

**ФОСФОЭНОЛПИРУВАТКАРБОКСИКИНАЗА
У CALICOPHORON ERSCHOWI
(TREMATODA: PARAMPHISTOMIDAE)**

В. И. Ключкова

Биолого-почвенный институт ДВНЦ АН СССР, Владивосток

У трематоды *Calicophoron erschowi* обнаружена высокоактивная фосфоэнолпируваткарбоксикиназа. Фермент проявляет высокую степень специфичности к субстрату, наличию ионов Mn^{++} и инозиндифосфату, имеет оптимум pH 6.0. Аланин не оказывает влияния на активность. Антгельминтик сульфид оксинид в концентрации $1.4 \cdot 10^{-6}$ М ингибирует активность на 93%. Показана зависимость активности от концентрации субстрата, инозиндифосфата и ионов марганца.

В тканях гельминтов ферменты, участвующие в анаэробном распаде углеводов, изучены довольно подробно. При этом особое внимание уделяли изучению ФЭП-карбоксикиназы в связи с тем, что этот фермент играет различную роль в углеводном обмене паразитических червей и их хозяев. У позвоночных животных она является ключевым энзимом на пути синтеза углеводов из неуглеводных предшественников, т. е. одним из ключевых энзимов глюконеогенеза (Ильин, Усатенко, 1965; Усатенко, 1966; Flores, Alleyne, 1971). В обмене углеводов гельминтов ФЭП-карбоксикиназа является ключевым энзимом, связывающим гликолиз с дикарбоновым участком цикла Кребса на пути образования сукцината и летучих жирных кислот (Сопрунов, Аннабаева, Лайнис, 1974; Prescott, Campbell, 1965; Saz, Lescure, 1967, 1969; Bueding, Saz, 1968; Prichard, Schofield, 1968). Известно также, что распад углеводов в анаэробных гельминтах в направлении сукцината или лактата контролируется активностями конкурирующих энзимов: пируваткиназы (КФ, ПК 2.7.1.40) и ФЭП-карбоксикиназы (Bueding, Saz, 1968; McManus, 1975; Prichard, 1976), превращающими один и тот же субстрат ФЭП либо в пируват и далее в молочную кислоту (ПК), либо в щавелево-уксусную кислоту и затем в сукцинат и летучие жирные кислоты (ФЭП-карбоксикиназа). Активность этих ферментов неодинакова у разных гельминтов и соответствует особенностям среды их обитания (Prichard, Schofield, 1968; Saz, 1970; Prichard, 1976). У гельминтов-анаэробов ПК малоактивна или отсутствует вообще; у гельминтов-аэробов активность фермента высока (Köhler, 1974).

Однако различия этих особенностей гликолиза изучены лишь у небольшого числа трематод, таких как *Fasciola hepatica* (Аннабаева, Сопрунов, 1973; Prichard, Schofield, 1968; Prichard, 1976), *Dicrocoelium dendriticum* и *Schistosoma mansoni* (Bueding, Saz, 1968; Brazier, Jaffe, 1973; Köhler, 1974), несмотря на то что знание этих особенностей у различных трематод имеет большое значение в практическом отношении, поскольку помогает выявить наиболее уязвимое для действия антгельминтных препаратов звено в их обмене.

Данная работа посвящена определению активности и некоторых особенностей ФЭП-карбоксикиназы трематод *Calicophoron erschowi* (Davudova, 1959), паразитирующей в рубце крупного рогатого скота, с целью

получения исходных данных, необходимых для последующего изучения антгельминтных препаратов на этот жизненно важный для гельминта фермент. Эти трематоды наносят ущерб животноводству Дальнего Востока, однако надежных способов лечения крупного рогатого скота от заболевания, которое они вызывают, не разработано.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты ставили на половозрелых особях *C. erschowi*, которых извлекали из рубца крупного рогатого скота сразу же после забоя животных, и помещали в термос со средой Гедон-Флейга. Перед гомогенизацией червей несколько раз промывали раствором, в котором они содержались, и слегка осушали фильтровальной бумагой. Гомогенизацию проводили в течение 2—3 мин с 5 объемами охлажденного 0.01 М трис-НСI буфера, рН 7.2 с 2 мМ ЭДТА. Гомогенат центрифугировали при 12 000 g в течение 15 мин. Осадок отбрасывали, а супернатант снова центрифугировали при 100 000 g в течение 30 мин в рефрижераторной центрифуге Vac-60. 100 000 g супернатант использовали как источник цитоплазматического энзима. Активность его при 0—4° была постоянной в течение нескольких дней.

При изучении митохондриальной формы ФЭП-карбоксикиназы¹ митохондрии готовили по методу Мустафы и Хочачки (Mustafa, Hochačka, 1973). Приготовление цитозола и выделение митохондрий проводили при температуре 2—4°. Наличие митохондрий подтверждалось фазово-контрастной и электронной микроскопией.

Плохо растворимый в воде препарат сульфид-оксид растворяли в 96° этаноле. Помимо контрольной пробы без препарата, ставился второй контроль на «спирт», чтобы убедиться в отсутствии ингибиторного действия этанола. Ингибирование выражали в процентах (отношение разности активности фермента в контрольной и опытной пробах к активности в контрольной пробе).

Активность ФЭП-карбоксикиназы (КФ 4.1.1.32) измеряли по методам, описанным в работах Бюдинга и Саза (Bueding, Saz, 1968) и Мустафы и Хочачки (1973). Инкубационная смесь содержала (мкМ/1 мл): имидазольный буфер рН 6.0 — 100; KHCO_3 — 20; MnCl_2 — 1; ИДФ — 1; ФЭП — 2; НАДН — 0.2. Биологический материал вносили в объеме 0.1 мл, что соответствовало 0.40—0.43 мг белка. Реакцию начинали добавлением субстрата. Активность фермента измеряли на спектрофотометре СФ-16 при 340 нм. Измерение оптической плотности регистрировали через каждую минуту в течение 5 мин. Активность фермента выражали в нмолях окисленного НАДН за 1 мин на 1 мг белка. Для расчета активности использовали молярный коэффициент экстинкции пиридиннуклеотидов (Kornberg, Horecker, 1955). Константы Михаэлиса определяли графически, методом двойных обратных величин по Лайнуиверу-Берку (Диксон, Уэбб, 1966). Белок определяли по Лоури (Lowry e. a., 1951).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Активность митохондриальной ФЭП-карбоксикиназы у калифорнонов не обнаруживается. В каждом случае вся активность появлялась в растворимой части цитоплазмы.

Результаты определения ФЭП-карбоксикиназной активности в диапазоне рН 5.0—8.0 представлены на рис. 1. Энзим в присутствии Mn^{++} имеет максимум активности при рН 6.0. Кривая рН имеет крутой подъем от рН 5.0 до рН 6.0 и довольно крутой спуск от рН 6.0 до рН 8.0. Показатели рН были определены до и после окончания реакции. Ни в одном случае не было замечено изменения рН в течение реакции.

¹ Принятые сокращения: ФЭП — фосфоэнолпируват, ИДФ — инозиндифосфат, ГДФ — гуанозиндифосфат, ЭДТА — этилендиаминтетраацетат, АДФ — аденозиндифосфат; МДГ — малатдегидрогеназа.

Оптимальная величина рН 6.0 для действия ФЭП-карбоксикиназы из каликофоронов аналогична той, которая характерна для этого фермента из других гельминтов: у *F. hepatica* рН 5.9; у *H. diminuta* рН 6.2 (Аннабаева, 1973; Prescott, Campbell, 1965, Prichard, Schofield, 1968).

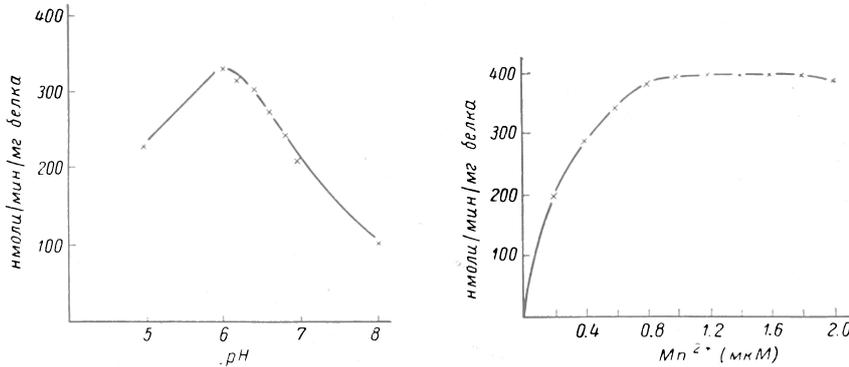


Рис. 1. Влияние рН на ФЭП-карбоксикиназную активность.

Инкубационная среда содержала (в мкМ/мл): 100 имидазольного буфера с разными рН; KHCO_3 — 20; Mn^{++} — 1; ИДФ — 1; ФЭП — 2; НАДН — 0.2; биологический материал — 0.1 мл.

Рис. 2. Влияние концентрации ионов Mn^{++} на ФЭП-карбоксикиназную активность.

Инкубационная среда содержала (в мкМ/мл): 100 имидазольного буфера рН 6.0; KHCO_3 — 20; ИДФ — 1; ФЭП — 2; НАДН — 0.2; разные концентрации ионов Mn^{++} ; биологический материал — 0.1 мл.

Известно, что ФЭП-карбоксикиназа для проявления активности требует присутствия металл-нуклеотидного комплекса (Mustafa, Hoshchka, 1973). Нами испытано влияние Mn^{++} , Mg^{++} , Zn^{++} , Fe^{++} и Cu^{++} на активность фермента при разных показателях рН. Оказалось, что

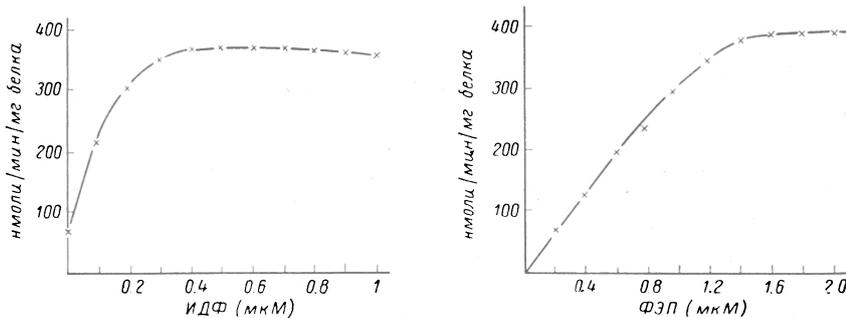


Рис. 3. Влияние концентрации ИДФ на ФЭП-карбоксикиназную активность.

Инкубационная среда содержала (в мкМ/мл): 100 имидазольного буфера рН 6.0; KHCO_3 — 20; Mn^{++} — 1; ФЭП — 2; НАДН — 0.2; разные концентрации ИДФ; биологический материал — 0.1 мл.

Рис. 4. Влияние концентрации ФЭП на ФЭП-карбоксикиназную активность.

Инкубационная среда содержала (в мкМ/мл): 100 имидазольного буфера рН 6.0; KHCO_3 — 20; Mn^{++} — 1; ИДФ — 1; НАДН — 0.2; разные концентрации ФЭП; биологический материал — 0.1 мл.

только Mn^{++} образует активный металл-нуклеотидный комплекс. Максимальную активность фермент проявляет при концентрации Mn^{++} , равной 1 мкМ (рис. 2). Увеличение концентрации Mn^{++} вызывает незначительное ингибирование энзима. Величина K_M для Mn^{++} равна $5.1 \cdot 10^{-4} \pm \pm 0.89$. Необходимость ионов Mn^{++} для проявления активности ФЭП-карбоксикиназы отмечена у *F. hepatica* (Аннабаева, 1973; Prichard, Schofield, 1968), у *S. mansoni* (Bueding, Saz, 1968) и *H. diminuta* (Prescott, Campbell, 1965).

Кривая насыщения ИДФ для ФЭП-карбоксикиназы представлена на рис. 3. Она имеет гиперболический характер со значением K_M (ИДФ), равной $1.55 \pm 0.05 \cdot 10^{-4}$ М. Наибольшую активность этот фермент проявляет при концентрации ИДФ, равной 0.4 мкМ. Более высокие концентрации до 1 мкМ не оказывали ингибирующего влияния. Ингибирование фермента ИДФ наблюдали только тогда, когда его концентрация превышала концентрацию двухвалентного катиона. Исключение нуклеотида приводит к падению активности до 19% от активности полной системы (см. таблицу). Кроме ИДФ, были испытаны другие нуклеотиды ГДФ и АДФ. Из них наибольшей специфичностью обладает ИДФ, 40% от активности с ИДФ фермент проявлял с ГДФ и совсем неактивным кофактором был АДФ.

Зависимость ФЭП-карбоксикиназной активности от кофакторов и субстратов

Условия проведения опыта	Специфическая активность (нмоль/мин/мг) белка	Активность (%)
Полная система	354.06 ± 5.04	100
Система без Mn^{++}	0.00	0.00
Mn^{++} заменен Mg^{++} , Zn^{++} , Fe^{++} , Cu^{++}	0.00	0.00
Система без ИДФ	67.31	19.0
Система с ГДФ	141.86	40.0
Система с АДФ	0.00	0.00
Система без ФЭП	0.00	0.00
ФЭП заменен пируватом	0.00	0.00
Система без экзогенной МДГ	353.05 ± 4.65	99.7
Система с аланином	322.21 ± 36.14	—
Система без аланина	321.23 ± 36.98	—
Система с сульфид оксинидом	24.09 ± 1.07	7.0

Интересно отметить, что в тканях моллюсков, которые филогенетически относительно близки к гельминтам, ФЭП-карбоксикиназа проявляет аналогичные потребности в ионах Mn^{++} и ИДФ (Simpson, Awaraга, 1964).

Кривая насыщения ФЭП для действия ФЭП-карбоксикиназы представлена на рис. 4. Показана четкая зависимость фермента в отношении субстрата. При замене субстрата ФЭП пируватом ферментативная активность отсутствовала. Наибольшая активность фермента отмечена при концентрации ФЭП около 1.6 мкМ. Увеличение концентрации субстрата до 2 мкМ не вызывало изменения активности. Аналогичные данные получены для ФЭП-карбоксикиназы аскарид, фасциол и сколексов альвеококка (Аннабаева, 1973), а также для этого фермента из *Moniezia expansa* (Behm, Bryant, 1975). Такие же концентрации субстрата были необходимы для анаэробов-моллюсков (Mustafa, Hochachka, 1973). Величина K_M (ФЭП) для цитозольной ФЭП-карбоксикиназы из тканей каликофоронов равна $3.55 \pm 0.17 \cdot 10^{-3}$ М.

Добавление кристаллической МДГ в инкубационную среду не повышает измеряемую активность энзима. Так, активность ФЭП-карбоксикиназы из тканей каликофоронов при добавлении экзогенной МДГ составляет 354.06 ± 5.04 нмоль/мин/мг белка, без МДГ — 353.05 ± 4.65 . Из этих данных видно, что в тканях каликофоронов эндогенная МДГ содержится в больших количествах. Это подтверждает хорошо известный факт о наличии высокой активности этого энзима в тканях гельминтов (Bueding, Saz, 1968; Saz, Lescure, 1969).

Как известно, аланин, образованный во время анаэробноза, ингибирует активность пируваткиназы гельминтов, давая возможность ФЭП-карбоксикиназе образовывать оксалоацетат (McManus, James, 1975) и тем самым стимулируя активность ФЭП-карбоксикиназы при низких

концентрациях ФЭП (Mustafa, Hochachka, 1973). Наши результаты показали, что аланин не влияет на активность энзима из каликофоронов (см. таблицу). Проверено также действие антгельминтного препарата сульфид оксинида, синтезированного в Лаборатории синтеза новых препаратов Института медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е. И. Марциновского, на активность фермента. Выяснено, что оксинид в концентрации $1.4 \cdot 10^{-6}$ ингибирует активность фермента на 93%.

Таким образом, в тканях трематоды *C. erschowi* показано наличие высокоактивной ФЭП-карбоксикиназы и изучены ее особенности. Активность фермента строго специфична в отношении субстрата и кофакторов (ионов марганца и ИДФ), имеет оптимум pH 6.0, сосредоточена в цитозоле и ингибируется сульфид оксинидом. Оптимум активности отмечен при концентрации ФЭП 1.6 мМ, K_m (ФЭП) = $3.55 \pm 0.17 \cdot 10^{-3}$ М. Эти данные в целом соответствуют результатам, полученным другими исследователями для других гельминтов, в частности для трематоды *F. hepatica* (Сопрунов, Аннабаева, 1973; Prichard, Schofield, 1968; Prichard, 1976). Активность ПК у каликофоронов составляет 37.66 ± 0.98 нмоль окисленного НАДН/мин/мг белка (Выхрестюк, Клочкова, Буренина, 1977). Известно, что отношение активности ПК к активности ФЭП-карбоксикиназы служит показателем направленности углеводного обмена. Оно меньше единицы у тех паразитических червей, конечными продуктами гликолиза которых являются сукцинат и летучие жирные кислоты, и больше единицы — у гельминтов, которые метаболизируют глюкозу до молочной кислоты (Bueding, Szaz, 1968). Отношение активности ПК к активности ФЭП-карбоксикиназы у каликофоронов составляет 0.1. При таком отношении активностей гликолиз у червей идет в направлении образования сукцината, т. е. через ФЭП-карбоксикиназу. Такой путь превращения углеводов у *C. erschowi*, по-видимому, не является исключением.

Однако при изменении содержания кислорода в среде, окружающей организм гельминта, возможно, что ПК явится ферментом, способным контролировать превращение ФЭП в направлении лактата или сукцината, как это было показано рядом авторов (Köhler, 1974; Bryant, 1972в; Prichard, 1976) для других гельминтов.

Все эти данные подтверждают своеобразие путей обмена у кишечных гельминтов, что, видимо, является результатом их длительной адаптации к паразитическому образу жизни.

Л и т е р а т у р а

- А н н а б а е в а Г. Д. 1973. Фосфоэнолпируваткарбоксикиназная система гельминтов *Ascaris suum*, *Fasciola hepatica*, *Alveococcus multilocularis* и возможность ее торможения антгельминтными препаратами. Автореф. канд. дис.: 1—16.
- А н н а б а е в а Г. Д., С о п р у н о в Ф. Ф. 1973. Фосфоэнолпируваткарбоксикиназная система у гельминтов *Ascaris suum* и *Fasciola hepatica*. — Биохимическая эволюция. Изд-во «Наука», Л., 27—31.
- С о п р у н о в Ф. Ф., А н н а б а е в а Г. Д., Л а й н и с Ю. Я. 1974. Роль разветвленных летучих жирных кислот в окислительных процессах митохондрий анаэробных беспозвоночных. Митохондрии. Регуляция процессов окисления и сопряжения. Изд-во «Наука», М., 136—140.
- В ы х р е с т ю к Н. П., К л о ч к о в а В. И., Б у р е н и н а Э. А. 1977. Особенности углеводного обмена у трематоды *Paramphistomum* sp. — паразита коровы. Экология гельминтов. Ярославский государ. ун-т, 1: 15—25.
- Д и к с о н М., У э б б Э. 1966. Ферменты. Изд-во «Мир», М.: 1—200.
- И л ь и н В. С., У с а т е н к о М. С. 1965. Синтез ФЭП (фосфоэнолпирувата), его регуляция и значение в глюконеогенезе. Усп. биол. хим., 7: 196—209.
- У с а т е н к о М. С. 1966. Фосфоэнолпируваткарбоксикиназа печени эмбрионов и новорожденных млекопитающих. Журн. эвол. биохим. и физиол., 2, 1: 83—84.
- В e h m С. А., В r y a n t С. 1975. Studies of regulatory metabolism in *Moniezia expansa*: The role of phosphoenolpyruvate carboxykinase. Int. J. Parasit., 5, 2: 347—354.
- В r a z i e r J. В., J a f f e J. J. 1973. Two of pyruvate kinase in Schistosomes and Filarie. Comp. Biochem. Physiol., 44, 1B, 145—155.
- В r y a n t С. 1972. Metabolic regulation in *Moniezia expansa* (Cestoda): the role of pyruvate kinase. Int. J. Parasitol., 2, 2, 333—340.

- B u e d i n g E., S a z H. J. 1968. Pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase activities of *Ascaris* muscle, *Hymenolepis diminuta* and *Schistosoma mansoni*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 24, 3 : 511—518.
- F l o r e s H., A l l e y n e G. A. O. 1971. Phosphoenolpyruvate carboxykinase of kidney subcellular distribution and response to acidbase changes. *Biochem. J.*, 123, 1 : 35—39.
- K ö h l e r P. 1974. Metabolic role of pyruvate kinase in the trematode *Dicrocoelium dendriticum*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 49, 2B: 335—344.
- K o r n b e r g A., H o r e c k e r B. 1955. *Methods in Enzymology*. Acad. Press. N. Y., 1 : 322.
- L o w r y O. H., R o s e b r o u g h N. J., F a r r A. L., R a n d a l l R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 1 : 265—275.
- M c M a n u s D. P. 1975. Pyruvate kinase in the plerocercoid of *Ligula intestinalis* (Cestoda : Pseudophyllidea). *Int. J. Biochem.*, 6, 2 : 79—84.
- M c M a n u s D. P., J a m e s B. L. 1975. The aerobic metabolism of ^{14}C -sugars and $^{14}\text{CO}_2$ by the daughter sporocysts of *Microphallus similis* (Jag.) and *Microphallus pygmaeus* (Levinsen) (Digenea : Microphallidae). *Int. J. Parasitol.*, 5, 2 : 177—182.
- M u s t a f a T., H o c h a c h k a P. W. 1973. Enzymes in facultative anaerobiosis of molluscs-II. Basic catalytic properties of phosphoenolpyruvate carboxykinase in oyster adductor muscle. *Comp. Biochem. Physiol.*, 45, 3B : 639—655.
- P r e s c o t t L. M., C a m p b e l l J. W. 1965. Phosphoenolpyruvate carboxylase activity and glycogenesis in the flatworm *Hymenolepis diminuta*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 14, 3 : 491—511.
- P r i c h a r d R. K. 1976. Regulation of pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in adult *Fasciola hepatica*. *Int. J. Parasit.*, 6, 3 : 227—234.
- P r i c h a r d R. K., S c h o f i e l d P. J. 1968B. Phosphoenol pyruvate carboxykinase in the adult liver fluke *Fasciola hepatica*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 24, 3 : 773—785.
- S a z H. J. 1970. Comparative energy metabolism of some parasitic helminths. *J. Parasitol.*, 56, 4 : 634—642.
- S a z H. J., L e s c u r e 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.
- S a z H. J., L e s c u r e O. L. 1969. The functions of phosphoenolpyruvate carboxykinase and malic enzyme in the aerobic formation of succinate by *Ascaris lumbricoides*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 30, 1 : 49—60.
- S i m p s o n J. W., A w a p a r a J. 1964. Phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, 12, 12, 457—464.

PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE IN THE TREMATODE
CALICOPHORON ERSCHOWI

V. I. Klochkova

S U M M A R Y

The trematode *Calicophoron erschowi* possesses high active phosphoenolpyruvate carboxykinase. Enzyme activity is concentrated in the cytoplasm. The enzyme has the optimum pH 6.0 and is active in the presence of ions Mn^{++} and inosine diphosphate. Alanine does not affect its activity. Sulphide oxinide in concentration $1.4 \cdot 10^{-6}$ M inhibits the activity up to 93%. Some kinetic characteristics are presented.
