

УДК 577.1: 576.595.123

## ФОСФОГИДРОЛАЗЫ ТУРБЕЛЛЯРИЙ *PHAGOCATA SIBIRICA*

© 2019 г. Э. А. Буренина<sup>1,\*</sup>, М. И. Жуковская<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки “Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии” Дальневосточного отделения Российской академии наук, г. Владивосток, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

\*e-mail: burenina@ibss.dvo.ru

Поступила в редакцию 24.07.2018 г.

После доработки 14.01.2019 г.

Принята к публикации 22.02.2019 г.

Изучены активности и свойства фосфогидролаз: нуклеозиддифосфатазы (НДФазы) и 5'-нуклеотидазы в субклеточных фракциях турбеллярии *Phagocata sibirica* (Turbellaria: Planariidae). Наибольшая активность НДФазы наблюдалась в микросомах, а 5'-нуклеотидазы в митохондриях и цитозольных (12000 г и 105000 г) фракциях. Исследованы зависимости скоростей реакций, катализируемых этими ферментами от концентрации субстратов и ионов металла. Изучено влияние различных эффекторов, а также двухвалентных катионов ( $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ) на активность фосфогидролаз.

**Ключевые слова:** нуклеозиддифосфатаза, 5'-нуклеотидаза, турбеллярия, *Phagocata sibirica*, митохондрия, микросома, эффекторы, ионы

**DOI:** 10.1134/S0044452919040053

### ВВЕДЕНИЕ

Установлено, что пути углеводного, энергетического и нуклеинового обменов беспозвоночных значительно богаче и разнообразнее, чем у позвоночных и могут протекать как по аэробной, так и по анаэробной схемам. Распад пуриновых нуклеотидов начинается с отщепления фосфатной группы под действием фермента 5'-нуклеотидазы, который имеет важную физиологическую функцию в продукции аденозина из внутриклеточных нуклеотидов. 5'-нуклеотидаза ассоциируется с распадом и транспортировкой нуклеиновых кислот, а также с активным транспортом метаболитов через клеточную мембрану. НДФаза катализирует гидролиз нуклеозиддифосфатов, отщепляя концевой фосфат, в соответствующий нуклеозидмонофосфат. Каталитические свойства ферментов (рН-оптимум, субстратная и ингибиторная специфичность) существенно зависят как от источника фермента, так и от условий определения ферментативной активности. Эти фосфогидролазы имеют широкую специфичность в отношении нуклеотидов и обнаружены у самых разных биологических объектов, начиная от примитивного одноклеточного до чрезвычайно сложно организованного млекопитающего. Фосфогидролазы у беспозвоночных были определены с помощью гистохимических [1–7], цитохимических [8–10] и биохимических методов исследования [11–17]. Так как беспозвоночные об-

ладают крайне разнообразными путями обмена, для оценки биологического разнообразия и эволюции этих ферментов каждый вид необходимо исследовать как уникальный объект.

Целью настоящей работы было изучение активности и свойств НДФазы и 5'-нуклеотидазы у турбеллярий *Phagocata sibirica* (Turbellaria, Planariidae), обитающих в горных ручьях Приморского края.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Турбеллярий *P. sibirica* доставляли в лабораторию в банках с ручьевого водой. Для приготовления ферментных экстрактов *P. sibirica* гомогенизировали с 10 объемами среды выделения (0.25 М сахараза, 0.05 М трис, 0.005 М ЭДТА, рН 7.4). Полученный гомогенат центрифугировали (настольная центрифуга MPW-340) 15 мин при 1 000 г и 10 С. Надосадочную жидкость центрифугировали 30 мин при 12000 г (цитозоль 12000 г). Выделенные митохондрии промывали средой выделения и центрифугировали 30 мин при 12000 г. Для получения микросомальной фракции цитозоль 12000 г центрифугировали при 105000 г в течение 60 мин и получали микросомы и цитозоль 105000 г (Suprafuge-22, угловой ротор). В ходе предварительных экспериментов были подобраны концентрации субстратов, ферментного белка, ионов  $Mg^{2+}$ , буфера и рН так, чтобы обеспечить наибольшую скорость реакции. В реакции с АМФ концентрация ионов  $Mg^{2+}$

**Таблица 1.** Активность нуклеозиддифосфатаз в субклеточных фракциях *Phagocata sibirica* (нмоль Фн/мин/мг белка)

Исследуемая фракция	Субстрат		
	ИДФ	УДФ	ГДФ
Цитозоль 12000 g	100.2 ± 3.3 (6)	26.0 ± 0.8 (6)	96.8 ± 1.9 (6)
Митохондрии	61.8 ± 1.8 (12)	25.8 ± 1.5 (12)	23.7 ± 1.5 (12)
Цитозоль 105000 g	29.1 ± 1.9 (6)	30.9 ± 1.4 (6)	85.4 ± 1.8 (6)
Микросомы	112.9 ± 0.7 (12)	50.4 ± 0.9 (12)	102.1 ± 3.2 (12)

была 5 мМ, с ГМФ – 6 мМ, с ИМФ – 1.5 мМ во всех изучаемых фракциях.

Активность НДФазы (нуклеозиддифосфат-фосфогидролаза, НФ 3.6.1.6.) измеряли по освобождению неорганического фосфата. Анализируемая среда содержала (мМ): 50 трис – НСl буфера (рН 7.6), 5 инозиндифосфата (ИДФ), 2 гуанозиндифосфата (ГДФ) и уридиндифосфата (УДФ), 7 MgCl<sub>2</sub> 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. Пробы центрифугировали 20 мин при 4000 об/мин. В надосадочной жидкости измеряли содержание неорганического фосфора (Фн) по Кочетову (1980) [18]. Белок определяли по Lowry et al. [19]. Константы Михаэлиса определяли графически [25]. Активность ферментов выражали в нмолях Фн/мин/мг белка. Активность 5'-нуклеотидазы (5'-рибонуклеотид-фосфогидролаза, НФ 3.1.3.5) измеряли по освобождению неорганического фосфата. Анализируемая среда содержала (мМ): 200 трис-малеатного буфера (рН 7.0), 5 аденозин-5'-монофосфата (АМФ) и гуанозин-5'-монофосфата (ГМФ), 1 инозин-5'-монофосфата (ИМФ), 1.5, 5 и 6 MgCl<sub>2</sub> и 0.1–0.15 мг ферментного белка. Объем пробы составил 1.2 мл. Остальные процедуры проводились также, как и для НДФазы. Активность цитозольных 5'-нуклеотидаз измеряли с АМФ в 12000 g и 105000 g цитозолях.

Полученные данные статистически обрабатывали с помощью Т-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони для множественных сравнений.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Активность и свойства НДФазы турбеллярий *Phagocata sibirica* изучены впервые. Предварительные эксперименты показали, что оптимум активности фермента наблюдался при рН 7.6. Активность фермента была исследована во всех субклеточных фракциях (цитозольных, митохондриальной и микросомальной). Как видно из данных табл. 1, наибольшую активность фермента наблюдали в микросомальной фракции с тремя субстратами: ИДФ, УДФ и ГДФ. Согласно литературным данным, фермент в эпителии жабр речного рака *Orconectes limosus* определяли в микросомальной

фракции 100000 g [14], а у постельного клопа *Cimex lectularius* и москита *Phlebotomus papatasi* – во фракции 12000 g [12].

Скорость энзиматической реакции зависит от концентрации субстратов, которыми служат ИДФ, УДФ и ГДФ. В отсутствие субстрата активность фермента не определяется во всех субклеточных фракциях *P. sibirica*. Скорость НДФазной реакции растет с увеличением количества добавленного субстрата, выходя на плато при концентрации их в пробах с ИДФ 5 мМ, а с ГДФ и УДФ – 2 мМ. Кинетические параметры субстратов в микросомальной фракции составляли: Km для ИДФ – 4 мМ, Vmax – 200 нмоль Фн/мин/мг белка, Km для ГДФ – 1.05 мМ, Vmax – 153.85 нмоль Фн/мин/мг белка, Km для УДФ – 0.95 мМ, Vmax – 71.42 нмоль Фн/мин/мг белка. Для сравнения, у трематод *Schistosoma mansoni* и *Haematoloechus medioplexus* фермент был активен с субстратами УДФ, ИДФ, АДФ и ГДФ при 4 мМ [13], а фермент постельного клопа и москита был активен при 0.5 мМ в реакции с УДФ [12].

НДФаза требует обязательного присутствия двухвалентных катионов при образовании энзим-субстратного комплекса. В представленных экспериментах концентрация ионов Mg<sup>2+</sup> составляла 7 мМ для трех субстратов. Изучая активность фермента в тегументе *S. mansoni* и *H. medioplexus*, авторы [13] добавляли в инкубационную среду 4 мМ MnCl<sub>2</sub>, а в случае с нематодой *Trichinella spiralis* [11] – 5 мМ MgCl<sub>2</sub>. Фермент постельного клопа [12] требовал присутствия 1 мМ Ca<sup>2+</sup>, а не Mg<sup>2+</sup>.

Для анализа свойств НДФазы, выделенной из *P. sibirica*, интересно было изучить влияние различных эффекторов на активность фермента в микросомах с субстратами ИДФ и ГДФ (табл. 2). Контрольные значения для обоих субстратов были сопоставимы, детергент Triton X-100 практически не менял их активность. Принимая во внимание, что активность мембран-связанной Ca<sup>2+</sup>-зависимой НДФазы в реакции с ИДФ у постельного клопа была в 4 раза выше после обработки Triton X-100 [12], можно предположить, что фермент *P. sibirica* существенно от него отличается. Активность фермента резко возрастала в присутствии АТФ ( $p < 0.001$  для обоих субстратов). Цистеин существенно снижал

**Таблица 2.** Влияние различных эффекторов на активность нуклеозиддифосфатазы в микросомах *Phagocata sibirica* (нмоль Фн/мин/мг белка). Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение

Среда инкубации (мМ)	Субстрат	
	ИДФ	ГДФ
Контроль	76.9 ± 3.6	92.2 ± 6.2
+ Triton X-100 1%	78.3 ± 2.1	81.7 ± 0.1
+ЭДТА, 10	57.8 ± 2.0***	80.0 ± 1.9*
+ДТГ, 1	47.7 ± 1.9***	45.9 ± 3.3***
+глутатион, 5	49.4 ± 1.9***	74.9 ± 2.1**
+арсенат натрия, 5	0***	0***
+ Ca <sup>2+</sup> , 10	63.0 ± 4.9**	61.3 ± 3.2***
+Mn <sup>2+</sup> , 10	25.5 ± 3.2***	64.7 ± 1.9**
+Zn <sup>2+</sup> , 10	12.1 ± 0.5***	49.4 ± 3.9***
+АТФ, 2	197.4 ± 3.2***	285.9 ± 2.0***
+цистеин	10.2 ± 0.2***	95.2 ± 3.8
+ NaF, 10	0***	78.3 ± 3.9**

Примечание. Повторность опытов шестикратная. Достоверность отличий от контроля: \* –  $p < 0.05$ ; \*\* –  $p < 0.01$ ; \*\*\* –  $p < 0.001$  ( $t$ -критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони).

ЭДТА – этилендиэтилтетрауксусная кислота, ДТГ – дитиотрейтол, АТФ – аденозинтрифосфат натрия, NaF – фтористый натрий.

активность НДФазы в отношении ИДФ ( $p < 0.001$ ), но не ГДФ. Фторид натрия полностью блокировал расщепление ИДФ и достоверно снижал активность по отношению к ГДФ ( $p < 0.001$ ), которая, однако, оставалась на довольно высоком уровне. Арсенат полностью блокировал действие фермента. Глутатион угнетал активность ИДФ-зависимой НДФазы на треть ( $p < 0.001$ ), а ГДФ –зависимой – на одну пятую ( $p < 0.01$ ).

Исследуя влияние двухвалентных катионов на активность ИДФ-зависимой НАДФазы, обнаружили, что ионы Zn<sup>2+</sup> ингибируют фермент на 84% ( $p < 0.001$ ), ионы Mn<sup>2+</sup> – на 67% ( $p < 0.001$ ), а ионы Ca<sup>2+</sup> – на 18% ( $p < 0.01$ ). ГДФ-зависимая НДФаза *P. sibirica* была ингибирована ионами Zn<sup>2+</sup> на 46% ( $p < 0.001$ ), ионами Mn<sup>2+</sup> – на 30% ( $p < 0.01$ ), а ионами Ca<sup>2+</sup> – на 33% ( $p < 0.001$ ). Остальные эффекторы

ингибировали ИДФ- и ГДФ-зависимые ферменты в небольшой степени (табл. 2). Таким образом, ионы Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> и Ca<sup>2+</sup> снижают каталитическую активность фермента.

Активность и свойства 5'-нуклеотидазы в субклеточных фракциях турбеллярий *P. sibirica* изучаются впервые. Оптимум активности фермента наблюдался при pH 7.0 во всех субклеточных фракциях. Фермент ракообразных рода *Artemia* [16], улитки *Helix lucorum* [15], головоногих моллюсков (*Cephalopoda*) [21] имел оптимум pH в пределах 7.0–7.2, а у моллюска *Meretrix meretrix lusoria* определяли фермент при pH 8.8 [17]. У саранчи, таракана, шмеля, мясной мухи, земляного червя авторы [22] изучали активность фермента радиоактивным методом с АМФ при pH 7.0. В том случае, когда фермент обнаруживали более чем в одной фракции, его свойства в разных фракциях отличались. Поэтому активность фермента у *P. sibirica* была исследована во всех субклеточных фракциях (табл. 3). В отсутствие субстрата активность фермента не определяется во всех субклеточных фракциях *P. sibirica*. Как видно из данных табл. 3, наибольшая активность фермента наблюдалась в митохондриях и цитозольных фракциях (12000 г и 105000 г) с тремя субстратами, что свидетельствует о присутствии цитозольных 5'-нуклеотидаз. Согласно литературным данным, фермент у других объектов изучали, в основном, гисто- и цитохимически [1–10], а у *Cephalopoda* [21] – в гомогенатах, в цистах и яйцах *Artemia* [16] – в супернатанте 27000 г. В связи с этим можно сказать, что широкое распространение в органах и тканях беспозвоночных 5'-нуклеотидаз свидетельствует об их важной физиологической роли в продукции аденозина.

Скорость энзиматической реакции зависит от концентрации субстратов, которыми служат АМФ, ГМФ, ИМФ, и растет с увеличением количества добавленного субстрата, выходя на плато при концентрации их в пробах с АМФ и ГМФ 5 мМ, а с ИМФ – 1 мМ в митохондриях и цитозольных фракциях. Наибольшая активность фермента была в реакции с АМФ во всех субклеточных фракциях. Кинетические параметры субстратов в митохондриях и цитозольных фракциях представлены в табл. 4. Насыщение фермента субстратом у беспозвоночных происходит при различных concentra-

**Таблица 3.** Активность 5'-нуклеотидаз в субклеточных фракциях *Phagocata sibirica* (нмоль Фн/мин/мг белка)

Исследуемая фракция	Субстрат		
	АМФ	ГМФ	ИМФ
Цитозоль 12000 г	366.3 ± 1.3 (12)	87.0 ± 0.7 (12)	76.3 ± 0.8 (12)
Митохондрии	280.3 ± 3.5 (12)	30.7 ± 1.1 (12)	21.9 ± 0.7 (12)
Цитозоль 105000 г	398.5 ± 1.6 (12)	97.4 ± 0.5 (12)	66.4 ± 1.3 (12)
Микросомы	172.2 ± 1.2 (6)	21.8 ± 0.9 (6)	16.9 ± 0.7 (6)

Примечание. Повторность опытов указана в скобках.

**Таблица 4.** Кинетические параметры 5'-нуклеотидаз в субклеточных фракциях *Phagocata sibirica*

Исследуемая фракция	Субстрат					
	АМФ		ИМФ		ГМФ	
	$K_m$	$V_{max}$	$K_m$	$V_{max}$	$K_m$	$V_{max}$
Митохондрии	0.77	312.5	0.31	27.8	0.65	392.2
Цитозоль 12000 g	0.95	392.2	2.22	250.0	—	—
Цитозоль 105000 g	0.61	434.8	0.65	111.1	—	—

Примечание.  $K_m$  выражены в мМ,  $V_{max}$  — в нмолях ФН/мин/мг белка.

Повторность опытов шестикратная.

циях нуклеозидмонофосфатов: в цистах ракообразного рода *Artemia* [16] при 2.5 мМ ГМФ, в головоногих моллюсках (*Cephalopoda*) [21] — при 10 мМ с АМФ или ИМФ, а у моллюска рода *Meretrix* — при 5 мМ АМФ [17]. При гистохимическом изучении фермента в мышцах *P. cervi* [6] использовали 125 мг % АМФ. Фермент *Bothriocephalus scorpii* [23] гидролизывался при 5 мМ в трех субклеточных фракциях, кроме микросомальной (4мМ) с АМФ, ИМФ и ЦМФ. В фильтрованном гомогенате улитки *H. lucorum* концентрация АМФ составляла 0.2 мМ [15].

5'-нуклеотидаза требует обязательного присутствия ионов  $Mg^{2+}$ , образуя энзим-субстратный комплекс. Без ионов  $Mg^{2+}$  активность фермента отсутствует во всех фракциях со всеми субстратами. В реакции с АМФ концентрация ионов  $Mg^{2+}$  составляет 5 мМ, с ГМФ — 6 мМ, с ИМФ — 1.5 мМ во всех изучаемых фракциях. Изучая активность фермента в цистах *Artemia*, авторы [16] добавляли в

инкубационную среду 7.5 мМ  $MgCl_2$ , для фермента мышц *P. cervi* [16] — 100 мМ. Концентрацию ионов  $Mg^{2+}$  поддерживали во фракциях митохондрий и микросом *Bothriocephalus scorpii* в реакциях с АМФ и ЦМФ на уровне 10 мМ, а в реакции с ИМФ — 7 мМ в митохондриях и 8 мМ в микросомах [23], а для улитки *H. lucorum* [15] — 18 мМ.

Влияние различных эффекторов и катионов на активность 5'-нуклеотидазы в митохондриях и цитозольных фракциях *P. sibirica* представлено в табл. 5. Молибдат аммония (20мМ) полностью ингибирует реакции в митохондриях и цитозольных фракциях. Парахлормеркурибензоат (п-хмб, 5 мМ) и NaF (10 мМ) полностью ингибируют фермент *P. sibirica* в реакциях с АМФ в митохондриях и цитозолях, а реакцию с ГМФ в митохондриях снижают на 85–87% ( $p < 0.001$ ). Однако фермент *B. scorpii* [23] был активирован п-хмб со всеми субстратами: с АМФ в 2 раза по сравнению с контролем, с ИМФ — в 2.7, с ЦМФ — в 3.5 раза.

ЭДТА, являясь хелатирующим агентом, оказывает специфическое действие на мембранные структуры. Обнаружено, что ЭДТА (10 мМ) слегка активирует ферменты *P. sibirica* во всех реакциях (от 4 до 19%,  $p < 0.001$ ). Для сравнения, фермент моллюска рода *Meretrix* [17] был ингибирован ЭДТА на 58% так же, как фермент *B. scorpii* [23].

Стабилизатор сульфгидрильных групп, дитиотрейтол (ДТТ) в концентрации 1 мМ ингибировал митохондриальный фермент *P. sibirica* в реакции с АМФ на 11% ( $p < 0.001$ ) и несколько активировал цитозольный из фракции 105000 g ( $p < 0.001$ ), а остальные ферменты — в пределах статистической погрешности (табл. 5). Ранее исследованный нами

**Таблица 5.** Влияние различных эффекторов на активность 5'-нуклеотидазы в митохондриях и цитозольных фракциях *Phagocata sibirica* (% от контроля)

Среда инкубации	Митохондрии		Цитозоль 12000 g	Цитозоль 105000 g
	Субстрат		Субстрат	
	АМФ	ГМФ	АМФ	АМФ
Контроль	268.7 ± 1.7	45.2 ± 0.4	348.4 ± 2.40	351.3 ± 0.7
+ЭДТА, 10 мМ	319.2 ± 2.0***	47.0 ± 0.3***	401.0 ± 1.0***	405.7 ± 2.0***
+ДТТ, 1 мМ	238.3 ± 2.2***	45.6 ± 0.2	347.3 ± 2.0	360.0 ± 1.0***
+NaF, 10 мМ	0***	6.7 ± 0.2***	5.3 ± 0.8***	6.2 ± 0.3***
+Ca <sup>2+</sup> , 10 мМ	267.3 ± 1.8	32.1 ± 0.5***	340.0 ± 2.4*	342.6 ± 1.1***
+Mn <sup>2+</sup> , 10 мМ	249.6 ± 0.8***	48.0 ± 0.3***	323.6 ± 2.0***	335.6 ± 2.4***
+Zn <sup>2+</sup> , 10 мМ	0***	13.8 ± 0.6***	14.5 ± 0.3***	11.2 ± 0.4***
+Cu <sup>2+</sup> , 10 мМ	0***	11.3 ± 0.4***	7.6 ± 0.4***	5.8 ± 0.5***
+цистеин, 10 мМ	274.0 ± 5.2	55.6 ± 1.1***	351.8 ± 3.5	368.7 ± 4.1***
+молибдат, 20 мМ	0***	0***	0***	0***
+арсенат, 10 мМ	141.2 ± 2.3***	105.9 ± 0.7***	228.0 ± 1.9***	170.9 ± 1.3***
+п-хмб, 5 мМ	0***	6.0 ± 0.1***	5.0 ± 0.2***	2.91 ± 0.03***

Примечание. Повторность опытов шестикратная.

Достоверность отличий от контроля: \* —  $p < 0.05$ ; \*\* —  $p < 0.01$ ; \*\*\* —  $p < 0.001$  ( $t$ -критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони).

митохондриальный фермент *B. scorpii* был ингибирован ДТТ в реакциях с АМФ (89%) и ИМФ (83%), а в реакции с ЦМФ был активирован на 39% [23]. Арсенат натрия (10 мМ) активировал фермент *P. sibirica* в реакции с ГМФ ( $p < 0.001$ ), а ферменты в реакциях с АМФ (митохондриальный и цитозольные) — ингибировал ( $p < 0.001$ ). Фермент митохондрий *B. scorpii* был полностью ингибирован арсенатом в реакции с АМФ и на 61% и 62% в реакциях с ИМФ и ЦМФ соответственно.

Исследуя влияние двухвалентных катионов на активность фермента *P. sibirica*, обнаружили, что ионы  $\text{Cu}^{2+}$  (10 мМ) и  $\text{Zn}^{2+}$  (10 мМ) полностью ингибируют митохондриальный фермент с АМФ и почти на два порядка цитозольные ( $p < 0.001$ ), а митохондриальный фермент с ГМФ — на 70–75% ( $p < 0.001$ ). Ионы  $\text{Ca}^{2+}$  (10 мМ) в реакции с АМФ во всех субстратах слегка ингибируют фермент (недостаточно для митохондриальной и достаточно для цитозольных фракций), а в реакции с ГМФ в митохондриях — на 29% ( $p < 0.001$ ) (табл. 5). Ионы  $\text{Mn}^{2+}$  (10 мМ) в митохондриях в реакции с ГМФ активируют фермент на 6% ( $p < 0.001$ ), а в реакциях с АМФ в митохондриях и цитозолях примерно в той же степени ингибируют ( $p < 0.001$ ) (табл. 5). Ингибирование фермента двухвалентными катионами ранее было показано у моллюска *Meretrix* [17]. Интересно, что у паразитических *B. scorpii* ионы  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$  лишь в некоторой степени ингибировали фермент [23] в реакциях с АМФ, с ИМФ — на 24 и 16%, с ЦМФ — на 54 и 35% в митохондриальных и цитозольных фракциях соответственно. В реакции с АМФ ионы  $\text{Ca}^{2+}$  активировали 5'-нуклеотидазу *B. scorpii* в 11 раз, а ионы  $\text{Zn}^{2+}$  — в 17 раз, а в реакциях с ИМФ и ЦМФ — примерно в 5 раз.

Цистеин в концентрации 10 мМ незначительно увеличивал активность 5'-нуклеотидазы *P. sibirica* во всех реакциях с АМФ, однако для фракции цитозоль 105 000 г различия оказались статистически достоверными ( $p < 0.001$ ), а в реакции с ГМФ в митохондриях активировал фермент на 14% ( $p < 0.001$ ) (табл. 5). Для сравнения, фермент цестоды *B. scorpii* в реакции с АМФ был ингибирован цистеином на 90%; в реакции с ИМФ фермент был активирован в 5 раз, а в реакции с ЦМФ — в 3.5 раза [23] по сравнению с контролем.

Подводя итог проведенным экспериментам, можно сделать вывод, что микросомальные фракции свободноживущих турбеллярий *P. sibirica* обладают НДФазной активностью, а митохондриальные и цитозольные фракции (12 000 г и 105 000 г) — 5'-нуклеотидазной активностью. Присутствие нуклеозид-метаболизирующих энзимов в мышцах беспозвоночных может быть важным для модуляции нуклеотидных и нуклеозидных уровней, контролирующих их действие на специфические пуриновые рецепторы у этих видов. Полученные результаты и литературные данные демонстрируют, что НДФазы и 5'-нуклеотидазы присутствуют в

различных органах и мышцах разных представителей беспозвоночных и аналогичны по свойствам ферментам позвоночных. Особенности свойств НДФазы и 5'-нуклеотидазы тканей *P. sibirica* и наличие других фосфогидролаз (фруктозобисфосфатаза, глюкозо-6-фосфатаза, кислая и щелочная фосфатазы, аденозинтрифосфатаза [24–26]) свидетельствуют о наличии активного транспорта метаболитов через клеточные мембраны. Установленный в тканях уровень ферментных значений, очевидно, следует считать сформировавшимся в процессе эволюции, обеспечивающим высокую эффективность функционирования метаболических систем в условиях адаптации к характерной для вида среде обитания. Например, переход к паразитическому образу жизни кардинально меняет метаболизм и двигательную активность животного, что отражается и в свойствах фосфогидролаз. Сравнительное изучение фосфогидролаз у беспозвоночных дает интересный материал для понимания биохимической эволюции.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена за счет средств госбюджета, программа АААА-А18-118013090245-6.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Настоящая статья не содержит результатов каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Moczon T.* Histochemical studies on the enzymes of *Hymenolepis diminuta*. II. Nonspecific and specific phosphatases in oncospheres and cysticercoids. *Acta Parasitol. Pol.* 21: 99–106. 1973.
2. *Moczon T.* Histochemical studies on the enzymes of *Hymenolepis diminuta*. IV. Nonspecific phosphatases in a mature parasite. *Acta Parasitol. Pol.* 22: 323–329. 1974.
3. *Roy T.K.* Histochemical studies on *Raillietina (Raillietina) johri* (Cestoda: Davaineidae). I. Non-specific and specific phosphatases. *J. Helminthol.* 53: 45–49. 1979.
4. *Humiczewska M.* Some specific and non-specific phosphatases of the sporocyst of *Fasciola hepatica*. II Enzymes associated with the membrane transport. *Folia Parasitol.* 49: 221–226. 2002.
5. *Omar M.S., Raoof A.M.S.* Histochemical distribution of hydrolytic enzymes in adult *Onchocerca fasciata* (Filarioidea: Onchocercidae). *Parasitol. Research* 80: 216–222. 1994.
6. *Sharma P.N., Mandawat S.* Phosphohydrolases of *Paramphistomum cervi* (Digenea, Paramphistomatidae). *Acta Parasitol. Pol.* 28: 381–392. 1983.
7. *Wang W., Dail J., Li H., Liang G.* Histochemical and enzyme-histochemical studies of *Oncomelania hupensis*

- (Gredler, 1881) the invertebrate host of *Schistosoma japonicum*. *Acta Parasitol.* 56: 105–110. 2011.
8. Roy T.K. Distribution, functional significance of phosphatases in the bovine amphistome *Ceylonocotyle scolicolium*. *Indian J. Exp. Biol.* 18: 385–392. 1980.
  9. Seniuta R. Cytochemical studies on some specific phosphatase activities in experimental trichinellosis of mice. *Wiadom. Parasitol.* 21: 683–688. 1975.
  10. Parshad V.R., Guraya S.S. Comparative histochemistry observations on the excretory system of helminth parasites. *Z. Parasitenk.* 52: 81–89. 1977.
  11. Gounaris K., Selkirk M.E., Sadeghi S.J. A nucleotidase with unique catalytic properties is secreted by *Trichinella spiralis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 136: 257–264. 2004.
  12. Failer B.U., Braun N., Zimmermann H. Cloning, expression and functional characterization of a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent endoplasmic reticulum nucleoside diphosphatase. *J. Biol. Chem.* 277: 36978–36986. 2002.
  13. Bogitsh B.J., Krupa P.L. *Schistosoma mansoni* and *Haematolechus medioplexus*: nucleosidediphosphatase location in tegument. *Exptl. Parasitol.* 30: 418–425. 1971.
  14. Strauss O., Graszynski K. Isolation of plasma membrane vesicles from the gill epithelium of the crayfish *Orconectes limosus* Rafinesque and properties of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger. *Comp. Biochem. Physiol.* 102A: 519–526. 1992.
  15. Lazou A. Adenylate metabolizing enzymes in invertebrate tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* 1989. 92B: 175–180.
  16. Pinto R.M., Canales J., Faraldo A., Sillero A., Sillero M.A.G. Cytosol 5'-nucleotidase from *Artemia* embryos. Purification and properties. *Comp. Biochem. Physiol.* 86B: 49–53. 1987.
  17. Umemori-Aikawa Y. An alkaline phosphatase in the clam *Meretrix meretrix lusoria* (Gmelin), with affinities for nucleotides. *Comp. Biochem. Physiol.* 40B: 347–358. 1971.
  18. Кочетов Т.А. Метод определения неорганического фосфора. Практическое руководство по энзимологии. М., 1980. [Kochetov T.A. Metod opredeleniya neorganicheskogo fosfora. Prakticheskoe rukovodstvo po enzimologii [Method of inorganic phosphorus definition. Practical guidelines on enzymology]. Moscow, 1980.]
  19. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265–275. 1951.
  20. Корниш-Бюден Э. Основы ферментативной кинетики. Изд-во Мир, М., 1979. [Kornish-Bouden E. Osnovy fermentativnoj kinetiki [Fundamentals of enzymatic kinetics.]. Moscow. Mir. 1979.]
  21. Fujisawa K., Yoshino M. Activities of adenylate-degrading enzymes in muscles from vertebrates and invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 86: 109–112. 1987.
  22. Arch J.R.S., Newsholme E.A. Activities and some properties of 5'-nucleotidase, adenosine kinase and adenosine deaminase in tissues from vertebrates and invertebrates in relation to the control of the concentration and the physiological role of adenosine. *Biochem. J.* 174: 965–977. 1978.
  23. Буренина Э.А. Влияние антигельминтных препаратов на активность 5'-нуклеотидазы *Bothrioccephalus scorpii* (Cestoda: Bothrioccephalidae). Российский паразитол. журнал. 30: 48–54. 2014. [Burenina E.A. Influence of anthelmintic drugs on activities of 5'-nucleotidase *Bothrioccephalus scorpii* (Cestoda: Bothrioccephalidae) Rossijskij parazitolog. zhurnal. 30: 48–54. 2014. (in Russ.).]
  24. Буренина Э.А. Турбеллярия *Phagocata sibirica*: некоторые ферменты углеводного и энергетического обмена. Ж. эвол. биохим. и физиол. 40: 298–304. 2004. [Burenina E.A. Enzymes of carbohydrate and energetic cycles in the turbellarian *Phagocata sibirica*. J. Evol. Biochem. Physiol. 40 (4): 298–304. 2004. (In Russ.).]
  25. Буренина Э.А. Активность и свойства глюкозо-6-фосфатаз турбеллярии *Phagocata sibirica* и цестоды *Bothrioccephalus scorpii*. Ж. эвол. биохим. физиол. 45 (5): 472–477. 2009. [Burenina E.A. Activities and properties of turbellarian and cestode glucose-6-phosphatases J. Evol. Biochem. Physiol. 2009. 45 (5): 571–578. (in Russ.).]
  26. Буренина Э.А. Активность и свойства фруктозобисфосфатаз турбеллярий *Phagocata sibirica*. Ж. эвол. биохим. физиол. 47: 212–218. 2011. [Burenina E.A. Activity and properties of fructose bisphosphatase of turbellaria *Phagocata sibirica*. J. Evol. Biochem. Physiol. 47 (3): 251–259. 2011. (in Russ.).]

## Phosphohydrolases in Turbellaria *Phagocata Sibirica*

E. A. Burenina<sup>a,#</sup> and M. I. Zhukovskaya<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

<sup>b</sup> Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

<sup>#</sup>e-mail: burenina@ibss.dvo.ru

Activity and properties of two phosphohydrolases, nucleoside diphosphatase (NDPase) and 5'-nucleotidase, were assayed in subcellular fractions of the turbellaria *Phagocata sibirica* Sabussov (Turbellaria, Planariidae). The highest activity of NDPase was observed in microsomes while that of 5'-nucleotidase in mitochondria and cytosolic fractions (12000 and 105000 g). The correlation between the rates of the relevant enzymatic reactions and concentrations of substrates and metal ions as well as the impact of various effectors and divalent cations ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) on phosphohydrolase activities were studied.

**Keywords:** nucleoside diphosphatase, 5'-nucleotidase, turbellaria, *Phagocata sibirica*, mitochondria, microsomes, effectors, ions