

УДК 576.895.122 : 577.154

**ПИРУВАТКИНАЗА ИЗ ТРЕМАТОД CALICOPHORON IJIMAI
И ВОЗМОЖНОСТЬ ИНГИБИРОВАНИЯ
ЕЕ НЕКОТОРЫМИ АНТГЕЛЬМИНТНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ**

Г. В. Ярыгина, Н. П. Выхрестюк, Э. А. Буренина

Изучены свойства пируваткиназы из цитозоля трематоды *Calicophoron ijimai*. Показано что пируваткиназа может быть ответственна за регулирование гликолиза. Исследовано влияние ряда антгельминтных препаратов на активность пируваткиназы.

Общим в характере метаболизма углеводов у трематод, как и у всех гельминтов, является их неспособность к полному окислению субстратов (Sorgrinov, 1978). Гликолиз у них, протекая до образования фосфоэнолпирувата (ФЭП) по классической схеме Эмбдена—Мейергофа, не всегда заканчивается образованием лактата. У большинства гельминтов-анаэробов предпочтительней дальнейшее превращение ФЭП через карбоксилирование в оксалоацетат, катализируемое фосфоэнолпируваткарбоксикиназой (ФЭПКК) с последующим восстановлением оксалоацетата в малат, который, поступая в митохондрии, превращается в сукцинат или пропионат с помощью фумаразы и фумаратредуктазы, либо с помощью «малик» энзима декарбоксилируется в пируват. При таком превращении ФЭП наблюдается высокая активность ФЭПКК и низкая — пируваткиназы (ПК). Ранее было показано, что отношение активностей ПК и ФЭПКК служит показателем направленности гликолиза у гельминтов (Bueding, Szaz, 1968). Изменение во внутриклеточных концентрациях АТФ, ФДФ, ФЭП и, возможно, H^+ могут контролировать активность ПК у гельминтов, а следовательно, и образование конечных продуктов распада глюкозы (Bryant, 1972; Köhler, 1974; McManus, 1975; McManus, James, 1975; Prichard, 1976). Таким образом, именно ПК отводится роль регулятора относительной скорости протекания обоих процессов внутри точки разветвления ферментативного механизма на уровне ФЭП. Однако из трематод гликолиз изучался только у *Fasciola hepatica*, *F. gigantica* и *Dicrocoelium dendriticum* (Prichard, 1976; Köhler, 1974; Umezurike, Anya, 1979).

Целью наших исследований явилось изучение свойств ПК из трематод *Calicophoron ijimai* (Fukui, 1922) Näsmark, 1937 (Trematoda, Paramphistomidae) и возможности ингибирования фермента некоторыми антгельминтными препаратами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Трематод, собранных у крупного рогатого скота, доставляли в лабораторию в термосе в среде Гедона—Флейга при 37 °С, слегка подсушивали между листами фильтровальной бумаги и растирали в стеклянном гомогенизаторе в 0.01 М трис-НСI буфере рН 7.5 (соотношение ткань/буфер — 1/10) при 0°. Гомогенат центрифугировали в рефрижераторной центрифуге К-24 (ГДР) при 12 000 g в течение 30 мин. Осадок отбрасывали, а супернатант рецентрифугировали при 100 000 g в течение 30 мин на центрифуге Vac-601 (ГДР). Этот супернатант, освобожденный от микросом, использовали для анализа энзима. Активность ПК определяли методом Бюхера и Пфлейдерера (Bücher, Pfliegerer, 1955) по изменению оптической плотности реакционной смеси при 340 нм в течение

3 мин на спектрофотометре СФ-16. Полная реакционная смесь в конечном объеме 3 мл содержала в мМ: трис-НСl буфер рН — 7.5—50, КСl — 75, АДФ — 2, МпСl₂ — 4 или МgСl₂ — 5, ФЭП — 3, НАДН — 0.2, ФДФ — 0.4, ЛДГ — 3.6 ФЕ, энзимный белок — 0.4—0.6 мг. Реакцию начинали добавлением субстрата. Активность фермента выражали в нмолях превращенного субстрата в мин на мг белка. Количество белка в энзимном экстракте определяли методом Лоури с соавторами (Lowry e. a., 1951). Полученные данные обрабатывали статистически (Асатиани, 1965). Кажущиеся константы Михаэлиса (K_M) и константы ингибирования (K_i) вычисляли графически (Lineweaver, Burk, 1934).

Антгельминтные препараты растворяли в этаноле и вносили в опытную пробу в объеме 0.1 мл. Параллельно, чтобы исключить ингибирующее влияние спирта на фермент, ставили контроль на спирт.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Концентрации субстрата, катионов, кофакторов были подобраны так, чтобы получить максимальную активность фермента.

Влияние температуры и рН среды. Реакция шла с большей скоростью, если смесь всех компонентов перед внесением субстрата предварительно инкубировали при 30° в течение 5 мин. ПК каликофоронов проявляла максимумы активности при рН 6.5 и 7.5. В этом интервале изменение рН мало влияло на активность фермента (рис. 1).

Влияние катионов. Фермент для проявления активности требует наличия как одновалентных, так и двухвалентных катионов; в отсутствие катионов реакция не идет. Лучшим двухвалентным катионом является Мп⁺⁺, без Мп⁺⁺ активность ПК падает в 20 раз. При замене Мп⁺⁺ на Мg⁺⁺ активность снижается в 9.4 раза (табл. 1). Добавление ФДФ к реакционной смеси не влияет на активность фермента с Мп⁺⁺, но сильно стимулирует Мg⁺⁺-зависимую реакцию. Активность фермента растет с ростом содержания Мп⁺⁺, оставаясь постоянной при концентрации Мп⁺⁺ 4 мМ. K_M для Мп⁺⁺ составляет 1.68 мМ, V_{max} — 71.4 (рис. 2). Насыщение Мg⁺⁺ наступает при 5 мМ, K_M для Мg⁺⁺ — 2.35 мМ, V_{max} — 71.4.

Т а б л и ц а 1

Кофакторная специфичность
и кинетические параметры пируваткиназы из взрослых *C. ijimai*

Условия (субстрат, кофактор, ингибитор)	Активность	K_M (ФЭП)	K_i	V_{max}
Полная система (ФЭП, АДФ, К ⁺ , Мп ⁺⁺ , ЛДГ)	60.3±0.4 (15)	1.1		82.0
+ФДФ	59.9±1.2 (12)	0.4		70.4
—Мп ⁺⁺ , +Мg ⁺⁺	6.4±0.3 (6)			
—Мп ⁺⁺ , +Мg ⁺⁺ , +ФДФ	52.6±1.3 (15)	1.5		78.3
—Мп ⁺⁺ , —Мg ⁺⁺	3.0±0.1 (3)			
—К ⁺	0.0 (3)			
—ЛДГ	6.5±0.4 (3)			
—АДФ	0.0 (3)			
—АДФ, +ИДФ	33.4±0.8 (3)			
—АДФ, +ГДФ	55.4±3.0 (3)			
—ФЭП	0.03 (3)			
+4 мМ аланин	57.3±1.0 (3)			
+4 мМ малат	52.1±1.1 (3)	1.7	7.3	82.0
+4мМ малат+ФДФ	58.9±0.9 (6)	0.5	21.3	70.4
+5 мМ АТФ	17.0±1.5 (6)	10.0	0.62	82.0
+5 мМ АТФ+ФДФ	37.8±1.2 (6)	1.9	1.4	70.4
+5 мМ ГТФ	29.6±1.2 (6)			
+5 мМ ИТФ	36.9±0.9 (6)			

Примечание. Специфическая активность ПК и V_{max} выражена в нмолях окисленного НАДН/мин на мг белка. В скобках — число определений тканевых образцов; для кинетических параметров повторность опыта четырехкратная. K_M выражена в мМ субстрата (ФЭП), K_i — в мМ ингибитора.

Потребность в нуклеотидах. Лучшим динуклеотидом для ПК из каликофоронов был АДФ. Замена АДФ на ГДФ сопровождалась падением активности на 9 %, замена на ИДФ — на 45 %. Отсутствие динуклеотидов в реакционной среде приводило к полной потере активности фермента (табл. 1). Кривая зависимости скорости реакции от концентрации АДФ имела гиперболический характер (рис. 3). Фермент имел низкое сродство к АДФ, K_m для АДФ составляла 0.51 мМ, V_{max} — 74.4.

Насыщение субстратом. В отсутствие добавленного субстрата реакция практически не идет. Скорость реакции растет с увеличением количе-

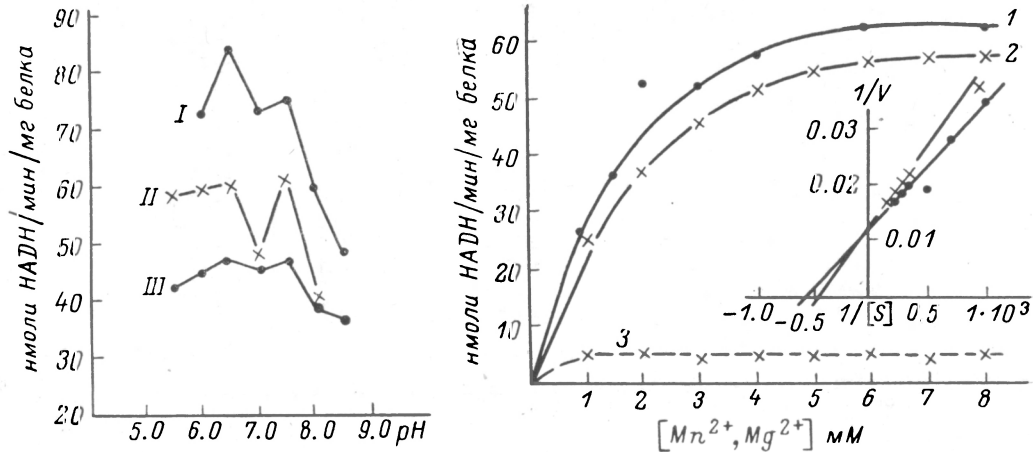


Рис. 1. Влияние pH и добавления ФДФ на активность магний- и марганецзависимой ПК из *C. ijimai*. Условия опыта описаны в тексте. Повторность опыта 4-кратная.

I — Mn^{2+} -зависимая ПК без ФДФ; II — Mn^{2+} -зависимая ПК с ФДФ; III — Mg^{2+} -зависимая ПК с ФДФ.

Рис. 2. Влияние концентрации ионов Mn^{2+} и Mg^{2+} на активность ПК из *C. ijimai*. Внутри график двойных обратных величин. Условия опыта описаны в тексте. Повторность опыта 4-кратная.

1 — влияние Mn^{2+} (как с ФДФ, так и без него); 2 — влияние Mg^{2+} с ФДФ; 3 — влияние Mg^{2+} без ФДФ.

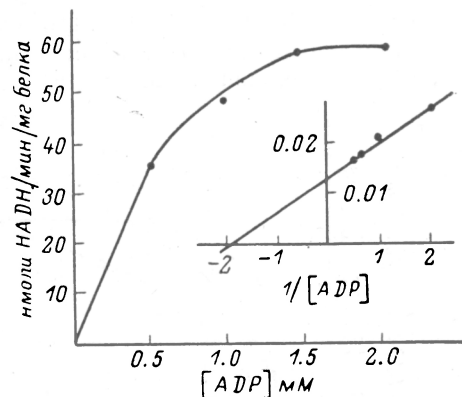


Рис. 3. Влияние АДФ на активность Mn^{2+} -активированной ПК. Внутри график двойных обратных величин. Условия опыта описаны в тексте. Повторность опыта 3-кратная.

ства добавленного ФЭП, оставаясь постоянной при концентрации его в пробе 3 мМ в реакции с Mn^{2+} и 4 мМ в реакции с Mg^{2+} . Как с Mn^{2+} , так и с Mg^{2+} фермент имеет гиперболическую кинетику насыщения субстратом (рис. 4) и относительно низкое сродство к ФЭП (табл. 1). Добавление в реакционную среду 0.4 мМ ФДФ не влияло на величину активности Mn^{2+} -активированного энзима, но значительно увеличивало его сродство к ФЭП, в 2.8 раза снижая кажущуюся K_m (табл. 1; рис. 4); насыщение субстратом наступало при концентрации ФЭП 1.25 мМ. В реакции с Mg^{2+} ФДФ резко активировал фермент; активность его возрастала в 8 раз.

Аланин в концентрации 4 мМ не оказывал заметного влияния ни на скорость реакции, ни на сродство фермента к ФЭП. 4 мМ малат снижал активность фермента на 13.6 %, несколько снижая сродство его к субстрату; V_{max} при этом не изменялось (табл. 1). Трифосфаты обладали значительным ингибирующим эффектом. АТФ в концентрации 5 мМ ингибировал фермент на 52.1 %, ГТФ — на 50.9, ИТФ — на 38.8 %. АТФ, как и малат, вызывал конкурентное ингибирование ПК по отношению к субстрату, повышая кажущуюся K_m ; V_{max} при этом остается без изменения. Добавление ФДФ несколько ослабляло ингибирующее

Т а б л и ц а 2

Влияние некоторых антгельминтных препаратов
на активность пируваткиназы из *S. ijimai*

Антгельминтик	Концентрация антгельминтика (М)	Специфическая активность	% ингибирования
Без препарата (контроль)		60.9±0.8	
Оксинид	10 ⁻⁵	64.7±0.4	+6.2
»	10 ⁻⁴	42.7±0.6	-29.9
Битионол	2·10 ⁻⁵	71.5±0.4	+17.4
»	10 ⁻⁴	36.2±1.5	-40.6
Тиабендазол	10 ⁻⁵	65.8±0.7	+8.0
»	10 ⁻⁴	72.8±0.3	+19.5
Г-937	10 ⁻⁵	75.0±1.4	+23.1
Г-937	10 ⁻⁴	75.5±0.9	+24.0
Г-1026	10 ⁻⁵	62.4±0.7	+2.5
Г-1026	10 ⁻⁴	55.5±0.3	-8.9
Г-1028	10 ⁻⁵	62.7±0.4	+3.0
Г-1028	10 ⁻⁴	55.4±1.1	-9.0
Фенбендазол	10 ⁻⁵	64.5±0.5	+5.9
»	10 ⁻⁴	56.1±1.5	-7.9

Примечание. Специфическая активность ПК выражена в нмолях окисленного НАДН/мин на мг белка.

действие малата и АТФ (рис. 5), в 3 раза увеличивая K_i малатом и более чем в 2 раза — АТФ; $K_m(\text{ФЭП})$ при этом также снижалось.

Нами испытано действие ряда антгельминтных препаратов из разных групп активных соединений на активность цитозольной ПК из *S. ijimai*. Из всех

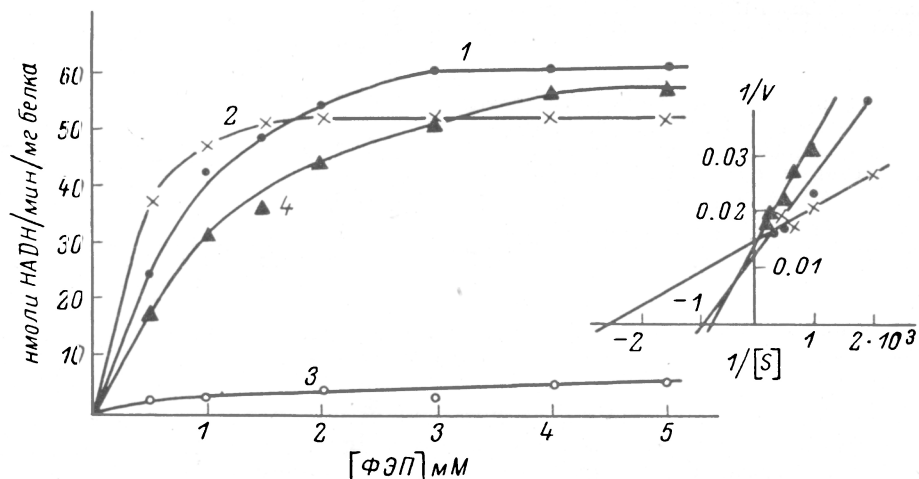


Рис. 4. Влияние концентрации ФЭП и добавления ФДФ на активность Mn^{++} - и Mg^{++} -зависимой ПК из *S. ijimai*. Внутри график двойных обратных величин. Условия опыта описаны в тексте. Повторность опыта 6-кратная.

1— Mn^{++} -зависимая ПК без ФДФ, 2 — Mn^{++} -зависимая ПК с ФДФ, 3 — Mg^{++} -зависимая ПК без ФДФ, 4 — Mg^{++} -зависимая ПК с ФДФ.

испытанных препаратов лишь производные дифенилсульфида — сульфидоксинид и битионол — в концентрации 10^{-4} М давали некоторый ингибирующий эффект (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Довольно широкий диапазон рН для проявления специфической активности ПК из *S. ijimai*, возможно, является результатом наличия не единственного изозима. Существование двух изозимных форм показано ранее для ПК из цес-

годы *Moniezia expansa* (Bryant, 1972). Одна форма проявляла максимум активности при pH 6.5, другая — при 7.0. Широкий диапазон действия pH (6.5—7.0) характерен для ПК из простейших *Tyranosoma brucei* (Flynn e. a., 1980). В пределах от 6.5 до 7.5 лежит оптимум действия фермента из других паразитических червей (Bueding, Saz, 1968; Bryant, 1972; McManus, 1975; McManus, James, 1975; Imbriani, Platzer, 1982).

В отличие от ПК из тканей позвоночных, предпочтительным двухвалентным катионом для которых является Mg^{++} (Bücher, Pfeleiderer, 1955), ПК из кали-

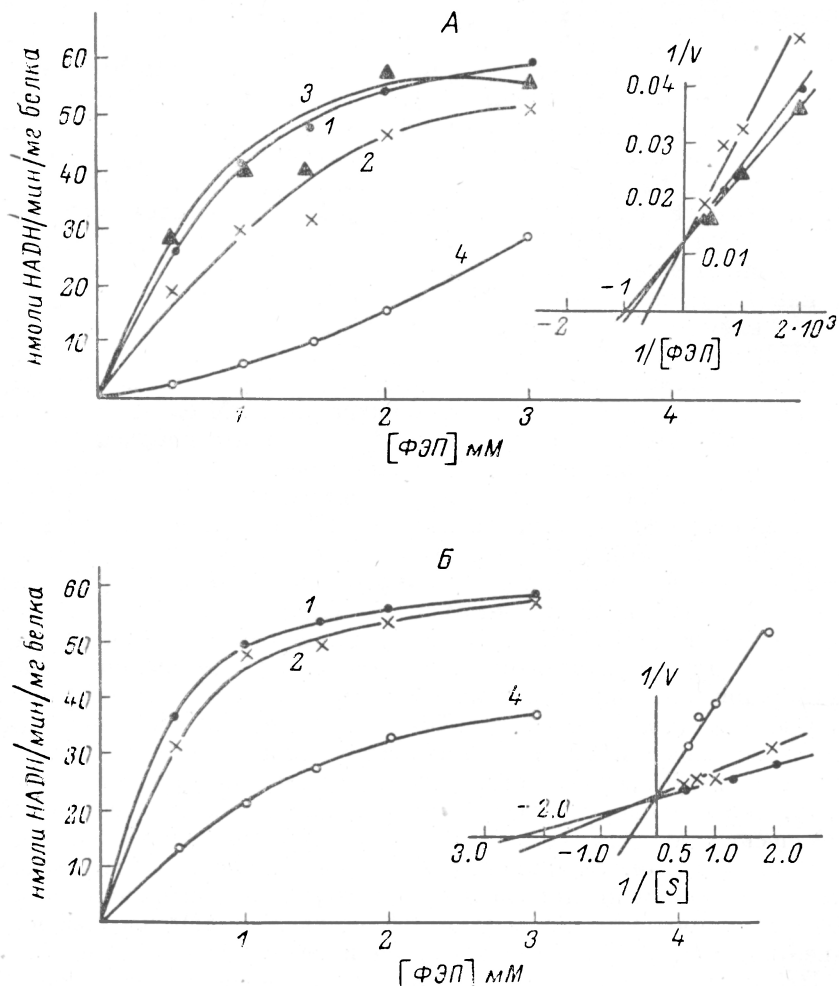


Рис. 5. Ингибирование малатом, аланином и АТФ Mn^{++} -зависимой ПК из *C. ijimai* и влияние на него ФДФ. Внутри график двойных обратных величин. Условия опыта описаны в тексте. Повторность опыта 4-кратная.

А — без ФДФ, Б — с ФДФ, 1 — насыщение ФЭП; 2 — ингибирование малатом, 3 — ингибирование аланином, 4 — ингибирование АТФ.

кофоронов в большей степени активизируется Mn^{++} . Высокая активация фермента ионами Mn^{++} и низкая — Mg^{++} , характерная для каликофоронов, отмечалась у *Ligula intestinalis* (McManus, 1975), *M. expansa* (Bryant, 1972) и *F. hepatica* (Prichard, 1976). У *Dicrocoelium dendriticum* (Köhler, 1974) в условиях насыщающих концентраций обоих катионов стимулирующий эффект Mn^{++} также несколько выше. У шистозом, наоборот, большим стимулирующим действием, как и у позвоночных, обладали ионы Mg^{++} , активность с Mn^{++} была вдвое ниже (Brazier, Jaffe, 1973).

Наилучшим акцептором фосфатов ПК-азной реакции у каликофоронов является АДФ. АДФ — лучший кофактор и для многих других паразитических червей (Prichard, 1976; Imbriani, Platzer, 1982). Однако активность с ГДФ у

каликофоронов лишь незначительно ниже, чем с АДФ. Отсутствие строгих ограничений по отношению к нуклеотидному кофактору характерно для ПК III (мышкульной ПК) позвоночных и ПК из шистозом (Brazier, Jaffe, 1973).

ПК из каликофоронов имеет гиперболическую кинетику насыщения субстратом, АДФ и катионами. В отсутствие экзогенных кофакторов и субстрата активность фермента низка или падает до 0 (табл. 1). Гиперболическая кинетика насыщения субстратом и кофакторами характерна и для других паразитических червей (Köhler, 1974; Bryant, 1972; McManus, James, 1975); у *L. intestinalis* в отсутствие ФДФ показана сигмоидная субстратная кинетика, с ФДФ — гиперболическая (McManus, 1975). ФДФ сильно стимулировал Mg^{++} -активированную реакцию у каликофоронов и не влиял на активность фермента с Mn^{++} , однако увеличивал его сродство к ФЭП. В присутствии ФДФ скорость Mg^{++} -зависимой реакции лишь немного ниже скорости реакции с Mn^{++} . Рост активности фермента и сродства к ФЭП при добавлении ФДФ отмечался ранее у *M. expansa* (Bryant, 1972), *L. intestinalis* (McManus, 1975), *D. dendriticum* (Köhler, 1974), *F. hepatica* (Prichard, 1976), однако у этих паразитов активировалась реакция как с Mg^{++} , так и с Mn^{++} .

Различно отношение ПК из паразитических червей к действию таких метаболитов, как L-аланин и малат. На активность фермента из каликофоронов L-аланин не влиял. Неэффективность его отмечалась на ПК из *M. expansa* (Bryant, 1972) и *L. intestinalis* (McManus, 1975), но фермент из *M. similis* он ингибировал (McManus, James, 1975). Малат оказывал слабое ингибирующее действие на ПК из каликофоронов: в концентрации 4 мМ он угнетал активность лишь на 13.6 %. Слабый ингибирующий эффект малата наблюдался у *D. dendriticum* (Köhler, 1974); 6 мМ малат вызывал 40 %-ное ингибирование. У *M. expansa* (Bryant, 1971) одна фракция ПК ингибировалась малатом на 63 %, другая не ингибировалась. Не угнетал малат и ПК из супернатантной фракции фасциол (Prichard, 1976). АТФ вызывал значительное ингибирование ПК у гельминтов. Так, у фасциол 2.8 мМ АТФ угнетал фермент на 100 %, вызывая неконкурентное ингибирование, которое ослаблялось возрастающими концентрациями ФДФ (Prichard, 1976). Ингибирующее влияние АТФ на ПК было показано и для других паразитических червей. Ингибирование АТФ на ПК из каликофоронов было конкурентным по отношению к субстрату (рис. 4, 5). ФДФ ослаблял действие малата и АТФ на фермент каликофоронов (как и у всех гельминтов), почти в 3 раза увеличивая K_i для малата и более чем в 2 раза — для АТФ. ФДФ, кроме того, увеличивал сродство ПК из каликофоронов к субстрату, снижая насыщающую концентрацию ФЭП от 3 мМ до 1.25 мМ.

Специфическая активность ПК из каликофоронов низка по сравнению с гельминтами-аэробами. Например, у *Schistosoma mansoni*, обитающей в среде с высоким содержанием кислорода и продуцирующей в основном лактат в качестве конечного продукта, активность ПК составляет 1590 нмоль/мин на мг белка (Bueding, Sz, 1968), тогда как у каликофоронов — 60.3 нмоль. Таким образом, ПК каликофоронов имеет относительно низкую специфическую активность, низкое сродство к ФЭП и АДФ, подвергается аллостерической регуляции ФДФ, чувствительна к ингибированию АТФ. По этим свойствам ПК каликофоронов подобна аналогичному энзиму из печени позвоночных (Tanaka e. a., 1967; Weber e. a., 1967; Strandholm e. a., 1976), т. е. ПК-1 (L-типа), контролирующему ход гликолиза и глюконеогенеза в печени и других тканях (Köhler, 1974; Llorente e. a., 1970; Staal e. a., 1971). Исходя из этих свойств можно предположить, что ПК каликофоронов может контролировать направленность метаболического потока от уровня ФЭП при изменении содержания кислорода в окружающей гельминта среде. Уровень активности фермента явно недостаточен для того, чтобы осуществлять диссимиляцию ФЭП только в направлении образования пирувата. Это предполагает существование альтернативного пути, связанного с фиксацией CO_2 с помощью ФЭПКК. Подтверждением этого предположения может служить наличие у *S. ijimai* активной фумаратредуктазной системы, осуществляющей перенос электронов на фумарат (Ярыгина и др., 1983).

Ни один из испытанных нами антгельминтных препаратов не дал значительного ингибирующего эффекта на ПК из каликофоронов (табл. 2). Даже битио-

нол, эффективный при парамфистомидозах, в концентрации 10^{-4} М угнетает фермент лишь на 40.6 %. Очевидно, ПК-азная реакция не является звеном, уязвимым для действия испытанных препаратов.

Л и т е р а т у р а

- А с а т и а н и В. С. Новые методы биохимической фотометрии. М.: Наука, 1965, с. 173—180.
- Я р ы г и н а Г. В., В ы х р е с т ь ю к Н. П., Б у р е н и н а Э. А. Фумаратредуктаза в митохондриях трематоды *Calicophoron iijimai*. — *Паразитология*, 1983, т. 17, вып. 4, с. 278—282.
- B e h m C. A., B r y a n t C. Studies of regulatory metabolism in *Moniezia expansa*: general considerations. — *Int. J. Parasitol.*, 1975, vol. 5, N 2, p. 209—217.
- B r a z i e r J. B., J a f f e J. J. Two types of pyruvate kinase in Schistosomes and filariae. — *Comp. Biochem. and Physiol.*, 1973, vol. 44, N 1B, p. 145—155.
- B r y a n t C. Metabolic regulation in *Moniezia expansa* (Cestoda); the role of pyruvate kinase. — *Int. J. Parasitol.*, 1972, vol. 2, N 3, p. 333—341.
- B ü c h e r T., P f l e i d e r e r G. Pyruvate kinase. — In: *Methods in Enzymology*. N. Y., Acad. press, 1955, vol. 1, p. 435—440.
- B u e d i n g E. Carbohydrate metabolism of *Schistosoma mansoni*. — *J. Gen. Physiol.*, 1950, vol. 33, N 2, p. 475—495.
- B u e d i n g E., S a z 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.
- F l y n n I a n W., B o w m a n I a i n B. R. Purification and characterization of pyruvate kinase from *Trypanosoma brucei*. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1980, vol. 200, N 2, p. 401—409.
- I m b r i a n i J. L., P l a t z e r E. C. Characterization of lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase, pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in *Romanomermis culicivorax* postparasitic larvae and adult. — *Comp. Biochem. Physiol.*, 1982, vol. 72, N 1B, p. 21—29.
- K ö h l e r P. Metabolic role of pyruvate kinase in the trematode *Dicrocoelium dendriticum*. — *Comp. Biochem. Physiol.*, 1974, vol. 49, N 2B, p. 335—344.
- L i n e w e a v e r H., B u r k D. The determination of enzyme dissociation constants. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1934, vol. 56, N 3, p. 658—666.
- L l o r e n t e P., M a r c o R., S o l s A. Regulation of liver pyruvate kinase and the phosphoenolpyruvate crossroads. — *Eur. J. Biochem.*, 1970, vol. 13, N 1, p. 45—54.
- 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. Protein measurement with Folin phenol reagent. — *J. Biol. Chem.*, 1951, vol. 193, N 1, p. 265—275.
- M c M a n u s D. P. Pyruvate kinase in the plerocercoid of *Ligula intestinalis* (Cestoda: Pseudophyllidae). — *Int. J. Biochem.*, 1975, vol. 6, N 1, p. 79—84.
- M c M a n u s D. P., J a m e s B. L. Pyruvate kinase and carbon dioxide fixing enzymes in the digestive gland of *Littorina saxatilis rudis* (Maton) and in the daughter sporocysts of *Microphallus similis* (Jäg.) (Digenea: Microphallidae). — *Comp. Biochem. Physiol.*, 1975, vol. 51, N 2B, p. 299—306.
- P r i c h a r d R. K. Regulation of pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in adult *Fasciola hepatica* (Trematoda). — *Int. J. Parasitol.*, 1976, vol. 6, N 3, p. 227—233.
- S o p r u n o v F. F. *Biochemie der Helminthen. 1. Der Energiehaushalt der Helminthen.* Parasitol. Schriftenr., 1978, N 23. 149 S.
- S t a a l G. E. J., K o s t e r J. F., K a m p H., v a n M i l l i g e n - B o e r s m a L., V e e g e r C. Human erythrocyte pyruvate kinase. Its purification and some properties. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, vol. 227, N 1, p. 86—96.
- S t r a n d h o l m J. J., D y s o n R. D., C a r d e n a s J. M. Bovine pyruvate kinase isozymes and hybrid isozymes electrophoretic studies and tissue distribution. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1976, vol. 173, N 1, p. 125—131.
- T a n a k a T., H a r a n o Y., S u e F., M o n i m u r a H. Crystallization, characterization and metabolic regulation of two types of pyruvate kinases isolated from rat tissues. — *J. Biochem.*, 1967, vol. 62, N 1, p. 71—91.
- U m e z u r i k e G. M., A n y a A. O. Carbohydrate energy metabolism in *Fasciola gigantica* (Trematoda). — *Int. J. Parasitol.*, 1979, vol. 10, N 2, p. 175—180.
- W a r d C. W., S c h o f i e l d P. J., J o n s t o n e I. L. Pyruvate kinase in *Haemonchus contortus* larvae. — *Comp. Biochem. Physiol.*, 1968, vol. 24, p. 643—647.
- W e b e r G., L e a M. A., C o n v e r y H. J. H., S t a m m N. B. Regulation of gluconeogenesis and glycolysis: studies of mechanisms controlling enzyme activity. — In: *Advances in Enzyme Regulation* (Ed. G. Weber), 1967, vol. 5, p. 257—298. Macmillan, New York.

Биолого-почвенный институт ДВНЦ АН СССР,
г. Владивосток

Поступила 31 XII 1983
Принята к печати 30 V 1985

PYRUVATE KINASE IN THE TREMATODES CALICOPHORON IJIMAI
AND POSSIBILITY OF ITS INHIBITION BY SOME ANTHELMINTHIC
PREPARATIONS

G. V. Yarygina, N. P. Vykhrestyuk, E. A. Burenina

S U M M A R Y

It was shown that pyruvate kinase (PK) in the supernatant fraction from *Calicophoron ijimai* is able to regulate the direction of metabolic flow at glucose break down from phosphoenolpyruvate (PEP) level. The enzyme for activity required substrate, dinucleotides, cations K^+ and Mn^{++} . The activity with Mg^{++} as divalent cation is low. The addition of fructose — 1,6-diphosphate (FDP) did not affect the enzyme activity with Mn^{++} , however, increased the affinity for PEP. The velocity of Mg^{++} activated reaction increased by 8.2 times in the presence of FDP. PK in *C. ijimai* is sensitive to ATP inhibition, being weakly inhibited by malate. L-alanine did not influence on the enzyme activity. The effect of some anthelmintic preparations on the PK activity was shown.
