

**КАБІНЕТ МІНІСТРІВ УКРАЇНИ**

**НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**На правах рукопису**

**ТЕРЕЩЕНКО Марина Петрівна**

**ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ БІЛКОВОГО СКЛАДУ  
ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ ЕПТЕЛІЮ ТОНКОГО  
КИШЕЧНИКА  
ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ**

**03.00.04 - біохімія**

**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

**дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук**

**Київ - 1997 р.**

542.1



00760690 (S)

Дисертація

Робота виконана на кафедрі біохімії  
Національного аграрного університету.

**Наукові керівники:** доктор біологічних наук, член - кор. НАН України,  
академік УААН, професор МЕЛЬНИЧУК Д.О.,  
доктор біологічних наук, професор УСАТЮК П.В.

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор  
ВОЙЦЬКИЙ В.М.  
доктор біологічних наук ТУГАЙ В.М.

**Провідна організація:** Білоцерківський державний аграрний  
університет

Захист дисертації відбудеться 14 січня 1997 року о 14 год.  
на засіданні спеціалізованої вченої ради К 01.05.08 в Національному  
аграрному університеті при факультеті ветеринарної медицини за  
адресою: 252041, Київ - 41, вул. Потехіна, 16, уч.корпус 12, ауд.404.

Просимо взяти участь в обговоренні дисертації при її захисті або  
надіслати Ваш відгук на автореферат за адресою: 252041, Київ - 41,  
вул. Героїв Оборони, 15, НАУ, сектор захисту дисертацій.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного аграрного  
університету.

Автореферат розісланий 14 грудня 1996 р.

**Вчений секретар**

спеціалізованої вченої ради  
кандидат біологічних наук,  
доцент

ЦВІЛХОВСЬКИЙ М.І.

40-36.432 1

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Вивчення процесів травлення, всмоктування та секреції, що відбуваються на рівні плазматичної мембрани епітелію тонкого кишечника (ентероцита) залишається актуальним для сучасної біохімії та фізіології. В останні роки плазматична мембрана ентоцитів була предметом численних досліджень (Уголев, 1985; Ganduly, 1987; Handen, 1990; Мельничук, Усатюк, Цвіліховський, 1988-1995 та інші).

Структурне розмежування плазматичної мембрани епітелію тонкого кишечника на апікальну та базолатеральну ділянки визначається їх різною функціональною роллю в епітелії. За даними літератури (Fujita, 1973; Морозов, 1988; Цвіліховський, 1988; Naase, 1990) це проявляється різноманітними біохімічними відмінностями між апікальною та базолатеральною ділянками плазматичної мембрани епітелію: ліпідним та білковим складом, транспортними ферментами, густиною та ін. Безсумнівно, білкам мембран, крім структурної та рецепторної функції, належить визначна роль в реалізації всіх тих складних процесів, які супроводжують явища травлення, всмоктування та секреції поживних речовин (Уголев, 1986; Tirupothi, 1986; Усатюк, 1994; Мельничук, 1995).

Видові та вікові характеристики об'єкту досліджень накладають свої особливості на спектр мембранних білків, активність гідролітичних ферментів, транспортних систем та ін. (Елецкий, 1979; Doering, 1990; Schmidt, 1993; Усатюк, 1994).

Білковий склад плазматичної мембрани епітелію тонкого кишечника великої рогатої худоби на час виконання нашої роботи не був вивчений, а наявність чотирьохкамерного шлунку у цього виду тварин обумовлює перерозподіл функціональної діяльності шлунково-кишкового тракту, що може проявлятися зміною активності і кількості певних ферментів, тобто білків. Тому вивчення білкового складу плазматичної мембрани епітелію тонкого кишечника великої рогатої худоби має теоретичне та практичне значення.

Особливий інтерес в останній час приділяється функціональним особливостям плазматичної мембрани новонароджених. Як відомо, для новонароджених телят характерне явище колострального імунітету, коли імуноглобуліни молозива всмоктуються через кишкову стінку в нативному стані протягом 1-1,5 діб після народження (Butler, 1983). Це передбачає особливу функцію як епітелію в цілому, так і плазматичної мембрани і її ділянок - апікальної і базолатеральної. **П.В.Видиш, В.В.Скофранюк** у перші два тижні життя серед новонароджених телят широко розповсюджені гострі розлади травлення та інші види захворювань.

Це часто пояснюють недостатнім імунним статусом цих тварин, що в свою чергу може бути пов'язано з порушенням білкового складу мембран ще при їх народженні. Тому вивчення особливостей білкового складу плазматичної мембрани епітелію тонкого кишечника новонароджених дозволить відповісти на ряд питань в галузі біохімії мембранного травлення.

Найбільш адекватним методичним прийомом для характеристики мембранних білків є метод електорофорезу в поліаріламідному гелі (ПААГ), який з використанням білків-стандартів молекулярних мас дає можливість якісної і кількісної їх характеристики. Використання гелів різної концентрації, дає змогу більш повно характеризувати групи білків різних молекулярних мас.

**Мета і завдання досліджень.** Виходячи з вищесказаного, мета нашої роботи - вивчити білковий склад апікальних і базолатеральних мембран епітелію тонкого кишечника дорослої великої рогатої худоби, особливості білкового складу плазматичної мембрани у новонароджених телят, а також можливу причетність білків плазматичної мембрани ентероцита новонароджених телят до формування у них колострального імунітету.

Для досягнення мети, були поставлені наступні завдання:

1. Дослідити білковий склад апікальної і базолатеральної мембран ентероцитів тонкого кишечника дорослої великої рогатої худоби.

2. Вивчити особливості білкового складу АМ і БМ ентероцитів тонкого кишечника телят у процесі їх постнатального періоду.

3. Провести порівняльну характеристику білкового складу плазматичної мембрани епітелію тонкого кишечника дорослої ВРХ, новонароджених телят у постнатальному періоді та новонароджених телят при народженні.

**3. Наукова новизна роботи.** Вперше для великої рогатої худоби вивчено білковий склад апікальних і базолатеральних мембран епітелію тонкого кишечника різних вікових груп тварин.

Встановлено якісні та кількісні відмінності білкового складу між апікальними та базолатеральними мембранами епітелію тонкого кишечника великої рогатої худоби у всіх піддослідних групах тварин.

Встановлено певні особливості білкового складу АМ та БМ у новонароджених телят на момент народження, порівняно з тваринами триденного віку. В обох ділянках плазматичної мембрани епітелію тонкого кишечника телят на момент народження знайдено характерні, добре виражені білки, які у телят триденного віку, що отримували молозиво за звичайним раціоном, не виявляються. На основі здобутих даних зроблено припущення, що виявлені білки можуть мати відношення до транспорту імуноглобулінів молозива

через кишкову стінку, тобто беруть участь у формуванні колострального імунітету новонароджених телят.

**Теоретичне і практичне значення роботи.** Здобуті дані, що до білкового складу плазматичної мембрани епітелію тонкого кишечника великої рогатої худоби будуть використані в подальших дослідженнях процесів мембранного травлення, при вивченні функціональної ролі знайдених білків.

Отримані дані значно поглиблюють розуміння механізмів проникнення імунних глобулінів молозива через кишкову стінку у внутрішнє середовище організму новонароджених телят та можуть бути використані для пояснення етіології імунodefіцитних станів у новонароджених тварин і бути основою для науковообґрунтованого добору методів підвищення імунного статусу новонароджених телят.

**Основні положення, що виносяться на захист.**

1. Вивчено білковий склад АМ і БМ епітелію тонкого кишечника великої рогатої худоби та його особливості в залежності від віку та стадії постнатального періоду.

2. Встановлено особливості білкового складу АМ і БМ епітелію тонкого кишечника в постнатальний період розвитку телят у порівнянні з дорослими тваринами.

3. Встановлено, що у телят на момент народження білковий склад плазматичної мембрани епітелію тонкого кишечника має якісні та кількісні відмінності як від дорослих тварин, так і від новонароджених у неонатальному періоді.

4. На основі отриманих результатів досліджень пропонується доповнення існуючої концепції щодо механізму переносу імуноглобулінів молозива через кишкову стінку у внутрішнє середовище організму новонароджених телят.

**Апробація роботи.** Матеріали дисертації доповідались на: Всесоюз. симп. "Биохим. с.-х. животных и прод. прог." (Київ, УСГА, 1989), IV - Українському біохімічному з'їзді (Київ, УСГА, 1992), науковій конференції професорсько - викладацького складу та аспірантів "Проблеми агропромислового комплексу: пошук, досягнення" (Київ, 1993), Українській конференції молодих вчених: "Сучасні проблеми ветеринарної медицини" (Київ, 1994), Науковій конференції професорсько - викладацького складу та аспірантів "Проблеми агропромислового комплексу: пошук, досягнення" (Київ, 1994, 1995).

**Публікація результатів досліджень.** За матеріалами дисертації опубліковано 5 наукових робіт.

**Структура і обсяг роботи.** Дисертація викладена на 167 сторінках машинописного тексту, містить 21 табл., 49 малюнків і складається з вступу, огляду літератури, матеріалів власних

досліджень, висновків, та списку використаної літератури з 182 джерел, серед яких 142 іноземних.

**Декларація конкретного особистого внеску.** Автор приймала участь в розробці методу отримання ізольованих клітин епітелію тонкого кишечника (гістологічні та біохімічні дослідження). Власноручно провела всі дослідження за методиками, описаними в дисертаційній роботі: отримання ізольованих клітин епітелію тонкого кишечника, отримання апікальних та базолатеральних мембран, вивчення білкового складу апікальних та базолатеральних мембран епітелію тонкого кишечника трьох піддослідних груп тварин методом електрофорезу в поліакріламідному гелі різної концентрації. Автором особисто проведено математичну обробку всього цифрового матеріалу.

## ОБ'ЄКТ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

В дослідях використовувалася велика рогата худоба чорно-рябї породи учгопу "Великоснітинський" Фастівського району Київської області. З дослідних тварин були сформовані групи-аналоги клінічно здорових тварин віком 3-5 років, новонароджених телят у віці три доби і тільки що народжених телят (до випойки молозива). Новонароджені, клінічно здорові телята в кількості 4 голів використовувались у день народження зразу ж після появи смоктального рефлексу.

Попередньо був розроблений метод для отримання суспензії ізольованих клітин епітелію тонкого кишечника. Для цього, використовуючи різні діючі дезагрегуючі фактори на кишечну стінку (колагеназу, акризим-3, гіалуронідазу та цитрат/ЕДТО метод), різний час інкубації, кількість отриманих клітин по біохімічних та морфолого-гістохімічних характеристиках були встановлені оптимальні умови для злушування функціональних клітин епітелію з краю кишечної ворсинки. Враховуючи однакову ефективність хімічного (цитрат/ЕДТО) методу з ферментативними (колагеназа, акризим-3, гіалуронідаза) та відсутність можливого ензиматичного пошкодження мембранних білків в роботі був використаний "цитрат-ЕДТО-метод".

Процедура отримання епітеліальних клітин: а) з ділянки порожньої кишки видаляли вміст, промивали розчином Рінгера, рН 7,4, 6-8° С, після чого інкубували в середовищі "А", що складається з 96 мМ NaCl, 1,5 мМ KCl, 27 мМ цитрат-Na, 5,6 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , рН 7,3. Через 10 хв. ділянку кишечника перенесли на 15 хв. в середовище "Б" складом: 140 мМ NaCl, 16 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,5 мМ ЕДТО, 0,5 мМ дітіотрейтол, рН 7,3; б) з отриманої суспензії, клітини осаджали на протязі 5 хв. в куттовому

роторі при 500 г з дворазовим промиванням середовищем "В", що складається з 120 мМ NaCl, 4,7 мМ KCl, 10 мМ HEPES-TPIC, 1,2 мМ MgSO<sub>4</sub>, 1,2 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 мМ CaCl<sub>2</sub>, 15 мМ NaHCO<sub>3</sub>, 100 мМ манніту, розбавляли фізіологічним розчином до концентрації 2,5 мг/мл білка і зберігали в рідкому азоті, як описано раніше (Томчук та ін., 1990).

Отримання АМ і БМ проходило в декілька етапів: 1). Суспензію епітеліальних клітин об'ємом 135 мл (0,8-1 гр.білку) гомогенізували в ножовому гомогенізаторі МР-302 в середовищі "А" складом: 5 М EDTO, TPIC - HCL, рН 7,4, 0,25 М сахароза при 12,5 тис.об. на протязі 20 сек. 2). Низькошвидкісне центрифугування гомогенату кишкового епітелію для розділення мембран АМ і БМ від супутніх субклітинних органел. 3). Загальну фракцію АМ отримували шляхом цинтрифугування при 15 тис. g (осад) на протязі 60хв., а загальну фракцію БМ (осад) - при 70 тис. g, на протязі 60 хв. 4). Очистку загальних фракцій АМ і БМ здійснювали на градієнті густини сахарози в межах 30; 35; 40; 43; 45; 46,5; 48 та 50% для апікальних мембран та 20;25; 31,5; 33, 35 і 40% для базолатеральних (Цвіліховський, Усатюк, Мельничук, 1988).

Оцінку чистоти та забруднення мембран проводили по активності маркерних ферментів, АМ - по активності лужної фосфатази, БМ - по активності Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> -АТРази (Murer, 1976).

Концентрацію білка в гомогенаті визначали по методу Лоурі і спів. (Lowry, 1951). Фракційний склад білків АМ і БМ визначали методом електрофорезу по Лемлі (Laemmly, 1970). З цією метою використовували систему електрофорезу АВГЕ-1 фірми "Хийу-Каллур" (Естонія), яка забезпечує розділення білків за принципом вертикального гель-електрофорезу в поліакріламідному гелі. Проби для електрофорезу готували змішуванням гомогенату АМ і БМ з TPIC-HCL буфером (рН 6,8), що містить 10% розчин гліцерину, 2% розчин додецилсульфата натрію і 3% розчин β-меркаптоетанолю.

Розділяючий гель готували на 0,375 М TPIC-HCL буфері (рН 8,8), що містить 0,1% розчин додецилсульфата Na. Застосовували розділяючі гелі 5%, 7,5% і 15% концентрації. Концентруючий гель готували на 0,125 М TPIC - HCL буфері (рН 6,8), який містить 0,1% розчин додецилсульфата Na. Кінцева концентрація геля - 4%, а для 5% - розділюючого геля застосовували 3% концентруючий гель. В лунки вносили 20-25 мкл проби. Електродним буфером служив 0,025 М TPIC-HCL буфер (рН 8,3), що містить 0,192 М розчин гліцину і 0,1% розчин додецилсульфата натрію.

Денситометрію гелів проводили на спектрофотометрі Specord M - 40 з використанням оптикомеханічної приставки для сканування гелів (Gel- scanning). Математичну обробку отриманих денситограм

здійснювали на Specord M - 40, використовуючи програму Gel-Scanning integrathion.

В якості маркерних білків використовували білки стандарти молекулярних мас для електрофорезу - 66, 45, 36, 29, 24, 20, 14, 1 кД (MW-SDS-70L Kit, Sigma, США) та ліофілізовану суміш цих білків, а також - 29, 45, 66, 97, 4, 116, 205 кД - (MW-SDS-200 Kit, Sigma, США) та ліофілізовану суміш цих білків.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

### БІЛКОВИЙ СКЛАД ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ ЕПІТЕЛІЮ ТОНКОГО КИШЕЧНИКА ДОРОСЛОЇ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

За даними ЕФ в 7,5% ПААГ нами отримано електрофоретичну картину білків апікальних мембран дорослих тварин, яка включає 23 білкових фракції (рис. 1) в межах від 200 до 16 кД (табл. 1).

Денситометрія гелів (рис. 1) дозволила згрупувати білки апікальних мембран епітелію тонкого кишечника великої рогатої худоби у 10 слідуєчих класів на основі електрофоретичної картини і молекулярної маси (кД): А (більше 200); В (199-150); С (149-90); D (89-70); Е (69-60); F (59-51); G (50-44); Н (43-29); К (28-20); L (менше 19).

Виходячи з ролі АМ епітелію тонкого кишечника в травленні, транспорті та секреції речовин, використовуючи дані літератури, можна припустити функціональну роль окремих знайдених білків на основі відомих молекулярних мас.

Перша і друга високомолекулярні білкові фракції, очевидно являють собою гідролітичні ферментні комплекси, такі як - мальтаза-глюкоамілаза (Seetharam, 1977; Lee, 1980; Sorensen, 1982; Tirupothi, 1986), сахараза-ізомальтаза

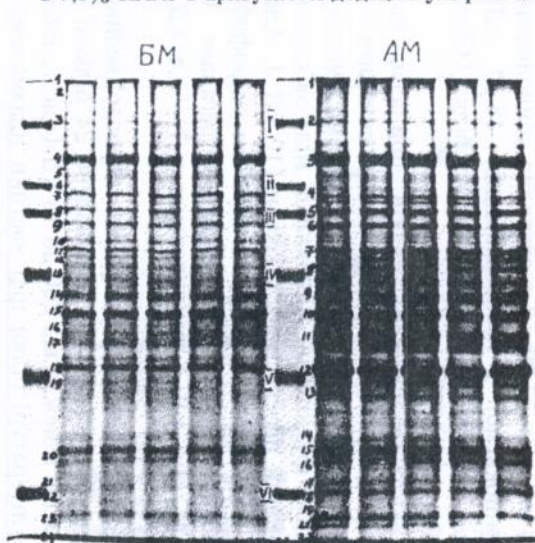
(Kenney, 1970; Cogolli, 1972; Cowell, 1986; Tirupothi, 1986) та високомолекулярні гідролітичні ферменти (Sylviane, 1986; Schmidt, 1993).

Група структурних білків апікальних мембран та скоротливого апарату мікрворсинок може бути представлена міозинподібним білком (110кД), актином (44кД), віліном (94кД) та фімбрином (66кД) (Kenney, 1978; Bretcher, 1980; Danielsen, 1980; Matsudaira, 1982; Cowell, 1985; Broschat, 1986; Coudrier, 1988; Doering, 1990; Haden, 1990).

До фракції 80 кД можуть входити різноманітні білки з відповідною молекулярною масою, що підтверджується її високим вмістом. Це, перш за все може бути гідролітично-транспортний білок  $\gamma$ -глутамілтрансфераза (Maestracci, 1975; Nakamura, 1985) та

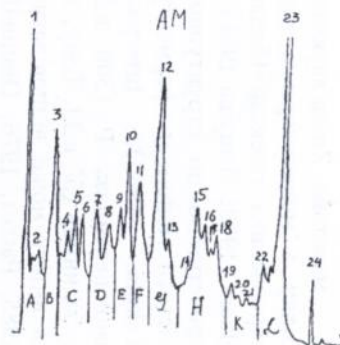
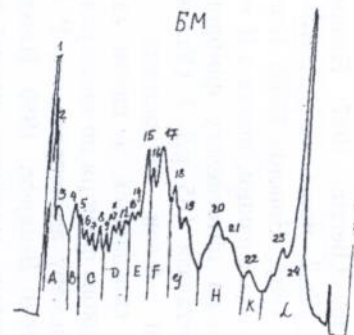
Фракції АМ	Мол. маса (кД)		Фракції БМ
	АМ	БМ	
1	>>> 200	>>> 200	1
2	>> 200	>> 200	2
	-	> 200	3
3	160	160	4
	-	130	5
	-	115	6
4	110	110	7
5	100	-	
6	94	94	8
	-	88	9
	-	81	10
7	80	80	11
8	72	72	12
	-	68	13
9	66	66	14
10	60	60	15
	-	58	16
11	55	55	17
12	47	47	18
13	44	44	19
14	37,5	-	
15	35	35	20
16	32	-	
17	30,5	30,5	21
18	29	-	
19	26	26	22
20	24	-	
21	22	-	
22	18	18	23
23	<18	<18	24

1. Характеристика білкових фракцій АМ та БМ ентероцитів тонкого кишечника дорослих тварин за даними електрофорезу в 7,5% ПААГ в присутності додецилсульфата натрія



Позначення:

а, б, в, г, д, - проби мембран різних тварин;  
 1 - 23 - окремі білкові фракції;  
 М - білки - стандарти молекулярних мас (кД);  
 I - 205; II - 116; III - 97,4; IV - 66; V - 45; VI - 29;  
 А, В, С, D, E, F, G, H, K, L - окремі класи білків.



можливо Zn-зв'язуючий білок (Berzin, 1987; Nempе, 1989). Білку з молекулярною масою 72кД може відповідати мономер переносника глюкози (Semenza, 1983; Honold, 1988; Bruce, 1990; Naase, 1990; Hirayama, 1994). Дев'ята фракція, поряд з її можливою причетністю до структурного білка цитоскелету фімбрина, може містити мономери ферменту трегалази (65 кД ) (Уголев, 1986; Yokota, 1986). Інтегральний білок апікальних мембран амінопептидаза Р (300 кД ) складається з шести ідентичних субодиниць (55 кД). Тому, 11 білкова фракція по молекулярній масі та вмісту може відповідати мономеру амінопептидази Р (Maroux, 1985; Pattus, 1976; Desnuelle, 1979; Benajeba, 1980; Hassain, 1981; Hasegawa, 1985), так як і 10 фракція - мономеру лужної фосфатази (Malik, 1977; Mc Comb, 1979; De Jong, 1981; Arens, 1988) або Fe - переносячому білку (Уголев, 1986; Морозов, 1988).

Група білків в межах 37-29 кД є очевидно компонентами білків-переносників амінокислот і моносахаридів, 18-22 кД - по молекулярній масі відповідає Са-зв'язуючому білку (Glenny, 1980; Howe, 1980; Egungula, 1987).

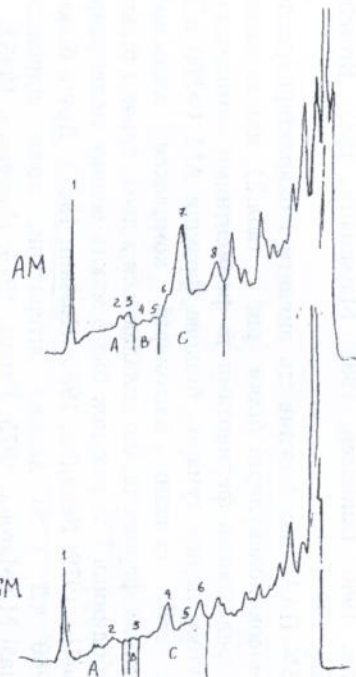
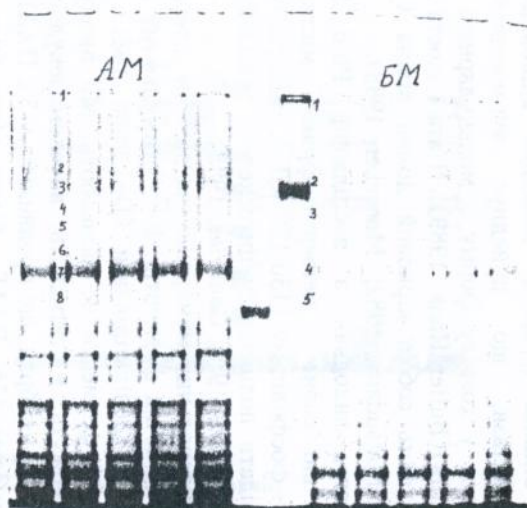
Значна кількість мембранних білків припадає на зону з молекулярною масою менше 16 кД . Це можна пояснити існуванням в апікальних мембранах білків з однаковими молекулярними масами, але різними функціями. Наприклад, мідь зв'язуючого білка (15 кД ), субодиниці переносника глюкози (10 кД ). Але основну долю цієї фракції, очевидно, беруть на себе гідрофобні якірні сегменти різних гідролітичних ферментів - трегалази (5 кД , амінопептидази М (4,5 кД ), амінопептидази N (3,8 кД ) та ін. (Уголев, 1986; Морозов, 1988).

В базолатеральній мембрані еритроцита дорослої великої рогатої худоби за даними ЕФ в 7,5% ПААГ виявлено 24 білкові фракції з молекулярною масою в межах від 200 до 18 кД (рис.1, табл.1). Слід відмітити, що в літературі білки цієї частини плазмалеми епітелію охарактеризовані недостатньо. Особливо це стосується низькомолекулярних і високомолекулярних білків. Відомо, що  $Na^+K^+$ - АТРаза, що є маркерним ферментом базолатеральних мембран має молекулярну масу 100-110кД . Можливо, сьома білкова фракція відповідає саме цьому ферменту (Murer, 1976). Са, Mg - АТРаза за даними літератури має молекулярну масу 115 кД (De Jong, 1981) . Тому, 6 білкова фракція по молекулярній масі може відповідати даному ферменту.

Білки цитоскелету присутні і в базолатеральних мембранах. Група структурних білків базолатеральних мембран може бути представлена віліном (94 кД ) - восьма фракція, фімбрином (68 кД ) - тринадцята фракція і актином (44 кД ) - дев'ятнадцята фракція

2. Характеристика високомолекулярних білкових фракцій  
 АМ та БМ ентероцитів тонкого кишечника дорослих тварин  
 за даними електрофорезу в 5% ПААГ в присутності  
 додецилсульфата натрія

Фракції АМ	Мол. маса (кД)		Фракції БМ
	АМ	БМ	
1	>300	>300	1
2	280	280	2
3	215	-	
4	176	-	
	-	160	3
5	153	-	
6	141	141	4
7	133	-	
	-	118	5
	-	116	6
8	113	-	



Позначення:

- а, б, в, г, д, - проби мембран різних тварин;
- 1 - 18 - окремі білкові фракції ;
- M<sub>1</sub> - білок - стандарт з молекулярною масою 116 кД;
- M<sub>2</sub> - білок - стандарт з молекулярною масою - 205 кД;
- А, В, С - окремі класи білків.

(Bretcher, 1980; Danielsen, 1980; Matsudaira, 1982; Broschat, 1986; Doering, 1990).

ЕФ в 5% ПААГ дав можливість виявити і охарактеризувати в основному високомолекулярні білки (рис.2, табл.2), які за даними літератури представлені ферментами та ферментними комплексами. На нашу думку перша сумарна білкова фракція АМ (>300 кД ) містить у собі складні олігомерні комплекси апікальних трансмембранних ферментів, що складаються з двох, трьох і більшої кількості субодиниць і за рахунок цього мають велику молекулярну масу (Desnuelle, 1979; Benajiba, 1980; Hussain, 1981). Друга білкова фракція (280 кД ) за даними літератури, може відповідати амінопептидазі М (Maroux, 1975; Pattus, 1976; Hasegawa, 1985).

Третя білкова фракція, можливо відповідає попереднику гідролази лактази, що приєднує вуглеводний залишок і перетворюється у дозрілу форму з молекулярною масою 130 кД (сьома фракція)(Buller Hans, 1989). П'ята і шоста білкові фракції можливо являють собою кірковий домен віліна (Bretcher, 1980; Young, 1981; Matsudaira, 1982; Mooseker, 1983).

Крім того, виходячи з досліджень Pind Steven, можна припустити, що сьома і четверта фракції містять мембранний глікопротеїн- фосфоліпазу (130-170 кД ). Шоста білкова фракція може відповідати поліпептиду цитоскелета з молекулярною масою 140 кД (Matsudaira, 1982; Coudrier, 1983).

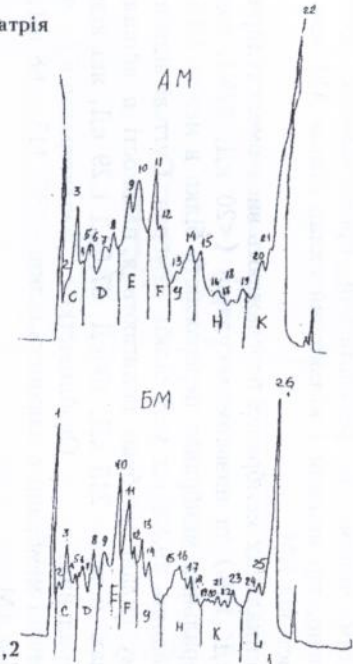
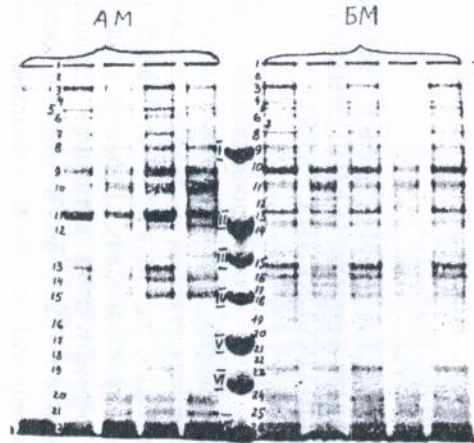
В базолатеральних мембранах за даними літератури виявлено активності слідуючих ферментів:  $K^+$  - стимулюючої фосфатази, 5' - нуклеотидази і аденілатциклази (De Jong, 1981). В апікальних мембранах дані ферменти не виявляють. Ми припускаємо, що ці ферменти можуть міститися в високомолекулярних фракціях базолатеральних мембран, що проявилися у 5% ПААГ.

За допомогою 15% ПААГ більш чітко були ідентифіковані низькомолекулярні білки апікальних мембран (рис.3, табл.3) . На нашу думку білки, виявлені додатково за допомогою 15% ПААГ можуть відноситися до білків цитоскелета, транспортних білків та мономерів гідролітичних ферментів.

Вілін - глобулярний мономерний білок, який володіє областю зв'язування  $Ca$  та бере участь у везикуляції мембран складається з двох доменів - кіркового, з молекулярною масою 84 кД та головного, з молекулярною масою 8,5 кД . Двадцять перша білкова фракція також може бути причетна до  $Ca$ -зв'язуючого білка - кальмодуліна з молекулярною масою 16,7 кД, якій регулює внутрішньоклітинні процеси обміну циклічних нуклеотидів, обміну глікогена, а також є регулятором скорочувальної активності клітини (Glenny, 1980; Howe, 1980; Egungula, 1987). Існування інших маловивчених мембранних білків залишається дискусійним.

3. Характеристика низькомолекулярних білкових фракцій АМ та БМ ентероцитів тонкого кишечника дорослих тварин за даними електрофорезу в 15% ПААГ в присутності додецилсульфата натрія

Фракції	Мол. маса (кД)		Фракції
	АМ	БМ	
1	>120	>120	1
2	115	115	2
3	105	105	3
4	90	90	4
5	84,5	84,5	5
6	84	84	6
7	-	78	7
8	72	72	8
9	66	66	9
10	61	61	10
11	55	55	11
12	-	52	12
13	48	48	13
14	45	45	14
15	36	36	15
16	34	34	16
17	-	32	17
18	31,5	31,5	18
19	-	31	19
20	27,5	27,5	20
21	26	26	21
22	24	24	22
23	21	21	23
24	19	19	24
25	-	17,5	25
26	16	-	26
27	<13,5	<13,5	27



Позначення:

1 - 22 - окремі білкові фракції;

М - білки - стандарти молекулярних мас (кД);

I - 66; II - 45; III - 36; IV - 29; V - 24; VI - 20,1; VII - 14,2

A, B, C, D, E, F, G, H, K, L - окремі класи білків.

Таким чином, за результатами представлених досліджень встановлено, що якісний і кількісний склад білків АМ має значні відмінності від БМ.

В апікальних мембранах переважають високомолекулярні білки (>200 кД, 13%) та низькомолекулярні (<20 кД, 22%), тоді як в базолатеральних мембранах переважають білки в межах 60-18 кД, які становлять 49,8% від усіх білків мембран. Суттєві відмінності в білковому складі мембран полягають в наявності в апікальних мембранах білків - 215 кД, 100кД, 37,5кД і 29 кД, які відсутні в базолатеральних. Особливістю базолатеральної частини плазматичної мембрани є наявність білків - 130; 115; і 68 кД, які не виявлені в АМ.

Встановлені відмінності, очевидно, відображають різну структуру та функціональну роль двох ділянок плазматичної мембрани епітелію тонкого кишечника: гідролітичні ферменти, транспортні білки, рецептори та ін.

### БІЛКОВИЙ СКЛАД ПЛАЗМАТИЧНОЇ МЕМБРАНИ ЕПІТЕЛІЮ ТОНКОГО КИШЕЧНИКА НОВОНАРОДЖЕНИХ ТЕЛЯТ

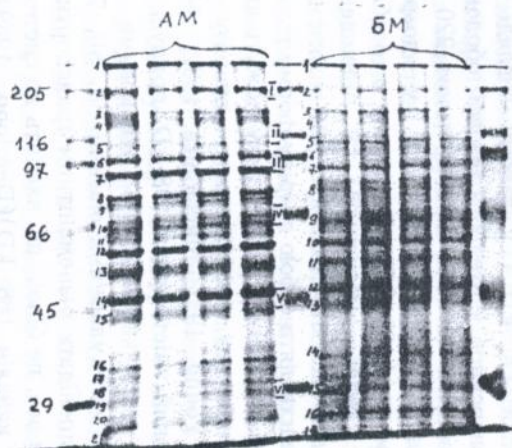
Особливий інтерес представляли дослідження білкового складу плазмалеми ентероцитів новонароджених телят.

Постнатальний період людини і тварин характеризується особливим типом харчування та годівлі - молозивний період. Це накладає особливості на функціональну діяльність травного каналу: низька секреторна та ферментативна активність шлунка (сичуга), високий рівень мембранного травлення в тонкому кишечнику, та активний ендоцитоз в епітелії на рівні апікальної мембрани та ін.(Морозов, 1988). У новонароджених великої рогатої худоби, крім того, відомий феномен колострального імунітету, пов'язаний із всмоктуванням імунних глобулінів в нативному стані. Передбачається, що в цьому процесі можуть приймати участь високомолекулярні структури апікальної ділянки плазматичної мембрани епітелію тонкого кишечника. Активність деяких ферментів також має вікову залежність. Все це передбачає можливі особливості білкового складу апікальних і базолатеральних мембран епітелію тонкого кишечника у новонароджених тварин.

В апікальних мембранах ентероцитів тонкого кишечника телят триденного віку за даними ЕФ в 7,5% ПААГ виявлено 21 білкову смугу, що відповідають поліпептидам з молекулярною вагою в межах від 200 до 24 кД(рис.4,табл.4).

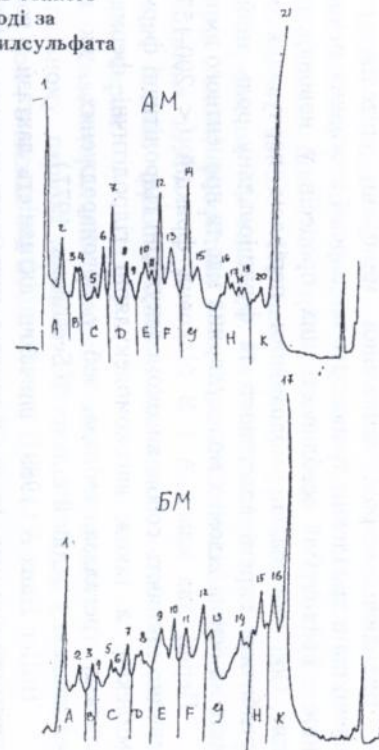
Фракції	Мол. маса (кД)		Фракції
	АМ	БМ	
1	>>200	>>200	1
2	>200	>200	2
3	155	155	3
4	135	135	4
	-	113	5
5	107	107	6
6	98	-	
	-	92	7
7	88	-	
8	80	80	8
9	78	-	
	-	69	9
10	66	-	
11	63	63	10
12	58	58	11
13	53	53	12
14	46,5	46,5	13
15	44	44	14
16	34,5	-	
17	34	34	15
18	32	-	
19	31	-	
20	28	28	16
21	<24	<24	17

4. Характеристика білкових фракцій АМ та БМ ентероцитів тонкого кишечника новонароджених телят в постнатальному періоді за даними електрофорезу в 7,5% ПААГ в присутності додецилсульфата натрія



Позначення:

- а, б, в, г, д, - проби мембран різних тварин;
- 1 - 21 - окремі білкові фракції ;
- М - білки - стандарти молекулярних мас (кД);
- I - 205; II - 116; III - 97,4; IV - 66; V - 45; VI - 29.



Виходячи з ролі апікальної мембрани епітелію тонкого кишечника в травленні, транспорті та секретії поживних речовин, а також враховуючі особливості цих процесів у новонароджених телят, які обумовлені молозивним періодом харчування можна передбачити окремі властивості та функціональну роль знайдених білків на основі відомих молекулярних мас та процентного вмісту.

Перші два класи А і В білкових фракцій (< 200-155 kD) очевидно являють собою високомолекулярні гідролітичні ферментні комплекси, а також високомолекулярні гідролітичні ферменти - мальтаза, трегалаза, амілаза, які у новонароджених як відомо представлені у великій кількості (Seetharam, 1977).

Büller Hans A. (1989), вивчаючи активність лактази у тонкому кишечнику відмічав, що ця гідролаза синтезується у вигляді білка з молекулярною масою 205 kD, а потім гліколізується, досягаючи молекулярної маси 220 kD і у такому вигляді вбудовується у мембрану мікрворсинок епітелію слизової оболонки кишечника. Попередник гідролази з молекулярною масою 220 kD у мембрані підлягає гідролізу і перетворюється у дозрілу форму з молекулярною масою 130 kD. Виходячи з особливості раціону новонароджених телят (молозиво) та підвищеної потреби у ферментах, що гідролізують молозиво, ми вважаємо, що фракція 135 kD може представляти собою дозрілу форму гідролази лактази.

Дві наступні фракції на нашу думку можуть входити до групи структурних білків та скоротливого апарату мікрворсинок (Bretcher, 1980; Young, 1981; Matsudaira, 1982; Mooseker, 1983). Враховуючи високий вміст фракції 98 kD, припускаємо, що до неї входять одразу декілька білків з однаковими молекулярними масами. Білки з молекулярними масами 88, 80, 78 kD на нашу думку можуть відповідати різноманітним транспортно-гідролітичним білкам. Перш за все, це білок, що входить до системи регуляції Cl-транспортуючих каналів (88 kD) (De Jong, 1989), гідролітично-транспортний білок  $\gamma$ -глутамілтрансфераза (Nakamura, 1985) і можливо Zn-зв'язуючий білок (Berzin, 1987; Nempе, 1989). До 9 фракції (78 kD) можуть входити транспортні білки - білок-переносник мономера глюкози, та білок, що забезпечує активний транспорт жовчних кислот (Kramer, 1983; Semenza, 1983; Honold, 1988; Bruce, 1990; Hirauma, 1991; Hofmann, 1991). Десята фракція (66 kD), може містити білок цитоскелета-фімбрин (Mretcher, 1981). Крім того, не виключається присутність в цій зоні мономеру ферменту трегалази (65 kD) (Уголев, 1986; Yokota, 1986). За даними літератури фракція 63 kD може бути представлена переносником кобаламіну (Ramanujam, 1990). Білок з молекулярною масою 58 kD може відповідати маркерному білку AM - лужній фосфатазі (De Jong, 1981; Stinson, 1981; Tardivel, 1981;

Agens, 1988). Фракція 53 kD одна з найбільших за вмістом, тому можливо містить у собі декілька різних білків. Можливо до цієї фракції входить білок, що транспортує іони  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  (Stremmel, 1987; Берзін, 1990). На нашу думку фракція 46,5 kD може містити переносник  $Na^+$ -глюкози. Не виключається присутність в ній мономерів лужної фосфатази (Semenza, 1983; Honold, 1988; Druce, 1990; Hirayama, 1991).

Інші білкові фракції близькі до таких, які описано для дорослих тварин.

В базолатеральних мембранах ентероцита телят в постнатальному періоді методом ЕФ в 7,5% ПААГ виявлено 17 білкових зон, в межах від 200 до 24 кД (рис.4, табл.4).

В БМ переважають білки в межах 80-28 kD. Як відомо з даних літератури в цих межах знаходяться в основному транспортні білки та білки цитоскелета мембрани (Уголев, 1986; Coudrier, 1988; Берзін, 1990; Doering, 1990; Haden, 1990; Hofmann, 1991).

Виходячи з основної функції БМ, що полягає в підтриманні електролітного гомеостазу клітини, очевидно, що для складу білків БМ, характерна наявність АТРаз. Шоста білкова фракція (107 kD) можливо відповідає  $Na^+$ ,  $K^+$  АТРази. П'ята білкова фракція може являти собою  $Ca$ ,  $Mg$  - АТРази (Murer, 1976; De Jong, 1981).

Виходячи з даних літератури білкова фракція 80 кД може відповідати ферменту  $\gamma$ -глутамілтрансферазі, активність якого в БМ епітелію добре відома (Maestrassi, 1975; Nakamura, 1985).

Повідомляється, що неактивні мономери лужної фосфатази в БМ мають молекулярну масу 70 kD, тому ми припускаємо, що дев'ята фракція може містити цей фермент (De Jong, 1981).

Для характеристики високомолекулярних і низькомолекулярних білків ми провели ЕФ АМ та БМ епітелію тонкого кишечника тварин у 5% та 15% ПААГ. За допомогою 5% проаналізовано п'ять високомолекулярних фракцій АМ та БМ, які доповнили класи А і С.

Електрофорез в 15% ПААГ дав можливість більш повно охарактеризувати низькомолекулярні білки апікальної мембрани.

Таким чином, проведеними дослідженнями встановлено, що білковий склад АМ новонароджених телят, як і дорослих тварин відрізняється від БМ :

1)-за кількістю фракцій - в АМ -21 чітко виражена білкова фракція, в БМ -17;

2)-за процентним вмістом окремих фракцій - в АМ виділяються п'ять білкових фракцій: 2-210 кД, 6-98 кД, 7-88 кД, 12-58 кД, 14-46,5 кД, яких за процентним вмістом в два рази більше ніж інших фракцій ; за вмістом білкові фракції БМ однорідні;

3)- білки, що виявляються тільки в АМ -98, 66, 32, 31 кД;

4)- білки, що виявляються тільки в БМ-92,69 кД.

З отриманих даних витікає, що ранній неонатальний період характеризується особливим білковим складом плазматичної мембрани епітелію тонкого кишечника новонароджених телят віком 3 доби у порівнянні з дорослими тваринами: а) білки АМ епітелію тонкого кишечника новонароджених телят 135; 63; 54; 14,5 і 11 кД не виявляються у дорослих тварин; б) білки БМ епітелію тонкого кишечника новонароджених телят- 219, 63 та 54 кД відсутні у дорослих; в) білки плазматичної мембрани епітелію тонкого кишечника дорослих тварин - 145; 72; 55; 37,5; 29 кД відсутні у новонароджених.

На нашу думку встановлені відмінності можуть відображати особливості молочивного періоду новонароджених тварин, низький рівень одних мембранних білків та високий рівень інших (ферменти, рецептори та ін.).

Що стосується припущення про можливу участь мембранних структур епітелію у всмоктуванні імунних глобулінів, то з отриманих даних не можна зробити висновку. Дійсно, підвищений рівень деяких білків в неонатальний період ще не дає стверджуючих підстав. Хоча використані в наших дослідженнях тварини віком 3-5 діб відносяться до неонатального періоду (молозивний період) в подальших дослідженнях ми поставили за мету використати тварин в момент народження (ще до першої їх годівлі). Це обумовлено наступними причинами: а)-максимальне всмоктування імуноглобулінів відбувається в першу добу і навіть перші години після народження; б)- щоб виключити вплив білків молозива на білковий спектр за рахунок їх включення в плазматичну мембрану епітелію.

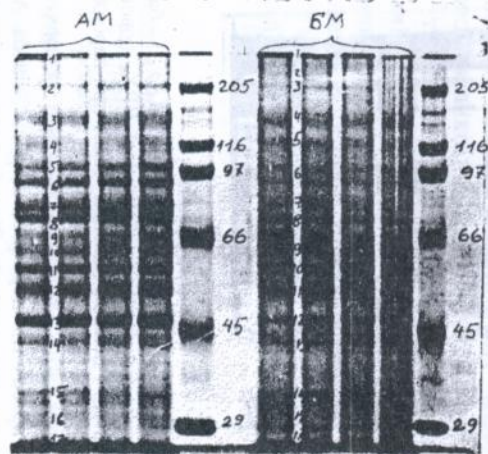
Тому, в наступній частині роботи було проведено детальний аналіз білкового складу апікальних та базолатеральних мембран епітелію тонкого кишечника тварин на момент народження до прийому молозива.

Кількісні параметри окремих білкових фракцій за даними ЕФ в 7,5% (рис.5, табл.5), 5%, та 15% ПААГ представлені в дисертації.

Якщо не торкатись детального перегляду білкових фракцій АМ та БМ як це було зроблено для новонароджених в 3 добовому віці, то за результатами цієї серії проведених досліджень можна виділити наступні відмінності та особливості: Перш за все, слід відмітити, що у телят на момент народження білковий склад плазматичної мембрани епітелію відрізняється від тварин віком 3 доби. В АМ та БМ епітелію щойнонароджених тварин нами встановлено наявність трьох нових білків. Аналіз їх електрофоретичної рухомості, молекулярної маси за даними гелів різної концентрації показує, що це білки, які відсутні у тридобових телят та дорослих тварин.

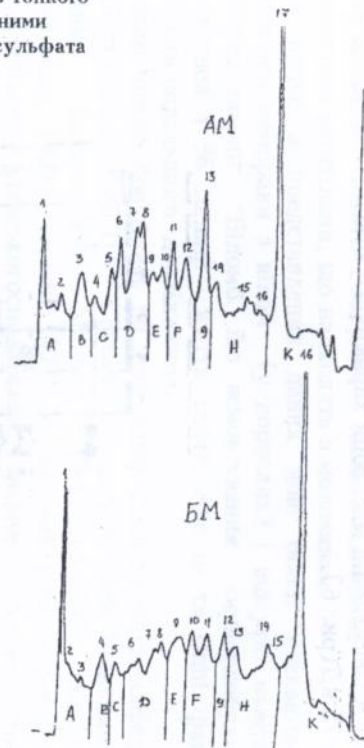
5. Характеристика білкових фракцій АМ та БМ ентероцитів тонкого кишечника новонароджених телят при народженні за даними електрофорезу в 7,5% ПААГ в присутності додецилсульфата натрія

Фракції	Мол. маса (кД)		Фракції
	АМ	БМ	
1	>>>200	>>>200	1
2	>>200	>>200	2
3	-	>200	3
4	160	160	4
5	125	125	5
6	103	-	6
7	89	89	7
8	83	83	8
9	75	75	9
10	68	68	10
11	64	-	11
12	59	59	12
13	53,5	53,5	13
14	46	46	14
15	42,5	42,5	15
16	-	35,5	16
17	-	34	17
18	32,5	-	18
19	30,5	-	19
20	<27,5	<27,5	20

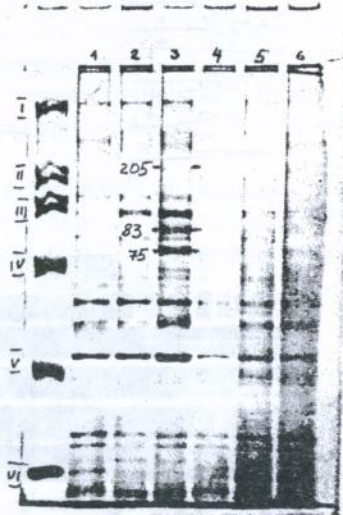


Позначення:

- а, б, в, г, д, - проби мембран різних тварин;  
 1 - 17 - окремі білкові фракції;  
 М - білки - стандарти молекулярних мас (кД);  
 I - 205; II - 116; III - 97,4; IV - 66; V - 45; VI - 29.



По молекулярній масі вони характеризуються :1-125 кД ;2 -83 кД ;  
3 - 75 кД(рис.6).



6. Електрофореграма білків апікальних (А) і базолатеральних (Б) мембран епітелію тонкого кишечника дорослої ВРХ, новонароджених телят у постнатальному періоді і новонароджених телят при народженні

Позначення:

М - білки стандарти молекулярних мас (кД ): I-205; II-116; III-97,4; IV-66; V-45; VI-29;1-проба АМ дорослих тварин; 2-проба АМ новонароджених телят у постнатальному періоді; 3-проба АМ новонароджених телят при народженні; 4-проба БМ дорослих тварин; 5-проба БМ новонароджених телят у постнатальному періоді; 6-проба БМ новонароджених телят при народженні.

На даний час невідомий механізм, за допомогою якого імуноглобуліни всмоктуються в нативному стані в перші години життя епітелієм тонкого кишечника. Якщо притримуватись гіпотези про рецепторний механізм транспорту імуноглобулінів через плазматичну мембрану епітелію тонкого кишечника, то закономірним буде припущення про можливу роль відкритих нами трьох білків в транспорті імунних глобулінів у новонароджених телят. Ми припускаємо, що білкові фракції 125кД, 83 та 75кД плазматичної мембрани тонкого кишечника являють собою аналоги Fc-рецепторів до імуноглобулінів на клітинах кишечника

новонароджених телят, завдяки яким пасивний імунітет підтримується антитілами, що надходять з молозивом.

Як видно з представлених даних нові білки зникають з плазматичної мембрани з віком (у дорослих) і відсутні навіть у тридобових тварин. Відомо, що всмоктування імуноглобулінів припиняється з 36 години життя телят. Але ці та інші факти потребують подальшого дослідження.

Таким чином, базуючись на попередніх дослідженнях кафедри біохімії та біотехнології НАУ (Тугай, Мельничук, 1989; Мельничук, Захаренко, Засекін, 1986; Малько, Любецька, 1986; Усатюк, Цвіліховський, 1990; Томчук, 1993) біохімічних шляхів регуляції обміну речовин у сільськогосподарських тварин та молекулярних механізмів патологічних процесів, в даній роботі було поставлено за мету вивчити білковий склад плазматичної мембрани епітелію тонкого кишечника великої рогатої худоби та особливості у новонароджених тварин. Отримані дані значно поглиблюють розуміння механізмів мембранного травлення, транспорту речовин та проникнення імунних глобулінів молозива через кишкову стінку у внутрішнє середовище організму новонароджених телят і можуть бути використані для пояснення етіології імунодефіцитних станів у новонароджених тварин.

### Висновки

1. На основі біохімічних та гістохімічних досліджень розроблено метод отримання суспензії ізольованих клітин епітелію тонкого кишечника великої рогатої худоби, як вихідного матеріалу для подальшого отримання високоочищених препаратів апікальних (АМ) та базолатеральних (БМ) мембран.

2. Вперше для великої рогатої худоби охарактеризовано білковий склад плазматичної мембрани епітелію тонкого кишечника за даними електрофореза в поліакріламідному гелі різної концентрації (5%, 7,5%, 15%).

3. Встановлено якісні та кількісні відмінності білкового складу двох ділянок плазматичної мембрани епітелію тонкого кишечника дорослої ВРХ, які полягають в наявності 4 білків (215; 100; 37,5; 29кД) характерних тільки для АМ та 3 білків (130, 115, 68кД), що виявлено тільки в базолатеральній частині плазматичної мембрани.

4. Вивчено білковий склад плазматичної мембрани епітелію тонкого кишечника новонароджених телят (віком 3 доби) та встановлено відмінності від дорослих: а) білки АМ епітелію тонкого кишечника новонароджених телят - 135; 63; 54; 14,5; 11кД не виявлено в АМ дорослих тварин; б) білки БМ епітелію тонкого

кишечника новонароджених телят - 219; 63; 54 кД відсутні у дорослих.

5. Встановлено, що у телят на момент народження білковий склад плазматичної мембрани епітелію тонкого кишечника відрізняється від тварин віком 3-5 діб. Особливістю плазматичної мембрани на момент народження є наявність трох нових білків (125, 83, 75кД), які відсутні у телят триденного віку та дорослих тварин.

6. За результатами досліджень описано білковий склад плазматичної мембрани епітелію тонкого кишечника великої рогатої худоби (дорослих та новонароджених тварин), які відображають різну функціональну роль в процесах мембранного травлення та особливості молозивного періоду. Висловлено припущення про можливу причетність білків плазматичної мембрани епітелію тонкого кишечника у формуванні колострального імунітету новонароджених телят.

### СПИСОК РОБІТ , ОПУБЛІКОВАНИХ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Мельничук Д.О., Усатюк П.В., Потоцький М.К., Терещенко М.П. Ізольовані клітини епітелію тонкого кишечника великої рогатої худоби: отримання, характеристика та метаболічна активність // В кн.Тез. доп. VI-Укр. біохімічний з'їзд.-Київ, УСГА-1992.с.68.

2. Терещенко М.П. Біохімічна та гістохімічна оцінка плазмалеми ізольованих клітин епітелію тонкого кишечника великої рогатої худоби. //Мат. доп. наук. конф. професорсько-викладацького складу та аспірантів "Проблеми агропромислового комплексу: пошук, досягнення".- Київ, 1993.- с. 85.

3. Цвіліховський М.І., Усатюк П.В., Захаренко М.О., Терещенко М.П., Мельничук Д.О. Білки апікальної та базолатеральної мембрани епітелію тонкого кишечника великої рогатої худоби за даними електрофорезу в поліакріламідному гелі // Мат. доп. наук. конф. професорсько-викладацького складу та аспірантів "Проблеми агропромислового комплексу: пошук, досягнення".- Київ, 1994.- с.67.

4. Мельничук Д.О., Терещенко М.П., Цвіліховський М.І., Усатюк П.В. Відмінності білкового складу двох ділянок плазматичної мембрани епітелію тонкого кишечника. //Доповіді Національної Академії наук України. - 1995, №9, с.104-106.

5. Melnichuk D.A., Tsvilichovsky N.I., Tereshchenko M.P., Usatiuk P.V. Proteins of two different regions of the intestinal epithelial cell membrane of the cattle and anew born calves. //In: Abstr. Ann. Meet. Amer. Soc. Anim. Sci.."Anim. Health. Pharm. and Toxicol. - 1994.- Minneapolis, USA.- Abst. numb. 398.

## АННОТАЦИЯ

Терещенко Марина Петровна.

Возрастные особенности белкового состава двух участков плазматической мембраны эпителия тонкого кишечника крупного рогатого скота.

Защищается рукопись диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 - биохимия.

Национальный аграрный университет, Киев, 1997.

Два участка плазматической мембраны, апикальный и базолатеральный, эпителия тонкого кишечника взрослого крупного рогатого скота и новорожденных телят исследованы методом электрофореза в полиакриламидном геле разных концентраций (5%, 7,5%, 15%).

Взвесь апикальных и базолатеральных мембран выделяли из гомогената эпителиальных клеток с помощью дифференциального центрифугирования. Очищение мембранных фракций проводили в градиенте густоты сахарозы.

В результате проведенных исследований охарактеризован белковый состав АМ и БМ эпителия тонкого кишечника крупного рогатого скота. Показано, что в ранний неонатальный период белковый спектр плазматической мембраны имеет особенности по сравнению со взрослыми животными. Установлено, что при рождении (возраст 1 час) в плазматической мембране, как в АМ так и в БМ, присутствуют новые белки - 125, 83, 75 кД. Высказано предположение о причастности новых белков к транспорту иммуноглобулинов через эпителий тонкого кишечника новорожденных

## SUMMARY

Tereshchenko Marina Petrovna.

Age features of two regions of the plasma membrane of the epithelial jejunal of the cattle and a new born calves.

The dissertation Manuscript for the competition of the Candidate of the Biochemistry Sciences scientific degree in the 03.00.04 specialization - biochemistry.

National Agriultural University, Kyiv, 1997.

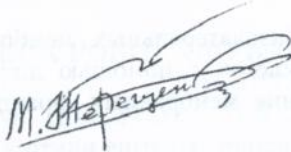
Two different parts of the plasma membrane, apical and basolateral, of jejunal epithelial cells of adult cattle and new born calves were analyzed to their protein components by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel (5%, 7,5%, 15%) electrophoresis.

Apical and basolateral membranes were isolated from the homogenate of the epithelial cell suspension preliminary obtained through the typical citrate - EDTA treatment using differential

centrifugation. Further purification of membrane fraction was accomplished by use of the sucrose density gradient.

As a result of conducted researches the protein composition of bovine small intestine epithelial plasma membrane was characterized. It was shown that protein spectra of plasma membrane has some features at neonatal period as compared with adult animals. New proteins - 125, 83 and 75 kD presents in AM and BM of small intestine plasma membrane of new born cattle (age 1 hour). It is concluded, that these new proteins take part in immunoglobulins transport through the small intestine epithelium at newborn animals.

**Ключові слова:** апікальна мембрана, базолатеральна мембрана, тонкий кишечник, білки.



M. H. Hryshchenko



...the ... ..

...the ... ..

...the ... ..

...the ... ..

...the ... ..

...the ... ..

...the ... ..

...the ... ..

...the ... ..

...the ... ..

...the ... ..

...the ... ..

...the ... ..

...the ... ..

---

Подписано к печати 12.12.96г. Формат 60x84/16.  
Объем: 1.0 усл.-печ.л., 1.0 уч.-изд.л.  
Тираж 100. Заказ 102.

---

Типография во Флоровском монастыре  
тел. 416-54-62

**AB 36.432**