

ВЛИЯНИЕ АНТИГЕЛЬМИНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА АКТИВНОСТЬ 5'-НУКЛЕОТИДАЗЫ *Bothriocephalus scorpii* (Cestoda: Bothriocephalidae)

Э. А. БУРЕНИНА

доктор биологических наук

Биолого-почвенный институт ДВО РАН

г. Владивосток, 690022, Пр. 100-летия Владивостока, 159,

e-mail: Burenina@ibss.dvo.ru

Изучены активность и свойства 5'-нуклеотидазы в субклеточных фракциях цестоды *Bothriocephalus scorpii* с аденозинмонофосфатом, инозинмонофосфатом и цитидинмонофосфатом в качестве субстратов. Наибольшая активность обнаружена в митохондриальной фракции. Исследованы зависимости скоростей 5'-нуклеотидазной активности от концентрации субстратов и ионов Mg^{2+} . Изучено влияние различных эффекторов на активность фермента, а также одно- и двухвалентных катионов (K^+ , Na^+ , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+}). Испытано действие ряда антигельминтных препаратов на активность фермента. Наиболее эффективными препаратами являются битионол и оксинид.

Ключевые слова: 5'-нуклеотидаза, аденозинмонофосфат, инозинмонофосфат, цитидинмонофосфат, митохондрия, цестода, антигельминтик.

Пути углеводного и энергетического обменов гельминтов значительно разнообразней и богаче, чем у позвоночных – хозяев этих паразитов. Черви относятся к филогенетически очень древней группе и они, естественно, сохранили многие черты пройденного пути биохимической эволюции. Адаптация гельминтов к паразитизму сказалась на их энергетическом балансе; изменилось соотношение затрат энергии на различные жизненные функции. Распад пуриновых нуклеотидов начинается с отщепления фосфатной группы под воздействием 5'-нуклеотидазы, являющейся энзимом интегральной плазмемной мембраны большинства клеток позвоночных и беспозвоночных. Эти фосфогидролазы имеют широкую специфичность в отношении 5'-нуклеотидов и обнаружены у самых разных биологических объектов, начиная от примитивного одноклеточного до чрезвычайно сложного организованного млекопитающего. У нематод 5'-нуклеотидазы были обнаружены в кутикуле, гиподермисе, кишечном эпителии, ооцитах, эмбрионах [8, 10, 12, 14], у трематод – в тегументе, паренхиме, нервных ганглиях, репродуктивных органах, экскреторном пузыре [3, 5, 15, 16, 17], у цестод – в интегументе, сколексе, присосках, эмбриональных яйцах [6, 11, 13]. Электронно-микроскопические исследования тегумента показали, что отсутствие пищеварительного тракта у цестод сказывается на особенностях структуры тегумента, который является

«вывернутым» кишечником и осуществляет функцию пищеварения, секреции и всасывания. Присутствие ферментов в тегументе цестод указывает на его активную роль в процессе метаболизма и транспорта пищевых веществ.

Целью настоящей работы было изучение активности и свойств 5'-нуклеотидазы у *Bothriocephalus scorpii* из отряда Pseudophyllidea Carus 1863, сем. Bothriocephalidae Blanch 1849, паразитирующих в пилорических придатках бычка Брандта (*Myoxocephalus brandti*) из залива Петра Великого, а также установление возможности ингибирования активности 5'-нуклеотидаз некоторыми препаратами, обладающими антигельминтной активностью.

Материалы и методы

Ботриоцефалов собирали из живых бычков и доставляли в лабораторию в термосе в растворе Рингера при температуре 20–25 °С. В лаборатории ботриоцефалов промывали дистиллированной водой, подсушивали на фильтровальной бумаге и замораживали. Для приготовления ферментных экстрактов *B. scorpii* гомогенизировали с 10 объемами среды выделения (0,25 М сахараза, 0,05 М трис, 0,005 М ЭДТА, pH 7,4). Полученный гомогенат центрифугировали 15 мин при 1000 g и 1 °С. Надосадочную жидкость центрифугировали 30 мин при 12 000 g (цитозоль 12 000 g). Выделенные митохондрии промывали средой выделения и центрифугировали 30 мин при 12 000 g. Для получения микросомальной фракции цитозоль 12 000 g центрифугировали при 105 000 g в течение 60 мин и получали микросомы и цитозоль 105 000 g (Supra-fuge-22, угловой ротор). Концентрации субстратов, ферментного белка, ионов металла, буфера и pH были выбраны такими, которые обеспечивали наибольшую скорость реакции.

Активность 5'-нуклеотидазы (5'-рибонуклеотид-фосфогидролаза, НФ 3.1.3.5.) измеряли по освобождению неорганического фосфата. Анализируемая среда содержала (мМ): 50 Трис-НCl буфера (pH 9,0), 5 аденозин-5'-монофосфата (АМФ), инозин-5'-монофосфата (ИМФ) и цитидин-5'-монофосфата (ЦМФ), 7–10 MgCl₂ и 0,1–0,15 мг ферментного белка. Объем пробы составил 1,2 мл, в контрольные пробы перед добавлением белка вносили 0,5 мл 20 % ТХУ. Перед добавлением субстрата пробы преинкубировали в водяной бане 10 мин. После добавления субстрата пробы инкубировали 30 мин в водяной бане, реакцию останавливали добавлением 0,5 мл 20 % ТХУ и охлаждали на льду. Пробы центрифугировали 15 мин при 4 000 об./мин (настольная центрифуга МРW-340). В надосадочной жидкости измеряли содержание неорганического фосфора (Фн) по Кочетову [2]. Определение белка проводили по Лоури [7]. Константы Михаэлиса (Km) определяли графически [1]. Активность фермента выражали в нмолях Фн/мин/мг белка. Антигельминтные препараты растворяли в 96%-ном этаноле и вносили в опытную пробу в объеме 0,1 мл. Параллельно, чтобы исключить ингибирующее влияние этанола на активность фермента, ставили контроль на спирт.

Результаты и обсуждение

Активность и свойства 5'-нуклеотидазы цестод *B. scorpii* изучена впервые. Оптимум активности фермента у *B. scorpii* наблюдали при pH 9,0. По данным авторов фермент взрослых мирацидий и онкосфер *Hymenolepis diminuta* [4, 9] и трематод *Paramphistomum cervi* [17] имел оптимум pH в пределах 7,0–7,2, а в мембранах ворсинок *H. diminuta* фермент изучали при pH

7,4 и 9,6 [11]. Фермент тегумента *Schistosoma mansoni* изучали радиоактивным методом при pH 5,0–6,0, 6,9–8,0, 8,0–10,0 с разными буферными системами [3], оптимум pH для фермента 9,6–10,2. Такой разброс pH оптимумов у гельминтов обусловлен, по-видимому, особенностями фермента, а также вариабельностью условий, при которых исследовали активности.

В том случае, когда фермент обнаруживали более чем в одной фракции, его свойства в разных фракциях несколько отличались. Поэтому активность 5'-нуклеотидазы у *B. scorpii* была исследована во всех субклеточных фракциях (цитозольных, митохондриальной и микросомальной). Как видно из данных таблицы 1, наибольшую активность фермента наблюдали в митохондриях с тремя субстратами. Согласно литературным данным, фермент у других объектов изучали, в основном, гисто- и цитохимически, а у *H. diminuta* – в гомогенате 500 g и в тегументальном материале *S. mansoni* – в супернатанте 100 000 g [3, 4]. В связи с этим можно сказать, что широкое распространение 5'-нуклеотидаз в органах и тканях гельминтов свидетельствует об их важной физиологической роли.

1. Активность 5'-нуклеотидаз в субклеточных фракциях
Bothriocephalus scorpii (нмоль Фн/мин/мг белка)

Исследуемая фракция	Субстрат		
	АМФ	ИМФ	ЦМФ
Цитозоль 12 000 g	28,2±1,5 (6)	63,8±1,6 (6)	56,2±0,9 (6)
Митохондрии	829,1±19,8 (18)	296,5±5,8 (12)	481,5±10,4 (12)
Цитозоль 105 000 g	7,6±1,5 (6)	9,6±1,5 (6)	16,1±0,7 (6)
Микросомы	54,7±5,7 (12)	37,9±1,7 (12)	50,6±0,80 (12)

Скорость энзиматической реакции зависит от концентрации субстратов, которыми служат АМФ, ИМФ и ЦМФ. В отсутствие субстрата активность фермента отсутствует во всех субклеточных фракциях *B. scorpii*. Скорость 5'-нуклеотидазной реакции растет с увеличением количества добавленного субстрата, оставаясь постоянной при концентрации их в пробах 5 мМ в трех субклеточных фракциях, кроме микросомальной (4 мМ). Различные нуклеотиды гидролизировались с разной скоростью (табл.1); наибольшая активность была в реакции с АМФ. Кинетические параметры субстратов в митохондриальных фракциях *B. scorpii* составляли: K_m для АМФ – 0,816 мМ, для ИМФ – 0,769 мМ, для ЦМФ – 0,806 мМ.

5'-нуклеотидаза, работающая в щелочной среде, требует обязательного присутствия ионов Mg²⁺, образуя энзим-субстратный комплекс. Без ионов Mg²⁺ активность фермента отсутствует во всех фракциях *B. scorpii* со всеми субстратами. В реакциях с АМФ и ЦМФ концентрация ионов Mg²⁺ составляет 10 мМ, а с ИМФ – 7 мМ в митохондриальной фракции и 8 мМ – в микросомальной фракции. Изучая активность 5'-нуклеотидазы мышц *P. cervi* [17], авторы добавляли в инкубационную среду 100 мМ ионов Mg²⁺.

Для анализа свойств 5'-нуклеотидазы в митохондриях *B. scorpii* было изучено влияние различных эффекторов и катионов на активность этого фермента с разными субстратами. При изучении влияния одновалентных катионов (Na⁺ и K⁺, 100 мМ) на активность фермента, обнаружили, что фермент был активирован в реакции с субстратами АМФ и ИМФ (от 4 до 23 %) , а с ЦМФ – ингибирован (5–14 %). Наши данные согласуются с данными, полу-

ченными на мышцах *S. mansoni* [3]. Фтористый натрий (NaF, 100 мМ), являясь классическим ингибитором ферментов, ингибировал активность 5'-нуклеотидазы *B. scorpionii* со всеми субстратами, особенно в реакции с ЦМФ (68 %). При изучении фермента мембран ворсинок *H. diminuta* и влияния NaF на его активность NaF не имел эффекта [11].

Исследуя влияние двухвалентных катионов на активность 5'-нуклеотидазы *B. scorpionii*, обнаружили, что ионы Cu^{2+} (10 мМ) и Mn^{2+} (10 мМ) ингибируют фермент в реакциях с АМФ незначительно, с ИМФ – на 24 и 16 %, с ЦМФ – на 54 и 35 % соответственно. Ионы Ca^{2+} (10 мМ) и Zn^{2+} (10 мМ) в 11 и 17 раз, соответственно, активировали фермент *B. scorpionii* в реакции с АМФ, в реакции с ИМФ – в 5, а в реакции с ЦМФ – в 4,5 и 4,8 раза соответственно. Наши данные не согласуются с данными авторов [3], полученными при изучении фермента в мышцах *S. mansoni*. Ионы Ca^{2+} и Zn^{2+} играют уникальную роль в выражении активности 5'-нуклеотидазы *B. scorpionii*, действуя как аллостерические активаторы.

ЭДТА, являясь хелатирующим агентом, оказывает специфическое действие на мембранные структуры. Нами обнаружено, что ЭДТА в концентрации 10 мМ угнетает активность 5'-нуклеотидазы *B. scorpionii* в реакциях со всеми субстратами, особенно в реакции с ЦМФ (85 %). Парахлормеркурибензоат (п-ХМБ, 1 мМ), являясь ингибитором сульфгидрильных групп ферментов, активировал фермент из *B. scorpionii* со всеми субстратами: с АМФ в 2 раза по сравнению с контролем, с ИМФ – в 2,7, с ЦМФ – в 3,5 раза. Такой же эффект был получен и при изучении фермента мембран ворсинок *H. diminuta* [11].

Цистеин в концентрации 10 мМ угнетал активность 5'-нуклеотидазы *B. scorpionii* в реакции с АМФ на 90 % по сравнению с контролем; в реакции с ИМФ активировал активность в 5 раз, а в реакции с ЦМФ – в 3,5 раза. Наши данные согласуются с результатами, полученными при изучении фермента цестоды *Raillietina johri* [13]; фермент был ингибирован цистеином (2,5 мМ) в реакции с АМФ.

Молибдат аммония в концентрации 20 мМ ингибировал 5'-нуклеотидазу в митохондриях *B. scorpionii* полностью в реакциях со всеми субстратами. Такой же результат был получен и при изучении фермента цестоды *H. diminuta* [11]. Арсенат натрия в концентрации 10 мМ полностью ингибировал фермент митохондрий *B. scorpionii* в реакции с АМФ и на 61 и 62 % в реакциях с ИМФ и ЦМФ соответственно. Дитиотрейтол (ДТТ) в концентрации 1 мМ ингибировал фермент *B. scorpionii* в реакциях с АМФ (89 %) и ИМФ (83 %), а в реакции с ЦМФ активировал фермент (39 %).

Было изучено влияние ди- и трифосфатов на активность 5'-нуклеотидазы в митохондриях *B. scorpionii* с тремя субстратами. Концентрация ди- и трифосфатов, как и монофосфатов, была 5 мМ. Активность фермента с монофосфатами была взята за 100 %. При добавлении АДФ к среде с АМФ в качестве субстрата активность фермента составляла 44,1, а с АТФ – 24,3 % от контроля. Когда в качестве субстрата был ИМФ, то активность фермента при добавлении ИДФ составляла 36,3, а при добавлении ИТФ – 15,4 % от контроля; а когда ЦМФ был субстратом, то активность фермента при добавлении ЦДФ составляла 29,5 %, а при добавлении ЦТФ – 0. Таким образом, ди- и трифосфаты угнетают активность фермента с изучаемыми субстратами. Трифосфаты были более существенными ингибиторами. ЦТФ полностью ингибировал активность 5'-нуклеотидазы в митохондриях *B. scorpionii* в реакции с

ЦМФ. Данных о влиянии ди- и трифосфатов на активность этого фермента у других беспозвоночных не встречали.

Подводя итог проведенным экспериментам, можно сделать вывод, что все субклеточные фракции *B. scorpionis* обладают 5'-нуклеотидазной активностью; наибольшей активностью обладают митохондрии. Полученные результаты и литературные данные демонстрируют, что 5'-нуклеотидаза присутствует в различных мышцах и органах разных представителей беспозвоночных и аналогична свойствам фермента из позвоночных.

5'-нуклеотидаза выполняет огромную роль в клеточном обмене гельминтов, изменение активности которой под влиянием антигельминтных препаратов может привести к серьезным нарушениям в углеводном и нуклеиновом обменах гельминта. Было испытано действие ряда антигельминтных препаратов из разных групп активных соединений на активность 5'-нуклеотидазы с разными субстратами в митохондриальной фракции *B. scorpionis* (табл. 2).

2. Влияние антигельминтных препаратов на активность 5'-нуклеотидазы *Bothrioccephalus scorpionis* с различными субстратами (в % от контроля)

Антигельминтный препарат (10 ⁻⁴ М)	Субстрат		
	АМФ	ИМФ	ЦМФ
Контроль	100	100	100
Оксинид	11,7	16,9	19,3
Г-937	21,4	55,9	58,7
Г-1028	21,8	35,5	52,7
Битионол	2,6	1,4	0,9
Тиабендазол	69,4	39,7	61,0
Фенбендазол	228,7	98,0	46,0
Трихлорофен	59,4	43,0	46,0
Празиквантел	100,1	79,3	92,1
Ацемидофен	106,3	82,4	82,5
Политрем	52,7	56,1	42,2

Примечание. Все антигельминтные препараты растворены в 96%-ном спирте, в контроль добавляли 0,1 мл спирта.

Битионол (представитель бисфенолов) и оксинид (производное битионола) сильнее других антигельминтных препаратов ингибировали 5'-нуклеотидазу *B. scorpionis* в митохондриях со всеми субстратами. Препараты Г-937 и Г-1028 (представители салициланилидов) сильнее ингибировали 5'-нуклеотидазу в реакции с АМФ, чем в реакциях с ИМФ и ЦМФ. Тиабендазол сильнее ингибировал 5'-нуклеотидазу в реакции с ИМФ, политрем – в реакции с ЦМФ, а трихлорофен одинаково ингибировал фермент в реакциях с ИМФ и ЦМФ. Остальные антигельминтные препараты не имели ингибирующего эффекта. Других данных по влиянию антигельминтиков на активность 5'-нуклеотидаз не обнаружили. Анализируя данные о действии антигельминтных препаратов на 5'-нуклеотидазную активность *B. scorpionis*, можно сделать вывод, что наиболее эффективными препаратами являются битионол и оксинид.

Лумепамыпа

1. Kornish–Bouden, Je. Osnovy fermentativnoj kinetiki / Je. Kornish–Bouden. – M., 1979.
2. Kochetov, G. A. Metod opredelenija neorganicheskogo fosfora. Prakticheskoe rukovodstvo po jenzimologii / G. A. Kochetov. – M., 1980. – S. 215–216.
3. Cesari, I. M. Properties of a tegumental membrane-bound phosphohydrolase activities of *Schistosoma mansoni* / I. M. Cesari, A. J. G. Simpson, W. H. Evans // Biochem. J. – 1981. – V. 198, N 3. – P. 467–473.
4. Gaitanaki, C., Beis, J. Enzymes of adenosine metabolism in *Hymenolepis diminuta* / C. Gaitanaki, J. Beis // Int. J. Parasitol. – 1985. – V. 15, N 6. – P. 651–654.
5. Humiczewska, M. Specific and non-specific phosphatases in the miracidium of *Fasciola hepatica* L. / M. Humiczewska // Folia Histochem. Cytochem. – 1975. – V. 3–4. – P. 231–236.
6. Humiczewska, M. The activity of some phosphatases in tissues of adult *Hymenolepis nana* siebold (Cestoda) / M. Humiczewska // Folia Biol. – 1989. – V. 37, N 3–4. – P. 171–179.
7. Lowry, O. H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Bosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall // J. Biol. Chem. – 1951. – V. 193, N 1. – P. 265–275.
8. Maki, J. Acid phosphatase activity demonstrated by intact *Angyostrongylus cantonensis* with special reference to its function / J. Maki, T. Yanagisawa // Parasitol. – 1979. – V. 79, N 3. – P. 417–423.
9. Moczon, T. Histochemical studies on the enzymes of *Hymenolepis diminuta*. II. Nonspecific and specific phosphatases in oncospheres and cysticeroids / T. Moczon // Acta Parasitol. Pol. – 1973. – V. 21, N1–10. – P. 99–106.
10. Omar, M. S. Histochemical distribution of hydrolytic enzymes in adult *Onchocerca fasciata* (Filarioidea: Onchocercidae) / M. S. Omar, A. M. S. Raoof // Parasitol. Res. – 1994. – V. 80, N 3. – P. 216–222.
11. Pappas P. W. *Hymenolepis diminuta*: partial characterization of membrane-bound nucleotidase activities (ATPase and 5'-nucleotidase) in the isolated brush border membrane / P. W. Pappas // Exp. Parasitol. – 1981. – V. 51, N 2. – P. 209–219.
12. Parshad, V. R. Morphological and histochemical observation on the intestinal epithelium of *Ascaridia galli* (Nematoda: Ascaridida) / V. R. Parshad, S. S. Guraya // Parasitol. Res. – 1978. – V. 55, N 3. – P. 199–208.
13. Roy, T. K. Histochemical studies on *Raillietina (Raillietina) johri* (Cestoda: Davaineidae). I. Non-specific and specific phosphatases / T. K. Roy // J. Helminthol. – 1979. – V. 53, N 1. – P. 45–49.
14. Seniuta, R. Cytochemical studies on some phosphatases in different developmental stages of *Trichinella spiralis* (Nematoda) / R. Seniuta // Acta Parasitol. Pol. – 1975. – V. 23, N 48. – P. 593–601.
15. Sharma P. N. Histochemical studies on the distribution of alkaline phosphatase, acid phosphatase, 5'-nucleotidase and ATPase in various reproductive tissues of certain digenetic trematodes / P. N. Sharma // Zeitsch. Parasitenk. – 1976. – V. 49, N 3. – P. 223–231.
16. Sharma P. N. Histochemical localization of glycogen, lipids, proteins and phosphatases in the parenchyma other tissues of some digenetic trematodes / R. Seniuta, P. N. Sharma // Indian J. Exptl. Biol. – 1979. – V. 17, N 5. – P. 479–483.

17. Sharma, P. N. Phosphohydrolases of *Paramphistomum cervi* (Digenea, Paramphistomatidae) / P. N. Sharma, S. Mandawat // Acta Parasitol. Pol. – 1983. – V. 28, N 40. – P. 381–392.

**Influence of anthelmintic drugs on activities of 5'-nucleotidase
Bothriocephalus scorpii (Cestoda: Bothriocephalidae)**

E. A. Burenina

doctor of biological sciences

Institute of Biology and Soil Sciences, Far East Branch of RAS, Vladivostok, Russia 690022, Prsp.100-let Vladivostoku, 159, e-mail: Burenina@ibss.dvo.ru

Activities and properties of 5'-nucleotidase in the subcellular fractions of *Bothriocephalus scorpii* are studied with the use of adenosine monophosphate, inosine monophosphate and cytidine monophosphate as substrates. The high activity of 5'-nucleotidase was observed in the mitochondrial fraction. Dependence of the 5'-nucleotidase activity on the concentration of substrates and Mn^{2+} ions is investigated. Impact of various effectors and ions (sodium fluoride, EDTA, cysteine, K^+ , Na^+ , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+}) on enzyme activity is determined. Effect of 10 anthelmintic drugs on enzyme activity has been tested. The most effective drugs are bitionol and oxinide.

Keywords: 5'-nucleotidase, adenosine monophosphate, inosine monophosphate, cytidine monophosphate, mitochondria, cestoda, anthelmintic drugs.