanism of the anticoagulant action of the SGEs of the *Ixodes ricinus* and *Rhipicephalus bursa*.

* The recent research is supported by Project 05B25 (Fund “Scientific investigation and mobile projects”, University of Plovdiv).