

Методики

УДК 612.33+591.132.5.577.352.619:616.33

М.І.Цвіліховський

Отримання фракцій плазматичної мембрани з ентероцитів тонкої кишки тварин різного віку

Описаны методические условия получения апикальных и базолатеральных мембран из суспензии изолированных энтероцитов кишечника крупного рогатого скота, которые по ряду критериев (выход мембранного белка, степень чистоты, загрязнение, везикулированность и ориентация везикул) более эффективны по сравнению с использованием соскоба слизистой оболочки. Установлено, что апикальные и базолатеральные мембраны энтероцитов новорожденных животных по количеству белка, загрязнению; очистке, везикулированности и ориентации везикул имеют особенности по сравнению со взрослыми животными. По ряду биохимических показателей фракции апикальных и базолатеральных мембран энтероцитов тонкого кишечника взрослых и новорожденных животных могут быть рекомендованы для исследования различных биохимических процессов, в том числе нормы и патологии пищеварительного канала.

Вступ

Використання двох морфологічних і функціональних ділянок плазматичної мембрани ентероцитів — апікальної (АМ) і базолатеральної (БМ) — дозволяє проводити дослідження мембранного травлення, транспорту речовин, норми та патології травного каналу. Відомі нині методичні процедури базуються на використанні зіскрібку слизової оболонки тонкої кишки як вихідного матеріалу [3]. Однак можливість забруднення плазматичними мембранами клітин із інших тканин вимагає використання суспензії ентероцитів, отриманої в попередніх дослідженнях. Відомо, що біохімічний склад АМ і БМ ентероцитів новонароджених тварин істотно відрізняється від дорослих [2, 10], що також вимагає окремих методичних підходів. Тому метою нашої роботи було відпрацювання методик отримання АМ і БМ тонкого кишечника: з ізольованих ентероцитів порівняно зі зіскрібком слизової оболонки, новонароджених тварин порівняно з дорослими.

Методика

У дослідженнях використовували ділянки порожньої кишки дорослих (3—4 роки) та новонароджених (щойно народжені та 3-добові) тварин великої рогатої худоби за умов, як описано раніше [5]. Ізольовані епітеліальні клітини отримували хімічним цитрат/ЕДТА методом [1].

Розуміння біохімічних механізмів розладів травлення у новонароджених потребує використання високоочищених мембранних препаратів ентероцитів. Їх чистоту оцінювали за активністю маркерних ферментів: лужна фосфатаза (АМ) [9] і Na^+ , K^+ -АТФаза (БМ) [4]. Орієнтацію везикул визначали із застосуванням каналоформера аламетицину [4], кількість білка — за методом Лоурі і співавт. [8]. Результати оброблено статистично.

Результати та їх обговорення

Критеріями оцінки методу отримання фракцій плазматичної мембрани із суспензії ентероцитів тонкого кишечника є вихід мембранного матеріалу за кількістю білка, оцінка АМ і БМ за активністю маркерних ферментів, везикульованість мембран та орієнтація везикул. Кількість білка, як показник, об'єднує ефективність таких етапів, як гомогенізація, центрифугування та кінцева очистка препаратів.

Дослідженнями було встановлено, що вихід матеріалу з ізольованих епітеліальних клітин значно перевищує такий при використанні зіскрібку слизової оболонки. Так, відсотковий вихід АМ становив $5,7 \pm 0,36$ проти $0,56 \pm 0,04$, а БМ— $0,42 \pm 0,04$ проти $0,26 \pm 0,04$, що вище в 10 та 1,6 разів, відповідно. Це свідчить про перевагу використання ізольованих ентероцитів. Описана нами процедура мала деякі особливості для новонароджених. Для АМ вихід матеріалу був у 2,3—2,7, а для БМ—у 1,3—1,45 рази нижчий у новонароджених порівняно з дорослими тваринами.

Істотна ефективність використання суспензії ентероцитів витікає з даних активності маркерних ферментів АМ і БМ—лужної фосфатази і Na^+ , K^+ -АТФази відповідно (табл. 1).

Ступінь очистки в градієнті густини сахарози мембранних фракцій, отриманих із суспензії ентероцитів, сягає 12,2 — для АМ, та 19,8 — для БМ, що вірогідно перевищує значення аналогічного показника при використанні зіскрібку слизової оболонки тонкого кишечника.

У дослідженнях різних авторів виникає проблема ефективного розділення АМ від БМ, оскільки вони є структурними елементами плазматичної мембрани. Забруднення АМ базолатеральними мембранами може сягати 0,5—5,3, а БМ апікальними — 0,1—6,0 [3]. Як видно з представлених результатів взаємна забрудненість мембран одна одною знаходиться в цих межах і не змінюється як з використанням суспензії епітеліальних клітин, так і зіскрібку слизової оболонки (див. табл. 1.).

Ступінь очистки фракцій плазматичної мембрани ентероцитів тонкого кишечника новонароджених має особливості порівняно з дорослими тваринами (табл. 2). Так, рівень чистоти АМ ентероцитів новонароджених за активністю маркерного фермента — лужної фосфатази, значно нижчий від аналогічного для АМ у дорослих тварин. У той же час, взаємне забруднення АМ ентероцитів новонароджених базолатеральними мембранами в 2,5 разів менше порівняно з дорослими тваринами. Рівень очистки та забруднення для БМ ентероцитів новонароджених і дорослих тварин майже не відрізняється (див. табл. 2.).

Т а б л и ц я 1. Порівняльна характеристика апікальних (лужна фосфатаза) і базолатеральних (Na^+ , K^+ -АТФаза) мембран (мкмоль Рн/мг білка·год⁻¹), одержаних з ізольованих епітеліальних клітин і зіскрібку слизової оболонки тонкого кишечника дорослої великої рогатої худоби ($M \pm m$, $n=5$)

Фракція	Лужна фосфатаза	Na^+ , K^+ -АТФаза
Ізольовані епітеліальні клітини		
Гомогенат	$19,2 \pm 1,8$	$1,50 \pm 0,2$
Апікальні мембрани	$234,0 \pm 19,2$ (12,2)*	$1,44 \pm 0,4$ (0,97)**
Базолатеральні мембрани	$93,0 \pm 2,8$ (4,8)**	$29,8 \pm 2,4$ (19,8)*
Зіскріб слизової оболонки		
Гомогенат	$15,8 \pm 1,2$	$3,9 \pm 0,7$
Апікальні мембрани	$133,0 \pm 13,2$ (8,5)*	$4,1 \pm 0,5$ (1,06)**
Базолатеральні мембрани	$50,4 \pm 14,4$ (3,2)**	$34,4 \pm 8,6$ (9,1)*

Примітка: Тут і в табл. 2 * ступінь очистки, ** ступінь забруднення фракцій апікальних і базолатеральних мембран відносно до гомогенату.

Т а б л и ц я 2. Характеристика апікальних (лужна фосфатаза) і базолатеральних (Na^+ , K^+ -АТФаза) мембран (мкмоль Рн/мг білка·год⁻¹), одержаних з ізольованих епітеліальних клітин тонкого кишечника дорослої великої рогатої худоби і новонароджених телят ($M \pm m$, $n=5$)

Фракція	Лужна фосфатаза			Na^+ , K^+ -АТФаза		
	Дорослі тварини	Новонароджені 3-добового віку	Шойно народжені	Дорослі тварини	Новонароджені 3-добового віку	Шойно народжені
Гомогенат	$19,2 \pm 1,8$	$67,8 \pm 6,0$	$85,8 \pm 4,2$	$1,50 \pm 0,2$	$1,50 \pm 0,2$	$9,0 \pm 0,8$
Апікальні мембрани	$234,0 \pm 19,2$ (12,2)*	$491,0 \pm 27,6$ (7,24)*	$535,2 \pm 25,0$ (6,24)*	$1,44 \pm 0,4$ (0,97)**	$1,26 \pm 0,18$ (0,84)**	$7,2 \pm 0,8$ (0,80)**
Базолатеральні мембрани	$93,0 \pm 2,8$ (4,8)**	$128,0 \pm 9,6$ (1,9)**	$166,0 \pm 9,0$ (1,94)**	$29,8 \pm 2,4$ (19,8)*	$25,7 \pm 2,4$ (17,1)*	$236,0 \pm 19,2$ (26,2)*

Незалежно від способу гомогенізації та методу фракціонування АМ і БМ, має місце різна ступінь і характер замкнутості везикул — незамкнені, правильно замкнені (цитоплазматичною стороною всередину) і неправильно (цитоплазматичною стороною назовні). Використання таких мембранних препаратів може бути обмеженим [6, 7, 11], особливо при застосуванні їх для транспортних досліджень. За даними літератури АМ мають переважно незамкнену структуру [6], тоді як для БМ — типовий високий відсоток замкнутих везикул [11].

Т а б л и ц я 3. Орієнтація везикул апікальних і базолатеральних мембран із епітеліальних клітин тонкого кишечника дорослої великої рогатої худоби та новонароджених телят (М±m, n=5)

Фракція	Дорослі тварини	Новонароджені 3-добового віку телята	Щойно народжені телята
Апікальні мембрани			
неправильно орієнтовані везикули	10,7 ± 2,8	4,9 ± 1,61	8,8 ± 2,0
правильно орієнтовані везикули	18,2 ± 2,42	28,1 ± 3,08	16,5 ± 3,2
незамкнені у везикули мембрани	71,1 ± 5,3	67,0 ± 5,9	74,7 ± 6,1
Базолатеральні мембрани			
неправильно орієнтовані везикули	27,1 ± 3,18	10,8 ± 2,51	47,2 ± 3,00
правильно орієнтовані везикули	16,0 ± 3,47	22,2 ± 2,74	23,4 ± 4,26
незамкнені у везикули мембрани	56,9 ± 5,6	67,0 ± 4,58	29,4 ± 2,08

Аналогічна тенденція спостерігається в інших дослідженнях (табл. 3). Для дорослих і новонароджених тварин відсоток незамкнених везикул сягає 57—75 %. Особливістю орієнтації везикул плазматичної мембрани новонароджених є низький відсоток незамкнених у везикули БМ та високий відсоток везикульованості, що можна пояснити властивістю їх ліпідного складу [2, 10].

Таким чином, у результаті проведених досліджень розроблено методичні умови отримання препаратів АМ і БМ із суспензії ентероцитів тонкого кишечника, які за рядом показників більш ефективні, ніж отримані із зіскрібку слизової оболонки. Встановлено, що АМ і БМ новонароджених тварин за кількістю матеріалу, забрудненням, очисткою, везикульованістю та орієнтацією везикул мають особливості порівняно з дорослими тваринами. Фракції АМ і БМ ентероцитів тонкого кишечника дорослих і новонароджених тварин можуть бути рекомендовані для дослідження різних біохімічних процесів, в тому числі норми та патології травного каналу.

N.I.Tsvilikhovskii

THE OBTAINING OF VESICULIZED FRACTIONS OF PLASMA MEMBRANE FROM SMALL INTESTINE ENTEROCYTES OF ANIMALS OF DIFFERENT AGE

The described methodical conditions of obtaining apical and basolateral membranes from the suspension of isolated small intestine epithelial cells of cattle, that are more effective, in comparison with mucous membrane scrapings by certain criteria (material output, purity level, presence of pollution, vesiculosity and orientation of vesicles). It is determined, that apical and basolateral membranes of newborn animals have their specific features as to the amount of protein, pollution, purification in comparison with the mature animals. For several biochemical features the fractions of apical and basolateral membranes of enterocytes of the small intestine

in mature and newborn animals might be recommended for the investigations of different biochemical processes, including the norm and pathology of the digestive tract.

National Agrarian University,
Cabinet of Ministers of Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Томчук В. А., Усатюк П. В., Цвилюховський М. І., Мельничук Д. О. Отримання ізольованих клітин епітелію тонкого кишечника великої рогатої худоби // Фізіол. журн. — 1994. — 40, №5-6. — С. 45 — 51.
2. Усатюк П.В., Волков Г.Л., Цвилюховський Н.И., Мельничук Д.А. Липидный состав плазматических мембран энтероцитов тощей кишки крупного рогатого скота различного возраста // Укр. биохим. журн.-1990. — 62, №3. — С. 87 — 94.
3. Усатюк П.В., Мельничук Д.О. Отримання апікальних та базолатеральних мембран епітелію тонкого кишечника. Методичні аспекти // Там же. — 1995. — 67, №5. — С. 16 — 34.
4. Усатюк П. В., Цвилюховський Н.И., Мельничук Д.А. Аденозинтрифосфатазы плазматической мембраны клеток кишечного эпителия крупного рогатого скота // Биохимия. — 1990. — 55, №4 — С.712 — 717.
5. Цвилюховський Н.И., Усатюк П.В., Мельничук Д.А. Выделение, очистка и характеристика щеточной каймы и базолатеральных мембран из клеток кишечного эпителия крупного рогатого скота // Укр. биохим. журн. — 1988. — 60, №6. — С. 91 — 94.
6. Castillo J. R-del, Robinson J. W. L. A simple and rapid method for the preparation of brush border and basolateral membranes in kidney and intestine // J. Physiol. — 1981. — 318. — P. 62 — 63.
7. Gains N., Hauser H. Leakiness of brush border vesicles // Biochim. Biophys. Acta. — 1984. — 772, N 2. — P. 161 — 166.
8. Lowry O.H., Rosebrough N. F., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — 193, N 1. — P. 265 — 275.
9. Murer H., Ammann E., Biber J., Hopfer U. The surface membrane of the small intestinal epithelial cell. 1. Localization of adenyl cyclase // Biochim. et Biophys. Acta. — 1976. — 433, N4. — P. 509 — 519.
10. Schwarz S.M., Hostetler B., Ling S., et al. Intestinal membrane lipid composition and fluidity during development in the rat // Amer. J. Physiol. — 1985. — 248, N 2. — P. 200 — 207.
11. Shirazy-Beechey S.P., Maarten de Jong D., Kemp R.B., et al. Preparation and characterisation of basolateral membrane vesicles from rabbit duodenal enterocytes: mechanism of glucose and phosphate transport across the basolateral membrane // Biochem. Soc. Trans. — 1987. — 15, N 3. — С. 539 — 540.

Нац. аграр. ун-т Кабінету міністрів України

Матеріал надійшов
до редакції 5.12.96