

К Р А Т К И Е С О О Б Щ Е Н И Я

УДК 576.893.192 : 577.112.3

АМИНОКИСЛОТЫ И ИХ МЕТАБОЛИТЫ ООЦИСТ
EIMERIA TENELLA (COCCIDIIDA)

Я. Я. Елчиев

С применением нового способа очистки ооцист кокцидий более детально изучен аминокислотный состав белков ооцист *Eimeria tenella*. У экзогенных стадий развития *E. tenella* впервые установлено 35 свободных аминокислот и их метаболитов. Отмечено, что споруляция ооцист сопровождается изменением количества большинства свободных аминокислот и их метаболитов.

Рядом авторов был изучен аминокислотный состав белков ооцист 4 видов эймерий домашних кур (Перов, Тальдрик, 1975; Перов, 1976). Они считают, что в белках ооцист такого эукариотного организма, как *E. tenella*, отсутствует аминокислота цистин и это рассматривается как видовое различие. Однако в дальнейшем цистин был выявлен в оболочке ооцист *E. tenella* другими исследователями (Stotish e. a., 1978). Сванбаевым (1982) в ооцитах *E. tenella* было обнаружено 16 свободных аминокислот.

В данной работе мы задались целью с применением более усовершенствованного способа очистки ооцист уточнить аминокислотный состав белков ооцист *E. tenella*, изучить свободные аминокислоты и некоторые их метаболиты в ооцитах паразита.

М а т е р и а л и м е т о д и к а. Массу ооцист получали путем заражения 15—20-дневных цыплят *E. tenella* и очищали ее новым способом, разработанным нами совместно с Мусаевым и Ребриковой (1982). Очистку неспорулированных ооцист проводили с применением реактивов, охлажденных до 4 °С.

Изучение свободных и связанных аминокислот в ооцитах проводили следующим образом: лиофильно высушенный остаток ооцист разрушали ультразвуковым диспергатором УЗДН-1 при частоте 22 кгц, мощностью 300 вт в присутствии 200-кратного избытка 96 %-ного охлажденного этилового спирта. Степень разрушения контролировали микроскопом. Образцы разрушенных ооцист помещали в холодильник на сутки, центрифугировали при 10 тыс. об./мин и в надосадочной жидкости определяли содержание свободных аминокислот и их метаболитов. Осадок разрушенных ооцист высушивали в вакуум-термостате при 40 °С до постоянного веса. Гидролиз белков ооцист проводили с участием 6 Н соляной кислоты при температуре 110 °С в течение 20 ч.

Для определения количества цистина в белках параллельные пробы разрушенных ооцист перед гидролизом обрабатывали надмуравьиной кислотой (окислительная смесь, состоящая из перекиси водорода и муравьиной кислоты в отношении 1 : 99), которая окисляет цистин в цистеиновую кислоту.

Определение аминокислот и их метаболитов проводили на чехословацком аминокислотном анализаторе ААА-881 с использованием цитрат-натриевых и цитрат-литиевых буферных растворов.

Р е з у л ь т а т ы и с с л е д о в а н и й и и х о б с у ж д е н и е. Ооциты *E. tenella* содержат большой набор свободных аминокислот. Путем использования цитрат-литиевых и цитрат-натриевых буферных растворов и настройкой аминокислотного анализатора на вторую программу удалось выявить 33 свободные аминокислоты и их метаболиты. Сванбаевым (1982) в ооцитах этого вида паразита было обнаружено 16 свободных аминокислот. Кроме аминокислот, представленных на табл. 1, на хроматограммах нами были выявлены следы орнитина и α -аминомасляной кислоты. В ооцитах *E. tenella* не были обнаружены δ -аланин, δ -аминомасляная кислота и метилгистидин-1.

Таблица 1

Содержание свободных аминокислот и их метаболитов в ооцистах *E. tenella* ($M \pm m$ в мкМ в 1 г сухого вещества ооцист; $n=3$)

Аминокислоты и их метаболиты	Неспорулированные ооцисты	Спорулированные ооцисты	Аминокислоты и их метаболиты	Неспорулированные ооцисты	Спорулированные ооцисты
Цистеиновая кислота	0.07 ± 0.01	0.10 ± 0.02	Цистин 1/2	1.20 ± 0.05	0.74 ± 0.23
Фосфоэтанолламин	0.51 ± 0.09	0.43 ± 0.08	Цистатионин	0.54 ± 0.02	0.55 ± 0.14
Таурин	1.05 ± 0.07	1.12 ± 0.41	Метионин	1.18 ± 0.14	0.85 ± 0.17
Мочевина (10×)	2.87 ± 0.29	6.12 ± 0.58 *	Изолейцин	2.42 ± 0.04	1.41 ± 0.12 *
Фосфосерин	0.25 ± 0.03	0.19 ± 0.02	Лейцин	4.07 ± 0.51	4.57 ± 0.40
Аспарагиновая кислота	2.23 ± 0.06	0.86 ± 0.17 *	Тирозин	1.46 ± 0.12	1.52 ± 0.14
Гидроксипролин	0.26 ± 0.03	0.30 ± 0.07	Фенилаланин	1.31 ± 0.21	1.38 ± 0.18
Треонин	3.03 ± 0.02	2.64 ± 0.33	Гамма-аминомасляная кислота	7.66 ± 0.16	4.46 ± 0.69 *
Серин	6.29 ± 0.05	5.81 ± 0.36	Этанолламин	0.05 ± 0.01	0.48 ± 0.10 *
Аспарагин	0.03 ± 0.01	0.20 ± 0.03 *	Лизин	2.33 ± 0.12	1.45 ± 0.16 *
Глутаминовая кислота	1.65 ± 0.04	1.52 ± 0.34	Гистидин	0.55 ± 0.05	1.48 ± 0.02 *
Глутамин	0.17 ± 0.02	0.77 ± 0.14 *	Метилгистидин-3	0.06 ± 0.02	0.08 ± 0.04
Саркозин	0.13 ± 0.01	0.07 ± 0.02	Триптофан	0.47 ± 0.14	0.36 ± 0.01
Пролин	1.69 ± 0.05	2.60 ± 0.13 *	Аргинин	1.71 ± 0.06	2.72 ± 0.07 *
Глицин	4.74 ± 0.05	3.00 ± 0.24 *	Адипиновая кислота	0.09 ± 0.02	0.07 ± 0.01
Аланин	9.67 ± 0.09	6.88 ± 0.61 *			
Цитруллин	0.18 ± 0.04	0.34 ± 0.06			
Валин	3.69 ± 0.08	3.14 ± 0.51	Сумма	63.61	58.21

Примечание. Здесь и в табл. 2 звездочка указывает на статистическую достоверность данных.

Спорулированные (они составляли 87 % от общего числа ооцист) и неспорулированные ооцисты имеют одинаковое число свободных аминокислот и их метаболитов. Количественный анализ указанных компонентов у *E. tenella* показал, что обе стадии развития ооцист паразита содержат больше аланина, серина, γ -аминомасляной кислоты, мочевины, лейцина, глицина и валина (табл. 1). Например, в неспорулированных ооцистах свободный аланин составляет 15.2 % от общей суммы аминокислот, γ -аминомасляная кислота — 12 %, серин — 9.9 % и т. д.

В ооцистах по сравнению с вышеперечисленными аминокислотами меньше изолейцина, глутаминовой и аспарагиновой кислот, таурина, тирозина, фенилаланина, аргинина, метионина и цистина. Такие метаболиты аминокислот, как фосфоэтанолламин, цистатионин, гидроксипролин, аспарагин, глутамин, саркозин, цитруллин, цистеиновая кислота, фосфосерин, адипиновая кислота и метилгистидин-1, содержатся в ооцистах в меньшем количестве и пики их выявляются на хроматограммах только в тех случаях, когда для исследования берется не менее 100 мг сухого вещества ооцист. При использовании для анализа сухого вещества ооцист в количестве 220 мг на хроматограммах были обнаружены более четкие пики указанных метаболитов аминокислот.

Сравнительный анализ свободных аминокислот двух стадий экзогенного развития паразита выявил, что спорулированные и неспорулированные ооцисты значительно отличаются по количеству отдельных свободных аминокислот и их метаболитов (табл. 1). В спорулированных ооцистах обнаружено меньше свободного глицина, аланина, аспарагиновой кислоты, изолейцина, γ -аминомасляной кислоты и лизина. В спорулированных ооцистах по сравнению с неспорулированными имеется больше мочевины, пролина, аспарагина, глутамина, этаноламина, гистидина и аргинина.

Неспорулированная стадия ооцист *E. tenella* характеризуется сравнительно большим содержанием свободных аминокислот и их метаболитов, чем спорулированная. В спорулированных ооцистах сумма свободных аминокислот на 8.5 % меньше, чем в неспорулированных (58.21 мкМ у спорулированных, против 63.61 мкМ у неспорулированных). Аналогичное различие в общем содержании свободных аминокислот было получено также Сванбаевым (1982) при изучении их в спорулированных и неспорулированных ооцистах этого же вида паразита.

Таким образом, результаты исследований показывают, что состав свободных аминокислот ооцист очень богат и разнообразен. Наличие многих метаболитов аминокислот в ооци-

сте указывает на то, что несмотря на паразитический образ жизни, кокцидии сохраняли некоторые пути обмена аминокислот и других веществ, характерных для их хозяев.

Как указывалось выше, литературные данные в отношении наличия цистина в белках ооцист *E. tenella* противоречивые, т. е. одни исследователи указывают, что цистин имеется (Stotish e. a., 1978), а по данным других — он отсутствует в белках ооцист паразита (Перов, Тальдрик, 1975; Перов, 1976). Для уточнения данного вопроса нами были проведены более детальные исследования аминокислотного состава белков ооцист *E. tenella*.

Путем окисления белков ооцист надмуравьиной кислотой нами установлено, что цистин имеется в составе белков, после окисления превращается в цистеиновую кислоту и при анализе на аминокислотном анализаторе выходит из большой колонки с фронтом растворителя перед аспарагиновой кислотой.

Таким образом, выяснено, что белки ооцист *E. tenella* содержат такой же набор аминокислот, как и другие организмы. Белки ооцист паразита в обеих стадиях развития имеют одинаковый аминокислотный состав, установлено различие в их количестве (табл. 2).

Т а б л и ц а 2
Содержание аминокислот в гидролизатах белков ооцист *E. tenella*
($M \pm m$ в мкМ в 1 г сухого вещества ооцист; $n=3$)

Аминокислоты	Неспорулированные ооцисты	Спорулированные ооцисты
Аспарагиновая кислота	143.38 ± 5.62	105.41 ± 6.25 *
Треонин	112.21 ± 6.43	120.75 ± 15.30
Серин	137.93 ± 15.69	134.74 ± 14.18
Глутаминовая кислота	209.91 ± 17.60	206.46 ± 13.51
Глицин	134.16 ± 5.25	115.60 ± 4.93
Аланин	143.83 ± 13.51	131.25 ± 11.31
Валин	93.11 ± 4.43	107.71 ± 7.28
Метионин	24.89 ± 2.64	25.97 ± 1.29
Изолейцин	75.51 ± 5.53	53.77 ± 4.78
Лейцин	145.92 ± 3.96	115.00 ± 5.62 *
Тирозин	61.23 ± 1.41	63.34 ± 5.39
Фенилаланин	59.06 ± 5.06	56.46 ± 1.42
Лизин	99.48 ± 1.87	59.58 ± 4.68 *
Гистидин	58.81 ± 3.12	78.54 ± 3.13 *
Аргинин	60.16 ± 1.36	74.17 ± 2.44 *
Цистеиновая кислота	46.60 ± 1.03	46.10 ± 1.01
Сумма	1606.19	1494.85

Белки ооцист наиболее богаты глутаминовой кислотой, лейцином, аланином, аспарагиновой кислотой, серином и глицином. Белки спорулированных ооцист по сравнению с белками неспорулированных содержат меньше аспарагиновой кислоты и лейцина.

У спорулированных ооцист статистически достоверным изменениям подвергаются все три аминокислоты основного характера (лизин, гистидин и аргинин). Количество первой из них уменьшается: а последних двух — увеличивается. Как известно, эти аминокислоты входят в большем количестве в состав нуклепротеидов, принимающих непосредственное участие при делении ядер. Поэтому можно полагать, что развитие спор, спорозоитов и образование ядер сопровождается синтезом белков, содержащих больше гистидина и аргинина.

В ы в о д ы. 1. Более подробно изучен аминокислотный состав белков ооцист *E. tenella*. В гидролизатах белков ооцист обнаружены лизин, гистидин, аргинин, треонин, серин, пролин, глицин, валин, аланин, метионин, изолейцин, лейцин, тирозин, фенилаланин, цистин, глутаминовая и аспарагиновая кислоты.

2. В ооцистах в свободном виде, кроме протеиновых аминокислот, выявлены γ -аминомасляная кислота, орнитин, этаноламин, аммиак, метилгистидин-1, цистеиновая кислота, фосфоэтанолламин, таурин, мочевины, фосфосерин, гидроксипролин, саркозин, адипиновая кислота, цитруллин, α -аминомасляная кислота и цистатионин. Не обнаружены δ -аланин, δ -аминомасляная кислота и метилгистидин-1. Отмечено, что споруляция ооцист сопровождается изменением количества большинства свободных аминокислот и их метаболитов.

Л и т е р а т у р а

- М у с а е в М. А., Е л ч и е в Я. Я., Р е б р и к о в а Т. В. Способ очистки культур кокцидий. — Авт. свид. СССР, № 100 6484 от 23 ноября 1982 г. — Бюл. № 11, 23.03.83.
- П е р о в М. Ф. Аминокислоты устойчивого и чувствительного к гликамиду штаммов ооцист *Eimeria tenella*. — Матер. 2-го съезда Всес. о-ва протозоол. Ч. 3. Киев, 1976, с. 82—83.
- П е р о в М. Ф., Т а л ь д р и к А. А. Аминокислотный состав белков ооцист некоторых видов кокцидий кур. — Паразитология, 1975, т. 9, вып. 6, с. 535—539.
- С в а н б а е в Е. С. Содержание свободных аминокислот в ооцистах *Eimeria tenella*. — Современные проблемы протозоологии. Матер. 3-го съезда Всес. о-ва протозоол. Вильнюс, 1982, с. 323.
- S t o t i s h R. L., W a n g C. C., M e y e n h o f e r M. Structure and composition of the oocysts wall of *Eimeria tenella*. — J. Parasitol., 1978, vol. 64, N 6, p. 1074—1081.

Институт зоологии АН АзССР,
Баку

Поступила 21 XI 1984

AMINO ACIDS AND THEIR METABOLITES IN THE OOCYSTS OF *EIMERIA TENELLA* (COCCIDIIDA)

Ya. Ya. Yelchiyev

S U M M A R Y

The amino acid composition of protein in the oocysts of *Eimeria tenella* has been studied in detail by using the new method of purification of the coccidial oocysts. 35 amino acids and their metabolites have been established for the first time at the exogenous stages of development of *E. tenella*. The oocyst sporulation is noted to be followed by quantitative changes of the majority of free amino acids and their metabolites.
