

## **Fc- $\gamma$ -РЕЦЕПТОРИ АПІКАЛЬНИХ МЕМБРАН ЕНТЕРОЦИТІВ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ У РАННІЙ ПЛОДОВИЙ ПЕРІОД: ПОЛІПЕПТИДНИЙ СКЛАД ТА ЇХ ДИНАМІКА**

*Д. М. Масюк\**

Дніпропетровський державний аграрний університет

*Досліджували особливості поліпептидного складу та динаміку експресії Fc- $\gamma$ -рецепторів плазмолемі ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби 2-, 3-, 4-місячного віку. Результати імуноблотингу показали загальну збіжність складу Fc- $\gamma$ -рецепторів екстрагованих із апікального домену ентероцитів протягом усього раннього плодового періоду великої рогатої худоби. Поліпептидний склад Fc- $\gamma$ -рецепторів у цей період був представлений молекулярними масами 120, 87, 72 і 43 кДа. Найбільш інтенсивно експресованими Fc- $\gamma$ -зв'язуючими поліпептидами є білки з Мм 87 та 43 кДа. Їх частка складала у середньому 77,5 %. Динаміка зміни загальної концентрації Fc- $\gamma$ -рецепторів протягом періоду, який досліджувався, проявлявся збільшенням її майже в 1,3 раза (за рахунок білків з молекулярними масами 87 та 72 кДа).*

Одним із факторів формування захисних механізмів новонародженого організму є передача їм імуноглобулінів матері. У різних тварин це залежить, перш за все, від специфіки плацентарного бар'єру. У гризунів і приматів, у тому числі у людини, пасивний імунітет створюється за рахунок прямого переходу материнських антитіл до плоду [1]. Імуноглобуліни класу G мають високу здатність проходити через плацентарний бар'єр, що зумовлено особливою будовою Fc-фрагмента її молекули. У великої рогатої худоби наявність десмохоріального типу плаценти зумовлює інший, особливий шлях імунізації новонародженого організму, який полягає у передачі їм нативних імуноглобулінів із молозивом матері [2]. Молозиво є єдиним головним джерелом материнських імуноглобулінів, що забезпечують захист новонароджених телят у неонатальний період розвитку. У молозиві корів вміст імуноглобулінів G має перевагу, оскільки вони ефективніше транспортуються у молочні залози та епітелій альвеол, клітини яких мають вищу щільність Fc- $\gamma$ -рецепторів. Fc- $\gamma$ -рецептори є найбільш важливими регуляторами імунної відповіді та транспортерами одночасно, які здатні специфічно розпізнавати Fc-фрагменти імуноглобулінів класу G [3].

Однак закономірності організації білкових структур апікальних мембран епітеліоцитів на ранніх стадіях внутрішньоутробного розвитку є на сьогоднішній день фрагментарними та нечисельними, а дані щодо визначення Fc- $\gamma$ -рецепторних поліпептидів ентероцитів плодів великої рогатої худоби відсутні. Розкриття особливостей поліпептидного складу та динаміки Fc- $\gamma$ -рецепторів у апікальних мембранах ентероцитів порожньої кишки великої рогатої худоби у плідний період відкривають перспективу як для подальшого дослідження формування загальних імунологічних механізмів у пренатальному онтогенезі продуктивних тварин, так і специфіку становлення окремих елементів, що відповідають за формування адаптивної взаємодії з біологічно активними компонентами молозива.

Мета роботи — визначити особливості поліпептидного складу та динаміку експресії Fc- $\gamma$ -рецепторів у апікальних мембранах (AM) ентероцитів порожньої кишки великої рогатої худоби у ранній плодовий періоді онтогенезу.

---

\* Науковий консультант — доктор біол. наук, професор, академік УААН Цвіліховський М. І.

лабораторії фізіології та функціональної морфології продуктивних тварин Дніпропетровського державного аграрного університету. Об'єктом досліджень були 18 плодів віком 2-, 3-, 4-ох місяців з середньою масою 0,25–1,9 кг, після забою в умовах

м'ясопереробного підприємства «Ювілейний» Дніпропетровської області. Вік плодів визначали за масою, вимірюванням довжини тулуба від голови до хвоста та за ступенем розвитку волосяного покриву [4].

Після негайної декапітації плодів (під нембуталовим наркозом), розтинали черевну порожнину, виділяли порожню кишку. Визначали довжину та середину кишки, яку використовували для одержання клітин. За основу отримання ізольованих епітеліоцитів тонкої кишки бика свійського був обраний хімічний (цитрат/ ЕДТО) метод змивання клітин у нашій модифікації [5].

Фракції апікальної мембрани отримували із суспензії ізольованих ентероцитів порожньої кишки методом центрифугування [6]. Ефективність отримання апікальної фракції здійснювали по виходу мембранного матеріалу за кількістю білка за методом Lowri O. у модифікації Miller G.

Електрофорез проводили у пластині ПААГ відповідно до методики, описаною Laemmli U. У гелі для розділення білків формували градієнт акриламід у  $T=7-18\%$ .

Імуноспецифічне виявлення комплексів IgG-Fc- $\gamma$ -рецептор проводили за допомогою імуноблотингу [7].

Після електрофорезу на пластину ПААГ накладали нітроцелюлозні мембрани (діаметр пор 0,27 мкм), фіксували фільтрувальним папером. Перенос білкових зон проводили протягом 60 хв при струмі 150 мА у камері з 12,5 мМ трис-НСІ буфером (рН 8,3), який додатково містив 0,195 М гліцин, 30 % метанол та 2 М сечовину. Після завершення переносу мембрани відмивали забуференим фізіологічним розчином (ЗФР) з 0,05 % Tween-80.

Блокування неспецифічної сорбції на нітроцелюлозі проводили 3%-ним розчином овальбуміну у ЗФР протягом 12–16 год при  $t = 4\text{ }^\circ\text{C}$ .

Після блокування нітроцелюлозні мембрани інкубували 12–16 год за  $4\text{ }^\circ\text{C}$  з розведеною 1:500 фракцією IgG сироватки крові бика, промивали ЗФР із 0,05 %-ним Tween-80 та інкубували 60 хв за  $37\text{ }^\circ\text{C}$  з розведеними 1:1500 вторинними антитілами проти  $\gamma$ -ланцюгів бика міченими пероксидазою хрому.

Для візуалізації поліпептидних зон нітроцелюлозну мембрану обробляли протягом 10–15 хв за кімнатної температури у 50 мМ трис-НСІ буфері (рН 7,4), який містив хромоген-діамінобензидин (0,01 %) і пероксид водню (0,02 %).

Інтенсивність імунозабарвлення поліпептидних зон, з якими зв'язувались IgG, пропорційна кількості Fc- $\gamma$ -рецепторного білка. Для порівняння інтенсивності поліпептидних зон після проведення імуноблотингу і сканування результатів цифрове зображення обробляли за допомогою програми «LabWork 4.0» (UVP, Велика Британія, 2001). Кількісний аналіз Fc- $\gamma$ -рецепторного білка здійснювали шляхом порівняння інтенсивності забарвлення між поліпептидними зонами проб, одержаних від плодів відповідного віку.

Розрахунки проводили за допомогою IBM-сумісного комп'ютера за програмами «Statistica 7.0» та «Excel 2000». Обробку отриманих цифрових даних проводили методами математичної статистики для малих вибірок [8].

**Результати та обговорення.** Результати імуноблотингу показали загальну збіжність складу Fc- $\gamma$ -рецепторів екстрагованих із апікального домену ентероцитів протягом усього раннього плодового періоду великої рогатої худоби. Білки, які зв'язували IgG за умов інкубації нітроцелюлози, на яку переносили екстраговані з мембран фракції розділеними у ПААГ. Антигени, що представляли мембранні білки апікальної фракції з молекулярною масою (Мм) поліпептидних зон 120, 87, 72 і 43 кДа, специфічно зв'язували IgG, оскільки розведення 1:1500 та присутність неіонного детергенту тритон X 100 попереджує неспецифічну сорбцію.

Відповідно сучасних уявлень, на поверхні плазматичних клітин ссавців присутні чотири групи Fc-рецепторів IgG: Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32), Fc $\gamma$ RIII (CD16) та Fc $\gamma$ RIV [9]. Усі вони мають позаклітинні домени, які у значній мірі гомологічні V-областям імуноглобулінів, тобто відносяться до імуноглобулінового суперсімейства молекул. Ці представники гетерогенного сімейства рецепторних молекул здатні зв'язувати імуноглобуліни окремих підкласів [10].

Результати розрахунку окремих поліпептидів Fc- $\gamma$ -рецепторів на АМ епітеліоцитів порожньої кишки 2-х місячних плодів великої рогатої худоби показали, що білок із молекулярною масою (Мм) 87 кДа, який проявляє Fc- $\gamma$ -зв'язуючу активність, переважає за вмістом на даному макродомені клітин. Частка цього поліпептиду складала  $44,9 \pm 0,63$  % (рис. 1). Такий високий вміст Fc- $\gamma$ -рецепторів (Мм 87 кДа) на поверхні плазматичних, ендотеліальних і епітеліальних клітин був виявлений для різних видів ссавців [11] у тому числі, і для ентероцитів тонкої кишки неонатальних телят [12].

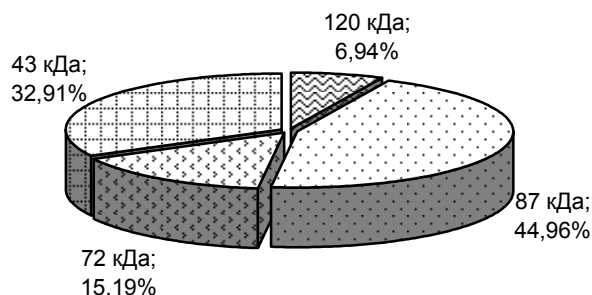


Рис. 1. Вміст поліпептидів із Fc- $\gamma$ -рецептивною активністю на АМ ентероцитів порожньої кишки 2-місячних плодів великої рогатої худоби, % (M $\pm$ m, n=6)

Дещо нижчою за інтенсивністю експресії на апікальному домені кишкового ентероциту у ранній плодовий період виявлена білкова фракція з Мм 43 кДа, вміст якої в 1,34 раза менший (у порівнянні з поліпептидом 87 кДа Fc- $\gamma$ -зв'язуючою активністю) і становить  $32,9 \pm 0,46$  %. Сумарний вміст білків з Мм 87 кДа та 43 кДа становить  $77,8 \pm 1,08$  % від загального вмісту Fc- $\gamma$ -рецепторів на цій ділянці мембрани. Це дає підставу вважати експресію поліпептидів найбільш інтенсивними на АМ у даний період онтогенезу. Співвідношення сумарного вмісту рецепторних білків до Fc- $\gamma$ -рецепторів із Мм 87 і 43 кДа становило 1,73:1,00 і 2,37:1,00, відповідно. Відносний вміст Fc- $\gamma$ -рецепторного білка з Мм 72 кДа становив  $15,19 \pm 0,56$  %, що в середньому нижче в 2,6 раза порівняно з домінуючими поліпептидними фракціями. Співвідношення між рецепторними білками з Мм 87 кДа та 72 кДа становило 2,96:1,00; та білками 43 кДа та 72 кДа відповідно 2,17:1,00.

Найнижча концентрація на АМ поліпептида з Мм 120 кДа, яка виявляє зв'язуючу активність до IgG, зафіксована у даний період утробного розвитку великої рогатої худоби. У порівнянні з Fc- $\gamma$ -рецепторами з Мм 87, 72 і 43 кДа його вміст був нижчий майже в 6,47; 2,19 і 4,89 разів, відповідно, та дорівнював  $6,9 \pm 0,15$  %.

Співвідношення між більш інтенсивно експресованими Fc- $\gamma$ -зв'язуючими поліпептидами та найменш експресованим білком (Мм 120 кДа) становить 11,22 : 1,0, що характеризує домінуючу роль Fc- $\gamma$ -рецепторів з Мм 87 та 43 кДа у структурі імунорецепторних поліпептидів, які експресуються на АМ епітеліальних клітин тонкої кишки 2-х місячних плодів великої рогатої худоби.

Досліджуючи показники окремих білків з Fc- $\gamma$ -рецепторною активністю на апікальному домені кишкових ентероцитів 3-х і 4-х місячних плодів великої рогатої худоби спостерігається залежність, подібна до розподілу поліпептидного спектру епітеліоцитів порожньої кишки у плодів на початку плодового періоду (рис. 2).

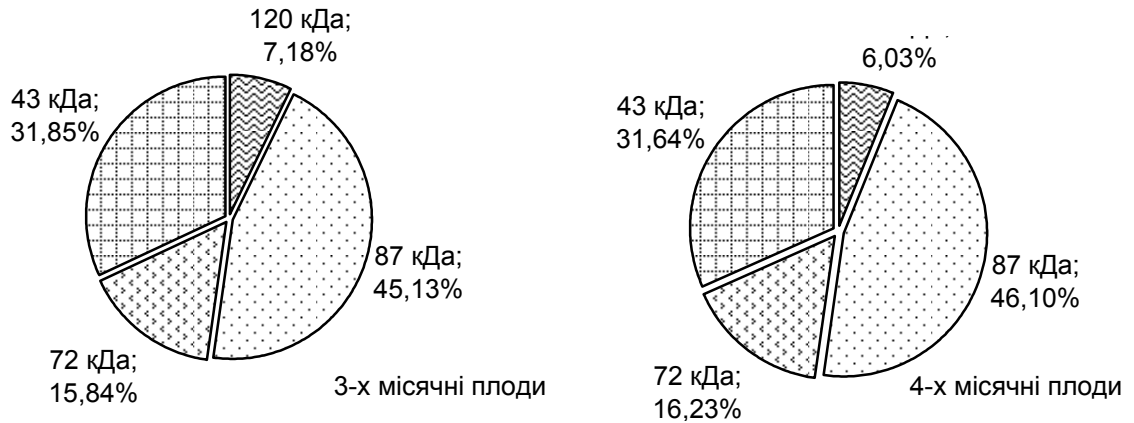


Рис. 2. Вміст поліпептидів із Fc- $\gamma$ -рецептивною активністю на АМ ентероцитів порожньої кишки 3- та 4-місячних плодів великої рогатої худоби, % (M $\pm$ m, n=6)

Білок з Мм 87 кДа проявляє домінуючий вміст Fc- $\gamma$ -зв'язуючої активності на АМ ентероцитів 3- і 4-місячних плодів. Його частка складала  $45,1 \pm 0,77$  % і  $46,1 \pm 0,96$  % відповідно. Нашими дослідженнями встановлено, що наступним за інтенсивністю експресії поліпептидом даного домену, як у 3- так і 4-місячних плодів, є Fc- $\gamma$ -рецептор з Мм 43 кДа. Вміст даного білка у цей період був менший в 1,42 (у 3-місячних плодів) і в 1,46 рази (у 4-місячних плодів) у порівнянні з поліпептидом із Мм 87 кДа та складав  $31,9 \pm 0,46$  % і  $31,6 \pm 0,42$  % відповідно. Загальний вміст поліпептидів із молекулярними масами 87 і 43 кДа на АМ кишкових епітеліоцитів у 3-місячних плодів складав  $77,0 \pm 0,53$  % та у 4-х місячних —  $77,7 \pm 0,69$  % від загального вмісту Fc- $\gamma$ -рецепторних білків. Співвідношення сумарної частки рецепторних білків, що проявляли Fc- $\gamma$ -зв'язуючу активність до поліпептидів з Мм 87 кДа і 43 кДа у плодів 3- і 4-місячного віку була майже однаковою, та становила у середньому 1,70:1,0 і 2,46:1,0 відповідно.

Концентрація Fc- $\gamma$ -рецепторного білка на АМ ентероцитів з Мм 72 кДа дорівнювала у 3-місячних плодів  $15,8 \pm 0,42$  %, а у 4-місячних —  $16,2 \pm 0,35$  %. Ці показники були нижчими на макродомені, які досліджувалися, у порівнянні з превалюючими поліпептидами з молекулярними масами 87 та 43 кДа в середньому майже в 3,0 рази (у 3-місячних плодів) та в 2,0 рази (у 4-місячних плодів), відповідно. Співвідношення між білками з Мм 87 та 72 кДа, які проявляють Fc- $\gamma$ -рецепторну активність у плодів 3-місячного віку становило 2,90:1,00 і у плодів 4-місячного віку — 2,80:1,00, відповідно між білками з Мм 43 та 72 кДа — 2,01:1,00 і 1,95:1,00. Найменший відносний вміст на апікальному домені плазматичної мембрани у 3- та 4-місячних плодів встановлений у рецепторного поліпептида з Мм 120 кДа та складав  $7,18 \pm 0,15$  % і  $6,03 \pm 0,16$  %. У результаті розрахунку концентрації білка з Мм 120 кДа, який проявляв зв'язуючу активність до IgG у порівнянні з поліпептидами з Мм 87, 72 і 43 кДа, було виявлено його зниження в 6,29; 2,21 і 4,44 рази у плодів 3-місячного віку та в 7,65; 2,69 і 5,25 рази — 4-місячного віку, відповідно. Такий невисокий вміст Fc- $\gamma$ -рецептора з Мм 120 кДа позначився на його співвідношення з найбільш домінуючими Fc- $\gamma$ -зв'язуючими поліпептидними фракціями (білки з Мм 87 і 43 кДа). У 3-місячних плодів цей показник дорівнював 10,72:1,0 та у 4-місячних плодів — 12,89:1,0.

Загальна концентрація рецепторів до IgG на апікальному домені ентероцитів у 2-місячних плодів великої рогатої худоби характеризувалась найнижчим показником вмісту у цей період пренатального розвитку і дорівнювала  $0,39 \pm 0,011$  ум. од. (рис. 3). У подальшому відносний вміст Fc- $\gamma$ -рецепторів достовірно ( $p < 0,05$ ) підвищувався у 3-місячних плодів на 10,3 % (у порівнянні з 2-місячними), а у 4-місячних — на 16,3 % (у порівнянні з 3-місячними плодами) та дорівнював  $0,50 \pm 0,03$  ум. од.

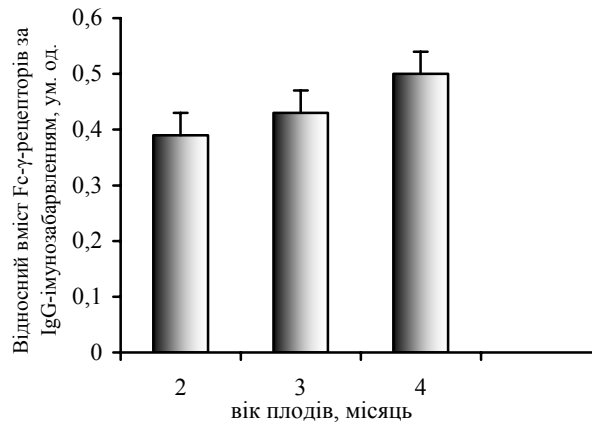


Рис. 3. Відносний вміст Fc-γ-рецепторів за IgG-імунозабарвленням апікальних мембран ентероцитів порожньої кишки 2-, 3-, 4- місячних плодів великої рогатої худоби

Аналіз динаміки змін загальної концентрації Fc-γ-рецепторів на АМ епітеліальних кишкових клітин показав її поступове прогресивне збільшення протягом усього раннього плодового періоду в 1,28 раза. Отримані дані дозволяють передбачити початкові стадії формування рецепції на щітковій облямівці до вмісту порожньої кишки великої рогатої худоби у пренатальному онтогенезі.

## В И С Н О В К И

Ранній плодовий період великої рогатої худоби характеризується загальною збіжністю складу білків, які виявляли зв'язуючу активність до IgG на апікальних мембранах епітеліальних клітин із посмуговою облямівкою порожньої кишки. Поліпептидний склад Fc-γ-рецепторів у цей період представлений молекулярними масами 120, 87, 72 і 43 кДа. Найбільш інтенсивно експресованими Fc-γ-зв'язуючими поліпептидами є білки з Мм 87 та 43 кДа. Їх частка складала у середньому 77,5 %. Динаміка зміни загальної концентрації Fc-γ-рецепторів протягом періоду, який досліджувався, проявлялася збільшенням її майже в 1,3 раза (за рахунок білків з молекулярними масами 87 та 72 кДа), що ймовірно пов'язано з процесами диференціації клітин і відображає певні стадії формування імунітету плода.

### **FC-γ-РЕЦЕПТОРЫ АПИКАЛЬНЫХ МЕМБРАН ЭНТЕРОЦИТОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В РАННИЙ ПЛОДНЫЙ ПЕРИОД: ПОЛИПЕПТИДНЫЙ СОСТАВ И ИХ ДИНАМИКА**

*Д. Н. Масюк*

#### А Н Н О Т А Ц И Я

Исследовали особенности полипептидного состава и динамику экспрессии Fc-γ-рецепторов в плазматической мембране энтероцитов тощей кишки плодов крупного рогатого скота 2-, 3-, 4- месячного возраста. Результаты иммуноблотинга показали общую сходность состава Fc-γ-рецепторов экстрагированных из апикального домена энтероцитов тощей кишки на протяжении всего раннего плодного периода. Полипептидный состав Fc-γ-рецепторов в этот период представлен белками с молекулярными массами 120, 87, 72 и 43 кДа. Наиболее экспрессированными Fc-γ-связывающими полипептидами были белки с Мм 87 и 43 кДа. Их часть составляла в среднем 77,5%. Динамика изменения общей концентрации Fc-γ-рецепторов на протяжении периода, который исследовали, проявлялся ее увеличением почти в 1,3 раза (за счет белков с молекулярными массами 87 и 72 кДа).

### **FC-γ-RECEPTORS OF APICAL BOVINE ENTEROCYTE'S MEMBRANE IN EARLY FETAL PERIOD: POLYPEPTIDE CONTENT AND THEIR DYNAMICS**

S U M M A R Y

The polypeptide composition and expression of Fc- $\gamma$ -receptors of enterocytes from bovine intestine at 2-, 3-, 4-month of fetal developing was investigated. The results of immunoblotting show common similar composition of Fc- $\gamma$ -receptors extracted from apical domen during while early fetal period. Fc- $\gamma$ -receptors polypeptide content in this period is represented molecular weight 120, 87, 72 and 43 kDa. Their part was 77,5% mean. Dynamic's changes of general concentration of Fc- $\gamma$ -receptors during researched period are images by them increasing in 1,3 times (by protein with molecular weight 87 and 72 kDa).

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. Rodewald R., Kraehenbuhl J. Receptor-mediated transport of IgG // J. Cell Biol. — 1984. — 99, № 1. — P. 159–164.
2. Korhonen H., Marnila P., Gill H. Milk immunoglobulins and complement factors // Br. J. Nutr. — 2000. — 84, № 1. — P. 75–80.
3. Hogarth P. M. Fc receptors are major mediators of antibody based inflammation in autoimmunity // Curr. Opin. Immunol. — 2002. — 14, № 6. — P. 798–802.
4. Беременность. Ветеринарное акушерство, гинекология и биотехника размножения / А. П. Студенцов, В. С. Шипилов, О. Н. Преображенский и др. ; Под ред. Никитина В. Я., Миролюбова М. Г. — М. : «Колос», 2000. — С. 139–192.
5. Масюк Д. М. Методичні особливості отримання та структурна характеристика ізольованих ентероцитів епітелію тонкого кишечника плодів великої рогатої худоби // Вісник Національного аграрного університету. — К., 2004. — № 75. — С. 148–152.
6. Масюк Д. М. Особливості фракціонування плазматичних мембран ізольованих ентероцитів тонкого кишечника плодів великої рогатої худоби // Вісник Національного аграрного університету. — К., 2004. — № 78. — С. 125–129.
7. Towbin H. Immunoblotting — an update // Biochem. Soc. Trans. — 1988. — 16, № 2. — P. 131.
8. Кокунин В. А. Статистическая обработка данных при малом числе опытов // Український біохімічний журнал. — 1975. — Т. 47, № 6. — С. 776–790.
9. Nimmerjahn F, Ravetch J. Fc $\gamma$  receptors: old friends and new family members // J. Immunity. — 2006. — 24, № 1. — P. 19–28.
10. Ravetch J., Bolland S. IgG Fc receptors // Annu Rev Immunol. — 2001. — 19. — P. 275–290.
11. Roopenian D., Akilesh S. [FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age](#) // Nature Reviews Immunology. — 2007. — 7. — P. 715–725.
12. Мельничук Д. О., Усатюк П. В., Цвіліховський М. І. Роль білкових структур плазматичної мембрани кишкового епітелію у формуванні колострального імунітету новонароджених телят // Вісник Національного аграрного університету. — К., 1998. — № 6. — С. 13–20.