

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

МАСЮК ДМИТРО МИКОЛАЙОВИЧ

УДК 577.352.315:612.33

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА
БІЛКІВ ПЛАЗМОЛЕМИ ЕНТЕРОЦИТІВ ПОРОЖНЬОЇ КИШКИ
ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ У ПЛОДОВИЙ ПЕРІОД ОНТОГЕНЕЗУ**

03.00.13 «Фізіологія людини і тварин»

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора ветеринарних наук

Київ – 2020

Дисертацією є кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису
Роботу виконано в Національному університеті біоресурсів і природо-
користування України Міністерства освіти і науки України та Дніпровському
державному аграрно-економічному університеті Міністерства освіти і науки
України

Науковий консультант доктор біологічних наук, професор,
академік НААН
Цвіліховський Микола Іванович,
Національний університет біоресурсів
і природокористування України,
декан факультету ветеринарної медицини

Офіційні опоненти: доктор ветеринарних наук, професор
Гуфрій Дмитро Федорович,
Львівський національний
університет ветеринарної медицини
та біотехнологій імені С. З. Гжицького,
професор кафедри фармакології та токсикології

доктор ветеринарних наук, доцент
Бобрицька Ольга Миколаївна,
Харківська державна зооветеринарна академія,
професор кафедри нормальної
і патологічної фізіології тварин

доктор ветеринарних наук, професор
Віщур Олег Іванович,
Інститут біології тварин НААН,
завідувач лабораторії імунології

Захист відбудеться «29» жовтня 2020 року о 10⁰⁰ годині на засіданні
спеціалізованої вченої ради Д 26.004.14 у Національному університеті
біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ,
вул. Героїв Оборони, 15, навчальний корпус № 3, кімната 301

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Національного
університету біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041,
м. Київ, вул. Героїв Оборони, 13, навчальний корпус № 4, кімната 41а

Автореферат розіслано «28» вересня 2020 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

О. В. Журенко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. За останні десятиліття, в результаті значних досягнень фізіологічної науки у дослідженні молекулярних механізмів життєдіяльності клітини, було вивчено структурно-функціональні особливості плазматичних мембран ентероцитів (Томчук В. А. і співавтори, 1994; Болдырев А. А., 1997; Бугай А. О., Цвіліховський М. І., 2010; Grandl F. et al., 2018). Повною мірою встановлено участь плазмолемі цих клітин у транспортних і регуляторних процесах як у нормі, так і за патологій (Мельничук Д. О. і співавтори, 2002). Доведено провідну роль полярності ентероцитів для забезпечення їх властивостей і функцій (Мельничук Д. О. і співавтори, 1998; Afshar Nima et al., 2019). Зокрема, апікальна мембрана відповідає за гідроліз та транспорт речовин до ентероциту, а базолатеральна – за транспорт речовин у кров'яне русло (Tilney L. G. et al., 1973; Цвіліховський М. І., 1998–2014). Серед іншого, ентероцити забезпечують трансцитоз імуноглобулінів молозива, що зумовлює формування колострального імунітету в організмі новонароджених тварин (Mohammad A. W. et al., 2015). Водночас, відомості про закономірності структурно-функціональної організації плазматичних мембран клітин слизової оболонки кишечника у період внутрішньоутробного розвитку є нині фрагментарними та нечисельними, а дані щодо активності гідролітичних і транспортних ензимів апікальних і базолатеральних мембран ентероцитів плодів великої рогатої худоби майже відсутні. Дослідження експресії активності мембранних ензимів ентероцитів дозволить розкрити як загальні закономірності їх формування у пренатальному онтогенезі, так і особливості становлення окремих ланок, що відповідають за розвиток потенційних можливостей функціональної регуляції з біологічно активними компонентами молозива.

Ключовими структурними і функціональними компонентами мембран плазмолемі ентероцитів є поліпептиди, що забезпечують транспорт і секрецію поживних речовин, мембранний гідроліз, рецепцію та регуляцію клітинного метаболізму (Tarabova L. et al., 2016). Білковий склад плазмолемі ентероцитів залежить від багатьох складових, зокрема, типу годівлі, віку, виду тварин, фізіологічного стану тощо. (St Jean G., 1989; Folsch H., 2008). Однак, дані щодо динаміки змін якісного і кількісного поліпептидного складу мембран ентероцитів великої рогатої худоби протягом усього плодового періоду у доступній літературі відсутні.

Fc γ -рецептори (Fc γ R) є одними з найбільших важливих регуляторів імунітету і транспортерів сигнальних молекул. Вони є чутливими сенсорами імунного статусу організму, розпізнають імунні комплекси, до складу яких входить IgG та забезпечують інтерналізацію таких комплексів з наступною активацією сигнальних каскадів у відповідних клітинах (Junker et al., 2020). Fc γ R широко експоновані у різних за гістотипом клітинах ссавців, зокрема, у жовтковому мішку, плацентарному синцитіотрофобласті, у постнатальний період онтогенезу – в тонкій кишці, капілярному ендотелії, гепатоцитах,

ниркових проксимальних каналцях, дихальному епітелії та епітелії молочної залози (Nimmerjahn F. et al., 2005–2008). Сьогодні достатньо детально вивчено локалізацію FcγR на кишкових клітинах і з'ясовано механізм передачі імуноглобулінів через плаценту гризунів і людини до плоду та через тонку кишку у новонароджених ссавців, у тому числі й у великої рогатої худоби (Усатюк П. В. і співавтори, 1990; Dickinson B. et al., 1999). Водночас, відомості про розподіл FcγR та їх участь у активації імунних механізмів у плодовий період великої рогатої худоби відсутні. З огляду на це, важливо дослідити особливості експресії білків плазмолемі ентероцитів порожньої кишки великої рогатої худоби у плодовий період онтогенезу, зокрема, закономірності експресії FcγR плазматичної мембрани ентероцитів порожньої кишки. Результати дослідження особливостей структурно-функціональних перетворень білків плазмолемі ентероцитів порожньої кишки великої рогатої худоби у плодовий період онтогенезу дозволять розробити науково обґрунтовані безпечні способи і методи імунокорекції та імунопрофілактики, що сприятиме підвищенню життєздатності та максимальному рівню реалізації генетичного потенціалу продуктивності тварин.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Результати дисертації є окремими розділами наукових тем Дніпровського державного аграрно-економічного університету: «Визначення молекулярних механізмів становлення мембранного травлення у сільськогосподарських тварин та розробка методів оптимізації мембранного травлення» (номер державної реєстрації 0106U010063, 2005–2008 рр.); «Визначення фізіологічних та біохімічних критеріїв статусу бар'єрних систем і особливостей метаболізму в організмі свійських тварин на різних етапах онтогенезу в умовах інтенсивного антропогенно-техногенного пресингу та розробка способів підвищення їх життєздатності та продуктивності із застосуванням імунологічних та нанотехнологічних інновацій» (номер державної реєстрації 0110U008505, 2010–2014 рр.); «Розробка комплексної системи фізіологічних, біохімічних та імунологічних критеріїв із метою оцінки стану здоров'я свійських тварин за показниками метаболічного статусу, резистентності та реактивності із застосуванням інноваційних молекулярних методів» (номер державної реєстрації 0115U007122, 2016–2020 рр.). Частину досліджень виконано автором, як іменним стипендіатом Кабінету Міністрів України за темою «Структурно-функціональні особливості білків мембран епітеліоцитів тонкого кишечника у плодів і новонароджених телят» (2001–2004 рр.).

Мета та завдання дослідження. Мета роботи – визначити особливості структурно-функціональних перетворень білків плазмолемі ентероцитів порожньої кишки великої рогатої худоби у плодовий період онтогенезу.

Досягнення цієї мети зумовило постановку та вирішення таких завдань:

- встановити фізіологічні особливості структурних компонентів слизової оболонки порожньої кишки плодів великої рогатої худоби;
- виявити динаміку цитометричних показників епітеліальних клітин із посмуговою облямівкою порожньої кишки плодів великої рогатої худоби;

- дослідити модуляцію вмісту структурних білків плазмолемі кишкових епітеліальних клітин з посмугованою облямівкою протягом плодового періоду;
- з'ясувати фізіологічну роль модуляції активності гідролітичних ензимів на різних ділянках мембран ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби;

- визначити розподіл активності йон-транспортних систем на апікальній та базолатеральній мембранах кишкових клітин плодів великої рогатої худоби;

- ідентифікувати поліпептидний склад Fc- γ -рецепторів плазмолемі ентероцитів великої рогатої худоби у плодовий період онтогенезу;

- дослідити закономірності пренатальної модуляції експресії Fc- γ -рецепторів плазматичної мембрани ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби;

- встановити локалізацію Fc- γ -рецепторної активності плазмолемі ентероцитів у плодів великої рогатої худоби;

- сформулювати концепцію фізіологічних систем сигналізації та механізмів розвитку бар'єрної на імунної функцій у плода за участі Fc- γ -рецепторів.

Об'єкт дослідження – фізіологічні механізми участі ензимів, йон-транспортних систем, Fc- γ -рецепторів і поліпептидів у морфо-функціональних процесах розвитку плазматичної мембрани ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби.

Предмет дослідження – порожня кишка, ізольовані ентероцити порожньої кишки, апікальні та базолатеральні мембрани, білковий вміст плазмолемі, йон-транспортні системи, Fc- γ -рецептори.

Методи дослідження: фізіологічні, клінічні, морфологічні (анатомічне препарування, морфометрія, цитометрія, мікроскопія препаратів), фізико-хімічні методи (спектрофотометрія, фотоколориметрія, ультрацентрифугування, електрофорез у поліакриламідному гелі; імунохімічні методи (імуноблотинг, імуногістохімія), статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше сформульовано новий підхід щодо комплексного дослідження поліпептидного складу та ензимної активності, а також наявності імунорецепторних білків, які здатні специфічно розпізнавати Fc-фрагменти імуноглобулінів класу G плазматичної мембрани ентероцитів у взаємозв'язку із структурно-функціональними особливостями слизової оболонки порожньої кишки великої рогатої худоби у плодовий період онтогенезу. Крім того, виявлено вікові зміни поліпептидного вмісту та активності ензимів плазматичних мембран ентероцитів порожньої кишки плодів, які характеризують фізіолого-біохімічні аспекти розвитку мембранного травлення та всмоктування у пренатальному онтогенезі великої рогатої худоби. Отримано нові наукові дані щодо мінливості білкового складу на апікальній та базолатеральній мембранах кишкових клітин плодів великої рогатої худоби та з'ясовано його динаміку.

Доведено, що активність транспортних аденозинтрифосфатаз плазмолемі кишкових клітин є більш високою на базолатеральній мембрані ентероцитів, порівняно з апікальною мембраною, протягом плодового періоду онтогенезу великої рогатої худоби. Кінетика активності йонних pomp є специфічною

для кожного полюсу клітин з переважною тенденцією до зниження протягом усього періоду в апікальній частині плазмолемі та певною періодичністю і асинхронністю відповідних змін у базолатеральній її частині. Специфіка динаміки активності гідролаз плазматичної мембрани ентероцитів у фетальному періоді онтогенезу визначається провізорною гетерохронністю для кожного ензиму із загальною тенденцією до зниження та має певні особливості для кожного макродомена. До того ж, ідентифіковано чотири основні поліпептиди з молекулярними масами 120 кДа, 87, 72 та 43 кДа, які проявляють Fc-γ-зв'язувальну активність на клітинних мембранах порожньої кишки плодів великої рогатої худоби. Виявлено динаміку змін умісту для кожного класу FcγR на полярних ділянках ентероцитів у плодовий період онтогенезу. Для поліпептидів з молекулярними масами 87 і 72 кДа (FcγRIII і FcγRI) характерною є інверсна модуляція експресії з базолатеральної поверхні кишкової клітини (у ранній плодовий період) на апікальну (у пізній плодовий період), а для білка з молекулярною масою 43 кДа (FcγRII) відповідно, навпаки. Поліпептид із молекулярною масою 120 кДа (FcγRf) проявляє значно інтенсивнішу експресію на базолатеральному домені ентероцитів упродовж усього фетального періоду.

Уперше запропоновано наукову концепцію щодо фізіологічного значення FcγR плазмолемі ентероцитів великої рогатої худоби у плодовий період онтогенезу. Результати дослідження вказують на участь FcγR у транслокації сигналів від організму корови через ланцюг мати – плацента – плід. FcγR можуть виступати одними з важливих сигнальних систем у регуляції розвитку ентероцитів і, в цілому, функції всмоктування; розпізнають специфічні сигнали від імуноглобулінів та імунних комплексів IgG-антиген; відіграють важливу роль у трансцитозі та рециклінгу IgG із амніотичної рідини у фетальну циркуляцію; можуть формувати імунні механізми плода та брати участь у розвитку механізмів травлення.

Практичне значення одержаних результатів. Запропоновано гіпотезу щодо особливостей структурно-функціональних перетворень білків плазмолемі ентероцитів порожньої кишки великої рогатої худоби у плодовий період онтогенезу. Запропонована схема трансцитозу IgG і їх комплексів з антигенами за допомогою FcγR різних класів (FcγRf, FcγRI, FcγRII і FcγRIII) у кишкових клітинах плодів дає можливість передбачити фізіологічну роль різних класів FcγR у розвитку специфічних імунних функцій у плодовий період великої рогатої худоби та дозволить об'єктивно характеризувати і прикладні аспекти фетальної імунології. Ця схема також відкриває можливості для подальших наукових досліджень щодо розкриття патогенезу імунодефіцитних станів новонароджених телят і рекомендується до використання фахівцям ветеринарної медицини під час створення нових сучасних методів імунокорекції та імунопрофілактики. Усе це сприятиме підвищенню їх життєздатності та максимальному рівню реалізації генетичного потенціалу продуктивності.

Результати проведених досліджень значно розширюють і поглиблюють сучасні уявлення про взаємозв'язок між структурно-функціональними

і біохімічними показниками епітеліальних клітин із посмугованою облямівкою та формуванням імунних механізмів у плодовий період онтогенезу великої рогатої худоби. Отримані дані щодо динаміки формування ензимної активності, визначення концентрації структурних білків плазмолемі є основою для подальших наукових досліджень особливостей процесів мембранного гідролізу, транспорту, секреції речовин у кишковому каналі жуйних тварин у пренатальному і ранньому постнатальному онтогенезі. Ці результати відіграють надзвичайно важливе значення для розвитку теоретичних і, особливо, практичних аспектів ветеринарної перинатології.

Важливо відзначити, що розроблений метод отримання ізольованих ентероцитів порожньої кишки у плодів великої рогатої худоби має високу ефективність, з урахуванням особливостей морфогенезу її слизової оболонки. Запропонована високоефективна модифікація схеми отримання апікальних і базолатеральних мембран ізольованих ентероцитів великої рогатої худоби у плодовий період онтогенезу дозволяє диференціювати вміст таких мембран та їх особливості. Рекомендується використовувати ці кишкові клітини та їх високоочищені мембранні фракції як моделі для фізіолого-біохімічних, молекулярно-біологічних і цитологічних досліджень.

Отримані дані пропонуються до використання вченими фізіологами та молекулярними біологами в науково-дослідній роботі, а також для написання відповідних розділів навчальної і довідкової літератури.

Основні положення дисертації впроваджено в навчальний процес і науково-дослідну роботу Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК Національного університету біоресурсів і природокористування України; кафедри нормальної та патологічної фізіології тварин Харківської державної зооветеринарної академії; кафедри нормальної та патологічної фізіології тварин Білоцерківського національного аграрного університету; кафедри фізіології та біохімії сільськогосподарських тварин Дніпровського державного аграрно-економічного університету; кафедри патологічної анатомії та патофізіології Полтавської державної аграрної академії; кафедри фізіології, біохімії та мікробіології Одеського державного аграрного університету; лабораторії екологічної фізіології та якості продукції Інституту біології тварин НААН; лабораторії контролю хіміотерапевтичних препаратів Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем самостійно виконано експериментальну частину роботи, проведено аналіз отриманих результатів, сформульовано й обґрунтовано наукову концепцію, спільно з науковим консультантом розроблено програму досліджень. З наукових праць, опублікованих у співавторстві, в дисертації використано лише авторські ідеї та положення, що зазначено у списку публікацій здобувача.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації апробовано та обговорено на: науково-практичних конференціях професорсько-викладацького складу та аспірантів Національного аграрного університету

(м. Київ, 2004–2007 рр.); III конференції Всеукраїнського товариства ветеринарних патологів (м. Харків, 2004 р.); V Міжнародній науково-практичній конференції «Проблеми неінфекційної патології тварин» (м. Біла Церква, 2005 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні проблеми біохімії, фізіології та функціональної морфології продуктивних тварин» (м. Дніпропетровськ, 2005 р.); IX Українському Біохімічному з'їзді (м. Київ, 2006 р.); Міжнародній науковій конференції «Ветеринарні препарати: розробка, контроль якості та застосування» (м. Львів, 2007 р.); II з'їзді Українського товариства клітинної біології (м. Київ, 2007 р.); V Міжнародному конгресі спеціалістів ветеринарної медицини (м. Київ, 2007 р.); науково-практичній конференції «Актуальні напрямки сучасної ветеринарної медицини» (м. Дніпропетровськ, 2007 р.); науково-практичній конференції, присвяченій 100-річчю кафедри мікробіології та біотехнології ХЗВІ (м. Харків, 2007 р.); Міжнародній конференції молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери» (м. Харків, 2007 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні проблеми ветеринарної медицини» (м. Кам'янець-Подільський, 2008 р.); III з'їзді Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом (м. Ялта, 2012 р.); II Міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (м. Дніпропетровськ, 2013 р.); XIV Міжнародній науково-практичній конференції професорсько-викладацького складу та аспірантів, присвяченій 95-річчю факультету ветеринарної медицини «Проблеми ветеринарної медицини та якості і безпеки продукції тваринництва» (м. Київ, 2015 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні питання фізіології тварин» (м. Харків, 2017 р.); IV Міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (м. Дніпро, 2017 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні проблеми фізіології тварин» (м. Чернігів, 2018 р.); III–V міжнародних науково-практичних конференціях викладачів і студентів «Актуальні аспекти біології тварин, ветеринарної медицини та ветеринарно-санітарної експертизи» (м. Дніпро, 2018–2020 рр.).

Публікації. Основні положення дисертації опубліковано в 61 науковій праці, з яких 30 статей у наукових фахових виданнях України, 5 статей у наукових фахових виданнях України, включених до міжнародних наукометричних баз даних, 2 статті в інших наукових виданнях, 2 патенти України на корисну модель та 22 тези наукових доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів експериментальних досліджень, їх аналізу та узагальнення, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних літературних джерел та додатків. Роботу викладено на 379 сторінках, ілюстровано 12 таблицями та 104 рисунками. Список використаних джерел нараховує 536 найменувань, з яких 452 латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ВИКОНАННЯ РОБОТИ

Дисертацію виконано впродовж 2003–2020 рр. на кафедрі терапії і клінічної діагностики Національного університету біоресурсів і природокористування України (м. Київ), кафедрі фізіології та біохімії сільськогосподарських тварин і в Науково-дослідному центрі біобезпеки та екологічного контролю ресурсів агропромислового комплексу Дніпровського державного аграрно-економічного університету (м. Дніпро).

Експериментальну частину роботи проведено на базі м'ясопереробного підприємства «Ювілейний» Дніпропетровської області. Всього в дослідженнях використано 80 плодів великої рогатої худоби (голштинської породи) віком від 2 до 9 місяців масою тіла 0,6–39 кг. Плоди отримували від тільних корів, які надходили на м'ясопереробний комбінат у зв'язку з вибракуванням через травматизм, несумісний з подальшим їх перебуванням у структурі продуктивного стада. Вік плодів встановлювали за масою та довжиною тіла, а також за ступенем розвитку похідних шкіри (Студенцов А. П., 2000).

Лабораторні дослідження проводилися у проблемній науково-дослідній лабораторії фізіології та функціональної морфології продуктивних тварин Дніпровського державного аграрно-економічного університету та проблемній науковій лабораторії внутрішніх хвороб тварин Національного університету біоресурсів і природокористування України. Загальну схему досліджень наведено на рис. 1.

Після етаназії плодів великої рогатої худоби розтинали черевну порожнину, виділяли порожню кишку. Відділяли брижу і визначали довжину та середину порожньої кишки, видаляли вміст, після чого відбирали частину (30 % від загальної довжини з середньої ділянки органу), яку використовували для одержання ізольованих ентероцитів. У досліджах використовували ділянку порожньої кишки раннього плодового періоду (плоди великої рогатої худоби 2–4-місячного віку) середньою довжиною 0,8 м; у пізній плодовий період (5–9-місячного віку) довжиною 1,7 м. Кишку вивертали слизовою оболонкою назовні або розрізали уздовж та ділили на невеликі сегменти по 7–10 см і ретельно промивали (4–5 разів) холодним (4–6 °С) середовищем такого складу: 120 мМ NaCl та 1 мМ HEPES за допомогою сухого трису доводили рН середовища до 7,4 одиниць.

У якості прототипу виділення кишкових клітин використовували хімічний (цитрат/ЕДТА) метод (Томчук В. А. і співавтори, 1994), на основі якого розроблялася авторська модифікація методу (патент на корисну модель «Спосіб одержання ізольованих ентероцитів плодів великої рогатої худоби») отримання ізольованих ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби. Процес виділення ізольованих ентероцитів включав наступні етапи:

1. Промиту та вивернуту ділянку кишки поміщали в підготовлене середовище «А» (мМ: 96 NaCl; 27 натрію цитрату; 5,6 KH_2PO_4 ; 1,5 KCl) за температури 37 °С, рН середовища 7,3 одиниць (співвідношення середовища до кишечника відповідно 2 мл – 1 см) на 10 хв.

2. Середовище, разом із вмістом кишки, слизом та зруйнованими клітинами, зливали, а кишку поміщали в розчин «Б» (мМ: 140 NaCl; 16 Na₂HPO₄*12 H₂O; 1,5 ЕДТА; 0,5 дітіотрейтолу) на 15 хв за постійного струшування на водяній бані за температури 37 °С, рН середовища 7,0 одиниць.

3. Після завершення інкубації клітини осаджували методом центрифугування впродовж 3 хв за 500 g (2500–3000 об./хв) із дворазовим промиванням ізотонічним розчином натрію хлориду. Кінцевий осад розбавляли середовищем «Б».

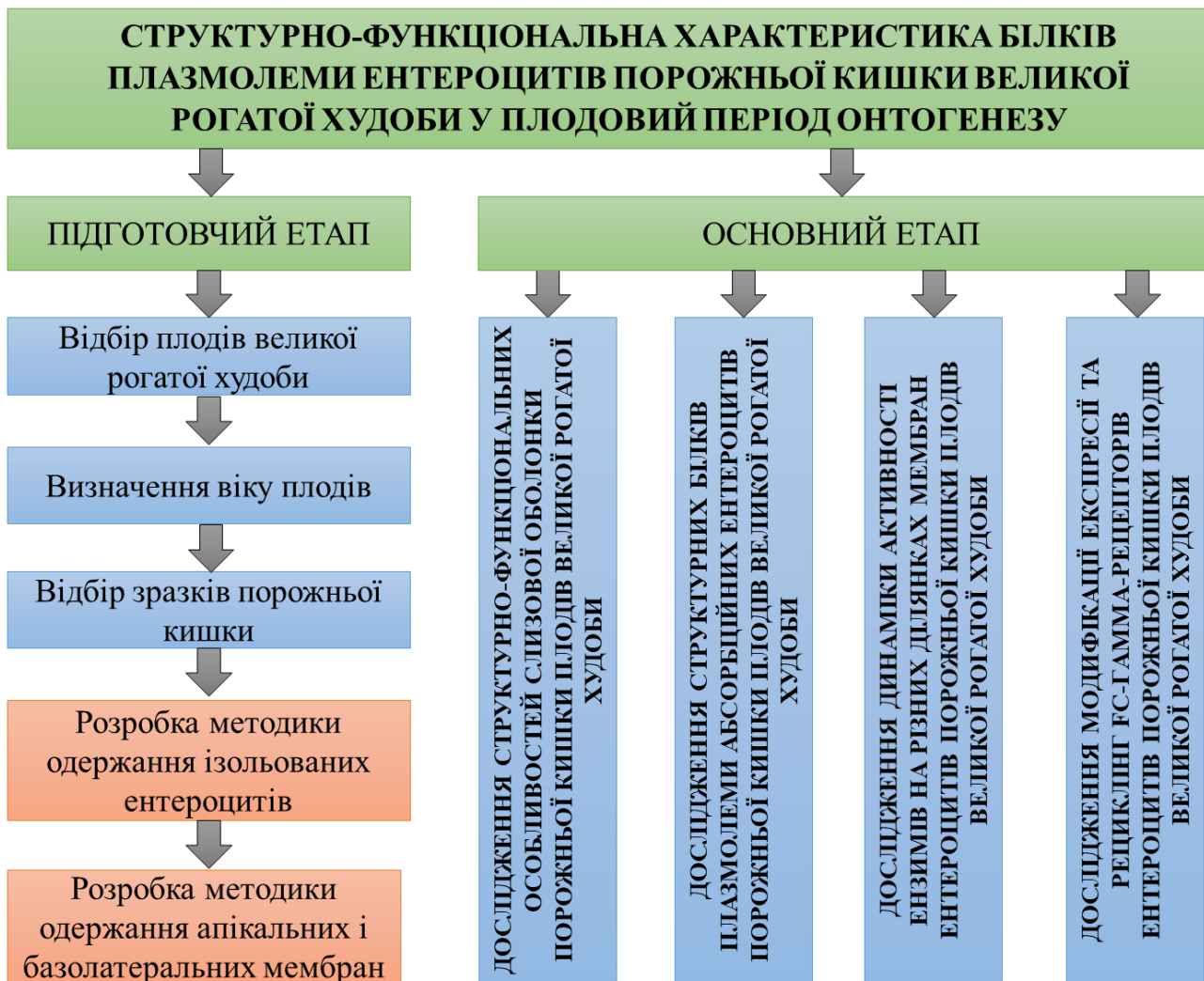


Рис. 1. Загальна схема досліджень

Якість отриманих епітеліальних клітин оцінювали за морфологічними і функціональними показниками. Для цього застосовували такі методи: гістологічні (заливання в парафін, фарбування гематоксиліном і еозином) для контролювання процесів виділення клітин із слизової оболонки тонкого кишечника, виявлення наявності агрегатів ентероцитів, характеристики їх структури (рис. 2), фарбування 0,1 % розчином трипанового синього для визначення за допомогою світлової мікроскопії життєздатності ентероцитів (барвник проникав виключно в клітини, що загинули); визначення активності цитозольного ензиму лактатдегідрогенази (ЕС 1.1.1.27) в інкубаційному

середовищі, як критерію цілісності плазматичної мембрани отриманих ізольованих ентероцитів тонкого кишечника; вимірювання концентрації загального білка, за методом Мюллера (Miller G., 1959), на одиницю маси нативного кишечника для характеристики повноти виділення ентероцитів. Виділені клітини розфасовували в поліпропіленові флакони, позначали і зберігали в рідкому азоті за температури 196 °С упродовж 2–6 місяців для подальшого використання.

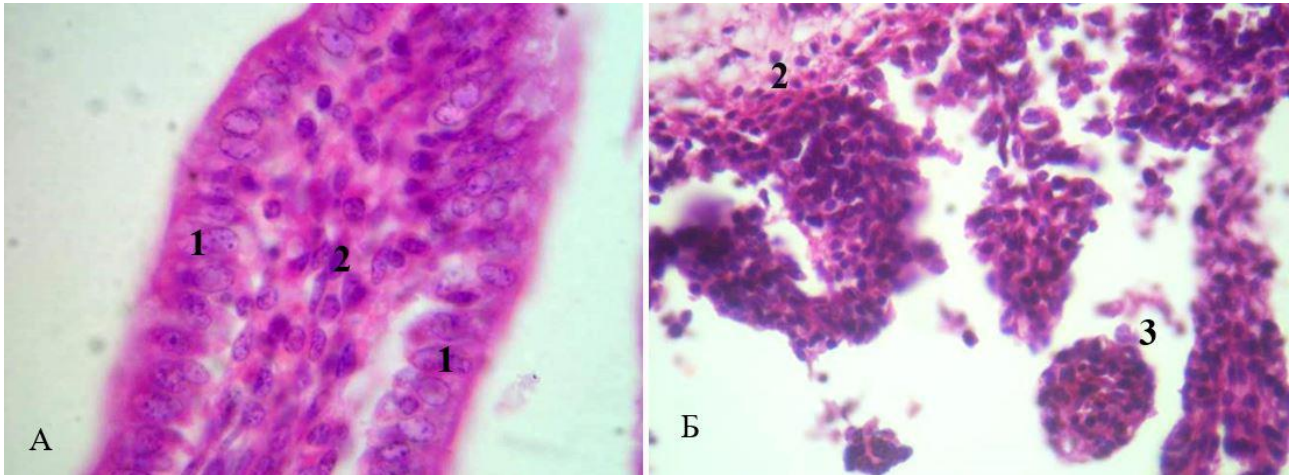


Рис. 2. Гістологічний препарат до (А) та після (Б) виділення клітин із слизової оболонки тонкого кишечника плодів великої рогатої худоби. Гематоксилін-еозин, $\times 400$: 1 – ентероцити; 2 – строма ворсинки; 3 – залишки епітеліальних клітин

Для отримання апікальних і базолатеральних мембран із суспензії ізольованих ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби використовували базову методику диференціального центрифугування (Цвіліховський М. І. і співавтори, 1988) у власній модифікації (патент на корисну модель «Спосіб фракціонування плазматичних мембран ізольованих ентероцитів»). Схема отримання мембранних фракцій включала наступні етапи:

1. Гомогенізація суспензії клітин у ножовому гомогенізаторі MPW-302 за швидкості обертання ножа 9,5 тис. об./хв упродовж 90 с у середовищі такого вмісту (мМ): 250 сахарози, 5 ЕДТА, 5 трис-НСІ буфер при температурі 4–6 °С, рН середовища 7,4 одиниць. Вимірювали концентрацію білка ентероцитів у середовищі гомогенізації.

2. Диференційне центрифугування за допомогою рефрижераторної ультрацентрифуги MSE High Speed 25 (Велика Британія). З метою очищення гомогенату від супутніх частин клітини та її органел (ядер, мітохондрій) і грубих мембранних фракцій його центрифугували за 10000 g упродовж 15 хв; далі проводили центрифугування супернатанту для виділення апікальної мембрани за 24000 g, а для базолатеральної – за 84000 g упродовж 60 хв кожну. Оцінку якості центрифугування проводили за активністю маркерних ензимів плазматичної мембрани ентероцитів та ступенем очистки мембранних фракцій відносно гомогенату.

3. Осади очищених фракцій апікальних і базолатеральних мембран ресуспендували у ізотонічному розчині натрію хлориду (за температури 4–6 °С, рН середовища 7,4 одиниць), які відразу використовували для дослідження поліпептидного складу або поміщали в поліпропіленові флакони і зберігали в рідкому азоті. Ступінь гомогенізації контролювали за допомогою мікроскопа Olimpus CH-20 у мазках, забарвлених за Романовським-Гімза, за збільшення в 1000 разів. Критерієм якості гомогенізації були наявність незруйнованих клітин (недостатня гомогенізація) чи відсутність вираженого осаду після центрифугування (10000 g) гомогенату (надмірна гомогенізація). Ефективність отримання мембранних фракцій плазмолеми ентероцитів здійснювали за вмістом у них білка. Оцінку ступеня очистки та забруднення мембранних препаратів здійснювали за активністю їх маркерних ензимів.

У апікальних і базолатеральних мембранах визначали активність лужної фосфатази (ЕС 3.13.1.) за методом Гарена-Левенталя (Garen A., Levinthal C., 1960), γ -глутамілтрансферази (ЕС 2.3.2.2.) за методом Церіотті (Ceriotti G., 1972), лактази (ЕС 3.2.1.23.) за методом Тсубої і співавторів (Tsuboi K. et al., 1979), Na^+ , K^+ -АТФази (ЕС 3.6.3.9), Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази (ЕС 3.6.1.3) та Mg^{2+} -АТФази (ЕС 3.6.3.2), згідно рекомендацій Болдирєва (Болдырев А. П., 1977). Гідроліз аденозинтрифосфату препаратами мембран фіксували у незабуференому середовищі рН-метрично. Інкубаційне середовище для дослідження АТФаз мало такий вміст, мМ: 100 NaCl, 250 сахарози, 5 MgCl, 2,5 АТР, 0,5 CaCl, 40 (для апікальної мембрани) та 20 (для базолатеральної мембрани) теофіліну; вміст мембран – 50 мкг білка на 1 мл (рН середовища 7,40±0,05, 370С), об'єм 2 мл. Для визначення активності Na^+ , K^+ -АТФази в середовище додатково вносили 20 мМ KCl, а вміст NaCl підвищували до 120 мМ; до середовища так само додавали 1 мМ уабаїну. Для дослідження активності Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази до дослідної проби додатково додавали 0,5 мМ ЕГТА, за цих умов Ca^{2+} не вносили. Для визначення активності Mg^{2+} -АТФази у пробах додатково були наявні 0,5 мМ ЕГТА та 1 мМ уабаїну, Ca^{2+} не доповнювали; у дослідну пробу не вносили MgCl_2 . Кожну експериментальну криву калібрували наприкінці досліду неорганічним фосфатом (KH_2PO_4). Відносну активність розраховували за різницею активності контрольної та дослідної проб.

Дослідження вмісту і складу структурних білків плазмолеми ентероцитів проводили за допомогою методу електрофорезу у градієнтному поліакрил-амідному гелі 7–18 % за Laemmli з модифікаціями (Laemmli, 1970). Уміст концентруючого гелю: T=7–18 % і C=0,8–2,5 %; 0,375 М трис-НСІ буфер (рН середовища 8,8 одиниць); 0,1 % ДСН; 0,025 % тетраетилендіаміну (ТЕМЕД); 0,025 % амонію персульфату (ПСА). У 18 % гель додавали гліцерин до кінцевої концентрації 5 % для запобігання нерівномірного набрякання гелю під час фарбування і знебарвлення та надання йому еластичності. Склад концентруючого гелю: T=4,5 %, C=6 %; 125 мМ трис-НСІ буфер (рН середовища 6,8 одиниць); 0,1 % ДСН; 0,025 % ТЕМЕД; 0,025 % ПСА.

Білкові проби вносили у буфері (рН 6,8 одиниць), що мав такий уміст: 1 М трис-НСІ, 5 % ДСН; 2 % дитіотриітолу; 1 % 2-меркаптоетанолу; 30 %

гліцерину; 0,001 % бромфенолового синього. Загальна концентрація білка не перевищувала 100 мкг на один зразок. У якості електродного буферу використовували розчин, який містив 25 мМ трис-НСІ (рН середовища 8,3 одиниць); 0,192 М гліцину; 0,1 % ДСН. Розділення проводили за фіксованого струму і часу. Для фарбування поліпептидних зон гель фіксували упродовж 12–16 год за кімнатної температури в розчині 12,5 % трихлороцтової кислоти. Електрофореграми фарбували 0,1 % розчином кумасі G-250, розчиненого у 50 % розчині етанолу та 15 % розчині оцтової кислоти протягом 12–16 год. Знебарвлення проводили у тому ж розчині, який не містив барвника. Гелі, які застосовували для імунохімічного виявлення Fc- γ -рецепторів після закінчення електрофорезу промивали у електродному буфері для вилучення надлишку ДСН.

Імуноспецифічне виявлення комплексів IgG – Fc- γ -рецептор проводили за допомогою методу імуноблотинга (Towbin H., 1988). Після блокування нітроцелюлозні мембрани інкубували упродовж 12–16 год за температури 4 °С з первинними специфічними до FcR антитілами Anti-Fc γ RII-Cd32b, ABCAM (ab 131051), Anti-Fc γ RI-Cd16 (ab 203883), Anti-Fc γ RIII-Cd32a (Sigma-Aldrich, MABF842), Anti-Fc γ Rf-Cd64 (ab 203349), розведеними 1:2000. Після інкубації промивали ЗФР із 0,05 % Tween-80 та інкубували 60 хв за температур 37 °С з розведеними 1:2500 вторинними антитілами проти γ -ланцюгів бика, позначеними пероксидазою хрому. Для візуалізації поліпептидних зон нітроцелюлозну мембрану обробляли упродовж 10–15 хв за кімнатної температури у 50 мМ трис-НСІ буфері (рН середовища 7,4 одиниць), який містив хромоген-діамінобензидин (0,01 %) і пероксид гідроген (0,02 %).

Відносний уміст Fc γ R виявляли через відносну густину і площу поліпептидних зон після проведення імуноблотингу. Скановані результати обробляли за допомогою програми «TotalLab TL120» (США). Розподіл Fc γ R на кишкових клітинах визначали імуногістохімічним методом (Gentilini, 1975). Фіксовані зрізи тонкої кишки інкубували з первинними антитілами проти FcRf, розведеними 1:100 упродовж 12 год за температури 4 °С. Після промивання зрізи інкубували з вторинними антитілами проти IgG, позначеними флуорофором флуоресцеїн ізотіоціонат FITC (Sigma Aldrich, США), розведеними 1:500 упродовж 60 хв за температури 37 °С. Зрізи промивали ЗФР та інкубували з флуоресцентним барвником Hoechst-33342 (Sigma Aldrich, США) для забарвлення ядер. Зображення результатів імуногістохімії візуалізували з використанням конфокального мікроскопу LSM 510 (Zeiss, Німеччина). Лазер із довжиною хвилі збудження 488 та 405 нм використовували для FITC та Hoechst відповідно. Довжина хвилі випромінювання була 505 нм для FITC і 420–480 нм для Hoechst. Усі зрізи було аналізовано у випадкових ділянках мінімум трьох зрізів для кожної групи. Зображення було оброблено та проаналізовано з використанням програмного забезпечення Zeiss ZEN 2009 Light Edition.

Для отримання оглядових препаратів фрагменти тонкої кишки фіксували, зневоднювали спиртами та заводили у парафін. Попередньо сегменти кишки промивали під проточною водою упродовж 6–12 год, зневоднення проводили

в етиловому спирті зростаючої концентрації. Для підвищення стійкості блоків під час заливання органів у парафін, використовували розчини хлороформу. Із парафінових блоків на санному та ротаційному мікротомах готували тотальні гістологічні зрізи для оглядових препаратів товщиною 7–10 мкм. Парафінові гістологічні зрізи фарбували гематоксиліном Ерліха та еозином за загально визнаною методикою. Кількісний (морфометричний) аналіз тканинних компонентів проводили за методикою «крапкового підрахунку» з використанням окулярних тестових систем (вставок) із 256 рівновіддаленими крапками за Автанділовим (Автанділов Г. Г., 1973).

Експериментальні дослідження проведено із дотриманням вимог Закону України № 3447-IV від 21.02.06 р. «Про захист тварин від жорстокого поводження» та узгоджуються з основними принципами «Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та наукових цілей» (Страсбург, 1986), декларації «Про гуманне ставлення до тварин» (Гельсінкі, 2000) і Національного конгресу з біоетики «Загальні етичні принципи експериментів на тваринах» (Київ, 2001).

Одержані цифрові дані опрацьовували статистично: визначали середньо-арифметичну величину (M) та її похибку (m). Імовірність різниць середніх значень встановлювали за критерієм Стюдента. Зміни показників вважали достовірними за $p \leq 0,05$ (в тому числі $p \leq 0,01$ і $p \leq 0,001$). Коефіцієнт кореляції (r) розраховували методом Пірсона за допомогою прикладного програмного комплексу «Microsoft Office Excel 2016».

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ АНАЛІЗ

Структурно-функціональні особливості слизової оболонки порожньої кишки плодів великої рогатої худоби. У ранньому плодовому періоді онтогенезу стінка порожньої кишки плодів великої рогатої худоби репрезентована трьома оболонками: слизовою, м'язовою та серозною. Товщина усієї кишкової стінки становила $331,7 \pm 6,88$ мкм (рис. 3).

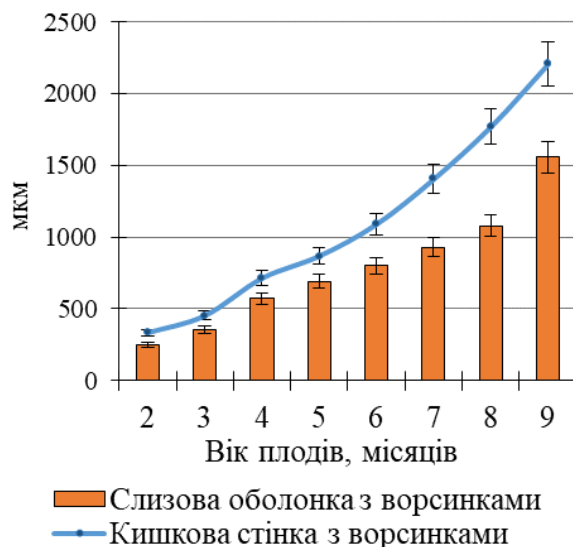


Рис. 3. Динаміка товщини слизової оболонки та стінки порожньої кишки плодів великої рогатої худоби, $M \pm m$, $n=6$; мкм

За цих умов, товщина слизової оболонки з епітеліальним шаром становить $247,4 \pm 6,03$ мкм. Водночас, період морфогенезу слизової оболонки пов'язаний із диференціюванням ентодермальної та мезенхімальної закладок. У 2-місячних плодів генез слизової оболонки відбувається неодноразово, супроводжується змінами її рельєфу та розмірів ворсинок. Кишкові ворсинки, як за висотою, так і за шириною, майже однакові (рис. 4), на їх верхівці епітелій однорядний призматичний, а в ділянці основи та бокової поверхні – багаторядний (рис. 5). У плодів 3-місячного віку невеликі епітеліально-сполучнотканинні вирости повністю трансформуються в істинні ворсинки (першої генерації). Це позначається збільшенням діаметра порожньої кишки, що відбувається за рахунок розправлення слизової оболонки та зникнення тимчасових ворсинок. У основи ворсинок формуються вистелені епітелієм поглиблення, які вдаються у підлягаючу мезенхіму і, таким чином, утворюють тяжі. Надалі, з розвитком, в 4-місячних плодів, формується власна пластинка слизової оболонки, висота ворсинок стає більшою в 1,71 раза, а ширина залишається майже незмінною.

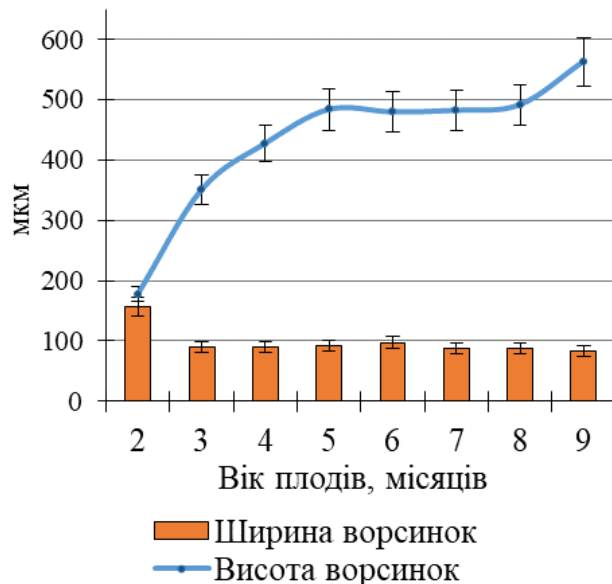


Рис. 4. Динаміка розвитку виростів слизової оболонки порожньої кишки плодів великої рогатої худоби, $M \pm m$, $n=6$; мкм

У пізній плодовий період процеси зростання і розвитку стінки порожньої кишки та її слизової оболонки у великої рогатої худоби характеризуються поступовим помірним збільшенням її основних морфометричних показників. Зокрема, у 6- та 7-місячних плодів великої рогатої худоби слизова оболонка і кишкова стінка поступово стають товщими, в основному за рахунок розвитку власної пластинки, тоді як висота та ширина ворсинок слизової оболонки порожньої кишки у цей же період фактично не змінюються. До останнього місяця утробного розвитку ширина кишкової стінки продовжує достовірно збільшуватися, а ворсинки подовжуються (рис. 6). Встановлено лінійну залежність збільшення товщини кишкової стінки, її слизової оболонки та власної пластинки слизової у пізньому плодовому періоді.

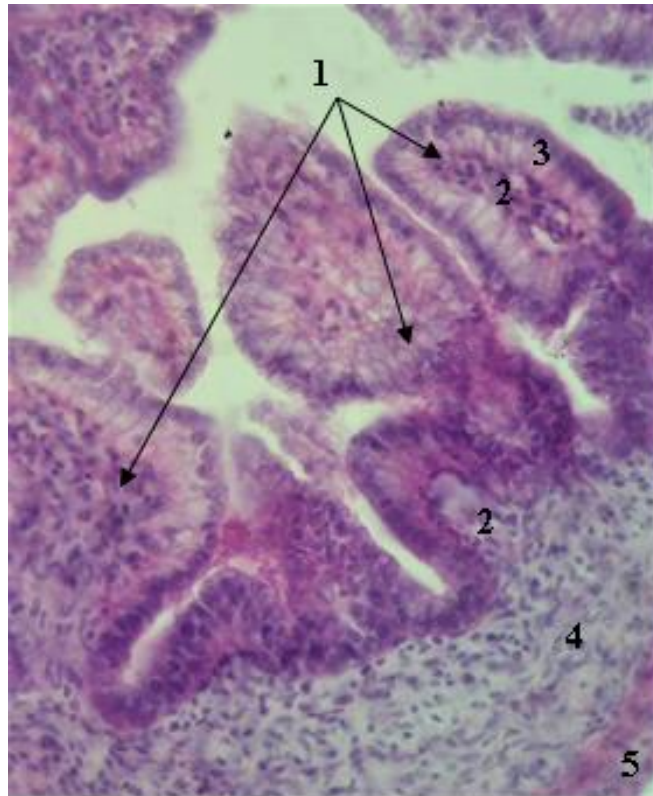


Рис. 5. Гістологічний препарат порожньої кишки 2-місячного плода великої рогатої худоби. Гематоксилін-еозин, $\times 400$: 1 – первинні ворсинки; 2 – строма ворсинки; 3 – епітелій ворсинки; 4 – сполучна тканина; 5 – м'язова оболонка

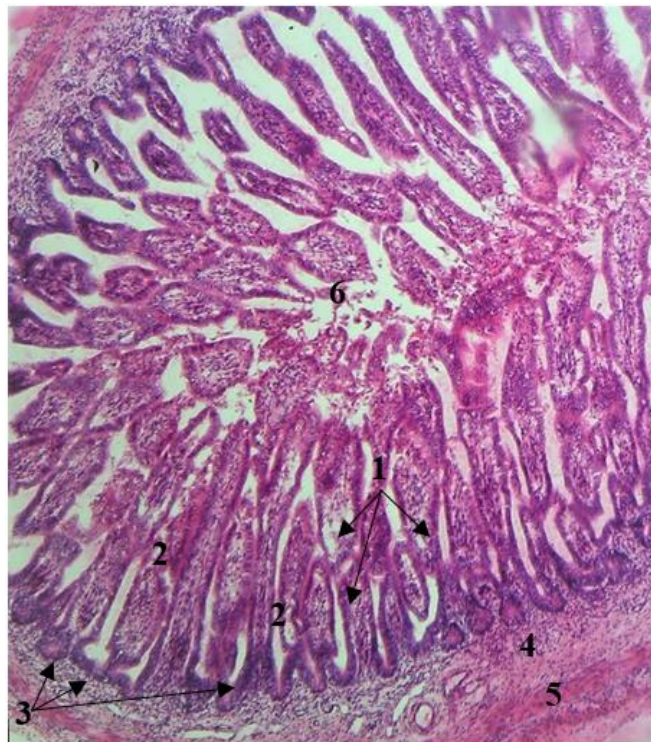


Рис. 6. Гістологічний препарат порожньої кишки 5-місячного плода великої рогатої худоби. Гематоксилін-еозин, $\times 100$: 1 – ворсинки; 2 – строма ворсинки; 3 – крипти; 4 – сполучна тканина; 5 – м'язова оболонка; 6 – просвіт кишки

У плодів 2-місячного віку відбувається формування епітеліально-сполучно-тканинних виростів (рис. 7), а у 3-місячних плодів – істинних кишкових ворсинок. Зрілого рівня істинні кишкові ворсинки досягають у 4–5-місячних плодів, що проявляється їх змінами як за висотою (підвищенням у середньому в 2,5 раза), так і за шириною (зменшенням у 1,7 раза). Такі зміни у конфігурації ворсинок характеризуються збільшенням коефіцієнта елонгації ворсинок. Первинні крипти формуються у плодів 3–4-місячного віку, вторинні – у плодів 5–7-місячного віку.

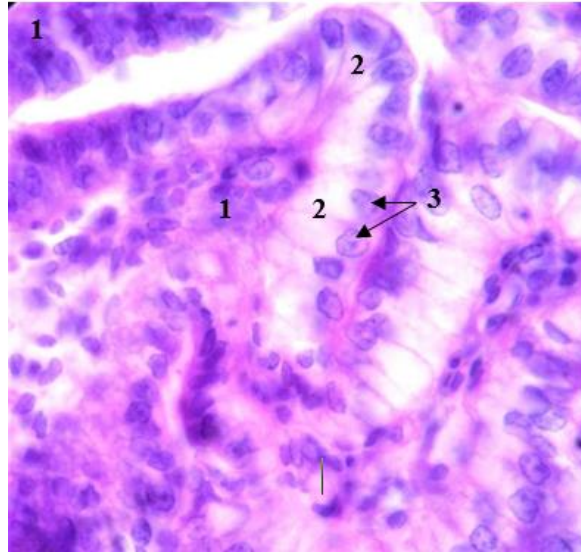


Рис. 7. Гістологічний препарат порожньої кишки 2-місячного плода великої рогатої худоби. Гематоксилін-еозин, $\times 400$: 1 – первинна ворсинка; 2 – ентероцити; 3 – ядра ентероцитів

Об'єм клітин кишкових ентероцитів наприкінці плодового періоду зменшується майже в усіх зонах (у 1,3–1,9 раза; $p \leq 0,001$) за виключенням зони крипт, де цей показник залишався на рівні попереднього значення (рис. 8).

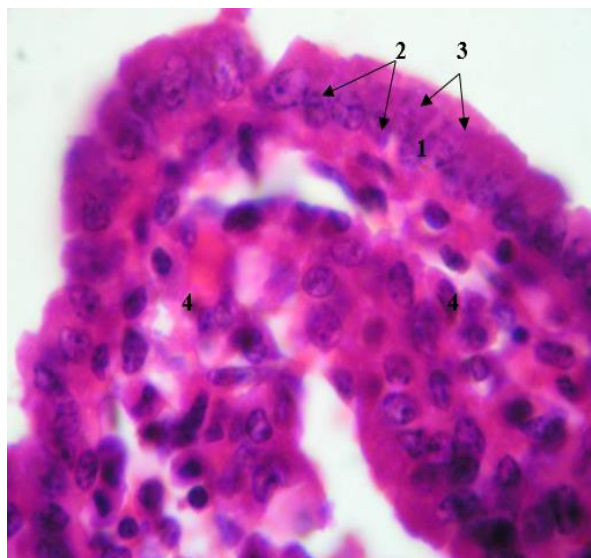


Рис. 8. Гістологічний препарат порожньої кишки 9-місячного плода великої рогатої худоби. Гематоксилін-еозин, $\times 400$: 1 – ентероцити; 2 – ядра ентероцитів; 3 – апікальні полюси ентероцитів; 4 – строма ворсинки

Об'єм ядер цих клітин мав уповільнену тенденцію до зниження у зоні вершини в 1,2 раза ($p \leq 0,01$) та в зоні бокової поверхні у 1,15 раза ($p \leq 0,05$); у зоні основи цей показник не змінювався, а в зоні крипт, навпаки, підвищувався (в 1,4 раза; $p \leq 0,001$). Такі зміни об'єму клітини та ядер позначилися на ядерно-цитоплазматичному відношенні, яке значно підвищувалося у всіх без винятку зонах ($p \leq 0,001$).

Цитометричні дослідження епітеліоцитів порожньої кишки вказують про щільний морфо-функціональний зв'язок між розмірами клітин, їх ядер та специфічною функцією, яку вони виконують на окремих ділянках ворсинок і крипт. Упродовж плодового періоду в зоні основи ворсин та крипт об'єм ядер збільшується відповідно в 1,21 та 1,42 раза, водночас, у зоні вершини та бокової поверхні ворсинок, навпаки, зменшувався відповідно в 1,46 та 1,22 раза. Отже, вікова структурна диференціація слизової оболонки порожньої кишки великої рогатої худоби в плодовому періоді онтогенезу визначається інтенсивним морфо-функціональним перетворенням компонентів, що забезпечують становлення постнатального травлення і колострального імунітету. З урахуванням наведеного вище, можна припустити існування механізмів, що забезпечують послідовний прогрес міжклітинних взаємовідношень наприкінці плодового періоду онтогенезу в ході диференціації органів травлення.

Структурні білки плазмолемі абсорбційних ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби. У апікальних ділянках мембран ентероцитів порожньої кишки 2-місячних плодів великої рогатої худоби було виявлено 25 білкових фракцій, більшість із яких мають низьку та середню молекулярну масу. Зокрема, білків з молекулярною масою 9,6–14,2 кДа було $9,06 \pm 0,08$ %; 15,5 кДа – $5,91 \pm 0,05$; 17 кДа – $2,47 \pm 0,03$; 21 кДа – $5,81 \pm 0,04$; 22,5 кДа – $6,10 \pm 0,05$; 26 кДа – $5,15 \pm 0,02$; 29 кДа – $2,78 \pm 0,03$; 31 кДа – $3,28 \pm 0,02$; 33 кДа – $4,15 \pm 0,02$; 35 кДа – $6,02 \pm 0,02$; 37 кДа – $3,33 \pm 0,01$; 39 кДа – $6,04 \pm 0,02$; 43 кДа – $3,33 \pm 0,02$; 46 кДа – $3,99 \pm 0,02$; 52 кДа – $6,16 \pm 0,03$; 57 кДа – $4,23 \pm 0,02$; 63 кДа – $4,19 \pm 0,02$; 72 кДа – $3,02 \pm 0,01$; 75 кДа – $2,77 \pm 0,01$; 87 кДа – $3,32 \pm 0,02$ %. Білкових фракцій з молекулярною масою 100 кДа і більше загалом виявлено лише $8,89 \pm 0,06$ % (рис. 9). У базолатеральних мембранах ентероцитів порожньої кишки 2-місячних плодів великої рогатої худоби виявлено 23 білкові фракції з молекулярною масою від 9,6 до 120 кДа. Окремо потрібно відзначити відсутність поліпептидних фракцій з молекулярною масою 22,5 кДа, 37, 155 та 170–185 кДа, які наявні в апікальних мембранах цих ентероцитів. Натомість, у базолатеральній мембрані ентероцитів наявні білки з молекулярною масою 19 кДа, 24 та 66 кДа. Більшість з виявлених білкових фракцій були з низькою та середньою молекулярною масою (9,6–39 кДа – 60,12 %). Білків з молекулярною масою від 40 до 100 кДа виявлено лише 36,12 %, а білків з молекулярною масою 100 кДа і більше лише 3,76 %.

Динаміка відношень вмісту окремих білкових фракцій в апікальній та базолатеральній мембрані ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби протягом раннього плодового періоду істотно змінюється. Це вказує на інтенсивність механізму дозрівання та формування полярних клітин у відповідні стадії плодового періоду. В базолатеральній мембрані

ентероцитів, порівняно з апікальною, більший відносний вміст білків з молекулярною масою 29 кДа (в 1,36 раза; $p \leq 0,001$), 33 (в 1,13 раза; $p \leq 0,01$), 43 (в 1,47 раза; $p \leq 0,001$), 57 (в 1,35 раза; $p \leq 0,001$), 63 (в 1,43 раза; $p \leq 0,001$), 72 (в 1,10 раза; $p \leq 0,05$), 100 (в 1,87 раза; $p \leq 0,001$) та 120 кДа (в 1,82 раза; $p \leq 0,001$). Натомість, в апікальній мембрані ентероцитів порожньої кишки 2-місячних плодів великої рогатої худоби, більший вміст білків з молекулярною масою 35 кДа (в 1,69 раза; $p \leq 0,001$), 39 (в 1,49 раза; $p \leq 0,001$), 46 (в 1,31 раза; $p \leq 0,001$) та 52 кДа (в 5,13 раза; $p \leq 0,001$).

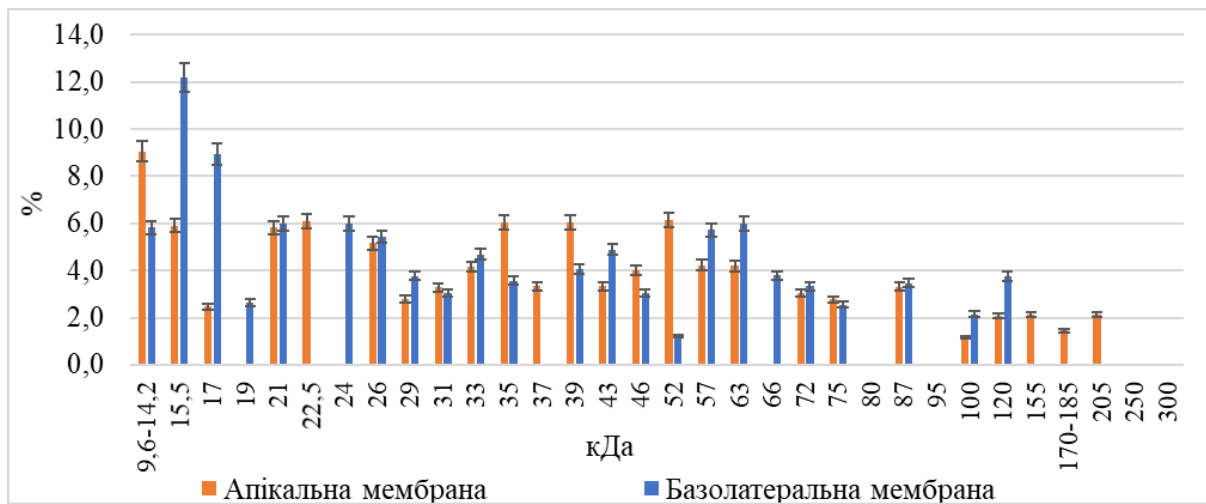


Рис. 9. Структурні білки плазмолем ентероцитів порожньої кишки 2-місячних плодів великої рогатої худоби, $M \pm m$, %; $n=6$

Вміст низькомолекулярних поліпептидів апікальної мембрани ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби з 2- до 3-місячного віку істотно не змінюється. Надалі, з 3- до 4-місячного віку плодів корів, відносний вміст низькомолекулярних поліпептидів з молекулярною масою 9,6–14,2 кДа в апікальній мембрані ентероцитів порожньої кишки істотно зменшується (в 1,34 раза; $p \leq 0,001$), тоді як вміст білків з молекулярною масою 17 кДа збільшується в 1,62 раза ($p \leq 0,001$). Виділяємо також достовірне зменшення відсотку білків з молекулярною масою 22,5 кДа (у 1,09 раза; $p \leq 0,05$), 75 (у 1,18 раза; $p \leq 0,01$), 120 (у 1,14 раза; $p \leq 0,01$) та 300 кДа (у 1,16 раза; $p \leq 0,01$).

За даними електрофорезу в апікальних мембранах ентероцитів порожньої кишки 5-місячних плодів великої рогатої худоби виявлено 29 білкових фракцій (рис. 10). Білкових фракцій з молекулярною масою до 24 кДа було лише 19,7 %, від 24 до 100 кДа – 69,2 %, а білкових фракцій з молекулярною масою 100 кДа і більше – лише 11,1 %. В базолатеральних мембранах ентероцитів 5-місячних плодів великої рогатої худоби виявлено 25 білкових фракції з молекулярною масою від 9,6 до 155 кДа. Велика частка з виявлених білкових фракцій належить поліпептидам з низькою молекулярною масою (9,6–24 кДа – 40,3 %). Білків із молекулярною масою 24–95 кДа значна більшість – 55,2 %, а з молекулярною масою 100 кДа і більше виявлено в сумі лише 4,5 %. Високомолекулярних білків з молекулярною масою більше за 155 кДа, на відміну від апікальної мембрани, не виявлено.

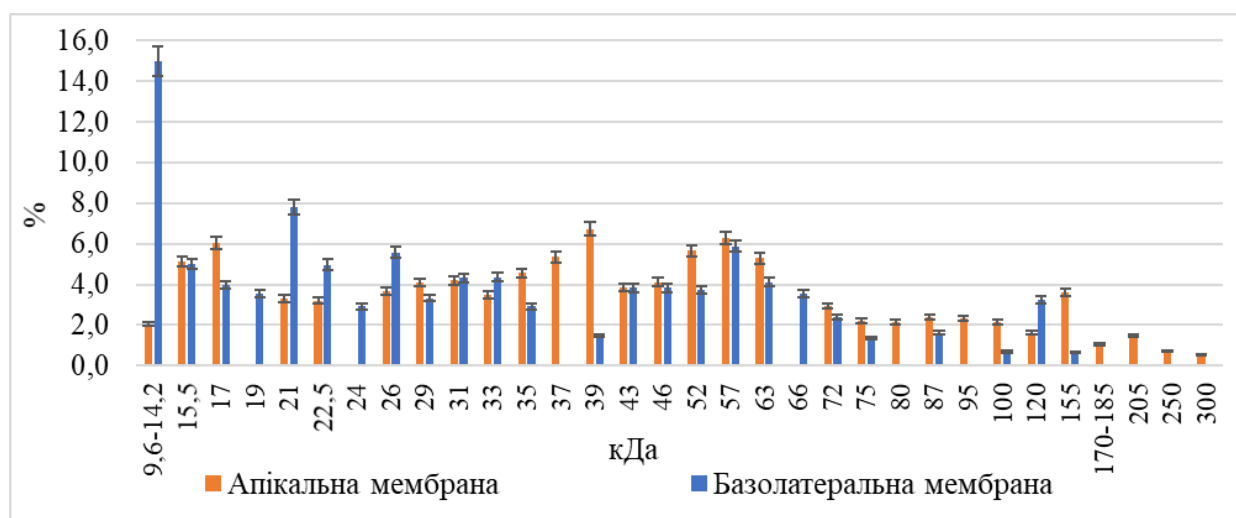


Рис. 10. Структурні білки плазмолемі ентероцитів порожньої кишки 5-місячних плодів великої рогатої худоби, $M \pm m$, %; $n=6$

З 5- до 6-місячного віку відбувається збільшення загальної кількості низькомолекулярних поліпептидних фракцій апікальної мембрани ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби до 20,8 %. Білкових фракцій з молекулярною масою більше 100 кДа в апікальних мембранах ентероцитів 6-місячних плодів – 12,8 % від загальної кількості поліпептидів, що більше на 1,7 % від цього показника у 5-місячному віці плодів. Також встановлено збільшення відсотку білків з молекулярною масою 120 кДа (у 1,17 раза; $p \leq 0,01$) та 300 кДа (у 4,88 раза; $p \leq 0,001$) за одночасного зменшення відсотку білків з молекулярною масою 100 та 205 кДа відповідно в 1,13 ($p \leq 0,01$) та 1,32 раза ($p \leq 0,001$). На відміну від цього, в базолатеральних мембранах ентероцитів плодів з 5- до 6-місячного віку частка білків з молекулярною масою 9,6–14,2 кДа зменшується в 1,60 раза ($p \leq 0,001$), 17 кДа – у 1,30 раза ($p \leq 0,001$) та 21 кДа – у 2,06 раза ($p \leq 0,001$) порівняно з цими показниками 5-місячних плодів великої рогатої худоби. Водночас, відбувається збільшення вмісту білків з молекулярною масою 15,5 кДа у 1,36 раза ($p \leq 0,001$). Крім цього, в базолатеральних мембранах ентероцитів 6-місячних плодів великої рогатої худоби не виявлено білкову фракцію з молекулярною масою 75 кДа. Поліпептидів з молекулярною масою 24–95 кДа у базолатеральній мембрані ентероцитів порожньої кишки 6-місячних плодів великої рогатої худоби є переважна більшість – 62,46 %, що на 10,9 % ($p \leq 0,001$) більше, ніж у плодів 5-місячного віку, а фракцій з молекулярною масою більше 100 кДа виявлено в сумі лише 7,33 %, що в 1,61 раза ($p \leq 0,001$) більше від попереднього значення.

З 6- до 7-місячного віку плодів великої рогатої худоби частка низькомолекулярних поліпептидних фракцій апікальної мембрани ентероцитів порожньої кишки зменшується до 16,3 %, або на 4,42 %, відповідно до їх вмісту в 6-місячних плодів. Білкових фракцій із молекулярною масою від 24 до 100 кДа – 69,4 %, що більше на 3,9 % від цих показників у 6-місячних плодів. У базолатеральній мембрані ентероцитів, водночас, встановлено зменшення частки поліпептидів з низькою молекулярною масою майже в 2,6 раза ($p \leq 0,001$). Відповідно до цього, відбувається збільшення частки поліпептидів

із молекулярною масою 24–95 кДа до 73,5 %, що на 11,1 % ($p \leq 0,001$) більше, ніж у 6-місячному віці плодів. Білкових фракцій із молекулярною масою більш ніж 100 кДа – 14,8 %, що в два рази ($p \leq 0,001$) більше від показників плодів у 6-місячному віці. З 7- до 8-місячного віку плодів великої рогатої худоби частка низькомолекулярних білків у апікальній мембрані ентероцитів порожньої кишки становить 14,7 %, від 24 до 100 кДа – 70,1 %, а більше 100 кДа – 14,6 %. У базолатеральній мембрані ентероцитів за цей період досліджень зменшується частка поліпептидів із молекулярною масою 24–95 кДа до 69,7 % та збільшується частка білкових фракцій із молекулярною масою 100 кДа і більше до 18,3 %, що на 3,5 % ($p \leq 0,05$) більше за показники у плодів 7-місячного віку.

У апікальних мембранах ентероцитів порожньої кишки 9-місячних плодів фракцій поліпептидів з молекулярною масою від 24 до 100 кДа майже 70 %, з молекулярною масою більше 100 кДа – 18,4 %, що достовірно більше від усіх отриманих попередніх значень (рис. 11). Крім того, у апікальній мембрані ентероцитів плодів 9-місячного віку, порівняно з базолатеральною, переважає вміст білків з низькою молекулярною масою (від 21 до 33 кДа), тоді як у базолатеральній мембрані переважають значно важчі за молекулярною масою білки (від 35 до 300 кДа). Так, у апікальній мембрані встановлено більший вміст білків із молекулярною масою 17 кДа – у 8,48 рази ($p \leq 0,001$), 21 – у 1,23 рази ($p \leq 0,001$), 22,5 – у 6,39 рази ($p \leq 0,001$), 24 – у 1,29 рази ($p \leq 0,001$), 26 – у 1,56 рази ($p \leq 0,001$), 29 – у 1,27 рази ($p \leq 0,01$), 31 – у 1,54 рази ($p \leq 0,001$), 33 – у 1,61 рази ($p \leq 0,001$) та 46 кДа – у 1,56 рази ($p \leq 0,01$). На відміну від вищезазначеного, у базолатеральній мембрані ентероцитів більший вміст поліпептидних фракцій з молекулярною масою 15,5 кДа – у 3,64 рази ($p \leq 0,001$), 35 – у 1,63 рази ($p \leq 0,01$), 39 – у 1,88 рази ($p \leq 0,001$), 43 – у 1,87 рази ($p \leq 0,001$), 52 – у 1,26 рази ($p \leq 0,001$), 63 – у 1,11 рази ($p \leq 0,05$), 66 – у 1,29 рази ($p \leq 0,001$), 87 – у 3,16 рази ($p \leq 0,001$), 100 – у 3,03 рази ($p \leq 0,001$), 155 – у 1,15 рази ($p \leq 0,05$), 170–185 – у 1,50 рази ($p \leq 0,001$) та 300 кДа – у 1,59 рази ($p \leq 0,001$) порівняно з таким у апікальній мембрані.

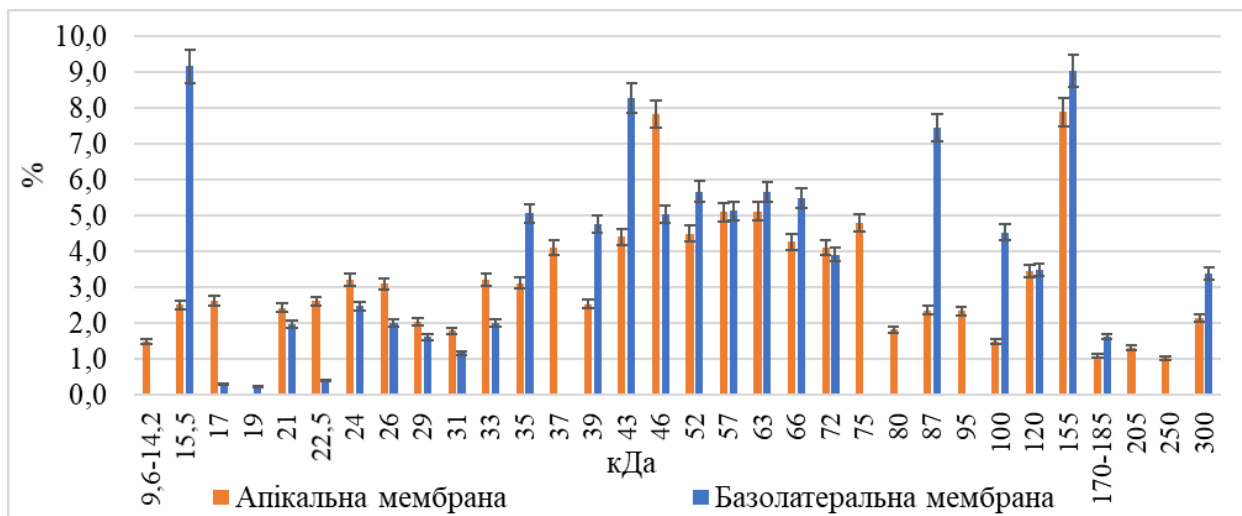


Рис. 11. Структурні білки плазмолемі ентероцитів порожньої кишки 9-місячних плодів великої рогатої худоби, $M \pm m$; %; $n=6$

Встановлено взаємозв'язки морфометричних змін основних структурних компонентів слизової оболонки порожньої кишки із вмістом структурних білків плазмолемі ентероцитів. Зокрема, доведено пряму залежність динаміки товщини усієї кишкової стінки порожньої кишки з вмістом високомолекулярних білків мембрани ентероцитів. Товщина кишкової стінки з ворсинками та слизової оболонки з ворсинками прямо пов'язана з вмістом на обох полюсах клітин білків з молекулярною масою 155 кДа ($r=0,89-0,99$; $p\leq 0,01-0,001$) та на апікальному домені ентероцитів білків з молекулярною масою 250 кДа ($r=0,94-0,95$; $p\leq 0,001$).

Отже, результати досліджень вказують на динамічні зміни поліпептидних складників апікальних та базолатеральних мембран ентероцитів плодів великої рогатої худоби протягом плідного періоду, що характеризуються як зміною їх співвідношення, так і перерозподілом між полюсами цих клітин.

Динаміка активності ензимів та йон-транспортних систем на різних ділянках мембран ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби. Результатами досліджень є те, що активність гідролітичних ензимів плазмолемі ентероцитів порожньої кишки великої рогатої худоби у плодовому періоді онтогенезу характеризується суттєвими змінами динаміки кожного з ензимів на різних полюсах клітин (рис. 12). Упродовж усього досліджуваного періоду відбувається поступове зниження активності лужної фосфатази, зокрема, до 3- та 4-місячного віку плодів на апікальній та базолатеральній мембрані на 9,9–20,2 % ($p\leq 0,05-0,001$). Порівняльний аналіз активності лужної фосфатази між окремими ділянками плазмолемі ентероцитів плодів показав значно вищу її активність у базолатеральній мембрані, порівняно з апікальною, протягом усього раннього плодового періоду великої рогатої худоби в 1,27–1,41 раза ($p\leq 0,001$). З 5- до 7-місячного віку активність ензиму в апікальній мембрані зменшується на 19,5 % ($p\leq 0,01$), з 7- до 8-місячного віку – на 26,5 % ($p\leq 0,001$), а з 8- до 9-місячного віку плода – на 32,0 % ($p\leq 0,001$). Після порівняння активність лужної фосфатази між окремими ділянками плазмолемі встановлено вищу її активність у базолатеральній мембрані з 5- до 8-місячного віку плодів у 1,63–1,89 раза ($p\leq 0,001$), порівняно з апікальною мембраною, із піком в 9-місячному віці плода – у 2,31 раза ($p\leq 0,001$).

Найвищу активність γ -глутамілтрансфери на пізньому етапі розвитку плодів великої рогатої худоби відзначено у 5-місячному віці, після чого до 9-місячного віку вона в апікальній мембрані поступово знижується (на 21,6 %; $p\leq 0,001$). Активність γ -глутамілтрансфери в базолатеральній мембрані ентероцитів у пізньому плодовому періоді змінюється значно активніше, ніж в апікальній мембрані. Зокрема, якщо з 5- до 6-місячного віку плода активність ензиму знижується у межах тенденції (на 5,3 %), то з 7- до 8-місячного віку – зменшується на 52,4 % ($p\leq 0,001$), а з 8- до 9-місячного віку – ще на 39,1 % ($p\leq 0,001$). З 5- до 8-місячного віку плода великої рогатої худоби активність γ -глутамілтрансфери на базолатеральній мембрані ентероцитів більша в 1,51–1,60 раза ($p\leq 0,001$), ніж на апікальній мембрані. З 8- до 9-місячного віку плода активність цього ензиму в апікальній мембрані ентероцитів стає в 1,27 раза ($p\leq 0,001$) більша, ніж у базолатеральній мембрані.

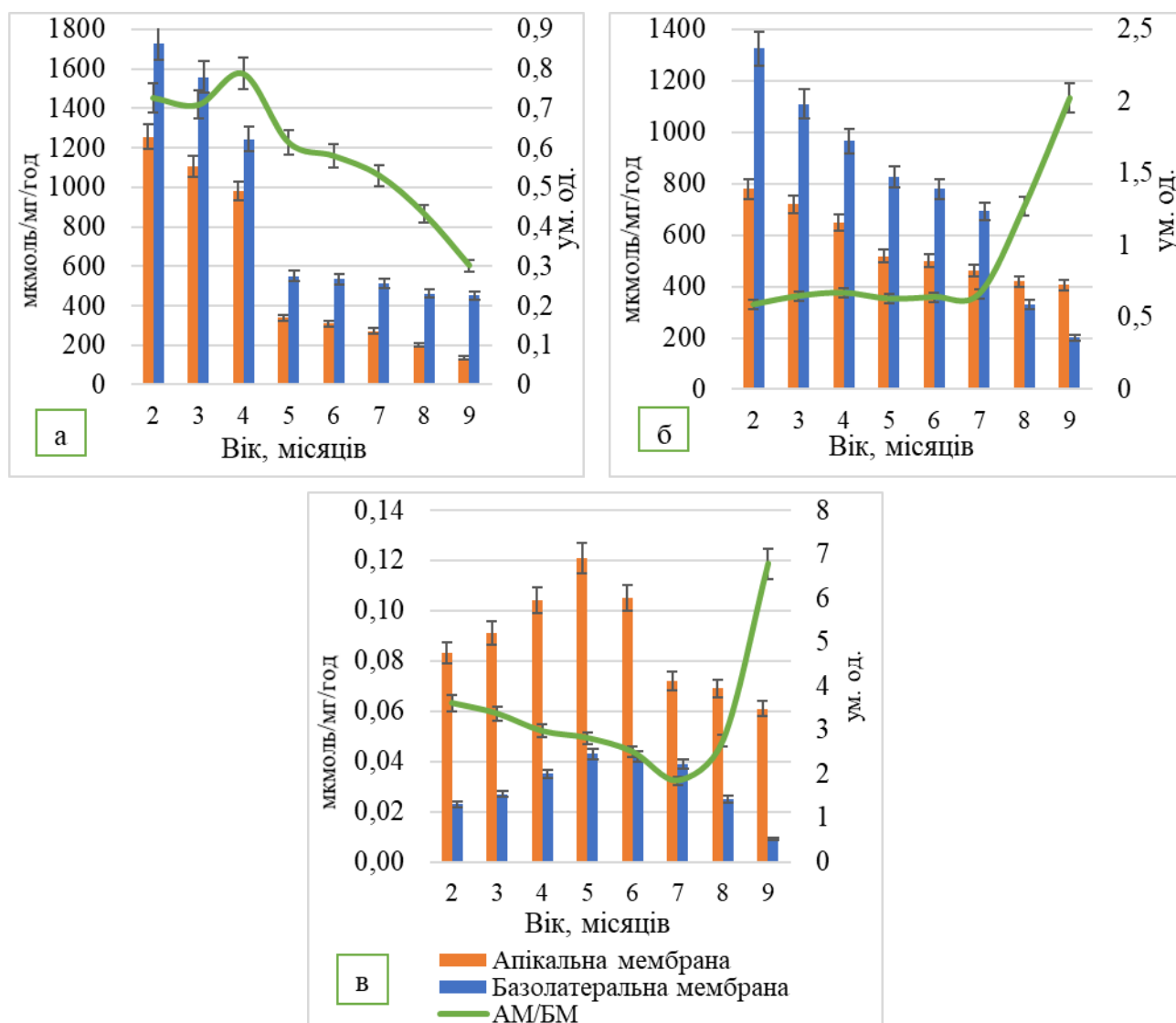


Рис. 12. Динаміка активності лужної фосфатази (а), γ-глутамілтрансферази (б) та лактази (в) в плазмолемі ентероцитів плодів великої рогатої худоби, мкмоль/мг/год; n=5

Примітка. Активність ензимів за основною віссю, апікальна мембрана/базолатеральна мембрана (АМ/БМ) – за додатковою

Активність лактази протягом раннього плодового періоду онтогенезу великої рогатої худоби поступово збільшується на обох макродоменах плазматичної мембрани ентероцитів у 1,3–1,5 раза ($p \leq 0,001$). В апікальній мембрані активність лактази збільшуються з 2- до 3-місячного віку плодів на 9,6 % ($p \leq 0,05$) і, надалі, до 4-місячного віку, ще на 14,3 % ($p \leq 0,01$). Після порівняння активності лактази між окремими макродоменами плазмолемі встановлено, що її активність значно нижча в базолатеральній мембрані, порівняно з апікальною мембраною протягом усього дослідного періоду.

Найбільша активність лактази на пізньому етапі розвитку плода виявлена у плодів 5-місячного віку, після чого до 9-місячного віку, вона, залежно від полюса клітини, зменшується в 1,5–1,8 раза ($p \leq 0,001$).

Активність лактази в апікальній мембрані ентероцитів у пізньому плодовому періоді великої рогатої худоби з 5- до 6-місячного віку знижується

на 13,2 % ($p \leq 0,05$) і далі до 7-місячного віку – ще на 31,3 % ($p \leq 0,001$). Водночас, активність лактази на базолатеральній мембрані ентероцитів з 7- до 8-місячного віку та з 8- до 9-місячного віку плодів зменшується відповідно на 35,9 ($p \leq 0,001$) та 64,0 % ($p \leq 0,001$).

Активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази в плазмолемі ентероцитів плодів упродовж дослідного періоду є аналогічною динаміці Na^{+} , K^{+} -АТФази і вона є високою у 2-місячних плодів (рис. 13).

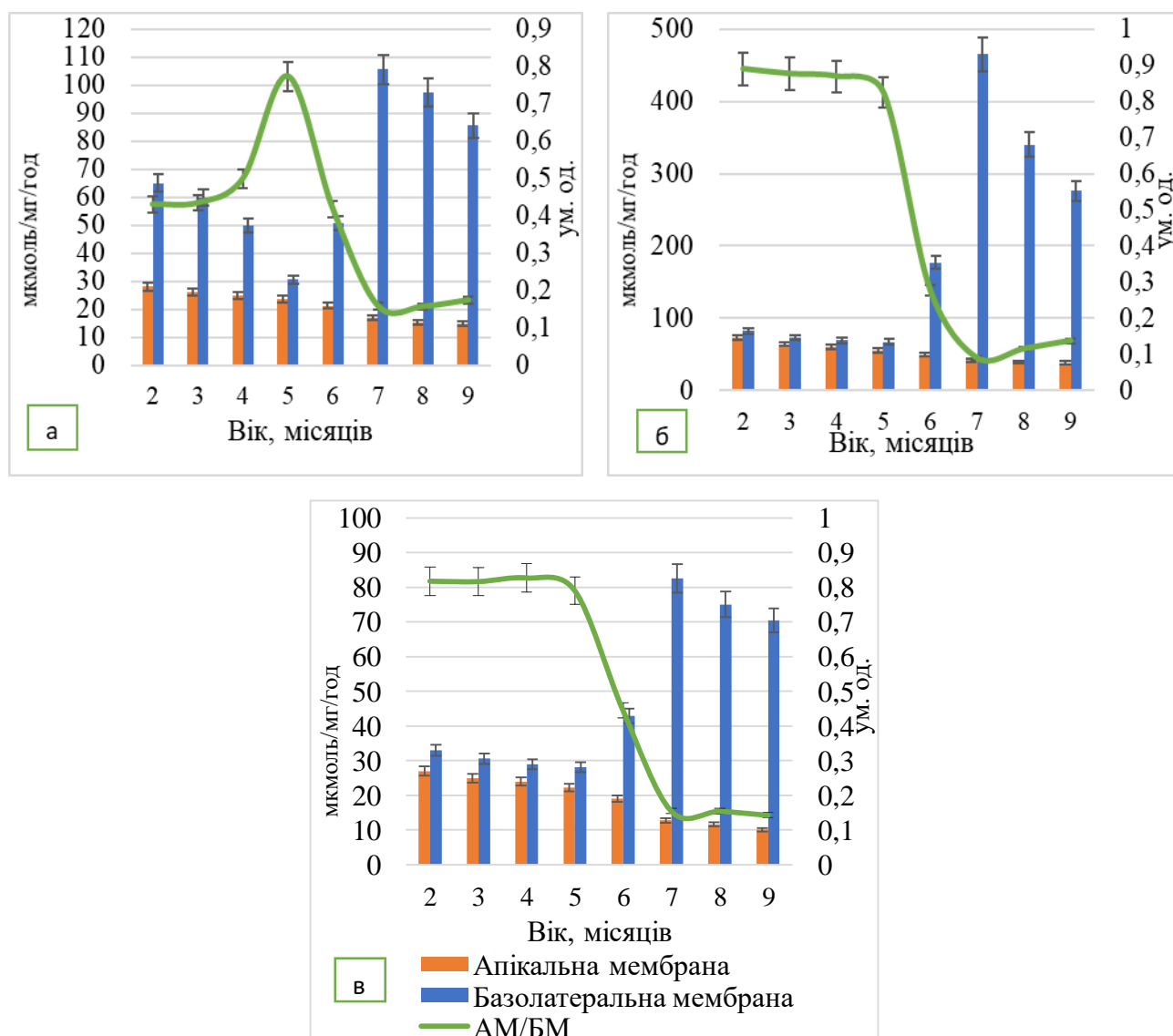


Рис. 13. Динаміка активності Ca^{2+} , Mg^{2+} - (а), Na^{+} , K^{+} - (б), та Mg^{2+} -АТФази (в) у плазмолемі ентероцитів плодів великої рогатої худоби, мкмоль/мг/год; $n=5$

Примітка. Активність ензимів за основною віссю, апікальна мембрана/базолатеральна мембрана (АМ/БМ) – за додатковою

У подальшому, на апікальній мембрані ентероцитів, активність даного ензиму знижується до 3-місячного віку плода на 7,1 % ($p \leq 0,001$). На базолатеральній мембрані ентероцитів активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази ензиму з 5- до 6-місячного віку та з 6- до 7-місячного віку плода підвищується відповідно у 6,66 ($p \leq 0,001$) та 10,8 рази ($p \leq 0,001$). Надалі, з 7- до 9-місячного

віку активність ензиму на апікальній мембрані знижується ще на 18,9 % ($p \leq 0,001$). Активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази на апікальній мембрані ентероцитів плодів великої рогатої худоби поступово, з 5- до 7-місячного віку, знижується ($p \leq 0,001$). Активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази є більш високою на базолатеральній мембрані, порівняно з апікальною мембраною, протягом усього плодового періоду. Так, у 5-місячному віці плода ця різниця перевищувала 1,29 раза ($p \leq 0,01$), 6-місячному – 2,4 раза ($p \leq 0,001$), 7-місячному – 6,3 раза ($p \leq 0,001$), 8-місячному – 6,4 раза ($p \leq 0,001$), 9-місячному – 4,7 раза ($p \leq 0,001$).

Найвищі показники активності Na^+ , K^+ -АТФази на обох полюсах плазмолемі ентероцитів відзначено у 2-місячних плодів. У подальшому, активність цього ензиму поступово знижується як на апікальній, так і на базальній мембрані. Так, активність Na^+ , K^+ -АТФази в апікальній і базальній мембранах ентероцитів 3-місячних плодів є меншою відповідно на 12,3 ($p \leq 0,001$) та 11,0 % ($p \leq 0,001$), за таку в плодів 2-місячного віку. Надалі, до 4-місячного віку плода, активність ензиму знижується ще на 6,3 та 5,5 % ($p \leq 0,05$) у апікальній і базальній мембрані, відповідно. Протягом усього плодового періоду активність Na^+ , K^+ -АТФази у базолатеральній мембрані ентероцитів вища, ніж в апікальній. Переважання локалізації активності Na^+ , K^+ -АТФази на базолатеральній поверхні є достатньо типовою для всіх видів епітеліальних клітин з полярними ділянками плазматичної мембрани. У останню третину плодового періоду активність Na^+ , K^+ -АТФази на апікальному домені знижується майже в 1,5 раза ($p \leq 0,001$), що, ймовірно, обумовлено змінами характеру мікрооточення епітеліальних клітин кишечника. Так, відносна активність даного ензиму суттєво підвищується до 7-місячного віку (з 5- до 6-місячного віку в 2,63 раза ($p \leq 0,001$) та з 6- до 7-місячного віку плода ще в 1,64 раза ($p \leq 0,001$)). У подальшому, в останні місяці плодового періоду, відбувається зниження активності Na^+ , K^+ -АТФази. Зокрема, з 7- до 8-місячного віку плода на 27,0 % ($p \leq 0,001$), і з 8- до 9-місячного віку плода ще на 18,6 % ($p \leq 0,01$).

Наявність активності Mg^{2+} -АТФази переважає на базолатеральній мембрані ентероцитів упродовж усього плодового періоду порівняно з апікальною мембраною. Активність Mg^{2+} -АТФази у 2-місячних плодів поступово знижується до 4-місячного віку, як на апікальній, так і на базолатеральній мембрані, на 11,1–12,1 % ($p \leq 0,001$). Рівень активності Mg^{2+} -АТФази на початку плодового періоду, ймовірно, відповідає його ролі у підтриманні структури плазматичної мембрани та форми клітин, що, напевно, взаємопов'язано з функціональною спеціалізацією мембран у цей же період онтогенезу. На апікальній мембрані відзначається стрімке зниження активності даної АТФази до 7-місячного віку плода (в 1,74 раза; $p \leq 0,001$), з подальшим менш інтенсивним зменшенням активності цього ензиму до 9-місячного віку плода в 1,27 раза ($p \leq 0,05$). На базолатеральній мембрані ентероцитів відзначається значне підвищення активності ензиму, починаючи з 6-місячного віку в 1,52 раза ($p \leq 0,001$), а з 6- до 7-місячного віку плодів – ще в 1,93 раза ($p \leq 0,001$). Однак, надалі, і до кінця плодового періоду, відзначено лише тенденцію до зменшення активності Mg^{2+} -АТФази у базолатеральній мембрані

ентероцитів плодів великої рогатої худоби. Максимальна наявність активності Mg^{2+} -АТФази на базолатеральній мембрані відзначена в ентероцитах 8- та 9-місячних плодів (у 6,45–6,47 разів ($p \leq 0,001$)) більша, ніж в апікальній мембрані).

Отже, динаміка активності гідролітичних і транспортних ензимів ентероцитів порожньої кишки з 2 до 9 місяця розвитку плода великої рогатої худоби є досить варіабельною та характеризується лінійністю і взаємозалежністю розвитку ензимних систем під час інтенсивних процесів проліферації епітеліоцитів.

Модифікація експресії та рециклінг $Fc\gamma R$ ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби. Результати імуноблотингу довели загальну збіжність складників $Fc\gamma R$, екстрагованих із апікального та базолатерального доменів ентероцитів упродовж усього плодового періоду великої рогатої худоби. Білки зв'язували IgG за умов інкубації нітроцелюлози. На вищенаведену мембрану переносилися екстраговані з мембран білкові фракції, що були розділені в поліакриламідному гелі (рис. 14). Антигени, що представляли мембранні поліпептидні фракції з молекулярною масою 120 кДа, 87, 72 і 43 кДа специфічно зв'язували IgG, оскільки розведення 1:1500 та наявність неіонного детергенту Triton X-100 попереджує неспецифічне зв'язування.

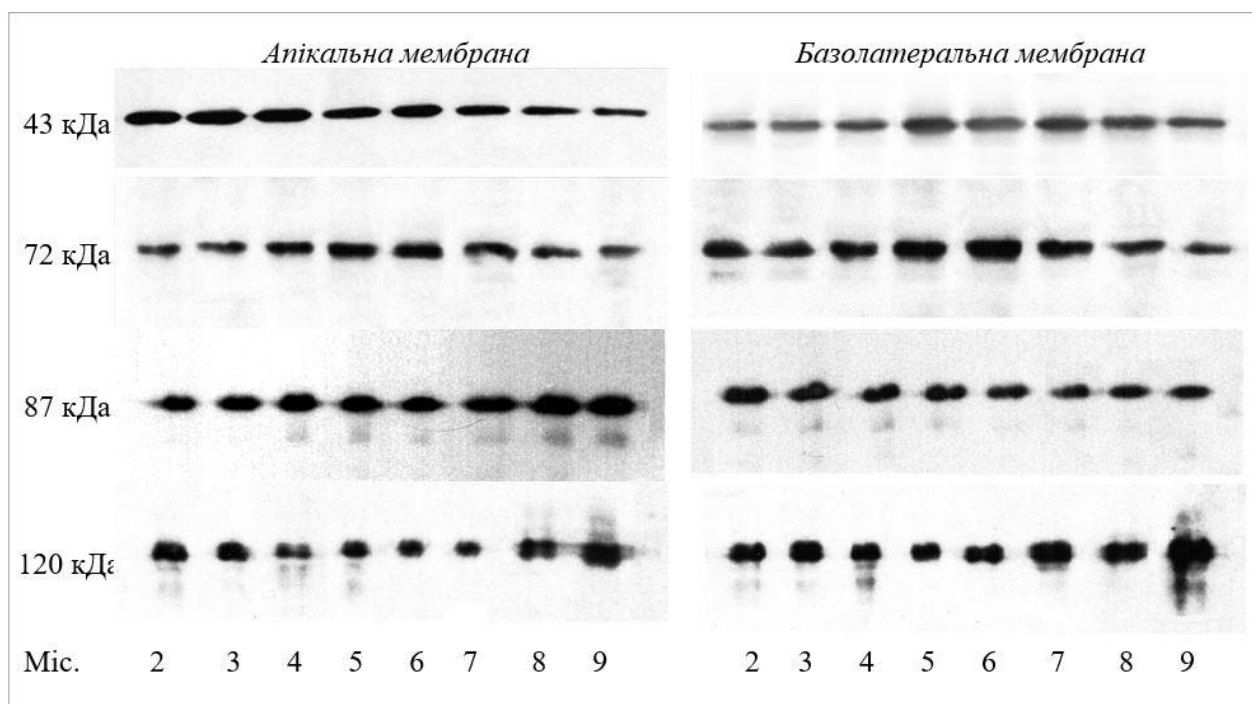


Рис. 14. Імуноблотинг $Fc\gamma R$ до IgG апікальних і базолатеральних мембран ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби

Відомо, що у ранній плодовий період онтогенезу відсутній безпосередній зв'язок кишкової трубки з навколишнім середовищем, що обумовлює відповідну специфіку фетального кровообігу та позначається гемотрофним типом живлення. Незважаючи на те, що антитіла не проникають крізь плаценту в корів, існують дані, які вказують на появу імунокомпетентних лімфоцитів

і синтез власних імуноглобулінів у плодів (Ємельяненко П. О., 1987). Це дозволяє припустити, що у ранній плодовий період великої рогатої худоби Fc γ RIII і Fc γ Rf базолатеральної мембрани беруть участь у зв'язуванні з різними підкласами фетальних IgG у базолатеральних ендосомах ентероцитів і за допомогою яких транспортують IgG на апікальну поверхню плазмолемі для участі в імунних механізмах захисту (рис. 15). Аналіз динаміки змін відносного вмісту Fc- γ -рецепторних білків на обох макродоменах плазмолемі ентероцитів довів, що на апікальній мембрані загальний вміст рецепторів до IgG достовірно підвищується у 5-місячних плодів у 1,3 раза, а в 7-місячних – у 2,2 раза, порівняно з 3-місячними плодами. У подальшому, в 9-місячних плодів, вміст рецепторів стрімко знижується майже в три рази ($p \leq 0,001$), порівняно з 7-місячними плодами і, фактично, дорівнює початковим даним плодів 3-місячного віку. На базолатеральній мембрані ентероцитів найвищий вміст Fc γ R виявляється у 5-місячних плодів і до 7- та 9-місячного віку поступово знижується в 1,7 та 2,8 раза ($p \leq 0,001$).

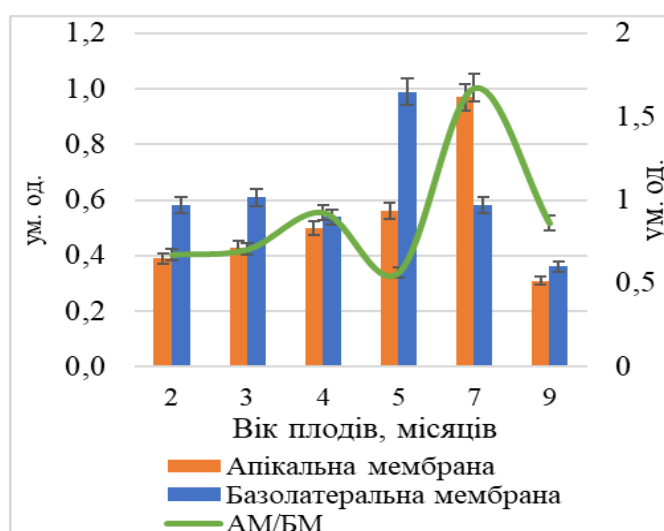


Рис. 15. Відносний вміст Fc γ R за IgG-імунозабарвленням апікальних мембран ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби, ум. од.; $M \pm m$, $n=6$

Принадно підкреслимо, що ймовірно, механізм постачання IgG з базолатерального боку, де рН середовища нейтральне або слаболужне (7,0–7,5 одиниць) відбувається рецепторно-незалежним способом за допомогою рідинно-фазового ендцитозу, після чого зв'язується з відповідним Fc γ R у кислій ендосомі. Порівнюючи вміст Fc γ R між різними полярними частинами плазмолемі ентероцитів, потрібно зазначити, що протягом усього плодового періоду їх вміст є більшим на базолатеральному домені (у 3-місячному віці плода на 42 %, у 5-місячному – на 77 %, у 9-місячному – на 16 %, за винятком плодів 7-місячного віку, де їх локалізація переважає на апікальній мембрані (на 67 %). Водночас, кількісний аналіз окремих поліпептидних зон дозволив виявити достовірне зростання вмісту Fc- γ -рецепторних білків із молекулярною масою 87 кДа, екстрагованих із апікальної мембрани ентероцитів з 3 по 7 місяці плодового періоду. На відміну від апікальної мембрани, у фракції білків

базолатеральної мембрани достовірних змін щодо вмісту рецепторного білка з цією молекулярною масою не виявлено.

Найбільший вміст Fc γ R із молекулярною масою 72 кДа виявлено у фракціях апікальної мембрани плодів 5–7-місячного віку. На відміну від апікальної мембрани, у базолатеральній мембрані максимальний вміст цього білка був більше у 3–5-місячних плодів. На особливу увагу заслуговує факт однаково спрямованого зниження вмісту Fc- γ -рецепторних білків із молекулярною масою 87 кДа, 72 і 43 кДа у плодів 9-місячного віку, як на апікальній, так і на базолатеральній мембранах ентероцитів. Виявлена динаміка змін вмісту окремих поліпептидних зон із молекулярною масою 120 кДа, 87, 72 і 43 кДа, в цілому, співпадала з динамікою для загального вмісту Fc- γ -рецепторних білків. Це може бути наслідком спорідненості генів, які кодують дані поліпептиди, а також визначатися загальними фізико-хімічними властивостями білків цього сімейства (рис. 16).

Отже, виявлена динаміка експресії та вміст Fc γ R на апікальній і базолатеральній мембранах ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби відображає процеси диференціації клітин у пізній плодовий період онтогенезу. Зміна вмісту Fc γ R на різних полюсах плазмолем ентероцитів плода відповідає певній стадії розвитку та вказує про пренатальне становлення механізмів імунологічної реактивності у ссавців даного виду.

Результати імуногістохімічних досліджень із використанням антитіл проти Fc γ R показали їх апікальну і базолатеральну локалізацію в ентероцитах. Водночас, Fc γ R виявлені в ділянках, що формують ендотеліально-кишковий бар'єр. До того ж, більш інтенсивний сигнал флуоресценції показаний в тканинах 9-місячних плодів у порівнянні з 4-місячними, що співпадає з результатами імуноблотингу (рис. 17). Наявність Fc γ R у апікальних і базолатеральних мембранах ентероцитів вказує про активний рециклінг цих рецепторів. Цілком можливо, що визначені зміни експресії Fc γ R на апікальних і базолатеральних мембранах ентероцитів тонкої кишки плодів великої рогатої худоби відображають певні стадії формування імунітету плода. Зростання вмісту Fc γ R на апікальній мембрані ентероцитів упродовж перших двох триместрів пренатального розвитку, з піком у плодів 7-місячного віку, ймовірно, пов'язане з наявністю специфічних індукторів у амніотичній рідині, яка безпосередньо контактує з апікальною ділянкою плазмолем ентероцитів. Загальний вміст Fc γ R є значно вищим на базолатеральній мембрані ентероцитів майже протягом усього плодового періоду, на відміну від апікального домену, з найвищою його експресією у 5-місячних плодів.

Отже, виявлені відмінності періодів, на які припадає максимальний вміст Fc γ R на полярних макродоменах плазмолем ентероцитів, відображають особливості функціонального навантаження і фізіологічні особливості пренатального розвитку функцій тонкої кишки. Зниження вмісту рецепторів, що було відзначено у фракціях апікальної і базолатеральної мембран ентероцитів на 9 місяці плодового періоду, можна пояснити тим, що в організмі плода в цей же період розвитку вже наявні власні імунокомпетентні лімфоцити, які здатні відповідати на антигенну стимуляцію синтезом специфічних антитіл.

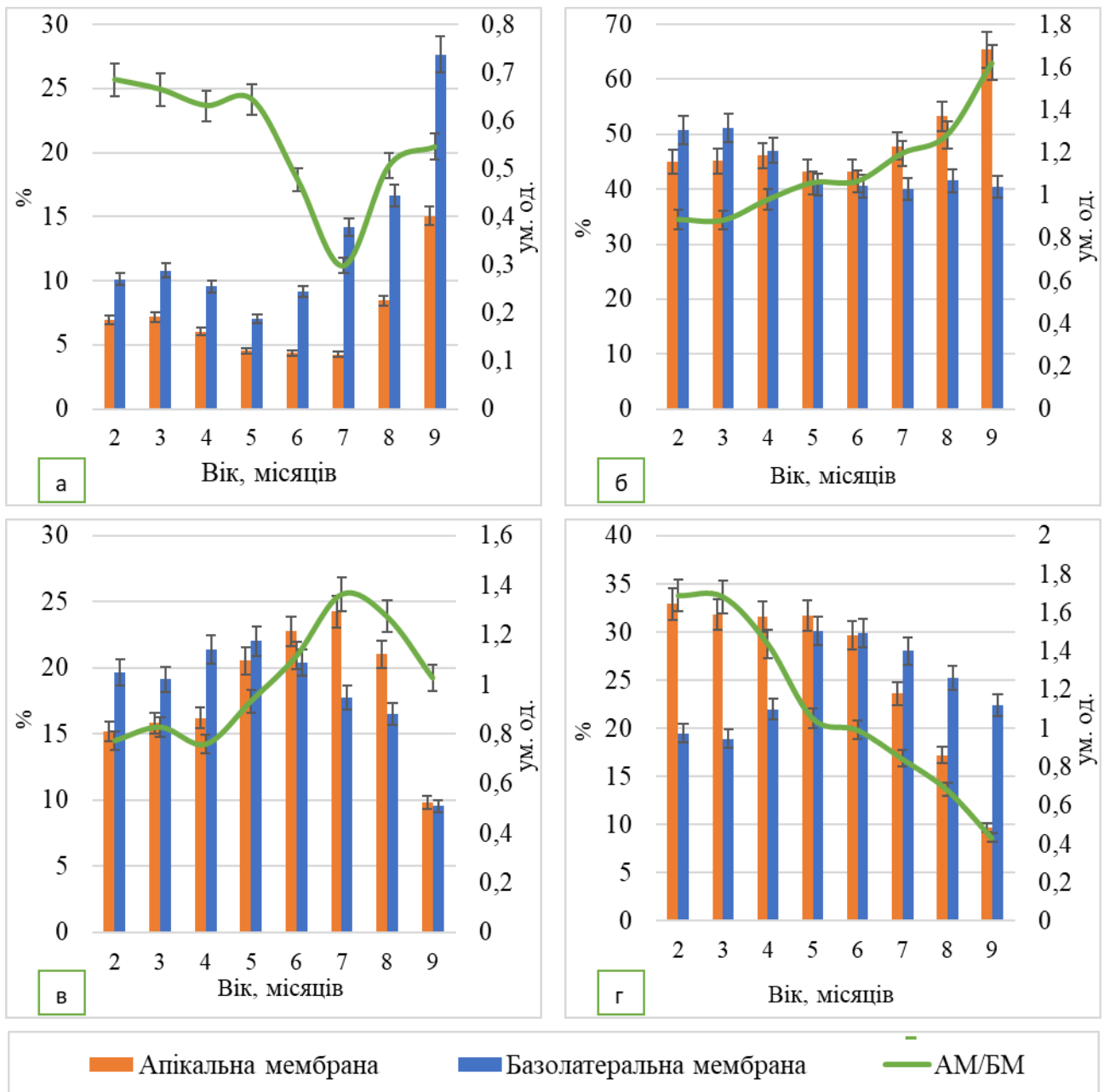


Рис. 16. Динаміка вмісту FcγR білків з молекулярною масою 120 кДа (а), 87 (б), 72 (в) та 43 кДа (г) на різних доменах плазмолемі ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби, ум. од.; $M \pm m$, $n=6$

Примітка. Відносний вміст білків – за основною віссю, апікальна мембрана/базолатеральна мембрана (АМ/БМ) – за додатковою

Враховуючи цей факт, а також те, що для епітеліальних і ендотеліальних клітин властивою є надзвичайно висока концентрація МНС-антигенів, можна припустити, що існує функціональний зв'язок FcγR із процесом презентації IgG-імуних комплексів з амніотичної рідини. Наявність FcγR на плазмолемі ентероцитів у плодовий період онтогенезу вказує, що на додаток до їх ефекторної функції вони забезпечують трансцитоз вільних IgG у комплексі з антигеном. Зворотній обмін (рециклінг) IgG за участю FcγR між тканиною плода та кишковою порожниною забезпечує захист і передродову імунізацію антигенами з амніотичної рідини. Цей транспорт може бути зв'язуючою

ланкою між уродженням і набутим імунітетом шляхом розпізнавання і презентації антигенів плодом, як Т-незалежних імунних комплексів.

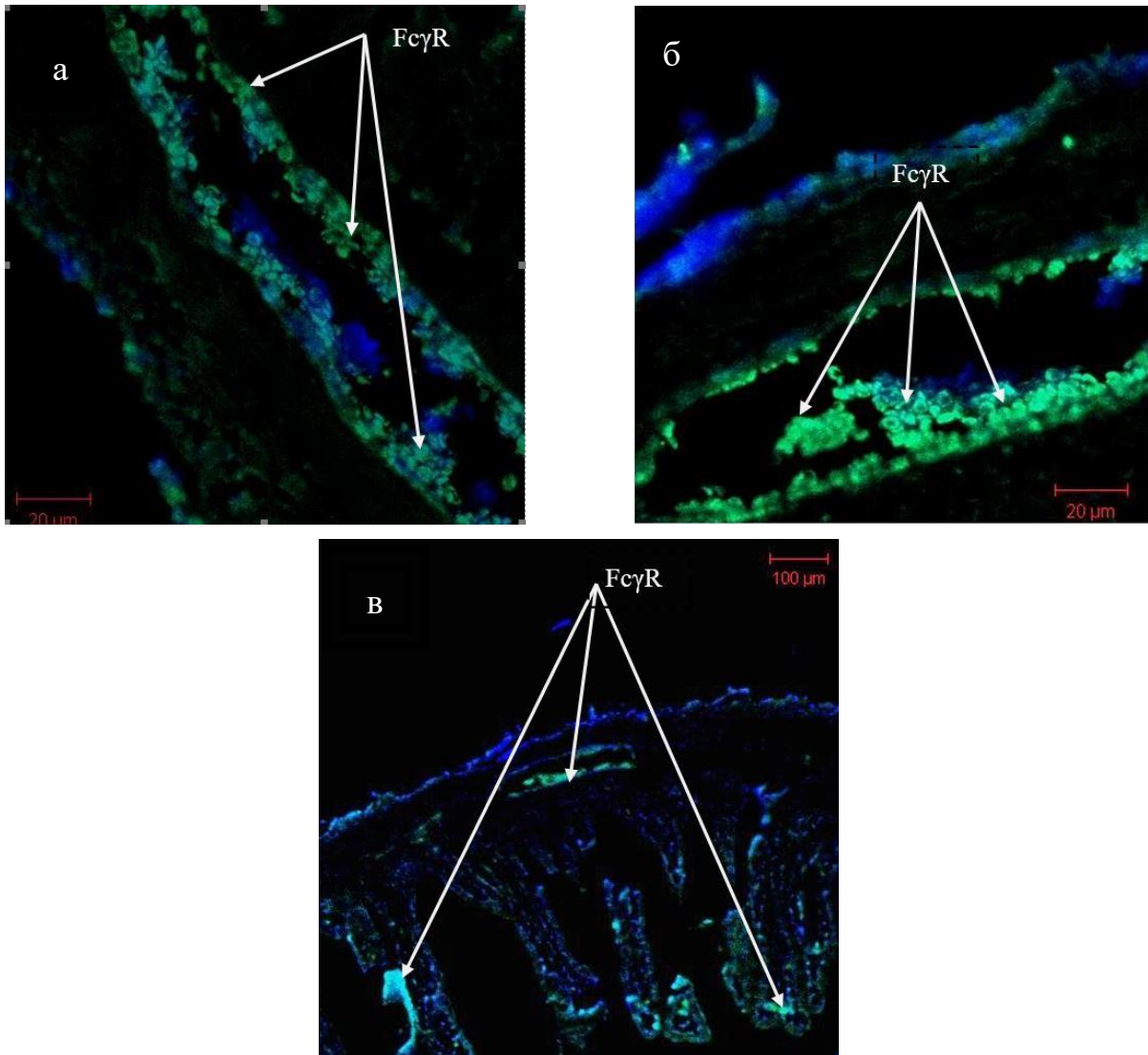


Рис. 17. Імуногістохімічний препарат порожньої кишки 4-місячного (а) та 9-місячного плода (б, в) великої рогатої худоби з візуалізацією FcγR. FITC/Ноеchst $\times 400$ (а, б) та $\times 200$ (в)

Визначені зміни експресії FcγR і їх гетерогенність в апікальних і базолатеральних макродоменах ентероцитів великої рогатої худоби у плодовий період вказують на певні особливості розвитку та формування імунних механізмів плода, починаючи з 3 місяця пренатального онтогенезу. Результати розрахунку вмісту окремих поліпептидів FcγR на протилежних ділянках плазмолемі ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби довели, що білки з молекулярною масою 120 кДа, 87 і 72 кДа переважають за вмістом на базолатеральній мембрані до середини фетального періоду (плоди 5-місячного віку). Така специфіка розподілення, можливо, відображає функціональну спеціалізацію плазмолемі ентероцитів внутрішньоутробного розвитку. У подальшому, FcγR з молекулярною масою 87 і 72 кДа змінюють домінуючу локалізацію на апікальний полюс плазмолемі ентероцитів. Зміна

полярності ентероцитів обумовлена розвитком травного каналу, збільшенням навколо-плодової рідини та заковтуванням її плодом. Експресія поліпептиду з молекулярною масою 43 кДа, який проявляє Fc- γ -зв'язувальну активність, має зворотну залежність порівняно з Fc γ R з молекулярною масою 87 і 72 кДа та характеризується апікальною приналежністю у ранній плодовий період великої рогатої худоби.

Виявлена динаміка вмісту для кожного класу Fc γ R дає можливість припустити існування певної рецепторної взаємодії антигенного складника навколоплодової рідини зі стимуляцією імунної системи плоду. Запропоновано оригінальну схему трансцитозу IgG за допомогою Fc γ R в ентероцитах порожньої кишки плодів великої рогатої худоби за участю Fc γ Rf та Fc γ RIII (рис. 18). Регуляція експресії Fc γ R плазмолемі ентероцитів порожньої кишки великої рогатої худоби у фетальний період онтогенезу контролюється механізмами, асоційованими з розвитком плоду.

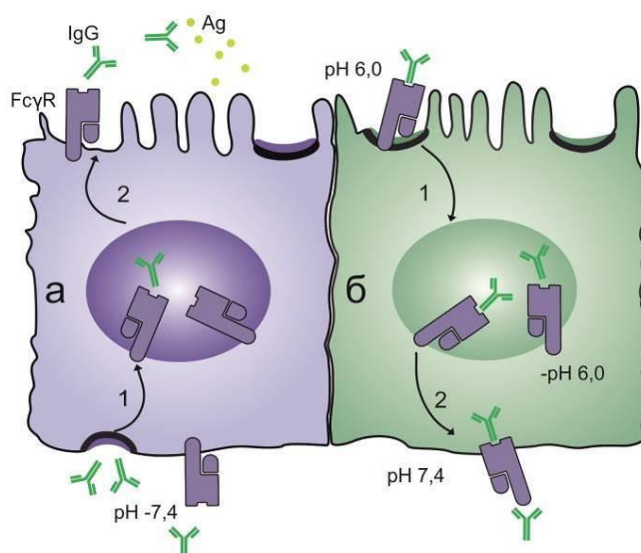


Рис. 18. Оригінальна схема трансцитозу IgG за допомогою Fc γ R в ентероцитах порожньої кишки плодів великої рогатої худоби; а – Fc γ Rf (поліпептид з молекулярною масою 120 кДа), б – Fc γ RIII (поліпептид з молекулярною масою 87 кДа)

Отримані результати досліджень та їх аналіз дозволили запропонувати наукову концепцію щодо фізіологічних функцій Fc γ R у плодовий період онтогенезу великої рогатої худоби. Зокрема, Fc γ R транслокують сигнали ланцюгом мати – плацента – плід, що є однією з головних сигнальних систем регуляції розвитку ентероцитів, розпізнають специфічні сигнали від імуноглобулінів та антигенів, відіграють важливу роль у трансцитозі та рециклінгу IgG із амніотичної рідини у фетальну циркуляцію, формують імунні механізми плода до адаптації внутрішньоутробного функціонування організму та готують його до антигенного пресингу після народження. Отже, модуляція експресії, локалізація і ідентифікація на плазмолемі поліпептидів, які проявляють Fc- γ -зв'язувальну активність, дозволяє сформувати систему сигналізації та контролювання розвитку бар'єрної та імунної функцій у плода за участі Fc γ R.

Підсумковий аналіз отриманих результатів довів про високий рівень кореляції динамічних змін синтезу і локалізації протеїнів на різних доменах плазмолемі ентероцитів, що визначається модуляцією активності гідролітичних ензимів, іон-транспортних систем, поліпептидного складника та розподілення FcγR. Ці процеси супроводжуються відповідними до етапів розвитку травної системи морфо-функціональними змінами слизової оболонки та певними змінами в самих кишкових клітинах.

ВИСНОВКИ

У дисертації вперше встановлено фізіологічні особливості структурно-функціональних перетворень білків плазмолемі ентероцитів порожньої кишки великої рогатої худоби у плодовий період онтогенезу. Наведено нові наукові дані щодо структури та фізіологічних функцій епітеліальних клітин із посмугованою облямівкою порожньої кишки плодів великої рогатої худоби. Доведено особливості експресії структурних білків та активність гідролітичних і транспортних ензимів на апікальній та базолатеральній мембранах кишкових клітин плодів великої рогатої худоби. Уперше ідентифіковано поліпептидний склад FcγR плазмолемі ентероцитів у плодовий період онтогенезу та досліджено закономірності формування модуляції їх експресії.

1. Вікова структурна диференціація слизової оболонки порожньої кишки у великої рогатої худоби в плодовому періоді онтогенезу визначається динамічними морфо-функціональними змінами, що забезпечують становлення постнатального травлення і колострального імунітету. У плодовому періоді онтогенезу відбувається збільшення складчастості слизової оболонки порожньої кишки, розвиток ворсинок, збільшення їх довжини і кількості, формування м'язової пластинки слизової оболонки, що чітко виявляється у 9-місячних плодів. Плодовий період онтогенезу характеризується асинхронністю розвитку виростів слизової оболонки порожньої кишки.

2. У кишечнику великої рогатої худоби у ранньому плодовому періоді відбувається найбільш динамічне зменшення висоти посмугової облямівки у зоні вершини ворсинок ($p \leq 0,001$). Об'єм ентероцитів наприкінці плодового періоду зменшується майже в усіх зонах. Об'єм ядер цих клітин зменшується в зоні вершини ($p \leq 0,01$) та в зоні бокової поверхні ($p \leq 0,05$), а в зоні крипт збільшується ($p \leq 0,001$). У пізньому плодовому періоді онтогенезу великої рогатої худоби стабілізується висота посмугової облямівки кишкових епітеліоцитів із зменшенням в ділянці вершини ворсинок і основи ворсинок. Динаміка об'єму кишкових клітин у різних зонах ворсинок характеризується хвилеподібними змінами, що, на тлі достатньо високих значень у першій частині пізнього плодового періоду, знижується – в середині періоду та підвищується – наприкінці періоду.

3. Білковий склад апікальних і базолатеральних мембран ентероцитів порожньої кишки 2-місячних плодів великої рогатої худоби характеризується такими показниками: а) апікальні мембрани – 25 білкових фракцій з молекулярною масою від 9,6 до 205 кДа; б) базолатеральні мембрани –

23 білкові фракції з молекулярною масою від 9,6 до 120 кДа; в) в апікальних мембранах наявні поліпептидні фракції з молекулярною масою 22,5 кДа, 37, 155 та 170–185 кДа, що відсутні у базолатеральних мембранах, і, навпаки, – в базолатеральних мембранах наявні білки з молекулярною масою 19 кДа, 24 та 66 кДа, що відсутні в апікальних мембранах.

4. У ранній плодовий період відбуваються динамічні зміни поліпептидного складу апікальних та базолатеральних мембран ентероцитів плодів великої рогатої худоби, зокрема, змінюється їх співвідношення та перерозподіл між полюсами цих клітин. В апікальних мембранах ентероцитів у 3-місячних плодів великої рогатої худоби ідентифіковані високомолекулярні фракції поліпептидів з молекулярною масою 250 та 300 кДа. В базолатеральній мембрані ентероцитів 4-місячних плодів зменшується вміст низькомолекулярних білкових фракцій та з'являються високомолекулярні поліпептиди з молекулярною масою 155 кДа.

5. У пізній плодовий період великої рогатої худоби в апікальних та базолатеральних мембранах ентероцитів виявлено 31 та 27 білкових фракцій, відповідно з молекулярною масою від 9,6 до 300 кДа. Водночас, зменшується вміст низькомолекулярних та збільшується частина високомолекулярних білкових фракцій. Особливістю апікальної мембрани ентероцитів на цьому етапі є наявність у ній білків з молекулярною масою 80 та 95 кДа, які в цій мембрані плодів 4-місячного віку відсутні. З 7-місячного віку розвитку плода великої рогатої худоби в плазмолемі ентероцитів з'являються фракції поліпептидів з молекулярною масою 24 та 66 кДа. Поліпептидний склад різних полюсів плазмолем ентероцитів у пізній плодовий період великої рогатої худоби динамічно змінюється, внаслідок чого у 9-місячному віці в апікальній мембрані переважають білки з молекулярною масою від 21 до 33 кДа, а у базолатеральній мембрані – від 35 до 300 кДа.

6. Активність транспортних АТФаз плазматичної мембрани ентероцитів порожньої кишки великої рогатої худоби у ранньому плодовому періоді онтогенезу поступово знижується на обох морфо-функціональних ділянках плазмолем за більш високої їх активності в базолатеральній мембрані. Активність Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази, Na^{+} , K^{+} -АТФази та Mg^{2+} -АТФази у апікальній мембрані ентероцитів з 2- до 5-місячного віку достовірно зменшується в 1,19 раз (p≤0,05), 1,32 (p≤0,001) та 1,21 раз (p≤0,001), а в базолатеральних мембранах відповідно у 2,13 раз (p≤0,001), 1,22 (p≤0,001) та 1,17 раз (p≤0,05).

7. Пік активності транспортних АТФаз на базолатеральному домені плазматичної мембрани ентероцитів порожньої кишки великої рогатої худоби припадає на 7 місяць внутрішньоутробного розвитку. Водночас, їх активність більша в 1,9–2,6 раз (p≤0,001), порівнюючи з такою у плодів віком 6 місяців, після чого вона, до 9-місячного віку, знижується на 14,6–40,6 % (p≤0,05–0,001). Активність АТФаз апікальних мембран поступово знижується з 5- до 9-місячного віку плодів великої рогатої худоби в 1,46–2,21 раз (p≤0,001).

8. Динаміка активності гідролітичних ензимів плазмолем ентероцитів порожньої кишки з 2 до 9 місяця розвитку плода великої рогатої худоби є більш варіабельною, ніж транспортних АТФаз: активність лужної фосфатази

на апікальному та базолатеральному полюсах плазмолемі ентероцитів зменшується в 9,24 ($p \leq 0,001$) та 3,83 раза ($p \leq 0,001$) відповідно з постійним її переважанням на базолатеральному домені; активність γ -глутамілтрансферази на апікальному і базолатеральному полюсах плазмолемі ентероцитів зменшується відповідно в 1,92 ($p \leq 0,001$) та 6,59 раза ($p \leq 0,001$), з перерозподілом полярної активності з базальної на апікальну мембрану у 8-місячному віці плода; активність лактази на апікальному та базолатеральному домені плазмолемі ентероцитів до 5-місячного віку плодів збільшується в 1,45–1,87 раза ($p \leq 0,001$), після чого, до кінця плодового періоду, зменшується відповідно у 1,98 ($p \leq 0,001$) та 4,78 раза ($p \leq 0,001$), з постійним переважанням полярної активності на апікальній мембрані.

9. Доведено лінійність та взаємозалежність розвитку ензимних систем під час інтенсивних процесів проліферації епітеліоцитів тонкої кишки плодів великої рогатої худоби. Активність транспортних АТФаз на різних доменах плазмолемі ентероцитів істотно пов'язана ($r=0,89-0,99$; $p \leq 0,01-0,001$). Незалежно від локалізації ензимів, існують достовірні зв'язки між активністю лужної фосфатази та γ -глутамілтрансферази ($r=0,85-0,99$; $p \leq 0,01-0,001$). Активність транспортних ензимів на апікальній мембрані ентероцитів пов'язана з активністю гідролаз (крім лактази) – $r=0,64-0,97$ ($p \leq 0,05-0,001$). На базолатеральній мембрані ентероцитів активність Na^+ , K^+ -АТФази та Mg^{2+} -АТФази обернено пов'язана з активністю лужної фосфатази та γ -глутамілтрансферази ($r=-0,65-0,77$; $p \leq 0,05$).

10. Методом імуноблотингу виявлено Fc- γ -рецепторні білки апікальних і базолатеральних мембран ентероцитів порожньої кишки з молекулярною масою 120 кДа, 87, 72 і 43 кДа. Загальний вміст рецепторів до IgG білків на апікальній мембрані ентероцитів плодів 7-місячного віку достовірно збільшується, однак надалі, до 9-місячного віку, знижується майже в 3 рази ($p \leq 0,001$). На базолатеральній мембрані ентероцитів найвищий уміст Fc γ R виявляється у 5-місячних плодів і до 7- та 9-місячного їх віку знижується відповідно у 1,7 та 2,8 раза ($p \leq 0,001$).

11. Експресія поліпептидів з молекулярною масою 120 кДа, 87 і 72 кДа, які проявляють Fc- γ -зв'язувальну активність, характеризується їх переважанням на базолатеральній мембрані ентероцитів до середини фетального періоду. У подальшому, Fc- γ -рецепторні білки з молекулярною масою 87 і 72 кДа змінюють домінуючу локалізацію на апікальний полюс плазмолемі ентероцитів. Експресія поліпептиду з молекулярною масою 43 кДа має зворотну залежність та характеризується апікальною приналежністю у ранній плодовий період.

12. Запропонована концепція ролі Fc- γ -рецепторів у транслокації сигналів від організму корови через ланцюг мати – плацента – плід. Fc- γ -рецептори є одними з ключових сигнальних систем у регуляції контролю розвитку ентероцитів і, в цілому, функції всмоктування та травлення у плодів. У плодовий період великої рогатої худоби Fc- γ -рецептори приймають та індукують сигнали від імуноглобулінів та імунних комплексів IgG-антиген, відіграють важливу роль у трансцитозі та рециклінгу IgG із амніотичної рідини

у фетальну циркуляцію і можуть формувати імунні механізми плода до адаптації внутрішньоутробного функціонування організму.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. У фізіолого-біохімічних, молекулярно-біологічних і цитологічних дослідженнях з використанням кишкових клітин та їх високоочищених мембранних фракцій, як моделі, рекомендується використовувати розроблені та модифіковані методи:

а) отримання ізольованих ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби з урахуванням особливостей морфогенезу її слизової оболонки (*патент України на корисну модель «Спосіб одержання ізольованих ентероцитів плодів великої рогатої худоби»*);

б) отримання апікальних і базолатеральних мембран ізольованих ентероцитів великої рогатої худоби у плодовий період онтогенезу (*патент України на корисну модель «Спосіб фракціонування плазматичних мембран ізольованих ентероцитів»*).

2. Одержані під час виконання досліджень дані пропонуємо використовувати в процесі підготовки фахівців освітнього ступеня «Магістр» та освітньо-наукового ступеня «Доктор філософії» спеціальності «Ветеринарна медицина» у закладах вищої освіти України.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України

1. Гаврилін П. М., Масюк Д. М. Закономірності морфогенезу тканинних компонентів органів кровотворення та імунного захисту у телят. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнології імені С. З. Гжицького. Серія: Ветеринарна медицина. 2004. Т. 6. № 1. Ч. 4. С. 16–25. (*Здобувачем проведено огляд наукових джерел з проблеми досліджень, оформлено ілюстративний матеріал, здійснено порівняльний аналіз одержаних даних та сформульовано висновки*).

2. Гаврилін П. М., Криштофорова Б. В., Масюк Д. М., Бібен І. А. Концепція підвищення життєздатності новонароджених телят. Вісник Дніпропетровського державного аграрного університету. 2004. № 1. С. 96–98. (*Здобувачем розроблено концепцію, проведено огляд наукових джерел, оформлено ілюстративний матеріал та сформульовано висновки*).

3. Масюк Д. М. Методичні особливості отримання та структурна характеристика ізольованих ентероцитів епітелію тонкого кишечнику плодів великої рогатої худоби. Вісник Національного аграрного університету. 2004. № 75. С. 148–151.

4. Масюк Д. М. Особливості фракціонування плазматичних мембран ізольованих ентероцитів тонкого кишечнику плодів великої рогатої худоби. Вісник Національного аграрного університету. 2004. № 78. С. 125–129.

5. Масюк Д. М., Гаврилін П. М. Особливості морфогенезу слизової оболонки порожньої кишки у плодів великої рогатої худоби та методичні

аспекти отримання ізольованих ентероцитів. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнології імені С. З. Гжицького. Серія: Ветеринарна медицина. 2004. Т. 6. № 3. Ч. 2. С. 59–64. *(Здобувачем виконано морфологічні дослідження слизової оболонки, проведено огляд наукових джерел та сформульовано висновки).*

6. **Масюк Д. М.**, Гаврилін П. М. Методичні підходи до отримання ізольованих ентероцитів порожньої кишки в плодів великої рогатої худоби з урахуванням особливостей морфогенезу слизової оболонки. Вісник Дніпропетровського державного аграрного університету. 2004. № 2. С. 102–105. *(Здобувачем удосконалено методіку отримання ізольованих ентероцитів, написано статтю).*

7. Масюк Д. М. Активність гідролаз плазматичної мембрани епітелію тонкої кишки великої рогатої худоби у плідному періоді онтогенезу. Ветеринарна медицина. 2005. Вип. 85. С. 760–764.

8. Масюк Д. М. Гідролітична активність плазмалеми ентероцитів великої рогатої худоби у пізній плідний період онтогенезу. Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок. 2005. Вип. 6. № 3–4. С. 265–269.

9. Масюк Д. М. Динаміка активності аденозинтрифосфатаз плазматичної мембрани ентероцитів тонкої кишки великої рогатої худоби у ранньому плідному періоді. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнології імені С. З. Гжицького. Серія: Ветеринарна медицина. 2005. Т. 7. № 3 (26). Ч. 2. С. 119–125.

10. Масюк Д. М. Активність гідролітичних ферментів плазматичної мембрани ентероцитів порожньої кишки великої рогатої худоби у ранній плідний період онтогенезу. Вісник Білоцерківського державного аграрного університету. 2005. Вип. 33. С. 174–179.

11. Гаврилін П. М., **Масюк Д. М.**, Бібен І. А. Роль і потенційні можливості фізіології та функціональної морфології у вирішенні проблем підвищення життєздатності продуктивних тварин. Вісник Дніпропетровського державного аграрного університету. 2005. № 2. С. 12–15. *(Здобувачем проведено огляд наукових джерел та сформульовано висновки).*

12. Масюк Д. М. Особливості АТФазної активності плазматичної мембрани ентероцитів порожньої кишки великої рогатої худоби у перинатальному періоді онтогенезу. Вісник Дніпропетровського державного аграрного університету. 2005. № 2. С. 222–225.

13. Масюк Д. М. Динаміка активності лужної фосфатази та Na^+ , K^+ -АТФази в плазматичній мембрані епітелію тонкої кишки великої рогатої худоби у перинатальний період онтогенезу. Вісник Національного аграрного університету. 2005. Вип. 89. С. 96–99.

14. Масюк Д. М. Активність АТФаз плазмалеми ентероцитів порожньої кишки великої рогатої худоби у пізньому плідному періоді. Біологія тварин. 2005. Т. 7. № 1–2. С. 103–108.

15. Масюк Д. М. Динаміка гідролітичної активності білків плазмолемі абсорбційних ентероцитів великої рогатої худоби у плідний період. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнології імені С. З. Гжицького. Серія: Ветеринарна медицина. 2006. Т. 8. № 4 (31). Ч. 2. С. 150–153.

16. Масюк Д. М. Особливості АТФазної активності білків плазмолемі епітеліоцитів тонкої кишки в плодів великої рогатої худоби. Вісник Національного аграрного університету. 2007. № 108. С. 206–211.

17. Масюк Д. М. Динаміка вмісту Fc- γ -рецепторів плазматичної мембрани ентероцитів великої рогатої худоби у плідний період онтогенезу. Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок. 2007. Вип. 8. № 3–4. С. 162–166.

18. Масюк Д. М. Експресія Fc- γ -рецепторів плазмолемі ентероцитів великої рогатої худоби у плодовий період. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнології імені С. З. Гжицького. Серія: Ветеринарна медицина. 2007. Т. 9. № 3 (34). Ч. 2. С. 130–135.

19. Масюк Д. М. Вікові особливості експресії Fc- γ -рецепторів ентероцитів тонкої кишки плодів великої рогатої худоби. Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини. 2007. Вип. 15 (40). Ч. 2. Т. 1. С. 254–258.

20. Масюк Д. М. Динаміка цитометричних показників ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби. Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини. 2008. Вип. 16 (41). Ч. 2. Т. 2. С. 31–38.

21. Масюк Д. М. Fc- γ -рецептори апікальних мембран ентероцитів великої рогатої худоби у ранній плодовий період: поліпептидний склад та їх динаміка. Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок. 2008. Вип. 9. № 3. С. 73–78.

22. Масюк Д. М. Поліпептидний склад Fc- γ -рецепторів базолатеральних мембран ентероцитів великої рогатої худоби у ранній плодовий період. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького. 2008. Т. 10. № 2 (37). Ч. 2. С. 165–170.

23. Масюк Д. М. Видоспецифічність Fc-g-рецепторів ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького. 2008. Т. 10. № 3 (38). Ч. 2. С. 299–302.

24. **Масюк Д. М.,** Недзвецький В. С. Розподіл Fc- γ -рецепторів ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби. Біологія тварин. 2008. Т. 10. № 1–2. 2008. С. 310–316. *(Здобувачем проведено лабораторні дослідження, написано статтю).*

25. **Масюк Д. М.,** Недзвецький В. С., Цвіліховський М. І. Вікова модуляція експресії Fc-g-рецепторів в ентероцитах порожньої кишки у плодів великої рогатої худоби. Вісник Національного аграрного університету. 2008.

№ 127. С. 188–191. *(Здобувачем проведено лабораторні дослідження, проаналізовано результати та сформовано статтю).*

26. Масюк Д. М. Кількісна характеристика структурних компонентів слизової оболонки порожньої кишки великої рогатої худоби у пренатальному онтогенезі. Ветеринарна медицина. 2009. Вип. 92. С. 322–327.

27. **Масюк Д. М.,** Недзвецький В. С. Трансцитоз Fc γ RII та Fc γ RIII ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби. Вісник Білоцерківського національного аграрного університету. 2009. Вип. 60. Ч. 2. С. 75–79. *(Здобувачем проведено лабораторні дослідження, проаналізовано результати та сформовано статтю).*

28. **Масюк Д. М.,** Цвіліховський М. І. Модуляція експресії Fc- γ -рецепторів ентероцитів великої рогатої худоби у плодовий період. Наукові праці Південного філіалу Національного університету біоресурсів і природокористування України «Кримський агротехнологічний університет». Серія: Ветеринарні науки. 2011. Вип. 139. С. 222–227. *(Здобувачем проведено лабораторні дослідження, написано статтю).*

29. Масюк Д. М. Структурно-функціональна характеристика білків плазмолемі ентероцитів корів в фетальний період онтогенезу. Аграрний вісник Причорномор'я. 2019. Вип. 94. С. 36–44.

30. Масюк Д. М. Структурні білки плазмолемі ентероцитів порожньої кишки великої рогатої у пізньому плодовому періоді. Аграрний вісник Причорномор'я. 2019. Вип. 95. С. 23–28.

**Статті у наукових фахових виданнях України,
включених до міжнародних наукометричних баз даних**

31. **Masiuk D.,** Kokariev A., Vasilenko T., Krutii K. The formation of colostral immunity and its duration in calves during the first months of life. Ukrainian Journal of Veterinary and Agricultural Sciences. 2019. № 2 (1). P. 3–6. *(Здобувачем проведено огляд наукових джерел та сформульовано висновки).*

32. Masiuk D. Structural proteins of plasmolemma of the jejunum absorbing enterocytes of cattle fetus in early fetal period. Ukrainian Journal of Veterinary and Agricultural Sciences. 2019. № 2 (3). P. 32–38.

33. Масюк Д. М. Взаємозв'язок експресії fc- γ -рецепторних протеїнів з активністю окремих ензимів у плазмолемі ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби. Український часопис ветеринарних наук. 2020. Т. 11. № 1. С. 70–80.

34. Masiuk D. Expression of plasmolemma proteins of the absorptive enterocytes of the cattle in the late fetal period. Ukrainian Journal of Veterinary and Agricultural Sciences. 2020. № 3 (1). С. 52–57.

35. Масюк Д. М. Співвідношення протеїнів на різних полюсах плазмолемі ентероцитів порожньої кишки у плодовий період розвитку великої рогатої худоби. Theoretical and Applied Veterinary Medicine. 2020. № 8 (1). С. 62–68.

Статті в інших наукових виданнях

36. **Масюк Д. М.**, Недзвецький В. С., Цвіліховський М. І., Неруш П. О. Динаміка експресії та поліпептидний склад Fc-γ-рецепторів ентероцитів тонкої кишки плодів бика. *Фізіологічний журнал*. 2008. Т. 54. № 1. С. 27–34. *(Здобувачем виконано лабораторні дослідження, проведено огляд наукових джерел, сформульовано висновки).*

37. **Masyuk D.**, Bugay A., Gibson P., Tsvilikhovsky M. Improved isolation and purification of plasma membrane fractions from small intestinal enterocytes of bovine fetuses. *Науково-технічний бюлетень НДЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК*. 2012. Т. 1. № 1. С. 90–94. *(Здобувачем виконано лабораторні дослідження, проведено огляд наукових джерел, сформульовано висновки).*

Патенти України на корисну модель

38. **Масюк Д. М.**, Цвіліховський М. І. Патент на корисну модель № 118133 Україна. G01N1/28. Спосіб фракціонування плазматичних мембран ізольованих ентероцитів. Заявник і патентовласник Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет. № u201700936; заявлено 02.02.2017; опубліковано 25.07.2017. Бюл. № 14. *(Здобувачем розроблено спосіб фракціонування плазматичних мембран ізольованих ентероцитів і сформовано заявку на патент).*

39. **Масюк Д. М.**, Цвіліховський М. І. Патент на корисну модель № 118136 Україна. G01N1/28, C12N5/07. Спосіб одержання ізольованих ентероцитів плодів великої рогатої худоби. Заявник і патентовласник Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет. № u201700936; заявлено 02.02.2017; опубліковано 25.07.2017. Бюл. № 14. *(Здобувачем розроблено спосіб фракціонування плазматичних мембран ізольованих ентероцитів і сформовано заявку на патент).*

Тези наукових доповідей

40. Масюк Д. М. Закономірності морфогенезу слизової оболонки порожньої кишки у плодів великої рогатої худоби. Конференція професорсько-викладацького складу і аспірантів Навчально-наукового інституту ветеринарної медицини якості і безпеки продукції АПК Національного аграрного університету, м. Київ, 2004 року: тези доповіді. К., 2004. С. 63–64.

41. Гаврилін П. М., **Масюк Д. М.**, Криштофорова Б. В. Шляхи підвищення життєздатності новонароджених продуктивних тварин. Новітні технології в тваринництві: Всеукраїнська науково-виробнича конференція, м. Дніпропетровськ, 23 березня 2004 року: тези доповіді. Дніпропетровськ, 2004. С. 229–232. *(Здобувачем розроблено концепцію, написано тези та сформульовано висновки).*

42. Масюк Д. М. Особливості активності маркерних ферментів плазмалеми ентероцитів порожньої кишки великої рогатої худоби у перинатальному онтогенезі. Конференція професорсько-викладацького складу і аспірантів Навчально-наукового інститут ветеринарної медицини якості

і безпеки продукції АПК Національного аграрного університету, м. Київ, 3–4 березня 2005 року: тези доповіді. К., 2005. С. 49.

43. Масюк Д. М. Особливості динаміки гідролаз плазмалеми епітелію тонкої кишки великої рогатої худоби у плідному періоді онтогенезу. Актуальні напрями розвитку ветеринарної медицини на сучасному етапі науково-технічного прогресу: наукова конференція професорсько-викладацького складу і студентів факультету ветеринарної медицини, м. Дніпропетровськ, 2005 року: тези доповіді. Дніпропетровськ, 2005. С. 9–10.

44. Масюк Д. М. Динаміка активності мембранних транспортних ферментів ентероцитів тонкої кишки у плодів великої рогатої худоби. Аграрна наука – виробництву: V державна науково-практична конференція, м. Біла Церква, 23 – 25 листопада 2006 року: тези доповіді. Біла Церква, 2006. Ч. 1. С. 44–45.

45. Масюк Д. М. Активність Na^+ , K^+ -АТФази плазматичної мембрани абсорбційних ентероцитів тонкої кишки великої рогатої худоби у плідний період. Кроки науки назустріч виробництву: XVIII (XXIX) Міжнародна науково-практична конференція, до 75-річчя УААН, м. Дніпропетровськ, 2006 року: тези доповіді. Дніпропетровськ, 2006. С. 99–103.

46. Масюк Д. М. Особливості АТФазної активності плазматичної мембрани ентероцитів у плодів *Bos domesticus*. IX Український біохімічний з'їзд, м. Харків, 24–27 жовтня 2006 року: тези доповіді. Х., 2006. Т. 1. С. 148–149.

47. Масюк Д. М. Гідролітична активність білків плазмалеми абсорбційних ентероцитів порожньої кишки у плодів великої рогатої худоби. Конференція професорсько-викладацького складу, наукових співробітників і аспірантів Навчально-наукового інституту ветеринарної медицини та якості і безпеки продукції тваринництва, м. Київ, 5–6 квітня 2006 року: тези доповіді. К., 2006. С. 66–67.

48. Масюк Д. М. Аденозинтрифосфатазна активність білків плазмалеми ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби. Теоретичні й практичні досягнення молодих вчених аграріїв: Міжнародна науково-практична конференція молодих вчених, м. Дніпропетровськ, 11–12 квітня 2006 року: тези доповіді. Дніпропетровськ, 2006. С. 204–206.

49. **Масюк Д. М.**, Бугай П. О. Білковий склад плазматичної мембрани ентероцитів порожньої кишки 9-ти місячних плодів великої рогатої худоби. Молодь та поступ біології: III Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів, м. Львів, 23–27 квітня 2007 року: тези доповіді. Львів, 2007. С. 76–77. *(Здобувачем проведено лабораторні дослідження, оформлено тези доповіді).*

50. **Masyuk D. M.**, Bugay P. O. Dynamic expression of Fc-R receptors of fetal enterocyte plasma membrane of *Bos domesticus*. Біологія: від молекули до біосфери: Міжнародна конференція молодих учених, м. Харків, 19–21 листопада 2007 року: тези доповіді. Х., 2007. С. 179. *(Здобувачем проведено лабораторні дослідження, написано тези та сформульовано висновки).*

51. **Масюк Д. М.,** Недзвецький В. С. Експресія неонатальних Fc- γ -рецепторів на ентероцитах плодів Bovis. Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології, м. Дніпропетровськ, 30–31 жовтня 2008 року: тези доповіді. Дніпропетровськ, 2008. С. 82. *(Здобувачем написано тези та сформульовано висновки).*

52. **Масюк Д. М.,** Недзвецький В. С., Цвіліховський М. І. Фізіолого-біохімічна характеристика Fc-рецепторів. VI Міжнародний конгрес спеціалістів ветеринарної медицини, присвячений 110-річчю НАУ, м. Київ, 6–10 жовтня 2008 року: тези доповіді. К., 2008. С. 117–119. *(Здобувачем написано тези та сформульовано висновки).*

53. Масюк Д. М. Особливості морфометричних змін слизової оболонки порожньої кишки у плодів великої рогатої худоби. Сучасні проблеми ветеринарної медицини: Міжнародна науково-практична конференція, присвячена 25-річчю факультету ветеринарної медицини ПДАТУ, м. Кам'янець-Подільський, 2008 року. Кам'янець-Подільський, 2008. С. 52–56.

54. Масюк Д. М. Молекулярні аспекти формування механізмів імунного захисту в тонкій кишці плодів великої рогатої худоби. Конференція науково-педагогічних працівників, наукових співробітників та аспірантів Навчально-наукового інституту ветеринарної медицини та якості і безпеки продукції тваринництва, м. Київ, 10–11 березня 2010 року: тези доповіді. К., 2010. С. 123–124.

55. **Масюк Д. М.,** Цвіліховський М. І. Локалізація Fc-гама-рецепторів на плазмолемі кишкових клітин великої рогатої худоби у плодовий період. III з'їзд Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом, м. Ялта, 16–20 травня 2012 року: тези доповіді. Ялта, 2012. С. 155. *(Здобувачем проведено визначення локалізації Fc- γ -рецепторів, написано тези).*

56. **Масюк Д. М.,** Недзвецький В. С., Цвіліховський М. І. Формування трансцитозу Fc- γ -рецепторів у пренатальний період. Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології: II Міжнародна наукова конференція, м. Дніпропетровськ, 24–25 вересня 2013 року: тези доповіді. Дніпропетровськ, 2013. С. 84. *(Здобувачем проведено визначення поліпептидного складу Fc- γ -рецепторів, написано тези та сформульовано висновки).*

57. **Масюк Д. М.,** Цвіліховський М. І., Недзвецький В. С. Механізми регуляції транспорту IgG у кишкових епітеліальних клітинах. Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології: IV Міжнародна наукова конференція, м. Дніпро, 5–6 жовтня 2017 року: тези доповіді. Дніпро, 2017. С. 222–224. *(Здобувачем сформовано концепцію, написано тези та сформульовано висновки).*

58. Масюк Д. М. Формування мембранного травлення у слизовій оболонці порожньої кишки плодів великої рогатої худоби. Актуальні проблеми фізіології тварин: Міжнародна науково-практична конференція, присвячена 120-річчю Національного університету біоресурсів і природокористування України, м. Київ, 3–5 травня 2018 року: тези доповіді. К., 2018. С. 61–62.

59. Масюк Д. М. Активність окремих ензимів з експресією Fc- γ -рецепторних протеїнів у плазматичній мембрані ентероцитів тонкої кишки плодів великої рогатої худоби. Актуальні аспекти біології тварин, ветеринарної медицини та ветеринарно-санітарної експертизи: III Міжнародна науково-практична конференція викладачів і студентів, м. Дніпро, 16–18 травня 2018 року: тези доповіді. Дніпро, 2018. С. 193–195.

60. Масюк Д. М. Білки плазмолемі ентероцитів порожньої кишки великої рогатої худоби у ранньому плодовому періоді. Актуальні аспекти біології тварин, ветеринарної медицини та ветеринарно-санітарної експертизи: IV Міжнародна науково-практична конференція викладачів і студентів, м. Дніпро, 22–23 травня 2019 року: тези доповіді. Дніпро, 2019. С. 147–148.

61. Масюк Д. М. Експресія пептидів плазмолемі абсорбційних ентероцитів порожньої кишки великої рогатої худоби у пізньому плодовому періоді. Актуальні аспекти біології тварин, ветеринарної медицини та ветеринарно-санітарної експертизи: V Міжнародна науково-практична конференція викладачів і студентів, м. Дніпро, 06–07 травня 2020 року: тези доповіді. Дніпро, 2020. С. 125–127.

АНОТАЦІЯ

Масюк Д. М. Структурно-функціональна характеристика білків плазмолемі ентероцитів порожньої кишки великої рогатої худоби у плодовий період онтогенезу. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора ветеринарних наук зі спеціальністю 03.00.13. «Фізіологія людини і тварин». Національний університет біоресурсів і природокористування України. Київ, 2020.

Дисертацію присвячено з'ясуванню фізіолого-біохімічних механізмів структурно-функціональних перетворень білків плазмолемі ентероцитів порожньої кишки великої рогатої худоби у плодовий період онтогенезу. Наведено нові наукові дані щодо характеристики структурних компонентів слизової оболонки порожньої кишки плодів великої рогатої худоби, динаміки цитометричних показників епітеліальних клітин із посмуговою облямівкою порожньої кишки плодів великої рогатої худоби, вмісту структурних білків плазмолемі кишкових епітеліальних клітин та вікових змін активності гідролітичних і транспортних ензимів на апікальній та базолатеральній мембранах кишкових клітин плодів великої рогатої худоби. Виявлено Fc- γ -рецепторні білки апікальних і базолатеральних мембран ентероцитів порожньої кишки у плодів великої рогатої худоби з молекулярною масою 120 кДа, 87, 72 та 43 кДа. Запропоновано гіпотезу, що в плодовий період великої рогатої худоби цей тип Fc γ R відіграє важливу роль (є тригером) у транспортуванні IgG із амніотичної рідини у фетальну циркуляцію.

Ключові слова: фізіологія, плід, велика рогата худоба, порожня кишка, ентероцити, поліпептиди, апікальна та базолатеральна мембрани, Fc- γ -рецепторні білки, транспортні ензими, гідролітичні ензими.

АННОТАЦИЯ

Масюк Д. М. Структурно-функциональная характеристика белков плазмолеммы энтероцитов тощей кишки крупного рогатого скота в плодный период онтогенеза. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание научной степени доктора ветеринарных наук по специальности 03.00.13. «Физиология человека и животных». Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины. Киев, 2020.

Диссертация посвящена выяснению физиолого-биохимических механизмов структурно-функциональных преобразований белков плазмолеммы энтероцитов тощей кишки крупного рогатого скота в плодный период онтогенеза.

В диссертации, в соответствии с поставленной целью, изложено теоретическое обобщение и новое решение научной проблемы, которое представлено новыми научными данными относительно характеристики структурных компонентов слизистой оболочки тощей кишки плодов крупного рогатого скота, динамики цитометрических показателей эпителиальных клеток с исчерченной каймой тощей кишки плодов крупного рогатого скота, содержания структурных белков плазмолеммы кишечных эпителиальных клеток и возрастных изменений активности гидролитических и транспортных энзимов на апикальных и базолатеральных мембранах кишечных клеток плодов крупного рогатого скота. Впервые идентифицирован полипептидный состав Fc- γ -рецепторов плазматической мембраны энтероцитов в плодный период онтогенеза, исследованы закономерности формирования модуляции экспрессии Fc- γ -рецепторов и установлено их локализацию на плазмолемме энтероцитов плодов крупного рогатого скота

Установлена возрастная структурная дифференциация слизистой оболочки тощей кишки у крупного рогатого скота в плодном периоде онтогенеза, которая определяется интенсивным морфофункциональным преобразованием компонентов, обеспечивающих становление постнатального пищеварения и колострального иммунитета. Впервые исследован белковый состав апикальных и базолатеральных мембран энтероцитов тощей кишки в течение плодного периода. В ранний плодный период крупного рогатого скота происходят динамические изменения полипептидного состава апикальных и базолатеральных мембран энтероцитов, в частности, меняется их соотношение и перераспределение между полюсами этих клеток. В поздний плодный период в апикальных и базолатеральных мембранах энтероцитов выявлено 31 и 27 белковых фракций, соответственно с молекулярной массой от 9,6 до 300 кДа. В то же время, уменьшается содержание низкомолекулярных и увеличивается доля высокомолекулярных белковых фракций. Полипептидный состав различных полюсов плазмолеммы энтероцитов в поздний плодный период крупного рогатого скота динамично изменяется вследствие чего в 9-месячном возрасте в апикальной мембране преобладают белки с молекулярной массой от 21 до 33 кДа, а в базолатеральной мембране – от 35 до 300 кДа.

Установлены особенности динамики активности транспортных АТФаз-плазматической мембраны энтероцитов тощей кишки крупного рогатого скота в начале плодного периода, что характеризуются устойчивым ее снижением на обоих макродоменах плазмалеммы всех исследованных энзимов на фоне большего их наличия в базолатеральных мембранах. С 6-месячного возраста происходит увеличение активности ферментов в базолатеральной мембране энтероцитов плодов с пиком в 7-месячном возрасте и некоторым снижением до 9-месячного возраста плодов. Динамика активности гидролитических энзимов плазмалеммы энтероцитов тощей кишки крупного рогатого скота в раннем плодном периоде онтогенеза характеризуется: перераспределением полярной активности γ -глутамилтрансферазы; динамичным уменьшением активности щелочной фосфатазы в течение всего исследуемого периода в обоих доменах мембран; увеличением активности лактазы до 5-месячного возраста плода с его снижением в течение следующих четырех месяцев.

Выявлены Fc- γ -рецепторные белки апикальных и базолатеральных мембран энтероцитов тощей кишки с молекулярной массой 120 кДа, 87, 72 и 43 кДа. Общая концентрация рецепторов на апикальной мембране энтероцитов до 7-месячного возраста плодов достоверно увеличивается ($p \leq 0,001$), однако, в дальнейшем, до 9-месячного возраста плода стремительно снижается (почти в 3 раза; $p \leq 0,001$). Экспрессия полипептидов с молекулярной массой 120 кДа, 87 и 72 кДа, которые проявляют Fc- γ -связывающую активность, характеризуется их преобладанием на базолатеральных мембранах к середине фетального периода. В дальнейшем Fc- γ -рецепторные белки с молекулярной массой 87 и 72 кДа меняют доминирующую локализацию на апикальный полюс плазмалеммы энтероцитов. Экспрессия полипептида с молекулярной массой 43 кДа имеет обратную зависимость и характеризуется апикальной принадлежностью в раннем плодном периоде. Предложенная концепция роли Fc- γ -рецепторов в транслокации сигналов от организма коровы через цепь мать – плацента – плод. Fc- γ -рецепторы являются одними из ключевых сигнальных систем в регуляции контроля развития энтероцитов и, в целом, функции всасывания и пищеварения у плодов.

Ключевые слова: физиология, плод, крупный рогатый скот, тонкая кишка, энтероциты полипептиды, апикальная и базолатеральная мембраны, Fc- γ -рецепторные белки, транспортные энзимы, гидролитические ферменты.

ANNOTATION

Masiuk D. M. Structural and Functional Characteristics of Plasmolemma Proteins of the Cattle Jejunum Enterocytes in the Fetal Period of Ontogenesis. – The Manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Veterinary Sciences on a specialty 03.00.13 «Human and Animal Physiology». National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. Kyiv, 2020.

The dissertation is devoted to the elucidation of physiological and biochemical mechanisms of structural and functional transformations of plasmolemma proteins

of the cattle jejunum enterocytes in the fetal period of ontogenesis. New scientific data on the characteristics of the structural components of the mucous membrane of the cattle fetus jejunum, dynamics of cytometric parameters of epithelial cells with a striped border of the cattle fetus jejunum, concentration of structural proteins of intestinal epithelial cells plasmolemma and age-related changes in the activity of hydrolytic and transport enzymes on the apical and basolateral membranes of intestinal cells of cattle fetus. Fc- γ -receptor proteins of apical and basolateral membranes of the jejunum enterocytes were detected in cattle fetuses with Mr 120 kDa, 87, 72 and 43 kDa. It is hypothesized that in the fetal period of cattle this type of Fc γ R plays an important role (is a trigger) in the transport of IgG from amniotic fluid to the fetal circulation.

Key words: physiology, fetus, cattle, jejunum, enterocytes, polypeptides, apical and basolateral membranes, Fc- γ -receptor proteins, transport enzymes, hydrolytic enzymes.

Підписано до друку 25.09.2020 р. Формат 60x84\16
Ум. друк. арк. 1,9 Обл.-вид.арк. 1,9
Наклад 100 прим. Зам. № 200497

Віддруковано у редакційно-видавничому відділі НУБіП України
вул. Героїв Оборони, 15, Київ, 03041, тел.: 527-81-55
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4097 від 17.06.2011

