



МІНІСТЕРСТВО  
ЕКОНОМІЧНОГО  
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 118133

(13) U

(51) МПК

G01N 1/28 (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2017 00936**

(22) Дата подання заявки: **02.02.2017**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **25.07.2017**

(46) Публікація відомостей  
про видачу патенту: **25.07.2017, Бюл.№ 14**

(72) Винахідник(и):

**Масюк Дмитро Миколайович (UA),  
Цвіліховський Микола Іванович (UA)**

(73) Власник(и):

**ДНІПРОПЕТРОВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ  
АГРАРНО-ЕКОНОМІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ,  
вул. ім. Ворошилова, 25, м.  
Дніпропетровськ, 49600 (UA)**

## (54) СПОСІБ ФРАКЦІОНУВАННЯ ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН ІЗОЛЬОВАНИХ ЕНТЕРОЦИТІВ

### (57) Реферат:

Спосіб фракціонування плазматичних мембран ізольованих ентероцитів включає гомогенізацію суспензії клітин у ножовому гомогенізаторі при швидкості обертання ножа 9,5 тис. об./хв. протягом 90 с у середовищі з наступним складом (мМ): 250 сахарози, 5 ЕДТО, 5 тріс-НСІ буфер при 4-6 °С, рН 7,4. Диференційне центрифугування за допомогою рефрижераторної ультрацентрифуги при 10 тис. g протягом 15 хв. та додаткове центрифугування супернатанту для відділення апікальних (АМ) і базолатеральних (БМ) мембран від супутніх клітинних органел та грубих мембранних фракцій. Ресуспендування високоочищених фракцій АМ і БМ в 0,5 мл фізіологічного розчину (t 4-6 °С, рН 7,4). Додаткове центрифугування супернатанту для виділення плазматичних мембран проводять протягом 60 хв. при 24 тис. g для АМ та 84 тис. g для БМ.

UA 118133 U



Корисна модель належить до ветеринарної медицини, зокрема біотехнології, а саме до способів одержання фракцій плазматичних мембран ізольованих ентероцитів плодів великої рогатої худоби, і може бути використана для проведення фундаментальних та експериментальних досліджень на субклітинному рівні та виготовлення біопрепаратів.

5 Травна система у плодів великої рогатої худоби має свої біологічні особливості, оскільки в новонароджених телят не функціонують передшлунки. Окрім того, в перші години життя з молозивом в кров через систему травлення телят надходять імунні білки у нативному стані. Безсумнівно, що всмоктування імунних глобулінів відбувається при цьому певними молекулярними структурами плазмалемі ентероцитів.

10 Дослідження мембран, як правило, пов'язують з їх фракціонуванням та очисткою, при цьому для кожного типу мембран характерні свої умови препаративного виділення. Наприклад, патент RU 2436093 описує спосіб отримання еритроцитарних мембран із збереженням їх морфофункціонального стану за умов тривалого зберігання.

15 Недоліками відомого способу є те, що він розроблений спеціально для отримання мембран еритроцитів, тобто високоспеціалізованих клітин, які в процесі диференціації втратили ряд органел та ядра. Окрім того, еритроцити характеризуються фактично однорідними у структурно-функціональному плані мембранами, на відміну від клітин епітелію.

20 У той же час, для епітеліальних клітин особливе значення має ступінь чистоти виділення окремих ділянок мембран. Зокрема, в ентероцитів тонкого відділу кишечника структурне розмежування мембрани на апікальну та базолатеральну ділянки визначається різницею в їх біохімічній організації, біологічних властивостях і функціях.

Слід зазначити, що у більшості випадків загальні методичні підходи до фракціонування мембран достатньо добре відпрацьовані та стандартизовані, але поряд з цим є велика кількість особливостей, що залежать від типу клітин, віку та виду тварин.

25 Найближчим аналогом до способу, що заявляється, є спосіб виділення апікальної та базолатеральної мембран ентероцита тонкої кишки великої рогатої худоби [Цвилюховський Н.И. Выделение апикальной и базолатеральной мембран энтероцита тонкой кишки крупного рогатого скота и структурно-функциональные изменения в них при патологии // Физиол. журн. - 1989. - Т. 35, № 5. - С. 121].

30 Відомий спосіб включає гомогенізацію суспензії клітин у ножовому гомогенізаторі при швидкості обертання ножа 9,5 тис. об./хв. протягом 90 с у середовищі за наступним складом (мМ): 250 сахарози, 5 ЕДТО, 5 тріс-НСІ буфер при 4-6 °С, рН 7,4, за концентрації білка ентероцитів у середовищі гомогенізації 1,65 мг/мл. Диференційне центрифугування за допомогою рефрижераторної ультрацентрифуги при 10 тис. g протягом 15 хв. З метою виділення АМ і БМ від супутніх клітинних органел (ядер, мітохондрій), та грубих мембранних фракцій; додатково центрифугування супернатанту для виділення АМ при 15 тис. g, а для БМ при 70 тис. g протягом 60 хв. кожну. Осади високоочищених фракцій АМ і БМ ресуспендують в 0,5 мл фізіологічного розчину (t 4-6 °С, рН 7,4).

40 Заявлений спосіб і прототип мають спільні ознаки, а саме: включає гомогенізацію суспензії клітин у ножовому гомогенізаторі при швидкості обертання ножа 9,5 тис. об./хв. протягом 90 с у середовищі з наступним складом (мМ): 250 сахарози, 5 ЕДТО, 5 тріс-НСІ буфер при 4-6 °С, рН 7,4; диференційне центрифугування за допомогою рефрижераторної ультрацентрифуги при 10 тис. g протягом 15 хв. та додаткове центрифугування супернатанту для відділення апікальних (АМ) і базолатеральних (БМ) мембран від супутніх клітинних органел та грубих мембранних фракцій; ресуспендування високоочищених фракцій АМ і БМ в 0,5 мл фізіологічного розчину (t 4-6 °С, рН 7,4).

Недоліками прототипу є його низька ефективність та те, що він не враховує специфіки виділення апікальних та базолатеральних мембран ентероцитів плодів великої рогатої худоби.

50 Заявлений нами спосіб усуває недоліки прототипу і забезпечує отримання апікальних та базолатеральних мембран ентероцитів плодів великої рогатої худоби високого ступеня очистки.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити новий, більш ефективний спосіб фракціонування плазматичних мембран ізольованих ентероцитів.

Заявлений спосіб виконують наступним чином:

55 для отримання ізольованих ентероцитів використовують середню частину порожньої кишки плодів, при цьому виділення клітин здійснюється хімічним (цитрат/ЕДТО) методом [Томчук В.А., Усатюк П.В., Цвілюховський М.І., Мельничук Д.О. Отримання ізольованих клітин епітелію тонкого кишечника великої рогатої худоби // Физиологический журнал. -1994. - Т. 40. - № 5/6. -С.45-51];

60 Поставлена задача вирішується тим, що проводять гомогенізацію суспензії клітин у ножовому гомогенізаторі при швидкості обертання ножа 9,5 тис. об./хв. протягом 90 с у середовищі за наступним складом (мМ): 250 сахарози, 5 ЕДТО, 5 тріс-НСІ буфер при 4-6 °С, рН

7,4; диференційне центрифугування за допомогою рефрижераторної ультрацентрифуги при 10 тис. g протягом 15 хв.; додаткове центрифугування супернатанту для виділення АМ при 24 тис. g, та БМ при 84 тис.g протягом 60 хв. кожно; осади високочищених фракцій АМ і БМ ресуспендують в 0,5 мл фізіологічного розчину ( $t$  4-6 °С, рН 7,4), згідно з корисною моделлю, додаткове центрифугування супернатанту для виділення плазматичних мембран проводять протягом 60 хв. при 24 тис.g для АМ та 84 тис.g для БМ.

Унікальна диференціація плазмолемі ентероциту на апікальну (АМ) та базолатеральну (БМ) мембрани забезпечує злагоджене здійснення гідролітичних, транспортних і секреторних функцій ентероцитів та контролю кишкового метаболізму, який, в свою чергу, можливий при реалізації явищ мембранної рецепції. Вирішальна роль у виконанні кожної окремої функції плазматичної мембрани ентероцитів належить білкам. Причому, різна структура та функціональні особливості АМ і БМ передбачають відмінності у білковому складі.

Ефективність отримання фракцій АМ і БМ здійснюють по виходу мембранного матеріалу за кількістю білка, а оцінка ступеня очистки та забруднення мембранних препаратів визначають за активністю їх маркерних ферментів (білків): АМ - лужної фосфатази і БМ -  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази.

Зміна швидкості обертання центрифуги для отримання АМ та БМ ентероцитів плодів великої рогатої худоби у відповідності до запропонованого способу у порівнянні із базовою методикою (прототипом) супроводжується підвищенням в осаді активності лужної фосфатази у 1,5-2,5 рази та  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази у 5-13 разів, при цьому ступінь очистки мембран у 2-4 та 4-8 разів вища.

Таким чином, технічний результат способу зумовлений збільшенням відносного центрифужного поля, у порівнянні із прототипом, для седиментації мембранних фракцій, що значно підвищує ступінь очистки апікальних та базолатеральних мембран.

При проведенні патентно-інформаційного пошуку авторами і заявником знайдено технічне рішення [Цвилюховский Н.И. Выделение апикальной и базолатеральной мембран энтероцита тонкой кишки крупного рогатого скота и структурно-функциональные изменения в них при патологии //Физиол. журн.-1989. - Т. 35, № 5. - С. 121] що містить найбільшу кількість суттєвих ознак, спільних із заявленим і включає гомогенізацію суспензії клітин у ножовому гомогенізаторі при швидкості обертання ножа 9,5 тис. об/хв. протягом 90 с у середовищі з наступним складом (мМ): 250 сахарози, 5 ЕДТО, 5 тріс-НСІ буфер при 4-6 °С, рН 7,4; диференційне центрифугування за допомогою рефрижераторної ультрацентрифуги при 10 тис.g протягом 15 хв. та додаткове центрифугування супернатанту для відділення апікальних (АМ) і базолатеральних (БМ) мембран від супутніх клітинних органел та грубих мембранних фракцій; ресуспендування високоочищених фракцій АМ і БМ в 0,5 мл фізіологічного розчину ( $t$  4-6 °С, рН 7,4).

Однак, наявність зазначених, спільних з прототипом ознак недостатня для отримання технічного результату, який забезпечує заявлений спосіб. Технічних рішень, які за сукупністю ознак повністю співпадають із заявленим способом, заявником не виявлено.

Це дозволяє зробити висновок про відповідність заявленого технічного рішення критерію корисної моделі - "новизна".

У патентній і науково-технічній інформації не знайдено технічних рішень, в яких були б описані відомості про ознаки, що відрізняють заявлений від прототипу і забезпечують досягнення технічного результату тим, що додаткове центрифугування супернатанту для виділення плазматичних мембран проводять протягом 60 хв. при 24 тис.g для АМ та 84 тис.g для БМ.

Корисна модель належить до ветеринарної медицини, зокрема біотехнології, а саме до способів одержання фракцій плазматичних мембран ізольованих ентероцитів плодів великої рогатої худоби і може бути використана для проведення фундаментальних та експериментальних досліджень на субклітинному рівні, та виготовлення біопрепаратів, а тому відповідає критерію винаходу (корисної моделі) - "промислова придатність".

Ефективність заявленого способу та його переваги перед прототипом підтверджені прикладом конкретного використання.

Дослідження ефективності фракціонування плазматичних мембран ізольованих ентероцитів плодів великої рогатої худоби запропонованим способом проведені на базі проблемної лабораторії фізіології та функціональної морфології продуктивних тварин Дніпропетровського державного аграрного університету.

Матеріал для досліджень відібрано від 5 плодів віком 240-250 діб, з середньою масою 39 кг, після забою клінічно здорових корів голштинської породи на Дніпропетровському м'ясокомбінаті "Ювілейний". Для отримання ізольованих ентероцитів використовували середню частину порожньої кишки плодів. Виділення клітин здійснювали хімічним (цитрат/ЕДТО) методом

[Томчук В.А., Усатюк П.В., Цвіліховський М.І., Мельничук Д.О. Отримання ізолюваних клітин епітелію тонкого кишечника великої рогатої худоби // Фізіологічний журнал.-1994. - Т. 40. - № 5/6. - С.45-51].

При створенні модифікації схеми отримання фракцій апікальної і базолатеральної мембран ентероцитів плодів великої рогатої худоби за основу брали схему, розроблену М.І.Цвіліховським (прототип) для ентероцитів дорослої великої рогатої худоби, що включає гомогенізацію біоматеріалу, відділення АМ і БМ від гомогенату та розділення цих мембран одна від одної методом центрифугування. Вдосконалення базової методики проводили у напрямку оптимізації ступеня гомогенізації клітин і збільшення кількісних показників окремих фракцій мембранного матеріалу.

Ступінь гомогенізації контролювали за допомогою мікроскопа Olimpus CH-20 у мазках забарвлених за Романовським-Гімза, при збільшенні у 1000 разів. Критерієм якості гомогенізації були: наявність незруйнованих клітин (недостатня гомогенізація) чи відсутність вираженого осаду при низькошвидкісному (10 ТНС.г) центрифугуванні гомогенату (надмірна гомогенізація).

Ефективність отримання фракцій АМ і БМ здійснювали по виходу мембранного матеріалу за кількістю білка за методом Лоурі (1951). Оцінка ступеня очистки та забруднення мембранних препаратів здійснювали за активністю їх маркерних ферментів: АМ - лужної фосфатази за методом Кінгса-Армстронга (1954) і БМ -  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази згідно рекомендацій А.А. Болдирєва (1977).

Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням програми Excel-97 (Г.Ф. Лакін, 1990).

Базова схема ( $M_{\text{баз}}$ ) отримання апікальних і базолатеральних мембран ізолюваних ентероцитів (прототип) включала: гомогенізацію суспензії клітин у ножовому гомогенізаторі MPW-302 при швидкості обертання ножа 9,5 тис. об/хв. протягом 90 с у середовищі за наступним складом (мМ): 250 сахарози, 5 ЕДТО, 5 тріс-НСІ буфер при 4-6 °С, рН 7,4. Концентрація білка ентероцитів у середовищі гомогенізації складала 1,65 мг/мл; диференційне центрифугування за допомогою рефрижераторної ультрацентрифуги MSE High Speed 25 при 10 тис.г протягом 15 хв. З метою виділення АМ і БМ від супутніх клітинних органел (ядер, мітохондрій), та грубих мембранних фракцій; додатково центрифугування супернатанту для виділення АМ при 15 тис.г, а для БМ при 70 тис.г протягом 60 хв. кожну. Осади високочищених фракцій АМ і БМ ресуспендували в 0,5 мл фізіологічного розчину ( $t$  4-6 °С, рН 7,4).

Оцінку якості центрифугування проводили за активністю маркерних ферментів плазматичної мембрани ентероцитів та ступенем очистки мембранних фракцій відносно гомогенату. В результаті було встановлено, що активність лужної фосфатази та  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази у апікальних і базолатеральних мембранах була  $91,03 \pm 7,89$  і  $174,24 \pm 21,89$  мкмоль/мг/год. та  $6,58 \pm 0,29$  і  $7,80 \pm 0,24$  мкмоль/мг/год. відповідно (таблиця). Але, слід зазначити, що ступінь очистки мембранних фракцій відносно гомогенату була дуже низькою за лужною фосфатазою для АМ-  $1,73 \pm 0,32$ , а для БМ -  $3,32 \pm 0,72$  разу (Фіг. 1). Очистка мембран за  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРазою не відбувалася, так як їх ступінь для АМ і БМ складала відповідно  $0,46 \pm 0,04$  і  $0,55 \pm 0,06$  разів (Фіг 2).

Таблиця

Активність лужної фосфатази та  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази апікальних і базолатеральних мембран, одержаних із ізолюваних ентероцитів тонкого кишечника плодів великої рогатої худоби,  $M \pm m$ ,  $n=5$

| Фракція                 | Лужна фосфатаза, мкмоль/мг/год. |                        |                      | $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -АТРаза, мкмоль/мг/год. |                       |                       |
|-------------------------|---------------------------------|------------------------|----------------------|--|-----------------------|-----------------------|
|                         | $M_{\text{баз}}$                | $M1_{\text{мод}}$      | $M2_{\text{мод}}$    | $M_{\text{баз}}$                                     | $M1_{\text{мод}}$     | $M2_{\text{мод}}$     |
| Гомогенат               | $53,92 \pm 5,85$                | $36,6 \pm 4,19^*$      | $52,22 \pm 5,49$     | $14,5 \pm 1,68$                                      | $23,56 \pm 3,41^*$    | $14,14 \pm 1,15$      |
| Апікальні мембрани      | $91,03 \pm 7,89$                | $136,58 \pm 16,9^*$    | $96,26 \pm 9,72$     | $6,58 \pm 0,29$                                      | $37,91 \pm 3,77^{**}$ | $15,82 \pm 1,06^{**}$ |
| Базолатеральні мембрани | $174,24 \pm 21,89$              | $451,24 \pm 32,7^{**}$ | $328,88 \pm 23,87^*$ | $7,8 \pm 0,24$                                       | $98,72 \pm 7,34^{**}$ | $42,74 \pm 3,51^{**}$ |

\*- $p < 0,05$ ; \*\*- $p < 0,01$

Отже, отримані результати свідчать, що при дотриманні значень центрифужного поля за базовою методикою виділення апікальних і базолатеральних мембран ентероцитів тонкого кишечника плодів великої рогатої худоби (прототип) є незначним при незадовільному ступені очистки, що відбувається в результаті перехресного забруднення фракцій. Тому, нами було

запропоновано дві модифіковані схеми виділення препаратів мембран, суть яких полягає в збільшенні показників центрифужного поля. В першій схемі ( $M1_{\text{мод}}$ ) по АМ до 24 тис.г і по БМ до 84 тис.г (запропонований спосіб), в другій ( $M2_{\text{мод}}$ ) до 28 тис.г і 87,3 тис.г відповідно.

В результаті проведених досліджень встановлено, що активність маркерних ферментів мембран у модифікованих схемах була значно вища ніж у базовій.

Так, активність лужної фосфатази у першій схемі модифікації (запропонований спосіб) у порівнянні з базовою методикою (прототипом) у АМ була достовірно вищою в 1,5, а у БМ в 2,6 разу. При цьому ступінь очистки був вище як по АМ, так і по БМ в 2,2 ( $p < 0,05$ ) і 3,8 ( $p < 0,001$ ) разу і склав  $3,78 \pm 0,66$  і  $12,51 \pm 1,66$ , відповідно (Фіг. 1).

У другій модифікованій схемі активність даного маркерного ферменту у порівнянні з  $M_{\text{баз}}$  у АМ була вища на 5,17 мкмоль/мг/год., але при статистичній обробці виявилась недостовірною. Активність лужної фосфатази у БМ була вищою в 1,9 ( $p < 0,05$ ) разу і склала  $328,88 \pm 23,87$  мкмоль/мг/год., але ступінь очистки даної мембранної фракції мав лише тенденцію до збільшення.

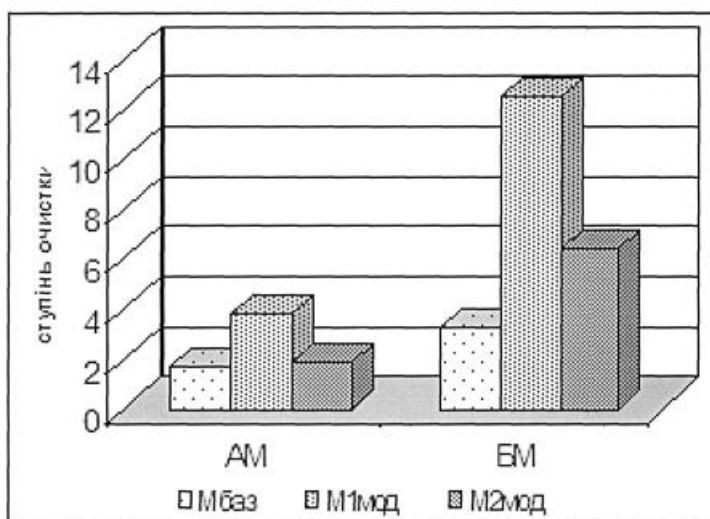
Аналізуючи показники активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази, слід зазначити, що її активність була значно вища у схемі  $M1_{\text{мод}}$  (запропонований спосіб), ніж у базовій схемі (прототип) - в 5,5 і 12,7 ( $p < 0,001$ ) разу у АМ і БМ відповідно. Ці дані достовірно підтверджуються і ступенем очистки, який склав у АМ  $1,63 \pm 0,14$  і у БМ  $4,30 \pm 0,67$ , що більше ніж і  $M_{\text{баз}}$  в 3,5 і 7,8 разу (Фіг. 2).

При порівнянні активності маркерного ферменту у другій модифікаційній схемі з базовою слід відмітити, що активність та ступінь очистки у АМ і БМ були достовірно вищими в 2,3 і 5,5 та 2,5 і 5,4 разу, але вони були нижчими, ніж у першій модифікаційній схемі майже на 40 %.

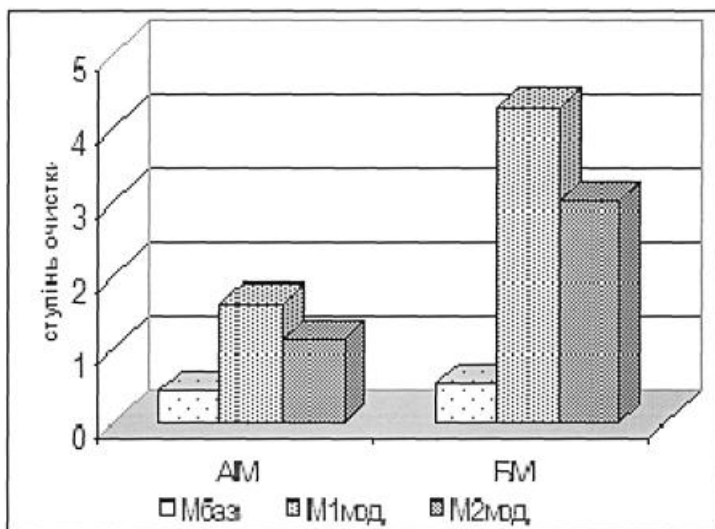
Таким чином, збільшення відносного центрифужного поля для седиментації мембранних фракцій значно підвищує ступінь їх очистки. При цьому, оптимальними показниками центрифужного поля для виділення апікальних та базолатеральних мембран для ентероцитів плодів великої рогатої худоби є 24 та 84 ТНС.г, при ступені очистки цих мембран у порівнянні з гомогенатом для лужної фосфатази -  $3,78 \pm 0,66$  (АМ) і  $12,51 \pm 1,66$  (БМ), а для  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТРази  $1,63 \pm 0,14$  (АМ) і  $4,30 \pm 0,67$  (БМ).

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб фракціонування плазматичних мембран ізольованих ентероцитів, що включає гомогенізацію суспензії клітин у ножовому гомогенізаторі при швидкості обертання ножа 9,5 тис. об./хв. протягом 90 с у середовищі з наступним складом (мМ): 250 сахарози, 5 ЕДТО, 5 тріс-НСІ буфер при 4-6 °С, рН 7,4; диференційне центрифугування за допомогою рефрижераторної ультрацентрифуги при 10 тис. г протягом 15 хв. та додаткове центрифугування супернатанту для відділення апікальних (АМ) і базолатеральних (БМ) мембран від супутніх клітинних органел та грубих мембранних фракцій; ресуспендування високоочищених фракцій АМ і БМ в 0,5 мл фізіологічного розчину (t 4-6 °С, рН 7,4), який **відрізняється** тим, що додаткове центрифугування супернатанту для виділення плазматичних мембран проводять протягом 60 хв. при 24 тис. г для АМ та 84 тис. г для БМ.



Фіг. 1



Фиг. 2

---

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

---

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

---

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601