

УДК 619:616.995.121

DOI:

Поступила в редакцию 10.02.2016

Принята в печать 28.11.2016

Для цитирования:

Буренина Э. А. Нуклеозиддифосфатазы цестод *Bothriocephalus scorpii* (Cestoda: Bothriocephalidae) // *Российский паразитологический журнал*. – М., 2016. – Т.38, Вып.4. – С.

For citation: Burenina E. A. Nucleoside-diphosphatase of cestode *Bothriocephalus scorpii* (Cestoda: Bothriocephalidae) // *Russian Journal of Parasitology*, 2016, V.38, Iss.4, pp.

НУКЛЕОЗИДДИФОСФАТАЗЫ ЦЕСТОД *BOTHRIOCEPHALUS SCORPII* (CESTODA: BOTHRIOCEPHALIDAE)

Буренина Э. А.

Биолого-почвенный институт ДВО РАН, 690022, г. Владивосток, пр. 100-летия Владивостока, 159, e-mail: burenina @ ibss.dvo.ru

Реферат

Цель исследования – изучение активности и свойств нуклеозиддифосфатазы (НДФаза) у цестод *Bothriocephalus scorpii*.

Материалы и методы. Цестод гомогенизировали с 10 объемами среды выделения. НАДазы определяли в митохондриях и микросомах с субстратами (ИДФ, ГДФ, УДФ). Неорганический фосфор определяли по Кочетову (1980). Было испытано действие 10 антигельминтных препаратов на активность НДФазы.

Результаты и обсуждение. Обнаружили, что митохондриальные и микросомальные фракции цестод *B.scorpii* обладают нуклеозиддифосфатазной активностью. Активность фермента зависит от субстратов и ионов Mg^{2+} . Изучено влияние различных эффекторов и ионов (Ca^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}) на энзимную активность. Эффект 10 антигельминтных препаратов на активность НДФазы был изучен. Эффективными препаратами являются битионол и трихлорофен.

Ключевые слова: нуклеозиддифосфатаза, инозиндифосфат, гуанозиндифосфат, уридиндифосфат, цестода, митохондрия, микросомы, антигельминтики.

Введение

Адаптация гельминтов к паразитизму оказала влияние на их энергетический баланс; изменилось соотношение затрат энергии на различные жизненные функции. Установлено, что пути углеводного и энергетического обменов гельминтов значительно богаче и разнообразнее, чем у позвоночных животных и могут протекать как по анаэробной, так и по аэробной схеме обмена.

Нуклеозиддифосфатаза (НДФаза) катализирует гидролиз нуклеозиддифосфатов, отщепляя концевой фосфат. Каталитические свойства фермента (рН-оптимум, субстратная и ингибиторная специфичность) существенно зависят как от источника фермента, так и от условий определения ферментативной активности. НДФазы у беспозвоночных были определены с помощью гистохимических [7–9], цитохимических [3, 10, 11] и биохимических методов исследования [4, 5, 12]. У нематод НДФазы были обнаружены в стенке кишечного тракта [5, 11], у трематод – в тегументе, различных тканях [3, 10], у

цестод – в тегументе, паренхиме, репродуктивных органах, сколексе, церкмере [7, 9]. У речного рака *Orconectes limosus* фермент изучали в эпителии жабер [12], а у кровососущих *Cimex lectularius* и *Phlebotomus papatase* [4] – в эндоплазматическом ретикулуме. Так как беспозвоночные обладают крайне разнообразными путями обмена, каждый вид необходимо исследовать как уникальный случай.

Целью настоящей работы было изучение активности и свойств НДФазы у *Bothriocephalus scorpii* из отряда Pseudophyllidea Carus 1983, сем. Bothriocephalidae Branch 1849, паразитирующих в пилорических придатках бычка Брандта (*Myoxocephalus brandti*) из залива Петра Великого, а также установление возможности ингибирования активности НДФазы некоторыми препаратами, обладающими антигельминтной активностью.

Материалы и методы

Ботрицефалов собирали из живых бычков и доставляли в лабораторию в термосе в растворе Рингера при температуре 20–25°C. В лаборатории ботрицефалов промывали дистиллированной водой, подсушивали на фильтровальной бумаге и замораживали. Для приготовления ферментных экстрактов *B. scorpii* гомогенизировали с 10 объемами среды выделения (0,25 М сахара, 0,05 М трис, 0,005 М ЭДТА, рН 7,4). Полученный гомогенат центрифугировали 15 мин при 1000g и 1°C. Надосадочную жидкость центрифугировали 30 мин при 12000g (цитозоль 12 000g). Выделенные митохондрии промывали средой выделения и центрифугировали 30 мин при 12 000g. Для получения микросомальной фракции цитозоль 12 000g центрифугировали при 105 000g в течение 60 мин и получали микросомы и цитозоль 105 000g (Suprafuge-22, угловой ротор). Концентрации субстратов, ферментного белка, ионов металла, буфера и рН были выбраны такими, которые обеспечивали наибольшую скорость реакции.

Активность НДФазы (нуклеозидифосфат-фосфогидролаза, НФ 3.6.1.6.) измеряли по освобождению неорганического фосфата. Анализируемая среда содержала (мМ): 50 Трис-НСl буфера (рН 7,4), 1,5 инозиндифосфата (ИДФ) и гуанозиндифосфата (ГДФ), 2,0 уридиндифосфата (УДФ), 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 20 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 [6]. Константы Михаэлиса устанавливали графически [1]. Активность фермента выражали в нмолях Фн/мин/мг белка. Антигельминтные препараты растворяли в 96%-ном этаноле и вносили в опытную среду в объеме 0,1 мл. Параллельно, чтобы исключить ингибирующее влияние этанола на активность фермента, ставили контроль на спирт.

Результаты и обсуждение

Активность и свойства НДФазы цестод *B. scorpii* изучены впервые. Оптимум активности фермента у *B. scorpii* наблюдали при рН 7,4. По данным авторов фермент *Schistosoma mansoni* и *Haematoloechus medioplexus* [3], кровососущих постельного клопа и москитов [4] и эпителиа жабер речного рака [12] имеют оптимум рН в пределах 7,0–7,4. Такой разброс рН оптимумов у беспозвоночных обусловлен, по-видимому, особенностями фермента, а также вариабельностью условий, при которых исследовали активности.

Активность НДФазы *B. scorpion* была исследована во всех субклеточных фракциях (цитозольных, митохондриальной и микросомальной). Как видно из данных таблицы 1, наибольшую активность фермента наблюдали в микросомальной фракции с тремя субстратами. Согласно литературным данным, фермент у других объектов изучали, в основном, цито- и гистохимически; в эпителии жабер речного рака *Orconectes limosus* – в микросомальной фракции 100 000 g [12], а у постельного клопа и москитов – во фракции 12 000 g [4]. В связи с этим можно сказать, что широкое распространение НДФаз в органах и тканях беспозвоночных свидетельствует об их важной физиологической роли.

Таблица 1

Активность нуклеозиддифосфатаз в субклеточных фракциях *Bothrioccephalus scorpion* (нмоль Фн/мин/мг белка)

Исследуемая фракция	Субстрат		
	ИДФ	УДФ	ГДФ
Цитозоль 12 000 g	70,52±1,53 (6)	57,67±1,40 (6)	49,36±1,26 (6)
Митохондрии	107,7±6,2 (18)	89,15±1,7 (18)	78,95±1,65 (12)
Цитозоль 105 000 g	75,30±2,01 (6)	55,41±1,53 (6)	52,89±0,87 (6)
Микросомы	125,8±9,9 (18)	103,1±0,9 (18)	87,40±1,83 (12)

Скорость энзиматической реакции зависит от концентрации субстратов, которыми служат инозиндифосфат (ИДФ), уридиндифосфат (УДФ) и гуанозиндифосфат (ГДФ). В отсутствие субстрата активность фермента отсутствует во всех субклеточных фракциях *B. scorpion*. Скорость нуклеозиддифосфатазной реакции растет с увеличением количества добавленного субстрата, оставаясь постоянной при концентрации их в пробах с ИДФ и ГДФ 1,5 мМ, а с УДФ – 2 мМ. Различные субстраты гидролизировались с разной скоростью, наибольшая активность была в реакции с ИДФ. Кинетические параметры в митохондриальной и микросомальной фракциях приведены в таблице 2.

Таблица 2

Кинетические параметры нуклеозиддифосфатаз *Bothrioccephalus scorpion*

Исследуемая фракция	ИДФ		УДФ		ГДФ	
	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}
Митохондрии	$2,0 \cdot 10^{-3}$	250,0	$1,1 \cdot 10^{-3}$	111,11	$0,8 \cdot 10^{-3}$	111,11
Микросомы	$2,2 \cdot 10^{-3}$	285,0	$1,0 \cdot 10^{-3}$	105,26	$1,1 \cdot 10^{-3}$	111,11

Примечание. K_m выражена в М, V_{max} – в нмоль Фн/мин/мг белка.

НДФаза требует обязательного присутствия ионов Mg^{2+} , образуя энзим-субстратный комплекс. Без ионов Mg^{2+} активность фермента отсутствует во всех фракциях *B. scorpion* со всеми субстратами, концентрация ионов Mg^{2+} составляет 10 мМ. Изучая активность фермента в тегументе *Schistosoma mansoni* и *Haematoloechus medioplexus* [3], постельного клопа и москитов [4], авторы добавляли в инкубационную среду 4 мМ $MgCl_2$, а в случае с *Trichinella spiralis* [5] – 5 мМ $MgCl_2$.

Для анализа свойств НДФазы интересно было изучить влияние различных эффекторов на активность фермента в митохондриях и микросомах *B. scorpion* с субстратом ИДФ и УДФ (табл. 3). Triton x-100 в концентрации 0,1 % увеличивал активность микросомальной УДФ-зависимой НДФазы на 47,8 %, а ИДФ-зависимой НДФазы – в микросомальной фракции на 14,8 %, а в митохондриальной – только на 5,4 %. Однако Ca^{2+} -НДФаза постельного клопа и москитов была в 4 раза выше в реакции с субстратом ИДФ и Triton-x-100 [4].

ЭДТА, являясь хелатирующим агентом, оказывает специфическое действие на мембранные структуры. Нами обнаружено, что ЭДТА в концентрации 10 мМ угнетает активность НДФазы с анализируемыми субстратами в митохондриальной и микросомальной фракциях. В присутствии 1 мМ ЭДТА каталитическая активность фермента постельного клопа и москитов [4] составляет 2,8 % от максимальной активности. Сульфгидрильный реагент, дитиотрейтол (ДТТ), в концентрации 1 мМ активировал микросомальную УДФ-зависимую НДФазу на 30 %, а микросомальную и митохондриальную ИДФ-зависимую НДФазу ингибировал также как и митохондриальную УДФ-зависимую НДФазу. НДФаза *T. spiralis* [5] при введении в инкубационную среду 2,5 мМ ДТТ была на уровне контроля. Глутатион в концентрации 5 мМ угнетал активность митохондриальной и микросомальной НДФаз с УДФ субстратом и микросомальную НДФазу с субстратом ИДФ, а митохондриальную активировал на 12 %. Наши данные согласуются с результатами, полученными при изучении НДФазы у *Raillietina johri* [9] и *Fasciola hepatica* [5]. Арсенат в концентрации 5 мМ ингибировал на 100 % митохондриальный и микросомальный ферменты с ИДФ субстратом и митохондриальный с УДФ субстратом, а микросомальный – на 59 % с УДФ субстратом. Данные по другим беспозвоночным отсутствуют.

Исследуя влияние двухвалентных катионов на активность НДФазы, обнаружили, что $MnCl_2$ в концентрации 10 мМ ингибировал НДФазу во всех фракциях с ИДФ и УДФ субстратами. $CaCl_2$ в микросомальных фракциях с ИДФ и УДФ субстратами действовал на уровне контроля; в митохондриях с УДФ угнетал фермент на 29 %, а в митохондриях с ИДФ активировал на 31 %. Ферменты постельного клопа и москитов [4] и *R. johri* [9] активировались ионами Ca^{2+} , а фермент *T. spiralis* [5] был ингибирован. Ионы Zn^{2+} активировали фермент со всеми субстратами в митохондриях и микросомах. Ионы Zn^{2+} играют уникальную роль в выражении активности НДФазы, действуя как аллостерические активаторы. Однако фермент *T. spiralis* [5] был ингибирован 1 мМ иона Zn^{2+} . АТФ (2 мМ), цистеин (10 мМ) и NaF (10 мМ) угнетали активность НДФазы в реакциях с субстратами ИДФ и УДФ в обеих фракциях (табл. 3). Наши данные согласуются с данными, полученными для *S. mansoni* [3] и *R. johri* [9] по ингибированию цистеином и NaF.

Таблица 3

Влияние различных эфффекторов и катионов на активность нуклеозиддифосфатаз с различными субстратами (% от контроля)

Инкубационная среда с добавками	Субстрат ИДФ		Субстрат УДФ	
	микросомы	митохондрии	микросомы	митохондрии
Контроль	100	100	100	100
Triton x-100 0,1 %	114,8	105,4	147,8	74,5
ЭДТА 10 мМ	33,0	26,8	5,0	29,1
ДТТ 1 мМ	71,4	89,6	130,7	60,6
Глутатион 5 мМ	63,8	112,0	45,1	55,5
Арсенат 5 мМ	0	0	41,2	0
$CaCl_2$ 10 мМ	99,5	130,9	94,5	71,1
$MnCl_2$ 10 мМ	35,7	66,9	50,0	33,8
$ZnCl_2$ 10 мМ	101,5	194,0	286,3	169,8
АТФ 2 мМ	40,8	0	0	7,2
Цистеин 10 мМ	66,3	69,4	53,8	53,3
NaF 10 мМ	10,2	17,0	11,0	17,0

Подводя итог проведенным экспериментам, можно сделать вывод, что митохондриальная и микросомальная фракции *B. scorpii* обладают нуклеозиддиффосфатазной активностью. Полученные результаты и литературные данные свидетельствуют о том, что НДФаза присутствует в различных мышцах разных представителей беспозвоночных и аналогична свойствам фермента из позвоночных. Сравнительное изучение НДФаз у беспозвоночных из разных классов и с разной локализацией могло бы дать интересный материал для понимания биохимической эволюции.

НДФаза выполняет огромную роль в клеточном обмене гельминтов, изменение активности которой под влиянием антигельминтных препаратов может привести к серьезным нарушениям в углеводном и нуклеиновом обменах гельминтов. Было испытано действие ряда антигельминтных препаратов из разных групп соединений на активность НДФазы с разными субстратами в микросомальной фракции *B. scorpii* (табл. 4).

Таблица 4

Влияние антигельминтных препаратов на активность нуклеозиддиффосфатазы в микросомах *Bothrioccephalus scorpii* с различными субстратами (в % от контроля)

Антигельминтный препарат (10 ⁻⁴ М)	Субстрат	
	УДФ	ИДФ
Контроль	100	100
Оксинид	75,4	64,7
Г-937	67,7	59,2
Г-1028	78,1	70,3
Битионол	51,8	49,4
Тиабендазол	68,2	58,6
Фенбендазол	61,1	54,3
Трихлорофен	54,0	52,1
Празиквантел	75,3	68,7
Ацемидофен	63,2	61,3
Политрем	73,8	69,9

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

Битионол и трихлорофен, являясь противоцестодозными средствами, вызывают необратимое нарушение двигательной активности цестод и ведут к разрушению их тегумента. Битионол и трихлорофен сильнее ингибировали НДФазу с ИДФ и УДФ субстратами в микросомальной фракции, чем другие препараты. Карбаматбензимидазолы, имеющие различные заместители в положении 5(6) бензимидазольного кольца, тиабендазол и фенбендазол, угнетали активность фермента на 41,4 и 45,7 %, соответственно, с ИДФ субстратом, а с УДФ субстратом – на 31,8 и 38,9 %. Таким образом, наиболее эффективными препаратами для НДФазы являются битионол и трихлорофен

Литература

1. Корниш–Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. – М.: Мир, 1979.
2. Кочетов Г. А. Метод определения неорганического фосфора. Практическое руководство по энзимологии. – М., 1980. – С. 215–216.
3. Vogitsh V. J., Krupa P. L. *Schistosoma mansoni* and *Haematoloechus medioplexus*: nucleosidediphosphatase location in tegument. *Exptl. Parasitol.*, 1971, Vol. 30, No 3, pp. 418–425.

4. Failer B. U., Braun N., Zimmermann H. Cloning, expression and functional characterization of a Ca²⁺- dependent endoplasmic reticulum nucleoside diphosphatase. *J. Biol. Chem.*, 2002, Vol. 277, pp. 36978–36986.
5. Gounaris K., Selkirk M. E., Sadeghi S. J. A nucleotidase with unique catalytic properties is secreted by *Trichinella spiralis*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2004, Vol. 136, No 2, pp. 257–264.
6. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, Vol. 193, No 1, pp. 265–275.
7. Moczon T. Histochemical studies on the enzymes of *Hymenolepis diminuta*. II Nonspecific and specific phosphatases in oncospheres and cysticercoids. *Acta Parasitol. Pol.*, 1973, Vol. 21, No 1–10, pp. 99–106.
8. Moczon T. Histochemical studies on the enzymes of *Hymenolepis diminuta*. IV. Nonspecific phosphatases in a mature parasite. *Acta Parasitol. Pol.*, 1974, Vol. 22, No 22–34, pp. 323–329.
9. Roy T. K. Histochemical studies on *Raillietina (Raillietina) johri* (Cestoda: Davaineidae). II. Nucleoside diphosphatase and thiamine pyrophosphatase. *J. Helminthol.*, 1979, Vol. 53, No 3, pp. 261–263.
10. Roy T. K. Distribution, functional significance of phosphatase in the bovine amphistome *Ceylonocotyle scoliocoelium*. *Ind. J. Exp. Biol.*, 1980, Vol. 18, No 4, pp. 385–392.
11. Seniuta R. Cytochemical studies on some specific phosphatase activities in experimental trichinellosis of mice. *Wiadom. Parasitol.*, 1975, Vol. 21, No 4–5, pp. 683–688.
12. Strauss O., Graszynski K. Isolation of plasma membrane vesicles from the gill epithelium of the crayfish *Orconectes limosus* Rafinesque and properties of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1992, Vol. 102A, No 3, pp. 519–526.

References

1. Bogitsh B. J., Krupa P. L. *Schistosoma mansoni* and *Haematoloechus medioplexus*: nucleosidediphosphatase location in tegument. *Exptl. Parasitol.*, 1971, vol. 30, no. 3, pp. 418–425.
2. Failer B. U., Braun N., Zimmermann H. Cloning, expression and functional characterization of a Ca²⁺- dependent endoplasmic reticulum nucleoside diphosphatase. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, pp. 36978–36986.
3. Gounaris K., Selkirk M. E., Sadeghi S. J. A nucleotidase with unique catalytic properties is secreted by *Trichinella spiralis*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2004, vol. 136, no. 2, pp. 257–264.
4. Kochetov G. A. Method for determination of organic phosphorus. *Prakticheskoe rukovodstvo po enzimologii* [Practical guide on enzymology] M., 1980, pp. 215–216.
5. Kornish–Bowden A. *Osnovy fermentativnoy kinetiki*. [Principles of Enzyme Kinetics]. M., Mir, 1979.
6. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, vol. 193, no. 1, pp. 265–275.
7. Moczon T. Histochemical studies on the enzymes of *Hymenolepis diminuta*. II Nonspecific and specific phosphatases in oncospheres and cysticercoids. *Acta Parasitol. Pol.*, 1973, vol. 21, no. 1–10, pp. 99–106.
8. Moczon T. Histochemical studies on the enzymes of *Hymenolepis diminuta*. IV. Nonspecific phosphatases in a mature parasite. *Acta Parasitol. Pol.*, 1974, vol. 22, no. 22–34, pp. 323–329.
9. Roy T. K. Histochemical studies on *Raillietina (Raillietina) johri* (Cestoda: Davaineidae). II. Nucleoside diphosphatase and thiamine pyrophosphatase. *J. Helminthol.*, 1979, vol. 53, no. 3, pp. 261–263.

10. Roy T. K. Distribution, functional significance of phosphatase in the bovine amphistome *Ceylonocotyle scoliocoelium*. Ind. J. Exp. Biol., 1980, vol. 18, no. 4, pp. 385–392.
11. Seniuta R. Cytochemical studies on some specific phosphatase activities in experimental trichinellosis of mice. Wiadon. Parasitol., 1975, vol. 21, No 4–5, pp. 683–688.
12. Strauss O., Graszynski K. Isolation of plasma membrane vesicles from the gill epithelium of the crayfish *Orconectes limosus* Rafinesque and properties of the Na⁺/H⁺ exchanger. Comp. Biochem. Physiol., 1992, vol. 102A, no. 3, pp. 519–526.

Russian Journal of Parasitology, 2016, V.38, Iss.4

DOI:

Received 10.02.2016

Accepted 28.11.2016

**NUCLEOSIDE-DIPHOSPHATASE OF CESTODE *BOTHRIOCEPHALUS*
SCORPII (CESTODA: BOTHRIOCEPHALIDAE)**

Burenina E. A.

Institute of Biology and Soil Sciences, Far East Branch of RAS

690022, г. Vladivostok, 159 Prosp.100-letiya Vladivostoka,

e-mail: burenina @ ibss.dvo.ru

Abstract

Objective of research: To study the activities and properties of nucleoside-diphosphatase (NDPase) in cestode *Bothriocephalus scorpii*.

Materials and methods: Cestodes were homogenized with 10 vol. of extraction medium. NDPase was detected in mitochondria and microsomes with substrates (IDP, GDP, UDP). Inorganic phosphorus was determined by the method of Kochetov (1980). The effects of 10 anthelmintic drugs on the activity of NDPase were studied.

Results and discussion: It was found that the mitochondrial and microsomal fractions of cestodes *B. scorpii* have nucleoside diphosphatase activity.

The activity of nucleoside diphosphatase depends on substrates and Mg²⁺ ions.

The impact of various effectors and ions (Ca²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺) on enzyme activity was determined.

Effects of 10 anthelmintic drugs on activity of nucleoside diphosphatase were studied.

The anthelmintics Bitionol and Trichlorophen have been proved effective.

Keywords: nucleoside-diphosphatase, inosine diphosphate, uridine diphosphate, guanosine diphosphate, cestode, mitochondria, microsomes, anthelmintic drugs.

© 2016 The Author(s). 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>)