

ОКИСЛЕНИЕ СУБСТРАТОВ ЦИКЛА КРЕБСА  
МИТОХОНДРИЯМИ EURYTREMA PANCREATICUM

Э. А. Шестак

Биолого-почвенный институт ДВНЦ АН СССР, Владивосток

Митохондрии мышечной ткани трематоды *Eurytrema pancreaticum* окисляли сукцинат, изоцитрат, цисаконитат, оксалацетат,  $\alpha$ -кетоглутарат, малат, цитрат, фумарат и пируват.

Основные функции митохондрий позвоночных — окисление субстратов цикла Кребса, транспорт ионов водорода и электронов по дыхательной цепи на молекулярный кислород и образование АТФ. Биохимические исследования паразитических червей говорят о существовании у них отклонений от биохимических процессов, происходящих у позвоночных. Достаточно подробно ферменты цикла Кребса изучены у нематод в противоположность другому классу — трематод. Из трематод наиболее полно изучена фасциола. В тканях фасциол были обнаружены следующие энзимы цикла Кребса: аконитаза, изоцитратдегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа, фумараза, фумаратредуктаза, малатдегидрогеназа, цитратсинтаза, глутаматдегидрогеназа. Низкий уровень активности аконитазы, НАДФ-специфичной изоцитратдегидрогеназы, свидетельствует о том, что цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) у фасциол имеет меньшее значение, чем у позвоночных (Prichard, Schofield, 1968; Zoeten, Tipker, 1969; Бенедиктов, 1971). Все энзимы ЦТК были обнаружены в тканях *Dicrocoelium dendriticum* (Köhler, Hanselmann, 1973). Гомогенаты яиц, личинок и половозрелых *Paragonimus westermani* и *P. miyazakii* ускоряли восстановление метиленовой сини в присутствии сукцината,  $\alpha$ -кетоглутарата, изоцитрата и малата (Hamajima, 1972). На основании полученных результатов автор предполагает возможность функционирования ЦТК на всех стадиях развития *Paragonimus*.

Объектом нашего изучения была трематода *Eurytrema pancreaticum* из подотряда *Fasciolata*, сем. *Dicrocoeliidae*, паразитирующая в протоках поджелудочной железы крупного рогатого скота. Работа выполнена на половозрелых эуритремах, совершенно не изученных в биохимическом отношении.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Митохондрии из эуритрем выделяли по методике Причарда и Шофелда (Prichard, Schofield, 1968). Окислительные процессы изучали по методике Бенедиктова (1963) с феррицианидом калия в качестве искусственного акцептора электронов. Оптическую плотность суспензии выделенных митохондрий измеряли при 520 нм на СФ-4А. Белок определяли по Лоури (Lowry et al., 1951). Материалы обработаны статистически (Асатиани, 1965).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Набухание митохондрий вызывается субстратами, которые поставляют электроны в основную цепь дыхания. Митохондрии эуритрем обладают способностью к спонтанному набуханию, к набуханию в присутствии субстрата окисления, парахлормеркурийбензоата (п-хмб); выделенные митохондрии чувствительны к  $K^+$  и  $PO_4^{-3}$  и не чувствительны к ионам  $Ca^{2+}$ ; АТФ и ионы  $Mg^{2+}$  стабилизируют их структуру.

Митохондрии эуритрем восстанавливали феррицианид калия без добавления субстратов окисления. Эндогенное окисление было чувствительно к добавлению НАД, АТФ, малоната и бензоата (табл. 1). Для выяснения природы субстрата, окисляемого при эндогенном процессе, к суспензии выделенных митохондрий добавляли растворы малоновой и бензойной кислот. Известно, что малонат является ингибитором сукцинатдегидрогеназы, а бензоат тормозит окисление жирных кислот в митохондриях позвоночных. Ни малонат, ни бензоат не ингибировали процесс эндогенного окисления в митохондриях эуритрем в противоположность митохондриям, выделенным из тканей позвоночных и других гельминтов (Van Grembergen, 1949; Massey, Rogers, 1950; Goldberg, 1957; Saz, Vidrine, 1959; Nogawa, 1961; Okamoto et al., 1962; Бенедиктов, 1967; Warren, 1965; Вертинская, 1971).

Выделенные из эуритрем митохондрии интенсивно окисляли сукцинат (табл. 2). Этот процесс протекал линейно в течение 30 мин., что свидетельствовало о стабильности сукцинатдегидрогеназного комплекса. В этом отношении эуритрема, как и другие гельминты (дикроцелииды, фасциолы, аскариды, аскаридии, мецистоциррусы), не являются исключением: сукцинатдегидрогеназа прочно связана со структурой митохондрий. Малонат в эквимольной концентрации угнетал окисление сукцината митохондриями эуритрем на 31%, но значительно меньше, чем отмечено у других гельминтов (Massey, Rogers, 1950; Saz, Vidrine, 1959; Vernberg, Hunter, 1960; Nogawa, 1961; Okamoto et al., 1962; Warren, 1965; Бенедиктов, 1967, 1971; Вертинская, 1972; Шестак, 1973). Однако низкий ингибиторный эффект малоната был отмечен и у фасциол (Van Grembergen, 1949; Prichard, Schofield, 1968). Окисление сукцината у эуритрем тормозилось добавлением п-хмб на 45%. Такое свойство п-хмб отмечено для митохондрий позвоночных и гельминтов (Goodwin, 1960; Бенедиктов, 1967; Вертинская, 1972; Шестак, 1973) и свидетельствует о том, что п-хмб не полностью блокирует сульфгидрильные группы сукцинатдегидрогеназы.

Суспензия гранул, выделенных из эуритрем, способна окислять изоцитрат (табл. 2). Введение НАД в инкубационную среду увеличивало окисление субстрата на 66%, а НАДФ — на 172%. Это свидетельствует о присутствии в тканях эуритрем НАД- и НАДФ-зависимых изоцитратдегидрогеназ и способности тканей образовывать  $\alpha$ -кетоглутарат. АТФ, являясь ингибитором изоцитратдегидрогеназы, угнетала процесс окисления изоцитрата. Введение АТФ в среду с субстратом и кофактором приводило к угнетению процесса окисления на 16%. В митохондриях фасциол была обнаружена низкая активность НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы, НАД-зависимая отсутствовала (Prichard, Schofield, 1968). Основная активность НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы была обнаружена в гиалоплазме фасциол. Это согласуется с сообщениями Келера и Хансельмана (Köhler, Hanselmann, 1973), изучавшими внутриклеточное распределение энзимов ЦТК в *Dicrocoelium dendriticum*. Активная изоцитратдегидрогеназа была обнаружена в церкариях и взрослых *Schi-*

Т а б л и ц а 1

Влияние ингибиторов и кофакторов на интенсивность эндогенного окисления митохондриями эуритрем

Кофактор, ингибитор	Концентрация (в мкмольях)	Стимуляция, торможение (в %)
НАД	0.2	+81
АТФ	3.0	+112
Малонат	20.0	+93
Бензоат	10.0	+77

*stosoma mansoni* и *S. mattheei* (Coles, 1973). Однако в митохондриях позвоночных преобладает НАД-зависимая изоцитратдегидрогеназа (Ernster, Glasky, 1960).

Митохондрии эуритрем окисляли цис-аконитовую кислоту, интенсивность окисления субстрата была в 1.7 раза выше эндогенного окисления. Это свидетельствует о присутствии в митохондриях эуритрем аконитазы. При введении в инкубационную среду НАД наблюдалось увеличение окислительной способности на 60%. Активность этого процесса была изучена также в митохондриях дикроцелиид (Köhler, Hanselmann, 1973) и аскаридий (Вертинская, 1971). В митохондриях фасциол аконитаза не была обнаружена (Prichard, Schofield, 1968), не обнаружен этот фермент и в митохондриях мезостоциррусов (Шестаков, 1973).

Выделенные из эуритрем митохондрии способны окислять оксалацетат (табл. 2). Интенсивность окисления этого субстрата достаточно высока. Добавление НАД к инкубационной среде увеличивало окислительную способность митохондрий на 41%.

Т а б л и ц а 2

Интенсивность окисления различных субстратов ЦТК митохондриями эуритрем (в мкмольх восстановленного  $K_3Fe(CN)_6$ /мг белка/30 мин)

Субстрат окисления	Интенсивность окисления	P
Эндогенное окисление	2.56 ± 0.35	
Сукцинат	8.90 ± 0.73	< 0.01
Изоцитрат	4.44 ± 0.78	< 0.05
Цисаконитат	4.44 ± 0.64	< 0.02
Оксалацетат	4.40 ± 0.63	< 0.02
α-кетоглутарат	4.06 ± 0.52	< 0.01
Малат	3.75 ± 0.49	< 0.01
Фумарат	3.39 ± 0.51	= 0.001
Пируват	3.27 ± 0.47	< 0.02
Цитрат	3.33 ± 0.47	< 0.001

Суспензия выделенных из эуритрем митохондрий окисляла α-кетоглутаровую кислоту (табл. 2), что свидетельствует о присутствии в митохондриях α-кетоглутаратдегидрогеназы. Бенедиктов (1971) не обнаружил окисления митохондриями фасциолы α-кетоглутарата, а Причард и Шофелд (1968) обнаружили у фасциол активную α-оксоглутаратдегидрогеназу. У дикроцелиид отмечался очень низкий уровень α-кетоглутаратдегидрогеназы (Köhler, Hanselmann, 1973). НАД увеличивал окислительную активность субстрата митохондриями эуритрем на 97%, а АДФ — на 76%. П-хмб не тормозил, а даже увеличивал процесс окисления α-кетоглутарата митохондриями эуритрем на 27%.

Митохондрии эуритрем окисляли яблочную кислоту (табл. 2). Добавленный в среду инкубации НАД увеличивал процесс окисления малата на 112%, что говорит о присутствии малатдегидрогеназы. Подобно митохондриям позвоночных, окисление малата происходит при непосредственном участии НАД. Малатдегидрогеназа обнаружена в митохондриях фасциол и шистозом (Prichard, Schofield, 1968; Zoëten, Tipker, 1969; Бенедиктов, 1971; Coles, 1973). Каталитические количества АДФ заметно ускоряли процесс сопряженного фосфорилирования у эуритрем. У позвоночных для максимальной скорости окисления НАД-зависимых субстратов в присутствии феррицианида калия требуется обязательное присутствие АДФ. Это справедливо для митохондрий аскарид, аскаридий и мезостоциррусов (Бенедиктов, 1967; Cheah, Chance, 1970; Вертинская, 1972; Шестаков, 1973). Известно, что активность малатдегидрогеназы у позвоночных блокируется п-хмб. Выделенные из эуритрем митохондрии в присутствии малата не ингибировались п-хмб.

Выделенные из эуритрем митохондрии окисляли фумаровую кислоту (табл. 2), что говорит о присутствии фумаратдегидрогеназы. Бенедиктов (1971) в митохондриях фасциол не обнаружил фумаратдегидрогеназу, а обнаружил фумаратредуктазу. Введение каталитических количеств НАД увеличивало интенсивность окисления субстрата митохондриями эуритрем на 76%, а АДФ — на 67%. П-хмб не угнетал процесс окисления фумарата, а даже увеличивал на 26%.

Митохондрии, выделенные из тканей эуритрем, окисляли лимонную кислоту (табл. 2). Добавление каталитических количеств НАДФ вызывало увеличение интенсивности процесса на 40%. Это еще раз подтверждает присутствие в тканях эуритрем аконитазы.

Была отмечена способность митохондрий эуритрем окислять пируват, интенсивность окисления субстрата была на 27% выше эндогенного. Может быть, окисление пирувата имеет место в основном в цитоплазме: в литературе встречаются указания на то, что кашицы тканей окисляют пируват, причем этот процесс сопровождается фосфорилированием (Chin, Bueding, 1954). Митохондрии аскарид не содержат активной пируватдегидрогеназы (Seidman, Entner, 1961), то же наблюдалось и у мезостоциррусов (Шестак, 1973). Добавление каталитических количеств НАД увеличивало интенсивность окисления субстрата митохондриями эуритрем на 52%. Бенедиктов (1971) не наблюдал окисления пирувата митохондриями фасциол.

Подводя итог нашим исследованиям, можно сказать, что выделенные из эуритрем митохондрии по своим оптическим и биохимическим свойствам близки к митохондриям других изученных гельминтов и позвоночных. Митохондрии эуритрем способны интенсивно окислять сукцинат, изоцитрат-цис-аконитат, оксалацетат,  $\alpha$ -кетоглутарат, и менее интенсивно — малат, фумарат, цитрат и пируват. Введение каталитических количеств НАД вызывало увеличение интенсивности окисления изоцитрата, цис-аконитата, оксалацетата,  $\alpha$ -кетоглутарата, малата, фумарата и пирувата, а НАДФ — изоцитрата и цитрата.

#### Л и т е р а т у р

- А с а т и а н и В. С. 1965. Новые методы биохимической фотометрии. Изд. «Наука», М.: 495—510.
- Б е н е д и к т о в И. И. 1963. Митохондрии мышечной ткани *Ascaris suum*. Получение изолированной суспензии и изучение окислительной активности. Мед. паразитолог., 32 (6): 683—687.
- Б е н е д и к т о в И. И. 1967. Некоторые особенности митохондрий мышечной ткани свиной аскариды. Журн. эвол. биохим. и физиол., 3 (4): 287.
- Б е н е д и к т о в И. И. 1971. Транспорт электронов в митохондриях трематоды *Fasciola hepatica*. Тр. ВИГИС, 17: 57—62.
- В е р т и н с к а я М. К. 1971. Окислительные процессы в тканях *Ascaridia galli* и *Macracanthorhynchus hirudinaceus*. Тр. ВИГИС, 17: 67—70.
- В е р т и н с к а я М. К. 1972. Окислительно-восстановительные процессы в тканях *Ascaridia galli* и *Macracanthorhynchus hirudinaceus* и возможности их блокировки антгельминтными препаратами. Автореф. дисс., М.: 4—12.
- Ш е с т а к Э. А. 1973. Тканевое дыхание гельминта сычуга крупного рогатого скота — *Mecistocirrus digitatus*. Тр. БПИ ДВНЦ АН СССР. Новая серия. Владивосток, 13 (116): 168—175.
- C h e a h K. S., C h a n c e B. 1970. The oxidase systems of *Ascaris* muscle mitochondria. Biochim. Biophys. Acta, 223 (1): 55—60.
- C h i n C. H., B u e d i n g E. 1954. Occurrence of oxidative phosphorylation in the muscle of *Ascaris lumbricoides*. Biochim. Biophys. Acta, 13: 331.
- C o l e s G. C. 1973. Enzyme levels in cercariae and adult *Schistosoma mansoni*. Int. J. Parasitol., 3 (4): 505—510.
- E r n s t e r L., G l a s k y A. J. 1960. On the mitochondrial oxidation of isocitrate. Biochim. Biophys. Acta, 38 (1): 168—169.
- G o l d b e r g E. 1957. Studies of the intermediary metabolism of *Trichinella spiralis*. Exptl. Parasitol., 6 (4): 367—382.
- G o o d w i n T. W. 1960. Recent advances in biochemistry. London, Churchill: 125.
- Н а м а џ и м а F. 1972. Studies on the metabolism of lung flukes genus *Paragonimus*. 5. Reactions of the tricarboxylic acid cycle in homogenates of eggs, larvae and adults. Jap. J. Parasitol., 21 (4): 280—285.
- K ö h l e r P., H a n s e l m a n n K. 1973. Intermediary metabolism in *Dicrocoelium dendriticum* (Trematoda). Comp. Biochem. Physiol., 45 (4B): 825—845.

- Lowry O. H., Rosebrough N. I., Parr A. L., Randall R. I. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 (1): 265.
- Massey V., Rogers W. P. 1950. The intermediary metabolism of nematode parasites. 1. General reactions of tricarboxylic acid cycle. *Austr. J. Sci. Res.*, 3 (2): 251—264.
- Nogawa Y. 1961. Histochemical studies on *Ascaris*. On succinic dehydrogenase of *Ascaris* cultured in organic acid solutions. *J. of the Kumamoto Med. Soc.*, 35 (9): 950—951.
- Okamoto O., Katsume T., Obo F. 1962. Biochemical studies of *Ascaris lumbricoides*. 7. On the succinate formation system of *Ascaris lumbricoides*. *Acta Med. Univ. Kagoshim.*, 4 (1): 61—65.
- Prichard R. K., Schofield P. J. 1968. A comparative study of the tricarboxylic acid cycle enzymes in *Fasciola hepatica* and rat liver. *Comp. Biochem. Physiol.*, 25 (3): 1005—1019.
- Saz H. J., Vidrine A. I. 1959. The mechanism of formation of succinate and propionate by *Ascaris lumbricoides* muscle. *J. Biol. Chem.*, 234 (8): 2001—2005.
- Seidman I., Entner N. 1961. Oxidative enzymes and their role in phosphorylation in sarcosomes of adult *Ascaris lumbricoides*. *J. Biol. Chem.*, 236 (3): 915—916.
- Van Grembergen G. 1949. Le métabolisme respiratoire du trematode *Fasciola hepatica* Linn. *Enzymologia*, 13: 241—257.
- Vernberg W. B., Hunter W. S. 1960. Studies on oxygen consumption in digenetic trematodes. 4. Oxidative pathways in the trematode *Gynaecotyla adunca* (Linton, 1905). *Exptl. Parasitol.*, 9 (1): 42—46.
- Warren L. G. 1965. Biochemistry of the dog hook worm. 1. Oxidative metabolism. *Exptl. Parasitol.*, 17 (1): 1—9.
- Zoeten L. W., Tipker J. 1969. Intermediary metabolism of the liver fluke *Fasciola hepatica*. 2. Hydrogen transport and phosphorylation. *Hoppe—Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 350 (6): 691—695.

---

OXIDATION OF THE SUBSTRATES OF KREBS' CYCLE  
BY MITOCHONDRIA OF EURYTREMA PANCREATICUM

E. A. Shestak

S U M M A R Y

From tissues of *E. pancreaticum* were isolated mitochondria capable to swell under the effect of some factors. The intensive oxidation of succinate, isocitrate, cisaconitate, oxalacetate and  $\alpha$ -ketoglutarate by mitochondria and less intensive one of malate, fumarate, citrate and pyruvate were shown. NAD caused the rise in oxidation intensity of isocitrate, cis-aconitate, oxalacetate,  $\alpha$ -ketoglutarate, malate, fumarate and pyruvate while NADP — of isocitrate and citrate.

---