

РОЗПОДІЛ Fc- γ -РЕЦЕПТОРІВ ЕНТЕРОЦИТІВ ПОРОЖНЬОЇ КИШКИ ПЛОДІВ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Д. М. Масюк, В. С. Недзецький

Дніпропетровський державний аграрний університет

Встановлена загальні закономірності складу Fc- γ -рецепторів екстрагованих з апікальних та базолатеральних мембран ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби віком від 2-х до 9-ти місяців. Виявлена динаміка змін вмісту для кожного класу Fc- γ -рецепторів. Для поліпептиду з Mr 87 кДа характерна інверсна модуляція експресії на базолатеральній поверхні кишкової клітини у ранній плодовий період і апікальній у пізній плодовий період. Експресія і вміст поліпептиду з Mr 120 кДа виявлені більш інтенсивними на базолатеральному домені ентероцитів протягом усього фетального періоду. Регуляція експресії Fc- γ -рецепторів плазмолемі ентероцитів порожньої кишки великої рогатої худоби у фетальний період онтогенезу може бути асоційована з механізмами розвитку плода.

Ключові слова: Fc- γ -РЕЦЕПТОРИ, АПІКАЛЬНА ТА БАЗОЛАТЕРАЛЬНА МЕМБРАНИ, ЕНТЕРОЦИТИ, ПОРОЖНЯ КИШКА, ПЛОДИ, ВЕЛИКА РОГАТА ХУДОБА.

Структурною особливістю поляризованих клітин є асиметричний, нерівномірний розподіл мембранних білків між апікальним і базолатеральним доменами плазматичної мембрани [1]. Ця характерна властивість лежить в основі транспорту через епітелій іонів, різних метаболітів і навіть макромолекул [2]. Одними з найбільш важливих транспортерів і одночасно регуляторів клітинних функцій є імунорецепторні білки, які здатні специфічно розпізнавати Fc-фрагменти імуноглобулінів класу G-Fc- γ -рецептори (Fc γ R).

Fc γ R — гетеродімери, які не ковалентно асоційовані з β_2 -мікроглобуліном [3]. У свою чергу, β_2 -мікроглобулін взаємодіє з α -ланцюгами МНС I класу [4]. Цей факт вказує на універсальність Fc γ R комплексів. До того ж, ген α -ланцюга Fc γ R був незалежно виявлений вперше у щурів, потім у людини, миші, великої рогатої худоби, овець, свиней [5]. Вони широко представлені у різних за гістотипом клітинах ссавців, зокрема у жовтковому мішку, плацентарному синцитіотрофобласті, у постнатальний період онтогенезу в тонкій кишці, капілярному ендотелії, гепатоцитах, ниркових проксимальних канальцях, дихальному епітелії та епітелії молочної залози [6].

Відомо, що Fc γ R кишкових клітин забезпечують постачання імунних комплексів компетентним клітинам, які у відповідь формують специфічні клони лімфоцитів і стимулюють розвиток імунної системи [7].

На сьогоднішній день достатньо детально вивчена локалізація Fc- γ -рецепторів на кишкових клітинах і з'ясований механізм передачі Ig через плаценту гризунів і людини до плоду та тонку кишку у новонароджених ссавців (у тому числі і у великої рогатої худоби) [5, 6, 8]. У той же час, відомості про розподіл Fc γ R та їх участь у активації імунних механізмів у плодовий період великої рогатої худоби відсутні.

Метою роботи було з'ясувати вікову локалізацію модуляції експресії Fc γ R на апікальних (АМ) і базолатеральних (БМ) мембранах ентероцитів порожньої кишки великої рогатої худоби у плодовий період онтогенезу.

Матеріали і методи

Дослідження провели на базі проблемної науково-дослідної лабораторії фізіології та функціональної морфології продуктивних тварин Дніпропетровського державного аграрного університету.

Об'єктом досліджень були 48-м плодів великої рогатої худоби, віком від 2-х до 9-ти місяців, отриманих від клінічно здорових корів, після забою в умовах м'ясопереробного підприємства «Ювілейний» Дніпропетровської області.

Після негайної декапітації плодів (під нембуталовим наркозом), розтинали черевну порожнину, виділяли порожню кишку. Відділивши брижу визначали довжину та середину кишки, видаляли вміст, після чого відбирали частину (30 % від загальної довжини з середньої ділянки органа), яку використовували для одержання клітин.

За основу отримання ізольованих ентероцитів порожньої кишки великої рогатої худоби був обраний хімічний (цитрат / ЕДТО) метод змивання клітин у нашій модифікації [9]. Фракції апікальних та базолатеральних мембран отримували з суспензії ізольованих ентероцитів порожньої кишки методом диференціального центрифугування за М. І. Цвіліховським, 1989 (авторська модифікація методики) [10].

Електрофорез проводили у пластині ПААГ за методикою, описаною Laemmli U., 1970. У гелі для розділення білків формували градієнт акриламідів $T=7-18\%$.

Імуноспецифічне виявлення комплексів IgG-Fc- γ -рецептор проводили за допомогою імуноблотинга як описано раніше [11].

Визначення відносного вмісту Fc γ R вимірювали за інтенсивністю поліпептидних зон після проведення імуноблотингу. Скановані результати обробляли за допомогою програми «LabWork 4.0» (UVP, Велика Британія, 2001).

Обробку одержаних даних проводили методами математичної статистики для малих виборок [12]. Відносний вміст Fc γ R виражали у вигляді середньої величини \pm стандартна похибка середньої, достовірну різницю між групами оцінювали із застосуванням t-критерія Ст'юдента.

Результати та обговорення

Імуноблотинг проводили в умовах, що дозволяють відновити нативну структуру білків і виявити їх у реакції специфічного розпізнавання рецептор-ліганд. Результати імуноблотингу показали, що поліпептидний склад Fc γ R екстрагованих із плазмолем кишкових епітеліальних клітин із посмугованою облямівкою протягом усього плодового періоду великої рогатої худоби мав ідентичний поліпептидний склад, як на апікальному, так і базолатеральному домені. Ідентифіковані мембранні білки з Fc- γ -зв'язуючою активністю представлені поліпептидними зонами з молекулярними масами 120 і 87 кДа (рис. 1).

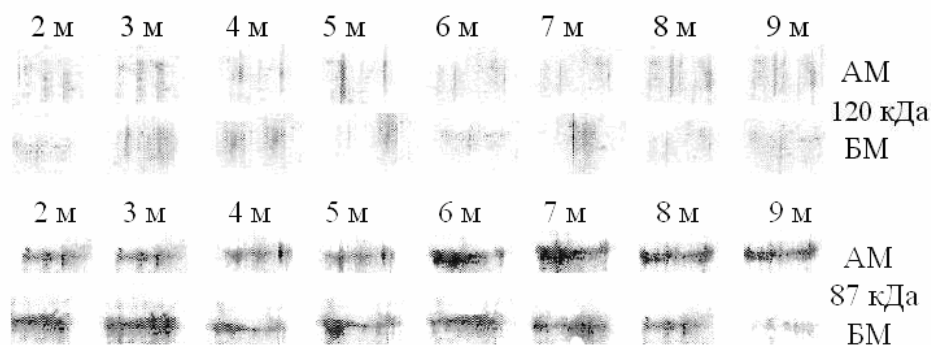


Рис.1. Імуноблотинг Fc- γ -рецепторів до IgG апікальних (AM) і базолатеральних (BM) мембранах ентероцитів порожньої кишки 2–9-ти місячних плодів великої рогатої худоби

Виявлені нами поліпептиди плазматичної мембрани ентероцитів відносяться до родини Fc γ R, оскільки афінно зв'язували в імуноблотингу Ig класу G та їх Fc- γ -фрагменти. Існують дані, що кожному окремому підкласу Ig у плазмолемі відповідають рецептори з різними молекулярними масами [13]. Тому ймовірно, що поліпептид з Mr 87 кДа відноситься до групи Fc γ RIII [14]. Поліпептид з Mr 120 кДа, на нашу думку, є видоспецифічним рецепторним білком плодів великої рогатої худоби і ми позначаємо його як Fc γ Rf.

Представлені результати вказують на локалізацію експресії всіх виявлених типів Fc γ R кишкових клітин протягом усього плодового періоду великої рогатої худоби. Слід зазначити, що динаміка змін вмісту поліпептидів із різною молекулярною масою, які проявляють Fc- γ -

зв'язуючу активність на базолатеральних і апікальних ділянках ентероцитів, мають певні характерні особливості для кожної групи рецепторів для IgG.

Кінетика поліпептиду з Мг 120 кДа, який проявляв Fc- γ -зв'язуючу здатність, характеризується загальною збіжністю експресії його вмісту на апікальному і базолатеральному домені ентероцитів протягом плодового періоду (рис. 2).

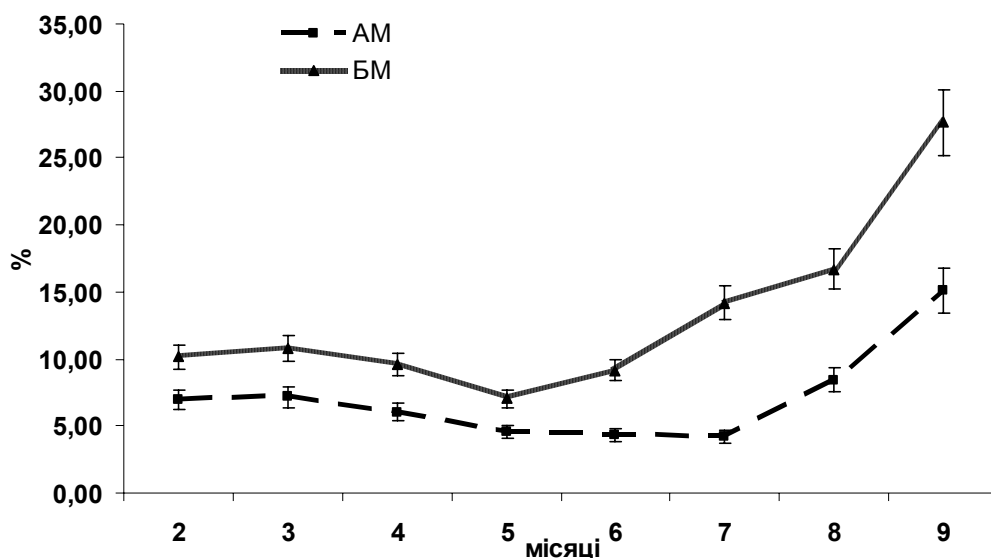


Рис. 2. Відносний вміст поліпептиду з Мг 120 кДа з Fc- γ -рецепторною активністю (Fc γ Rf) на апікальних (AM) і базолатеральних (БМ) мембранах ентероцитів порожньої кишки 2–9 місячних плодів великої рогатої худоби

На AM вона проявлялась майже однаковими показниками на початку раннього плодового періоду (плоди 2-х і 3-х місячного віку) з поступовим зниженням експресії даного класу Fc γ R на 16 % у 4-х місячних плодів, на 37 % у 5-ти місячних і майже на 40 % у 6-ти та 7-ми місячних у порівнянні з плодами 3-х місячного віку. В останні місяці фетального періоду, навпаки, відбувається стрімке збільшення вмісту Fc- γ -рецепторного білку з Мг 120 кДа майже в 2 рази у 8-ми місячних плодів та в 3,6 рази у плодів 9-ти місячного віку (у порівнянні з 7-ми місячними плодами). Тобто, за весь період пренатального розвитку у плодів на апікальній поверхні кишкових клітин проходить загальне збільшення експресії Fc γ Rf в 2,2 рази.

Експресія Fc γ R з Мг 120 кДа на БМ характеризується найнижчим показником у плодів 5-ти місячного віку, що позначилось її зниженням у цей період на 35 % у порівнянні з плодами 3-місячного віку. У подальшому проходить збільшення його вмісту в 1,3 рази у 6-ти місячних плодів, в 2,0 рази у 7-ми місячних, в 2,4 рази у 8-ми місячних та майже в 4 рази у 9-ти місячних у порівнянні з плодами 5-ти місячного віку. У цілому, на базолатеральній ділянці плазмолемі ентероцитів протягом плодового періоду відбувається підвищення вмісту даного Fc γ R в 2,7 рази.

Аналізуючи коефіцієнт співвідношення експресії Fc γ R з Мг 120 кДа на AM і БМ слід зазначити, що протягом усього фетального періоду проходить його зниження. При цьому динаміка даного коефіцієнту характеризується асинхронністю. Так, найвищий його рівень відмічається протягом усього раннього плодового періоду та зниженням у плодів 6-ти та 7-ми місячного віку в 1,3 та 2,3 рази відповідно. Наприкінці плодового періоду відбувається збільшення цього коефіцієнту в середньому в 1,8 рази (у порівнянні з 7-ми місячними плодами), але по відношенню до плодів 2-х місячного віку цей показник нижчий на 19 %.

Таким чином, протягом усього плодового періоду великої рогатої худоби динаміка поліпептиду з Мг 120 кДа, який проявляв Fc- γ -зв'язуючу активність, подібна між окремими ділянками плазмолемі ентероцитів порожньої кишки. Слід зазначити, що більш виражена експресія даного рецептору характерна для базолатерального домену, ніж для апікального. Найменший вміст Fc γ R на БМ відмічається у 5-ти місячних плодів, тоді як на AM — у 7-ми місячних. У той же час, максимальна експресія рецептору проявляється однаково на окремих

ділянках кишкових клітин у плодів 9-ти місячного віку. Такі вікові зміни кінетики Fc γ R з Mг 120 кДа свідчать про гетерохронність розвитку її модуляції на протилежних полюсах мембрани ентероцитів.

Динаміка вмісту Fc γ R з Mг 87 кДа кишкових епітеліальних клітин із посмугованою обляміркою протягом усього фетального періоду характеризується десинхронністю його експресії на АМ і БМ (рис. 3).

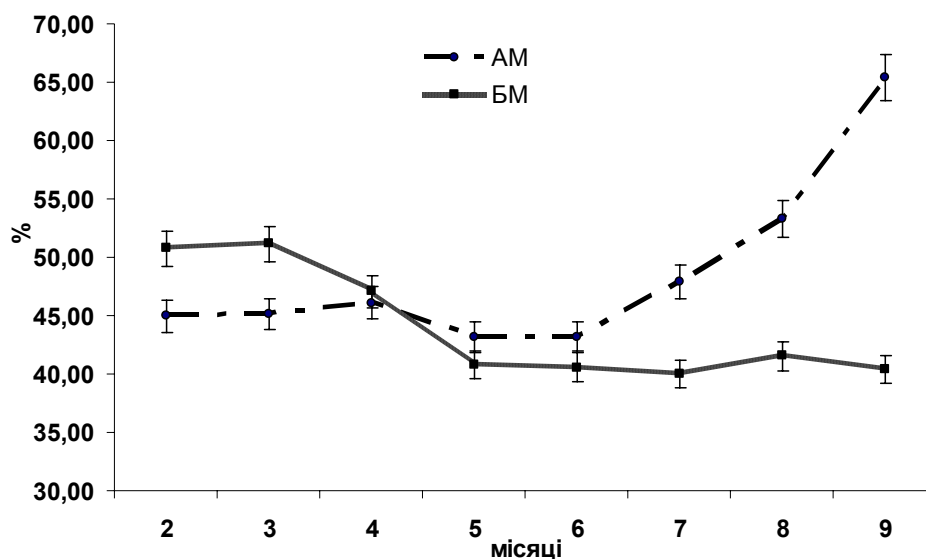


Рис. 3. Відносний вміст поліпептиду з Mг 87 кДа з Fc- γ -рецепторною активністю (Fc γ RIII) на апікальних (АМ) і базолатеральних (БМ) мембранах ентероцитів порожньої кишки 2–9 місячних плодів великої рогатої худоби

У ранній плодовий період на апікальному домені ентероцитів вміст Fc-рецептору для IgG достовірно не змінюється. На початку пізнього плодового періоду (плоди 5-ти та 6-ти місячного віку) відбувається його зниження в середньому на 6 % у порівнянні з 4-х місячними плодами. У подальшому, у плодів 7-ми, 8-ми та 9-ти місячного віку експресія даного Fc γ R поступово збільшується відповідно на 10,7 %, 23,3 % та 51,4 % (у порівнянні з 6-ти місячними плодами). За весь пренатальний онтогенез у плодів великої рогатої худоби відбувається збільшення рецепторного білку на АМ в 1,5 раза.

Протилежна залежність кінетики поліпептиду з Mг 87 кДа який проявляв Fc- γ -зв'язуючу активність відмічається на БМ ентероцитів. Найвищий вміст Fc γ R на базолатеральній поверхні кишкових клітин проявлявся у плодів на 2-му та 3-му місяці утробного періоду. Наприкінці раннього плодового періоду цей показник зменшується на 8 %. У подальшому, у 5-ти місячних плодів продовжується зниження експресії Fc γ R з Mг 87 кДа на 13,3 % (у порівнянні з плодами 4-х місячного віку). Після такого зниження вміст даного рецепторного білку залишається фактично на тому ж рівні протягом усієї другої половини плодового періоду великої рогатої худоби.

Співвідношення експресії Fc γ R з Mг 87 кДа між АМ і БМ ентероцитів порожньої кишки плодів у пренатальному онтогенезі характеризується перманентним збільшення цього коефіцієнту протягом усього періоду на 11,4 % у 4-х місячних плодів, на 21,6 % у 5-ти та 6-ти місячних плодів, на 41 % у плодів 7-ми та 8-ми місячних плодів (у порівнянні з першими місяцями раннього плодового періоду). Наприкінці плодового періоду відбувається найбільш суттєве збільшення даного індексу — в 1,8 раза у порівнянні з плодами 2-х місячного віку.

Таким чином, вікова динаміка Fc γ R з Mг 87 кДа характеризується інверсними змінами його експресії між апікальним і базолатеральним доменом кишкових клітин великої рогатої худоби.

Розрахунок і аналіз коефіцієнтів співвідношення вмісту Fc γ R між АМ та БМ кишкових клітин показали, що у ранній плодовий період проявляється перевага вмісту Fc γ RIII і Fc γ Rf на базолатеральному полюсі. Така специфіка розподілу, можливо, відображає

функціональну спеціалізацію плазматичних мембран порожньої кишки у даний період внутрішньоутробного розвитку.

Відомо, що у ранній плодовий період онтогенезу відсутній безпосередній зв'язок кишкової трубки з зовнішнім середовищем, що обумовлює відповідну специфіку фетального кровообігу та позначається гемотрофним типом живлення. Незважаючи на те, що антитіла не проникають крізь плаценту корів, існують дані, які свідчать про появу імунокомпетентних лімфоцитів і синтез власних імуноглобулінів у плодів великої рогатої худоби [15]. Цей факт дозволяє припустити, що у ранній плодовий період великої рогатої худоби FcγRIII і FcγRf базолатеральної мембрани беруть участь у зв'язуванні з різними підкласами фетальних IgG у базолатеральних ендосомах ентероцитів і за допомогою яких транспортують їх на апікальну поверхню плазмолемі для участі в імунних механізмах захисту (рис. 4 а).

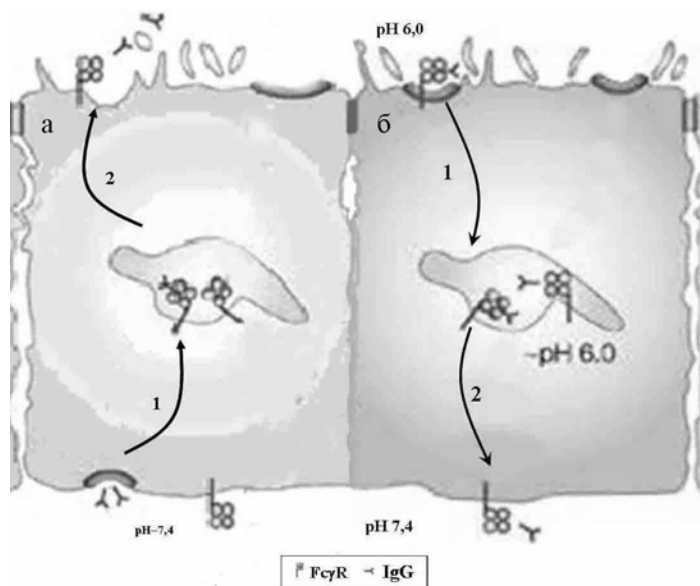


Рис. 4. Схема трансцитозу IgG за допомогою FcγR в ентероцитах порожньої кишки плодів великої рогатої худоби; а — FcγRf (поліпептид з Mr 120 кДа), б — FcγRIII (поліпептид з Mr 87 кДа)

Слід зазначити, що, ймовірно, механізм доставки IgG з базолатерального боку, де pH нейтральна або слаболужна (7,0–7,5), відбувається рецепторно-незалежним способом за допомогою рідинно-фазового ендоцитозу, після чого зв'язується з відповідним FcγR у кислій ендосомі, подібний до відомого шляху, який проходить IgG у мишей, щурів, приматів і людини у жовтковому мішку та плаценті [16].

На початку пізнього плодового періоду відмічається початок перерозподілу полярності експресії FcγRIII, яка позначилась збільшенням її вмісту на АМ. Такий розподіл FcγRIII на протилежних сторонах ентероцитів, ймовірно, пов'язані з процесами трансцитозу IgG у цей період онтогенезу за рахунок розвитку травного каналу, збільшенням навколоплодової рідини та заковтуванням її плодом. Ці фізіологічні закономірності, перш за все, призводять до зміни спрямованості та інтенсивності напрямку трансцитозу IgG (апикально-базолатеральний). Такий напрям трафіку антитіл пояснюється тим, що pH порожнини тонкої кишки є слабокислотним (6,0–6,5), а тільки за таких умов FcγR зв'язуються з IgG на АМ ентероцитів і здійснює їх ефективний однонаправлений транспорт (рис 4 б). Незалежно від механізму інтерналізації ліганду комплекс FcRn-IgG вивільняється за допомогою трансцитоза на базолатеральну поверхню клітини, де нейтральне значення pH сприяє дисоціації IgG від свого рецептора [17].

Інтенсивність експресії FcγRf залишалась без зміни напрямку кінетики та, як і у ранній плодовий період, характеризувалась базолатеральною приналежністю. Така тривала, переважна локалізація FcγRf на БМ, ймовірно, може бути пов'язана з важливою функцією даного рецепторного білку у транспорті IgG у кишкових клітинах плодів великої рогатої худоби. FcγRf можливо генерує сигнал, що індукує ендоцитоз, а також сприяє зміні рідинно-кристалічної властивості клітинної мембрани, везикуляції або зворотній інвагінації окремих ділянок, створюючи ендосоми [18]. Не виключено, що однією з причин домінуючої експресії на базолатеральній поверхні ентероцитів FcγRf є також і їх участь в активному рециклінгу та повторному їх вбудовуванні на БМ [19].

Висновки

Представлені дані свідчать, що Fc γ R ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби експресуються протягом усього пренатального періоду онтогенезу. Для поліпептиду з Mr 87 кДа притаманний інверсний характер модуляції експресії. Максимум вмісту, що спостерігали на базолатеральній поверхні кишкової клітини у ранній плодовий період з часом розвитку плода прогресивно знижувався. У той же час, на апікальній мембрані вміст цього білка зростав у пізній плодовий період. Локалізація поліпептиду з Mr 120 кДа проявляється більш інтенсивною експресією на базолатеральному домені ентероцитів протягом усього фетального періоду. Виявлені особливості розподілу дозволяють передбачити важливу роль різних класів Fc γ R у розвитку трансцитозу IgG і специфічних імунних функцій у плодовий період великої рогатої худоби.

D. M. Masyuk, V. S. Nedzvetskii

DISTRIBUTION OF ENTHEROCYTE FC- γ -RECEPTORS FROM SMALL INTESTINE OF COW FETUS

S u m m a r y

There was shown common similar of Fc- γ -receptors composition that are isolated from both apical and basolateral enterocyte membrane during from 2 to 9 month cows fetal development. The changes of each class of Fc- γ -receptor contents were identified. Inverse modulation of 87 kDa polypeptide was observed on basolateral enterocyte's membrane while fetus period and apical later fetus period. Expression and content of 120 kDa polypeptide was observed more intensive for basolateral membrane of enterocytes all fetus period. Fc- γ -receptor expression regulation of bovine small intestine enterocytes of fetus is associated with development mechanisms.

1. *Mostov K.* Membrane traffic in polarized epithelial cells [Text] / Mostov K., Verges M., Altschuler Y. // *Curr. Opin. Cell Biol.* — 2000. — 12, № 4. — P. 483–490.
2. *Muth T.* Transport protein trafficking in polarized cells [Text] / Muth T., Caplan M. // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* — 2003. — 19. — P. 333–366.
3. *Praetor A.* Beta(2)-microglobulin is important for cell surface expression and pH-dependent IgG binding of human FcRn [Text] / Praetor A., Hunziker W. // *J. Cell Sci.* — 2002. — 115. — P. 2389–2397.
4. *Simister N., Mostov K.* An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens [Text] // *Nature.* — 1989. — 337. P. 184-187.
5. *Nimmerjahn F.* Fc γ receptors: old friends and new family members [Text] / Simister N., Mostov K. // *J. Immunology.* — 2006. — 24, № 1. — P.19–28.
6. *Roopenian D.* [FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age](#) [Text] / Roopenian D., Akilesh S. // *Nature Reviews Immunology.* — 2007. — 7. — P. 715–725.
7. *Schlachetzki F.* Expression of the neonatal Fc receptor (FcRn) at the blood–brain barrier [Text] / Schlachetzki F., Zhu C., Pardridge, W. // *J. Neurochem.* — 2002. — 81. — P. 203–206
8. *Мельничук Д. О.* Роль білкових структур плазматичної мембрани кишкового епітелію у формуванні колострального імунітету новонароджених телят [Текст] / Мельничук Д. О., Усатюк П. В., Цвіліховський М. І. // *Вісник Національного аграрного університету.* — Київ, 1998. — № 6. — С. 13–20.
9. *Масюк Д. М.* Методичні особливості отримання та структурна характеристика ізольованих ентероцитів епітелію тонкого кишечника плодів великої рогатої худоби [Текст] / Масюк Д. М. // *Вісник Національного аграрного університету.* — Київ, 2004. — № 75. — С. 148–152.
10. *Масюк Д. М.* Особливості фракціонування плазматичних мембран ізольованих ентероцитів тонкого кишечника плодів великої рогатої худоби [Текст] / Масюк Д. М. // *Вісник Національного аграрного університету.* — Київ, 2004. — № 78. — С. 125–129.
11. *Масюк Д. М.* Динаміка експресії та поліпептидний склад Fc- γ -рецепторів ентероцитів тонкої кишки плодів бика [Текст] / Масюк Д. М., Недзвецький В. С., Цвіліховський М. І., Неруш П. О. // *Фізіологічний журнал.* — Київ, 2008. — Т. 54, №1. — С. 27–34.

12. *Кокунин В. А.* Статистическая обработка данных при малом числе опытов [Текст] / Кокунин В. А. // Український біохімічний журнал. — 1975. — Т. 47, № 6. — С. 776–790.
13. *Hogarth P.* Fc receptors are major mediators of antibody based inflammation in autoimmunity [Text] / [Hogarth P.](#) // Curr. Opin Immunol. — 2002. — 14, № 6. — P. 798–802.
14. *Shields R.* High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for FcγRI, FcγRII, FcγRIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the FcγR [Text] / Shields R., Namenuk A., Hong K. et al. // J. Biol. Chem. — 2001. — 276. — P. 6591–6604.
15. *Kacskovics I.* Cloning and characterization of the bovine MHC class I-like Fc receptor [Text] / Kacskovics I., Wu Z., Simister N. // The Journal of Immunology. — 2000. — 164. — P. 1889–1897.
16. *Antohe F.* Expression of functionally active FcRn and the differentiated bidirectional transport of IgG in human placental endothelial cells [Text] / Antohe F., Radulescu L., Gafencu, A. // Hum. Immunol. — 2001. — 62. — P. 93–105.
17. *Vaughn D.* Structural basis of pH-dependent antibody binding by the neonatal Fc receptor [Text] / Vaughn D., Bjorkman P. // Structure. — 1998. — 6. — P. 63–73.
18. *Rojas R.* Immunoglobulin transport across polarized epithelial cells [Text] / Rojas R., Apodaca G. // Nature Reviews Molecular Cell Biology. — 2002. — 3, № 12. — P. 944–956.
19. *Ramalingam T.* IgG transcytosis and recycling by FcRn expressed in MDCK cells reveals ligand-induced redistribution [Text] / Ramalingam T., Detmer S., Martin W., Bjorkman P. // J. EMBO. — 2002. — 21, № 4. — P. 590–601.