

УДК 577.1.576.895.122

**ФОСФАТАЗЫ ЦЕСТОД *BOTHRIOCEPHALUS SCORPII* И ВЛИЯНИЕ
НА НИХ АНТГЕЛЬМИНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

© Э. А. Буренина

Биолого-почвенный институт ДВО РАН
пр. 100-летия Владивостока, 159, Владивосток, 690022
E-mail: burenina@ibss.dvo.ru
Поступила 12.04.2007

Изучены активности и свойства аденозинтрифосфатаз и глюкозо-6-фосфатаз в митохондриальных и микросомальных фракциях цестод *Bothriocephalus scorpii*. Наибольшая активность этих ферментов наблюдалась в митохондриальных фракциях. Изучено влияние различных ионов и эффекторов. Испытано действие 10 антгельминтных препаратов на активность ферментов. Наиболее эффективными для АТФазы были трихлорофен, битионол, оксинид, Г-937 и Г-1028, а для Г-6-Фазы — оксинид, битионол, Г-937, Г-1028, ацемидофен.

Углеводный и энергетический обмен гельминтов значительно отличается от подобного обмена позвоночных, что может быть основой для рационального поиска новых антгельминтных препаратов. Основным путем катаболизма углеводов в большинстве клеток является гликолиз, в ходе которого с помощью ферментов гликолитической последовательности реакций глюкоза превращается в пировиноградную кислоту. Обратный процесс — превращение пирувата в глюкозу (глюконеогенез) — наиболее общий путь биосинтеза углеводов. Последней необратимой ступенью глюконеогенеза является образование глюкозы из глюкозо-6-фосфата (Г-6-Ф), осуществляемое при участии глюкозо-6-фосфатазы (Г-6-Фазы). Узловым моментом энергетического обмена является образование и гидролиз молекул АТФ в митохондриях. Митохондриальная аденозинтрифосфатаза (АТФаза) является самым высокомолекулярным компонентом АТФазного комплекса. Изучение возможности блокировки этих процессов у гельминтов антгельминтными препаратами представляет значительный практический интерес с точки зрения разработки высокочувствительной биохимической модели для предварительного отбора препаратов. Информация об АТФазах плоских червей немногочисленна в противоположность обширным данным по млекопитающим, дрожжам и бактериям. У трематод *Schistosoma mansoni*, *Fasciola hepatica*, *Calicophoron ijimai*, *Eurytrema pancreaticum* (Бенедиктов, 1982; Савченко, 1983; Буренина, 1993) и цестод *Schistocephalus solidus*, *Penetrocephalus ganapati* (Walker, Barrett, 1983; Dhandayuthapani, Nellaiappan, 1989) изучались в тканях. С помощью гистохимических методов фермент изучал-

ся у цестод и трематод (Moczon, 1973; Cesari et al., 1981; Rahman et al., 1981; Podesta, McDiarmid, 1982; Noel, Soares de Moura, 1986). Укоренилось мнение, что Г-6-Фаза существует в печени и почках животных, где играет важную роль в освобождении глюкозы и глюкозо-6-фосфата, который продуцируется из гликогена и глюкозо-6-фосфата предшественников. Изучая активности и возможности фермента в мышцах позвоночных и беспозвоночных, Сурхолт и Ньюшолм (Surholt, Newsholme, 1981) пришли к выводу, что Г-6-Фазная активность присутствует в различных мышцах представителей животного царства. В книге Д. Барретта (Barrett, 1981) есть данные о присутствии Г-6-Фазы в гельминтах. Этот фермент был изучен в нематодах (Srivastava et al., 1970a; Hutchinson, Fernando, 1974; Anwar et al., 1977), трематодах (Yusufi, Siddiqui, 1978; Sharma, Mandawat, 1983; Tielens et al., 1991; Выхрестюк, Буренина, 2001), цестодах (Moczon, 1973; Kortling, Barrett, 1977; McManus, Sterry, 1982; Humiczewska, 1989).

Целью настоящей работы является изучение активности и свойств аденозинтрифосфатаз и глюкозо-6-фосфатаз в цестодах *Bothriocephalus scorpii* из отряда Pseudophyllidea Carus 1963, сем. Bothriocephalidae Blanch, 1849, паразитирующих в пилорических придатках бычка Брандта (*Myoxocephalus brandti*) из залива Петра Великого, а также установление возможности ингибирования АТФазной и Г-6-Фазной систем некоторыми препаратами, обладающими антгельминтной активностью.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Ботриоцефалов собирали из живых бычков на сейнерах и доставляли в лабораторию в термосах в растворе Рингера. Для приготовления ферментных экстрактов *B. scorpii* гомогенизировали с 10 объемами среды выделения по методике, описанной ранее (Vykhrestyuk et al., 1984). Полученный гомогенат центрифугировали 15 мин при 1000 г и 1 °С. Надосадочную жидкость центрифугировали 30 мин при 12 000 г — это цитозольная фракция. Митохондрии промывали средой выделения и центрифугировали 30 мин при 12 000 г. Для получения микросомальной фракции цитозоль 12 000 г центрифугировали при 105 000 г в течение 60 мин.

Концентрации ионов, субстратов, кофакторов, ферментного экстракта, буфера и рН были выбраны такими, которые обеспечивали максимальную скорость реакции. Инкубационная среда для определения АТФазы (НФ 3.6.1.3) была следующего состава (мМ): 200 трис-малеатный буфер рН 9.0, 1 ЭДТА, 2 NaCl, 2 KCl, 4–6 MgCl₂, 4 MnCl₂, 4–6 CaCl₂. Объем пробы 1.2 мл, количество энзимного экстракта — 0.1–0.15 мг. Активность Г-6-Фазы (НФ 3.1.3.9) определяли по методу Юнга и др. (Yeung et al., 1967). Анализируемая среда содержала (мМ): 200 трис-малеатного буфера, рН 7.2, 6–8 MgCl₂, 0.1–0.15 мг энзимного экстракта. Перед добавлением субстратов (3 мМ АТФ и 70–80 мМ Г-6-Ф) пробы преинкубировали в водяной бане при 37 °С в течение 10 мин. После добавления субстрата пробы инкубировали 30 мин в водяной бане, реакцию останавливали добавлением 0.5 мл 20%-ного ТХУ и охлаждением на льду. Пробы центрифугировали 15 мин при 4000 об/мин. В надосадочной жидкости измеряли содержание неорганического фосфора по Кочетову (1980). Определение белка в энзимных экстрактах проводили по Лоури и др. (Lowry et al., 1951). Константы Михаэлиса (K_m) определяли графически (Корниш-Боуден, 1979).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Максимум АТФазной активности в митохондриальной и микросомальной фракциях *B. scorpii* находится в области рН 9.0, а Г-6-Фазной — при рН 7.2.

Было изучено распределение АТФазной активности по субклеточным фракциям (табл. 1). Наибольшая АТФазная активность приурочена к митохондриям. В большинстве животных клеток АТФаза в основном присутствует в митохондриях и общая активность митохондриальной АТФазы составляет около 60—90 % общей активности АТФаз клетки (Ивашенко, 1982). Одной из главных функций АТФазы является активный транспорт неорганических катионов через мембрану. Изучая влияние различных ионов металлов на АТФазную активность *B. scorpii*, установили, что решающее влияние оказывает ионный состав среды инкубации. При отсутствии ионов в среде инкубации гидролиз АТФ во всех фракциях идет с низкой скоростью (табл. 1). Одновалентные катионы (K^+ , Na^+), введенные в среду инкубации, незначительно увеличивали гидролиз АТФ, а двухвалентные катионы изменяли картину ферментативной активности. Как известно, Mg^{2+} необходим для всех ферментативных реакций, включающих перенос фосфатных групп. Митохондриальная Mg^{2+} -активируемая АТФаза играет существенную роль в окислительном фосфорилировании. У *B. scorpii* активность Mg^{2+} -АТФазы выше в микросомах, чем в митохондриях, однако Mn^{2+} - и Ca^{2+} -зависимые АТФазы имели достаточно высокую активность в митохондриальной фракции. Насыщение ионами Mg^{2+} и Ca^{2+} наступало при 4 мМ в микросомальных фракциях и при 6 мМ — в митохондриальных, Mn^{2+} — при 4 мМ в обеих фракциях. Зависимость величины K_m митохондриальных и микросомальных АТФаз *B. scorpii* от присутствия различных двухвалентных катионов представлена в табл. 2. Ионы двухвалентных катионов по-разному влияют на активность АТФаз, выделенных из других паразитических червей. С помощью гистохимических методов показано, что почти во всех тканях *Fasciola hepatica* и онкосферах *Hymenolepis diminuta* присутствуют Mg^{2+} - и Ca^{2+} -зависимые АТФазы (Moczon, 1973; Резник, 1984). Цитохимически было установлено, что тегумент *Ceylonocotyle scoliocoelium* содержит Ca^{2+} -АТФазу, но не Mg^{2+} -АТФазу (Roy, 1980). Сходная картина наблюдается

Таблица 1

Влияние различных ионов на АТФазную активность цестод *Bothriocephalus scorpii* (нмоль Р/мин/мг белка)

Table 1. Influence of different ions on ATPase activity of cestodes *Bothriocephalus scorpii* (in nmol P/min/mg of protein)

| Ионы | Исследуемая фракция | | |
|-------------|---------------------|----------------|----------------|
| | Цитозоль | Митохондрии | Микросомы |
| Без ионов* | 0 | 2.87 ± 0.41 | 1.07 ± 0.09 |
| + K^+ | 0 | 4.89 ± 0.37 | 2.84 ± 0.26 |
| + Na^+ | 0 | 10.47 ± 0.29 | 4.99 ± 0.16 |
| + Mg^{2+} | 13.63 ± 1.18 | 87.00 ± 1.45 | 95.63 ± 9.46 |
| + Mn^{2+} | 45.06 ± 0.50 | 179.32 ± 16.40 | 156.46 ± 15.66 |
| + Ca^{2+} | 41.28 ± 1.68 | 174.86 ± 17.60 | 135.51 ± 3.22 |

Примечание. * — Инкубационная среда содержала (мМ): трис-200, ЭДТА — 1, АТФ — 3, белок — 0.1—0.15 мг.

Таблица 2

Кинетические параметры аденозинтрифосфатаз *Bothriocephalus scorpii* в зависимости от присутствия двухвалентных катионов

Table 2. Kinetic parameters of adenosine triphosphatase of *Bothriocephalus scorpii* upon bivalent cations

| Исследуемая фракция | Катионы и их параметры | | | | | |
|---------------------|------------------------|------------------|------------------------|------------------|-------------------------|------------------|
| | Mg ²⁺ | | Mn ²⁺ | | Ca ²⁺ | |
| | K _m | V _{max} | K _m | V _{max} | K _m | V _{max} |
| Митохондрии | 2.7 · 10 ⁻³ | 133.33 | 4.8 · 10 ⁻³ | 400.0 | 66.7 · 10 ⁻³ | 1052.63 |
| Микросомы | 3.3 · 10 ⁻³ | 200.0 | 3.1 · 10 ⁻³ | 250.0 | 10.5 · 10 ⁻³ | 434.78 |

Примечание. K_m выражена в М, V_{max} — в нмолях Р/мин/мг белка.

ся в пищеварительном и половом трактах *Ascaris suum* (Langer et al., 1972). Внесение в среду инкубации ионов Mg²⁺ вызывало увеличение активности АТФаз личинок *Trichinella spiralis* (Agosin, Aravena, 1959), *F. hepatica* (Савченко, 1983), *Ascaris suum* (Повякель, 1968), *Schistosoma mansoni* (Podesta, McDiarmid, 1982), *Calicophoron ijimai* и *Eurytrema pancreaticum* (Буренина, 1993). Считается, что двухвалентный катион необходим для создания субстратного комплекса АТФазы (Болдырев, 1985), причем не АТФ, а комплекс Mg²⁺-АТФ (Mn²⁺-АТФ) является истинным субстратом для митохондриальных и других АТФаз.

Самыми сильными ингибиторами АТФазной реакции *B. scorpii* являются азид натрия и фторид натрия, особенно в микросомальной фракции (табл. 3), что согласуется с данными, полученными для АТФаз *C. ijimai* и *E. pancreaticum* (Буренина, 1993).

Исследовано распределение Г-6-Фаз по субклеточным фракциям (табл. 4), наибольшая активность локализована в митохондриальной фракции *B. scorpii*. У *E. pancreaticum* и *C. ijimai* Г-6-Фаза изучалась в митохондриях и микросомах, причем у *C. ijimai* активность была выше в митохондриях, а у *E. pancreaticum* — в микросомах (Выхрестюк, Буренина, 2001). У *F. hepatica* фермент изучался в микросомах (Prichard, Schofield, 1968), у *Bunostomum trigonocephalum* (Kumar, 1987), *A. lumbricoides* (Barrett, Beis, 1973), *Litomosoides carinii* (Srivastava et al., 1970b) и свободноживущих нематод *Panagrellus rudivivus* и *Turbatrix aceti* (Cooper, Ferguson, 1972) — в гомогенатах, а у *Ascaridia galli* (Srivastava et al., 1970a) — в экстрактах 1300 г, митохондриях и микросомах. Диапазон активностей Г-6-Фазы у гельминтов колеблется в пределах от 0.05—0.09 (Barrett, Beis, 1973; Korting, Barrett, 1977) до 39.6 нмолей Р/мин/мг белка (McManus, Sterry, 1982; Выхрестюк, Буренина, 2001). Максимальные каталитические активности Г-6-Фазы были изучены в большинстве мышц из позвоночных и беспозвоночных (Surholt, Newsholme, 1981). Диапазон активностей от 0.1 до 8.0 мкмоль Р/мин/мг белка: наивысшая активность, наблюдаемая в летательных мышцах осы *Vespa vulgaris*, подобна печени крысы.

Глюкозо-6-фосфатаза, являясь металлопротеином, требует обязательного присутствия иона Mg²⁺. В отсутствии ионов Mg²⁺ активность фермента *B. scorpii* уменьшается в цитозоле 12 000 г на 115 %, в цитозоле 105 000 г — на 54 %, в митохондриях — на 223 %, в микросомах — на 24 %. Изучая влияние концентрации Mg²⁺ на активность Г-6-Фаз, обнаружили, что насыщение среды инкубации наступало в микросомальной фракции при 6 мМ, а в митохондриальной — при 8 мМ. Зависимость величины K_m митохондриаль-

Таблица 3

Эффект ионов и ингибиторов на АТФазную активность *Bothriocephalus scorpii* (% от контроля)Table 3. Influence of ions and inhibitors on ATPase activity of *Bothriocephalus scorpii* (in % to control)

| Ионы, ингибиторы | Mg ²⁺ | Mn ²⁺ | Ca ²⁺ |
|--|------------------|------------------|------------------|
| Митохондрии | | | |
| Среда инкубации | 100 | 100 | 100 |
| + NaN ₃ (5 мМ) | -48.3 | -50.2 | -27.3 |
| + NaSCN (5 мМ) | -3.8 | -21.4 | 0 |
| + NaF (30 мМ) | -37.2 | -31.3 | -79.0 |
| + HCO ₃ ⁻ (3 мМ) | +12.6 | +37.2 | -9.9 |
| + АДФ (3 мМ) | +100.5 | +128.1 | +110.8 |
| + 2.4-ДНФ (20 мМ) | +38.3 | +47.9 | -2.7 |
| + ПХМБ (5 · 10 ⁻⁴ М) | -29.7 | +10.6 | -35.5 |
| + ПХМБ + ДТТ | -19.3 | -12.0 | -13.9 |
| Микросомы | | | |
| Среда инкубации | 100 | 100 | 100 |
| + NaN ₃ (5 мМ) | -60.6 | -100 | -100 |
| + NaSCN (5 мМ) | -20.2 | -67.5 | 0 |
| + NaF (30 мМ) | -100 | -42.5 | -100 |
| + HCO ₃ ⁻ (3 мМ) | +66.0 | +100 | -81.5 |
| + АДФ (3 мМ) | +144.9 | +105.2 | +82.1 |
| + 2.4-ДНФ (20 мМ) | +66.7 | +39.6 | -6.4 |
| + ПХМБ (5 · 10 ⁻⁴ М) | -90.3 | -1.4 | +3.6 |
| + ПХМБ + ДТТ | +88.5 | +46.2 | +32.0 |

ных и микросомальных фракций от присутствия ионов Mg²⁺ представлена в табл. 5. Некоторые авторы при определении активности Г-6-Фазы в инкубационную среду не вносили ионы Mg²⁺ (Prichard, Scofield, 1968; Cooper, Ferguson, 1972), однако для определения фермента в личинках и взрослых *A. lumbricoides* было необходимо 5 мМ Mg²⁺, а в *A. galli*, *S. cervi* и *L. carinii* — 10 мМ Mg²⁺ (Srivastava et al., 1970a, b; Anwar et al., 1977).

Скорость Г-6-Фазной реакции растёт с увеличением количества добавленного субстрата, оставаясь постоянной при концентрации его в пробе в

Таблица 4

Распределение активности глюкозо-6-фосфатаз *Bothriocephalus scorpii* по субклеточным фракциям (в нмолях Р/мин/мг белка)Table 4. Distribution of activities of glucose-6-phosphatases of *Bothriocephalus scorpii* subcellular fractions (nmol P/min/mg of protein)

| Исследуемая фракция | Активность |
|---------------------|--------------|
| Цитозоль 12 тыс. g | 7.12 ± 0.67 |
| Митохондрии | 26.40 ± 3.50 |
| Цитозоль 105 тыс. g | 5.59 ± 0.25 |
| Микросомы | 8.60 ± 1.08 |

Таблица 5

Кинетические параметры глюкозо-6-фосфатаз
*Bothriocephalus scorpii*Table 5. Kinetic parameters of glucose-6-phosphatases
of *Bothriocephalus scorpii*

| Исследуемая фракция | Глюкозо-6-фосфат | | Mg ²⁺ | |
|---------------------|--------------------------|------------------|--------------------------|------------------|
| | K _m | V _{max} | K _m | V _{max} |
| Митохондрии | 66.7 · 10 ⁻³ | 71.43 | 28.57 · 10 ⁻³ | 153.84 |
| Микросомы | 833.3 · 10 ⁻³ | 80.0 | 2.0 · 10 ⁻³ | 21.74 |

Примечание. K_m выражена в М, V_{max} — в нмолях Р/мин/мг белка.

митохондриальной фракции 70 мМ, в микросомальной фракции — 80 мМ. Величины K_m митохондриальных и микросомальных фракций представлены в табл. 5. Насыщение фермента субстратом у разных гельминтов происходило при разных концентрациях Г-6-Ф: в личинках и взрослых *A. lumbricoides* — при 8 мкМ (Saz, Lescure, 1967), в личинках *H. contortus* и взрослых *L. carinii* — при 10 мкМ (Srivastava et al., 1970b), в *A. galli*, *S. cervi*, *C. ijimai*, *E. pancreaticum* (Srivastava et al., 1970a; Anwar et al., 1977; Выхрестюк, Буренина, 2001) — при 10 мМ, в плероцеркоидах *S. solidus* и маритах *F. hepatica* (Prichard, Schofield, 1968; Korting, Barrett, 1977) — при 40 мМ, в личинках ранней стадии, юных и взрослых *O. cuniculi* (Hutchinson, Fernando, 1974) и свободноживущих нематодах *P. redivivus* и *T. acetii* (Cooper, Ferguson, 1972) — при 80 мМ.

Для анализа свойств Г-6-Фазы было исследовано влияние различных эффекторов на активность фермента *B. scorpii*. Глюкоза, являясь конечным продуктом Г-6-Фазной реакции, активирует митохондриальную (+ 56 %) и микросомальную (+ 3.4 %) Г-6-Фазу *B. scorpii*. NaF в концентрации 2 мМ активирует митохондриальную на 10.5 % и ингибирует микросомальную Г-6-Фазу на 15.8 %. В микросомах *F. hepatica* Г-6-Фаза также была ингибирована NaF (Prichard, Schofield, 1968). При введении аниона HCO⁻³ в концентрации 20 мМ в инкубационную среду увеличивалась активность Г-6-Фазы в митохондриальной фракции на 132 %, а в микросомальной — на 45 %. Цитрат в концентрации 10 мМ угнетал активность митохондриального фермента на 46.3 %, а микросомального — на 36 %. В связи с тем что двухвалентные катионы являются ингибиторами Г-6-Фазы, интересно было посмотреть влияние Cu²⁺ (10 мМ) на активность фермента *B. scorpii*. Катион Cu²⁺ ингибирует Г-6-Фазу в митохондриальной фракции на 9.5 %, в микросомальной — на 22.6 %.

Дитиотрейтол (ДТТ) в концентрации 0.1 мМ активировал митохондриальную Г-6-Фазу *B. scorpii* на 50.7 %, но ингибировал микросомальную на 11.3 %. ЭДТА оказывает специфическое действие на мембранные структуры, что, видимо, объясняется образованием комплексов с двухвалентными катионами. Мы обнаружили, что ЭДТА в концентрации 1 мМ угнетает и митохондриальные (41.1 %), и микросомальные (34.0 %) Г-6-Фазы *B. scorpii*. Изучая Г-6-Фазу в гомогенатах и микросомах мышц взрослых *A. lumbricoides* и личинок, авторы (Saz, Lescure, 1967) вводили в среду инкубации 5 мкмоль Mg²⁺ и 0.25 мкмоль ЭДТА. По сравнению с контрольными пробами (без Mg²⁺ и ЭДТА) активность фермента в гомогенатах мышц взрослых *A. lumbricoides* увеличивалась в 30 раз, в гомогенатах личинок —

Таблица 6

Влияние антгельминтных препаратов на активность аденозинтрифосфатаз в митохондриях *Bothriocephalus scorpii* (% от контроля)

Table 6. Influence of anthelmintic preparations on activity of adenosine triphosphatases in mitochondrions of *Bothriocephalus scorpii* (% to control)

| Антгельминтные препараты (10^{-4} М) | Ca ²⁺ -АТФаза | Mn ²⁺ -АТФаза | Mg ²⁺ -АТФаза |
|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Битионол | -32.9 | -28.05 | -58.6 |
| Оксинид | -9.8 | -38.35 | -45.2 |
| Г-937 | -11.6 | -39.50 | -72.8 |
| Г-1028 | +5.4 | -46.60 | -71.6 |
| Празиквантель | -5.5 | +1.8 | -8.3 |
| Трихлорофен | -56.6 | -52.1 | -75.6 |
| Ацемидофен | -6.3 | +5.5 | -10.2 |
| Тиабендазол | -6.1 | +3.0 | -13.8 |
| Фенбендазол | -10.4 | +15.9 | -25.5 |
| Политрем | -7.2 | +9.7 | -29.5 |

в 1.5 раза, а в микросомах мышц взрослых и личинок — в 5 и 2.7 раза соответственно. Хотя Г-6-Фаза из печени млекопитающих ингибировалась АТФ и АДФ (Nordlie, 1974), но они не имели ингибирующего эффекта на митохондриальные и микросомальные Г-6-Фазы *B. scorpii*. АТФ активировал митохондриальный фермент на 742 %, а микросомальный — на 2096 %, а АДФ — на 207.5 и 407.5 % соответственно.

Подводя итог проведенным экспериментам, можно сделать вывод, что митохондриальные и микросомальные фракции обладают АТФазной активностью, зависимой от присутствия катионов Mg²⁺, Mn²⁺, Ca²⁺, и Г-6-Фазной активностью.

АТФаза является одной из парциальных реакций окислительного фосфорилирования, изменение активности которой под влиянием антгельмин-

Таблица 7

Влияние антгельминтных препаратов на активность глюкозо-6-фосфатаз *Bothriocephalus scorpii* (% от контроля)

Table 7. Influence of anthelmintic preparations on activity of glucose-6-phosphatases of *Bothriocephalus scorpii* (% to control)

| Антгельминтные препараты (10^{-4} М) | Митохондрии | Микросомы |
|---|-------------|-----------|
| Битионол | -28.8 | +40.7 |
| Оксинид | -43.7 | -17.4 |
| Г-937 | -24.6 | -18.6 |
| Г-1028 | 31.8 | +10.4 |
| Празиквантель | -6.5 | +4.5 |
| Трихлорофен | -10.2 | +15.0 |
| Ацемидофен | -1.1 | -36.2 |
| Тиабендазол | -12.5 | +20.8 |
| Фенбендазол | -5.4 | -7.1 |
| Политрем | -8.7 | +3.4 |

тика может привести к серьезным нарушениям энергетического обмена гельминта. При работе АТФазной системы принимает участие только цепь переноса энергии, что позволяет в чистом виде наблюдать действие ингибиторов. Было испытано действие ряда антгельминтных препаратов из разных групп активных соединений на активность митохондриальных АТФаз (табл. 6). Карбаматбензимидазолы, имеющие различные заместители в положении 5 (6) бензимидазольного кольца, действуют на снижение массы паразитов в хозяине. К этому ряду соединений относятся тиабендазол и фенбендазол, которые у гельминтов резко снижают потребление и обмен экзогенной глюкозы по сравнению с контролем (McCracken, Taylor, 1983). Эти препараты незначительно ингибируют Ca^{2+} - и Mg^{2+} -АТФазы *B. scorpionis*, а Mn^{2+} -АТФазу активируют. Трихлорофен и битионол, являясь противотрематодозными и противощестодозными средствами, вызывают необратимое нарушение двигательной активности цестод и трематод, ведут к разрушению тегумента. Трихлорофен сильнее всех антгельминтиков ингибировал все три АТФазы *B. scorpionis*. Битионол (представитель бисфенола), оксинид (производное битионола), препараты Г-937 и Г-1028 (представители салициланилинов) сильнее ингибировали Mg^{2+} -АТФазу, чем Ca^{2+} - и Mg^{2+} -АТФазы. Среди средств лечения цестодозов заслуживает особого внимания празиквантел, обладающий высокой активностью по отношению к молодым и половозрелым цестодам теплокровных животных, но на АТФазы *B. scorpionis* этот препарат не оказывает заметного действия. Наши данные согласуются с данными по ингибированию АТФаз антгельминтиками, полученными для *S. mansoni*, *F. hepatica*, *E. pancreaticum*, *S. ijimai* (Nechay et al., 1980; Бенедиктов, 1982; Савченко, 1986; Буренина, 1993).

Глюкозо-6-фосфатаза освобождает глюкозу из мышечного гликогена и глюконеогенных продуктов. Изменение ее активности под влиянием антгельминтных препаратов может привести к нарушениям активного транспорта и энергетического обмена. Результаты влияния антгельминтных препаратов на активность митохондриальных и микросомальных Г-6-Фаз *B. scorpionis* представлены в табл. 7. Наиболее эффективным антгельминтиком для митохондриальной Г-6-Фазы был оксинид, Г-1028 и битионол, а для микросомальной — ацемидофен, Г-937 и оксинид. Остальные антгельминтики в митохондриальной фракции имели незначительный ингибирующий эффект, а в микросомальной фракции даже активировали фермент. Митохондриальная Г-6-Фаза *S. ijimai* ингибировалась тиабендазолом на 36.2, битионолом — на 29.4; Г-1028 — на 28.3; фенбендазолом — на 27.1; оксинидом — на 21.5 % (Выхрестюк, Буренина, 2001). Других данных по влиянию антгельминтиков, изучаемых нами, на активность Г-6-Фазы не обнаружили.

Анализируя данные о действии антгельминтных препаратов на Mg^{2+} -, Ca^{2+} - и Mn^{2+} -АТФазы и Г-6-Фазы, можно сделать вывод, что АТФазы более чувствительны к изучаемым препаратам. Поэтому АТФаза может быть хорошей моделью для установления действия антгельминтных препаратов, затрагивающих энергетический обмен цестод.

Список литературы

- Бенедиктов И. И. 1982. Пути биологического окисления и энергетический обмен у гельминтов и биохимический механизм действия антгельминтиков: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М. 48 с.
- Болдырев А. А. 1985. Биологические мембраны и транспорт ионов. М.: Изд-во. МГУ. 207 с.
- Буренина Э. А. 1993. Аденозинтрифосфатазы трематод, паразитирующих у крупного рогатого скота, и влияние на них некоторых антгельминтных препаратов. Паразитология. 27 (5) : 396—403.
- Выхрестюк Н. П., Буренина Э. А. 2001. Углеводный обмен и его регуляция у трематод. Владивосток: Дальнаука. 201 с.
- Ивашенко А. Т. 1982. Анионные аденозинтрифосфатазы. Алма-Ата: Наука. 138 с.
- Корниш - Боуден Э. 1979. Основы ферментативной кинетики. М.: Мир, 271 с.
- Кочетов Г. А. 1980. Метод определения неорганического фосфора. В кн.: Практическое руководство по энзимологии. М.: Высшая школа. 215—216.
- Повякель Л. И. 1968. Аденозинтрифосфатазная активность в митохондриях мышечной ткани аскариды (*Ascaris suum* Goeze, 1758). Мед. паразитол. и паразит. болезни. 37 (5) : 530—533.
- Резник Г. К. 1984. Гистохимическое исследование некоторых фосфогидролаз у фасциолы обыкновенной. В кн.: Биохимия и физиология гельминтов и иммунитет при гельминтозах. М.: Наука. 117—121.
- Савченко А. В. 1983. Фосфорилирующая и АТФазная активности митохондрий *Fasciola hepatica*. Бюл. Всесоюз. ин-та гельминтологии. 35 : 67—68.
- Савченко А. В. 1986. Особенности энергетического обмена у *Fasciola hepatica* и влияние на него некоторых фасциолоцидных препаратов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М. 27 с.
- Agosin M., Aravena L. C. 1959. Anaerobic glycolysis in homogenates of *Trichinella spiralis* larvae. Exptl. Parasitol. 8 (1) : 10—30.
- Anwar N., Ansari A. A., Ghatak S., Krishna Murti C. R. 1977. *Setaria cervi*: enzymes of glycolysis and PEP-succinate. Z. Parasitenk. 51 (2) : 275—283.
- Barrett J. 1981. Biochemistry of parasitic helminths. L.; Basingstoke: McMillan. 307 p.
- Barrett J., Beis I. 1973. Studies on glycolysis in the muscle tissue of *Ascaris lumbricoides* (Nematoda). Comp. Biochem. Physiol. 44 (3B) : 751—761.
- Cesari T. M., Simpson A. J. G., Evans W. H. 1981. Properties of a series of tegumental membrane-bound phosphohydrolase activities of *Schistosoma mansoni*. Biochem. Journ. 198 (3) : 467—473.
- Cooper S. C., Ferguson J. H. 1972. The effect of cold acclimation upon glucose-6-phosphatase activity in two species of free-living nematodes — I The effect pH. Comp. Biochem. Physiol. 42 (3A) : 781—789.
- Dhandayuthapani S., Nellaiappan K. 1989. Mitochondrial adenosine triphosphatase of *Penetrocephalus ganapatii* (Cestoda: Pseudophyllidea) in relation to activators and inhibitors. Proc. Indian. Acad. Sci. Anim. Sci. 98 (4) : 249—257.
- Humiczewska M. 1989. The activity of some phosphatases in tissues of adult *Hymenolepis nana siebold* (Cestoda). Folia Biol. 37 (3—4) : 171—179.
- Hutchinson G. W., Fernando M. A. 1974. Enzymes of glycolysis and the pentose phosphatase pathway during development of the rabbit stomach worm *Obeliscoides cuniculi*. Int. Journ. Parasitol. 4 (4) : 389—395.
- Korting W., Barrett J. 1977. Carbohydrate catabolism in the plerocercoides of *Schistocephalus solidus* (Cestoda: Pseudophyllidea). Int. Journ. Parasitol. 7 (5) : 411—417.
- Kumar S. 1987. *Bunostomum trigonocephalum*: the in vitro effects of anthelmintics on the enzyme activities. Helminthologia. 24 (2) : 133—140.
- Langer B. W. Jr., Smith W. J., Theodorides V. J. 1972. Nematode metabolism: the adenosine triphosphate of *Ascaris suum* muscle. Biochem. Journ. 128 (4) : 991—992.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journ. Biol. Chem. 193 (1) : 265—275.
- McCracken R. O., Taylor D. D. 1983. Biochemical effects of thiabendazole and cambendazole on *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) in vivo. Journ. Parasitol. 69 (2) : 295—301.
- McManus D. P., Sterry P. R. 1982. *Ligula intestinalis*: intermediary carbohydrate metabolism in plerocercoids and adults. Z. Parasitenkd. 67 (1) : 73—85.

- Moczon T. 1973. Histochemical studies on the enzymes of *Hymenolepis diminuta*. II Nonspecific and specific phosphatases in oncospheres and cysticercoïdes. *Acta parasitol. pol.* 21 (1-10) : 99-106.
- Nechay B. R., Hillman G. R., Dotzon M. J. 1980. Properties and drug sensitivity of adenosine triphosphatases from *Schistosoma mansoni*. *Journ. Parasitol.* 66 (4) : 596-600.
- Noel F., Soares de Moura R. 1986. *Schistosoma mansoni*: preparation, characterization of (Na⁺ + K⁺) ATPase from tegument and carcass. *Exptl. parasitol.* 62 (2) : 298-307.
- Nordlie R. C. 1974. Metabolic regulation by multifunctional glucose-6-phosphatase. In: *Current topics in cellular regulation.* 8 : 33-117.
- Podesta R. B., McDiarmid S. S. 1982. Enrichment and partial enzyme characterization of ATPase activity associated with the outward-facing membrane complex and inward-facing membrane of the surface epithelial syncytium of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 6 (4) : 225-236.
- Prichard R. K., Schofield P. J. 1968. The glycolytic pathway in adult liver fluke *Fasciola hepatica*. *Comp. Biochem. Physiol.* 24 (3) : 697-710.
- Rahman M. S., Mettrick D. F., Podesta R. B. 1981. Properties of a Mg²⁺-dependent and Ca²⁺-inhibited ATPase localized in the brush border of the surface epithelial syncytium of a parasitic flatworm. *Canad. Journ. Zool.* 59 (6) : 918-923.
- Roy T. K. 1980. Distribution, functional significance of phosphatases in the bovine amphistome *Ceylonocotyle scoliocoelium*. *Indian Journ. Exp. Biol.* 18 (4) : 385-392.
- Saz H. J., Lescure O. L. 1967. Gluconeogenesis, fructose-1.6-diphosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase activities of *Ascaris lumbricoides* adult muscle and larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* 22 (1) : 15-28.
- Sharma P. N., Mandawat S. 1983. Phosphohydrolases of *Paramphistomum cervi* (Digenea: Paramphistomatidae). *Acta parasitol. pol.* 28 (40) : 381-392.
- Srivastava V. M. L., Ghatak S., Krishna Murti C. R. 1970a. *Ascaridia galli*: lactic acid production, glycogen content, glycolytic enzymes and properties of purified aldolase, enolase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Parasitol.* 60 (2) : 157-180.
- Srivastava V. M. L., Chatterjee R. K., Sen A. B., Ghatak S., Krishna Murti C. R. 1970b. Glycolysis in *Litomosoides carinii* the filarial parasite of the cotton rat. *Exptl. Parasitol.* 28 (2) : 176-185.
- Surholt B., Newsholme E. A. 1981. Maximum activities and properties of glucose-6-phosphatase in muscles from vertebrates and invertebrates. *Biochem. Journ.* 198 (3) : 621-629.
- Tielens A. G. M., Van der Meer P., Van den Heuvel J. M., Van den Bergh S. G. 1991. The enigmatic presence of all gluconeogenetic enzymes in *Schistosoma mansoni* adults. *Parasitol.* 102 (2) : 267-276.
- Vykhrestyuk N. P., Burenina E. A., Yarygina G. V. 1984. Fermentation and the properties of some enzymes of carbohydrate metabolism in the trematode *Calicophoron iji-mai*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 13 (2) : 20-38.
- Walker R. W., Barrett J. 1983. Mitochondrial adenosine triphosphatase activity and temperature, adaptation in *Schistocephalus solidus* (Cestoda: Pseudophyllidea). *Parasitol.* 87 (3) : 307-326.
- Yeung D., Stanley R. S., Oliver I. T. 1967. Development of gluconeogenesis in neonatal rat liver. *Biochem. Journ.* 105 (3) : 1219-1227.
- Yusufi A. N. K., Siddiqi A. H. 1978. Some aspects of carbohydrate metabolism of digenetic trematodes from indian water buffalo and catfish. *Z. Parasitenkd.* 56 (1) : 47-53.

PHOSPHATASES OF CESTODES BOTHRIOCEPHALUS SCORPII
AND INFLUENCE OF SOME ANTHELMINTIC PREPARATIONS
ON ACTIVITIES OF THESE ENZYMES

E. A. Burenina

Key words: Cestoda, *Bothriocephalus scorpii*, adenosine triphosphatase, glucose-6-phosphatase, anthelmintic, mitochondrion, microsomes.

SUMMARY

Activities and properties of adenosine triphosphatases and glucose-6-phosphatases in microsomal fractions of cestodes *Bothriocephalus scorpii* were studied. The highest activity of these enzymes was observed in mitochondrial fractions. The influence of different ions and effectors is studied. The effect of 10 anthelmintic preparations on activities of the enzymes was investigated. Trichlorophen, bitionol, oxinide, G-937 and G-1028 were found to be most effective preparations for ATPases. Oxinide, bitionol, G-937, G-1028, and acemidophene were the most effective preparations for G-6-Pases.
