

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК ЕКСПРЕСІЇ Fc- γ -РЕЦЕПТОРНИХ ПРОТЕЇНІВ З АКТИВНІСТЮ ОКРЕМИХ ЕНЗИМІВ У ПЛАЗМОЛЕМІ ЕНТЕРОЦИТІВ ПОРОЖНЬОЇ КИШКИ ПЛОДІВ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Д. М. МАСЮК, докторант*, кандидат ветеринарних наук, професор кафедри фізіології та біохімії сільськогосподарських тварин, <http://orcid.org/0000-0002-2800-2580>
Дніпровський державний аграрно-економічний університет
E-mail: dimasiuk@gmail.com

Анотація. Знання закономірностей розвитку органів травлення у продуктивних тварин в період пренатального онтогенезу є біологічною передумовою для забезпечення відповідного рівня їх життєздатності за народження. У статті представлено взаємозв'язки експресії Fc- γ -рецепторних протеїнів з активністю окремих ензимів у плазмолемі ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби. Методом імуноблотингу виявлено Fc- γ -рецепторні білки апікальних і базолатеральних мембран ентероцитів порожньої кишки молекулярної маси 120 кДа, 87 кДа, 72 кДа та 43 кДа. У апікальній мембрані ентероцитів активність γ -глутамілтранспептидази, лактази, Na⁺, K⁺-АТФази, Ca²⁺, Mg²⁺-АТФази та Mg-АТФази прямо пов'язана з вмістом Fc- γ -рецепторних протеїнів мембрани ентероцитів з молекулярною масою 43 кДа ($r = 0,77-0,92$; $P \leq 0,05-0,01$), а активність Mg²⁺-АТФази та лактази обернено корелює з вмістом Fc- γ -рецепторних протеїнів апікальної мембрани ентероцитів з молекулярною масою 87 кДа ($r = 0,75-0,76$; $P \leq 0,05$). У базолатеральній мембрані ентероцитів активність лужної фосфатази прямо пов'язана з вмістом Fc- γ -рецепторних протеїнів з молекулярною масою 87 кДа ($r = 0,99$; $P \leq 0,001$) та обернено пов'язана з вмістом протеїнів з молекулярною масою 43 кДа ($r = -0,79$; $P \leq 0,05$). Активність γ -глутамілтранспептидази прямо пов'язана з вмістом Fc- γ -рецепторних протеїнів з молекулярною масою 87 кДа та 72 кДа ($r = 0,73-0,79$; $P \leq 0,05$) та обернено пов'язана з вмістом протеїнів з молекулярною масою 120 кДа ($r = -0,77$; $P \leq 0,05$). Активність лактази прямо пов'язана з вмістом Fc- γ -рецепторних протеїнів з молекулярною масою 72 кДа ($r = 0,82$; $P \leq 0,05$) та обернено пов'язана з вмістом протеїнів з молекулярною масою 120 кДа ($r = -0,80$; $P \leq 0,05$). Отримані результати досліджень мають як фундаментальне, так і прикладне значення. Визначені особливості взаємозв'язків експресії Fc- γ -рецепторних протеїнів з активністю окремих ензимів у апікальних і базолатеральних мембранах ентероцитів відкривають перспективу для подальшого дослідження фізіолого-біохімічних аспектів мембранного травлення у продуктивних тварин у пренатальному та у

* Науковий консультант – доктор ветеринарних наук, професор М. І. Цвіліховський

ранньому постнатальному онтогенезі, як основи для розкриття патогенезу шлунково-кишкових розладів у тварин.

Ключові слова: Fc-γ-рецептори, порожня кишка, плазмолема, ентероцити, АТФ-ази, гідролази

Актуальність

Встановлення фізіолого-біохімічних критеріїв функціонування організму у внутрішньоутробний період неможливе без урахування морфологічних і біохімічних аспектів їх росту та розвитку (Fanos et al., 2017). Тому, дослідження структурної диференціації слизової оболонки порожньої кишки великої рогатої худоби у плодовому періоді онтогенезу дозволить встановити інтенсивність її морфо-функціональних перетворень (Atay, 2016).

Провідну роль у забезпеченні імунного захисту і життєздатності плода відіграють молекулярні механізми, які контролюють розвиток імунокомпетентних клітин, синтез і транспорт імуноглобулінів (Mund, 2018). В даний час одними з найбільш важливих регуляторів і транспортерів одночасно розглядаються рецепторні білки, які здатні специфічно розпізнавати Fc-фрагменти імуноглобулінів класу G (Fc-γ-рецептори) (Eisenreich et al., 2017). Інформація щодо закономірності організації плазматичних мембран ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби в період внутрішньоутробного розвитку є на сьогоднішній день фрагментарними та нечисельними. Розкриття особливостей поліпептидного складу Fc-γ-рецепторів в апікальних і базолатеральних мембранах ентероцитів порожньої кишки у плідний період та його взаємозв'язок із активністю окремих гідролітичних та транспорт-

них ензимів дасть можливість краще зрозуміти закономірності онтогенезу травної системи продуктивних тварин. Крім цього слід відмітити, що загальні закономірності активності аденозинтрифосфатаз та гідролаз-плазматичних мембран вивчені достатньо лише на лабораторних тваринах (Apell, 2018). Відомості про становлення функціональних протеїнів плазматичних мембран у продуктивних тварин є фрагментарними та нечисельними (Böttger et al., 2018; Masiuk, 2019), а дані щодо активності гідролаз та іонних pomp апікальних і базолатеральних мембран ентероцитів великої рогатої худоби у плідний період онтогенезу майже відсутні. Тому дослідження активності мембранозв'язаних ензимів та експресії Fc-γ-рецепторів плазмо леми ентероцитів дозволить сформувати відповідну уяву про специфіку формування пристінкового травлення та всмоктування у новонароджених тварин.

Аналіз останніх досліджень та публікацій

Знання закономірностей розвитку органів травлення у продуктивних тварин в період пренатального онтогенезу є біологічною передумовою для забезпечення відповідного рівня їх життєздатності за народження (Grandl et al., 2018). Не дивлячись на те, що рецептори для імуноглобулінів були вперше ідентифіковані у минулому столітті, їх провідна роль в імунній відповіді стає зрозумілою тільки ос-

таннім часом. Fc- γ -рецептори є ключовими учасниками як аферентної, так і еферентної фази імунної відповіді. Встановлюючи поріг для В-клітинної активації ці білки регулюють розвиток дендритних клітин і закріплюють тонку специфічну відповідь антитіл на природжені ефекторні шляхи такі як, фагоцитоз, антитіло-залежну клітинну цитотоксичність та інші. Присутність Fc- γ -рецепторів у складі рецепторних пар індукує активацію та інгібування метаболізму клітин і дозволяє встановити баланс позитивних і негативних сигналів, які визначають результат імунної відповіді (Schmidt et al., 2005). Fc- γ -рецептори експресуються різними типами клітин як складові критичних елементів модуляції імунної відповіді і об'єднують ланки гуморальних і клітинних реакцій (Sibéril et al., 2006). Fc- γ -рецептори є чутливими сенсорами імунного статусу організму. Велика кількість досліджень на модельних системах підтверджує важливу роль Fc-рецепторів як в активації, так і у супресії імунної відповіді (Nimmerjahn et al., 2007).

Всмоктування і транспорт у тонкій кишці неорганічних іонів, а також утворених у результаті порожнинного та мембранного травлення мономерних форм органічних субстратів здійснюється шляхом їх трансепітеліального переносу через плазматичну мембрану епітеліоцитів за безпосередньою участю відповідних іонних pomp – транспортних аденозинтрифосфатаз (Saakes et al., 2020). Окрім цього, ці ензими забезпечують потреби клітин у підтриманні іонного гомеостазу та скоротливої активності. Різні аденозинтрифосфатази мають відмінні функції та кількісні показники на окремих ділянках плазмалемиентероцитів (Pnizza et al.,

2019). Ці особливості функціонального перерозподілу іонних pomp, перш за все, залежать від віку, фізіологічного стану та характеру травлення тварин.

Важливе значення в процесах мембранного травлення і транспорту поживних речовин в тонкому кишечнику відіграють гідролази, зокрема: γ -глутамілтранспептидаза забезпечує функціонування γ -глутамільного циклу, функція якого полягає в транспорті деяких амінокислот у клітину (Baumrucker et al., 2018); лужна фосфатаза є основним гідролітичним ферментом локалізованим в апікальних мембранах (Whyte, 2020); лактаза – гідролізує дисахарид лактозу, при цьому її максимальна активність проявляється у неонатальний період, що визначається специфікою живлення новонароджених тварин (Szilagyí, 2019). Однак, взаємозв'язки активності окремих гідролітичних і транспортних ферментів з експресією Fc- γ -рецепторних протеїнів у плазмалемиентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби на сьогодні не встановлені.

Мета дослідження – встановити взаємозв'язок експресії Fc- γ -рецепторних протеїнів з активністю окремих ферментів у плазмалемиентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проведені на 80 плодах великої рогатої худоби (Голштинської породи), віком від двох до дев'яти місяців, із середньою масою 0,6–39 кг, отриманих від клінічно здорових корів, під час вимушеного забою. Вік плодів встановлювали

за масою та довжиною тіла, а також розвитком похідних шкіри. Після евтаназії плодів, розтинали черевну порожнину, виділяли порожню кишку. У дослідях використовували ділянку кишки у ранній плодовий період (два, три та чотири місяці) середньою довжиною 0,8 м; у пізній плодовий період (п'ять, шість, сім, вісім та дев'ять місяців) – 1,7 м, яку, вивертали слизовою оболонкою назовні або розрізали уздовж та ділили на невеликі сегменти по 1,5–3 см і ретельно промивали (4–5 разів) холодним (4–6 °С) середовищем такого складу: 120 мМ NaCl та 1 мМ HEPES, за допомогою сухого трісу доводили рН до 7,4. Метод розрізання кишки у плодів від дво- до чотирьохмісячного віку використовували замість вивертання у зв'язку з її малим діаметром.

За основу виділення кишкових клітин кишечнику був хімічний (цитрат/ЄДТО) метод (Tomchuk et al., 1994), на основі якого розроблялась авторська модифікація методу (Masiuk et al., 2017) отримання ізольованих ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби.

Процес виділення ізольованих ентероцитів включав наступні етапи:

1. Промиту та вивернуту ділянку кишки поміщають в підготовче середовище “А” (мМ: 96 NaCl; 27 цитрату натрію; 5,6 KH_2PO_4 ; 1,5 KCl) за 37 °С, рН 7,3 (співвідношення середовища до кишечника відповідно 2 мл – 1 см) на 10 хвилин.
2. Середовище разом із вмістом кишки, слизом та зруйнованими клітинами зливають, а кишку поміщають в розчин “Б” (мМ: 140 NaCl; 16 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$; 1,5 ЕДТО; 0,5 дітіотреїтолу) на 15 хв за постійного струшування на водняній бані за 37 °С, рН 7,0.

3. Після завершення інкубації, клітини осаджують центрифугуванням протягом 3 хв за 500 g (2500–3000 об/хв.) з дворазовою промивкою фізіологічним розчином. Кінцевий осад розбавляють середовищем “Б”.

Якість отриманих епітеліальних клітин оцінювали за морфологічними і функціональними показниками. Для цього застосовували методи:

- 1) гістологічні (залівка у парафін, фарбування гематоксилином і еозином) для контролю процесів виділення клітин із слизової оболонки тонкого кишечника, виявлення наявності агрегатів ентероцитів, характеристики їх структури; 2) фарбування 0,1 % розчином трипанового синього для визначення за допомогою світлової мікроскопії життєздатності ентероцитів (барвник проникав тільки в клітини, що загинули); 3) визначення активності цитозольного ферменту лактатдегідрогенази (КФ 1.1.1.27) в інкубаційному середовищі, як критерію цілісності плазматичної мембрани отриманих ізольованих ентероцитів тонкого кишечника; 4) вимірювання кількості загального білку на одиницю маси нативного кишечника для характеристики повноти виділення ентероцитів.

Виділені клітини розфасовували в поліпропіленові флакони, позначали і зберігали в рідкому азоті протягом 2–6 місяців для подальшого використання.

Для отримання апікальних мембран (АМ) і базолатеральних мембран (БМ) із суспензії ізольованих ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби використовували базову методику диференціального центрифугування (Tsvilikhovskiy, 1989) у нашій модифікації (Masiuk et al., 2017).

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 протягом 90 с у середовищі за наступним складом (мМ): 250 сахарози, 5 ЕДТО, 5 трис-НСІ буфер за 4-6 ° С, рН 7,4. Вимірювали концентрацію білка в ентероцитах у середовищі гомогенізації.
2. Диференційне центрифугування за допомогою рефрижераторної ультрацентрифуги MSE HighSpeed 25 (Велика Британія). З метою очищення гомогенату від супутніх частин клітини та її органел (ядер, мітохондрій), та грубих мембранних фракцій його центрифугували за 10 тис g протягом 15 хв; далі проводили центрифугування супернатанту для виділення АМ за 24 тис g, а для БМ – за 84 тис g протягом 60 хв кожну.
3. Осади очищених фракцій АМ і БМ ресуспендували у фізіологічному розчині (*t* 4-6 ° С, рН 7,4), які одразу 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 у 1000 разів. Критерієм якості гомогенізації були: наявність незруйнованих клітин (недостатня гомогенізація) чи відсутність вираженого осаду за центрифугування (10 тис g) гомогенату (надмірна гомогенізація).

Ефективність отримання фракцій плазмолемі здійснювали за виходом мембранного матеріалу щодо кількості білка. Оцінка ступеня очистки та забруднення мембранних препаратів здійснювали за активністю їх маркерних ферментів: АМ — лужної фосфатази і БМ — Na⁺,K⁺-АТРази.

Кількість загального білка у мембранних препаратах визначали методом Лоурі.

В апікальних і базолатеральних мембранах визначали активність лужної фосфатази (КФ 3.1.3.1.) за методом Гарена-Левенталя, γ-глутаміл-транспептидази (КФ 2.3.2.2.), лактази (КФ 3.2.1.23.), Na⁺, K⁺-АТФази (КФ 3.6.3.9), Ca²⁺, Mg²⁺-АТФази (КФ 3.6.1.3) та Mg²⁺-АТФази (КФ 3.6.3.2) згідно рекомендацій А. П Болдирева.

Дослідження вмісту і складу структурних білків плазмолеміентероцитів проводили за допомогою електрофорезу у поліакриламідному гелі товщиною 1 мм (Laemmli, 1970). У гелі для розділення білків формували градієнт акриламідну T = 7–18 %. Склад розділюючого гелю: T = 7–18 % і C = 0,8–2,5 %; 0,375 Мтрис-НСІ буфер (рН 8,8); 0,1 % ДСН; 0,025 % тетраетилендіаміну (ТЕМЕД); 0,025 % персульфату амонію (ПСА). У 18 % гель додавали гліцерин до кінцевої концентрації 5 % для запобігання нерівномірного набрякання гелю за забарвлення і знебарвлення та надання йому еластичності.

Склад концентруючого гелю: T = 4,5 %, C = 6 %; 125мМ трис-НСІ буфер (рН 6,8); 0,1 % ДСН; 0,025 % ТЕМЕД; 0,025 % ПСА.

Білкові проби вносили у буфері (рН 6,8), що мав такий склад: 1 Мтрис-НСІ, 5 % ДСН; 2 % дитіотриетолу; 1 % 2-меркаптоетанолу; 30 % гліцерину; 0,001 % бромфенолового синього. Загальна концентрація білка не перевищувала 100 мкг на один зразок.

В якості електродного буферу використовували розчин, який містив 25 мМтрис-НСІ (рН 8,3); 0,192 М гліцину; 0,1 % ДСН.

Розділення проводили за фіксованого струму і часу. Для забарвлення поліпептидних зон гель фіксували

протягом 12–16 год за кімнатної температури у розчині 12,5 %-ої трихлороцтової кислоти (ТХО). Електрофорезграми забарвлювали у 0,1 %-ому розчині кумасі G-250, розчиненого у 50 %-му етанолі та 15 %-вій оцтової кислоті 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 дистильованій воді для того, щоб вилучити надлишок ДСН.

Імуноспецифічне виявлення комплексів IgG – Fc-γ-рецептор (FcγR) проводили за допомогою імуноблотинга.

Після блокування нітроцелюлозної мембрани інкубували 12–16 год за 4 °С з розведеною 1:500 фракцією IgG сироватки крові бика, промивали ЗФР із 0,05 %-вим Tween-80 та інкубували 60 хв за 37 °С з розведеними 1:1500 вторинними антитілами проти γ-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 пероксиду водню (0,02 %).

Визначення відносного вмісту FcγR визначали через відносну густину і площу поліпептидних зон після проведення імуноблотингу. Скановані результати обробляли за допомогою програми “LabWork4.0”.

Експериментальні дослідження проведені із дотримання вимог Закону України № 3447 – IV від 21.02.06 р. «Про захист тварин від жорстокого поводження» та узгоджуються з основними принципами «Європейської конвенції з 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. Коефіцієнт кореляції (r) розраховувалися методом Пірсона за допомогою прикладного програмного комплексу «Microsoft Office Excel 2016».

Результати дослідження та їх обговорення

Структура слизової оболонки порожньої кишки плодів великої рогатої худоби та динаміка клітинного оновлення пов'язані з функціональним станом органів травлення у пренатальному періоді онтогенезу динамічно змінюються. Методом імуноблотингу виявлено Fc-γ-рецепторні протеїни апікальних і базолатеральних мембран ентероцитів порожньої кишки молекулярної маси 120 кДа, 87 кДа, 72 кДа та 43 кДа. Загальна концентрація рецепторів до IgG на апікальній мембрані до семимісячного віку плодів достовірно збільшується ($P < 0,001$), однак, надалі до дев'яти місяців стрімко знижується (майже у 3 рази; $P < 0,001$). На базолатеральній мембрані найвищий вміст Fc-γ-рецепторів виявляється у 5 місячних плодів і до семи- та дев'ятимісячного віку знижується відповідно в 1,7 та 2,8 рази ($P < 0,001$). Експресія поліпептидів, які проявляють Fc-γ-зв'язуючу активність, характеризується їх переважанням на базолатеральній мембрані до середини фетального періоду. У подальшому Fc-γ-рецепторні протеїни з молекулярною масою 87 і 72 кДа

змінюють домінуючу локалізацію на апікальний полюс. Експресія поліпептиду з молекулярною масою 43 кДа має зворотну залежність та характеризується апікальною приналежністю у ранній плодовий період. Запропонована гіпотеза, що у плодовий період великої рогатої худоби цей тип FcγR відіграє важливу роль (є тригером) у транспортуванні IgG із амніотичної рідини у фетальну циркуляцію.

Як показано у табл. 1, активність гідролітичних і транспортних ензимів у різних доменах мембрани еритроцитів взаємопов'язана з кишки з вмістом Fc-γ-рецепторних протеїнів мембрани еритроцитів. Так, активність γ-глутамілтранспептидази, лактази, Na⁺, K⁺-АТФази, Ca²⁺, Mg²⁺-АТФази та Mg-АТФази у апікальній мембрані еритроцитів прямо пов'язана з вмістом Fc-γ-рецепторних протеїнів мембрани еритроцитів з молекулярною масою 43 кДа ($r = 0,77-0,92$; $P \leq 0,05-0,01$). Слід відмітити, що від 59 % до 84 % ($P \leq 0,05-0,01$) варіацій активності цих ензимів на апікальному домені плазмолемі еритроцитів взаємозалежно з вмістом цього протеїну на апікальній мембрані еритроцитів плодів великої рогатої худоби. Крім цього, активність Mg²⁺-АТФази та лактази обернено корелює з вмістом Fc-γ-рецепторних протеїнів апікальної мембрани еритроцитів з молекулярною масою 87 кДа ($r = 0,75-0,76$; $P \leq 0,05$).

Отже 56–58 % ($P \leq 0,05$) варіацій активності активність Mg²⁺-АТФази на апікальному домені плазмолемі еритроцитів взаємозалежно з вмістом Fc-γ-рецепторних протеїнів апікальної мембрани еритроцитів плодів.

Особливості динаміки активності транспортних АТФаз плазматичної мембрани еритроцитів тонкої кишки

великої рогатої худоби на початку плідного періоду визначається стійкою тенденцією до її зниження на обох макродоменах плазмалеми в усіх дослідних ензимах на тлі більш високого їх вмісту у базолатеральних ділянках оболонки клітин. Динаміка активності гідролітичних ензимів плазмалеми еритроцитів порожньої кишки великої рогатої худоби у ранньому плідному періоді онтогенезу характеризується перерозподілом їх полярної активності, що можливо пов'язано з генетично обумовленими процесами морфо-функціональної трансформації та диференціації мембран за впливу специфічних метаболітів як індукторів.

Аналізуючи дані активності ензимів на різних полюсах плазмалеми еритроцитів, встановлено, що активність транспортних АТФаз плазматичної мембрани еритроцитів порожньої кишки великої рогатої худоби у ранньому плідному періоді онтогенезу поступово знижується на обох морфо-функціональних ділянках плазмалеми за більш високої активності цих ензимів на базолатеральній мембрані. Найбільш варіабельною активністю характеризується активність Na⁺, K⁺-АТФази на базолатеральному домені. Її відносна активність знижується до п'ятимісячного віку на 22 % у порівнянні з двомісячними плодами. Однак, в подальшому вона збільшується до семимісячного віку в 7 разів. Динаміка активності γ-глутамілтранспептидази, лужної фосфатази та лактази плазмолемі еритроцитів порожньої кишки великої рогатої худоби у ранньому плідному періоді онтогенезу характеризується перерозподілом їх полярної активності, що, можливо, пов'язано з генетично обумовленими процесами морфо-функці-

ональної трансформації та диференціації мембран за впливу специфічних метаболітів як індукторів. У пізньому плодовому періоді активність цих ензимів зменшується динамічніше, ніж у плодів на ранніх стадіях розвитку. Це характерно для активності γ-глутамилтранспептидази на базолатеральній та лактази і лужної фосфатази на апікальній мембранах.

Активність гідролітичних і транспортних ензимів у базолатеральній мембрані ентероцитів мала відмінні взаємозв'язки з вмістом Fc-γ-рецепторних протеїнів у порівнянні із апікальною мембраною. Так, активність лужної фосфатази прямо пов'язана з вмістом Fc-γ-рецепторних протеїнів з молекулярною масою 87 кДа ($r = 0,99; P \leq 0,001$) та обернено пов'язана із вмістом протеїнів з молекулярною масою 43 кДа ($r = -0,79; P \leq 0,05$).

Активність γ-глутамилтранспептидази прямо пов'язана з вмістом Fc-γ-рецепторних протеїнів з молекулярною масою 87 кДа і 72 кДа ($r = 0,73-0,79; P \leq 0,05$) та обернено пов'язана вмістом протеїнів з молекулярною масою 120 кДа ($r = -0,77; P \leq 0,05$). Тоді, як активність лактази прямо пов'язана з вмістом Fc-γ-рецепторних протеїнів з молекулярною масою 72 кДа ($r = 0,82; P \leq 0,05$) та обернено пов'язана вмістом протеїнів з молекулярною масою 87 кДа і 72 кДа ($r = 0,73-0,79; P \leq 0,05$) та обернено пов'язана вмістом протеїнів з молекулярною масою 120 кДа ($r = -0,77; P \leq 0,05$).

Тоді, як активність лактази прямо пов'язана з вмістом Fc-γ-рецепторних протеїнів з молекулярною масою 72 кДа ($r = 0,82; P \leq 0,05$) та обернено пов'язана вмістом протеїнів з молекулярною масою 87 кДа і 72 кДа ($r = 0,73-0,79; P \leq 0,05$) та обернено пов'язана вмістом протеїнів з молекулярною масою 120 кДа ($r = -0,77; P \leq 0,05$).

1. Взаємозв'язок(r) експресії Fc-γ-рецепторних протеїнів з активністю окремих ензимів у плазмолемі ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби (r; n = 5)

Ензими	Молекулярна маса Fc-γ-рецепторних протеїнів							
	120 кДа		87 кДа		72 кДа		43 кДа	
	r	D	r	D	r	D	r	D
Апікальна мембрана								
ЛФ, кмоль / мг / год	-0,20	0,04	-0,48	0,23	-0,33	0,11	0,69	0,48
ГТП, кмоль / мг / год	-0,28	0,08	-0,56	0,32	-0,27	0,07	0,77*	0,59*
Лактаза, кмоль / мг / год	-0,66	0,44	-0,76*	0,58*	0,30	0,09	0,78*	0,61*
Na ⁺ , K ⁺ -АТФаза, кмоль / мг / год	-0,35	0,12	-0,64	0,41	-0,23	0,05	0,83*	0,70*
Ca ²⁺ , Mg ²⁺ -АТФаза, кмоль / мг / год	-0,44	0,19	-0,72	0,52	-0,14	0,02	0,90**	0,81**
Mg ²⁺ -АТФаза, кмоль / мг / год	-0,47	0,22	-0,75*	0,56*	-0,11	0,01	0,92**	0,84**
Базолатеральна мембрана								
ЛФ, кмоль / мг / год	-0,41	0,17	0,99***	0,97***	0,37	0,14	-0,79*	0,63*
ГТП, кмоль / мг / год	-0,77*	0,60*	0,79*	0,62*	0,73*	0,54*	-0,36	0,13
Лактаза, кмоль / мг / год	-0,80*	0,64*	-0,22	0,05	0,82*	0,68*	0,68	0,47
Na ⁺ , K ⁺ -АТФаза, кмоль / мг / год	0,56	0,31	-0,64	0,41	-0,54	0,29	0,35	0,12
Ca ²⁺ , Mg ²⁺ -АТФаза, кмоль / мг / год	0,66	0,44	-0,28	0,08	-0,65	0,42	-0,1	0,01
Mg ²⁺ -АТФаза, кмоль / мг / год	0,71	0,5	-0,63	0,39	-0,69	0,47	0,24	0,06

Примітка. * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$

кулярною масою 120 кДа ($r = -0,80$; $P \leq 0,05$). Натомість активність трансспортних ензимів на базолатеральній мембрані ентероцитів порожньої кишки плодів достовірно не взаємопов'язана з вмістом Fc- γ -рецепторних протеїнів мембрани ентероцитів.

Виявлена нами динаміка змін вмісту окремих поліпептидних зон з молекулярною масою 120 кДа, 87 кДа, 72 кДа і 43 кДа в цілому співпадала з динамікою для загального вмісту Fc- γ -рецепторних білків, що може бути слідством спорідненості генів, які кодують дані поліпептиди, та загальними фізико-хімічними властивостями білків цього сімейства.

Висновки і перспективи

Встановлено, що у плодовий період онтогенезу великої рогатої худоби у апікальній мембрані ентероцитів активність γ -глутамілтранспептидази, лактази, Na⁺, K⁺-АТФази, Ca₂⁺, Mg₂⁺-АТФази та Mg-АТФази прямо пов'язана з вмістом Fc- γ -рецепторних протеїнів мембрани ентероцитів з молекулярною масою 43 кДа ($r = 0,77-0,92$; $P \leq 0,05-0,01$), а активність Mg₂⁺-АТФази та лактази обернено корелює з вмістом Fc- γ -рецепторних протеїнів апікальної мембрани ентероцитів з молекулярною масою 87 кДа ($r = 0,75-0,76$; $P \leq 0,05$). У базолатеральній мембрані ентероцитів активність лужної фосфатази прямо пов'язана з вмістом Fc- γ -рецепторних протеїнів з молекулярною масою 87 кДа ($r = 0,99$; $P \leq 0,001$) та обернено пов'язана вмістом протеїнів з молекулярною масою 43 кДа ($r = -0,79$; $P \leq 0,05$). Активність γ -глутамілтранспептидази прямо пов'язана з вмістом Fc- γ -рецепторних протеїнів з молекулярною масою 87 кДа та 72 кДа

($r = 0,73-0,79$; $P \leq 0,05$) та обернено пов'язана вмістом протеїнів з молекулярною масою 120 кДа ($r = -0,77$; $P \leq 0,05$). Активність лактази прямо пов'язана з вмістом Fc- γ -рецепторних протеїнів з молекулярною масою 72 кДа ($r = 0,82$; $P \leq 0,05$) та обернено пов'язана вмістом протеїнів з молекулярною масою 120 кДа ($r = -0,80$; $P \leq 0,05$).

Визначені особливості кореляційних зв'язків експресії Fc- γ -рецепторних протеїнів з активністю окремих ензимів вапікальних і базолатеральних мембранах ентероцитів порожньої кишки плодів великої рогатої худоби відкривають перспективу для подальшого дослідження фізіолого-біохімічних аспектів мембранного травлення у продуктивних тварин у пренатальному та у ранньому постнатальному онтогенезі як основи для розкриття патогенезу шлунково-кишкових розладів у тварин.

References

- Apell, H. J. (2018). Finding Na, K-ATPase: I-From Cell to Molecule. *Substantia*, 2(1): 17–28. DOI: <https://doi.org/10.13128/Substantia-38>
- Atay, O. (2016). Neonatology and gastrointestinal issues. *International Journal of Child Health and Human Development*, 9(1):121.
- Baumrucker, C. R., Guerino, F., & Huntington, G. B. (2018). Transport of nitrogenous compounds by the ruminant gastrointestinal tract. In *Absorption and utilization of amino acids* CRC Press., 159–174.
- Böttger, A., Vothknecht, U., Bolle, C., & Wolf, A. (2018). *Lessons on Caffeine, Cannabis & Co.* Springer, 43–56.
- Eisenreich, W., Rudel, T., Heesemann, J., & Goebel, W. (2017). To eat and to be eaten: mutual metabolic adaptations of immune cells and intracellular bacterial pathogens upon infection. *Frontiers in cellular and*

- infection microbiology, 7:316.<https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00316>
- Fanos, V., Saugstad, O. D., Dimitriou, G., Burlea, M., Hasanoglu, E., & Vendemmia, S. (2017). Selected Lectures of the 13th International Workshop on Neonatology. *Journal of Pediatric and Neonatal Individualized Medicine*, 6(2). e060235. doi: 10.7363/060235
- Grandl, F., Schwarm, A., Ortmann, S., Furger, M., Kreuzer, M., & Clauss, M. (2018). Kinetics of solutes and particles of different size in the digestive tract of cattle of 0.5–10 years of age, and relationships with methane production. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 102(3):639–651.<https://doi.org/10.1111/jpn.12862>
- Masiuk, D. M. (2019). Structural proteins of plasmolemma of the jejunum absorbing enterocytes of cattle fetus in early fetal period. *Ukrainian Journal of Veterinary and Agricultural Sciences*, 2(3):32–38 doi: [10.32718/10.32718/ujvas2-3.08](https://doi.org/10.32718/10.32718/ujvas2-3.08)
- Masiuk, D. M., Tsvilikhovsky, M. I. (2017). Method for fractionation of plasma membranes of isolated erythrocytes. Patent of Ukraine for useful model. № 118133. G01N1/28; declared 02.02.2017; published 25.07.2017, № 14.
- Masiuk, D. M., Tsvilikhovsky, M. I. (2017). Method of producing isolated erythrocytes of cattle. Patent of Ukraine for useful model. № 118136. G01N1/28, C12N5/07; declared 02.02.2017; published 25.07.2017, № 14.
- Mund, M. E. (2018). The Influence of Cell Mediated Immune Response of Brahman Cows on Calving Interval, Post Partum Interval, Colostral Immunoglobulin Concentration, Serum Immunoglobulin Concentration, and Growth of their Calves (Doctoral dissertation). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00316>
- Nimmerjahn, F., Anthony, R. M., Ravetch, J. V. (2007). Agalactosylated IgG antibodies depend on cellular Fc receptors for in vivo activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(20):8433–8437.<https://doi.org/10.1073/pnas.0702936104>
- Panizza, E., Zhang, L., Fontana, J. M., Hamada, K., Svensson, D., Akkuratov, E. E., Aperia, A. (2019). Ouabain-regulated phosphoproteome reveals molecular mechanisms for Na⁺, K⁺-ATPase control of cell adhesion, proliferation, and survival. *The FASEB Journal*, 33(9):10193–10206.<https://doi.org/10.1096/fj.201900445R>
- Saakes, M., Hamelers, H. V. M., Van Egmond, W. J. (2020). U.S. Patent No. 10,541,439. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Schmidt, R. E., & Gessner, J. E. (2005). Fc receptors and their interaction with complement in autoimmunity. *Immunology letters*, 100(1):56–67.<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2005.06.022>
- Sibénil, S., Dutertre, C. A., Boix, C., Bonnin, E., Ménez, R., Stura, E., Teillaud, J. L. (2006). Molecular aspects of human FcγR interactions with IgG: functional and therapeutic consequences. *Immunology letters*, 106(2):111–118.<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2006.05.009>
- Szilágyi, A. (2019). Digestion, absorption, metabolism, and physiological effects of lactose. In *Lactose*. Academic Press., 49–111. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811720-0.00002-7>
- Tomchuk, V. A., Usatiuk, P. V., Tsvilikhovsky, M. I., Melnychuk, D. O. (1994). Otrymannia izolovanykh khlytin epiteliu tonkoho kyshchynky velykoi rohatoi khudoby. *Fiziologichnyi zhurnal*. 40(5/6):45–51.
- Tsvilikhovsky, N. I. (1989). Vydelenie apikal'noj i bazolateral'noj membran enterocita tonkoj kishki krupnogo rogatogo skota i strukturno-funkcional'nye izmeneniya v nih pri patologii. *Fiziol. zhurn.* 35(5): 121.
- Whyte, M. P. (2020). Hypophosphatasia: nature's window on alkaline phosphatase function in humans. In *Principles of bone biology* Academic Press, 1569–1599. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814841-9.00066-X>

Masiuk D. M. (2020). INTERCONNECTION BETWEEN EXPRESSION OF Fc- γ -RECEPTOR PROTEINS WITH THE ACTIVITY OF INDIVIDUAL ENZYMES IN THE PLASMALEMMA ENTEROCYTES OF THE JEJUNUM INTESTINE OF THE BOVINE FETUS. *Ukrainian Journal of Veterinary Sciences*, 11(1): 70–80, <https://doi.org/10.31548/ujvs2020.01.008>

Abstract. Knowledge of the patterns of development of digestive organs in productive animals during prenatal ontogeny is a biological prerequisite to ensure an adequate level of their vitality at birth. The article deals with the interconnection of expression of Fc- γ receptor proteins with the activity of individual enzymes in plasmalemma of jejunum enterocytes of cattle fetus. Immunoblotting revealed Fc- γ receptor proteins of the apical and basolateral membranes of the jejunum enterocytes with a molecular weight of 120 kDa, 87 kDa, 72 kDa, and 43 kDa. In the apical membrane of enterocytes, the activity of γ -glutamyltransferase, lactase, Na⁺, K⁺-ATPase, Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase and Mg-ATPase is directly related to the content of Fc- γ -receptor proteins of the enterocyte membrane with a molecular weight of 43 kDa ($r = 0,77-0,92$; $P \leq 0,05-0,01$), and the activity of Mg²⁺-ATPase and lactase inversely correlates with the content of Fc- γ -receptor proteins of the apical membrane of enterocytes with a molecular weight of 87 kDa ($r = 0,75-0,76$; $P \leq 0,05$). In the basolateral membrane of enterocytes, alkaline phosphatase activity is directly related to the content of Fc- γ -receptor proteins with a molecular weight of 87 kDa ($r = 0,99$; $P \leq 0,001$) and inversely related to the content of proteins with a molecular weight of 43 kDa ($r = -0,79$; $P \leq 0,05$). The activity of γ -glutamyltransferase is directly related to the content of Fc- γ -receptor proteins with a molecular weight of 87 kDa and 72 kDa ($r = 0,73-0,79$; $P \leq 0,05$) and inversely related to the protein content of the molecular weight 120 kDa ($r = -0,77$; $P \leq 0,05$). Lactase activity is directly related to the content of Fc- γ -receptor proteins with a molecular weight of 72 kDa ($r = 0,82$; $P \leq 0,05$) and inversely related to the content of proteins with a molecular weight of 120 kDa ($r = -0,80$; $P \leq 0,05$). The results of the research have both fundamental and applied value. The peculiarities of interconnection expression of Fc- γ receptor proteins with the activity of individual enzymes in the apical and basolateral membranes of enterocytes open the perspective for further research of the physiological and biochemical aspects of membrane digestion in productive animals in prenatal and early postnatal in early postnatal ontogeny as a basis for the disclosure of pathogenesis of gastrointestinal disorders in animals

Keywords: Fc- γ -receptors, jejunum intestine, plasmalemma, enterocytes, ATP-ase, hydrolases

Подано до друку 2 лютого 2020 року