

УДК 577.352.315:612.33

DOI: 10.37000/abbsl.2019.95.04

**СТРУКТУРНІ БІЛКИ ПЛАЗМОЛЕМИ ЕНТЕРОЦИТІВ  
Порожньої кишки великої рогатої у пізньому  
плодовому періоді**

Д. Масюк

*Дніпровський державний аграрно-економічний університет*

*Наведено результати досліджень експресії структурних білків плазмолемі різних доменів мембран абсорбційних ентероцитів порожньої кишки великої рогатої у пізньому плодовому періоді. Встановлено, що у пізній плідний період відбуваються динамічні зміни поліпептидного складу апікальних та базолатеральних мембран ентероцитів, що характеризуються не лише змінами їх відношення, але і перерозподілом між полюсами цих клітин.*

**Ключові слова:** поліпептиди, порожня кишка, ентероцити, апікальна мембрана, базолатеральна мембрана.

**Вступ.** За останнє десятиліття в результаті значних досягнень науки у сфері молекулярних механізмів життєдіяльності клітини були досліджені структурно-функціональні особливості плазматичних мембран ентероцитів [1]. У повній мірі встановлена участь плазмолемі цих клітин в транспортних і регуляторних процесах як в нормі, так і за патології [2]. Доведено провідну роль полярності ентероцитів для забезпечення їх властивостей і функцій [3], зокрема, апікальна мембрана відповідає за гідроліз та транспорту речовин до ентероциту, а базолатеральна мембрана – за транспорт речовин у кровоносне русло [4]. Серед іншого, ентероцити забезпечують трансцитозу імуноглобулінів молозива, що зумовлює формування колострального імунітету в організмі новонароджених тварин [5]. Ключовими як структурними так і функціональними компонентами мембран плазмолемі ентероцитів є поліпептиди, що забезпечують транспорту і секреції поживних речовин, мембранний гідроліз, рецепцію та регуляцію клітинного метаболізму [6]. Білковий склад плазмолемі ентероцитів залежить від багатьох складових, зокрема типу годівлі, віку, виду тварин, фізіологічного стану і ін. [7]. Однак дані щодо динаміки змін якісного і кількісного поліпептидного складу мембран ентероцитів великої рогатої худоби протягом усього плідного періоду у доступній літературі відсутні.

**Мета дослідження** – дослідити співвідношення структурних білків плазмолемі абсорбційних ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби у пізньому плодовому періоді.

**Матеріали і методи дослідження.** Матеріал для досліджень відбирали від 80-ти плодів великої рогатої худоби, віком від 2-х до 4-х місяців, отриманих від клінічно здорових корів, під час вимушеного забою в умовах м'ясопереробного підприємства. Забій тварин проводили з дотриманням вимог «Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та наукових цілей» (Страсбург, 1986), декларації «Про гуманне ставлення до тварин» (Гельсінкі, 2000), Національного конгресу з

біоетики «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах» (Київ, 2001) та Закону України № 3447 – IV від 21.02.06 р. «Про захист тварин від жорстокого поводження». Після евтаназії плодів, розтинали черевну порожнину, виділяли порожню кишку. Відбирали ділянку кишки у ранній плодовий період (2-, 3-, 4-місяці) середньою довжиною 0,8 м, яку розрізали уздовж та ділили на невеликі сегменти по 1,5-3 см і ретельно промивали (4-5 разів) холодним (4–6°C) середовищем такого складу: 120 мМ NaCl та 1 мМ HEPES, за допомогою сухого трісу доводили рН до 7,4. Метод розрізання кишки у плодів 5-, 7- та 9-місячного віку використовували замість вивертання у зв'язку з її малим діаметром. За основу виділення кишкових клітин був хімічний (цитрат/ЄДТО) метод (Томчук В.А., Усатюк П.В., Цвіліховський М.І., Мельничук Д.О., 1994) на основі якого розроблялась авторська модифікація методу (Масюк Д.М., 2004) отримання ізольованих ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби. Для отримання апікальних мембран і базолатеральних мембран із суспензії ізольованих ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби використовували базову методику диференціального центрифугування (Цвіліховський М.І., Усатюк П.В., Мельничук Д.О., 1988) у нашій модифікації (Масюк Д.М., 2004). Ефективність отримання фракцій плазмолемі здійснювали по виходу мембранного матеріалу за кількістю білка. Дослідження вмісту і складу структурних білків плазмолемі ентероцитів проводили за допомогою електрофорезу у поліакриламідному гелі товщиною 1 мм (Laemmli, 1970). У гелі для розділення білків формували градієнт акриламідну  $T=7-18\%$ .

Результати досліджень обробляли з використанням параметричних і непараметричних статистичних критеріїв для малих виборок: t-критерію Ст'юдента (Кокунин, 1975; Лакин, 1990). Зміни показників вважали достовірними при  $P<0,05-0,001$ , після перевірки гіпотез про нормальність розподілення та різницю між генеральними дисперсіями.

**Результати досліджень.** Відношення концентрації окремих білкових фракцій у апікальній та базолатеральній мембрані ентероцитів протягом пізнього дослідного періоду динамічно змінюється. Неоднаковий вміст поліпептидів на окремих полюсах ентероцитів та їх зміни протягом пізнього плідного періоду дає нові наукові дані щодо як структурних, так і функціональних змін у цих клітинах. В апікальній мембрані ентероцитів плодів п'ятимісячного віку, порівняно з базолатеральною, більший вміст білків з молекулярною масою 17 кДа у 1,52 раза ( $p\leq 0,001$ ), 29 кДа у 1,23 раза ( $p\leq 0,01$ ), 35 кДа у 1,57 раза ( $p\leq 0,001$ ), 39 кДа у 4,55 раза ( $p\leq 0,001$ ), 52 кДа у 1,51 раза ( $p\leq 0,001$ ), 63 кДа у 1,28 раза ( $p\leq 0,001$ ), 72 кДа у 1,22 раза ( $p\leq 0,001$ ), 75 кДа у 1,62 раза ( $p\leq 0,001$ ), 87 кДа у 1,46 раза ( $p\leq 0,001$ ), 100 кДа у 3,12 раза ( $p\leq 0,001$ ) та 155 кДа у 5,70 раза ( $p\leq 0,001$ ). І навпаки, у базолатеральній мембрані ентероцитів вміст поліпептидних фракцій з молекулярною масою 9,6–14,2 кДа, 21 кДа, 22,5 кДа, 26 кДа, 33 кДа та 120 кДа більше від такого у апікальній мембрані відповідно у 7,34 раза ( $p\leq 0,001$ ), 2,36 раза ( $p\leq 0,001$ ), 1,55 раза ( $p\leq 0,001$ ), 1,52 раза ( $p\leq 0,001$ ), 1,24 раза ( $p\leq 0,01$ ) та у 2,01 раза ( $p\leq 0,001$ ).

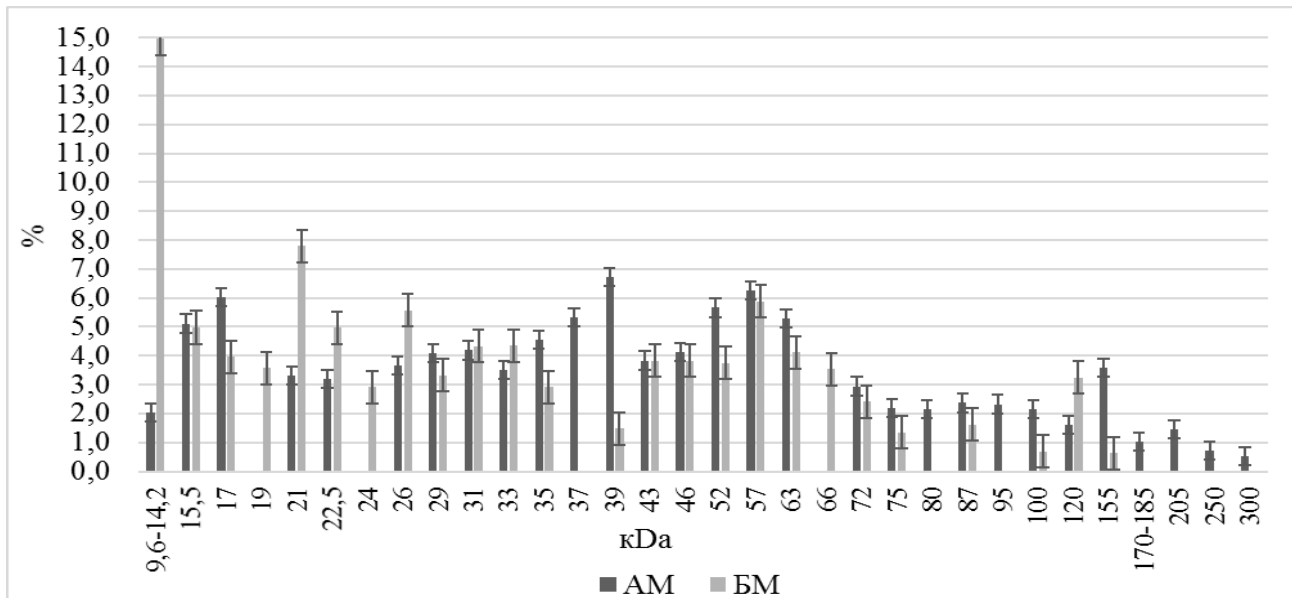


Рис. 1. Структурні білки мембрани ентероцитів порожньої кишки п'ятимісячних плодів великої рогатої худоби ( $M \pm m$ ; %;  $n=6$ ).

Як свідчать отримані результати досліджень до семимісячного віку ембріонів великої рогатої худоби змінюється відношення окремих фракцій поліпептидів між апікальною та базальною мембраною (рис. 2). Так, у базолатеральній мембрані ентероцитів порожньої кишки семимісячних плодів великої рогатої худоби вміст поліпептидів з молекулярною масою 39 кДа був більше у 1,28 раза ( $p \leq 0,01$ ), а 155 кДа у 1,36 раза ( $p \leq 0,001$ ) від відповідних значень їх концентрації у апікальній мембрані.

Окрім цього, в апікальній мембрані ентероцитів плодів семимісячного віку, порівняно з базолатеральною, залишається більший вміст білків з молекулярною масою 17 кДа – у 4,34 раза ( $p \leq 0,001$ ), 29 кДа – у 1,59 раза ( $p \leq 0,01$ ), 31 кДа – у 3,89 раза ( $p \leq 0,001$ ) та 52 кДа – у 1,28 раза ( $p \leq 0,001$ ). Поряд з цим, у базолатеральній мембрані ентероцитів більший вміст поліпептидних фракцій з молекулярною масою 15,5 кДа (у 1,36 раза;  $p \leq 0,001$ ), 43 кДа (у 1,49 раза;  $p \leq 0,001$ ), 46 кДа (у 1,67 раза;  $p \leq 0,001$ ), 63 кДа (у 1,49 раза;  $p \leq 0,001$ ), 72 кДа (у 1,65 раза;  $p \leq 0,01$ ), 87 кДа (у 1,87 раза;  $p \leq 0,01$ ) та 100 кДа (у 2,46 раза;  $p \leq 0,001$ ) від такого у апікальній мембрані.

Слід також відмітити, що хоча в апікальній мембрані ентероцитів порожньої кишки семимісячних плодів з'являються поліпептидні фракції з молекулярною масою 66 кДа, їх все-таки менше у 1,58 раза ( $p \leq 0,001$ ) від такого у базолатеральній мембрані. Однак, білки з молекулярною масою 300 кДа, що з'являються у семимісячному віці в базолатеральній мембрані одразу домінують над їх вмістом у апікальній мембрані в цей період (більше у 1,11 раза;  $p \leq 0,05$ ). Тоді, як поява у цей період білків з молекулярною масою 24 кДа у апікальній мембрані супроводжується їх переважанням на цьому домені у 1,87 раза ( $p \leq 0,001$ ) порівняно з їх вмістом у базолатеральній мембрані ентероцитів. До дев'ятимісячного віку ембріонів великої рогатої худоби відношення поліпептидів з середньою молекулярною масою між апікальною та базальною мембраною істотно не змінюється (рис. 3). Слід відмітити, більшу

концентрацію у базолатеральних мембранах ентероцитів порожньої кишки дев'ятимісячних ембріонів вмісту поліпептидів з молекулярною масою 52 кДа (у 1,26 раза;  $p \leq 0,001$ ). Причому, білки з молекулярною масою 46 кДа починають переважати на апікальному домені (в 1,56 раза;  $p \leq 0,001$ ). Відмітимо також, що білки з молекулярною масою 57 кДа, 72 кДа та 120 кДа в рівній мірі представлені на обох полюсах ентероцитів, тоді, як у восьмимісячному віці вони домінували на базолатеральній мембрані.

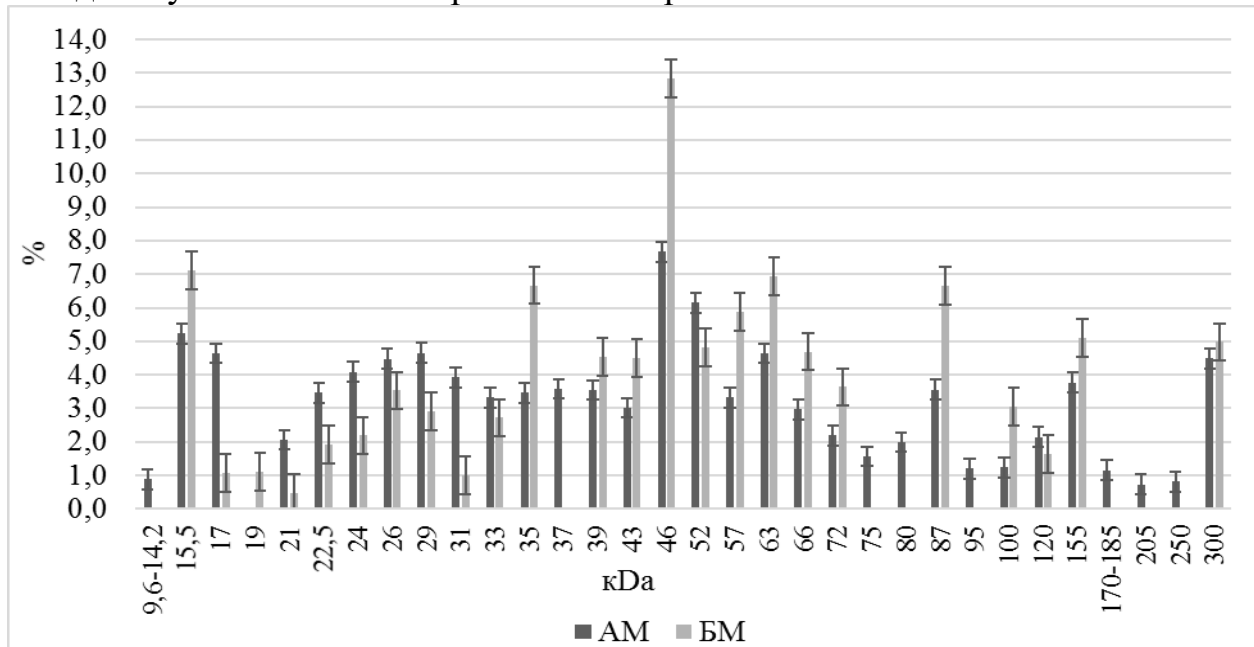


Рис. 2. Структурні білки мембрани ентероцитів порожньої кишки семимісячних плодів великої рогатої худоби ( $M \pm m$ ; %;  $n=6$ ).

Аналіз проведених досліджень вказує на те, що у апікальній мембрані ентероцитів плодів дев'ятимісячного віку, порівняно з базолатеральною, переважає вміст білків з невеликою молекулярною масою (від 21 кДа до 33 кДа), тоді, як у базолатеральній мембрані домінують значно важчі білки (від 35 кДа до 300 кДа). Так, у апікальній мембрані встановлено більший вміст білків з молекулярною масою 17 кДа – у 8,48 раза ( $p \leq 0,001$ ), 21 кДа – у 1,23 раза ( $p \leq 0,001$ ), 22,5 кДа – у 6,39 раза ( $p \leq 0,001$ ), 24 кДа – у 1,29 раза ( $p \leq 0,001$ ), 26 кДа – у 1,56 раза ( $p \leq 0,001$ ), 29 кДа – у 1,27 раза ( $p \leq 0,01$ ), 31 кДа – у 1,54 раза ( $p \leq 0,001$ ), 33 кДа – у 1,61 раза ( $p \leq 0,001$ ) та 46 кДа – у 1,56 раза ( $p \leq 0,01$ ). На відміну від цього у базолатеральній мембрані ентероцитів більший вміст поліпептидних фракцій з молекулярною масою 15,5 кДа – у 3,64 раза ( $p \leq 0,001$ ), 35 кДа – у 1,63 раза ( $p \leq 0,01$ ), 39 кДа – у 1,88 раза ( $p \leq 0,001$ ), 43 кДа – у 1,87 раза ( $p \leq 0,001$ ), 52 кДа – у 1,26 раза ( $p \leq 0,001$ ), 63 кДа – у 1,11 раза ( $p \leq 0,05$ ), 66 кДа – у 1,29 раза ( $p \leq 0,001$ ), 87 кДа – у 3,16 раза ( $p \leq 0,001$ ), 100 кДа – у 3,03 раза ( $p \leq 0,001$ ), 155 кДа – у 1,15 раза ( $p \leq 0,05$ ), 170–185 кДа – у 1,50 раза ( $p \leq 0,001$ ) та 300 кДа – у 1,59 раза ( $p \leq 0,001$ ) від такого у апікальній мембрані.

З вищенаведеного можна зробити висновок, що у пізній плідний період відбуваються істотні зміни білкового складу апікальних та базальних мембран ентероцитів, що характеризуються їх динамічним розподілом між полюсами

ентероцитів з переважанням у дев'ятимісячному віці поліпептидів з більшою масою на базолатеральній мембрані і з меншою – на апікальній.

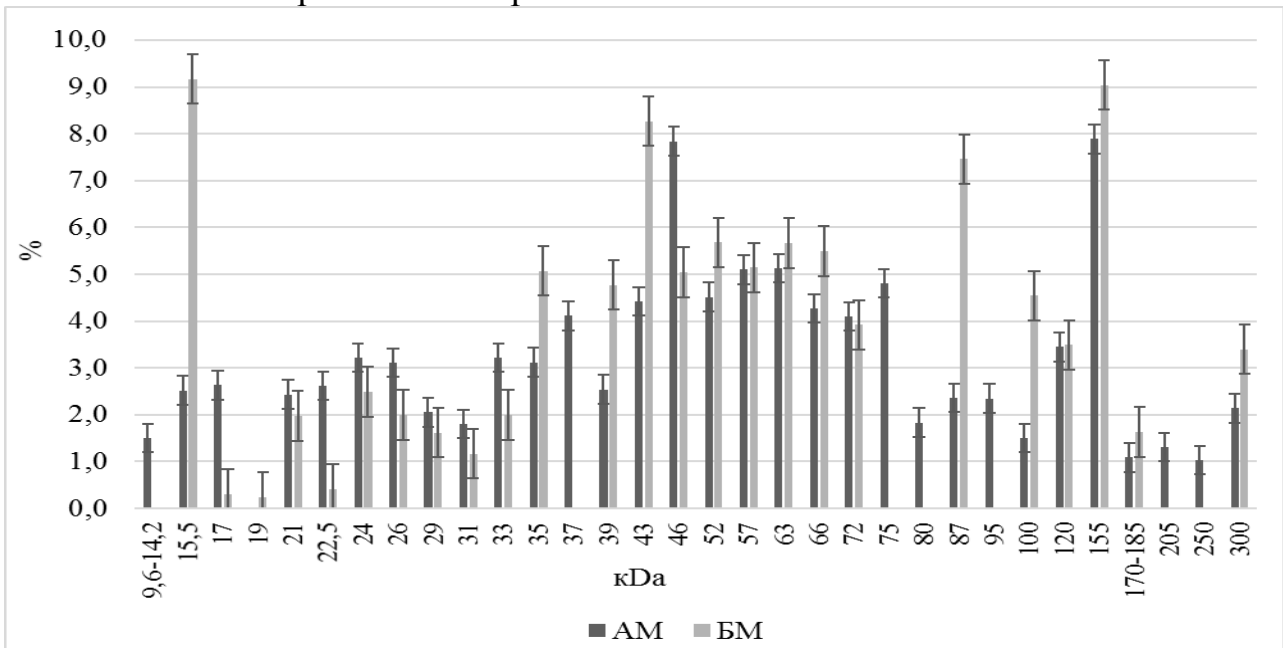


Рис. 3. Структурні білки мембрани ентероцитів порожньої кишки дев'ятимісячних плодів великої рогатої худоби (M±m; %; n=6).

Результати наших досліджень частково узгоджуються з даними Цвіліховського М. І., яким встановлено, що в апікальній мембрані ентероцитів дорослих корів міститься 26, а в базолатеральній 29 поліпептидних фракцій [3]. Нами встановлено, що у пізньому плодovому періоді в базолатеральних мембранах ентероцитів п'ятимісячних плодів великої рогатої худоби виявлено 25 білкових фракцій з молекулярною масою від 9,6 до 155 кДа. В цей час відбувається зменшення вмісту низькомолекулярних білкових фракцій (у 3,3 раза;  $p \leq 0,001$ ) та збільшення частки високомолекулярних. Крім цього з семимісячного віку зникають білки з молекулярною масою 9,6–14,2 кДа, а з шестимісячного – білки 75 кДа, а заявляються білки з молекулярною масою 300 кДа та 170–185 кДа. Відмінність у експресії поліпептидів на окремих полюсах ентероцитів та її динамічні зміни протягом плідного періоду дає уявлення як про структурні, так і функціональні зміни у цих клітинах.

**Висновки.** У пізній плідний період відбуваються динамічні зміни поліпептидного складу апікальних та базолатеральних мембран ентероцитів, що характеризуються не лише змінами їх відношення, але і перерозподілом між полюсами цих клітин. У апікальних та базолатеральних мембран виявлено відповідно 31 та 27 білкових фракцій з молекулярною масою від 9,6 кДа до 300 кДа. В цей час відбувається зменшення вмісту низькомолекулярних білкових фракцій та збільшення частки високомолекулярних.

### Список літератури

1. Бугай А. О., Цвіліховський М. І. Ензимативна активність транспортних атфаз плазмолем абсорбційних ентероцитів курчат-бройлерів за впливу лікопену. Біологія тварин. - 2010. Т. 12, № 2. С. 96-105.

2. Мельничук Д.О., Усатюк П.В., Цвіліховський М.І. Роль білкових структур плазматичної мембрани кишкового епітелію у формуванні колострального імунітету новонароджених телят // Вісник Національного аграрного університету. – Київ, 1998. - № 6. - С. 13-20.

3. Цвіліховський М. І., Береза В. І., Немова Т. В., Якимчук О. М. Лімітні фактори і патологія тварин антенатального та постнатального розвитку. Вісн. Полтав. держ. аграр. акад.. 2014. № 3. С. 92–94.

4. Mohammad A. W. et al. Nanofiltration membranes review: Recent advances and future prospects //Desalination. – 2015. – Т. 356. – С. 226-254.

5. Tarabova L. et al. Intestinal mucus layer and mucins (a review) //Folia Veterinaria. – 2016. – Т. 60. – №. 1. – С. 21-25.

6. St Johnston D1, Sanson B. Epithelial polarity and morphogenesis. Curr Opin Cell Biol. 2011 Oct;23(5):540-6. doi: 10.1016/j.ccb.2011.07.005.

7. Folsch H. 2008. Regulation of membrane trafficking in polarized epithelial cells. Curr Opin Cell Biol 20: 208-213.

### **СТРУКТУРНЫЕ БЕЛКИ ПЛАЗМОЛЕММЫ ЭНТЕРОЦИТОВ ТОНКОЙ КИШКИ КРУПНОГО РОГАТОГО В ПОЗДНЕМ ПЛОДНОМ ПЕРИОДЕ Масюк Д.Н.**

*Приведены результаты исследований экспрессии структурных белков плазмолеммы разных доменов мембран абсорбционных энтероцитов тонкой кишки крупного рогатого в позднем плодовом периоде. Установлено, что в поздний плодотворный период происходят динамические изменения полипептидного состава апикальных и базолатеральных мембран энтероцитов, что характеризуется не только изменениями их отношения, но и перераспределением между полюсами этих клеток.*

**Ключевые слова:** полипептиды, пустая кишка, энтероциты, апикальная мембрана, базолатеральных мембрана.

### **STRUCTURAL PROTEINS OF PLASMOLEMS OF THE LEGAL HORROR ENTROCYTES IN THE LATE FRUIT PERIOD Masyuk DM**

*The results of studies of the expression of plasmolemic structural proteins of different membrane domains of the absorptive enterocytes of the cavity of the cattle in the late fetal period are presented. It is established that in the late fertile period dynamic changes of the polypeptide composition of apical and basolateral membranes of enterocytes occur, characterized not only by changes in their ratio but also by redistribution between the poles of these cells.*

**Keywords:** polypeptides, empty gut, enterocytes, apical membrane, basolateral membrane.