

**ЦИТОЗОЛЬНАЯ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗА
В ТРЕМАТОДАХ CALICOPHORON IJIMAI¹
И ВЛИЯНИЕ НА ЕЕ АКТИВНОСТЬ
НЕКОТОРЫХ ПРОТИВОПАЗИТАРНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

Н. П. Выхрестюк, А. Ю. Хаматова

Биолого-почвенный институт ДВНЦ АН СССР, Владивосток

Определены активность и свойства малатдегидрогеназы (МДГ) НАД-зависимой, а также «малик»-энзима в цитозоле трематод *Calicophoron ijimai*. Изучено влияние некоторых противопаразитарных препаратов на активность МДГ.

Известно, что гельминты, адаптировавшиеся к жизни в анаэробных условиях, обладают низкой активностью пируваткиназы (ПК) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ), поэтому гликолиз идет у них через присоединение CO₂ к фосфоэнолпирувату, катализируемое очень активным у них ферментом фосфоэнолпируваткарбоксихиназой (ФЭПКК). Образующаяся при этом щавелевоуксусная кислота быстро выводится из реакции, восстанавливаясь высокоактивной малатдегидрогеназой (МДГ) в малат. Таким образом, МДГ выполняет важную роль в углеводном обмене гельминтов, являясь вторым ферментом метаболического шунта, обходящего пируваткиназную реакцию. Активность МДГ в тканях гельминтов-анаэробов велика и достигает 1400—5430 нмоль НАДН₂/мин на мг белка (Bueding, Saz, 1968; van den Bossche e. a., 1971). Активность этого фермента в тканях *Schistosoma mansoni*, паразитирующих в аэробных условиях в кровяном русле, составляет 136—368 нмоль (Bueding, Saz, 1968).

Однако свойства МДГ у различных паразитических червей изучены пока еще недостаточно. Наша работа посвящена определению активности и некоторых биохимических особенностей цитозольной МДГ трематод *Calicophoron ijimai* (Fukui, 1922) Näsmark, 1937 (Trematoda, Paramphistomidae) (syn. *Calicophoron erschowi* Davidova, 1959, Дворянkin, Ермоленко, 1981), паразитирующих в рубце крупного рогатого скота, и изучению влияния на активность этого фермента противофасциозных препаратов Г-937, Г-1026 и Г-1028 (Михайлицин и др., 1981), а также битионола, очень эффективного при парамфистоматозах (Васильев и др., 1967) и его производного оксинида.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Половозрелых трематод извлекали из поджелудочной железы и рубца крупного рогатого скота сразу же после забоя животных и помещали в термос со средой Гедона—Флейга. Перед гомогенизацией червей несколько раз промывали раствором, в котором они содержались, и слегка подсушивали фильтровальной бумагой. Гомогенизацию проводили в течение 2—3 мин с 5 объемами охлажденного 0.01 М трис-HCL буфера pH 7.2, содержащего 2 мМ ЭДТА. Извлечение белка из гомогенизированных червей проводили этим же буфером

¹ Систематическое положение изучаемых червей было определено сотрудником Лаборатории общей гельминтологии Биолого-почвенного института ДВНЦ АН СССР В. А. Дворянkinым, за что авторы выражают ему искреннюю благодарность.

в течение 18—20 ч при постоянном помешивании на холоду. Для определения МДГ использовали супернатант после осаждения митохондрий при 12 000 g. Предварительные опыты показали, что активность МДГ не меняется в цитозоле после осаждения микросомальной фракции при 1000 000 g.

Активность МДГ (L-малат: НАД оксидоредуктаза, НФ 1.1.1.37) в прямой и обратной реакции определяли по Причарду и Шоффилду (Prichard, Schofield, 1968), активность «малик»-энзима (L-малат: НАДФ оксидоредуктаза, декарбоксилирующая, НФ 1.1.1.40) — по Очоа (Ochoa, 1955). Подробный состав полной инкубационной смеси указан в подписях к рисункам. Конечный объем 3 мл. Реакцию начинали добавлением субстрата. Активность фермента измеряли по изменению поглощения восстановленного НАД при 340 нм. Изменение оптической плотности регистрировали каждые 10 сек в течение 1 мин. Активность

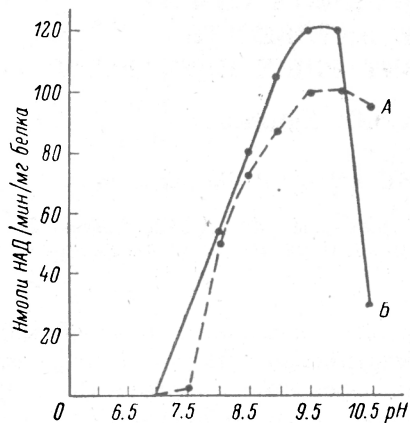


Рис. 1. Влияние pH на активность МДГ каликофоронов (малат → оксалоацетат). Полная реакционная смесь содержала в мМ: триэтанол-аминовый (A) или трис-НСЛ (B) буфер с разными значениями pH — 54, малат — 6.7, НАД — 0.2, белок 0.4—0.5 мг.

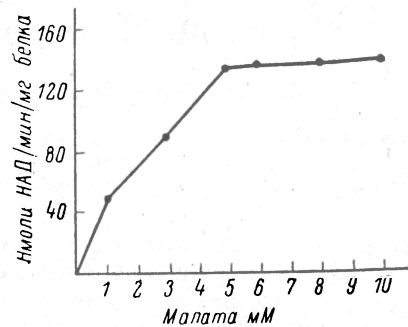


Рис. 2. Влияние концентрации малата на активность МДГ. Полная реакционная смесь содержала в мМ: триэтанол-аминовый буфер pH 9.0 — 54, малат — разные концентрации, НАД — 0.2, белок — 0.4—0.5 мг.

фермента выражали в нмолях окисленного или восстановленного НАД и НАДФ в мин/мг белка. Для расчета активности использовали молярный коэффициент экстинкции пиридиннуклеотидов (Norecker, Kornberg, 1948). Кажущиеся константы Михаэлиса (K_m) определяли графически методом двойных обратных величин по Лайнуверу—Бэрку. Белок определяли по Лоури (Lowry e. a., 1951). Полученные данные обрабатывали статистически (Асатиани, 1965).

Препараты Г-937, Г-1026, и Г-1028 синтезированы в Институте медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е. И. Марциновского (Михайлицин и др., 1981) и относятся к замещенным салициланилидам. Битионол и сульфидоксинид являются производными бисфенолов.

Антгельминтные препараты растворяли в 96%-ном этаноле, нейтрализовали до pH реакционной смеси и добавляли в пробу перед инкубацией. Параллельно ставили контроль «на спирт», чтобы убедиться в отсутствии ингибиторного действия этанола. Определение изозимных спектров МДГ проводили по прописям Шу и Коэна (Shaw, Коэн, 1968). Для этого 1 г червей замораживали, растирали в агатовой ступке и экстрагировали белки 0.01 М трис-НСЛ буфером pH 7.4, содержащим 2 мМ ЭДТА. Затем экстракт центрифугировали в рефрижераторной центрифуге при 15 000 g 20 мин. Супернатант служил источником белка. Электрофорез в полиакриламидном геле проводили по Мауреру (1971). Изозимы МДГ окрашивались раствором, содержащим в 25 мл: 2 М малата натрия — 1.5 мл, НАД — 18 г, нитросинего тетразолия — 10 мг, феназинметасульфата — 0.6 мг, 0.1 М трис-НСЛ буфера pH 8.5 до 25 мл, проявлялись 30 мин при 37°. Контроль без малата.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Активность МДГ в прямой реакции составляет 127 ± 11 нмолей НАД/мин/мг белка, в обратной — 1761 ± 54 нмоля НАДН₂/мин/мг белка. Оптимум рН для МДГ в прямой реакции находится при рН 9.5—10 в триэтаноламиновом (рис. 1) и в трис-НСL буферах. Насыщение субстратом происходит при 5 мМ малата (рис. 2). Кривая насыщения субстратом имеет форму гиперболы. Кажущаяся константа Михаэлиса K_M составляет $4.2 \cdot 10^{-3}$ М, максимальная скорость реакции V_{max} — 250 нмолей. Оптимум рН для МДГ, работающей в направлении оксалоацетат → малат, при определении в триэтаноламиновом буфере составляет 9.0 (рис. 3), в имидазольном — 9.5; примерно в таких же пределах находится и оптимум рН из *Fasciola hepatica* (Probert, Jwin, 1977). Насыщение

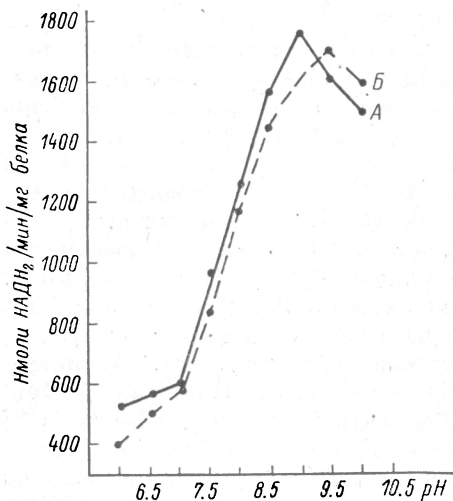


Рис. 3. Влияние рН на активность МДГ (оксалоацетат → малат). Полная реакционная смесь содержала в мМ: триэтаноламиновый (А) или имидазольный (Б) буфер с разными значениями рН — 54, ЭДТА — 5, НАДН₂ — 0.17, оксалоацетат — 0.3, белок — 0.4—0.5 мг.

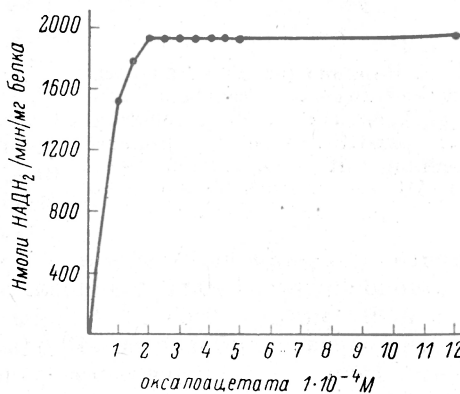


Рис. 4. Влияние концентрации оксалоацетата на активность МДГ каликофоронов. Полная реакционная смесь содержала в мМ: триэтаноламиновый буфер рН 9.0 — 54, ЭДТА — 5, НАДН₂ — 0.17, оксалоацетат — разные концентрации, белок — 0.4—0.5 мг.

оксалоацетатом происходит при концентрации его 0.3 мМ (рис. 4). Дальнейшее повышение его концентрации до 1.2 мМ не влияет на реакцию. Кривая насыщения оксалоацетатом имеет форму гиперболы. Кажущаяся K_M составляет $1.3 \cdot 10^{-4}$ М, V_{max} — 3333 нмоля/мин/мг белка. Цитозольная НАД-зависимая МДГ представлена в каликофоронах 3 изозимами, которые в щелочном полиакриламидном геле имеют относительные электрофоретические подвижности 0.20, 0.24 и 0.47. Изозимы МДГ у гельминтов изучены еще мало. Особенно мало работ по изозимам МДГ трематод. Колес (Coles, 1971) обнаружил отчетливые различия в изоферментных спектрах МДГ у шистозом. Так, во взрослой и церкариях *Schistosoma haematobium* автором обнаружено по 2 изозима МДГ, у *S. mansoni* церкарии и взрослые самки имеют по 4 изозима, самцы — по 2 изозима.

В цитозольной фракции каликофоронов присутствует «малик» фермент, активность которого составляет 43—131 нмоль НАД/мин/мг белка. Максимальная активность фермента проявляется при рН 8.5 (рис. 5). Противопаразитарные препараты Г-937, Г-1026, Г-1028, битионол и оксинид, добавленные в различных концентрациях к среде Гедона—Флейга с антибиотиками, приводили к гибели каликофоронов через 36 ч уже при концентрации ингибитора в среде $1 \cdot 10^{-5}$ М. Контрольные черви при инкубации в такой же среде без препаратов были хорошо подвижны в течение 48 ч и более. Изучение влияния этих препаратов на превращение оксалоацетата в малат показало, что наибольшей антгельминтной активностью против этого звена обмена являются бисфенолы битионол и его

нитропроизводное оксинид (см. таблицу). Они вызывают неконкурентное ингибирование. Несколько менее эффективен салициланилид Г-1028 и еще менее Г-937 и Г-1026. Препараты вызвали конкурентное ингибирование. Сильное угнетение активности МДГ и ФЭПКК бисфенолами показано ранее (Аннабаева и Сопрунов, 1973; Бенедиктов, 1978). Возможно, что именно это звено обмена блокируется бисфенолами и обуславливает их противопаразитарную активность.

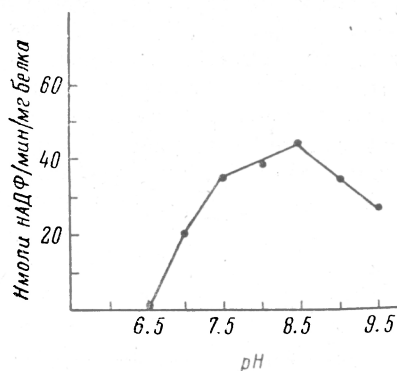


Рис. 5. Влияние pH на активность «малик»-энзима каликофорона. Полная реакционная смесь содержала в мМ: трис-HCl буфера с разными значениями pH — 50, малат — 7, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ — 0.2, НАДФ — 0.2, белок — 0.4—0.5 мг.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Цитозольная МДГ в каликофоронах имеет большее сродство к оксалоацетату. Активность ее в этом направлении выше в 14 раз, максимальная скорость реакции выше в 13 раз, кажущаяся K_M ниже почти на 1 порядок. Это подтверждает протекание гликолиза в этих паразитических червях через присоединение CO_2 к фосфоэнолпирувату с помощью ФЭПКК. Ранее в нашей лаборатории было показано наличие высокоактивной ФЭПКК в каликофоронах (Ключкова, 1979). Высокая активность ФЭПКК должна быть уравновешена высокой активностью МДГ для

быстрого удаления из реакции образующегося оксалоацетата. Аналогичная закономерность была установлена и на фасциолах. По данным Причарда и Шофилда (Prichard, Schofield, 1968), активность цитозольной МДГ в сторону образования малата в 19.6 раза выше, по данным Проберта и Джвина (Probert, Jwin, 1977), скорость превращения оксалоацетата в малат цитозольной МДГ в 6.6. раза превышает скорость обратной реакции. Цитозольная МДГ, более активная с оксалоацетатом, чем с малатом, обнаружена также в кишечных цестодах (van den Bossche e. a., 1971; McManus, 1975) и нематодах (Ануа, Умезурике, 1978). Такая закономерность отмечена лишь для кишечных гельминтов, обитающих в анаэробных условиях. В гельминтах-аэробах активность МДГ одинакова в обоих направлениях (Bueding, Saz, 1968). В то же время подобная закономерность характерна и для других беспозвоночных, ведущих анаэробный образ жизни (Хочачка и Сомеро, 1977; Шапиро и Бобкова, 1975). МДГ

Влияние противопаразитарных препаратов на активность МДГ из *Calicophoron ijimai*

Ингибитор	Концентрация (М/л)	Активность МДГ (нмоли НАДФ _н /мин/мг белка)	% ингибирования
Без ингибитора		991 ± 22	
Оксинид	$1 \cdot 10^{-5}$	909 ± 45	9
Без ингибитора		1190 ± 48	
Оксинид	$1 \cdot 10^{-4}$	719 ± 48	40
»	$2 \cdot 10^{-4}$	329 ± 27	72
Битионол	$1 \cdot 10^{-5}$	724 ± 18	39
»	$2 \cdot 10^{-5}$	690 ± 6	42
»	$1 \cdot 10^{-4}$	449 ± 73	62
»	$2 \cdot 10^{-4}$	282 ± 18	76
»	$1 \cdot 10^{-3}$	0	100
Г-1028	$1 \cdot 10^{-4}$	784 ± 26	34
»	$2 \cdot 10^{-4}$	571 ± 44	52
»	$1 \cdot 10^{-3}$	Препарат не растворялся	
Без ингибитора		991 ± 22	
Г-937	$1 \cdot 10^{-5}$	940 ± 31	5
Г-1026	$1 \cdot 10^{-5}$	940 ± 36	5

беспозвоночных — факультативных анаэробов, в том числе и гельминтов, по мнению многих авторов (Bueding, Saz, 1968; van den Bosche e. a., 1971; Köhler, Hanselman, 1973), выполняет две основные функции: во-первых, осуществляет быстрое удаление ЩУК, образовавшейся при карбоксилировании ФЭП, и, во-вторых, обеспечивает окисление цитоплазматического НАДН, образуемого в результате гликолиза. Малат, образованный в результате реакции, является не конечным продуктом, выделяемым в среду, а субстратом для дальнейших превращений. С помощью фумаразы он может превращаться в фумарат и служить акцептором водорода в системе транспорта электронов у каликофоронов. Нами было установлено наличие активной фумаратредуктазной системы в каликофоронах. Кроме того, малат с помощью «малик»-энзима может превращаться в пируват, который после переаминирования с глютаминовой кислотой превращается в аланин, а образовавшийся α -кетоглутарат через сукцинил-КоА далее — в пропионат и сукцинат. В свете этого присутствие «малик»-энзима в цитозоле каликофоронов приводит к мысли, что для этих гельминтов характерны оба пути дальнейшего превращения малата.

Л и т е р а т у р а

- Аннабаева Г. Д., Сопрунов Ф. Ф. Фосфоэнолпируваткарбоксикиназная система у гельминтов *Ascaris suum* и *Fasciola hepatica*. — В кн.: Биохимическая эволюция. Л., Наука, 1973, с. 27—31.
- Асатиани В. С. Новые методы биохимической фотометрии. М., Наука, 1965. 543 с.
- Бенедиктов И. И. Системы транспорта электронов и фосфорилирования у гельминтов. — В кн.: Научные и прикладные проблемы гельминтологии (к 100-летию со дня рождения академика К. И. Скрябина). М., Наука, 1978, с. 10—15.
- Васильев А. А., Матузенко В. А., Горохов В. В., Платонов А. В., Ковалевский В. Б., Задорожный Г. Н., Артеменко Ю. Г., Мороз И. Я. Эффективность битионола при парамфистоматидозах крупного рогатого скота. — Ветеринария, 1967, № 12, с. 50—51.
- Дворядкин В. А., Ермоленко А. В. Видовой состав и распространение парамфистомид жвачных животных на юге Дальнего Востока СССР. — В кн.: Биология и систематика гельминтов животных Дальнего Востока. Владивосток, 1981, с. 35—45.
- Клочкова В. И. Фосфоэнолпируваткарбоксикиназа у *Calicophoron erschowi* (Trematoda: Paramphistomidae). — Паразитология, 1979, т. 13, вып. № 4, с. 391—395.
- Маурер Г. Диск — электрофорез. М., Мир, 1971. 247 с.
- Михайлицин Ф. С., Гику Г. А., Шведова В. И., Лычко Н. Д., Бехли А. Ф., Кротов А. И., Гладких В. Ф. — Автор. свид. СССР № 807609. — Бюлл. изобретений, 1981, № 7.
- Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. М., Мир, 1977. 398 с.
- Шапиро А. З., Бобкова А. Н. Роль малатдегидрогеназы беспозвоночных в адаптации к дефициту кислорода. — ЖЭБиФ, 1975, т. 11, № 5, с. 546—547.
- Апуа А. О., Умезурике Г. М. Respiration and carbohydrate energy metabolism of the lung-dwelling parasite *Rhabdias bufonis* (Nematoda: Rhabdiasoidea). — Parasitol., 1978, vol. 76, N 1, p. 21—27.
- Bossche van den H., Schaper J., Borgers M. Some aspects of carbohydrate metabolism of *Syphacia muris*, the rat pinworm. — Comp. Biochem. Physiol., 1971, vol. 38B, N 1, p. 43—52.
- Bueding E., Saz H. J. Pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase activities of *Ascaris* muscle, *Hymenolepis diminuta* and *Schistosoma mansoni*. — Comp. Biochem. Physiol., 1968, vol. 24, N 2, p. 511—518.
- Coles G. C. Variation in malate dehydrogenase isoenzymes of *Schistosoma mansoni*. — Comp. Biochem. Physiol., 1971, vol. 38B, N 1, p. 35—42.
- Нореккер В. Л., Корнберг А. The extinction coefficients of the reduced band of pyridine nucleotides. — J. Biol. Chem., 1948, vol. 175, N 1, p. 385—390.
- Köhler P., Hanselman K. Intermediary metabolism in *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda). — Comp. Biochem. Physiol., 1973, vol. 45, N 3, p. 825—845.
- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Parr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. — J. Biol. Chem., 1951, vol. 193, N 1, p. 265—268.
- McManus D. P. Pyruvate kinase in the plerocercoids of *Ligula intestinalis* (Cestoda: Pseudophyllida). — Int. J. Biochem., 1975, vol. 6, N 1, p. 79—84.
- Ochoa S. Malic enzyme. — In: Methods in enzymology (Colowick S. P., Kaplan N. O. eds). Acad. Press., 1955, vol. 1, p. 739—753.
- Prichard R. K., Schofield P. J. The glycolytic pathway in adult liver fluke *Fasciola hepatica*. — Comp. Biochem. Physiol., 1968, vol. 24, N 3, p. 697—710.

- Probert A. J., Jwin T. Fasciola hepatica: the subcellular distribution and kinetic and electrophoretic properties of MDH. — Exptl. Parasitol., 1977, vol. 41, N 1, p. 89—94.
- Shaw C. R., Koen A. L. Starch gel zone electrophoresis of enzymes. — In: Chromatographic and electrophoretic techniques. (Ed. J. Smith). New York, 1968, vol. 2, p. 347.

CYTOSOL MALATE DEHYDROGENASE IN THE TREMATODE
CALICOPHORON IJIMAI AND THE EFFECT OF SOME ANTIPARASITIC
DRUGS ON ITS ACTIVITY

N. P. Vykhrestyuk, A. U. Khamatova

S U M M A R Y

The activity and properties of malate dehydrogenase (MDH; EC 1.1.1.37) and of «malic» enzyme (EC 1.1.1.40) in cytosole of the trematode *C. ijimai* were determined. The activity of MDH directed to oxaloacetate formation was shown to be 14 times and maximum velocity 13 times lower than that of the reverse reaction. The apparent K_M was one order higher in the direct reaction. This confirms the possibility of glycolytic pathway in *C. ijimai* via CO_2 fixation into phosphoenolpyruvate to form oxaloacetate which is readily eliminated by active MDH. The presence of «malic» enzyme in *C. ijimai* testifies to the occurrence of different pathways of succinate formation in this species.
